인간 자궁내막에서 Cyclooxygenase-1과 -2의 주기적 발현 양상

아주대학교 의과대학 산부인과학 교실, 연세대학교 의과대학 산부인과학 교실*
박동욱 · 양현원 · 권혁찬 · 황경주 · 유정현 · 이치형 · 김세광* · 조동제* · 오기석

Cyclic Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in Human Endometrium

Dong Wook Park, Hyun Won Yang, Hyuck-Chan Kwon, Kyung Joo Hwang, Jung Hyun Yoo, Chi Hyeong Lee, Sei Kwang Kim*, Dong Jea Cho* and Kie Suk Oh

Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

=Abstract=

Cyclooxygenase (COX) is an enzyme involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins (PGs), and exists in two forms, COX-1 and COX-2. COX has been reported to be involved in early implantation by secretion of PGs which causes permeability of vessels and reaction of decidual cells around the implantation site. Recently, in mice and sheep studies, COX-1 and COX-2 expression in the endometrium has been reported to be different according to implantation and stages of the estrous cycle, but expression of COX-1 and COX-1 in human endometrium during the menstrual cycle has not yet been established. The purpose of this study was to observe the variances of COX-1 and COX-2 expression by immunohistochemical staining in endometrial samples obtained from human hysterectomy specimens and biopsies of women of reproductive age according to different stages of the menstrual cycle. Also, we attempted to observe COX-1 and COX-2 expression in the epithelial and stromal cells of the endometrium obtained during the mid-secretory phase, which were cultured separately.

COX-2 showed a cyclic pattern of expression according to the different stages of the menstrual cycle and was strongly expressed particularly at the mid-secretory phase which corresponds to the time of implantation. However, COX-1 tended to be increased in the early proliferative, and mid- and late secretory phases, but was also expressed in the whole menstrual cycle showing no particular pattern. In the separately cultured cells COX-1 was expressed in epithilial cells and COX-2 in the stromal cells.

The above results suggest that since COX-2 is expressed at the same time as implantation and cultured cells display a specific secretory pattern, COX-2 has inductive endocrine enzyme properties and has an important effect on endometrial cells during implantation. Also, and COX-2 expression in endometrial cells may be utilized as a useful marker of endometrial maturation.

Key Words: Implantation, Endometrium, Prostaglandin (PG), Cyclooxygenase (COX)

본 연구는 '97년도 보건의료기술개발연구사업의 지원(HMP-97-M-1-0006)과 아주대학교 의과대학 교내 연구비 지원(교비 96-19)에 의하여 이루어진 것임.

서론

인간의 자궁내막 조직은 자궁내강 상피세포 (luminal epithelial cell), 자궁선 상피세포 (glandular epithelial cell), 기질세포 (stromal cell) 등의 여러 형태의 세포로 구성되어 있다. 이러한 세포들은 생리 주기에 따라 estradiol 및 progesterone 수용체 (Ilesanmi et al., 1993), integrins (Lessey et al., 1992), 성장 인자들 (Giudice, 1994), interleukin-1 (IL-1) 및 그 수용체(Tabibzadeh et al., 1990; Simon et al., 1993), cyclooxygenase (COX)와 PGE_2 (Ishihara et al., 1986; Kennedy et al., 1983a, b; Martel et al., 1989) 등과 같은 여러 가지 물질들의 발현 양상에 변화를 보이며, 이러한 변화가 생리기(menstrual phase), 증식기 (proliferative phase), 배란기(ovulatory phase), 분비기(secretory phase)의 특징적인 자궁내막 구조와 기능에 변화를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 특히, Simon 등(1996)은 성선 호르몬 변화에 의해 발현된 IL-1이 TNFα, TGFβ, FGF, LIF, CSF 등과 작용하여 INF-8, INF-γ, IL-6, PGE2, integrins, adhesion molecules, MMPs, TIMP 등의 발현을 조절하는 것으로 보고하면서 착상 기전을 "Cytokine - adhesion molecules - invasive proteinase hypothesis" 모델로 설명하고 있다. 최근 이러한 연구들은 현재까지 자궁내막 성숙도 측정의 지표로 활용되고 있는 Noyes 등(1950)의 조직학적 분류의 분자생물학적 기전을 제공하면서 인간의 착상 기전 연구에 중요한 기여를 하고 있으며 임상적으로도 정밀한 성숙 지표를 제공할 것이라고 기대되고 있다.

최근에는 착상기 즉, 중기 분비기의 자궁내막 변화에 관심이 집중되고 있으며, 이때 가장 특징적인 변화는 prostaglandins (PGs)에 의해 유발된 탈락막 반응(decidual reaction)이라고 할 수 있다(Rees et al., 1982; Malathy et al., 1986; Gupta et al., 1989; Yee and Kennedy, 1991; Kennedy, 1994). 이러한 반응은 설치류에서 호르몬 혹은 배아에 의해 자궁내막에서 발현된 PAF (platelet-activating factor), IL-1의 paracrine 작용에 의해 자궁내강 상피세포에서 합성된 PGE_2와 기질세포의 수용체에 작용하면서 착상 부위에서 강력한 국소적 혈관 투과 작용을 하는 CRF (corticotrophin-releasing factor)가 작용하여 유발하는 것으로 알려지고 있으나 인간에서는 확실치 않다(Psychoyos et al., 1995). COX는 이러한 PGs를 arachidonic acid로부터 합성하는데 관여하고 중요한 효소로 COX-1과 COX-2라는 두 가지 이성체를 가지고 있다(Fletcher et al., 1992; Kraemer et al., 1992). COX-1은 생체내 많은 조직에 존재하는 내재성 효소인 반면, COX-2는 내분비적 자극에 의해 유도되는 유도성 효소의 특징을 가지고 있다. 이러한 특징은 동물의 발정 주기에 따라 이들 효소의 자궁내 발현 양상은 다르게 보고되고 있다. 즉, 쥐와 양에서 COX-1의 경우 발정주기 간에 차이 없이 자궁내막에서 항상 발현되나, COX-2는 쥐의 경우 착상 이후, 양에 있어서는 배란 직전 및 배란기에 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있어(Chakrabotry et al., 1996; Charpigny et al., 1997) 동물 종에 따라 차이가 있으나 유도성 효소인 COX-2가 착상 및 임신 유지에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 유추할 수 있다. 인간에 있어서도 태반 (Wetzka et al., 1997) 및 자궁내막 (Han et al., 1996; Jones et al, 1997)에서 COX-2의 발현을 확인하였으나 생리 주기에 따른 자궁내막내 발현 양상은 아직 확립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 면역조직화학적 조직염색 방법을 이용하여 인간 자궁내막에서 생리 주기에 따른

COX-1과 -2의 발현 양상을 관찰하고, 또한 자궁내막 세포를 상피세포와 기질세포로 각각 분리 배양한 후 배양된 세포에서 COX-1과 -2의 발현 양상을 확인하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상 환자와 자궁내막 조직 처리

아주대학교 병원 산부인과를 내원한 정상적인 생리주기(28-32일)를 갖는 20-40세 사이의 가임기 환자로써 자궁 근종 및 자궁경부 병변으로 전자궁적출술을 시행한 24례(증식기 9례, 분비기 13례, 생리기 2례)에서 자궁내막 후저부에서 자궁내막 조직을 채취하였다. 채취 직후 조직의 일부는 바로 PBS로 세척하여 적혈구를 제거한 후에 세포배양 준비를 하였으며 나머지는 4.5% paraformaldehyde에 24시간 고정 한 후 paraffin에 포매하여 4μm 두께로 박절하여 슬라이드로 만든 후에 통상의 탈 paraffin 과정과 함수 과정을 수행하였다. 각 조직은 통상적인 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 염색하여 광학현미경으로 Noyes 등(1950)의 조직학적인 기준에 따라 배란기를 기준으로 -3일까지의 조직을 후기 증식기로 -4에서 -7일까지의 조직을 중기 증식기로 그 이상에서 생리 직후까지를 전기 증식기로 나누었으며, 배란 후 5일까지를 전기 분비기로 6일에서 10일까지를 중기 분비기로 그 이상 14일까지의 조직을 후기 분비기로 나누어 분류하였다.

2. 자궁내막세포의 배양

채취된 자궁내막조직은 PBS가 들어 있는 cornical tube (Falcon, Becton Dikinson, New Jersey, USA)에 담아 실험실로 운반되었으며, 다시 PBS로 여러 번 세척하여 남아 있는 혈액을 제거하였다. 배양접시에 Dulbeco's Modified Eagle's Media (DMEM; Gibco, Life Technologies, Roskilde, USA)을 2-3 ml 가량 부어준 후 조직을 넣고 멸균된 가위를 이용하여 1-2 mm 정도의 크기로 잘게 잘라 cornical tube에 용액과 함께 부어준 후 원심 분리하여 상층 액은 따라내었다. 약 5 ml의 trypsin-EDTA (Gibco, USA)용액을 조직이 들어 있는 tube에 부어준 후 37℃에서 회전배양 (shaking incubation)을 하였다. 약 1시간 가량 경과 후 400 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층에 분리된 효소를 제거하였으며, 0.2 % penicillin-streptomycin (Gibco, USA), 10 % fetal bovine serum (Gibco, USA)이 포함된 DMEM 배양액에 약 1 x 10^6cells/ml의 농도로 60 mm 배양접시 (Falcon, Becton Dikinson, New Jersey, USA)에 세포를 분주한 후 배양하였다. 기질세포 군과 상피세포 군의 분리를 위하여 배양 24시간 후 배지를 모두 제거하고 새로운 성장 배지로 세척한 후 배양접시에 달라붙지 못한 상피세포 덩어리들을 분리하였다. 분리해 낸 세포 덩어리를 멸균된 cornical tube에 넣고 400 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 남아있는 배지를 제거한 후 0.2 % penicillin-streptomycin과 1,000 units/ml의 collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 1:1로 섞인 효소 용액을 첨가하여 37 ℃에서 회전배양을 하였다. 2시간 후 400 rpm에서 5분간 원심 분리하여 남아있는 효소 용액을 제거하였으며, 여기에 약 3 ml의 성장 배지를 첨가하여 60 mm 배양접시에 1 x 10^6cells/ml의 농도로 세포를 분주한 후 배양하였다.

3. 면역조직화학적 염색

COX-1과 -2에 대한 면역조직화학적 염색은 박절한 표본을 4% H_2O_2 용액에 5분간 전처리하여 조직에 남아있는 peroxydase를 제거한 후 1/400으로 희석한 COX-1과 COX-2 일차항체 (Santa Cruz, Biotechnology Inc., Califonia, USA)로 상온에서 1 시간동안 항습

chamber에서 반응시킨 후 LSAB- kit (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)에 포함된 2차 항체를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 diaminobenzidine (DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 10초간 대조 염색하여 canadian balsam으로 봉입하였다.

배양된 세포에서 COX-1과 -2의 발현을 확인하기 위하여 세포를 4일간 배양한 후 3.7 % formaldehyde 용액으로 상온에서 15분간 고정시켰다. PBS로 세척하여 남아 있는 고정액을 제거한 후 파라핀 포매 조직과 동일한 방법으로 COX-1과 -2에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 이들을 DAB로 발색시킨 후 Methylen blue를 이용하여 약 10초간 대조 염색을 하였으며, PBS를 culture dish에 부어 세포가 건조되는 것을 방지한 후 phase contrast inverted microscope (Diaphot 300, Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 염색 정도를 확인하였다.

4. 결과의 관찰 및 분석

광학현미경으로 면역조직화학적으로 염색된 슬라이드에서 자궁내강 상피세포, 자궁선 상피세포, 기질세포에 따른 염색을 관찰하였으며 염색되지 않은 경우를 (-), 희미하게 염색된 경우를 (+), 중등도 염색을 (++), 강한 염색을 (+++)로 구분하여 표시하였다.

결과

1. 자궁내막 세포에서 COX-1과 -2의 발현

자궁내막에서 COX-1의 발현 양상은 중기 증식기를 제외한 전 생리 주기동안 자궁내막 상피세포에서 강한 염색(+++)이 관찰되었다. 자궁선 상피세포에서는 생리기, 전기 증식기, 전기분비기 및 후기 분비기에 약한 염색강도를 보였으나 중기 분비기에 중등도(++)의 염색강도가 관찰되었다. 기질세포에서는 중기 및 후기 증식기에 약한 염색반응을 보였고 생리기, 전기 증식기와 중기 분비기에서 강한 염색반응(+++)을 보였다. 자궁근육층에서는 생리기와 전기 증식기에서 중등도(++)의 염색반응을 보였으며 전 생리주기에서 약한 염색(+)이 관찰되었다.

COX-2의 발현 양상은 생리기에서는 자궁근육층, 자궁내강 상피세포 및 기질세포에서 아무런 염색반응(-)을 보이지 않다가 전기 증식기에서 전 자궁내막 조직에서 약한 염색반응(+)을 보였다. 중기 증식기에서는 자궁내강 상피세포에서, 후기 증식기에서는 자궁근육층에서만 약한 염색반응(+)을 보일 뿐 다른 조직에서는 양성 염색반응을 보이지 않았다. 분비기에서는 전기에 자궁내강 상피세포와 자궁근육층에서만 약한 염색반응(+)을 보이다가 중기에서 자궁근육층을 제외한 전 조직에서 중등도(++) 이상의 염색반응을 보였으며, 특히 자궁내강 상피세포에서 강한 염색강도(+++)를 보였다. 그러나 후기 분비기에서는 전 자궁내막 조직에서 COX-2에 대한 양성 염색 결과를 관찰할 수 없었다(Fig. 1 [A-L], Table 1, 2).

2. 자궁내막 세포의 배양과 COX-1과 -2의 발현

배양 4 일째에 세포는 배양 접시 바닥에 포화 상태에 도달하였으며, 각 세포군에서 COX-1과 -2에 대한 면역조직화학적 염색을 한 결과 상피세포에서 COX-1에 대한 양성 염색이 전체 세포의 80% 이상에서 확인된 반면, 기질세포 배양에서는 COX-2에 대한 양성 염색이 약 80% 이상으로 관찰되었다(Fig. 1 [a, b]).

고찰

COX-1과 -2의 두 가지 이성체를 가지고 있는 COX는 arachidonic acid를 PGs로 변환시키는데 중요한 효소로 동물 발정 주기간에 다양한 발현 양상을 보이고 있다. 현재까지 COX-1은 많은 조직에서 일정하게 발현되는 것으로 보고되고 있으며(Dewitt et al, 1995), 세포의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Wetzka et al, 1997). 반면 COX-2는 세포의 분화 및 증식과 같은 세포의 활성화 반응에 의해 유전자 발현이 유도되는 유도성 효소로 동물의 발정 주기, 임신 및 출산간에 다양한 발현 양상을 보이는 것으로 보고되고 있다(Ristimaki et al, 1994; Dong et al, 1996). 그러나 인간 자궁내막에서 생리주기에 따른 COX-1과 -2의 발현 양상에 관한 연구는 아직 부족한 상태에 있으며, 이에 본 연구에서 인간의 자궁내막을 대상으로 COX-1과 -2의 발현 양상을 관찰한 결과 COX-1의 발현은 전 생리 주기에 걸쳐 자궁내강 상피세포, 기질세포, 자궁근육층에서 고르게 발현되는 것을 알 수 있었다. 반면 COX-2는 전기 증식기에서 비교적 약하게 발현되다가 배란 이후 중기 분비기 즉, 착상 시기에 자궁내강 상피세포와 기질세포에서 일시적으로 강하게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 COX-1과 -2의 발현 양상에 차이는 각각 유전자의 구조적 차이에서 오는 것으로 알려지고 있다. 즉, COX-1과 -2의 아미노산 서열은 종들간에 85% 이상의 유사성을 가지고 있으며, 한 개체 내에서 COX-1과 -2의 단백질 서열은 약 60%의 유사성을 보인다(Fletcher et al., 1992). 그러나 COX-1과 -2 유전자의 5'-전사 조절 부위에서 유사성은 전혀 찾아 볼 수 없으며, 이러한 전사 조절 부위의 차이가 발현에 있어서 차이를 유발시키는 것으로 보고하고 있다(Kosaka et al., 1994). 특히, 인간 COX-1 promoter 부위에서는 일정한 TATA box를 발견할 수 없는 대신 여러 개의 전사 개시 부위가 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, 이러한 사실은 COX-1이 상시발현 (house keeping) 유전자라는 것을 뒷받침하고 있다(Wang et al., 1993). 반면 COX-2는 lipopolysaccharide (Hempel et al., 1994), cAMP (Wong et al., 1989), interleukin-1 (IL-1)(Kawaguchi et al., 1994), 및 hCG (Sirois et al., 1992) 등과 같은 유도 물질에 의해 각각 다른 조직에서 발현이 조절되는 것으로 알려지고 있으며, Wu 등(1997)은 양을 대상으로 한 실험에서 estradiol과 progesterone이 자궁내막에서 COX-2의 발현을 증가시키는 것으로 보고하고 있다. 특히, interleukin-1은 지난 여러 해 동안 자궁내막과 탈락막 기능에 관여하는 것으로 알려져 왔으며, Simon 등(1993)은 IL-1 type I 수용체를 인간 자궁내막의 기질세포와 상피세포에서 확인하였고, IL-1β의 IL-1 수용체 발현을 통해 기질세포에서 PGE_2가 생성되는 것으로 보고하고 있다(Tabibzadeh et al., 1990). 최근에 Kennard 등(1995)은 인간 탈락막 세포에서 IL-1β가 COX-2의 발현을 직접적으로 유발시킨다는 것을 확인하였다. 또한 IL-1은 착상 시기 및 임신 초기에 자궁내막에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며(Simon et al., 1994), 이러한 IL-1은 착상 전 배아 및 progesterone에 의해 자궁내막에서 분비되는 것으로 보고되고 있다(Simon et al., 1996). 생쥐 자궁내막에서 COX-2의 발현이 배아의 착상과 연관이 있는 것은 배아에서 분비된 IL-1이 자궁내막의 IL-1 수용체와 결합함으로써 일어나는 현상으로 보이나 양과 인간을 대상으로 한 실험 결과 배아의 착상 없이 COX-2가 중기 분비기에 급격하게 증가하는 현상은 progesterone에 의한 자궁내막에서 IL-1의 발현이 주요 기전이라고 사료된다.

COX-1과 2의 자궁내막 세포에 따른 발현 양상을 확인하기 위해서 자궁내막 세포를 배

양하여 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 배양은 Osteen(1989)등의 방법을 응용하여 자궁내막의 상피세포와 기질세포로 분리하였다. 배양시 상피세포에 비하여 기질세포는 한 번의 trypsin-EDTA 처리만으로 비교적 쉽게 단일세포로 분리되었으나, 상피세포는 trypsin-EDTA 처리 후에도 세포괴를 형성하고 있었다. 따라서 trypsin-EDTA를 처리한 상피세포와 기질세포를 약 24 시간 배양하면 단일세포로 분리된 기질세포들은 쉽게 배양 접시에 달라붙지만 세포괴를 형성하고 있는 상피세포의 경우에는 배양 접시와 접촉하고 있는 극히 일부분의 세포만 배양 접시 표면에 부착되며, 이를 획득한 후 다시 collagenase를 처리하여 단일세포로 분리할 수 있었다. 분리된 상피세포와 기질세포를 각각 다른 배양접시에서 4 일간 배양하면서 관찰한 결과 상피세포는 비교적 둥근 형의 세포가 세포군를 형성하였고 기질세포는 길쭉한 모양의 세포들이 세포군을 형성하지 못하고 개별 세포로 분포하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 배양된 세포에 대한 COX-1과 -2의 면역조직화학적 염색 결과 COX-1은 배양된 상피세포에서 80% 이상의 양성 염색결과를 보였으며, COX-2의 경우에는 기질세포에서 80 % 이상의 양성 염색결과를 보이고 세포핵을 중심으로 강하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 COX-2가 상피세포보다는 기질세포를 중심으로 발현되며, 세포핵에 염색된 것은 COX-2가 주로 핵막에 위치해서 핵 내 유전자 발현을 조절한다는 연구 결과와 일치하고 있다(Morita et al, 1995).

결론

인간 생리 주기간에 발현되는 COX-1은 생리 주기간에 상피세포를 중심으로 상시 발현되고 있었으며, COX-2는 배란이후 중기 분비기, 즉 착상 시기에 일시적으로 상피세포 및 기질세포에서 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 실험 동물에서와 마찬가지로 유도성 성질을 가지고 있는 COX-2가 배란 이후 LH에 영향으로 급격히 발현된 것으로 사료된다. 또한 본 실험을 통하여 인간 자궁내막 조직의 기질세포와 상피세포를 각각 구분하여 배양하는 방법을 정립할 수 있었으며, 배양된 두 종류의 세포 중 상피세포에서는 COX-1이 주로 발현되며, 기질세포에서는 COX-2가 주로 발현됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 두 효소의 발현 양상에 차이는 이제까지 기질세포와 상피세포의 분리 배양에 있어서 단순히 세포 모양만으로 분리 여부를 판정하던 것에서 더 나아가 이들 효소의 발현 양상을 이용해 기질세포와 상피세포의 분리 여부를 판정할 수 있으리라 기대한다.

참고문헌

Bummer JN, Longfellow M, Ribbon A: Leucocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann NY Acad Sci* 1991, 622, 57-68.

Charkraborty I, Das SK, Wang J, et al: Developmental expression of the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroid. *J Mol Endocrin* 1996, 16, 107-122.

Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, et al: Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1997, 138(5), 2163-2171.

Dewitt D and Smith WL: Yes, but do they still get headaches? *Cell* 1995, 83, 345-348.

Dong YL., Gangula PRR, Fang L, et al: Differential Expression of cyclooxygenase-1 and -2 protein in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial Cells. *Prostaglandins* 1996, 52, 13-34.

Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, et al: Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 1992, 267, 4338-4344.

Giudice LC: Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: Their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994, 61, 1-17.

Gupta A, Huet YM, Dey SK: Evidence for prostaglandins and leukotrienes as mediators of phase I of estrogen action in implantation in the mouse. *Endocrinology* 1989, 124, 564-569.

Han SW, Lei ZM, Rao CV: Up-regulation of cyclooxygease-2 gene expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. *Endocrinology* 1996, 137(5), 1791-1797.

Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW: Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994, 93, 391-396.

Ilesanmi AO, Hawkins DA, Lessy BA: Immunohistochemical markers of uterine receptivity in the human endometrium. *Microscopy reserch and technique* 1993, 25, 208-222.

Ishihara O, Tsutsumi O, Mizuno M: Metabolism of arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua. *Prostaglandins Leukotriens Med* 1986, 24, 93-102.

Jones RL, Kelly RW, Critchley HOD: Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 1997, 12, 1300-1306.

Kawaguchi H, Raisz LG, Voznesensky OS et al. Regulation of the two prostaglandin G/H synthase by parathyroid hormone, interleukin-1, cortisol, and prostaglandin E_2 in cultured neonatal mouse calvariae. *Endocrinology* 1994, 135, 1157-1164.

Kennard EA, Zimmerman PD, Friedman CI, et al: Interleukin-1β induces cyclooxygenase-2 in cultured human decidual cells. *Am J Reprod Immunol* 1995, 34, 65-71.

Kennedy TG: Involvement of local mediators in blastocyst implantation. In Glasser SR, Mulholland J, Psychoyos A (eds). Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions, New York, NY, USA, Plenum Press, 1994, pp.183-194.

Kennedy TG, Martel D, Psychoyos A: Endometrial prostaglandin E_2 binding: characterization in rats sensitized for the decidual cell reaction and changes during pseudopregnancy. *Biol Reprod* 1983a, 29, 556-564.

Kennedy TG, Martel D, Psychoyos A: Endometrial prostaglandin E_2 binding during the estrus cycle and its hormonal control in ovariectomized rats. *Biol Reprod* 1983b, 29, 565-571.

Kniss DA, Zimmerman PD, Garver CL. et al: Interleukin-1 receptor antagonist blocks interleukin-1-induced expression of cyclooxygenase-2 in endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 177, 559-567.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, et al: Charaterization of the human gene PTGS2) encoding prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994, 221, 889-897.

Leesey BA, Damjanovich L, Courifaris C, et al: Integrin adhesion molecules in the human endometrium. J *Clin Invest* 1992, 90, 188-195.

Malathy PV, Cheng HC, Dey SK: Production of leukotrienes and prostaglandins in the rat uterus during peri-implantation period. *Prostaglandins* 1986, 32, 605-614.

Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A: Effect of mifepristone(RU 486) on concentrations of prostaglandin E_2 binding sites in the rat endometrium. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 527-532.

Morita I, Schindler M, Regier M, et al: Different intracellular location for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995, 270(18), 10902-10908.

Noyes RN, Hertig AT, Rock J: Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950, 1,

3-25.

Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, Gorstein F: Development of a method to isolate and culture highly purifide populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fertil Stril* 1989, 52, 965-972.

Parr EL, Tung HN, Parr MB: Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 1987, 36, 211-225.

Psychoyos A: Endocrine control of egg implantation. In Greep RO, Astwood EG, Geiger SR (Eds), Handbook of Physiology, Washington, USA, American Physiological Society, 1973, pp187-215.

Rees MC, Parry DM, Anderson AB, et al: Immunohistochemical localisation of cyclooxygenase in the human uterus. *Prostaglandins* 1982, 23, 207-214.

Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, et al: Induction of cyclooxygenase-2 by intereukin-1α. *J Biol Chem* 1994, 269(16), 11769-11775.

Simon C, Frances A, Piquette GN, et al: Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994, 134, 521-528.

Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, et al: Cytokine-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Human Reprod* 1996, 2(6), 405-424.

Simon C, Piquette GN, Frances A, et al: Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1β in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77, 549-555

Sirois J, Simmons DL, Richards JS: Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 1992, 267, 11586-11592.

Tabibzadeh S, Kaffka KL, Satyaswaroop PG, et al: Interleukin-1 (IL-1) regulation of human endometrial function: presence of IL-1 receptor correlates with IL-1-stimulated prostaglandin E2 production. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70, 1000-1006.

Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, et al: Charaterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 190, 406-411.

Wetzka B, Nusing R, Charnock-Jones DS, et al: Cyclooxygenase-1 and -2 in human placenta and placental bed after normal and pre-eclamptic pregnancies. *Hum Reprod* 1997, 12(10), 2313-2320.

Wong WYL, Dewitt DL, Smith WL, et al: Rapid induction of prostaglandin endoperoxide synthase in rat preovulatory follicles by luteinizing hormone and cAMP in blocked by inhibitor of transcription and translation. *Mol Endocrinol* 1989, 3, 1714-1723.

Wu WX, Ma XH, Zhang Q, et al: Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2 by estradiol and progesterone in nonpregnant ovine myometrium and endometrium in vitro. *Endocrinology* 1997, 138, 4005-4012.

Yee GM and Kennedy TG: Role of adenosine 3',5'-monophosphate in mediating the effect of prostaglandin E2 on decidualization in vitro. *Biol Reprod* 1991, 45, 163-171.

Fig. 1. Immunohistochemistry of COX-1 and COX-2 in human endometriums during the menstrual cycle (A-L) and in primary cultured endometrial cells (a, b). Intense COX-1 (A-F) positive staining was observed in the luminal epithelium cells during the menstrual cycle. In the glandular epithelial cells, no positive immunostaining was obtained on the early and late proliferative phase. In the subepithelial stroma, positive staining was not detectable on the early and late secretory phase. The positive immunoreactions of COX-2 (G-L) were appeared in the luminal and grandular epithelium and stroma cells at the mid secretory. An weak positive staining was observed in subepithelial stromal cells on early proliferative phase. In the menstrual phase, no positive immunoreactivity was obtained from all tissue samples. (A, G ; menstrual phase, B, H ; early proliferative phase, C, I ; late proliferative phase, D, J ; early secretory phase, E, K ; mid secretory phase, F, L ; late secretory phase. le; luminal epithelium, ge; grandular epithelium, st; stromal cell) For immunohistochemical staining of COX-1 and -2 in cultured endometrial cells, detached single endometrial cells were grown on poly-L-lysin coated glass cover slip for 4 days after plating. COX-1 positive staining was observed in epithelial-enriched culture (a) and COX-2 positive staining was observed in stromal-enriched culture (b).