



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위 논문

자궁내막증 정상부위 내막과 난소
자궁내막증에서 Gonadotropin-Releasing
Hormone Agonist 치료 후 Aromatase의
정상화와 Cyclooxygenase-2의 감소

아주대학교 대학원

의학과

김영아

자궁내막증 정상부위 내막과 난소
자궁내막종에서 Gonadotropin-Releasing
Hormone Agonist 치료 후 Aromatase의
정상화와 Cyclooxygenase-2의 감소

지도교수 황 경 주

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 영 아

김영아의 의학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장 유 희 석 인

심사위원 이 영 돈 인

심사위원 김 해 권 인

심사위원 민 철 기 인

심사위원 황 경 주 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 22일

자궁내막증 정상부위 내막과 난소 자궁내막종에서 Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist 치료 후 Aromatase의 정상화와 Cyclooxygenase-2의 감소

목적: 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제가 자궁내막증의 중요한 병인으로 생각되는 아로마타제와 COX-2에 직접적인 작용이 있는지를 생체 내 뿐 아니라, 난소 자궁내막종과 정상부위 내막의 기질 세포 배양을 통해 알아보려고 하였다.

연구 방법: 불임 클리닉을 내원한 환자들 중 복강경 수술을 요하는 환자군을 대상으로 전향적 연구를 실시하였다. 복강경수술 상 난소에 자궁내막종이 보이면 낭종절제술(enucleation)을 시행해서 낭종벽(chocolate cyst linings)을 적출하고, 정상부위 자궁내막 조직은 중기 및 후기 증식기 자궁의 후저부 부위에서 진단적 소파수술을 시행하였다. 기질세포를 분리하여 배양한 후 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제(lucrin 0, 1, 5, and 10 uM)를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 기질세포와 채취된 조직에서 아로마타제와 COX-2의 Western blots 시행하여 분석하였다.

결과: 자궁내막증이 있는 정상부위 내막에서 비정상적으로 발현되던 아로마타제와 COX-2는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 3개월 치료 후 Western blot 상 감소하였다. 자궁내막증 정상부위 내막과 자궁내막종 기질세포 배양에서 Western blot으로 보이던 아로마타제 사이토크롬 P450과 COX-2는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 배양 후 약간 감소하였다. 자궁내막종 기질세포 배양에서 Western blot상 p-ERK가 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양 후 감

소되었고 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 용량이 증가함으로 더욱 감소함을 보였다.

결론: 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제가 저에스트로겐혈증 뿐 아니라, 자궁내막증의 정상부위 내막과 자궁내막종 기질세포에서 직접 작용하여 아로마타제를 정상화시키며 COX-2를 감소시키는 것을 확인하였다. 이에 자궁내막증에서 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 신호전달 체계 및 작용기전에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: 자궁내막증, 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제, 아로마타제, COX-2, 기질세포배양

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
I. 서론	1
II. 대상 및 방법	3
A. 연구 대상과 조직 채취	3
B. 기질세포의 배양	4
C. Western blot 분석 (SDS-PAGE & Western blotting)	6
III. 결과	7
IV. 고찰	14
V. 결론	19
참고문헌	20
영문요약	26

그림 차례

Fig. 1. Effects of GnRH agonist treatment for 3 months on the expression of aromatase P450 and COX-2 in eutopic endometrium of endometriosis	10
Fig. 2. Effects of GnRH agonist for 24 hours on stromal cells culture obtained from ovarian endometrioma	11
Fig. 3. Effects of GnRH agonist for 24 hours on stromal cells culture obtained from eutopic endometrium of endometriosis	12
Fig. 4. Effects of GnRH agonist and PGE ₂ for 24 hours on Aromatase protein level of stromal cells culture obtained from eutopic endometrium of endometriosis	13

I. 서 론

자궁내막증은 가임기 여성의 3-10%, 불임 여성의 25-35% 정도에서 나타나 는 비교적 흔한 부인과 질환으로 자궁내막 조직이 자궁이외의 장소에서 증식하 는 질환이다(Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosis, 1994). 아직까지 자궁내막증의 병태생리학적인 기전에 대해서는 논란의 여지가 많으나 생리혈의 역류현상 (Sampson, 1940), 혈액 혹은 림파계를 통한 발생 (Javert, 1949), 체강 이행설 (Suginami, 1991) 등으로 설명되고 있다. 이 중 Sampson 에 의해 제시된 착상설 (implantation theory)이 가장 많이 받아들여지고 있다(Sampson, 1927). 그러나 생리혈의 역류 현상이 거의 모든 여성들에게서 일어나는 반면 자궁내막 증은 일부 여성들에게만 발현되는 것으로 보아 역류혈 이외에도 여러 가지 원 인이 자궁내막증의 발생에 관여할 것으로 생각된다.

자궁내막증의 정상부위의 내막 (eutopic endometrium)은 정상자궁내막과 달 리 변형된 아로마타제가 나타나며, 이는 자궁내막증의 병변 내 에스트로겐의 국 소적인 생성에 관여할 것으로 생각된다 (Zeitoun 등, 1999). 또한 자궁내막증에 서 높은 수치로 나타나는 프로스타글란딘 E₂는 가장 강력한 아로마타제 유도제 로 알려졌으며 (Noble 등, 1997; Zeitoun 등, 1999), 역으로 에스트로겐은 자궁내 막의 기질세포 배양에서 COX-2를 자극하여 프로스타글란딘 E₂형성을 증가시킨 다. 이에 자궁내막증에서 보이는 국소적인 에스트로젠 증가와 PGE₂의 생성이 정 피이드백환 (positive feedback cycle)을 형성하고, 자궁내막증의 특징인 세포증식 과 염증이 나타나는 것으로 설명하고 있다.

자궁내막증 조직의 지속적인 성장은 난소의 스테로이드 호르몬, 특히 에스트 로젠, 의 영향을 받으며, 현재 약물치료는 이러한 난소의 스테로이드호르몬 생성 (steroidogenesis)의 억제에 초점이 맞춰져 있다. 지속적인 성선자극호르몬 분비 호르몬 효능제 (Gonadotropin-Releasing Hormone(GnRH) Agonist) 치료는 성선

자극호르몬 분비호르몬 (GnRH) 수용체의 탈 감작 및 하양조절이 되어, 결과적으로 성선자극호르몬 (gonadotropin) 수치를 낮추고 난소의 호르몬 생성을 억제한다. 자궁내막증에서 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 치료는 자궁내막증 병변의 감소와 자궁내막증 통증 감소를 보여 왔다 (Henzl 와 Kwei, 1990; Dlugi 등, 1990). 이는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의한 저에스트로겐혈증이 중요한 결과이다. 그러나 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제는 호르몬 환경 (milieu)의 변화에 의해서만이 아니라, 자궁내막에 직접적으로 작용하며 또한 다른 말단 조직에서도 성선자극호르몬 분비호르몬 수용체의 발현이 보고 되었다 (Cheng 와 Leung, 2000). 이러한 세포와 조직에서의 성선자극호르몬 분비호르몬과 수용체의 발견은 성선자극호르몬 분비호르몬의 말단 조직에 대한 직접적인 작용과 파라크린/오토크린(paracrine/autocrine) 역할을 고려하게 하였다 (Cheon 등, 2001). 이에 Ishihara 등은 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 치료로 비정상적으로 발현된 자궁내막증의 정상부위 내막의 아로마타제(aromatase)의 발현이 정상화되는 것을 생체 내 (*in vivo*) 연구를 통해 보고하였다 (Ishihara 등, 2003). 또한 Shozu 등도 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의해 자궁의 근종 세포에서 아로마타제가 억제됨을 보고하였다 (Shozu 등, 2001).

이에 본 연구는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제가 자궁내막증의 중요한 병인으로 생각되는 아로마타제와 COX-2에 직접적인 작용이 있는지를 생체 내 뿐 아니라, 난소 자궁내막종과 정상부위 내막의 기질 세포 배양을 통해 알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 연구 대상과 조직 채취

이 연구는 임상연구위원회의 인증을 받고, 불임 클리닉을 내원한 환자들 중 복강경 수술을 요하는 환자를 대상으로 동의서를 받은 후 전향적 연구로 실시하였다. 3개월 전부터 내분비적 치료를 받은 적이 없는 환자들을 대상으로 생리 주기에 맞추어 불임 검사를 실시하였다. 복강경 검사 상 자궁내막증이 진단된 환자를 대상으로 설정하고, The American Fertility Society classification에 의거하여 병기를 결정하였다 (The American Fertility Society, 1985). 복강경수술 상 난소의 자궁내막증이 보이면 낭종절제술 (enucleation)로 낭종벽 (chocolate cyst linings)을 적출하여 조직을 얻었다. 정상부위 자궁내막 조직은 중기 및 후기 증식기 자궁의 후저부 부위에서 진단적 소파수술을 시행하였다. 채취된 조직은 진단을 위해 병리과로 보내져 조직학적 검사를 실시하였다. 이 중 일부는 분자생물학적 검사를 위해 -80°C 에 즉각 보존하며 일부는 기질세포를 분리하여 배양하였다.

자궁내막증을 수술적으로 제거한 후 재발 방지 및 미세하게 잔존하고 있는 병변 치료를 위해 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제인 루크린 데포(Leuprolide acetate, Abbott Pharmaceuticals, France) 3.75mg을 4주 간격으로 3회 피하 주사하였다. 이 후 자궁내막 조직 채취는 마지막 주사 후 2주 내에 즉, 증식기 자궁 후저부 부위에서 시행하였다. 채취된 조직은 병리과를 보내져 조직검사를 실시하고 분자생물학적 검사를 위해 일부를 -80°C 에 즉각 보존하였다.

2. 기질세포의 배양

Osteen 등에 의해 제시된 방법으로 기질세포를 분리하여 배양하였다 (Osteen 등, 1989). 기질세포 순수분리를 확인하기 위해서 상피세포의 표지(marker)로 cytokeratin (Santa Cruz, Biotechnology Inc., California, USA), 기질세포 표지로 vimentin (Santa Cruz)을 사용하여 면역조직염색을 시행하였다. 98%이상의 기질세포의 순도(purity)를 보였다. 채취된 조직은 PBS가 들어 있는 conical tube (Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA)에 담아 실험실로 운반, 다시 PBS로 여러 번 세척하여 남아 있는 혈액을 제거하였다. 배양 접시에 Dulbeco's Modified Eagle's Media (DMEM; Gibco, Life Technologies, Roskilde, USA)를 2-3 ml 부어준 후 조직을 넣고 멸균된 가위를 이용하여 1-2 mm의 크기로 자른다. 잘게 잘린 조직은 다시 conical tube에 용액과 함께 부어준 후 원심 분리하여 상층액을 따라내고, 1,000 units/ml collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 5ml을 첨가하여 37°C에서 회전 배양 (shaking incubation)한다. 1시간 경과 후 1 % penicillin-streptomycin (Gibco), 10 % fetal bovine serum (Gibco)이 포함된 DMEM 배양액을 5 ml 첨가하여 효소 작용을 정지시킨 후 기질세포들이 포함된 용액 상층부 5 ml과 상피세포들이 포함된 하층부 5 ml을 각각 나누어 60 mm 배양 접시 (Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA)에 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양된 기질세포는 배양접시의 배양액을 제거한 후 trypsin-EDTA 2 ml을 첨가하여 10분경과 후 새로운 배양액 5 ml을 첨가한 후 400 rpm에서 5분간 원심 분리한다. 분리된 기질세포는 48시간 간격으로 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 media를 바꿔가며 증식될 때까지 배양하였다. 배양액은 24시간동안 혈청이 없는 phenol red-free medium으로 바꾼다. 그다음에 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 (lucrin 0, 1, 5, and 10 uM)를 실험의 과정 중 첨가하여 24시간 배양하였다. 프로스타글란딘 E2는 가장 강력한 아로마타제 사이토크롬 P450의 유도제이기에 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의한 COX-2의 결과가 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 아로마타제에 대한 반

응에 영향을 있는지를 확인하기 위해 배양액에 PGE₂ (5x10⁻⁸M, Sigma)를 성선 자극호르몬 분비호르몬 효능제와 함께 첨가 혹은 없는 상태에서 각각 24시간 배양하였다.

3. Western blot 분석 (SDS-PAGE and Western blotting)

배양액을 제거한 기질세포와 채취된 조직을 ice-cold PBS로 2번 세척한 후 protein extraction buffer (0.1 % SDS, 0.1 % Triton X-100, Tris, protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 단백질을 추출한 후 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 각각 준비된 시료는 단백질 정량 후 동일 부피의 4X sample buffer를 첨가한 후 100 °C에서 5분간 가열 후 8% acrylamide gel 상에서 전기영동 한다.

전기영동 후 gel은 PVDF membrane (pore size 0.45 um)에 100 mA의 전류로 4 °C에서 1시간 전기적으로 전이시킨다. Western 분석을 위해 전이된 membrane는 Tris-buffered saline-T (TBS, 0.05% Tween 20)으로 5분간 2회 세척한 후 5% skin milk로 상온에서 1시간 동안 blocking한 후 TBS-T (0.05 % Tween-20)로 5분간 3회 세척하였다. 희석한 일차항체(aromatase-1:100, Serotec Ltd., Oxford, UK, ; COX-1, COX-2, p-ERK-1:1000, Santa Cruz, Biotechnology Inc., California, USA)로 상온에서 1 시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 희석된 2차 항체(Aromatase:anti-mouse-HRP, COX-1 & COX-2: anti-goat-HRP, p-ERK: anti-mouse-HRP, chemicon International Inc., CA, USA)를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 diaminobenzidine (DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시킨다.

III. 결 과

1. 생체 내 연구(In Vivo study)

1)성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료 후 자궁내막증 정상부위 내막에서 아로마타제

자궁내막증이 있는 정상부위 내막에서 비정상적으로 발현되던 아로마타제가 GnRH agonist 3개월 치료 후 Western blot 상 감소하였다(Fig1).

2)성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료 후 자궁내막증 정상부위 내막에서 COX-2

자궁내막증이 있는 정상 부위 내막에서 과 발현되었던 COX-2가 GnRH agonist 3개월 치료 후 Western blot 상 감소하였다(Fig1).

2. 생체 외 연구(In Vitro study)

1) 자궁내막중 기질세포와 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양

자궁내막중 기질세포 배양시 Western blot 상 보이던 아로마타제 사이토크롬 P450이 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 배양 후 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 1uM에서는 거의 변화가 없다가, 5uM 의 농도에서 약간 감소하였다. COX-2의 발현은 1uM에서부터 변화가 없는 COX-1과는 대조적으로 약간 감소하였다(Fig2).

2) 자궁내막중의 정상부위 내막 기질세포와 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양

자궁내막중 정상부위 내막 기질세포 배양에서 Western blot에서 발현된 아로마타제 사이토크롬 P450이 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양 후 1uM 농도에서부터 감소되었고 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 용량이 증가함으로 더욱 감소하는 경향을 보였다. COX-2의 발현도 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양 후 COX-1과는 대조적으로 1uM에서부터 감소되었으며 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 용량이 증가함으로 감소하는 경향을 보였다(Fig3).

3) 자궁내막중의 정상부위 내막 기질세포에서 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 프로스타글란딘 E₂ 배양

자궁내막중 정상부위 내막 기질세포 배양 시 Western blot에서 발현된 아로마타제 사이토크롬 P450은 프로스타글란딘 E₂와 배양 후 더 증가하였으나, 성선호르몬분비호르몬 효능제와 함께 배양 시 거의 발현되지 않았다. 이에 자궁내막중 정상부위 내막에서 아로마타제 사이토크롬 P450은 성선호르몬분비호르몬 효능제의 반응이 프로스타글란딘 E₂에 의해 영향 받지 않고 더 강력하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig4).

4) 자궁내막종 기질세포에서 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 배양 후 p-ERK

자궁내막종 기질세포 배양에서 Western blot상 처음부터 보였던 p-ERK 가 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 배양 후 감소되었고 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 용량이 증가함으로 더욱 감소함을 보였다. 기질세포 배양에서 활성화되어 있던 p-ERK의 감소는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 직접적인 작용에 관여하는 신호전달체계 중의 일부일 것으로 생각된다(Fig2).

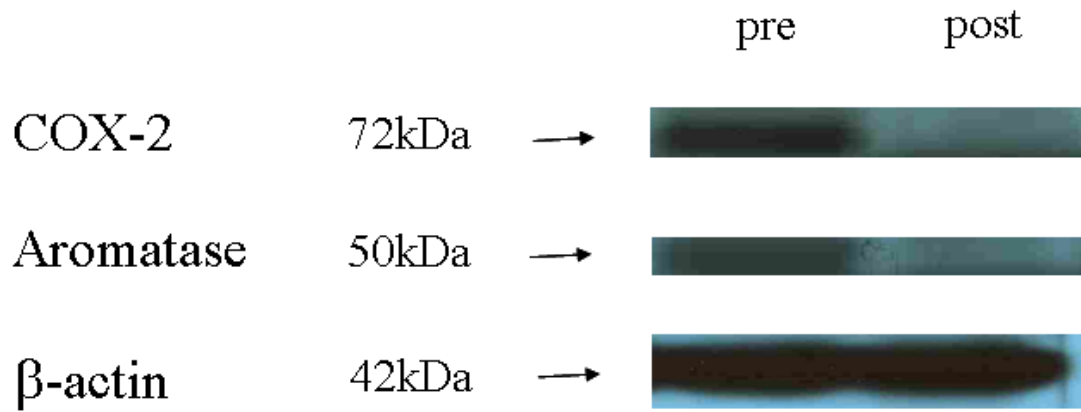


Fig. 1. Effects of GnRH agonist treatment for 3 months on the expression of aromatase P450 and COX-2 in eutopic endometrium of endometriosis (pre.-before GnRH agonist therapy, post.-after GnRH agonist therapy).

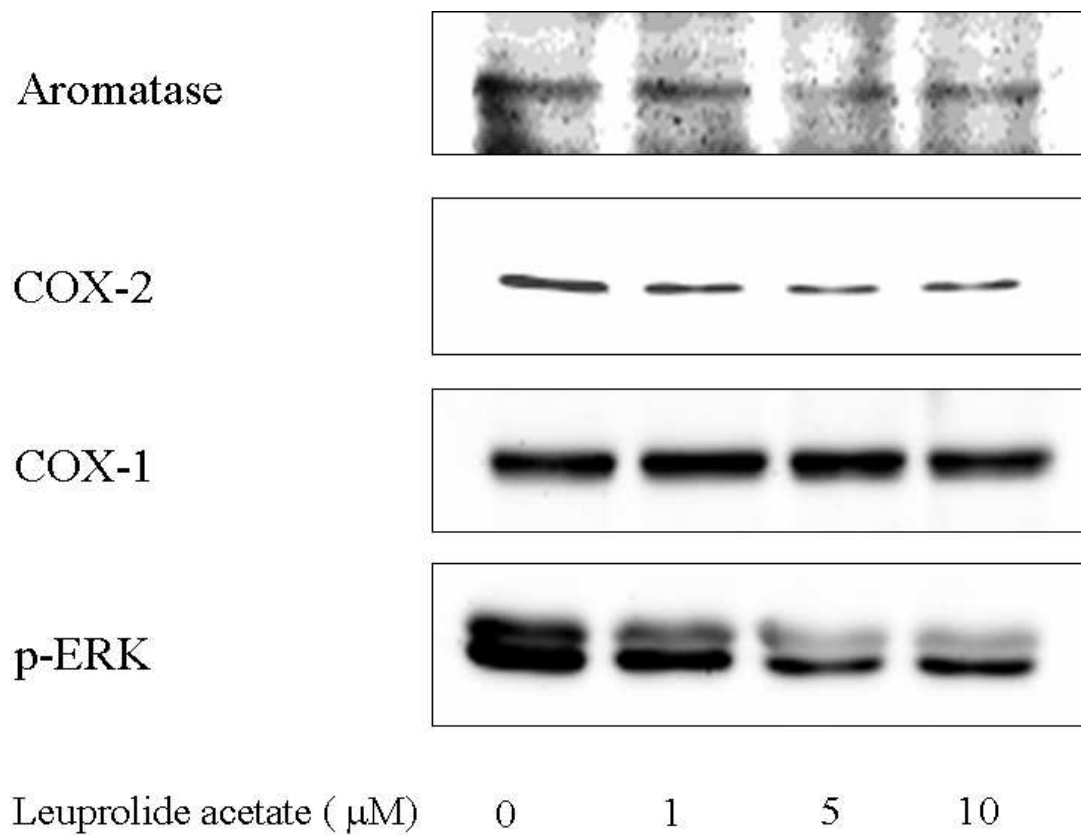


Fig. 2. Effects of GnRH agonist (leuprolide acetate 0, 1, 5, and 10 μM) for 24 hours on stromal cells culture obtained from ovarian endometrioma.

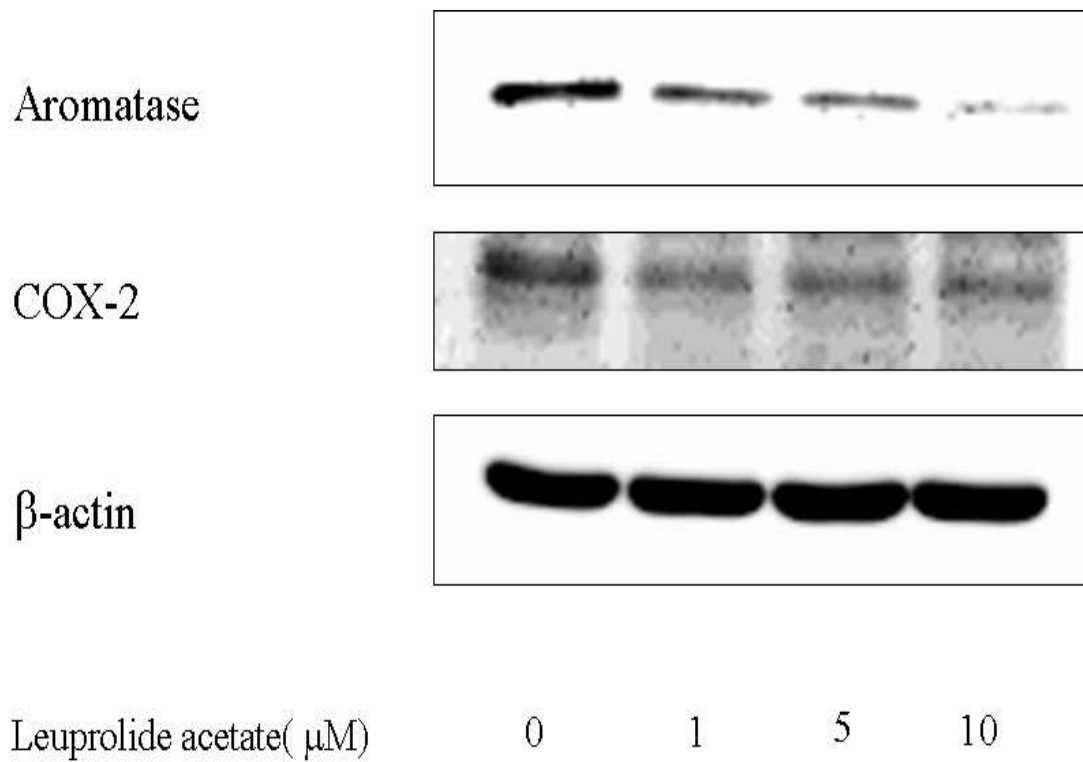


Fig. 3. Effects of GnRH agonist (0, 1, 5, and 10 μ M) for 24 hours on stromal cells culture obtained from eutopic endometrium of endometriosis.

PGE₂ - - **5x10⁻⁸** **5x10⁻⁸** (M)

Leuprolide acetate - **10** - **10** (uM)

Aromatase



β-actin

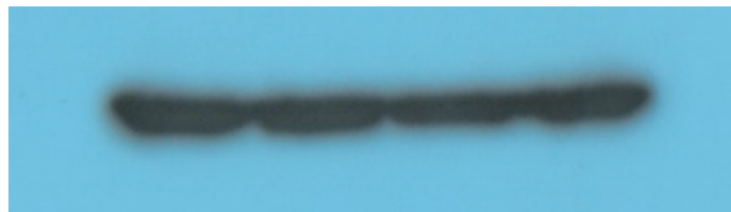


Fig. 4. Effects of GnRH agonist (10 uM) and PGE₂ (5x10⁻⁸M) for 24 hours on Aromatase protein level of stromal cells culture obtained from eutopic endometrium of endometriosis.

IV. 고 찰

자궁내막증의 병태생리학적인 기전에 대해서는 논란의 여지가 많으나, Sampson에 의해 제시된 착상설(implantation theory)이 가장 많이 받아들여지고 있다. 그러나 생리혈의 역류 현상이 거의 모든 여성들에게서 일어나는 반면 자궁내막증은 일부 여성들에 있어서만 발현되는 것으로 보아 역류혈 이외에도 여러 가지 원인이 자궁내막증의 발생에 관여할 것으로 생각된다.

자궁내막증의 내막 조직은 정상 조직에 비해 변형된 아로마타제 (aberrant aromatase)가 나타나며 세포고사 (apoptosis)가 억제되고 (Meresman 등, 2000) 세포증식이 증가됨이 보고 되었다 (Meresman 등, 2002). 이에 많은 연구에서 자궁내막증의 정상부위의 내막 (eutopic endometrium)이 자궁내막증의 병태생리에 중요한 원인으로 보고 있다.

이 중 자궁내막증의 정상부위 내막에서 비정상적으로 발현되는 아로마타제는 안드로겐을 에스트로겐으로 전환하는 사이토크롬P450효소이다. 아로마타제는 많은 조직과 세포에 존재하며, 특히 난소 과립막세포, 태반 융합영양막 (placental syncytiotrophoblast), 지방세포, 피부 섬유아세포, 뇌에 나타난다. 아로마타제 messenger RNA가 난소의 자궁내막증 이식 부위와 자궁내막증에 높게 나타나는 데, 이는 자궁내막증의 병변 내 에스트로겐의 국소적인 원천에 해당된다 (Zeitoun 와 Bulum, 1999). 또한, 자궁내막증에서는 에스트로겐을 에스트론 (estrone)으로 비활성화 시키는 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD)가 결핍되어, 활성화된 에스트로겐이 높은 상태이다. 또한, 자궁내막증 병변에서 높게 나타나는 프로스타글란딘 E_2 는 가장 강력한 아로마타제 유도제로 알려졌으며 (Noble 등, 1997; Zeitoun 등, 1999), 역으로 에스트로겐은 자궁내막의 기질세포 배양에서 COX-2를 자극하여 프로스타글란딘 E_2 형성을 증가시킨다. 이에 국소적인 에스트로겐 유도과 PGE_2 의 생성이 정피이드백환 (positive feedback cycle)을

형성하고, 이로 자궁내막증의 특징인 세포증식과 염증으로 나타난다.

자궁내막증 조직의 지속적인 성장은 난소의 스테로이드 호르몬, 특히 에스트로겐, 의 영향을 받으며, 이 중 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제는 혈중 에스트로겐을 낮추는 자궁내막증의 대표적인 치료제이다. 자궁내막증에 대한 치료 효과는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의한 저에스트로겐혈증에 의한 것으로 생각되어진다. 그러나 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제는 호르몬 환경을 변화 시킬 뿐 아니라, 자궁내막에 직접적으로 작용하며, 다른 말단 조직에서도 성선자극호르몬 분비호르몬 수용체 발현이 보고 되었다 (Cheng 와 Leung, 2000; Klausen 등, 2002). 즉, 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료로 자궁내막에 난소스테로이드 수용체의 변화를 보이며, 자연주기 내막과 비교해서 항유사분열 (antimitotic) 영향을 유도한다 (Bourgain 등, 2002). 다른 생체 내, 외 연구에서도 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제로 유도된 세포성장 변화, 세포주기 단백질, 성장 요소(Growth factor), 사이토카인, 프로테아제 및 프로테아제 억제제가 몇몇 말단 조직 즉, 자궁내막암 세포계(cell line), 기질세포(stromal cell), 이소성 자궁내막조직, 자궁근종과 자궁근육세포에서 발현되는 것이 보고 되었다 (Dou 등, 1997; Imai 등, 2000; Grundker 등, 2001; Grundker 등, 2002; Chegini 등, 2003a; Chegini 등, 2003b; Chou 등 2003a; Chou 등, 2003b; Meresman 등, 2003).

이 중 Ishihara 등은 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 다나졸 치료로 비정상적으로 발현된 자궁내막증의 정상부위 내막의 아로마타제의 발현이 정상화되는 것을 생체 내 연구를 통해 보고하였다 (Ishihara 등, 2003). 그러나 이 연구에서는 다나졸과 함께 배양한 자궁내막증의 정상부위 내막에서 아로마타제 발현이 감소하여 직접적인 작용이 있음을 설명하였으나, 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료 후 보인 아로마타제의 정상화는 세포배양 실험에서는 관찰되지 않아, 아로마타제의 정상화는 저에스트로겐 혈증에 의한 간접적인 작용으로 설명하였다. Shozu 등은 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료를 통해 자궁근종세포에서 아로마타제 발현이 감소한 것을 보고하였고 성선자극호르몬 분비호르몬

효능제와 자궁근종세포 배양을 통해 아로마타제가 감소함을 확인하여 직접적인 작용임을 보고하였다 (Shozu 등, 2001). 본 연구에서도 생체 내에서 뿐 아니라, 자궁내막증의 정상부위 내막과 자궁내막종의 기질세포를 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 배양함으로 직접적인 작용으로 아로마타제와 COX-2 발현이 감소됨을 확인하였다. 이에 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료가 저에스트로겐혈증에 의해서 뿐 아니라, 직접적인 작용을 통하여 추가적인 치료 효과의 가능성을 기대하게 된다.

성선자극호르몬 분비호르몬 수용체의 신호전달체계는 protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), G protein-coupled receptor kinases, calcium-calmodulin (Ca^{2+} -CaM), mitogen activated protein kinase (MAPK) 다단계 (cascade) 등이 있고 epidermal growth factor receptor tyrosine과 c-Src kinases 도 있다 (Cheng 와 Leung, 2000; Klausen 등, 2002). 이 중 자궁내막 세포계에서 성선자극호르몬 분비호르몬 수용체는 MAPK/ERK (extracellular signal-regulated kinase) 신호체계와 관련 있는 것으로 알려졌으나, 자궁내막의 신호전달체계에 대해서는 아직 연구가 진행 중이다 (Cheng 와 Leung, 2000; Klausen 등, 2002; Luo 등, 2003; Xu 등, 2003; Yoshino 등, 2003).

세포내 신호 변환기(transducers)인 MAPKs은 염증 전단계 (proinflammatory) 사이토카인에 의해 유도된 효과를 중개 (mediate)한다. 최근엔 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK 등이 알려졌다. 이러한 MAPK의 인산화 (phosphorylation)는 하향 흐름 (downstream)의 기질(substrates) 인산화를 유도해서 유전자 표현 (gene expression), 유사분열, 이동, 신진 대사, 세포소멸 (apoptosis) 등을 조절한다 (Pearson 등, 2001). 최근 연구에서는 인간 자궁내막에서 국소적 염증 조절에 의한 착상에 p38이 관여함을 보고하였다 (Yoshino 등, 2003).

Yoshino 등은 자궁내막증 기질세포에서 IL-1 β 와 배양 전 상태에서 이미 세포 내의 ERK 인산화 형태를 확인하고 IL-1 β 에 의해 ERK, p38, 그리고 JNK의 인

산화 형태가 증가하는 것을 보고하여, 자궁내막증에서 MAPK가 증추적 세포내 신호전달 변환기 역할을 할 것으로 생각하였다 (Yoshino 등, 2004). 그리고 Tamura 등은 자궁내막기질세포(ESC) 배양에서 COX-2의 mRNA, 단백질, 그리고 PGE2가 IL-1 β 에 의해 의미 있게 증가하는 것을 보고하였으며 (Tamura 등, 2002), 이러한 COX-2의 발현이 PKA 억제제, nuclear factor(NF-kappaB) 억제제, ERK1/2 억제제에 의해 감소하였으나, p38MAPK 억제제와 PKC 억제제에 의해서는 감소하지 않은 것도 보고하였다. 이에 IL-1 β 에 의한 COX-2의 신호전달 체계에 PKA, NF-kappaB 와 ERK1/2가 관여할 것으로 설명하였다. 또한 COX-2 mRNA 안정화에 ERK1/2신호전달이 필수적임을 확인하였다. 본 연구에서는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 난소 자궁내막종과 정상부위 내막의 기질 세포 배양에서 아로마타제와 COX-2의 감소와 동반되어 활성화된 p-ERK가 감소함을 확인하였다. 이러한 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 직접적인 작용이 ERK 신호체계의 비활성화에 의한 것으로 단정 지을 수는 없으나, 기질 세포 내에서 작용하는 다양한 신호체계 중의 일부로 작용한 것으로 추정된다.

아로마타제는 자궁내막증의 병변 내 에스트로겐의 국소적인 원천과 병변 성장의 원인으로 받아들여지고 있으나 ERK/MAPK 신호전달체계와의 연관성에 대한 연구는 아직 없는 상태이다. 최근에 미성숙 쥐에서 분리한 세르톨리세포(Sertoli cell)의 배양 연구에서 활성화한 ERK/MAPK 신호전달체계가 아로마타제와 에스트로겐을 억제시킨다는 연구가 있어 ERK도 아로마타제의 활동에 관여할 것으로 추정한다 (McDonald 등, 2006).

다나졸에 의해 아로마타제가 억제되는 기전에 대해서는 명확히 밝혀지지는 않았지만, Murakami의 연구에서는 다나졸이 아로마타제의 mRNA와 단백질에는 영향을 주지 않으며, 운동학 분석 (kinetic analysis)에 의해 경쟁적인 기전(competitive mechanism)에 의해 아로마타제 활성을 억제한다고 보고하였다 (Murakami 등, 2006). 이에 본 연구는 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 배양시 아로마타제가 정상화되는 것이 직접적인 작용이 아닌, 성선자극호르몬 분비

호르몬에 의한 COX-2 감소에 의한 프로스타글란딘 E₂ 감소가 아로마타제를 정상화시킨 것이 아닐까하는 의문이 제기되어, 자궁내막증의 정상부위 내막 기질세포에서 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제와 프로스타글란딘 E₂를 첨가하여 배양하였다. 아로마타제 사이토크롬 P450은 프로스타글란딘 E₂와 배양 후 더 증가하였으나, 성선호르몬분비호르몬 효능제를 첨가 배양 시 거의 발현되지 않았다. 이에 아로마타제 사이토크롬 P450은 프로스타글란딘 E₂의 강력한 유도보다 성선호르몬분비호르몬 효능제에 의해 더 강력한 직접적인 작용으로 감소하는 것을 확인하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 자궁내막증의 대표적인 치료제인 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제 치료 후, 자궁내막증의 정상부위 내막에서 아로마타제의 정상화와 COX-2의 감소가 나타남을 확인하였다. 또한 자궁내막종 및 자궁내막증 정상부위 내막의 기질세포와의 배양을 통해 아로마타제와 COX-2를 정상화 시키는 직접적인 작용이 있음을 확인하였다. 이에 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의한 자궁내막증의 치료 효과는 저에스트로겐혈증에 의한 것 뿐 아니라, 아로마타제와 COX-2에 직접적으로 관여할 것으로 생각된다. 또한 프로스타글란딘 E₂의 아로마타제 유도보다 강력한 억제효과가 있음을 확인하여 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제의 치료적 기전에 대해 새로운 이해가 필요할 것으로 생각된다. 또한 성선자극호르몬 분비호르몬 효능제에 의한 아로마타제와 COX-2의 정상화에 대한 신호전달 체계 및 작용기전에 대한 연구 뿐 아니라 다른 표적 유전자(target genes)에 대한 연구가 자궁내막증의 이해 및 더 나은 치료를 위해 필요할 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

1. Bourgain C, Ubaldi F, Tavaniotou A, Smitz J, Van Steirteghem AC, Devroey P. Endometrial hormone receptor and proliferation index in the periovulatory phase of stimulated embryo transfer cycles in comparison with natural cycles and relation to clinical pregnancy outcome. *Fertil Steril* 78: 237-244, 2002
2. Chegini N, Kornberg L. Gonadotropin releasing hormone analogue therapy alters signal transduction pathway involving mitogen-activated protein and focal adhesion kinases in leiomyoma. *J Soc Gynecol Investig* 10: 21-26, 2003a
3. Chegini N, Luo X, Ding L, Ripley D. The expression of Smads and transforming growth factor beta receptors in leiomyoma and myometrium and the effect of gonadotropin releasing hormone analogue therapy. *Mol Cell Endocrinol* 209: 9-16, 2003b
4. Cheng KW, Leung PC. The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 1029-1052, 2000
5. Cheon KW, Lee HS, Parhar IS, Kang IS. Expression of the second isoform of Gonadotropin-releasing hormone(GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 7: 447-452, 2001
6. Chou CS, MacCalman CD, Leung PC. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3806-3815, 2003a

7. Chou CS, Zhu H, MacCalman CD, Leung PC. Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone(GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase(MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4781-4790, 2003b
8. Dlugi AM, Miller JD, Knittle J. Lupron depot(leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double blind study. *Fertil Steril* 54: 419-427, 1990
9. Dou Q, Tarnuzzer RW, Williams RS, Schultz GS, Chegini N. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in leiomyoma: a mechanism for gonadotropin releasing hormone agonist-induced tumor regression. *Mol Hum Reprod* 3:1005-1014, 1997
10. Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, Emons G. Protein kinase C-independent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur J Endocrinol* 145: 651-658, 2001
11. Grundker C, Gunthert AR, Millar RP, Emons G. Expression of gonadotropin-releasing hormone II(GnRH II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1427-1430, 2002
12. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosis. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod* 9: 1158-1162, 1994
13. Henzl MR, Kwei L. Efficacy and safety of nafarelin in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 162: 579-581, 1990

14. Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repaired reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 182: 1142-1146, 2000
15. Ishihara H, Kitawaki J, Kado N, Koshihara H, Fushiki S, Honjo H. Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas. *Fertil Steril* 79 (suppl 1): 735-742, 2003
16. Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metaplasia. Including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 2: 399-410, 1949
17. Klausen C, Chang JP, Habibi HR. Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone signaling: a comparative perspective. *Prog Brain Res* 141:111-128, 2002
18. McDonald CA, Millena AC, Reddy S, Finlay S, Vizcarra J, Khan SA et al. Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli cells requires an active phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is inhibited via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Endocrinol* 20: 608-618, 2006
19. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 74: 760-766, 2000
20. Meresman GF, Auge L, Baranao R, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril*

77: 1141-1147, 2002

21. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao RI. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 18: 1767-1771, 2003
22. Murakami K, Nomura K, Shinohara K, Kasai T, Shozu M, Inoue M. Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis-derived stromal cells by a competitive mechanism. *Fertil Steril* 86: 291-297, 2006
23. Noble LS, Takayama K, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 600-606, 1997
24. Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, Gorstein F. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimen. *Fertil Steril* 52: 965-972, 1989
25. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al., Mitogen-activated protein(MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183, 2001
26. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14: 422-429, 1927
27. Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am H Obstet Gynecol* 40: 549-557, 1940
28. Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang HJ, Murakami K, Inoue M.

- Inhibition of in Situ expression of Aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by Leuprorelin Acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5405-5411, 2001
29. Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol* 165: 214-218, 1991
 30. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. Interleukin-1 beta elevates Cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellular regulated kinase 1 and 2. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3263-3273, 2002
 31. The American Fertility Society. Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 115: 79-83, 1985
 32. Xu J, Luo X, Chegini N. Differential expression, regulation, and induction of Smads, transforming growth factor-beta signal transduction pathway in leiomyoma, and myometrial smooth muscle cells and alteration by Gonadotropin-releasing hormone analog. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1350-1361, 2003
 33. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata Y, Yano T et al., Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 beta via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2236-2241, 2003
 34. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Harada M et al., Possible pathophysiological roles of Mitogen-Activated Protein Kinases(MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immun* 52: 306-311,

2004

35. Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* 72: 961-969, 1999
36. Zeitoun K, Takayama K, Michael MD, Bulun SE. Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in endometrium are regulated by competitive binding of SF-1 and COUP-TF to the same cis-acting element. *Mol Endocrinol* 13: 239-253, 1999

-ABSTRACT-

**Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Treatments
Normalize Aromatase and Reduce
Cyclooxygenase-2 in Ovarian Endometrioma and
Eutopic Endometrium with Endometriosis**

Kim Young Ah

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Kyung Joo Hwang)

Purpose: To investigate whether GnRH agonists could normalize aromatase cytochrome P450 and cyclooxygenase-2 metabolism by direct action in the eutopic endometrium of endometriosis and ovarian endometrioma.

Methods: Endometrial specimens and ovarian endometrioma tissues were obtained from infertility women undergoing laparoscopic surgery. Biopsy samples of the endometrium were obtained before and after GnRH agonist therapy. The stromal cells of eutopic endometrium with endometriosis and ovarian endometrioma were cultured in the presence of GnRH agonist (leuprolide acetate 0, 1, 5, and 10 uM) for 24 hours. The expression of aromatase cytochrome P450 and COX-2 was examined by Western blot.

Results: Protein expression of aromatase cytochrome P450 and COX-2 was

reduced in the eutopic endometrium of patients treated with GnRH agonist for 3 months. The stromal cells culture of endometrial explants and ovarian endometrioma by GnRH agonist reduced aromatase cytochrome P450 and COX-2. Phosphorylated ERK was also reduced in endometriotic stromal cultures by GnRH agonist.

Conclusion: Therapy with GnRH agonists decreased expression of aromatase cytochrome P450 and COX-2 in eutopic endometrium of endometriosis and ovarian endometrioma. GnRH agonist reduced the expression of aromatase cytochrome P450 and COX-2 by promoting a hypoestrogenic state and direct action on eutopic endometrium and ovarian endometrioma.

Key words: Endometriosis, Aromatase, COX-2, Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist, Stromal cell culture