

중증 자궁내막증 환자의 자궁내막과 정상인 자궁내막에서 uPA, uPAR mRNA 발현의 차이에 관한 연구

건양대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 건국대학교 의과대학 산부인과학교실²,
이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실³

허성은¹ · 이지영² · 이운정³ · 문혜성³ · 정혜원³

mRNA Expression Differences of uPA, uPAR in Eutopic Endometrium of Advanced Stage Endometriosis Patients

Sung Eun Hur¹, Lee Ji Young², Woon Jung Lee³, Hye-Sung Moon³, Hye Won Chung³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, KonYang University, School of Medicine, Daejeon, Korea,

²Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, KonKuk University, Seoul, Korea,

³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Objective: We investigated the expression of uPA and uPAR in eutopic endometrium of advanced stage endometriosis and control patients.

Methods: The 33 endometriosis patients and 32 controls were enrolled. Endometrial samples were obtained from 65 premenopausal women aged 29~44 years, undergoing laparoscopic surgery or hysterectomy for non-malignant lesions. Sufficient samples were collected from 33 patients with endometriosis stage III and IV and 32 controls without endometriosis confirmed by laparoscopic surgery. The mRNA expression of uPA and uPAR from eutopic endometrium were analyzed by RT-QC PCR.

Results: The mRNAs of uPA and uPAR were expressed in eutopic endometrium from endometriosis and normal controls throughout the menstrual cycle. Uterine endometrium from women with endometriosis expresses significantly ($p<0.05$) higher levels of u-PA mRNA than endometrium from normal women without endometriosis in the proliferative phase. There were no significant differences in expression of uPAR in eutopic endometrium between controls and endometriosis patients.

Conclusion: These results suggest that eutopic endometrium from endometriosis patients may be more invasive and prone to peritoneal implantation because of greater u-PA mRNA expression than endometrium from women without endometriosis. Thus, increased proteolytic activity may be one etiology for the invasive properties of the endometrium resulting in the development of endometriosis.

Key Words: uPA, uPAR, Endometriosis, Proteolysis

자궁내막증은 자궁강 밖에 자궁내막 선과 간질이 존재하는 질환으로, 가임기 여성의 7~10%의 유병율을 보이지만 아직 정확한 원인과 병태생리는 명

확하게 밝혀지지 않은 질환으로서 환경적 요인, 면역학적 요인, 호르몬 요인과 유전적 요인이 함께 작용하는 것으로 알려져 있다.¹ 자궁내막증의 여러

주관책임자: Hye Won Chung, Department of Obstetrics and Gynecology, Ewha Womans University Mokdong Hospital, 911-1 Yang Chun Ku Mock 6 Dong 158-710 Seoul, Korea.

Tel: 822-650-5568, Fax: 822-2647-9860, e-mail: hyewon@ewha.ac.kr

*이 논문은 2004년도 한국과학재단의 지원에 의하여 연구되었음 (R0420030001004702004).

병인 중에서 자궁내막 세포가 월경시 역류된 생리혈에 의해 복강내로 파종되고 착상된다는 가설이 가장 유력하다.² 이런 과정에서 세포의 단백분해 (extracellular proteolysis)와 맥관형성 (angiogenesis)이 중요한 과정으로 인식되고 있다. 이러한 일차적인 요인 외에 이차적인 요인으로는 유전적인 성향과 환경적인 원인, 면역학적인 원인 등이 제시되어 왔다.^{1,3,4}

종양과 자궁내막 조직의 침습이나 전이에는 세포막의 기질 및 기저막의 파괴가 일어나야 하는데 이 과정에 plasminogen activators (PA)나 matrix metalloproteinase (MMP) 같은 proteolytic enzyme이 관여한다. Plasminogen은 fibrin을 제거하고 혈액응고작용과 관련이 있으며 조직의 remodelling, 암조직의 침습, 배란, 배아착상에 깊은 관련이 있는 fibrinolytic system의 기초가 되는 효소이다.⁵⁻⁹ Proenzyme인 plasminogen은 serine protease의 일종으로 tissue plasminogen activator (t-PA)나 urokinase plasminogen activator (u-PA)와 같은 강력한 활성효소에 의하여 매우 강력한 단백분해효소인 plasmin으로 분해된다. u-PA는 urokinase type plasminogen activator receptor (u-PAR)에 결합하여 세포이동, 조직의 remodelling, 암조직의 침습 등 다양한 생물학적 과정에 깊이 관여한다. u-PAR는 55 kDa 크기의 glycoprotein으로서 u-PA에 강한 친화력을 갖고 잘 분리되지 않는 것으로 알려져 있다. 수용체에 붙은 u-PA는 세포표면에 plasmin을 형성하여 proteolytic cascade를 시작하게 함으로서 기저막과 extracellular matrix (ECM)를 분해한다. 이러한 plasmin system에 의한 단백질 분해 과정은 matrix metalloproteinase system과 함께^{10,11} 자궁내막증의 침습에 중요한 기능을 할 것으로 추정된다. Plasmin activator system이 자궁내막증의 발생에 관여하는지에 대해서는 아직 논란이 있다.

본 연구에서는 자궁내막증의 병태생리를 연구함에 있어서 자궁내막증으로 확진된 환자와 자궁내막증이 없음을 확인한 정상 대조군에서 단백질 분해 효소인 u-PA와 그 수용체인 u-PAR mRNA의 발현에 차이가 있는지를 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription - quantitative competitive polymerase chain reaction, RT-QC PCR)을 이용하여 분석해 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1996년 9월부터 2004년 12월까지 방문한 한국인 여성 중 수술을 통해 병리조직학적으로 자궁내막증을 확인한 환자에서 revised American Society for Reproductive Medicine 분류에¹² 따라 III기와 IV기인 33명을 대상으로 하였다. 대조군은 난소 낭종 등의 양성 질환으로 개복술이나 골반경 수술을 시행한 환자 중 자궁내막증이 없음을 확인한 여성 32명을 대상으로 하였다. 환자들은 최근 6주간 비스테로이드성 항염증제, 성선자극호르몬유리호르몬 작용제 (GnRH agonist), 그리고 스테로이드성 약물 등을 투여 받은 적이 없었다. 본 연구는 임상시험 심사원 (Institutional Review Board)에서 심의를 받았으며, 각각의 환자에 대해 사전 동의를 받았다. 자궁내막 조직은 골반경을 시행한 경우는 수술 시행 전에, 개복술을 시행한 경우는 자궁 적출 후 즉시 조직을 얻었으며, 자궁내막 조직은 Noyes 등의 분류에 따라 난포기와 황체기로 나누어 분류하였고,¹³ 인산염완충 식염수 (phosphate-buffered saline; PBS)에 세척한 후, 실험할 때까지 -70°C에서 동결해 두었다.

2. 연구 방법

1) RNA 추출

동결해 두었던 내막조직을 PBS로 세 번 세척한 후, 100 mg의 조직을 RNA-STAT-60 시약 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX, USA) 1 ml과 함께 균질화시킨 후, chloroform을 첨가하고, isopropanol을 이용하여 침전시킨 후, 75% ethanol로 두 번 세척한 후, diethylpycocarbonate (DEPC)-treated dH₂O로 재희석시켰다. 추출된 RNA는 GenQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 spectrophotometry로 측정하였다. 평균 10~100 µg의 RNA가 추출되었다.

2) Reverse Transcription (RT) PCR

역전사 중합효소 연쇄반응에는 Gene Amp RNA PCR kit를 사용한다. 5 mmol/L MgCl₂, IX PCR buffer II, dNTP 1 mmol/L, 2.5 µl/L oligo deoxythymidine, 20 IU ribonuclease inhibitor, 50 IU Moloney murine leukemia

virus reverse transcriptase를 포함한 역전사용 혼합물 19 µl에 1 µl당 1 µg이 되게 희석한 RNA 1 µl를 넣은 후 역전사한다. 역전사는 Perkin-Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600을 이용하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분 반응시켜서 4°C로 냉각시킨 후 사용

전까지 -20°C에 보관한다.

3) u-PA와 u-PAR의 competitive와 target cDNA의 합성

자궁내막 조직에서 추출한 RNA로부터 역전사 후 정상 3', 5'-시발체를 넣고 PCR을 통하여 753 bp

Table 1. Oligonucleotide primers for stromal cell mRNA amplification

mRNA		Primers 5'-3'	Size (bp)	Position on mRNA
uPA	Upstream (5'-end)	CCT GGA ACT CTG CCA CTG TCC T	753	217~239
	Downstream (3'-end)	CCG GTG GGA AAT CAG CTT CAC		969~947
	Competitor	TCC CCC AAT AAT CTT CCG GTG GGA AAT CAG CTT CAC	291	486~472, 969~947
uPAR	Upstream (5'-end)	CGC TGC TGC TGC TGC TCC ACA	1234	68~89
	Downstream (3'-end)	CAA CAC AAC AGC GGC AAC AA		1301~1282
	Competitor	CAA CAC AAC AGC GGC AAC AAC GCT GCT GCT GCTGC TCC ACA	938	985~967, 1301~1282

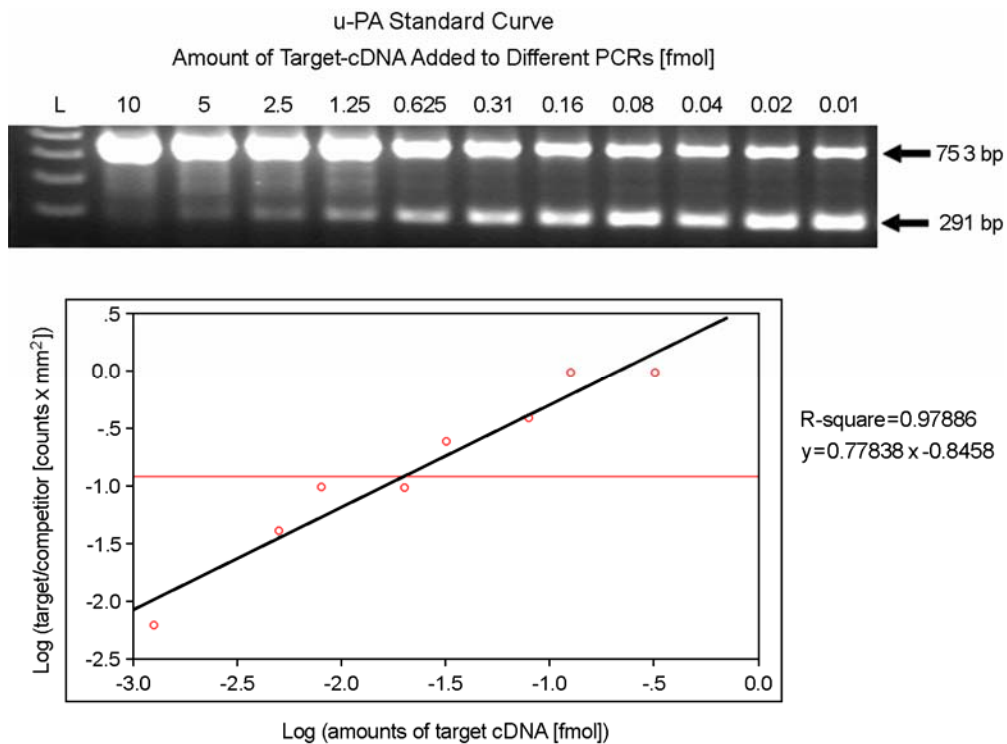


Figure 1. A representative illustration of u-PA

의 uPA, 1,234 bp의 uPAR의 target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동 시키고 Promega사의 DNA purification kit로 cDNA를 추출하였다. 정상 3', 5'-시발체 접합부위 사이의 염기 서열 중에서 3'-floating primer를 고안한 후 정상 5'-시발체와 함께 반응시켜서 target cDNA를 얻는 방법과 같은 방법으로 competitive cDNA를 추출하였다. 이렇게 만들어진 competitive cDNA는 u-PA 391 bp, u-PAR 938 bp의 크기였다.

4) u-PA와 u-PAR의 Standard curve의 작성과 competitive PCR

u-PA와 u-PAR의 standard curve는 일정한 양의 competitive cDNA와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭시켜 만든다. 표준곡선은 1.9 mmol MgCl₂, 10X PCR buffer II, 0.2 mmol/l of deoxy-NT, 2.5 U Taq-polymerase를 포함한 100 µl PCR 혼합 용액과 0.2 µmol/L의 시발체를 반응시킨 후 Perkin Elmer사의 DNA thermal cycler 9600으로 u-PA의 경우 94°C 45초, 70°C 40초, 72°C 1분으로 35주기 반응 시키고, PAI-1의 경우 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1

분으로 30주기 반응시키고 72°C 7분 elongation 시킨 후 4°C로 냉각시킨다. Ethidium bromide (ETB)로 염색한 1% agarose gel에 standard curve 및 sample PCR 산물 25 µl씩을 100 bp의 DNA ladder와 함께 전기영동 시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 UV 농도계로 gel blot을 분석한다. Standard curve에 사용한 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/competitive cDNA의 gel blot 농도의 비를 log로 전환하여 standard curve를 얻는다. 이 standard curve는 반복해서 얻어서 $y=b+mx$ 로 표현될 수 있어서 이로부터 농도를 알 수 없는 sample의 cDNA양을 계산해 낸다. 각 환자에서 얻어진 두 개 이상의 RT sample을 QC PCR 하는데 두 개의 오차는 ±5% 미만인 경우 결과로 채택한다. u-PAR의 경우도 같은 방법으로 실험한다 (Figure 1, 2).

3. 통계 분석

각각의 결과는 mean ± SEM (standard error of mean)으로 제시하였으며, 각 그룹간의 비교는 Kruskal-

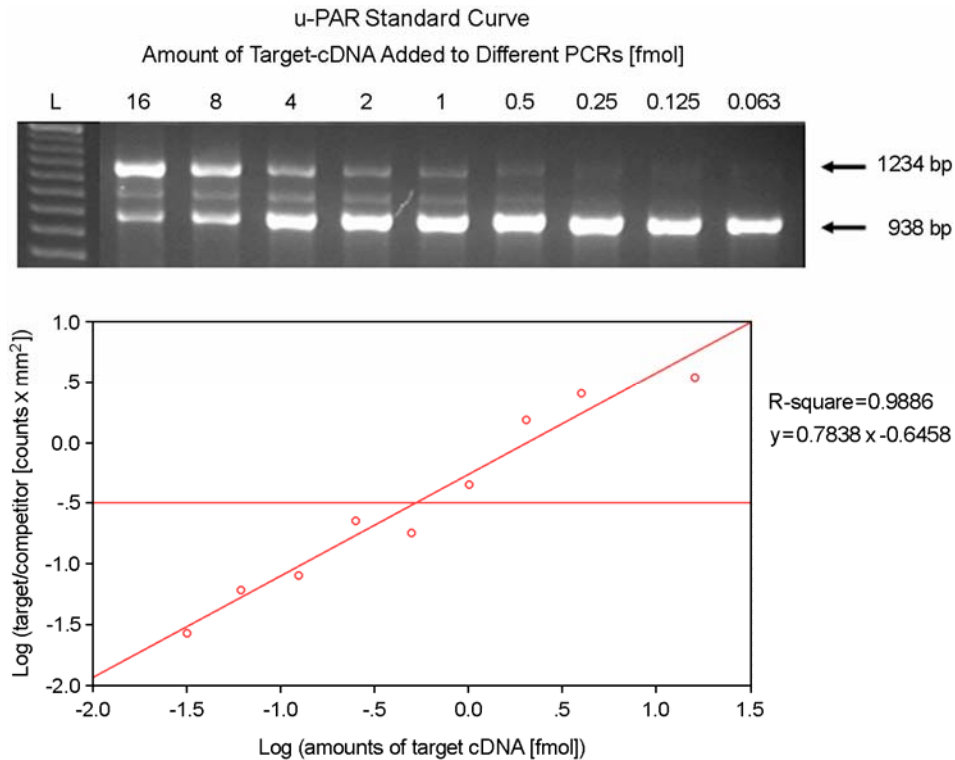


Figure 2. A representative illustration of u-PAR

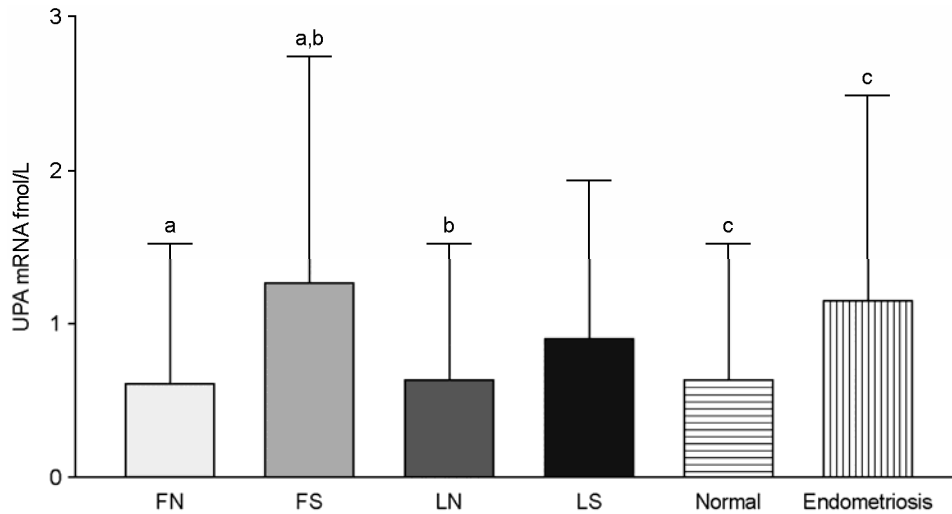


Figure 3. Quantitative and competitive polymerase chain reaction of UPA in ectopic and eutopic endometrium throughout the menstrual cycle. FN: proliferative phase endometrium from normal patients. FS: proliferative phase endometrium from endometriosis patients. LN: secretory phase endometrium from normal patients. LS: secretory phase endometrium from endometriosis patients. a=0.0118, b=0.0303, c=0.0106

Wallis와 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 각각의 통계적 방법은 Statistical Package for Social Science version 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였고, p값이 <0.05에서 통계적으로 유의하다고 보았다.

로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Figure 3). 자궁내막증 환자에서의 u-PAR mRNA는 생리주기 전반에 걸쳐 비교했을 때 대조군에 비해서 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Figure 4).

결 과

1. 생리주기에 따른 자궁내막의 u-PA와 u-PAR의 mRNA의 발현

대조군과 환자군 모두에서 생리주기 전반에 걸쳐 RT-PCR을 한 결과, 753 bp의 u-PA와 1,234 bp의 u-PAR mRNA가 발현되었다. 대조군으로 실험한 β -actin mRNA도 정상 대조군과 자궁내막증 환자군 모두에서 생리주기 전반에 걸쳐 모두 838 bp로 발현되었다.

2. u-PA와 u-PAR의 mRNA 정량 분석

u-PA와 u-PAR의 QC-PCR 결과 대조군과 자궁내막증 환자군의 자궁내막 조직에서 각각의 환자 당, target과 competitive의 두 개의 band가 보였고, 이를 표준곡선을 이용하여 정량하였다. 자궁내막증 환자 증식기 자궁내막에서의 u-PA mRNA의 발현은 대조군에 비해 높게 발현되었으나 분비기에는 통계적으

고 찰

자궁내막증은 여성 양성 질환 중에서 가장 많은 빈도를 차지하는 질환들 중의 하나로 그 원인과 발생 과정에 단백질 분해에 의한 기저막 및 세포간질의 분해가 필수적임이 밝혀져 있다.^{10,11}

자궁내막증은 양성 종양이나 악성 종양과는 다른 질환이지만 자궁내막 조직이 이소성으로 존재하고, 전이되며 성장한다는 점에서 유사하다고 할 수 있다. 자궁내막 조직에서의 u-PA의 발현이 대조군보다 환자군에서 높은 점으로 볼 때, 자궁내막증 환자에서는 월경 시에 역류된 자궁내막 조직의 단백질 분해 능력이 증가하여 기저막 및 세포간질의 분해가 일어나 조직의 침습 및 전이의 가능성이 높아지게 될 것으로 생각된다.

자궁내막증의 병인 중 월경혈의 역류에 의하여 생긴다는 가설이 가장 유력하다. 이 가설에 따르면 월경 시 역류된 이소성 자궁내막 조직이 정상적인 복

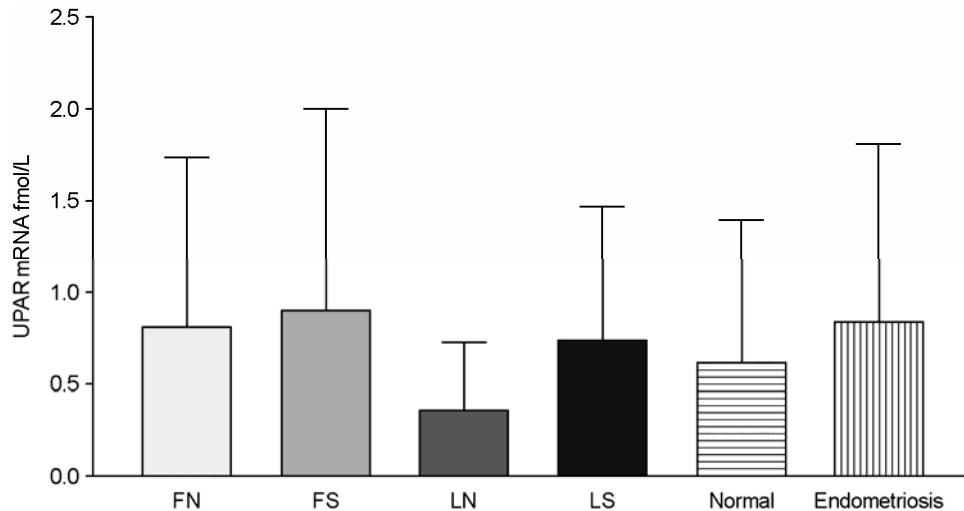


Figure 4. Quantitative and competitive polymerase chain reaction of UPAR in ectopic and eutopic endometrium throughout the menstrual cycle. FN: proliferative phase endometrium from normal patients. FS: proliferative phase endometrium from endometriosis patients. LN: secretory phase endometrium from normal patients. LS: secretory phase endometrium from endometriosis patients.

강표면에 부착하여 침습하고 자랄 수 있어야 하는데 이 과정에는 일단 단백질 분해능이 커야 한다.¹⁴ 실제로 자궁내막과 자궁내막증 조직에는 plasmin activator, MMPs 등과 그 inhibitor들이 존재하여 자궁내막증의 발생에 관여하는데 inhibitor와의 상호작용에서 효소 쪽의 활동성이 더 큰 경우 실제로 더 침습이 강하고 진행이 된 자궁내막증의 양상을 보인다.

본 연구에서 자궁내막증 환자의 자궁내막과 대조군의 자궁내막에서 증식기 동안 u-PA mRNA의 발현의 차이를 보였으며 자궁내막의 주기와 관계없이 증가함을 보여 Gilbert-Estells 등의¹⁵ 보고와 같은 양상을 보였다. 이로써 자궁내막증 환자의 자궁내막에 u-PA가 고농도로 있어서 월경 중에 자궁내막의 탈락을 변화시키고^{16,17} 탈락되어 역류된 자궁내막이 착상한 후 세포외 간질을 분해하여 자궁내막증의 발생에 관여할 것으로 생각된다.

자궁내막에는 원래 자궁 u-PA와 PAI-1이 자궁내막 조직보다 자궁내막증 조직에 더 높은 농도로 있다는 보고가 있으나¹⁶ Gilbert-Estells은 자궁내막증 조직에서는 u-PA는 차이가 없으나 PAI-1의 발현만이 증가되어 이미 형성된 자궁내막증 조직에서는 단백질 분해능이 감소된다고 하여¹⁵ 자궁내막 조직에 대한 연구결과는 같으나 이미 형성된 자궁내막

증에 대한 결과는 서로 달라 단지 PA system만이 아닌 다른 단백질 분해효소나 성장인자들과의 상호관계에 의해 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 한편 자궁내막증 세포와¹⁷ 자궁내막증이 있는 환자의 자궁내막에서 u-PAR의 발현이 증가 하였다고 보고하였는데¹⁸ 본 연구에서는 자궁내막증 환자의 자궁내막과 대조군의 자궁내막에서 u-PA의 수용체인 u-PAR의 발현은 차이가 없는 것으로 나타나 수용체보다는 ligand가 자궁내막증 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

본 논문에서 저자는 중증 자궁내막증 환자와 대조군의 자궁내막에서 u-PA와 그 수용체인 u-PAR mRNA의 발현을 생리주기 전반에 걸쳐서 비교해 보았다. u-PAR의 mRNA 발현은 생리주기 전반에 걸쳐서 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 u-PA는 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 그 발현이 증가됨으로서 수용체의 농도와는 관계없이 월경 중에 역류된 자궁내막의 침습에 관여할 것으로 사료된다. 자궁내막증에 대한 기본적인 병태생리로 볼 때, 자궁내막 자체가 가장 중요한 역할을 하리라고 보며, 이를 단백질 분해능과 연관지어 생각해 볼 때, u-PA 발현의 dysregulation이 자궁내막의 침습에 가장 중요한 병태생리가 된다.

참 고 문 헌

1. Kennedy S. Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 309-18.
2. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69.
3. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 327-31.
4. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 48-59.
5. Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassalli JD. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 1989; 109: 2471-9.
6. Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 1989; 9: 87-115.
7. Shen X, Minoura H, Yoshida T, Toyoda NNY T, Leonardsson G, Peng XR. Changes in ovarian expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 messenger ribonucleic acids during ovulation in rat. *Endocr J* 1997; 44: 341-8.
8. Krunithof EKO. Plasminogen activator inhibitors-a review. *Enzyme* 1988; 40: 113-21.
9. Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen BS, Kristensen P, Lund LR, et al. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 1993; 326: 69-74.
10. Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001; 75: 152-9.
11. Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, et al. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2002; 78: 787-95.
12. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 817-21.
13. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122: 262-3.
14. Witz CA, Thomas MR, Montoya-Rodriguez IA, Nair AS, Centonze VE, Schenken RS. Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertil Steril* 2001; 75: 385-90.
15. Gilabert-Estelles J, Estelles A, Gilabert J, Castello R, Espana F, Falco C, et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-22.
16. Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril* 1998; 70: 821-6.
17. Kobayashi H. Invasive capacity of heterotopic endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 26-32.
18. Sillem M, Prifti S, Monga B, Buvari P, Shamia U, Runnebaum B. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is over-expressed in uterine endometrium from women with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 1101-5.

= 국문초록 =

목적: 자궁내막증에서 그 병태생리를 연구함에 있어서 fibrinolytic system과의 연관성을 알아보기 위해서 자궁내막증 환자와 자궁내막증이 아닌 대조군의 자궁내막에서 urokinase plasminogen activator (u-PA)와 urokinase type plasminogen activator receptor (u-PAR)의 mRNA의 발현의 차이를 알아보고자 하였다.

연구방법: 본원 산부인과를 방문한 한국인 여성 중 수술을 통해 자궁내막증을 진단 받은 33명의 환자와 난소 낭종 등의 양성 질환으로 개복술이나 골반경 수술을 시행한 환자 중 자궁내막증이 없음을 확인한 여성 32명을 대조군으로 하였다. 각각의 대상으로부터 얻은 자궁내막 조직에서 RNA를 추출하여 RT-QC PCR을 시행하여 얻고자 하는 대상의 mRNA 양을 정량화하여 두 군 간에 차이가 있는지를 생리주기에 따라 비교하였다.

결과: u-PA와 u-PAR의 mRNA는 자궁내막증 환자 및 대조군에서 모두 발현하였으며, 자궁내막증 환자에서의 u-PA mRNA는 증식기 자궁내막에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 발현됨을 관찰하였다. u-PAR mRNA는 두 군 사이에서 생리주기 전반에 걸쳐 비교했을 때 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

결론: 자궁내막증의 병태생리와 관련하여 u-PA와 u-PAR의 mRNA 발현에 대해서 조사한 결과, u-PA mRNA가 자궁내막증 환자에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높게 발현되었고 이것은 자궁내막증 환자의 자궁내막의 성격이 좀 더 침습적이고, 이로써 복막에의 침습에도 더 유리한 역할을 가진다고 볼 수 있다. 자궁내막증에 대한 기본적인 병태생리로 볼 때, 자궁내막 자체가 가장 중요한 역할을 하리라고 보며, 이를 단백질 분해능과 연관지어 생각해 볼 때, u-PA 발현의 dysregulation이 자궁내막의 침습에 중요한 병태생리라고 생각된다.

중심단어: uPA, uPAR, Endometriosis, Proteolysis