

의학 석사학위 논문

TGF- β 와 PPAR- γ 에 의한
자궁내막 분화

아주대학교 대학원

의학과

권종희

TGF- β 와 PPAR- γ 에 의한
자궁내막 분화

지도교수 황 경 주

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

권 중 희

권종희의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 유 희 석 인

심사위원 황 경 주 인

심사위원 김 미 란 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2005년 6월 22일

TGF- β 와 PPAR- γ 에 의한 자궁내막 분화

목적 : 배양된 인간의 자궁내막을 이용하여 착상과 임신 유지에 필수적인 자궁내막의 탈락막화 과정에서 TGF- β 와 PPAR- γ 의 작용을 알아보려고 한다.

연구 방법 : 인간의 자궁내막조직에서 증식기와 분비기의 TGF- β 와 Smad발현을 면역조직화학적 방법을 통해 비교하였다. 또한 자궁내막의 기질세포를 배양하여 TGF- β 와 PPAR- γ agonist를 처리하여 western blotting과 동초점 현미경, 생활성 세포의 수를 관찰하여 탈락막화의 과정에서 이들의 작용을 비교하였다.

결과 : 인간자궁내막조직에서 증식기에는 자궁내막의 상피 세포와 간질세포에서의 TGF- β 수용체 I, II형의 발현 정도는 차이가 없었으나 분비기에는 상피세포보다 간질세포에서 두 수용체가 모두 높게 발현되었다. 또한 TGF- β 신호전달 경로중 하나인 인산화된 Smad2/3의 발현과 세포핵 내로의 이동 역시 증식기보다 분비기에 더 높게 발현되었다.

PPAR- γ 는 세포핵의 스테로이드 수용체의 superfamily 중 하나로 PPAR- γ 는 태반에서 발견되어 영양세포의 분화와 조직침투에 관여하는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서는 증식기의 간질세포에서도 발현됨을 알 수 있었고, PPAR- γ agonist를 TGF- β 와 같이 처리하였을 때 TGF- β 의 작용을 상쇄시키는 결과를 보였다.

결론 : 자궁내막 분비기 간질세포에서는 탈락막화 과정을 위한 TGF- β 와 Smad의 발현이 증가되어 있었고 탈락막화 과정에 TGF- β /Smad 신호전달 경로가 중추적인 역할을 하며 PPAR- γ 는 이러한 신호전달 경로를 차단함으로써 TGF- β 의 작용을 억제하는 작용을 한다.

핵심어 : 자궁내막 기질세포, 탈락막화, TGF- β , pSmad, PPAR- γ

차 례

국문요약	i
차례	ii
그림 차례	iii
표 차례	iv
I. 서론	1
II. 연구대상 및 방법	3
A. 자궁내막조직의 획득	3
B. TGF- β 와 Smad 발현에 대한 면역조직화학적 분석	3
C. 자궁내막 기질세포의 배양	3
D. Western blot analysis	4
E. 동초점 현미경(confocal microscopy)	5
F. 생활성 세포의 수(cell count)	5
III. 결과	7
A. 정상 자궁내막에서의 TGF- β 수용체 1형, 2형과 pSmad2/3의 분포와 발현양상	7
B. 기질세포에서의 Prolactin과 pSmad2/3의 분포 및 발현 양상	10
C. Western blotting	12
D. 동초점 현미경	13
E. 생활성 세포의 수	14
IV. 고찰	15
V. 결론	19
참고문헌	20
영문요약	24

그림 차례

Fig. 1. TGF- β receptor type-1,-2 expression by immunohistochemical staining	8
Fig. 2. pSmad2/3 expression by Immunohistochemical staining	10
Fig. 3. prolactin-positive and pSmad2/3 positive stromal cell	11
Fig. 4. Western blotting	12
Fig. 5. pSmad2/3, Prolactin, and PPAR- γ expressions by confocal microscopy	13
Fig. 6. Cell count after 72hour culture	14

표 차례

Table 1. Immunohistochemical expression comparison by Image

Pro Plus 4.5	9
--------------------	---

I. 서론

인간의 자궁내막은 생리 주기 동안에 난소의 스테로이드 호르몬의 영향 하에 광범위한 생화학적, 형태학적 변화의 과정을 거치며 임신시 배아의 착상에 관여를 한다. 이러한 변화의 과정에는 스테로이드 호르몬 뿐 아니라 다양한 성장인자, 사이토카인 등이 작용하는 것으로 알려져 있다(Luo 등, 2003). 배아의 착상을 위해 간질 세포는 특징적으로 탈락막화 과정을 겪게 되는데 프로게스테론의 영향을 받아 섬유모세포와 유사한 형태의 세포에서 프로락틴과 insulin-like growth factor binding protein-1(IGFBP-1) 등을 특징적으로 분비하는 원형세포의 형태로 변화하게 된다. 시험관 내에서는 탈락막화 과정에서 황체호르몬 뿐 아니라 세포내의 cAMP의 증가가 필수적인 것으로 알려져 있으며 생체내에서는 황체호르몬, prostaglandin E, relaxin등이 이러한 환경을 조성한다고 알려져 있다(Dunn 등, 2003).

TGF- β 는 다양한 기능을 가진 사이토카인으로 세포의 성장, 분화, 세포자멸, 혈관형성, 암의 전이, 염증과 면역반응, 세포외기질 축적, 유착 분자, 단백질 분해효소 등의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있고 인간의 생리주기 전반에 걸쳐 발현되며 난소의 스테로이드 호르몬에 의해 조절된다(Arici 등, 1996). 특히 인간의 자궁내막조직에서 TGF- β mRNA 생성의 증가가 중기 및 후기 분비기에 상승하며 생리 후 자궁내막조직의 재생성과정에서 혈관형성에 관여하는 것으로 보고되었다(Casslen 등, 1998). Mashburn(Mashburn 등, 1994) 등에 의하면 기질세포에서의 TGF- β 1의 발현이 분비기에 가장 많이 상승하며 상피세포의 발현과 분화에 작용할 것으로 보고하였고, TGF- β 2 역시 분비기에 가장 많이 상승하는 것으로 알려져 있는데 이것은 에스트로겐 보다는 황체호르몬이 TGF- β 의 발현을 유도하기 때문인 것으로 보고하고 있다. TGF- β 2는 또한 시험관내에서 자가분비/측분비를 통해 자궁내막의 기질세포에서 세포자멸을 조절하는 기전으로 임신 초기에 이들 세포의 자멸에 관여한다고 알려져 있다

(Moulton, 1994).

TGF- β 는 비활성화 상태로 세포에서 분비된 후 plasmin의 단백분해 작용에 의해 활성화되는데 TGF- β 2형 수용체와 결합하여 1형 수용체를 활성화시키고 활성화된 1형 수용체는 세포질단백질인 Smad2, 3를 인산화시켜 Smad4와 복합체를 이루게 된다. 이 복합체는 핵내부로 이동하여 다양한 유전자발현을 조절하게 된다(Cohen, 2003).

Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)은 리간드에 의해 활성화되는 전사인자로 세포의 분화와 증식에 관여하는 특정 유전자의 발현을 조절한다. 모든 PPAR들은 retinoid-X-receptor(RXR)와 이질이합체를 이루어 활성화되는데 이질이합체는 peroxisome proliferator response element(PPRE)라고 명명된 DNA의 특정 서열에 결합하여 유전자의 전사를 촉진한다. α, γ, δ 의 3가지 type이 각각 다른 조직 분포를 보이고 있는데, PPAR- γ 는 주로 지방세포나 단구세포, 조직대식세포, 태반 등에 분포하고 지방세포의 분화, 지방 축적과 포도당의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. Barak은 쥐를 통한 실험에서 PPAR- γ 결손시 영양막세포의 분화와 태반의 혈관신생을 방해하여 심장결손을 일으켜 배아발달시기에 사망이 유발됨을 밝힌 바 있다. PPAR- γ 결손은 RXR 결손시 나타나는 현상과 유사하여 이들 이질이합체가 태반발달에 필수적임을 알 수 있다(Barak 등, 1999; Asami-Miyagishi 등, 2004).

PPAR- γ 가 Smad 신호전달 경로를 직접적으로 방해함으로써 TGF- β 의 작용을 방해한다는 보고는 간암세포나 대동맥의 평활근세포 등의 연구에서 밝혀진 바 있다(Fu 등, 2001; Han 등, 2004).

이에 본 연구에서는 TGF- β 의 생리주기에 따른 발현의 차이를 확인하고 이를 통해 증식기 동안에 증가한 TGF- β 의 발현이 자궁내막의 탈락막화에 어떠한 역할을 하는지를 확인하고자 한다. 또한 이와 더불어 인간 자궁내막의 기질 세포만을 배양하여 자궁내막의 탈락막화에 있어 TGF- β 와 PPAR- γ 의 작용이 이전의 다른 조직(혈관 평활근, 간암세포)에서의 결과처럼 서로 상쇄되는지 확인하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

A. 자궁내막조직의 획득

아주대병원 산부인과에서 자궁내막질환 이외의 양성 질환(자궁 근종 및 자궁 선근종)으로 생리 주기상으로 전기 및 후기 분비기에 전자궁 적출술을 시행한 여성의 자궁내막을 획득하였다. 환자군의 평균나이는 37.8(+4.5)세였고 30세에서 45세 사이에 분포되어있었다. 환자들로부터 고지 승낙 하에 자궁내막 조직을 얻어 실험을 수행하였다.

B. TGF- β 와 pSmad 발현에 대한 면역조직화학적 분석

파라핀으로 봉입된 표본을 rehydration한 후 4% citric acid 처리, 3% H₂O₂ 처리를 하여 peroxidase를 비활성화 시킨 후 조직을 PBS(phosphate buffered saline, Sigma, USA)로 3회 세척한 후 각각 1/400으로 희석한 TGF- β 수용체 I형 혹은 II형에 대한 일차 항체(anti-human rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotech, California, U.S.A.), 1/400으로 희석된 pSmad2/3에 대한 일차 항체(anti-human goat polyclonal, Santa Cruz Biotech, California, U.S.A.)로 상온에서 1시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB-kit(DAKO A/S, Denmark)에 포함된 이차 항체를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 PBS로 세척한 후 diaminobenzidine(DAB; DAKO A/S, Denmark)를 이용하여 발색시킨 후 관찰하였다. 모든 면역조직학적 영상분석은 Image-Pro[®] Plus version 4.5(Media Cybernetics, U.S.A.)에 의해서 정량화되었다.

C. 자궁내막 기질세포의 배양

채취된 자궁내막조직은 PBS가 들어 있는 conical tube(Falcon, U.S.A.)에

담아 실험실로 운반했으며 다시 PBS로 여러 번 세척하여 남아있는 혈액을 제거하였다. 배양 접시에 Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM, Gibco, U.S.A.) 2-3 ml를 부어준 후 조직을 넣고 멸균 가위로 1-2 mm의 크기로 잘게 자르고, 잘린 조직은 다시 conical tube에 용액과 함께 부어준 후 원심 분리하여 상층액을 따라내고 trypsin-EDTA(Gibco, U.S.A.) 5 ml를 첨가하여 37°C에서 회전 배양하였다. 1시간 경과 후 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, U.S.A.)이 포함된 DMEM 배양액을 5 ml 첨가하여 효소작용을 정지시켰다. conical tube를 20분 정도 정치시킨 후 상층부 5 ml를 100 mm 배양접시(Falcon, U.S.A.)에 옮겨서 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 배양된 기질세포에 TGF- β 10 ng/ml와 PPAR- γ agonist인 Rosiglitazone 50 nM을 처리하여 72시간동안 배양하였다.

D. Western blot analysis

TGF- β 와 PPAR- γ agonist인 Rosiglitazone을 처리하여 72시간 후 배양된 세포를 수확하여 단백질 분해 효소 억제제인 aprotine과 RIPA cell lysis solution(50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 10 mM sodium deoxycholate)을 첨가하여 30분간 얼음위에서 반응시킨 후 세포질 추출물을 4°C, 14000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액만을 분리한 후 얻은 단백질추출물을 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)를 사용하여 정량 분석하였다. 추출된 단백질 20-30 μ g 정도를 2x SDS sample buffer 용액(50 mM Tris-HCL, 100 mM dithiothreiol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 1:1로 희석하여 100°C에서 5분간 가열한 후 5% stacking gel과 10% acrylamide separating gel로 구성된 1 mm SDS polyadrylamide gel에 loading 후 1X 전기영동 완충용액(25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, 0.1% SDS)으로 채운 후 100 volt에서 2분간 전기영동 하였다. 전기영동 후 단백질을 wet-electrotransfer(transfer buffer, 48 mM Tris, 39 mM glycine,

0.073% SDS, 20% methanol)를 통하여 4℃에서 120 mA 3 volt로 2시간 동안 Nitrocellulose(NC) filter로 전이시킨 후 전이된 NC filter washing buffer (TBS-T; 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20)에 무지방유를 5%로 혼합하여 NC filter(10 ml)의 크기에 맞는 적당한 양으로 실온에서 1시간 흔들어서 비특이성 항원의 결합을 차단하였다. Washing buffer로 20분씩 2회 이상 세척 후 5% 무지방유에 1차 항체(pSmad2/3, PPAR- γ , β -Actin, Prolactin Ab; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, U.S.A.)를 1:1000으로 희석하여 만든 용액에 NC filter를 넣고 실온에서 2시간 이상 반응시킨 다음 역시 Washing buffer로 20분씩 2회 이상 세척 후 5% 무지방유에 2차 항체를 1:2000으로 희석하여 만든 용액에 실온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 20분씩 2회 이상 세척하였다. 모든 과정을 거친 NC filter를 wrap위에 올려놓고 ECL western analysis system reagent kit의 1번 용액과 2번 용액을 동량을 잘 섞은 후 Hybond-N 위에 적시고 1분 정도 반응시킨 후 즉시 wrap으로 감은 후 감광판에 직접 넣어 암실에서 X-ray film에 노출시킨 후 현상하였다.

E. 동초점 현미경(Confocal microscopy)

PBS로 여러 번 세척을 한 후 10% FBS로 blocking하고 1:200으로 희석한 1차 항체(pSmad2/3, PPAR- γ , β -Actin, Prolactin Ab; Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA, U.S.A.)로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 이차항체 (FITC conjugated antibody; molecular probe)로 30분 동안 빛을 차단하여 반응을 시켰다. PBS로 표본을 세척하고 mounting 용액을 가하여 동초점 현미경하에서 세포 안에서의 단백질 발현 정도를 관찰하였다.

F. 생활성 세포의 수(Cell count)

trypsin-EDTA로 cell을 떼어낸 후 PBS로 세척 한 다음 동량의 PBS에 재

현탁을 시킨 후 동량의 0.4% trypan Blue로 염색하여 hematocytometer에서 살아 있는 cell만을 계산하였다.

III. 결 과

A. 정상 자궁 내막에서의 TGF- β 수용체 1형, 2형과 pSmad2/3의 분포와 발현 양상

자궁 내막조직에서 기질 조직 배양을 하기 전에 면역조직화학적 염색을 통해 TGF- β 수용체 1형과 2형, TGF- β 의 신호전달에 관여하는 pSmad2/3의 발현을 검사하였다. 면역화학적으로 활성화된 TGF- β 수용체 1형과 2형, pSmad2/3 모두 자궁내막의 상피조직과 기질조직에서 발현되었다. 생리 주기에 따라 TGF- β 수용체 1형과 2형의 발현정도를 Image-Pro[®] Plus version 4.5(Media Cybernetics, Inc., USA) 로 정량화하여 분석한 결과 증식기보다 분비기에서 TGF- β 수용체 1형과 2형 모두 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 증식기에서 상피세포와 기질세포의 TGF- β 수용체 1형과 2형을 비교하면 발현강도의 차이는 통계학적인 의의가 없으나 분비기에서는 상피세포보다 기질세포에서의 TGF- β 수용체 1형과 2형의 발현이 통계학적으로 의미 있게 증가됨을 알 수 있다(Table. 1).

TGF- β 신호전달 경로의 활성화 형태인 인산화된 Smad2(pSmad2/3) 역시 증식기 보다 분비기에 발현강도가 높았고 특히 상피세포보다 기질 세포에서 pSmad2/3의 세포핵 내로 이동 또한 의미 있게 증가되었다(Fig. 2). 이러한 결과들은 분비기의 자궁 내막에서는 TGF- β 수용체 단백질의 발현이 증가 될 뿐 아니라 TGF- β 의 신호 전달도 활성화됨을 보여주고 있다.

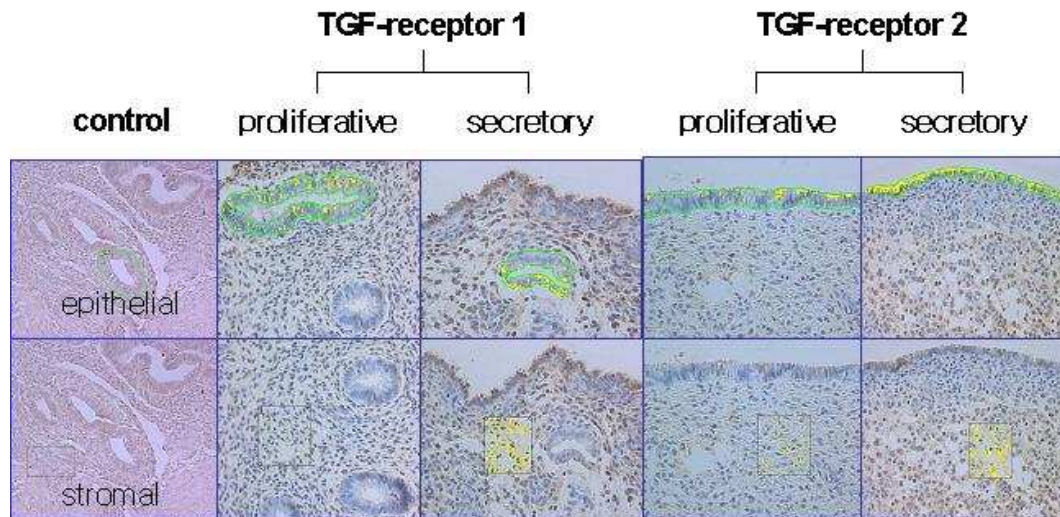


Fig. 1. TGF- β receptor type-1,-2 expression by immunohistochemical stain. TGF- β receptor type-1,-2 expression were noted in epithelial and stromal cells of proliferative and secretory phase. Especially, there was increased expression in stromal cells of secretory phase.

Table 1. Immunohistochemical expression comparison by Image Pro Plus 4.5.

	Epithelial	Stromal
TGF receptor 1		
proliferatory	3.69±1.21	2.27±1.30
secretory	4.84±3.46	6.77±3.96**
TGF receptor 2		
proliferative	2.49±1.83	5.43±2.29
secretory	6.38±1.58	15.76±5.79**
pSmad 2/3		
proliferative		
cytoplasm	0.22±0.19	0.45±1.52
nucleus	4.07±7.03	1.72±0.50
secretory		
cytoplasm	0.15±0.08	0.18±0.12
nucleus**	18.91±18.01	28.94±49.50

There was no significant difference in expression of TGF-β receptor type 1 and type 2 in proliferative epithelial and stromal cells. But there was significant increased expression of type-1, and -2 receptor in secretory stromal cells. Phosphorylated Smad2/3(pSmad2/3) expression was significantly increased in secretory phase and translocation into nucleus of pSmad2/3 was noted.

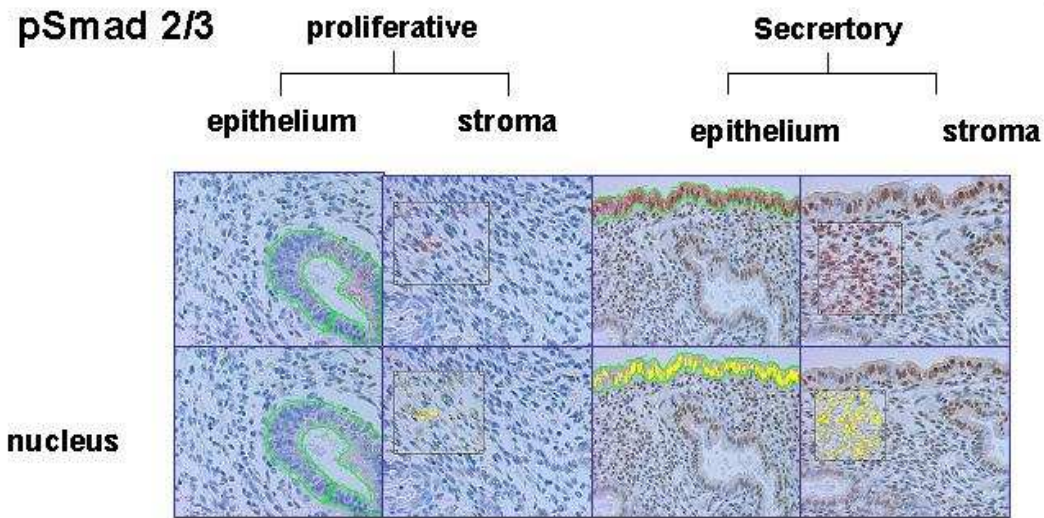
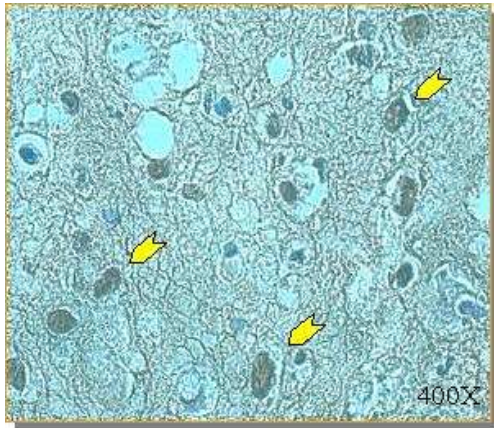


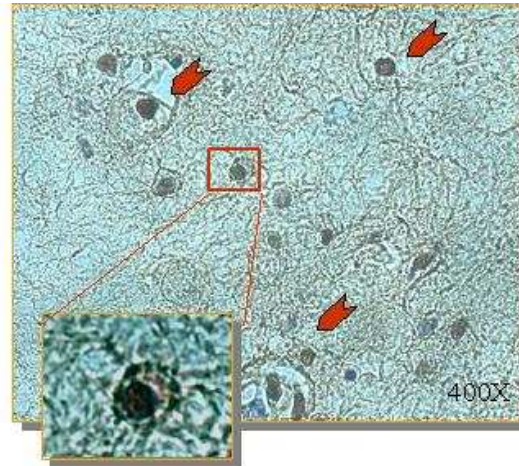
Fig. 2. pSmad2/3 expression by Immunohistochemical stain. Phosphorylated Smad3(pSmad2/3) expression was significantly increased in secretory phase and translocation into nucleus of pSmad2/3 was noted.

B. 기질세포에서의 Prolactin과 pSmad2/3의 분포 및 발현 양상

배양된 기질세포에서 anti-prolactin, anti-pSmad2/3 항체로 면역염색을 시행하였다. prolactin 양성인 기질세포는 원형이고, 대부분의 기질 세포에서 prolactin 양성 반응을 보여 기질세포의 탈락막화가 일어났음을 확인할 수 있었다. pSmad2/3 양성인 기질세포에서도 핵 내로의 pSmad2/3의 이동을 확인할 수 있었다(Fig. 3).



Prolactin-positive



Phosphorylated Smad 2/3-positive

Fig.3. Prolactin-positive and pSmad2/3 positive stromal cell.

Decidualization of stromal cell was confirmed by prolactin and pSmad2/3 translocation into nucleus from was identified.

C. Western blotting

대조군과 TGF- β , PPAR- γ agonist 인 Rosiglitazone을 각각 처리한 실험군(T군, R군)과 같이 처리한 실험군(T+R군) 각각에서의 pSmad2/3, PPAR- γ , β -Actin, Prolactin의 단백질을 분석한 결과 TGF- β 에 의해서 pSmad2/3의 단백질량이 증가함을 알 수 있었고 Rosiglitazone을 함께 투여한 경우 TGF- β 만을 투여한 군보다 단백질량의 증가가 약화됨을 알 수 있었다. PPAR- γ 의 단백질량은 PPAR- γ agonist를 투여한 군에서 예상대로 증가함을 보이고 β -Actin의 단백질량은 4군 모두에서 일정하게 높게 발현됨을 보였다. 탈락막화의 표지인자로 이용되는 Prolactin의 경우 TGF- β 를 처리한 군에서 발현이 나타나고 Rosiglitazone을 함께 투여한 경우에도 prolactin의 발현을 보이지만 TGF- β 만을 처리한 군보다는 발현이 감소한 결과를 보였다(Fig. 4). 즉, TGF- β 가 기질세포의 탈락막화에 중요한 작용을 한다는 사실을 알 수 있었고 PPAR- γ 는 이러한 TGF- β 의 작용을 상쇄시킴을 알 수 있었다.

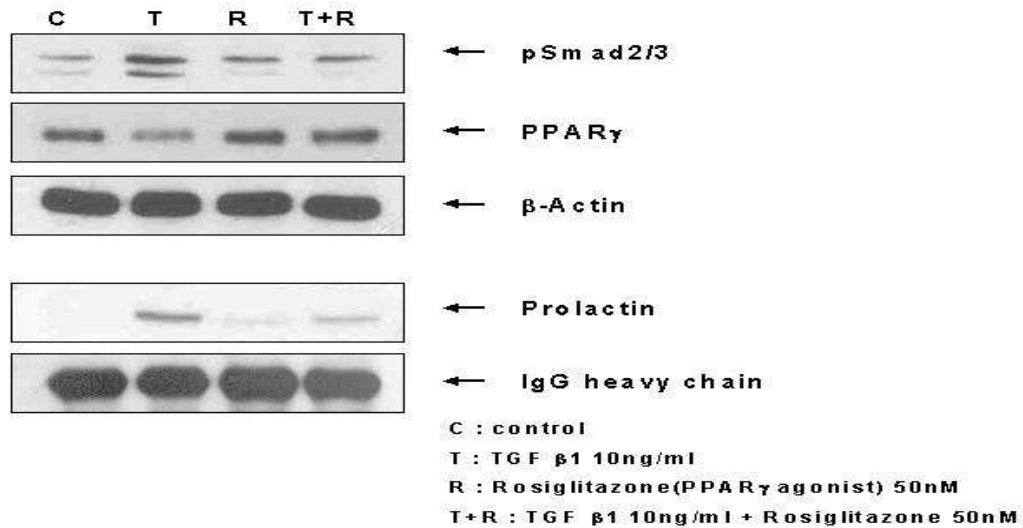


Fig. 4. Western blot analysis. A pSmad 2/3 protein expression was increased in TGF- β treated group(T) but this effect was decreased by adding rosiglitazone.(T+R). This inhibitory effect was also applied in prolactin expression.

D. 동초점 현미경

동초점 현미경 하에서 기질세포 내에서의 pSmad2/3, Prolactin, PPAR- γ 의 단백질 발현을 4군에서 비교 관찰하였다. TGF- β 의 신호전달 경로의 활성화 형태인 pSmad2/3와 탈락막화의 결과산물인 prolactin의 발현이 TGF- β 를 처리한 군에서 강하게 발현됨을 알 수 있었고, 특히 pSmad2/3의 핵 내에서의 강한 발현을 확인할 수 있었다. PPAR- γ agonist인 Rosiglitazone을 투여하였을 때 TGF- β 의 작용이 상쇄됨을 보였다(Fig. 5).

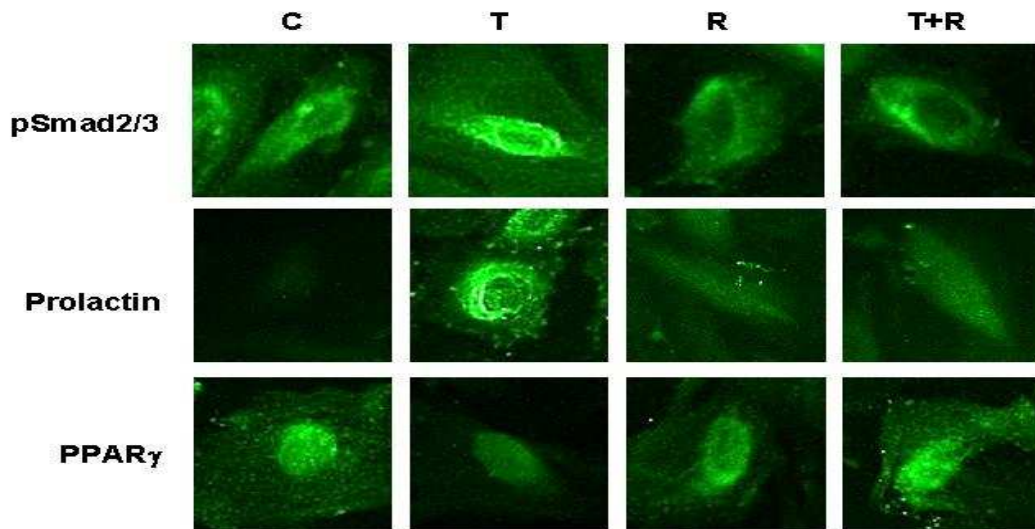


Fig. 5. pSmad2/3, Prolactin, PPAR γ expression by confocal microscopy.

Comparison of pSmad2/3, Prolactin, PPAR γ expression in 4 groups by confocal microscopy, TGF- β treated group showed high expression of intranuclear pSmad2/3 and prolactin. By adding rosiglitazone, inhibition of TGF- β induced decidualization in stromal cells was identified.

E. 생활성 세포의 수

4군 각각을 trypan Blue로 염색하여 hemacytometer에서 살아 있는 cell 만을 계산하여 비교한 결과 Rosiglitazone을 투여한 군에서는 배양 72시간 후 기질세포수의 증가가 현저했으나 TGF- β 를 투여한 군에서는 아무것도 투여하지 않은 대조군보다도 기질세포의 수가 감소한 결과를 보였다. 따라서 TGF- β 는 기질세포의 증식보다는 분화에 더 관여할 것으로 생각되고 PPAR- γ 의 기질 세포 증식에 대한 작용도 상쇄시킴을 알 수 있었다(Fig. 6).

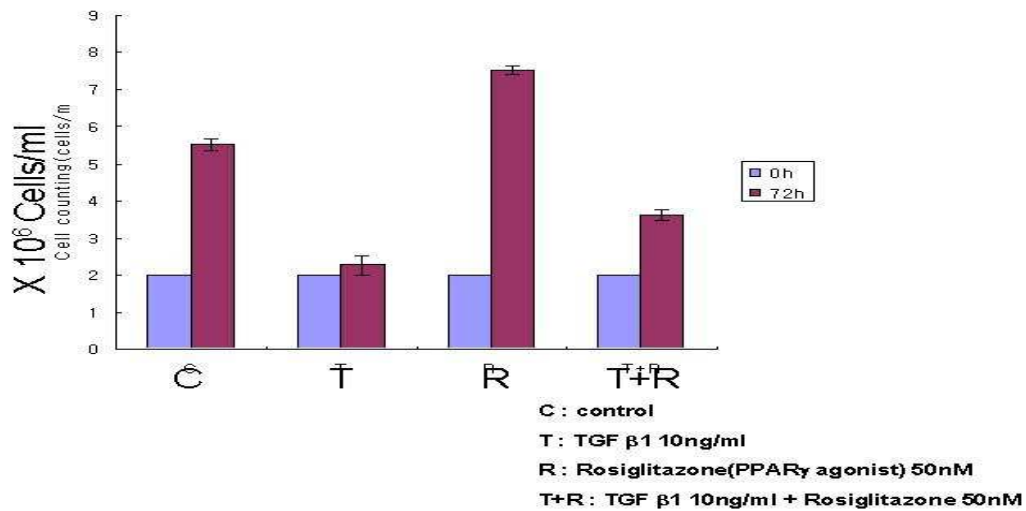


Fig. 6. Cell count after 72hour culture. In comparison with other groups, TGF- β regulates differentiation and apoptosis of stromal cell rather than proliferation.

IV. 고 찰

인간의 자궁 내막조직은 생리 주기에 따라 다양한 변화를 보이는데 이런 자궁내막 조직의 증식 및 분화는 에스트로겐과 황체호르몬과 같은 성선 호르몬 및 주기적 발현을 보이는 성장 인자와 싸이토카인 등에 의해 조절된다. 후기 분비기에 분화된 자궁내막 기질 세포는 형태적, 기능적으로 독특한 특징을 지니게 되는데 이런 현상을 탈락막화(Decidualization)라고 하고 포배의 착상 및 임신 유지에 필요한 기능층으로 작용하고 이런 탈락막화를 유도하는 인자로 성호르몬(Noyes 등, 1950), cAMP(Tang 등, 1993), gonadotropin(Tang 등, 1993), PGE2(Frank 등, 1994) 등이 보고되었다(권혁찬 등, 2001; Osteen 등, 1994).

자궁내막 세포의 생리 주기에 따른 변화양상은 단순한 호르몬의 영향 이외에 상피세포와 기질세포의 상호작용이 중요하다고 보고되었고, 3차원적인 공배양하에 기질세포의 탈락막화 기전에 상피세포와 기질세포간의 상호작용에 대한 연구에서 TGF- β 가 이러한 작용을 하는 것으로 보고되었다(박동욱 등, 2003; Casslen 등, 1998).

포배의 착상은 자궁 내막 기질의 맞자궁간막 부위에서 탈락막화를 개시하여 4일후에는 자궁 내막 기질 전체의 탈락막화가 이루어진다. 이 기간 동안 성장과 분화의 과정을 거친 후 영양막에 인접한 맞자궁간막의 탈락막 부위에서 세포자멸이 일어나게 되고 이런 세포자멸을 통해서 영양막과 모성 혈관과의 소통이 이루어지게 된다(Welsh와 Enders, 1985). 탈락막화 자궁 내막의 특정 부위에서 세포자멸이 발생하는 것은 자궁의 세포 자체가 축분비나 자가분비를 통해서 세포자멸을 조절함을 설명해준다(Welsh와 Enders, 1991). 이런 특정 자궁 내막 세포의 증식과 세포자멸에 관여하는 여러 성장 인자들 중 TGF- β 는 임신 초기에 배아의 발달 조절 뿐 아니라 자궁 내막의 탈락막화와 모성의 배아 거부 반응 억제를 위한 면역억제에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

TGF- β 가 다양한 자궁내막의 세포 활동을 조절하는데 중요한 역할을 함은 이미 알려진 바이고 이러한 TGF- β 작용을 매개하는 것으로 알려진 Smad

의 발현과 Smad의 신호전달 경로에 관여하는 인자들에 대한 자궁내막 세포들에서의 존재 확인을 위한 이번 실험에서 TGF- β 수용체 1형과 2형 모두 증식기보다 분비기에 발현이 증가되는 결과를 통해 TGF- β 가 분비기 자궁내막의 탈락막화에 작용함을 확인할 수 있었다. TGF- β 에 신호전달을 매개하는 것으로 알려진 Smad 역시 TGF- β 수용체에 의해 활성화된 형태인 pSmad2/3가 분비기 특히 세포핵 내에서 발현이 의미있게 증가된 것을 확인함으로써 TGF- β /pSmad 2/3의 신호전달 경로가 분비기 기질세포에서의 탈락막화 과정에서 중추적인 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 탈락막 세포에서 특징적으로 분비되는 prolactin으로 분비기 기질세포의 탈락막화를 확인할 수 있었다.

TGF- β 를 처리하였을 때 pSmad2/3와 Prolactin의 발현 증가를 유도하는지에 대한 기질세포 배양실험에서 TGF- β 를 처리하지 않은 대조군에 비해 두 단백질 모두 발현 증가를 보여 자궁내막에서 TGF- β 의 작용은 Smad 경로의 활성화를 통해 이루어짐을 확인할 수 있었다. Luo 등도 이와 유사한 실험으로 Smad의 자궁내막에서의 발현을 확인하였고 자궁내막 상피세포 및 기질세포에서 TGF- β 에 의한 Smad의 조절 및 유도를 확인하였다. 이들은 세포질 내에서 발현되던 Smad3가 TGF- β 의 처리 후 세포핵 내로 이동함을 면역형광법을 이용하여 확인하였고 본 실험에서도 이와 동일한 결과를 동초점 현미경하에 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

TGF- β 의 효과를 상쇄시키기 위해 Luo 등은 TGF- β 2형 수용체에 대한 antisense 처리를 하여 TGF- β 에 의한 Smad의 유도가 상쇄되는 결과를 확인하였다. 반면 본 실험에서는 타장기 조직에서 Smad에 직접적으로 작용하여 TGF- β 의 작용을 억제시키는 것으로 알려진 PPAR- γ 를 이용하여 확인한 결과 자궁내막에서도 이와 동일한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Luo 등, 2003).

PPARs는 세포의 분화와 증식에 관여하는 특정 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 Barak 등의 실험을 통해 PPAR- γ 결손이 영양막의 분화와 태반의 혈관생성의 장애를 유발하여 배아발달 자체를 방해하는 것을 증명하였다(Barak

등, 1999). 또한 PPAR- γ 는 콜레스테롤 transporter gene의 발현에 관여하여 지단백의 세포 내외로의 이동을 조절함으로써 임신초기에 지질의 이동, 생성, 저장에 관여하여 영양막의 성숙에 필수적으로 알려져 있다(Asami-Miyagishi 등, 2004; Isseman과 Green, 1990; Lee 등, 1995).

TGF- β 와 PPAR- γ 의 세포 증식에 대한 작용은 대동맥 평활근 세포와 간암 세포에서의 연구에서 밝혀진 바 있는데, Han등이 연구한 간암 세포 연구에 따르면 TGF- β 는 종양세포 증식은 Smad와 cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂ α)의 인산화 2가지 경로에 의해 조절된다. Smad 활성화는 종양세포의 증식을 억제하지만, 인산화된 cPLA₂ α 는 세포막 인지질에서 arachidonic acid를 분비하여 PGE₂ 생성과 세포질 수용체 EP₁ 경로를 통해 세포 성장을 촉진시키거나 PPAR 활성화를 유도하여 직접적으로 Smad3와 작용하여 TGF- β /Smad 경로를 차단하여 세포 증식 억제작용을 방해하는 것으로 보고하였다(Han 등, 2004).

그 외에도 Inhibitory Smad로 알려진 Smad7은 활성화된 TGF- β 수용체에 반응하여 Smad3의 활성화를 막으므로 Smad7의 발현의 변화가 TGF- β 의 세포 반응성을 좌우하므로 신호전달의 세포내 조절인자로 작용할 수 있다. 즉 TGF- β 나 그 수용체의 변이, Smad 발현과 조절, 활성화의 변화가 자궁내막증이나 자궁근종, 자궁내막암 등 다양한 질환과 연관성이 있음을 보고하고 있다. (Piestrzeniewicz-Ulanska 등, 2003).

TGF- β 의 기질세포 증식과 세포자멸에서의 역할에 대한 본 실험에서는 PPAR- γ agonist과 비교하였을 때 세포 증식의 작용보다는 세포자멸과 더 관련이 있음을 알 수 있었고 이는 Moulton의 연구 결과와 일치하였다. 즉, 기질세포 배양에서 세포의 밀도가 증가할수록 TGF- β 2 분비가 증가하고 세포자멸을 증가시킴을 알 수 있었다(Moulton, 1994).

TGF- β 는 또한 자궁내막에서 성장인자와 펩티드 호르몬에 의해 활성화되고 발현되는 MAPK, Protein kinase C, Ca²⁺/Calmodulin등 다른 신호 전달 경로도 활성화 시킨다. 비록 이런 각각의 신호전달 경로가 자궁내막 환경에서 조절

인자로 작용할 수 있으나 그것보다는 이들 경로간의 상호작용과 교차대화가 특정 유전자 발현의 조절에 중요함이 강조되고 있다.

이들 신호전달 경로의 목표 유전자에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 많지 않아 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료되고 탈락막화 과정에서의 TGF- β /Smad 신호전달 과정을 조절하는 인자들과 다른 신호전달 경로와의 교차대화에 대한 심도있는 연구가 자궁내막의 탈락막화 및 배아의 착상 및 임신 유지과정을 이해하고 임상적으로 이용하는데 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

인간 자궁내막에서 분비기 자궁내막의 기질세포는 임신 및 착상을 위한 준비로 탈락막화 과정을 겪게 되는데 이것은 주로 TGF- β 의 활성화에 의해 이루어진다. 면역조직화학적 검사를 통해 기질세포내 TGF- β 수용체와 신호전달 경로에 관여하는 인자인 Smad 단백질의 존재를 확인할 수 있었고 활성화된 TGF- β 의 세포핵 내로의 신호전달에 Smad의 작용 또한 확인할 수 있었다.

TGF- β 와 그 수용체와의 결합이 Smad2/3의 활성화를 유발하고 활성화된 pSmad2/3는 Smad4와 결합하여 세포핵내로 이동하게 되어 세포핵내의 목표 유전자의 전사를 조절하게 된다. 이러한 Smad의 신호전달 과정을 PPAR- γ 가 직접적으로 Smad3에 반응하여 TGF- β 의 작용을 억제시킨다는 결과를 배양된 기질세포에 TGF- β 와 PPAR- γ agonist를 처리하여 western blot과 동초점 현미경 등을 이용하여 확인할 수 있었다. 또한 생활성 세포수를 비교하여 자궁 내막의 탈락막에서 TGF- β 의 세포자멸에 대한 작용을 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. 권혁찬: 3차원적 자궁내막 세포배양 체계의 확립: 성선 호르몬에 의한 분화 유도 및 특성. *대한산부회지* 44:65-73, 2001
2. 박동욱: 인간자궁내막의 탈락막화 (Decidualization)에 있어서 TGF- β (Transforming Growth Factor- β)의 역할. *대한불임학회지* 30(1):65-75, 2003
3. Arici A, MacDonald PC, Casey ML: Modulation of the levels of transforming growth factor beta messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 54:463-469, 1996
4. Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H, Morita I: Expression and function of PPAR in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun* 315:497-501, 2004
5. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595, 1999
6. Casslen B, Sandberg T, Gustavsson B, Willen R, Nilbert M: Transforming growth factor β -1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biol Reprod* 58:1343-1350, 1998
7. Cohen MM: TGF β /Smad signaling system and its pathologic correlates. *Am J Med Genet* 116:1-10, 2003
8. Ding NZ, Teng CB, Ma H, Ni H, Ma XH, Xu LB, Yang ZM: Peroxisome proliferator-activated receptor delta expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Mol Reprod*

Dev 66:218-224. 2003

9. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO: Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 7:151-161, 2003
10. Frank GR, Brar AK, Decars MI, Handwerger S: Prostaglandin E2 enhances human endometrial cell differentiation. *Endocrinology* 134:258-263, 1994
11. Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem* 276:45888-45894, 2001
12. Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, Wu T: Transforming growth factor- β (TGF- β) activates cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α)-mediated prostaglandin E₂ (PGE)₂/EP1 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF- β -induced mitoinhibition, *J Biol Chem* 279:44344-44354, 2004
13. Isseman I and Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650, 1990
14. Lee SST, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL: Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15:3012-3022, 1995
15. Lim H, Dey SK: PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab* 11:137-142, 2000

16. Luo X, Xu J, Chegini N: The expression of Smads in human endometrium and regulation and induction in endometrial epithelial and stromal cells by transforming growth factor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4967-4976, 2003
17. Mashburn PB, Arici AM, Casey ML: Expression of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and the modulation of DNA synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human endometrial cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 170: 1152-1158, 1994
18. Moulton BC: Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 134:1055-1060, 1994
19. Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating of endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3-25, 1950
20. Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM: Stromal-epithelial interaction mediates regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1012-33, 1994
21. Piestrzeniewicz-Ulanska D, Brys M, Semczuk A, Jakowicki JA, Krajewska WM: Expression and intracellular localization of Smad proteins in human endometrial cancer. *Oncol Rep* 10:1539-1544, 2003
22. Tang B, Guller S, Gurpid E: Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 133:2197-2203, 1993
23. Tang B, Grupide E: Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47:115-121, 1993
24. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J: PPAR gamma/ RXR

alpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5017-5024, 2001

25. Welsh AO, Enders AC: Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidual and its degeneration. *Am J Anat* 172:19-29, 1985

26. Welsh AO, Enders AC: Chorioallantoic placenta formation in the rat. I. Luminal epithelial cell death and extracellular matrix modifications in the mesometrial region of implantation chambers. *Am J Anat* 192: 215-231, 1991

- ABSTRACT -

Endometrial Decidualization by TGF- β and PPAR- γ

Jong-Hee Kwon

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Kyung-Joo Hwang)

Objective : Endometrial decidualization is essential for implantation and pregnancy, so we investigated the interaction of TGF- β and PPAR- γ on decidualization using cultured human endometrial stromal cell.

Methods : Human endometrial tissues were examined immunohistochemically for the expression of TGF- β receptors and transducer proteins in the TGF- β signaling. And we examined the cultured endometrial stromal cell treated with TGF- β and/or PPAR- γ agonist using western blotting, confocal microscopy, and cell counting.

Results: The results revealed a significant increase in the level of both TGF- β receptor -I and -II protein expressions in the secretory endometrium compared to the proliferative endometrium. The magnitude of discrepancy of epithelial receptor expression between the proliferative and secretory phase was comparable to that obtained from stromal cells. In addition, pSmad2/3 translocation from the cytoplasm to the nucleus was greatly enhanced in the

secretory endometrium. Prolactin was used for endometrial decidualization marker.

PPAR- γ is a member of steroid receptor superfamily of nuclear receptor. PPAR- γ is essential for normal placental development and trophoblast differentiation and invasion. Our data demonstrated the expression of PPAR- γ in the stromal cell and TGF- β and PPAR- γ did the conflicting role in human cultured endometrial decidualization.

Conclusion : There was a significant increase in the level of both TGF- β receptor -I and -II protein and transducer proteins(Smad) of the TGF- β signaling in secretory endometrium. TGF- β /Smad signaling pathway is essential for the endometrial decidualization and PPAR- γ did the conflicting role by direct binding Smad protein and blocking the TGF- β /Smad signaling pathway.

Key Words : endometrial stromal cell, decidualization, TGF- β , Smad, PPAR- γ