

생리혈에 존재하는 자궁내막조직에서 자궁내막증 관련 유전자의 발현 양상

관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과 생식내분비 및 불임분과¹, 생식생물학 및 불임연구실²

박찬우¹ · 전진현^{2*} · 궁미경¹ · 송인옥¹

Expression of Endometriosis Related Genes in the Shed Endometrial Tissues from Menstrual Blood

Chan Woo Park¹, Jin Hyun Jun^{2*}, Mi Kyoung Koong¹, In Ok Song¹

¹Division of Reproductive Endocrinology & Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology

²Laboratory of Reproductive Biology & Infertility Cheil General Hospital

Kwandong University College of Medicine, Seoul

Objective: This study was performed to investigate the expressions of endometriosis related genes in shed endometrial tissues from menstrual blood of patients with or without endometriosis.

Methods: The shed endometrial tissues were collected on 2nd or 3rd day of menstrual cycle with Wallace catheter in patients with endometriosis (n=16) and without endometriosis (n=26). The mRNA expressions of twelve kinds of endometriosis related genes were compared between two groups using semi-quantitative RT-PCR.

Results: The collected shed endometrium was confirmed by histological observation. Expressions of *telomerase*, *c-kit* and *aromatase* mRNA were not detected by RT-PCR in shed endometrial tissues. The mRNA expressions of apoptosis related genes (*fas*, *fas ligand*, *bcl-2*, *bax*), *stem cell factor*, *estrogen receptor- α* , *endometriosis protein-1* and *secretory leukocyte protease inhibitor* gene were similar between shed endometrial tissues with endometriosis and without endometriosis.

Conclusion: We could not find the difference of mRNA expressions of tested endometriosis related genes between shed endometrial tissues with or without endometriosis by semi-quantitative RT-PCR analysis. It may be related to the dynamical changes of gene expressions in the endometrium with menstrual cycle.

[Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(4): 275-283.]

Key Words: Endometriosis, Shed endometrial tissues, mRNA expression, Semi-quantitative RT-PCR

자궁내막증은 자궁내막조직이 자궁 외에 존재하여 생리통을 비롯한 골반통 및 불임 등의 다양한 증상을 유발하는 질환으로 전체 여성의 1~7%, 불임여성의 20~40%에서 나타나는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 오랜 기간의 연구에도 불구하고 자궁내막증의 병인에 대해 확실하게 밝혀진 것이 없으며, 고

전적으로 착상설 (implantation theory), 체강 이행설 (coelomic metaplasia) 및 혈액 혹은 림프계를 통한 발생설 (hematogenous or lymphatic spread) 등이 제시되었으나, 1927년 Sampson이 제시한 생리혈 역류와 착상 가설 (menstrual regurgitation and implantation theory)이 현재까지 널리 받아들여지고 있다.³ 복강 내로 역류된 탈락된 자궁내막세포 및 조직이 생존력 (viability)을 유지하고 있고^{4,5} 유착 물질들 (adhesion molecules)을 발현한다는 사실은 자궁내막증의 병인으로서 생리혈 역류와 착상 가설을 뒷받

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621
e-mail: junjh55@hanmail.net

*본 연구는 제일의료장학재단 연구비 지원으로 수행되었음.

침 해주고 있으며,^{6,7} 저자들도 양막을 이용한 체외 모델에서 생리혈에 존재하는 탈락된 자궁내막세포 및 조직이 유착 (adhesion) 및 침윤 (invasion)하는 사실을 보고한 바 있다.⁸

복강 내로 역류된 생리혈 내의 자궁내막세포 또는 조직이 자궁내막증으로 발병하는 데에는 자궁내막세포와 조직의 유착 및 침윤뿐만 아니라 체내 면역체계를 피해 증식할 수 있는 능력이 있어야 한다. 이와 관련하여 자궁내막증 환자의 역류된 생리혈에 존재하는 자궁내막세포는 자궁 내에서 존재할 때와 달리 그 특성이 변화되고, 여러 가지 요인들과의 상호작용으로 자궁 이외의 부위에서 병변으로 진행되는 것으로 생각되고 있다. 자궁내막증 환자에서는 자궁내막세포의 증식이 증가되며, 스테로이드 호르몬의 합성과 관련이 있는 아로마타제 (aromatase)가 비정상적으로 발현되고, 세포사멸 (apoptosis)이 억제된다는 보고는 자궁내막증의 병인이 일차적으로 자궁내막의 비정상적인 변화와 관련이 있음을 시사하고 있다.^{9,10} 이러한 자궁내막증의 병태생리와 관련이 있는 유전자로 *Fas*, *Fas ligand*,¹¹ *Bax*,¹² *Bcl-2*,¹³ *endometriosis protein-1 (Endo-1)*,¹⁴ *heptoglobin*, *secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)*,¹⁵ *estrogen receptor (ER)*,¹⁶ 등이 알려져 있다. 또한, Kao 등은 high-density oligonucleotide microarray 기법을 이용하여 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 대조군에 비해 일부 유전자의 발현이 감소되어 있음을 보고하였으며, 자궁내막의 이러한 유전자 발현의 차이가 자궁내막증을 유발하는 원인으로서의 가능성을 제시하였다.¹⁷

일반적으로 자궁내막증은 복강경 검사에 의해 전형적, 비전형적인 병변을 확인함으로써 진단되며, 이를 진단하기 위한 비침습적인 혈청학적 검사들이 제안되었으나, 아직까지 자궁내막증을 정확하게 진단할 수 있는 비침습적인 방법은 개발되지 않은 실정이다. 현재까지 혈청 내 CA-125 수치를 자궁내막증 환자의 추적관찰에 이용하고 있지만 자궁내막증의 진단에 있어 임상적인 효용성에 대한 의문이 제기되고 있다. 따라서 자궁내막증의 병인과

직접적인 관련이 있는 인자를 발굴하고 이를 이용한 진단시스템을 개발하고자 하는 연구들이 계속해서 수행되고 있다.

본 연구에서 저자들은 생리혈에 존재하는 자궁내막조직의 유전자 발현 양상이 자궁내막증의 병태생리와 관련성이 있을 것이라는 가설을 세웠다. 이러한 가설을 증명하기 위해 자궁내막증으로 확진된 환자와 정상 대조군의 생리혈에 존재하는 탈락된 자궁내막조직에서 자궁내막증 관련 유전자의 발현 양상을 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR) 방법으로 비교, 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 제일병원에 불임증을 주소로 내원하여 진단복강경을 시행한 환자들 가운데 자궁내막증으로 확진된 환자군 (n=16)과 자궁내막증을 동반하지 않은 대조군 (n=26)을 대상으로 수행하였다. 진단복강경 검사에서 자궁내막증에 대한 병기는 revised American Society for Reproductive Medicine (1996) 분류를 이용하여 판정하였다. 자궁내막 시료는 생리 2~3일째 Wallace catheter로 자궁강에서 채취한 생리혈에서, 100 μm^2 직경의 nylon mesh (Falcon 2360, Becton Dickinson, NJ)를 이용하여 생리혈 내에 존재하는 탈락된 자궁내막조직을 분리하였다. 분리된 자궁내막조직은 phosphate-buffered saline (Gibco BRL, Grand Island, NY)로 세척한 후, 1 mL의 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 침지하여 실험에 사용할 때까지 -70°C 에서 냉동보관하였다. 시료의 일부를 분리하여 일반적인 조직학적 관찰을 통해 자궁내막조직임을 확인하였다.

2. 자궁내막조직에서 total RNA의 분리

냉동보관해 두었던 자궁내막조직에서 total RNA를 분리하기 위해 TRIzol reagent에서 조직을 균질화한 후 상온에서 5분간 두었다가 4°C 에서 12,000 g로 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 RNA를

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for endometriosis related genes with GenBank accession number, expected product size and annealing temperature (AT) of RT-PCR

	Forward primer Reverse primer	Acc. No.	AT (°C)	Size (bp)
Apoptosis related genes				
<i>Fas</i>	5'-GGACCCAGAATACCAAGT-3'	NM_000043	56	187
	5'-GGCAAAAGAAGAACACAAAG-3'			
<i>Fas ligand</i>	5'-GGAATGGGAAGACACCTATGG-5'	NM_000639	60	212
	5'-GGCAAAAGAAGAACACAAAG-3'			
<i>Bcl-2</i>	5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGAG-3'	NM_000633	56	382
	5'-CCTGCAGCTTTGTTTCATGGT-3'			
<i>Bax</i>	5'-GGTTTCATCCAGGATCGAGACGG-3'	NM_138761	54	446
	5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'			
Cell survival related genes				
<i>Telomerase</i>	5'-GTCCGAGGTGTCCCTGAGTA-3'	NM_198255	60	189
	5'-GGCATAGCTGGAGTAGTCGC-3'			
<i>SCF</i>	5'-AACCCCTCAAATATGTCCCCG-3'	NM_003994	54	500
	5'-CTGCCCTTGTAAGACTTGGC-3'			
<i>c-Kit</i>	5'-GCCACAATAGATTGGTATTT-3'	NM_000222	56	570
	5'-AGCATCTTTACAGCGACAGTC-3'			
Steroid hormone related genes				
<i>Aromatase</i>	5'-ACTACTACAACCGCGTATATGG-3'	NM_000103	52	422
	5'-AACCACGATAGCACTTTCGTC-3'			
<i>ER-α</i>	5'-CAGATGGTCAGTGCCTTGTTGG-3'	NM_000125	60	357
	5'-TGATGTAGCCAGCAGCATGTCG-3'			
<i>ER-β</i>	5'-TCCTCCTATGTAGACAGCCACC-3'	NM_001040276	60	343
	5'-AGTGAGCATCCCTCTTTGAACC-3'			
Endometriosis candidate genes				
<i>Endo-I</i>	5'-CATCACTCTCTCATTAACAGAC-3'	NM_005143	52	212
	5'-TTCCCACCATAATCTCAC-3'			
<i>SLPI</i>	5'-ACTCCTGCCTTCACCATGAAGTCC-3'	NM_003064	55	413
	5'-TCAAGCTTTCACAGGGGAAACGCT-3'			
Internal control gene				
<i>GAPDH</i>	5'-CGGAGTCAAAGGATTTGGTCGTAT-3'	NM_002046	58	307
	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'			

포함하고 있는 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하고 상온에서 10분간 방치한 후 12,000 g로 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 제거한 후 RNA를 수세하기 위해 75% ethanol을 넣고 4°C에서 8,000 g로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 공기 중에서 건조시켰다. 건조된 RNA는 20~50 µL의 DEPC가 처리된 증류수를 이용하여 녹인 후 다음 사용할 때까지 -70°C에서 냉동보관하였다.

3. 자궁내막증 관련 유전자 발현 분석

분리한 total RNA의 양은 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, 2 µg의 total RNA를 역전사(reverse transcription, RT) 반응에 사용하였다. cDNA를 합성하기 위한 역전사 반응의 조건은 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10 pmol oligo(dT)₁₂, 40 U RNasin, 400 IU AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Germany) 등이 포함된 50 µL의 반응액을 42°C에서 60분 동안 반응시키고, 95°C에서 10분 동안 효소를 불활성화시킨 후 4°C 상태를 유지하였다. 합성된 cDNA 2 µL를 이용하여 자궁내막증 관련 유전자들(endometriosis related genes)에 대한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 자궁내막증 관련

유전자들의 목록과 사용한 primers에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응 조건은 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10 pmol primers, 1 U Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany) 등이 포함된 25 µL의 반응액을 각각의 유전자에 대한 annealing temperature에서 30~35회의 중합반응을 실시하였다. 각각의 유전자에 대한 RT-PCR 후 10 µL의 증폭 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 image analyzer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 optical density를 측정하였다. 유전자 발현 양상은 GAPDH를 internal control로 이용한 semi-quantitative 분석을 통해 비교하였다. 통계적인 분석은 Student's t-test를 이용하여 p 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 생리혈 내 탈락된 자궁내막조직의 채취

환자군과 대조군에서 생리 2~3일째 자궁강으로부터 Wallace catheter를 이용하여 72.4% (42/58)에서 성공적으로 생리혈을 채취하였으며, 생리혈의 양은 0.4~2.0 mL로 평균 0.8 mL이었다. 이러한 생리혈에

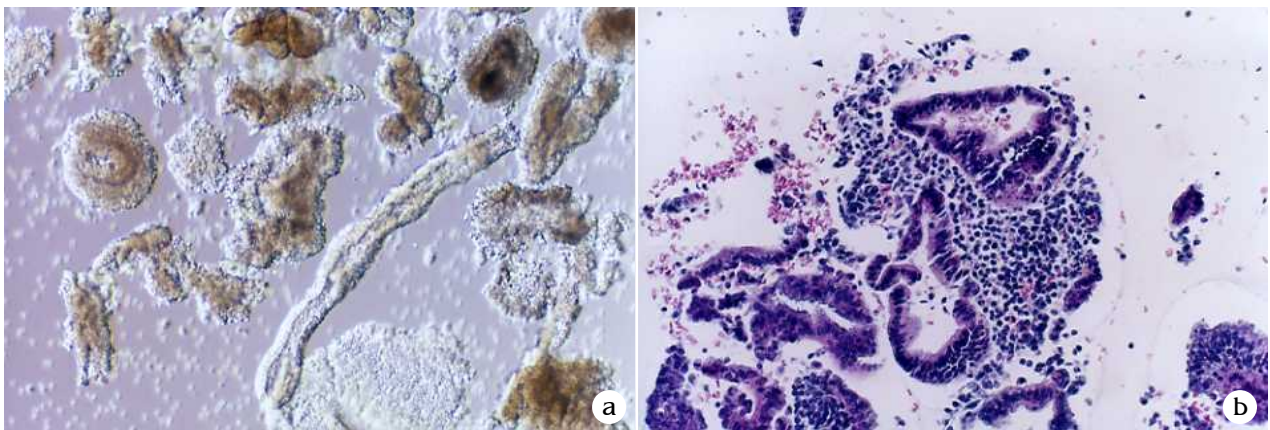


Figure 1. Microphotographs of the shed endometrium in the menstrual blood. **(a)** Phase contrast microphotograph of the shed endometrial tissues after filtration with nylon mesh (100 µm). Original magnification $\times 100$. **(b)** Histological observation of the shed endometrial tissue stained with hematoxylin-eosin. Original magnification $\times 100$.

Table 2. Semi-quantitative analysis of the expressions of endometriosis related genes in the shed endometrium of menstrual flow from patients with or without endometriosis

	Without endometriosis (n=26)	With endometriosis (n=16)	P-value
<i>Fas</i>	1.60±0.10	1.38±0.13	NS
<i>Fas ligand</i>	1.28±0.18	1.32±0.12	NS
<i>Bcl-2</i>	0.69±0.07	0.73±0.06	NS
<i>Bax</i>	1.11±0.15	1.25±0.13	NS
<i>Stem cell factor</i>	0.46±0.07	0.45±0.08	NS
<i>Estrogen receptor-α</i>	0.56±0.08	0.58±0.12	NS
<i>Estrogen receptor-β</i>	0.17±0.03	0.21±0.05	NS
<i>Endo-I</i>	1.02±0.14	1.16±0.15	NS
<i>SLPI</i>	1.05±0.11	1.10±0.09	NS

Data represents the ratio of optical density of target gene to *GAPDH* as an internal control and mean ± SEM. NS = no significance.

서 분리한 자궁내막조직의 양은 0.2~1.0 mL로 평균 0.4 mL이었으며, 형태학적 관찰을 통해 자궁내막 상피세포와 기질세포 그리고 일부 혈액세포들이 공존함을 관찰할 수 있었다 (Figure 1a). 또한, 분리한 탈락된 자궁내막조직의 일부는 조직학적 관찰을 통해 자궁내막조직임을 확인하였다 (Figure 1b).

2. 자궁내막증 관련 유전자의 발현 양상

생리혈의 자궁내막조직에서 분리한 total mRNA의 농도를 10 µg/mL로 일차적으로 보정하고, RT-PCR 후 *GAPDH* 발현양에 대하여 자궁내막증 관련 유전자들의 mRNA 발현 양상을 상대정량적인 semi-quantitative 방법으로 분석을 실시하였다. 전체적인 분석 결과는 Table 2에 나타내었다. 총 12가지 종류의 자궁내막증 관련 유전자에 대한 RT-PCR 분석에서 *telomerase*, *c-kit*, *aromatase* 등의 mRNA 발현이 관찰되지 않았다.

세포사멸 (apoptosis)과 관련성이 있는 *fas*, *fas ligand*, *bcl-2*, *bax* 유전자의 mRNA 발현 양상은 자궁내막증으로 확진된 환자군과 대조군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 2, Figure 2). 세포의 생존력에 영향을 주는 *c-kit ligand*인 *stem cell factor* mRNA의 발현은 다소 낮게 관찰되

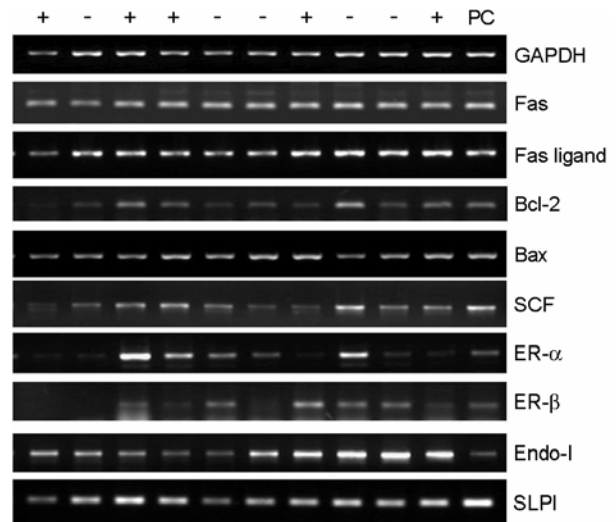


Figure 2. Composite picture of semi-quantitative RT-PCR for *GAPDH* (internal control) and endometriosis related genes (EDRs) in the shed endometrium from presence (+) or absence (-) of endometriosis and PC (positive control).

었으나, 자궁내막증 환자군과 대조군에서 발현 양상이 유사하였다 (Table 2, Figure 2). 스테로이드 호르몬 관련 유전자인 *ER-α*의 mRNA는 발현양의 차이는 다소 있었지만 모든 시료에서 발현이 관찰되었으나, *ER-β*는 71.4% (30/42)의 시료에서만 발현이 확인되었다. 자궁내막증 환자군의 75.0% (12/16)와

대조군의 69.2% (18/26)에서 *ER-β*의 발현이 관찰되었다. 이들 *ER-α/β*와 자궁내막증 특이적인 *Endo-I*과 *SLPI*의 발현 양상도 두 군간에서 차이가 나타나지 않았다 (Table 2, Figure 2).

고 찰

자궁내막증 발생과 관련한 병태생리 기전에 있어 Sampson에 의해 제시된 착상설 (implantation theory)이 가장 많이 받아들여지고 있으나,³ 생리혈의 역류 현상이 거의 모든 여성들에게서 일어나는 반면 자궁내막증은 일부 여성들에서만 발병된다는 사실은 역류가설 이 외에도 여러 가지 요인이 자궁내막증 발병에 관여할 것이라는 사실을 추정하게 한다. 정상적인 자궁내막은 증식기, 분비기 및 생리기의 주기적인 변화를 반복하고 세포증식 (proliferation) 및 세포사멸 (apoptosis) 관련 유전자 등이 관여하여 항상성 (homeostasis)을 유지하는 것으로 알려져 있다. 최근 자궁내막증 환자의 자궁내막이 정상 대조군에 비해 세포사멸이 억제되고, 세포증식이 증가되어 있으며, 변형된 아로마타제 (aberrant aromatase)가 발현된다는 사실은 자궁내막증 발병에 있어 자궁내막조직의 비정상적인 변형이 관련되어 있음을 시사하고 있다.^{9,10,13,17}

본 연구에서는 생리혈에 존재하는 자궁내막조직에서 세포사멸, 세포증식 및 스테로이드 호르몬 관련 유전자와 자궁내막증 특이 유전자로 알려진 *Endo-I*과 *SLPI* 등의 발현 양상을 mRNA 수준에서 살펴보았으며, 이들 유전자의 발현을 정상 대조군과 비교하여 비침습적으로 자궁내막증을 진단하는데 있어 진단적 가치가 있는 유전자를 찾아보고자 하였다.

세포사멸과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있는 *Bcl-2* 유전자는 세포사멸을 억제하는 유전자 (anti-apoptotic gene)로 알려져 있으며, *Bax* 유전자는 *Bcl-2*의 작용에 반하여 세포사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 자궁내막증을 동반하지 않은 정상 여성의 자궁내막에서 *Bcl-2* 단백질 발현이 생리주

기의 후기 증식기 및 초기 분비기에 증가하고, 후기 분비기에 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다.^{12,13,18,19} 이는 생리 후에 탈락된 자궁내막세포의 정상적인 세포사멸과 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한, *Fas* 유전자는 종양괴사인자 (tumor necrosis factor, TNF) 수용체계에 속하는 세포막 수용체로 *Fas ligand*와 결합하여 세포사멸을 유발한다. 정상 자궁내막의 면역조직화학염색에서 *Fas* 단백질은 분비기에 강하게 발현되며, *Fas ligand*도 분비기에 발현이 증가하는 사실은 정상 자궁내막에서 세포사멸이 후기 분비기 및 생리 시에 빈번하게 나타나고 증식기나 초기 분비기에는 거의 나타나지 않는 사실을 뒷받침하고 있다.¹¹ 본 연구에서는 자궁내막증 환자군과 대조군의 생리혈에 존재하는 탈락된 자궁내막조직에서 *Bcl-2*와 *Bax* 그리고 *Fas*와 *Fas ligand* 유전자의 발현 양상에서 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 대상 시료가 세포사멸이 왕성하게 나타나는 탈락된 자궁내막조직이기 때문에 mRNA 수준에서의 발현양의 차이를 확인하기는 어려웠던 것으로 생각된다.

세포의 분열 과정에서 telomere 길이의 유지에 관여하는 telomerase는 줄기세포와 같은 미분화세포 또는 지속적으로 분열하는 종양세포 등에서 그 발현이 유지되는 것으로 알려져 있다. Yokoyama 등은 정상 여성의 자궁내막에서 telomerase의 활성도가 증식기에 높은 반면 분비기에는 telomerase 활성도가 낮아져, 자궁내막 telomerase 활성도는 자궁내막세포의 증식과 밀접한 연관이 있다고 보고하였다.²⁰ 한편 자궁내막증 환자를 대상으로 한 최근의 연구에서 real time RT-PCR 방법으로 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 telomerase mRNA 발현이 정상 대조군에 비해 증식기와 분비기에 걸쳐 증가하며, 특히 분비기에 유의하게 높은 발현을 보인다고 하였으며, 아울러 경증의 자궁내막증 보다 중등도 및 중증 자궁내막증의 자궁내막에서 telomerase mRNA 발현이 정상 대조군에 비해 유의하게 높게 나타남을 보고하였다.²¹ 그러나 본 연구에서는 telomerase mRNA의 발현을 확인할 수 없었는데 이는 본래의

자궁내막조직에 포함된 다양한 세포들과 탈락된 자궁내막조직에 존재하는 세포들의 상이성에서 기인한 것으로 생각된다.

자궁내막증은 에스트로겐 의존형 질환으로 알려져 있으며, ER은 이형체 (isoform)의 형태로 ER- α 와 ER- β 가 존재하며 정상 자궁내막뿐만 아니라 자궁내막증 환자의 병변에서도 발현된다. 각각의 에스트로겐 수용체의 발현은 서로 상이하게 조절되며 각 수용체의 상호작용에 의해 에스트로겐에 대한 반응을 나타내는 것으로 추정하고 있다. 정상 자궁내막과 달리 난소의 자궁내막증 병변에서는 ER- β 수용체가 높게 발현되어, 에스트로겐에 대해 다른 반응을 나타내어 자궁내막증 발병으로 발전하는데 관여한다는 보고도 있다.¹⁶ 또한, P-450 aromatase는 난소와 태반을 포함하는 여러 조직에서 C19 steroid를 에스트로겐으로 전환시키는 기능을 하며, 자궁내막조직에서도 발현된다는 보고가 있다.²² 이는 복강내 유입된 자궁내막이 에스트로겐을 자체적으로 생성하여 이소성 자궁내막증 조직의 발생을 유발하는 것과 관련이 있을 수 있다. 본 연구에서는 자궁내막증 환자군과 대조군의 생리혈에 존재하는 자궁내막조직에서 P-450 aromatase의 발현을 확인할 수 없었으며, 상대적으로 낮은 수준의 ER- α/β 의 발현을 관찰할 수 있었다. 이는 프로게스테론의 영향이 큰 생리기와 황체기 자궁내막조직의 특성을 반영한 것으로 생각된다.

자궁내막증 특이적으로 보고된 Endo-I은 당단백질로 그 염기서열이 haptoglobin β -chain과 유사하여 haptoglobin like protein으로 알려져 있다. 자궁내막증 환자의 자궁내막조직뿐만 아니라 복강내 병변 및 난소의 자궁내막증에서 발현되며, 특히 복강내 병변에서 발현이 높게 나타나 자궁내막조직에서의 발현에 비해 37배, 난소의 자궁내막증의 발현에 비해 28배 높게 발현되어 복강내 병변에서의 국소적인 Endo-I 발현이 자궁내막증 발병에 있어 중요한 인자로 관여하는 것으로 보고된 바 있다.¹⁴ 또한, SLPI는 anti-leukoprotease 또는 mucous protease inhibitor로 작용하여 염증반응으로부터 점막을 보호하

는 기능이 있으며, 주로 비강이나 기관지, 자궁경부의 점막 상피세포나 대식세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다.²³ 정상 자궁내막조직의 면역조직화학염색에서 자궁경부의 선상피세포에서 생리주기에 관계없이 발현되는 것으로 알려져 있다. 반면 자궁내막증 환자에서는 자궁내막조직과 복강내 병변 및 복강내 체액에서 SLPI mRNA가 발현되고, 특히 복강내 체액에서 SLPI mRNA가 경증 자궁내막증 초기 병변에서 높게 발현되어 자궁내막증의 조기 진단에 있어 복강내 체액에서 SLPI mRNA의 가능성이 제시되기도 하였다.¹⁵ 본 연구에서는 생리혈 내의 자궁내막조직에서 Endo-I과 SLPI mRNA의 발현을 관찰할 수 있었으나, 자궁내막증과의 관련성은 확인할 수 없었다.

자궁내막증의 발병이 환자에서 자궁내막 자체의 비정상적인 변형으로 발생할 수 있다는 가설들이 여러 연구에 의해 뒷받침되고 있고, 비침습적으로 자궁내막증을 진단하기 위한 연구들이 진행되고 있지만 아직까지 그 결과가 명확하게 확인되지 않고 있다. 본 연구에서도 기존에 보고되어 있는 자궁내막증과 관련된 다양한 유전자의 발현 양상을 생리혈에 존재하는 자궁내막조직에서 분석하였지만 의미있는 유전자를 동정하지는 못하였다. 이는 자궁내막조직의 생리학적인 특징인 생리주기 증식기, 분비기 및 생리기에 따른 자궁내막의 변화와 각 시기에 유전자 발현의 차이가 있음을 고려해 볼 때, 생리기의 탈락된 자궁내막조직에서는 생리과정에 필요한 유전자들의 발현이 높아지게 된다. 또한, mRNA 수준에서의 특정 유전자 발현 양상의 차이를 semi-quantitative analysis 방법으로 확인하는 것은 쉽지 않을 것으로 생각된다. 따라서 이와 같은 mRNA 수준의 유전자 발현 양상에 대한 연구는 민감도가 우수한 real time RT-PCR 방법과 광범위한 유전자의 발현 양상을 비교할 수 있는 microarray를 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 상기 연구들과 더불어 생리혈에 존재하는 자궁내막조직이 복강 내로 유입된 후 나타나는 변화와 이러한 변화를 유발하는 복강 내의 환경적인 요인에 대한

연구가 병행되면 자궁내막증의 병인을 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Barbieri RL. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 565-7.
2. Mahmood TA, Templeton A. Folliculogenesis and ovulation in infertile women with mild endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6: 227-31.
3. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual kissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-9.
4. Keetel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440-2.
5. Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297-303.
6. Béliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 266-72.
7. Van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, van der Linden EP, Ramaekers FC, Evers JL. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61: 85-90.
8. 궁미경, 전진현, 김은수, 고경남, 홍수정, 송지홍, 등. 생리혈내 탈락된 자궁내막세포의 유착력에 관한 연구: 자궁내막증의 병인 연구를 위한 실험 모델. *대한산부회지* 1999; 42: 2700-4.
9. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, TesoneM, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760-6.
10. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 600-6.
11. Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, et al. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 360-8.
12. Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28-9.
13. Meresman GF, Augé L, Barañao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 1141-7.
14. Piva M, Sharpe-Timms KL. Peritoneal endometriotic lesions differentially express a haptoglobin-like gene. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 71-8.
15. Suzumori N, Sato M, Yoneda T, Ozaki Y, Takagi H, Suzumori K. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72: 857-67.
16. Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 742-7.
17. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144: 2870-81.
18. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 expression in normal endometrium during menstrual cycle. *Am J Path* 1994; 144: 1195-202.
19. Koh EA, Illingworth PJ, Duncan WC, Critchley HO. Immunolocalization of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum Reprod* 1995; 10: 1557-62.
20. Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Niwa K, Tamaya T. Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 173-7.
21. Kim CM, Oh YJ, Cho SH, Chung DJ, Hwang JY, Park KH, et al. Increased telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2007; 22: 843-9.
22. Velasco I, Rueda J, Acién P. Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 377-81.
23. Van Seuningem I, Audie JP, Gosselin B, Lafitte JJ, Davril M. Expression of human mucous proteinase inhibitor in respira-

tory tract: a study by in situ hybridization. J Histochem Cyto-

chem 1995; 43: 645-8.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구에서는 생리혈에 존재하는 탈락된 자궁내막조직에서의 자궁내막증 관련 유전자들의 발현 양상과 자궁내막증 병태생리와의 관련성을 살펴보고자 하였다.

연구방법: 자궁내막증으로 확진된 환자 (n=16)와 정상 대조군 (n=26)에서 생리주기 2~3일째 Wallace catheter로 채취한 생리혈로부터 탈락된 자궁내막조직을 분리하였다. 기존의 연구들에서 보고된 12종류의 자궁내막증 관련 유전자들의 mRNA 발현 양상을 semi-quantitative RT-PCR 방법으로 비교, 분석하였다.

결 과: 생리혈에서 분리한 탈락된 자궁내막조직은 조직학적 관찰을 통해 자궁내막조직임을 확인하였다. 총 12가지 종류의 자궁내막증 관련 유전자에 대한 RT-PCR 분석에서 *telomerase*, *c-kit*, *aromatase* 등의 mRNA 발현이 관찰되지 않았다. 세포사멸 (apoptosis)과 관련성이 있는 *fas*, *fas ligand*, *bcl-2*, *bax* 유전자와 *stem cell factor*, *ER- α/β* , *endometriosis protein-1*, *secretory leukocyte protease inhibitor* 등의 mRNA 발현 양상은 자궁내막증으로 확진된 환자군과 대조군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

결 론: 결론적으로 자궁내막증과 관련된 다양한 유전자들의 발현 양상을 생리혈에 존재하는 탈락된 자궁내막조직에서 분석하였지만 의미성이 있는 유전자를 동정하지는 못하였다. 이는 자궁내막조직의 생리학적 특징인 생리주기에 따른 유전자 발현의 역동적인 변화와 관련이 있을 것으로 생각된다.

중심단어: 자궁내막증, 탈락된 자궁내막조직, mRNA 발현, Semi-quantitative RT-PCR