자궁내막증 환자에서 자궁내막의 VEGF 발현 양상

서울대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 서울대학교 의과대학 병리학교실[2],
서울대학교 의학연구원 인구의학연구소[3], 서울의료원 산부인과학교실[4]

정창원[1] 박인애[2] 홍민아[1] 이경훈[4] 최영민[1,3*] 구승엽[1,3] 지병철[1,3]
서창석[1,3] 김석현[1,3] 김정구[1] 문신용[1,3]

VEGF Expression Patterns in Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosis

Chang Won Jeong[1], In Ae Park[2], Min A Hong[1], Gyoung Hoon Lee[4], Young Min Choi[1,3*], Seung-Yup Ku[1,3], Byung Chul Jee[1,3], Chang Suk Suh[1,3], Seok Hyun Kim[1,3], Jung Gu Kim[1], Shin Yong Moon[1,3]

Departments of [1]Obstetrics and Gynecology, [2]Pathology, Seoul National University College of Medicine, [3]Institute of Reproductive Medicine and Population, Seoul National University, [4]Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul Medical Center, Seoul, Korea

Objective: The purpose of this study was to evaluate the correlation between the expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometrium and the pathogenesis of endometriosis by investigating VEGF expression patterns and their difference between eutopic endometrium of patients with endometriosis and that of normal controls without endometriosis.

Methods: Endometrial sections were obtained from 64 hysterectomy specimens from women under age of 40, who had undergone hysterectomies and had histological evidence of endometriosis, with stage 3 and 4 according to the revised American Society for Reproductive Medicine classification. As for controls, 37 sections were gained from women diagnosed as having cervical intraepithelial neoplasia (CIN) of the uterine cervix and without evidence of pelvic endometriosis or adenomyosis during their operation. The VEGF content was evaluated immunohistochemically in the eutopic endometrium from 64 patients with endometriosis and 37 normal controls. Histological semiquantitative score (H-score) was calculated and compared between study group and control group throughout the menstrual cycle.

Results: There was no significant difference in the H-score of VEGF in the eutopic endometrium between patients with endometriosis and controls without endometriosis when compared according to the same phase of the cycle, although the H-score of the study group was significantly higher in the secretory phase than the proliferative phase.

Conclusion: The VEGF expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis was not different from that of women without endometriosis. This study suggests VEGF expression in eutopic endometrium is unlikely associated with the pathogenesis of endometriosis. **[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(2): 159-168.]**

Key Words: VEGF, Endometriosis, Angiogenesis, Endometrium, Immunohistocytochemistry

접수일: 2009년 9월 11일, 수정일: 2010년 3월 11일, 게재확정일: 2010년 3월 25일
주관책임자: 최영민, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 2072-2385, Fax: (02) 762-3599, e-mail: ymchoi@snu.ac.kr
*본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

자궁내막증의 원인은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나, 자궁내막증의 조직기원설로 착상설 (implantation theory), 체강 화생설 (coelomic metaplasia theory), 유도설 (induction theory) 등이 주된 이론으로 받아들여져 왔다. 그 중 월경 중에 탈락된 자궁내막이 역행성으로 복강 내에 들어가 자궁내막증이 발생한다는 Sampson[1]의 착상설이 가장 중요한 가설로 받아들여지고 있으나, 월경혈의 역류는 90% 이상의 여성에서 볼 수 있는 흔한 현상으로 월경혈의 역류가 있다고 해서 자궁내막증이 모든 여성에서 발생하지는 않는다. 착상설의 관점에서 보면 자궁내막증의 주 조직기원을 환자의 자궁내막으로 볼 수 있으므로, 자궁내막증이 발생하는 여성의 자궁내막은 정상인의 자궁내막과는 다른 특성이 있을 가능성이 제기되어 왔다. 자궁내막증 환자의 이러한 자궁내막 특이성 분석에 관한 연구 중 특히 자궁내막 자체의 일차적인 이상 중 역류된 월경혈 내의 자궁내막 세포의 비정상적인 혈관형성 (angiogenesis) 또는 비정상적인 세포증식을 통해 착상 및 침습과정을 거쳐 자궁내막증을 발병하는데 중요한 역할을 한다는 가설들이 제시되고 있다.

Hii과 Rogers[2]는 혈관형성이 활발한 조직 내에서 발현이 증가하는 integrin αvβ3가, 자궁내막증 환자의 정상 자궁내막에서 정상인에 비해 발현이 증가되어 있음을 보고하였고, Kim 등[3]은 혈관형성의 민감한 지표로 제시되고 있는 endoglin의 발현이 자궁내막증 환자의 정상 자궁내막에서 유의하게 증가되어 있음을 보고한 바 있다. Tan 등[4]도 혈관형성 억제 당단백인 thrombospondin-1이 자궁내막증을 가진 환자의 자궁내막 선세포에서 정상인에 비해 감소되어 있음을 보고함으로써, 정상 자궁내막에서의 증가된 신생 혈관형성이 자궁내막증의 발생에 역할을 할 것으로 추론하였다.

자궁내막의 혈관 생성과정에 관여하는 생성인자 중 vascular endothelial growth factor (VEGF)는 혈관내피세포에 매우 특이적으로 작용하여 세포증식을 일으키는 성장인자로 VEGF의 수용체에 결합하여 강력한 혈관투과성 (vascular permeability)을 일으킴으로써 혈관신생에 가장 중요한 역할을 한다.[5] 따라서 VEGF는 혈관신생을 통한 자궁내막증의 발병에 중요한 역할을 할 것으로 주목 받아 왔으나 아직 논란의 여지는 남아있다.

Donnez 등[6]은 면역조직화학 염색을 통해 자궁내막증 환자의 정상 자궁내막과 자궁내막증 조직에서 대조군의 정상 자궁내막에 비해 분비기 중-후기에 VEGF가 유의하게 증가되어 있음을 보고하였고, Tan 등[4]도 자궁내막증이 있는 환자군에서 정상군에 비해 자궁내막의 VEGF mRNA가 분비기에 증가되어 있음을 보고함으로써 자궁내막의 VEGF 발현이 자궁내막증 병인에 관여함을 시사하였다. 또한 자궁내막증 환자의 복강 내 VEGF 농도가 대조군에 비해 증가되어 있다는 결과도 보고되었다.[7]

반면 Barcz 등[8]은 복강 내 VEGF 농도와 자궁내막증 병기 간에 상관관계가 없음을 보고함으로써 자궁내막증 병인론에 있어서 VEGF의 역할에 의문을 제기하였고, Gescher 등[9]은 실험적으로 환자군과 정상군의 정상 자궁내막 조직으로부터 chicken chorioallantoic membrane에 이식한 자궁내막 조직에서 VEGF mRNA 발현 차이가 없음을 보고하면서, 자궁내막증 발생에 있어서 자궁내막 특이성보다는 자궁내막외 다른 요인이 더 중요할 것이라고 하였다.

이에 본 연구는 자궁내막증으로 확진된 환자와 자궁내막증이 없는 것으로 확인된 대조군의 자궁내막에서 양 군 간에 VEGF 발현 양상의 차이를 비교하여 자궁내막의 VEGF가 자궁내막증의 발병과 상관 있는지를 알아보기 위해 고안되었다. 이를 위하여 VEGF에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색을 이용하여 각각 월경주기 별로 자궁내막증이 있는 환자와 자궁내막증이 없는 대조군의 정상 자궁내막 조직에서 VEGF 발현 차이를 반정량적으로 비교해 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1999년 1월부터 2006년 12월까지 서울대학교병원 산부인과에 입원하여 복식 전자궁적출술이나 내시경하 질식 전자궁적출술 (laparoscopy assisted vaginal hysterectomy, LAVH)을 시행받은 자궁내막증 3~4기 환자로서 병리조직 검사상 자궁내막증이 확진된 40세 이하의 환자 64명을 연구대상으로 하였다. 대조군은 같은 시기에 자궁경부 상피내암 (carcinoma in situ of the uterine cervix, CIS)을 포함한 자궁경부 상피내종양 (cervical intraepithelial neoplasia of the uterine cervix)으로 복식 전자궁적출술이나 LAVH 시행 받은 환자로서 수술소견과 병리조직 검사상 자궁내막증의 증거가 없는 40세 이하의 환자 37명을 대상으로 하였다. 수술소견 상 자궁내막증의 소견이 발견되어도 병리조직 검사로 자궁내막증이 확인되지 않은 환자는 연구대상에서 제외하였고 자궁선근증 (adenomyosis)이 있는 환자는 대조군에 포함시키지 않았다. 모든 실험군들은 최소 수술 전 3개월 이내에는 호르몬제를 사용하지 않은 환자들을 대상으로 하였고 자궁내막의 조직학적 생리일 분류가 불가능한 환자는 분석에서 제외하였다.

2. 연구방법

1) 면역조직화학적 염색 방법

모든 자궁내막증 환자는 수술 시 미국생식의학학회 (American Society for Reproductive Medicine, ASRM, 1997)에서 제시한 기준에[10] 의거하여 병기를 설정하였다. 모든 정상 자궁내막 조직은 자궁적출 시 병리 진단을 위하여 만든 파라핀 블록과 슬라이드를 이용하였다.

모든 자궁내막 조직은 Buckley가 제시한 조직학적 생리일수를 기준하여 증식기 초기 (생리일 수 1~7일), 증식기 중기 (8~10일), 증식기 후기 (11~14일), 분비기 초기 (15~18일), 분비기 중기 (19~23일), 그리고 분비기 후기 (24~28일)로 분류하였다.[11] 자궁내막의 면역조직화학 염색 방법을 간단히 요약하면 파라핀에 포배된 블록을 4 μm 두께로 박절하여 코팅된 슬라이드 위에 부착한 뒤, 5분간 3번 xylene 용액에 담가 파라핀을 제거하고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 단계적으로 5분씩 함수과정을 거친 후 3차 증류수에 씻었다. 포르말린 고정으로 조직 내에 감추어진 항원을 노출시키기 위하여 target retrieval solution (Dako, Carpenteria, CA, USA)에 담가 microwave에 3분간 3번 노출시킨 뒤, 실온에서 5분간, 후에 흐르는 물에서 냉각시키고 phosphate-buffered saline액으로 수세하였다. 조직 내에 존재하는 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 dual endogenous enzyme block을 specimen에 덮고 10분간 배양한 후 흐르는 물에 수세 후 phospate buffered solution (PBS)액으로 세정하였다. 일차항체로 VEGF에 대해서는 1:20으로 희석한 rabbit 다클론 항체 (VEGF [A-20]: sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 4℃에서 16시간 이상 반응시켰다. 이차항체로는 Envision+peroxidase, rabbit (DAKO K4002)를 가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 5분간 3회 수세 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 10분간 발색시켰다. 대조 염색으로 Meyer's hematoxyline을 사용하였고 수세 후 에탄올에 탈수시키며 xylene으로 투명화하여 permount로 봉입하였다. 음성 대조군은 일차항체를 대신해서 증류수를 적용하였다.

2) 염색결과의 해석

염색결과의 판정은 Donnez 등[6]이 사용한 방법을 사용하였는데, 모든 슬라이드는 광학현미경을 사용하여 400배율 아래 분석하였고, 환자군 혹은 대조군 여부를 인지하지 못한 상태에서 두 명의 병리학자에 의해 각각 관찰되었다. 자궁내막의 선세포와 기질세포의 염색되는 분포와 강도에 근거하여 반정량적인 조직학 점수 (H-score)를 다음과 같이 산정하였다. H-SCORE=ΣPi로, i는 염색된 강도를 각각 0 (absent), 1 (weak), 2 (moderate), 3 (strong)으로,

Table 1. Clinical characteristics of patients and controls

	Endometriosis group (n=64)	Control group (n=37)
Age (yr)	35.4±3.1	36.6±2.1
Menstrual phase (n)		
Early proliferative	9	1
Mid- proliferative	17	12
Late proliferative	6	7
Early secretory	11	3
Mid- secretory	8	10
Late secretory	13	4

Chang Won Jeong. VEGF Expression Patterns in Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosi. Korean J Reprod Med 2010.

*p*는 각 염색된 강도에서의 염색된 세포의 백분율을 나타낸 것이다. *p*값은 전체 슬라이드 중 염색된 분율이 15% 미만일 때 1, 15~50%일 때 2, 50~85%일 때 3, 85% 이상일 때 4, 100%일 때 5라고 정하였다.

3) 통계처리

선상피세포 및 기질세포에서의 VEGF 발현에 대한 조직학 점수의 통계학적인 비교 시, 같은 그룹 내에서 생리주기 별 변화는 Kruskall-Wallis test를, 환자군과 대조군간의 생리주기 별 비교는 Mann-Whitney test를 각각 이용하였고, $p<0.05$인 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

64명의 자궁내막증 환자는 미국생식의학학회의 자궁내막증 병기 (ASRM, 1997) 중 모두 3기 이상의 환자들로 구성되었다. 자궁내막증 환자군과 대조군 모두 40세 미만이었으며, 평균 연령은 각각 35.4±3.1세와 36.6±2.1세로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 환자의 임상적인 특성은 Table 1과 같다. 양 군의 조직학적 생리주기를 살펴보면 자궁내막증 환자의 경우 증식기 초기가 9명, 중기가 17명, 후기가 6명, 분비기 초기가 11명, 중기가 8명, 후기가 13명이었고, 대조군의 경우 증식기 초기가 1명, 중기가 12명, 후기가 7명, 분비기 초기가 3명, 중기가 10명, 후기가 4명이었다.

Table 2와 Table 3은 각각 자궁내막증 환자군과 대조군에서 자궁내막의 선세포와 기질세포의 반정량적 조직학 점수 (H-score)를 나타낸 것이다.

1. 생리주기에 따른 환자군과 대조군 내에서의 비교

자궁내막증 환자군에서 선세포의 조직학 점수 (H-score)는 증식기 전체와 분비기 전체에서 각각 0.7±1.4, 1.2±1.2로 분비기에서 유의하게 증가된 모습을 나타내었다 (p=0.018). 또한 기질세포에서도 증식기와 분비기에서 각각 1.3±2.8, 2.2±2.5로 역시 분비기에서 유의하게 증가된 모습을 나타내었다 (p=0.016) (Table 2, Table 3). 반면 대조군에서 H-score는 선세포와 기질세포 모두 분비기에서 증가된 경향을 보이긴 했으나 통계적으로 유의한 차이를 보이진 않았다 (p=0.246, p=0.246). 전반적으로 환자군과 대조군 모두에서 선세포보다 기질세포에서 더 높은 조직학 점수를 나타내었다 (Figure 1).

2. 환자군과 대조군 사이의 비교

선세포에서 환자군과 대조군 전체 주기의 조직학 점수는 각각 1.0±1.3, 1.0±1.5로 유의한 차이를

Table 2. Vascular endothelial growth factor histological score in the glandular cells of eutopic endometrium according to the menstrual cycle

Patient	Whole cycle	Proliferative				Secretory			
		Early	Mid	Late	Total	Early	Mid	Late	Total
Endometriosis group	1.0±1.3 (64)	1.0±1.4 (9)	0.6±1.4 (17)	0.7±1.6 (6)	0.7±1.4 (32)	1.5±1.5 (11)	1.0±0.9 (8)	1.2±1.2 (13)	1.2±1.2 (32)
Control group	1.0±1.5 (37)	0 (1)	0.6±0.9 (12)	1.1±2.0 (7)	0.8±1.3 (20)	0.3±0.6 (3)	1.8±1.8 (10)	1.0±2.0 (4)	1.4±1.7 (17)

Values are presented as mean ± SD (number).

Chang Won Jeong. VEGF Expression Patterns in Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosi. Korean J Reprod Med 2010.

Table 3. Vascular endothelial growth factor histological score in the stromal cells of eutopic endometrium according to the menstrual cycle

Patient	Whole cycle	Proliferative				Secretory			
		Early	Mid	Late	Total	Early	Mid	Late	Total
Endometriosis group	1.8±2.7 (64)	1.9±2.8 (9)	1.1±2.7 (17)	1.3±3.3 (6)	1.3±2.8 (32)	2.5±3.1 (11)	1.8±1.9 (8)	2.1±2.5 (13)	2.2±2.5 (32)
Control group	2.0±3.0 (37)	0 (1)	1.1±1.8 (12)	2.3±3.9 (7)	1.5±2.7 (7)	0.3±0.6 (3)	3.6±3.5 (10)	2.0±4.0 (4)	2.6±3.4 (17)

Values are presented as mean ± SD (number).

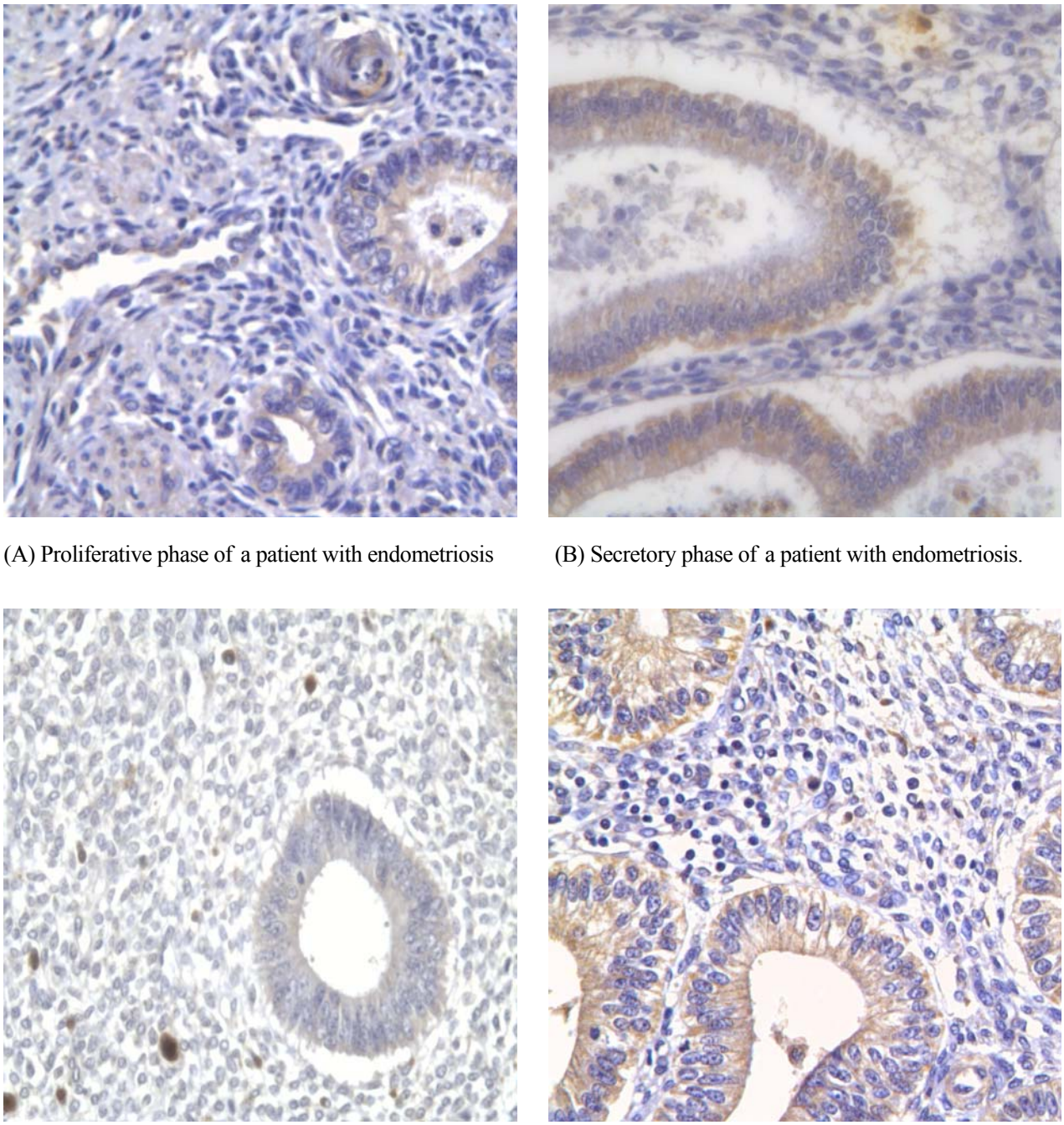
Chang Won Jeong. VEGF Expression Patterns in Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosi. Korean J Reprod Med 2010.

나타내지 않았다 (p=0.85). 증식기와 분비기 별로 각각 비교하여도 환자군과 대조군에서 증식기에 각각 0.7±1.4, 0.8±1.3 (p=0.77), 분비기에 각각 1.2±1.2, 1.4±1.7 (p=0.85)으로 두 군간에 유의한 차이를 보이지 못했다. 세분된 생리주기 별로 각각 비교하였을 때도 두 그룹간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

기질세포에서 환자군과 대조군 전체 주기의 조직학 점수는 각각 1.8±2.7, 2.0±3.0으로 차이를 나타내지 않았다 (p=0.89). 증식기와 분비기 별로 각각 비교하였을 때도 환자군과 대조군에서 증식기에 각각 1.3±2.8, 1.5±2.7 (p=0.75), 분비기에 각각 2.2±2.5, 2.6±3.4 (p=0.88)로 두 군간에 유의한 차이를 보이지 못했다. 세분된 생리주기 별로 비교하였을 때도 두 그룹간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Figure 1).

고 찰

본 연구는 자궁내막의 VEGF 발현 양상을 살펴본 지금까지 발표된 연구 중 가장 많은 수의 실험군을 대상으로 하였다. 본 실험의 결과에서 우선 37명의 정상 대조군의 자궁내막에서 생리주기에 따른 VEGF 발현은 생리주기 전체에서 선세포보다 기질세포에서 높은 염색강도의 경향을 보였고, 증식기 전체보다 분비기 전체에 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 못했다. 또한 선세포나 기질세포 모두에서 각 세분화된 시기별로 통계적으로 유의한 차이를 발견하지는 못하였는데 이는 같은 면역조직화학 염색 방법을 사용하여 VEGF 발현을 조사한 Donnez 등[6]의 결과와 일치하였다. Donnez 등은 10명의 자궁내막증이 없는 대조군의 자궁내막의 면역조직화학 염색을 통



(A) Proliferative phase of a patient with endometriosis (B) Secretory phase of a patient with endometriosis.

(C) Proliferative phase of a control without endometriosis. (D) Secretory phase of a control without endometriosis.

Figure 1. Vascular endothelial growth factor immunostaining in eutopic endometrium. Immunosignal resulting in a brownish stain and counterstained with Mayer's hematoxyline (×400).

Chang Won Jeong. VEGF Expression Patterns in Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosi. Korean J Reprod Med 2010.

해서 증식기, 초기 분비기, 중-후기 분비기로 생리주기를 세분했을 때 선세포나 기질세포 모두에서 각 시기 별 VEGF 발현의 유의한 차이를 발견하지 못하였다. 하지만 Donnez 등의 연구에서 비록 통계적으로 유의한 차이를 보이진 않았으나 분비기 말기에 VEGF 발현이 감소하는 양상은 본 연구결과와 차이점이라 할 수 있다. 또한 본 연구결과는 정상 자궁내막에서의 생리주기에 따른 VEGF 발현을 보고한 전의 보고들과 정확히 일치하지는 않았다. Charnock-Jones 등[12]은 VEGF 발현이 증식기에서는 기질세포에서, 분비기에는 선세포에서 강하게 발현된다고 보고하였고, Li 등[13]은 후기 분비기와 초기 증식기에는 선세포에 강하게 발현되고 기질세포에는 초기 분비기까지 강하게 발현된다고 보고하였지만, 초기의 이 두 연구는 실험대상 수에 대한 언급이 없었다.

한편 정상인의 자궁내막과 자궁내막증 환자의 자궁내막에서의 VEGF 발현을 비교했을 때 각 생리시기 별로 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 비록 자궁내막증 실험군 내에서는 선세포와 기질세포에서 H-score가 분비기에 유의하게 증가되는 소견을 보여주었으나 대조군에서도 분비기에 증가하는 성향을 보여줌으로써 두 군간에 차이를 발견할 수는 없었다. 이러한 결과는 결국 정상 자궁내막자체의 VEGF 발현은 자궁내막증의 병태생리와 관련이 없을 가능성을 제시한다. 이는 실험적으로 이식된 자궁내막증에서 그 원천이 정상인의 자궁내막이든 자궁내막증 환자의 자궁내막이든 병변에서 발현되는 VEGF의 양에는 차이가 없었다는 Gescher 등[9]의 연구와 부합되는 소견이다. Gescher 등은 자궁내막증 환자와 정상 대조군 환자의 자궁내막을 chicken chorioallantoic membrane에 이식하여 실험적으로 자궁내막증을 유도하였다. 자궁내막이 복막에 착상하는 기전에, VEGF 증가로 인한 혈관형성의 중요성은 전의 연구들과 마찬가지로 중요한 과정으로 인정하였으나 VEGF의 조절인자가 자궁내막 자체의 특이성보다는 병변 외부의 조절환경이 더 중요할 가능성을 제시하였다. 이는 자궁내막증의 병인론에 자궁내막 특이성 중 자궁내막증 환자의 자궁내막이 원래 혈관형성 성향이 강할 것이라는 일련의 Donnez 등[6]과 Tan 등[4]의 연구결과와는 다른 결과이다. Donnez 등은 면역조직화학 염색을 사용하여 자궁내막 선세포의 VEGF 발현이 대조군에서보다 자궁내막증 환자군에서 분비기 말기에 유의하게 증가되어 있음을 보고하면서, 증가된 혈관형성 성향의 자궁내막이 자궁내막증 병인론에 있어 중요한 기전임을 주장하였다. 하지만 통계적으로 분석을 한 대상군이 중-후기 분비기의 자궁내막증 환자 14명, 대조군 3명으로 대상수가 너무 적어서 통계적 오류가 발생했을 개연성이 있다. 또한 이 연구의 생리주기에 따른 VEGF 발현 양상을 보면 비록 통계적으로 유의성에 도달하진 못했지만 정상인의 자궁내막 선세포에서 후기 분비기에 조직학 점수가 떨어지는 양상을, 자궁내막증 환자군에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 즉 후기 분비기의 VEGF 발현이 두 군간에 차이가 난 이유를 자궁내막증군의 발현 증가보다는 정상군에서 발현이 감소했기 때문으로 볼 수 있는데, 이는 전의 정상 자궁내막에서 VEGF 발현 양상에 관한 연구들에서 적어도 VEGF 발현이 후기 분비기에 감소하지는 않았던 결과들과는 상충되는 결과이다. Tan 등[4]의 연구에서도 정상인과 자궁내막증 환자의 자궁내막 조직에서 VEGF mRNA는 분비기에 증가하였다.

본 연구의 한계점으로는 대상분석 환자수의 부족을 들 수 있는데 비록 본 연구가 대상 환자수가 지금껏 발표된 연구 중 가장 최대이긴 하나 생리시기 별로 세분하였을 경우 통계적으로 의미있는 결과를 얻기에는 소규모였다. 중-후기 분비기의 자궁내막증 환자가 21명, 대조군이 14명으로, 특히 착상설의 관점에서 자궁내막증 병인론에 있어 자궁내막 특이성을 규명하기에 중요하리라고 여겨지는 후기 분비기의 대상 환자수가 대조군이 4명으로 적었다. 또 다른 한계점으로는 면역조직화학 염색해석에 있어서의 주관성이다. 본 연구에서 면역조직화학 점수는 Donnez 등[6]이 사용한 방법을 채택

하였는데, 염색된 세포의 강도와 분포 분율에 따라 산출하게 되므로 강도점수를 줄 경우에나 분율을 구하는데 있어서 관찰자 내, 관찰자간 차이가 있을 개연성이 있다. 특히 슬라이드 염색이 고르게 되지 못했을 경우 점수 산정에 주관성의 영향은 그만큼 더 커지게 된다. H-score 정량화의 객관성을 향상시키기 위한 방법으로 densitometer 등과 같은 장비를 사용했었다면 좀 더 객관적인 데이터를 얻을 수 있었을 것으로 생각된다. 또한 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 또는 northern blot의 방법으로 VEGF의 양을 직접 정량적으로 동시에 분석하였다면 면역화학염색법의 실험방법에 객관적인 정량분석 의미를 보완했을 것으로 생각된다.

결과에서 H-score의 표준편차가 큰 것도 데이터의 신뢰성을 약화시키는 한계로 생각되는데, 이는 실험방법 상에서 여러 슬라이드를 한꺼번에 다 염색하지 못하고 몇 차례에 걸쳐서 나눠서 염색하였는데, 염색이 균일한 강도로 되지 않고 강하게 염색됨과 약하게 염색됨의 차이가 크게 데에서 기인된 것으로 생각된다. 하지만 같은 염색과정에서는 환자군과 대조군의 슬라이드를 일정하게 썪어서 같은 조건으로 실험하였기에 환자군과 대조군을 비교한 결과에 신뢰성은 있을 것으로 생각된다.

제시되고 있는 VEGF 조절인자들로는 VEGF 수용체의 농도나 분포 차이, 난소 스테로이드 호르몬, 복막의 면역조절인자, 이러한 인자들의 수용체나 이런 여러 인자들의 반응이나 발현에 관여하는 유전적 차이 등이 작용할 수 있으며 자궁내막증을 일으키는데 자궁내막 특이성보다 더 중요하게 작용할 가능성이 있다. 에스트로젠은 VEGF의 유전자발현에 직접적으로 영향을 미치며 에스트로젠 수용체의 유전자변이는 이런 반응을 변화시킬 수 있음이 보고되었고,[14] 자궁내막증 환자의 복강액에서 대식세포 (macrophage)의 수와 활성이 증가되어 있고 VEGF에 대한 수용체를 지니고 있어 자가 분비 (autocrine) 방식으로 VEGF의 중요한 원천이 된다고 보고된 바 있다.[15,16] 또한 이소성 자궁내막 조직에서는 interleukin (IL)-1에 의해 VEGF의 발현이 유도되지만 정상 자궁내막 조직에서는 그렇지 않다고 보고되었다.[17] 이러한 보고들은 모두 VEGF의 발현에 여러 복잡한 요소들이 관여하고 있음을 단적으로 보여주는 예들이라 할 수 있다. 자궁내막증의 발생기전에 있어서 혈관형성의 중요한 역할과 혈관형성에 대한 VEGF의 강력한 효과에 대해 발표된 많은 연구들을 고려해 볼 때, 본 연구결과는 VEGF의 발현이 자궁내막증과 관련이 없다라는 결론보다는 VEGF의 발현에 자궁내막자체의 특이성보다 다른 인자들이 중요하게 작용할 수 있음을 시사한다. 향후 자궁내막증 발생에 있어서 VEGF 발현을 조절하는 여러 인자들의 세밀한 작용기전과 조절기전에 대한 광범위한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 자궁내막증 환자군과 정상 대조군의 정상 자궁내막에서의 VEGF 발현 차이는 없었고, 이는 정상 자궁내막의 VEGF 발현은 자궁내막증의 발병기전에 관여하지 않을 가능성을 제시한다. 더 나아가 자궁내막 특이성에 대한 다른 연구들에서도 볼 수 있듯이 본 결과는 자궁내막증의 발병기전이 자궁내막자체의 특이성만이 아닌 다른 여러 인자들에 의해 조절될 수 있음을 시사하는 소견이다.

참 고 문 헌

1. Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1940; 40: 549-57.
2. Hii LL, Rogers PA. Endometrial vascular and glandular expression of integrin alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. Hum Reprod 1998; 13: 1030-5.
3. Kim SH, Choi YM, Chae HD, Kim KR, Kim CH, Kang BM. Increased expression of endoglin in the eutopic endometrium of women with endometriosis. Fertil Steril 2001; 76: 918-22.
4. Tan XJ, Lang JH, Liu DY, Shen K, Leng JH, Zhu L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis.

Fertil Steril 2002; 78: 148-53.
5. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989; 246: 1306-9.
6. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13: 1686-90.
7. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Hum Reprod 1996; 11: 220-3.
8. Barcz E, Kaminski P, Marianowski L. VEGF concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis. Ginekol Pol 2001; 72: 442-8.
9. Gescher DM, Siggelkow W, Meyhoefer-Malik A, Malik E. A priori implantation potential does not differ in eutopic endometrium of patients with and without endometriosis. Arch Gynecol Obstet 2005; 272: 117-23.
10. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997; 67: 817-21.
11. Buckley CH, Fox H. Biopsy pathology of the endometrium. 2nd ed. London: Arnold; 2002.
12. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. Biol Reprod 1993; 48: 1120-8.
13. Li XF, Gregory J, Ahmed A. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human endometrium. Growth Factors 1994; 11: 277-82.
14. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 10972-7.
15. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. J Clin Invest 1996; 98: 482-9.
16. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update 2000; 6: 45-55.
17. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. Mol Hum Reprod 2000; 6: 269-75.

= **국문초록** =

목 적: 자궁내막증 환자군과 자궁내막증이 없는 대조군의 정상 자궁내막에서 생리주기에 따른 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현 양상과 양 군간의 차이를 살펴, 자궁내막의 VEGF와 자궁내막증 발병의 상관관계를 알아보고자 하였다.

연구방법: 환자군은 자궁적출술을 시행 받은 환자 중 3기 이상의 자궁내막증으로 조직학적 진단을 받고, 자궁내막의 조직학 주기가 확인 가능한 40세 이하의 환자 64명을 대상으로 하였고, 대조군은 같은 시기에 자궁경부내 상피병변으로 자궁적출술을 시행 받은 환자 중 자궁내막증이나 자궁선근증이 없고 자궁내막의 주기가 확인 가능한 40세 이하의 환자 37명이었다. 환자군과 대조군의 정상 자궁내막에서 얻은 조직들을 면역조직화학 염색을 시행하여 반 정량적인 VEGF의 조직학적 점수를 산출하여 두 그룹간에 같은 월경주기 별 차이를 비교하였다.

결 과: 선세포와 기질세포로 나누어 같은 월경주기에 따라 자궁내막증군과 대조군을 비교하였을 때, 증식기와 분비기 모두에서 선세포 및 기질세포의 VEGF의 발현은 차이가 없었다. 각 세분된 월경주기 별 비교에서도 두 군간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 자궁내막증 환자군내에서는 선세포와 기질세포 모두 분비기에서 증식기보다 높은 VEGF 발현 양상을 보였다.

결 론: 자궁내막증 환자군과 정상 대조군의 자궁내막에 있어서 VEGF 발현 양상은 차이가 없었다. 즉 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 VEGF 발현이 정상인에 비해 증가되어 있지 않고 이는 자궁내막의 VEGF 발현은 자궁내막증의 병인생성에 관련이 없을 가능성을 제시한다.

중심단어: VEGF, 자궁내막증, 혈관형성, 자궁내막, 면역조직세포화학 염색