

# 인간 자궁내막의 탈락막화에서 HOXA10 유전자의 역할

관동대학교 의과대학 제일병원 분자종양학 연구실<sup>1</sup>,  
관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실<sup>2</sup>, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과<sup>3</sup>

이창세<sup>1</sup> · 박동욱<sup>2\*</sup> · 박찬우<sup>3</sup> · 김태진<sup>3</sup>

## Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization

Chang Se Lee<sup>1</sup>, Dong Wook Park<sup>2\*</sup>, Chan Woo Park<sup>3</sup>, Tae Jin Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Oncology, <sup>2</sup>Laboratory of Reproductive Biology and Infertility,  
<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Kwandong University  
College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** This study was performed to clarify the role of HomeoboxA (HOXA) and its related signaling molecules in the decidualization of primary cultured endometrial cells.

**Methods:** Human endometrial tissues were obtained by curettage of hysterectomy specimens from patients with conditions other than endometrial diseases. Tissues were minced and digested with Trypsin-EDTA for 20 min, 37°C. Cells were cultured with DMEM/F12 medium in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator for 24 hrs. Cells were treated with HOXA10 siRNA and added transforming growth factor (TGF)-β1 (10 ng/mL) for 48 hrs to induces decidualization *in vitro*. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis was accomplished to observe the expression of HOXA10, prolactin, cyclooxygenase (COX)-2, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ, and wingless-type MMTV integration site family (Wnt).

**Results:** HOXA10 expression was increased (1.8 fold vs. non-treated control) in TGF-β1 treated cells. Decidualization marker, prolactin, was significantly increased in TGF-β1 treated cells compared with HOXA10 siRNA treated cells. Endometrial cell differentiation marker, COX-2 was down-regulated by HOXA10 siRNA even if cells were treated with TGF-β1. Wnt4 was down-regulated by treated with HOXA10 siRNA, this expression patters was not changed by TGF-β1. Expression of PPAR-γ was down regulated by TGF-β1 in regardless of HOXA10 siRNA treatment.

**Conclusion:** TGF-β1 which is induced by progesterone in endometrial epithelial cells may induces stromal cell decidualization via HOXA10 and Wnt signaling cascade. [Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(3): 207-216.]

**Key Words:** HOXA, Wnt, Decidualization, Endometrium

인간 자궁내막은 생리주기에 따라 생리 (menstruation), 증식 및 착상기 자궁내막으로의 분화를

반복하는 조직이다. 이중 자궁내막 기질세포의 탈락막화 (decidualization)는 생리주기 중 후기 분비기 (late secretory phase)에 progesterone의 영향에 의하여 일어나며 세포의 형태학적, 분자생물학적 분화를 수반하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 탈락막으로 분화된 자궁내막 세포는 prolactin (PRL), relaxin, cyclooxygenase (COX)-2 등을 발현시키는 것으로 알려져 있으며 이중 PRL은 일반적으로 사용되는

접 수 일: 2010년 6월 7일, 수정일: 2010년 7월 26일

게재확정일: 2010년 8월 3일

주관책임자: 박동욱, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19,

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실

Tel: (02) 2000-7590, Fax: (02) 2265-5621

e-mail: gypsyroad@empal.com

\* 이 논문은 2008년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 313-2008-2-E00320).

탈락막화 표지인자다.<sup>3</sup> Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 는 영장류의 자궁내막 조직에서 sex steroid hormone에 의한 생리주기에 따라 그 발현 양상이 변화하며 이는 TGF- $\beta$ 가 sex steroid hormone의 자궁내막 착상환경 조절에 중요한 역할을 함을 시사한다.<sup>4</sup> *In vitro*에서 자궁내막 세포를 탈락막화 시키기 위하여는 progesterone, cAMP 또는 TGF- $\beta$ 1 등을 외부에서 첨가하여 탈락막화를 유도할 수 있다. 이중 TGF- $\beta$ 1은 3차원 자궁내막 공배양을 이용한 연구에서 progesterone 첨가에 의하여 자궁내막 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며 분비된 TGF- $\beta$ 1은 자궁내막 기질세포에서 발현되는 TGF- $\beta$  수용체와 이와 연결된 일련의 세포 내 신호전달 시스템에 의하여 기질세포의 탈락막화를 유도하는 것으로 보고된 바 있다.<sup>5</sup> 이러한 TGF- $\beta$ 1에 의한 자궁내막의 탈락막화는 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ 에 의하여 억제되는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup>

Homeobox (HOX) 유전자는 진화론적으로 중간에 매우 잘 보존되어 있으며 배발생에 있어서 형태형성 및 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7</sup> 포유류에서는 39개의 HOX 유전자가 HOXA, B, C, D와 같은 4개의 유전자 집단 (cluster)에 속하는 것으로 보고되고 있으며 각 cluster는 각기 다른 염색체에 위치하여 9~11개의 유전자들을 포함하는 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> Taylor 등<sup>8</sup>은 paramesonephric duct의 발생과정에서 HOXA9의 경우에는 수관관으로 발달될 부분에서 주로 발현 하며 HOXA10의 경우 자궁으로 발달될 부분, HOXA11은 자궁 저부 및 자궁경부, HOXA13은 질 (vagina)로 발달될 부분에 HOX 유전자 cluster가 일렬로 발현되는 것을 보고한 바 있다. 이러한 HOXA 유전자는 이후 성체시기에 임신 및 착상에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. HOXA 유전자는 sex steroid hormone에 의하여 그 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup> 백서 (mouse)의 자궁내막에서 HOXA10은 착상기 자궁내막의 해부학적 표지인자인 pinopod의 발현을 조절하는 것으로 보고되었으며,<sup>10</sup> 이와 더불어

pinopod 내부를 채우고 있는 leukemia inhibitory factor (LIF)의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup> 따라서 HOXA10은 착상기 자궁내막으로의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 결론 지을 수 있다. 이와 더불어 HOXA11의 경우 자궁내막 기질세포주에서 PRL의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다.<sup>12</sup>

따라서 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 1을 첨가하여 배양된 자궁내막 기질세포를 탈락막화 시키는 과정에 있어서 HOXA10 유전자 및 이와 연관된 것으로 알려져 있는 유전자들의 역할을 관찰하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 자궁내막 조직의 획득

자궁내막 조직은 관동의대 제일병원 산부인과를 내원한 환자 중 자궁내막 질환 이외의 양성 질환 (자궁근종)으로 인해 전자궁적출술을 시행한 환자들을 대상으로 하였다. 이들은 모두 생리일을 기준으로 중기 및 후기 분열기인 여성들이었으며 적출된 자궁 후저부로부터 자궁내막 조직을 획득하였다. 모든 조직은 본원 기관윤리위원회의 심의 및 환자의 동의 하에 시행하였으며 최소 3인의 환자의 자궁내막 조직을 사용하였다.

### 2. 면역세포화학염색

배양된 세포를 3.7% formaldehyde 용액으로 상온에서 15분간 고정시켰다. Phosphate buffered solution (PBS)로 세척하여 남아 있는 고정액을 제거한 후 일차 항체를 500:1로 희석하여 4시간 동안 반응시킨 후 통상적 면역세포화학적 염색을 수행하였다. 면역조직화학에 사용한 일차항체는 다음과 같다. 이들을 diaminobenzidine (DAB)-chromogen으로 발색시킨 후 PBS를 culture dish에 부어 세포가 건조되는 것을 방지한 상태에서 phase contrast inverted microscope (Diaphot 300, Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 염색 정도를 확인하였다. HOXA10 및 PRL 일차 항체는 모두 Santa Cruz (California, CA,

USA)사로부터 구입하여 사용하였으며 2차 항체 처리 및 발색 kit는 DAKO (Glostrup, Denmark)사의 LSAB kit을 구입하여 사용하였다.

3. 자궁내막 조직세포 배양

적출된 자궁 검체로부터 획득한 자궁내막 조직을 PBS가 들어 있는 conical tube (Falcon, California, USA)에 담아 무균 실험대로 운반하였고, PBS로 여러 번 세척하여 혈액을 제거하였다. 자궁내막 조직을 PBS가 들어 있는 dish에서 잘게 자른 후 원심분리하여 상층액을 제거하고, trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) 10 mL을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응 후 fetal bovine serum (FBS) 1 mL을 첨가하여 효소반응을 정지시키고, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 다시 PBS 5 mL을 첨가하여 현탁시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 DMEM F/12 (10% FBS) 10 mL을 첨가하여 재 현탁시킨 후 상층액 8 mL (stromal fraction)을 100 mm 배양접시 (Corning, Corning, NY, USA)에 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 부유하는 세포 및 적혈구를 PBS로 씻어내고 2회 계대 배양하였다. 실험에 사용한 세포는 DMEM F/12 (10% FBS; 1 nM E2; 100 nM P4) 조건 하에서 배양하였으며, 실험 목적에 따라 10 ng/mL의 TGF-β1

(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고, 48시간 동안 배양하여 탈락막화를 유도하였다.

4. Small interfering RNA (siRNA)에 의한 HOXA10 유전자의 silencing

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) transfection reagent를 이용하여 siRNA를 transfection하였다. 자궁내막 세포에 20 nmoL의 HOXA10 siRNA oligonucleotides (Dharmacon, ON-TARGETplus SMARTpool M-006336-02-0020)를 transfection하였고, siRNA를 transfection한 후 24시간 뒤에 TGF-β1 (Sigma)을 첨가하여 48시간 동안 배양하였다.

5. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 통계처리

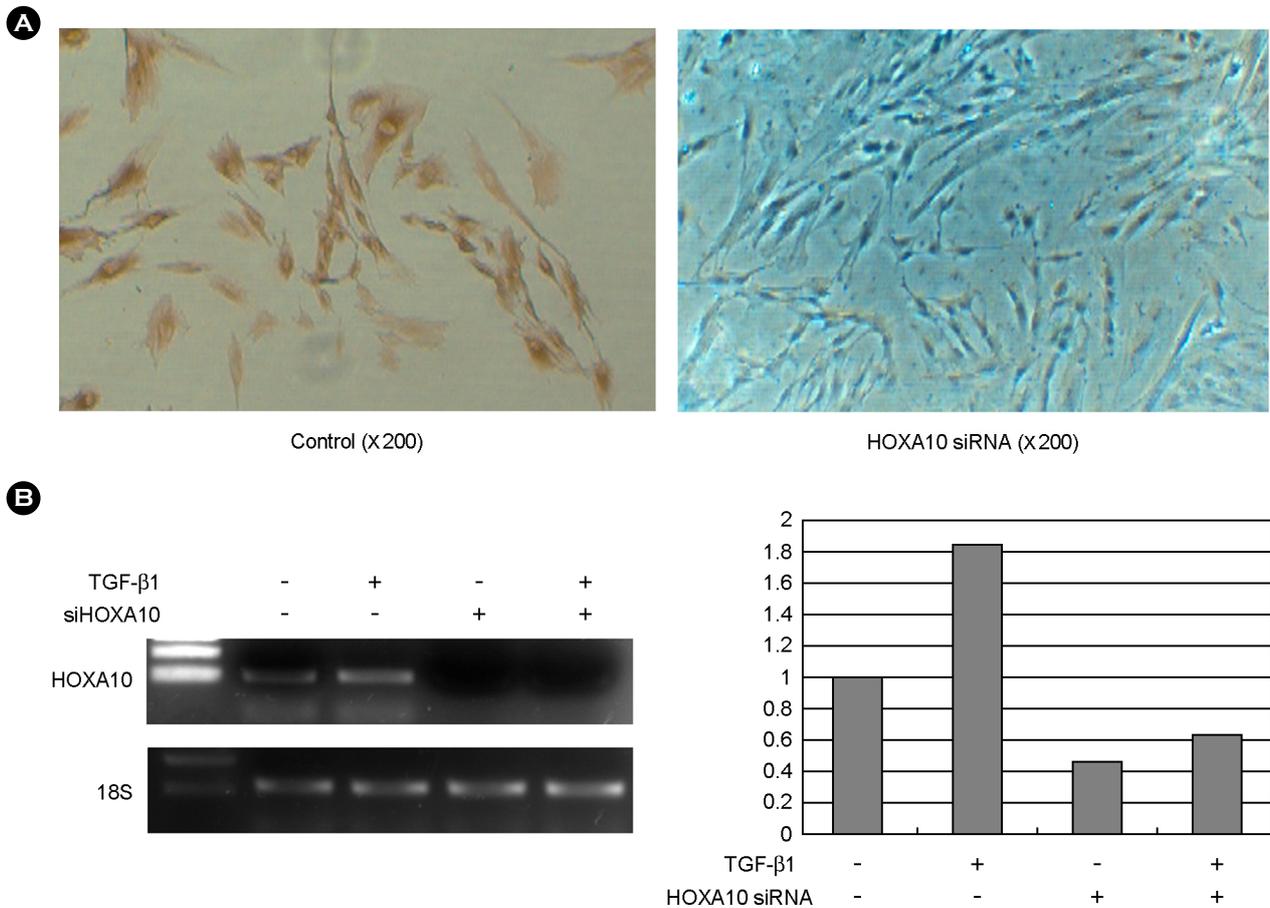
실험 목적에 따라 배양된 세포에서 TRIZOL reagent (Invitrogen)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA 2 µg으로 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 각 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 각 유전자에 대한 primer (Table 1)를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 증폭

Table 1. Gene specific primer sequence

Gene name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
HOXA10	GCCCTTCCGAGAGCAGCAAAG	AGGTGGACGCTGCGGCTAATCT
IGFBP1	CTCTCCATGTCACCAACATCAA	CCCATTCCAAGGGTAGACGC
PRL	AAAGCTGTAGAGATTGAGGAGCA	CGATTTTATGTGAATCCCTGCGT
COX-2	CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA	GCCCTCGCTTATGATCTGTC
PPAR-γ	CTCATGAAGAGCCTTCCAACCTCC	ACCCTTGCATCCTTCACAAGC
Wnt3	GACCACATGCACCTCAAATG	GATGCAGTGGCATTTCCT
Wnt4	ACCTGGAAGTCATGGACTCG	GCCTCATTGTTGTGGAGGTT

HOX, homeobox; IGFBP, insulin-like growth factor-binding protein; PRL, prolactin; COX, cyclooxygenase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Wnt, wingless-type MMTV integration site family.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.



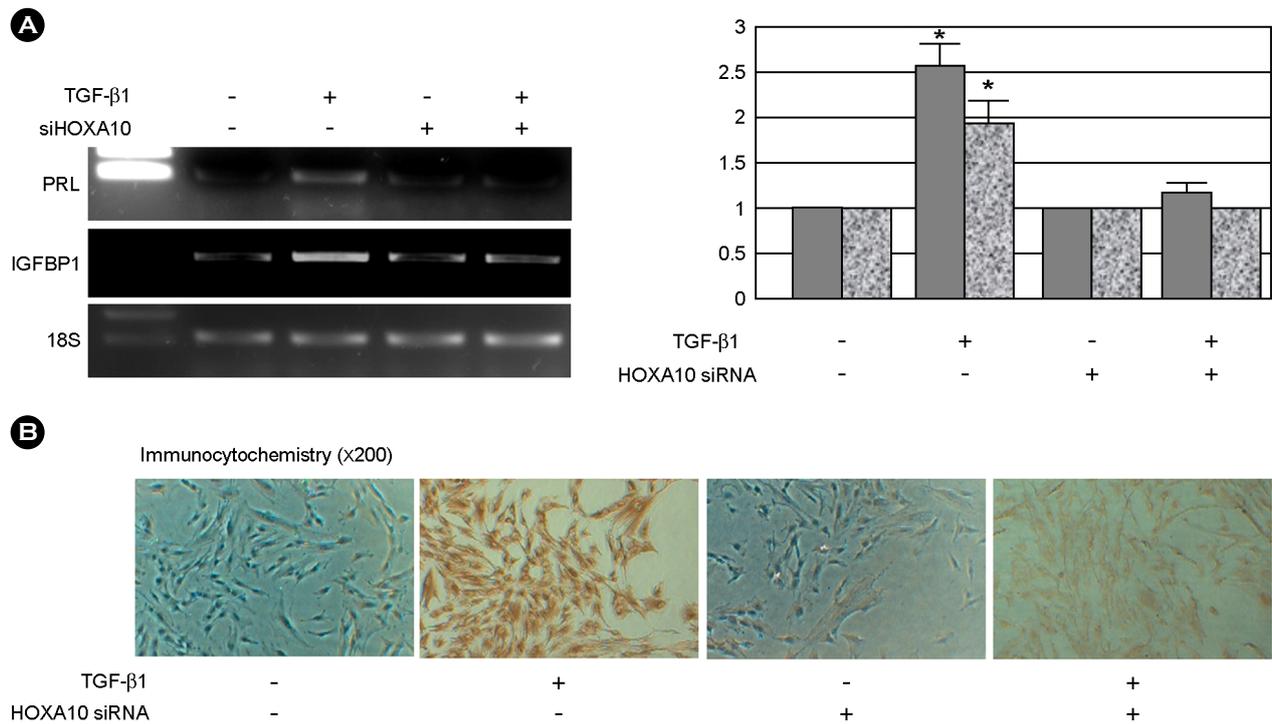
**Figure 1.** (A) Immunocytochemical images of cultured human endometrial cells. Over 95% of cultured endometrial cells express HOXA10. Immunological resulting in a brownish stain and counterstained with Mayer's hematoxyline ( $\times 200$ ). HOXA10 siRNA eliminates HOXA10 expression in endometrial cells. (B) RT-PCR analysis for HOXA10 expression in cultured human endometrial cells. TGF- $\beta 1$  (10 ng/mL, for 48 hr) upregulated HOXA10 mRNA expression, these effect was diminished by treatment of HOXA10 siRNA. HOX, homeobox; siRNA, small interfering RNA; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; TGF, transforming growth factor.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.

된 유전자는 통상적인 agarose 전기영동을 수행하였으며 GeneFlash imaging system (Syngene, Frederick, MD, USA)을 이용하여 band의 강도를 측정하였다. 데이터는 대조군을 1로 하여 증감을 값으로 나타내었으며 각기 독립적인 3번의 실험을 수행하였다. ANOVA test를 이용하여 통계를 수행하였다.  $p$ 값이 0.05 미만일 경우 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 변화로 인정하였다.

## 결 과

HOXA10 siRNA의 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁내막 HOXA10 siRNA를 72시간 처리하여 HOXA10 단백질 및 mRNA의 발현을 면역세포화학 적 방법 및 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 확인 결과 HOXA10 siRNA를 처리한 세포에서 90% 이상의 세포가 HOXA10 단백질을 발현하지 않았으며 (Figure 1A), mRNA의 발현에 있어서도 HOXA10 siRNA를 처리한 군에 있어서 HOXA10 mRNA의 발현이 50% 이상 감소하는 것을 확인할 수 있었



**Figure 2.** Effect of HOXA10 siRNA on and IGFBP-1 expression. TGF-β1 (10 ng/mL, for 48 hr) upregulated PRL and IGFBP1 mRNA (A) and PRL protein (B) expression, these effect were inhibited by treatment of HOXA10 siRNA. Values are the mean intensity (± standard deviation) from three independent experiments. Immunological resulting in a brownish stain and counterstained with Mayer's hematoxyline (×200). \*indicates  $p < 0.05$  vs. control. HOX, homeobox; siRNA, small interfering RNA; PRL, prolactin; IGFBP-1, insulin-like growth factor-binding protein-1; TGF, transforming growth factor.

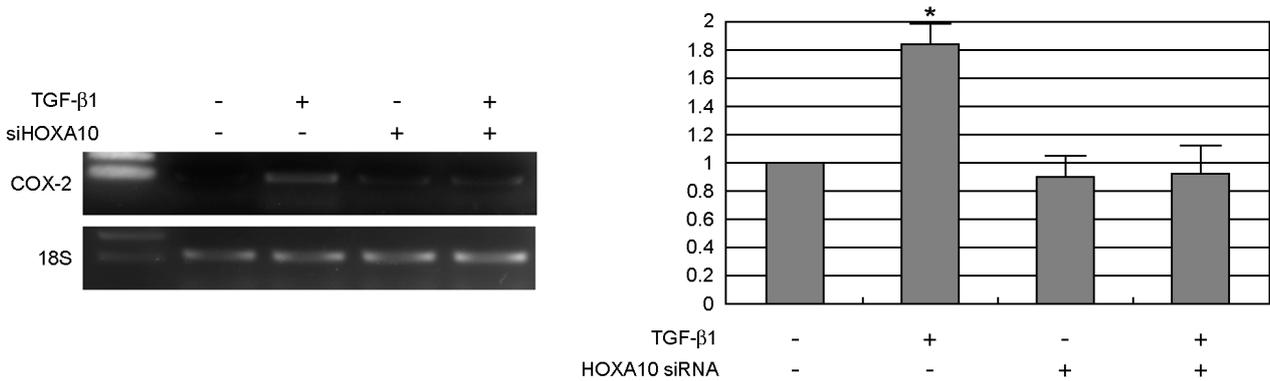
Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.

다. 또한 48시간 동안 10 ng/mL의 농도로 TGF-β1을 처리한 군에 있어서도 HOXA10 mRNA의 발현이 50% 가량 감소하는 것을 알 수 있었다 (Figure 1B). 따라서 본 연구에 사용한 HOXA10 siRNA는 효과적으로 HOXA10의 mRNA와 그 산물 단백질의 발현을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

HOXA10 siRNA에 의한 PRL의 발현 억제를 관찰하기 위하여 48시간 동안 10 ng/mL의 TGF-β1을 처리함과 동시에 HOXA10 siRNA를 처리하여 PRL 단백질 및 mRNA의 발현을 RT-PCR 및 면역세포 화학적 염색법으로 관찰하였다. 실험 결과 TGF-β1을 처리한 군에서 PRL의 발현양이 처리하지 않은 대조군에 비하여  $2.6 \pm 0.42$ 배 ( $p < 0.05$ ) 증가하였으나 HOXA10 siRNA를 동시에 처리한 군에 있어서는 TGF-β1의 처리와는 상관없이 그 증가를 관찰할

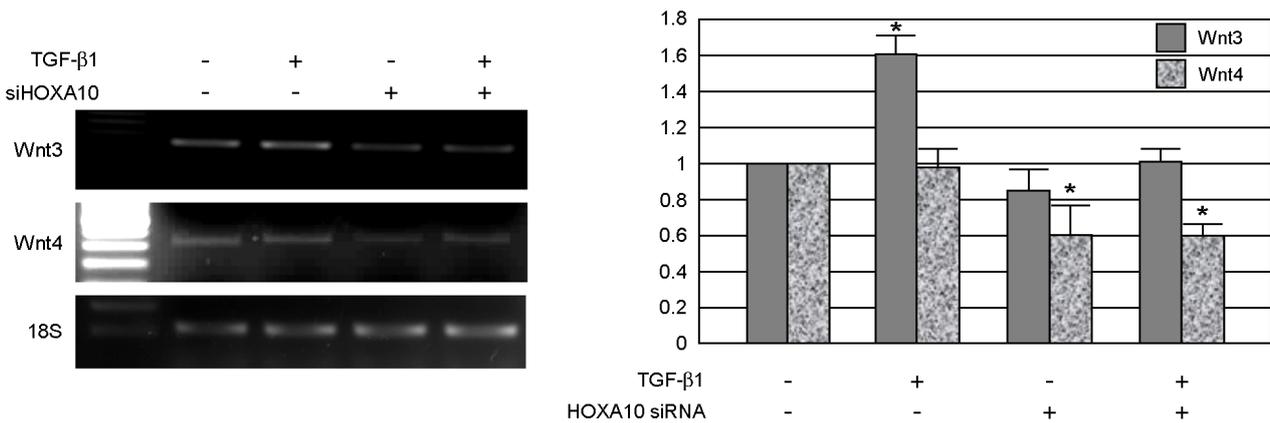
수 없었다. 이와 더불어 또 하나의 타락막 표지인자로 알려진 IGFBP1 역시 TGF-β1를 처리한 군에서  $1.9 \pm 0.38$ 배 ( $p < 0.05$ ) 증가하는 양상을 보였으며 대조군 및 HOXA siRNA를 처리한 군 및 HOXA siRNA와 TGF-β1만을 처리한 군에서는 그 발현양의 변화를 관찰할 수 없었다 (Figure 2A, 2B). 또한 cyclooxygenase (COX)-2의 발현 역시 TGF-β1에 의하여  $1.82 \pm 0.2$ 배 ( $p < 0.05$ ) 증가하는 양상을 보였으나 siRNA를 이용하여 HOXA10 유전자의 발현을 억제한 군에 있어서는 증가를 관찰할 수 없었다 (Figure 3).

이와 더불어 TGF-β의 세포 내 신호전달과 관계 있는 것으로 알려진 wingless-type MMTV integration site family (Wnt)<sup>13</sup>의 발현양을 비교하였다. 실험 결과 Wnt3의 경우 TGF-β1의 처리에 의하여 발현양



**Figure 3.** Effect of HOXA10 siRNA on COX-2 expression. TGF-β1 (10 ng/mL, for 48 hr) upregulates PRL mRNA expression. These effect was inhibited by treatment of HOXA10 siRNA. Values are the mean intensity (± standard deviation) from three independent experiments. \*indicates  $p < 0.05$  vs. control. HOX, homeobox; siRNA, small interfering RNA; COX, cyclooxygenase; TGF, transforming growth factor; PRL, prolactin.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.



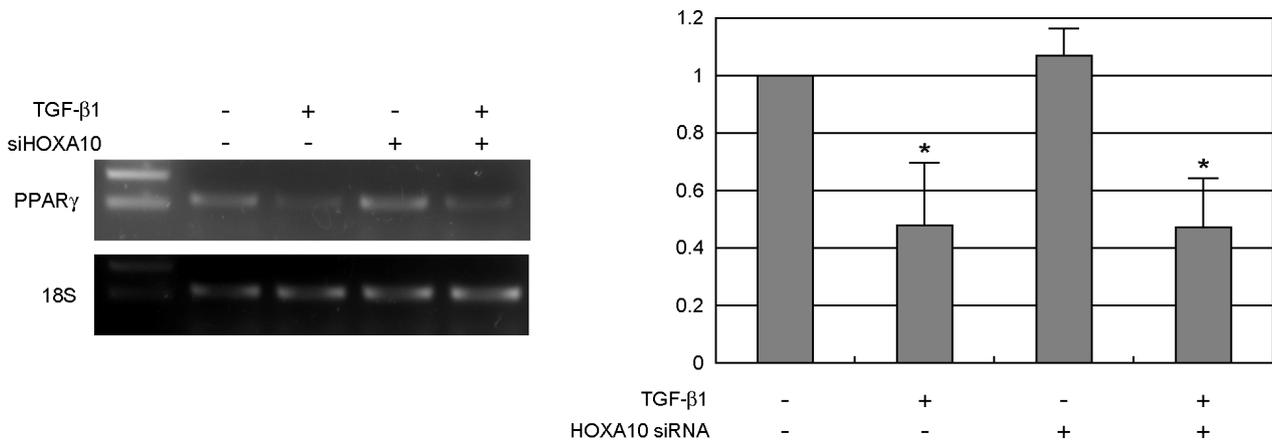
**Figure 4.** Effect of HOXA10 siRNA on Wnt3 and Wnt4 expression. TGF-β1 (10 ng/mL, for 48 hr) upregulates Wnt3 mRNA expression. This effect was inhibited by treatment of HOXA10 siRNA. Expression of Wnt for was not upregulated by TGF-β1, but it diminished by HOXA10 siRNA. Values are the mean intensity (± standard deviation) from three independent experiments. \*indicates  $p < 0.05$  vs. control. HOX, homeobox; siRNA, small interfering RNA; Wnt, wingless-type MMTV integration site family; TGF, transforming growth factor.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.

이  $1.6 \pm 0.2$ 배 ( $p < 0.05$ ) 가량 증가하였으나 HOXA10 siRNA의 처리에 의하여 mRNA의 발현양에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나, Wnt4 발현의 경우 TGF-β1의 처리에 영향을 받지 않았으나 HOXA10의 발현을 억제했을 경우 그 발현이 0.4배 가량 감소함을 확인할 수 있었다 (Figure 4).

PPAR-γ의 경우 TGF-β1 처리에 의하여  $0.48 \pm 0.2$  ( $p < 0.05$ )로 그 발현이 감소되었으며, TGF-β1과

HOXA10 siRNA를 동시에 처리한 군에서는  $0.47 \pm 0.15$  ( $p < 0.05$ ) 정도로 발현이 감소하였다. 그러나 HOXA10 siRNA만 단독으로 처리한 군에 있어서는 감소되거나 증가하는 양상을 관찰할 수 없었다 (Figure 5).



**Figure 5.** Effect of HOXA10 siRNA on peroxisome PPAR- $\gamma$  expression. TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL, for 48 hr) inhibited PPAR $\gamma$  mRNA expression. These effects were not affected by treatment of HOXA10 siRNA. Values are the mean intensity ( $\pm$  standard deviation) from three independent experiments. \*indicates  $p < 0.05$  vs. control. HOX, homeobox; siRNA, small interfering RNA; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TGF, transforming growth factor.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.

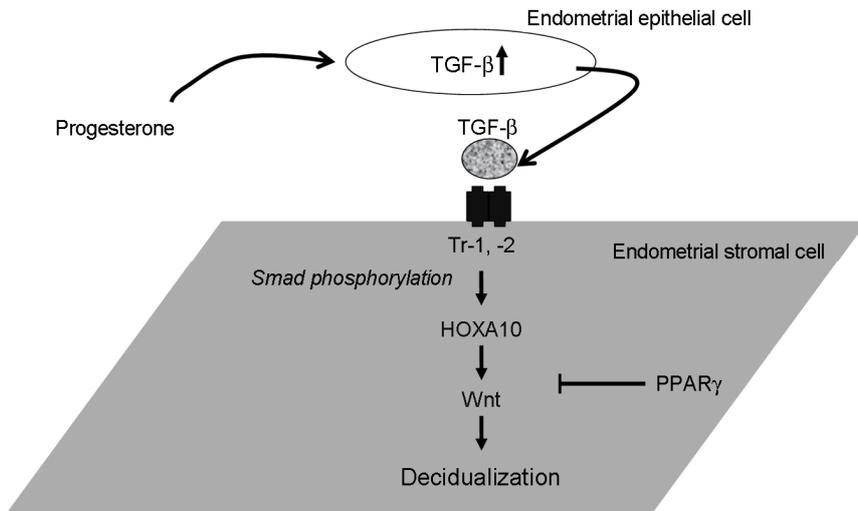
## 고찰

백서의 자궁내막에서 HOXA10의 발현을 억제시켰을 경우 배란이 정상적으로 이루어져도 정상적인 착상이 일어나지 않는다.<sup>14</sup> 이는 HOXA 유전자 산물이 자궁내막의 분화 및 착상환경 (endometrial receptivity) 구현에 중요한 역할을 하는 것을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 인간 자궁내막의 분화 중 탈락막화 과정에 있어서 HOXA10의 역할 및 이와 관련된 유전자들의 발현을 관찰하고자 하였다.

본 연구에서 자궁내막 기질세포의 탈락막화를 유발하는 것으로 알려진 TGF- $\beta$ 1을 처리한 경우 HOXA10의 발현이 유의하게 증가함을 볼 수 있었다 (Figure 1B). 현재까지 TGF- $\beta$ 에 의한 HOX 유전자 발현 조절에 관한 보고는 그리 많지 않다. 그러나 Gamer 등<sup>15</sup>은 닭의 사지 (limb) 발달에 있어서 TGF- $\beta$ 의 상위족 (superfamily)인 GDF11이 일부 HOX 유전자의 발현을 조절함을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서도 자궁내막 분화인자인 TGF- $\beta$ 가 배양된 자궁내막 세포의 HOXA10의 발현을 유도하는 것으로 생각된다. 배양된 자궁내막 세포에

서 PRL 및 COX-2의 발현은 HOXA10을 knockdown시켰을 경우 TGF- $\beta$ 1의 처리와 상관없이 발현양의 증가를 보이지 않았다 (Figures 2, 3). 이러한 연구 결과는 hCG를 처리한 배양된 자궁조직에서 HOXA10의 발현이 증가된다는 최근의 보고<sup>16</sup>와도 일치하는 것으로 초기 착상에 있어서 HOXA10이 중요한 역할을 할 것을 의미한다. 또한 영장류를 이용한 자궁내막증 모델연구<sup>17</sup>에서 밝힌 바와 같이 HOXA10은 자궁내막에서 탈락막화를 조절하는 인자 중 하나라는 것을 증명하는 결과로 생각된다.

Wnt 유전자는 초파리의 체절분화와 연관되어 있으며 다양한 glycoprotein의 발현과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 인간과 백서에서 Wnt족 유전자들은 19개 그룹의 신호전달 분자들의 분비와 관련되어 있으며 이들은 세포의 세포간 상호작용, 성장 및 분화에 관계하는 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 백서를 이용한 착상 및 임신모델에서 Wnt는 난소로부터 분비되는 steroid hormone에 의하여 그 발현이 조절되며 임신 및 착상에 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>19</sup> 따라서 본 연구에서도 인간 자궁내막의 탈락막화 과정에 Wnt가 관여할 것으로 가정하였다. 연구 결과 Wnt3의 경우 TGF- $\beta$ 1의 처리에 의하여



**Figure 6.** A schematic drawing of human endometrial stromal cell decidualization. TGF, transforming growth factor; HOX, homeobox; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Wnt, wingless-type MMTV integration site family.

Chang Se Lee. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. Korean J Reprod Med 2010.

그 발현이 증가하였으나 HOXA10의 발현을 억제한 군에 있어서는 그 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 Wnt4의 경우에는 TGF-β1의 첨가에 의하여 그 발현양이 증가하지는 않았으나 HOXA10의 발현을 knockdown시킨 자궁내막 세포에 있어서는 그 발현양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 반면에 Wnt-6, -7, -5b, -10b 및 -3a의 경우 HOXA10 siRNA 및 TGF-β1의 처리에 의하여 발현양의 변화를 관찰할 수 없었다 (data not shown). 현재까지 다양한 Wnt 유전자들이 인간 자궁내막에서 생리주기 중 증식 및 분비에 발현하는 것으로 알려져 있다.<sup>20</sup> 이중 Wnt4는 포배의 착상에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며 인간과 백서의 자궁내막에서 탈락막화 과정 중 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. 배양된 백서 자궁내막을 이용한 연구에서 TGF-β의 상위족인 BMP2가 Wnt4를 하위 타겟으로 하여 탈락막화를 유발한다는 연구 결과<sup>21</sup>에서 나타내는 바와 같이 본 연구에서도 인간 자궁내막 세포의 탈락막화 과정에 있어서는 TGF-β의 하위 타겟으로 Wnt4가 작용함을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과로 미루어 TGF-β에 의한 자궁내막 세포의 탈락막화 과정은 TGF-β에 의하여 인산화된 smad2/3가 핵으로 이동하여 Wnt4의 발현을 조절하며 이 결과 탈락막화가 진행되는 것으로 가정할 수 있으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생

각된다.

PPAR는 nuclear hormone receptor 족의 일원으로서 기질의존적 전사요소 (ligand-dependent transcription factors)로 알려져 있다. 현재까지 세 종류의 PPAR이 알려져 있으며 (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) 이 중 PPAR $\gamma$ 는 세포의 성장, 분화, 사멸 및 염증 반응과 같은 다양한 생체 반응을 조절하는 것으로 보고되고 있다. 이와 더불어 PPAR $\gamma$ 를 인간 간암세포에서 과발현 시켰을 경우 TGF-β1에 의한 Smad 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup> Chang 등<sup>3</sup>은 TGF-β1에 의한 자궁내막 세포의 탈락막화 과정은 PPAR $\gamma$ 에 의해서 억제됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 TGF-β1을 처리한 세포에서 PPAR $\gamma$  mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 HOXA10의 발현 억제에 따라 그 발현양의 변화는 관찰되지 않았다 (Figure 5). 이러한 결과로 미루어 TGF-β1과 PPAR $\gamma$ 간에는 음의 상관관계가 있는 것으로 보이며 이러한 과정은 HOXA10의 발현과는 무관하게 진행되는 것으로 생각된다.

본 연구진은 이전의 연구 결과에서 자궁내막 기질세포의 탈락막화 과정은 progesterone에 의한 직접적인 영향 보다는 progesterone에 의하여 자궁내막 상피세포에서 분비된 TGF-β가 기질세포에 발현된 TGF-β 수용체와 결합함으로써 일어남을 증명하였으며 이와 같은 일련의 과정은 PPAR $\gamma$ 에 의하여

억제됨을 보고한 바 있다.<sup>3,5</sup> 본 연구에서는 이러한 일련의 탈락막화 과정에 TGF- $\beta$  이외에도 HOXA10 및 Wnt 역시 관여함을 관찰하였다.

결론적으로, 성호르몬에 의하여 착상기로 분화되는 자궁내막에서 progesterone에 의하여 자궁내막 상피세포로부터 분비된 TGF- $\beta$ 에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화 과정은 HOXA10과 Wnt를 통한 세포 내 신호전달과정을 거치는 것으로 결론지을 수 있다 (Figure 6). 또한 이러한 세포 내 신호전달 과정 및 각 분자들간의 정확한 상관관계를 증명하기 위한 추가적인 분자생물학적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Takekida H. Autoradiographic studies on the nucleic acid and protein synthesis and the decidualization of endometrium in early pregnancy of rat. *Acta Obstet Gynaecol Jpn* 1971; 18: 200-13.
2. Tamaya T, Fujimoto J, Arabori K, Wada K, Kato Y, Okada H. The biologic role of sex steroid receptors in the decidualization of human endometrium. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1985; 11: 573-8.
3. Chang HJ, Lee JH, Hwang KJ, Kim MR, Chang KH, Park DW, et al. Transforming growth factor (TGF)-beta1-induced human endometrial stromal cell decidualization through extracellular signal-regulated kinase and Smad activation in vitro: peroxisome proliferator-activated receptor gamma acts as a negative regulator of TGF-beta1. *Fertil Steril* 2008; 90: 1357-65.
4. Sachdeva G, Patil V, Katkam RR, Manjramkar DD, Kholkute SD, Puri CP. Expression profiles of endometrial leukemia inhibitory factor, transforming growth factor beta2 (TGFbeta2), and TGFbeta2 receptor in infertile bonnet monkeys. *Biol Reprod* 2001; 65: 1-8.
5. Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 801-8.
6. Pinsonneault J, Florence B, Vaessin H, McGinnis W. A model for extradenticle function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. *EMBO J* 1997; 16: 2032-42.
7. Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 2006; 313: 1918-22.
8. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1338-45.
9. Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 75-9.
10. Bagot CN, Kliman HJ, Taylor HS. Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Dev Dyn* 2001; 222: 538-44.
11. Quinn CE, Detmar J, Casper RF. Pinopodes are present in Lif null and Hoxa10 null mice. *Fertil Steril* 2007; 88: 1021-8.
12. Lynch VJ, Brayer K, Gellersen B, Wagner GP. HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes. *PLoS One* 2009; 4: e6845.
13. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19: 71-88.
14. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995; 374: 460-3.
15. Gamer LW, Cox KA, Small C, Rosen V. Gdf11 is a negative regulator of chondrogenesis and myogenesis in the developing chick limb. *Dev Biol* 2001; 229: 407-20.
16. Fogle RH, Li A, Paulson RJ. Modulation of HOXA10 and other markers of endometrial receptivity by age and human chorionic gonadotropin in an endometrial explant model. *Fertil Steril* 2010; 93:1255-9.
17. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, et al. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 323-32.
18. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 45-51.
19. Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean JA 2nd, Rucker EB 3rd, et al. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biol Reprod* 2009; 80: 989-1000.

20. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3860-6.
21. Li Q, Kannan A, Wang W, Demayo FJ, Taylor RN, Bagchi MK, et al. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. *J Biol Chem* 2007; 282: 31725-32.
22. Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, Wu T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE)2/EP1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF-beta-induced mitoinhibition. *J Biol Chem* 2004; 279: 44344-54.

---

= 국문초록 =

**목적:** Small interfering RNA (siRNA)를 이용하여 homeobox (HOXA) 10 유전자의 발현이 억제된 일차배양 자궁내막 세포를 이용하여 자궁내막 탈락막화 (decidualization)에 HOXA 유전자를 포함한 세포 내 신호전달기전을 분석하고자 하였다.

**연구방법:** 본원 산부인과에서 자궁내막 질환 이외의 이유로 전자궁 적출술을 받은 환자의 자궁내막 조직을 채취한다. 37°C에서 20분간 Trypsin-EDTA를 처리하여 단일세포로 분리한 후 10% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM/F12 배지를 이용하여 24시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 배양한다. 배양된 자궁내막 세포를 HOXA10 siRNA로 첨가한 후 TGF-β1을 10 ng/mL 농도로 48시간 첨가하여 탈락막화를 유도한다. 배양된 자궁내막 세포에서 reverse transcription polymerase chain reaction을 이용하여 HOXA10, prolactin, cyclooxygenase (COX)-2, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ 및 wingless-type MMTV integration site family (Wnt)의 발현을 관찰하였다.

**결과:** HOXA10의 경우 transforming growth factor (TGF)-β1과 HOXA10 siRNA를 처리하지 않은 대조군에 비하여 TGF-β1을 처리한 군에서 약 1.8배 가량 발현양의 증가를 보였다. 자궁내막 표지인자로 알려져 있는 prolactin의 경우 TGF-β1을 처리한 경우 대조군에 비하여 유의한 발현의 증가를 보였으며 HOXA10 siRNA를 처리한 군에 있어서는 TGF-β1을 첨가하더라도 prolactin mRNA의 발현양의 증가를 관찰할 수 없었다. 또한 자궁내막 세포의 분화인자로 알려져 있는 COX-2의 발현 역시 HOXA10 siRNA를 처리한 군에 있어서 mRNA 발현양이 유의하게 감소하였으며 TGF-β1을 처리하여도 발현의 증가를 관찰할 수 없었다. Wnt4의 경우 HOXA10 siRNA를 이용하여 HOXA10의 발현을 억제한 경우 대조군에 비하여 유의하게 mRNA의 발현양이 감소하였으며 이러한 발현양의 감소는 TGF-β1을 처리하여도 증가됨을 관찰할 수 없었다. PPARγ의 발현은 HOXA10 siRNA의 처리와 관계없이 TGF-β1에 의하여 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

**결론:** Progesterone에 의하여 자궁내막 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있는 TGF-β1에 의한 자궁내막 기질세포의 분화 (탈락막화)는 HOXA10 및 Wnt에 의하여 조절되는 것으로 생각된다.

**중심단어:** HOXA, Wnt, 탈락막화, 자궁내막

---