

자궁근종 환자에서 Gonadotropin Releasing Hormone(GnRH) 유사체 투여 후 자궁근종 세포 증식에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 연세대학교 의과대학 병리학교실*

이병석 · 이보연 · 박기현 · 조동제 · 이 국 · 송찬호 · 김호근*

The Activity of Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) of Uterine Myoma after Treatment with Gonadotropin Releasing Hormone(GnRH) Analogue

Byung Seok Lee, M.D., Bo Yeon Lee, M.D., Ki Hyun Park, M.D., Dong Jae Cho, M.D.
Kook Lee, M.D., Chan Ho Song, M.D. and Ho Keun Kim, M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei University

*Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University**

= Abstract =

The factors involved in the initial neoplastic transformation and subsequent growth of uterine fibroid are poorly understood. The reduction in uterine fibroid volume associated with the chronic administration of the mechanisms mediating the decrease in fibroid volume in GnRH-a treated patients are poorly defined.

The purpose of this study was to determine the proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in fibroid from-women pretreated with GnRH analogue(GnRH-a) compared with controls. Tissue was obtained from 16 premenopausal women with uterine fibroid who received GnRH-a(D-Trp6-GnRH) intramuscularly every 28 days for four injections. The mean proliferating index(PI) in patients with uterine fibroids was 2.25 ± 0.9 , and in controls was 8.82 ± 1.8 ($P < 0.001$). The proliferating index was not correlated with the reduction of fibroid volume. In this clinical study, although hypoestrogenism may be the main factor that reduce the volume of fibroid, other factors are also considered to be involved in that process. And the regrowth of uterine fibroid may be affected by increased production of PCNA after stopping GnRH-a.

서 론

자궁근종은 부인과 질환중 가장 흔한 질환중의 하나로서, 월경과다증, 골반통 등을 유발하며 때로는 불임을 초래하기도 한다. 자궁근종을 일으키는 기전은 확실치 않으나 일반적으로 난소호르몬이 근종 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있어 최근 난소호르몬의 생성을 감소시켜 근종을 치료하려는 시도가 되고 있다. 따라서 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) 유사체를 투여하여 성선 자극 호르몬의 분비를 억제시키므로써 난소의 기능을 저하시

켜 자궁근종의 크기를 감소시키고(Van Leusden HAIM, 1986) 자궁근종으로 가는 혈량을 감소시키므로써 수술을 용이하게 할수 있다(Park et al., 1991).

일반적으로 어떠한 조직의 형태를 유지하는 데는 세포의 분열정도가 큰 영향을 미친다. 그러나 자궁근종은 세포의 분화속도가 느린 종양중의 하나로 알려져 있어 일반적으로 근종세포의 분화정도를 측정하는 것이 힘들었으나 최근 세포가 분열되는 과정에서 생성되는 물질인 proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA로 약함)을 이용하여 분열기 세포를 측정하는 방법이 도입되었다. 따라서 저자들은 자궁근종 환

자에서 GnRH 유사체 투여 후 근종이 감소하고 GnRH 유사체를 끊었을 때 다시 재성장하는 원인이 세포증식과 관련이 있는지 알아보기 위해 PCNA를 이용한 면역조직화학적 방법을 통해 GnRH 유사체가 근종세포의 증식에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

대상은 21세에서 38세까지의 폐경전 여성으로 초음파와 임상적 진찰로 자궁근종으로 진단된 환자 16명을 대상으로 하였다. 이들 환자들은 월경시작 제 2일째에 근종의 부피를 감소시키고자 long acting GnRH analogue(D-Trp 6-GnRH in biodegradable microcapsules, Ferring B.V, Haarlem, the Netherland)를 매 4주마다 한번씩 4번 근무 한 후 모든 환자에서 전신 마취하에 자궁근종제거술을 실시하였다. 자궁근종의 부피 변화를 알아 보기 위해 초음파(Aloka, SD-650)를 이용하여 투여하기전과 4번 모두 투여한 후 측정하였으며, 측정 공식은 $4/3\pi(R_1 \times R_2 \times R_3)$ (R : each radius of 3 dimension)를 이용하였다(Friedman et al., 1987). 또 제거된 근종에서 분열기세포의 발현 정도를 알아보기 위해 면역조직 화학적 검사를 실시하였다.

먼저 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 5-6 μ m 두께의 절편으로 만들어 PCNA 단클론 항체(Dako, Denmark)를 사용하여 LSAB kit(Dako, Denmark)로 염색하여 핵에 양성 반응을 보이는 세포를 검사하였다. 분열기 세포의 수는 1000배 광학현미경으로 각 절편마다. 최소 500개 이상의 세포를 검색하여 이를 100분율로 환산하여 proliferation index (이하 PI로 약함)를 정하였으며 그 공식은 다음과 같다.

$$\text{Proliferation Index(PI)} = \frac{\text{number of reactive cells}}{\text{total number of cells}} \times 100$$

대조군은 31-42세까지의 10명의 폐경전 여성에서 자궁근종으로 전자궁적출술을 받은 환자의 검체를 이용하여 위에 기술한 바와 같은 방법으로 분열기세포의 수를 계산하였다.

혈청 홀몬의 측정은 GnRH 유사체를 투여하기전과 투여한후 혈중내 에스트로젠, luteinizing

hormone, follicle stimulating hormone의 측정을 위해 채혈하여 혈청을 분리한 후 -40 $^{\circ}$ C에 보관하여 방사면역측정법(Radioimmunoassay)에 의해 측정하였다.

결 과

GnRH 유사체를 투여하기 전과 투여한후의 홀몬의 변화를 보면 혈중내 E2치는 투여전이 71.6 \pm 35.7pg/ml에서 투여후에는 모두에서 20pg/ml로 감소하였고, luteinizing hormone치는 10.8 \pm 3.1mIU/ml에서 3.9 \pm 1.9mIU/ml로, follicle stimulating hormone치는 8.1 \pm 2.1mIU/ml에서 2.6 \pm 1.71.7mIU/ml로 감소하였다(표 1). 자궁근종의 부피의 변화는 GnRH 투여전이 413.5 \pm 326.5cc에서 투여후 222.4 \pm 80.2cc로 53.8%의 감소를 보였고(p<0.001), 대조군의 근종부피는 386.2 \pm 220.7cc로 GnRH 투여전군과 통계학적으로 의의가 없었다(그림 1).

GnRH유사체 투여후와 대조군과의 분열기세포의 활동성을 비교해 보면 대조군의 PI는 8.82 \pm 1.8 치료군의 PI는 2.25 \pm 0.9로 매우 의의 있는 감소를 보였으며(p<0.001)(그림 2, 3) 자궁근종의 부피 감소에 따른 PCNA 활동성의 상관관계를 보면 Y=0.006 X+0.938, r=0.068

Table 1. Hormonal levels before and after therapy

| E2(pg/ml) | | LH(mIU/ml) | | FSH(mIU/ml) | |
|------------|-------|------------|-----------|-------------|-----------|
| Before | After | Before | After | Before | After |
| 71.6 | <20 | 10.8 | 3.9 | 8.1 | 2.6 |
| ± 35.7 | | ± 3.1 | ± 1.9 | ± 2.1 | ± 1.7 |
| P<0.001 | | P<0.001 | | P<0.001 | |

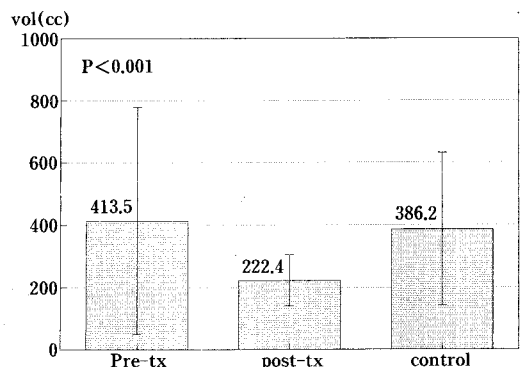


Fig. 1. Change of volume before and after tx.

로 부피감소에 따른 PCNA 활동성은 상관관계를 보이지 않았다(그림 4).

고 찰

자궁근종은 임신시(Muram et al., 1980) 혹은 스테로이드 홀몬이나 배란유도체 사용시 커지며 폐경이 되면 크기가 감소되는 경향으로 보아 에스트로젠이 근종의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Tamaya et al., 1978; Soules et al., 1982). 또한 Pasqualini 등(1990)은 자궁근종환자에서 GnRH 유사체를 투여한 후 자궁근종에서 프로세스테론 수용체와 에스트라디올 sulfate의 농도가 감소함으로써 에스트로젠이 자궁근종을 야기하는 가설을 뒷받침할 수 있다고 보고하였다. 그러나 에스트로젠뿐 아니라 프로세스테론도 근종의 세포분열에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며(Kawaguchi et al., 1989) 또한 자궁근종의 세포의 분열능력이 에

스트로젠과 프로세스테론을 투여했을 때 보다 프로세스테론 단독 투여시 더 증가한다는 보고가 있어 프로세스테론 역시 자궁근종의 세포분열에 영향을 주는 요인중의 하나로 인식되고 있다. GnRH 유사체 사용시 자궁근종의 부피가 감소하는데 GnRH 유사체 사용후 제거한 근종의 전자현미경적 소견을 보면 미토콘드리아의 cristae의 상실과 팽창, 근섬유의 상실, lysosome과 perinuclear vacuolation의 증가, 핵염색체의 응집등의 퇴행성 변화를 뚜렷이 보여주고 있다(Park et al., 1991). 따라서 GnRH 유사체를 투여할때 자궁근종이 감소하는 기전을 첫째는, GnRH에 의해 뇌하수체의 GnRH 수용체의 down regulation이 일어나 성선자극 홀몬의 분비가 안되고 이차적으로 난소에서 여성홀몬이 분비가 안되어 근종의 부피를 감소시키거나(Friedman et al., 1987) 둘째의 GnRH의 결합 부위가 자궁근종에도 존재하여 직접적으로 작용한다는 가설도 있다. 그러나 최근 자궁근종에 GnRH 수용체가 존재하지 않는다는 문헌

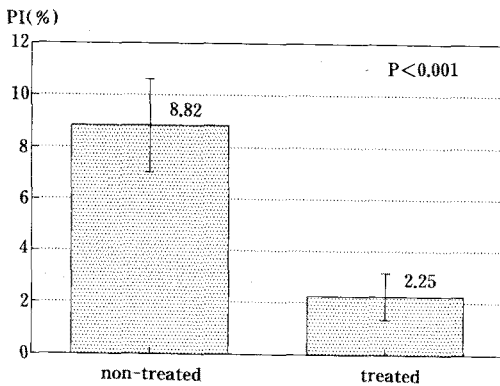


Fig. 2. Proliferation index of treated and non-treated fibroid.

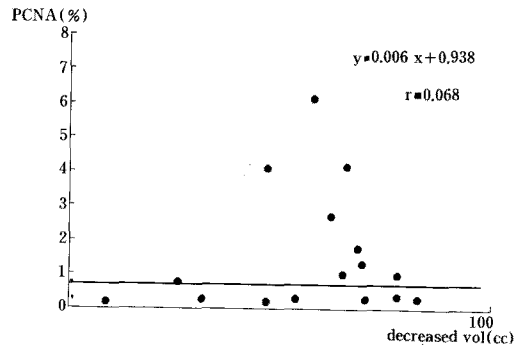


Fig. 4. Relation of the PCNA to the volume reduction of the fibroid.

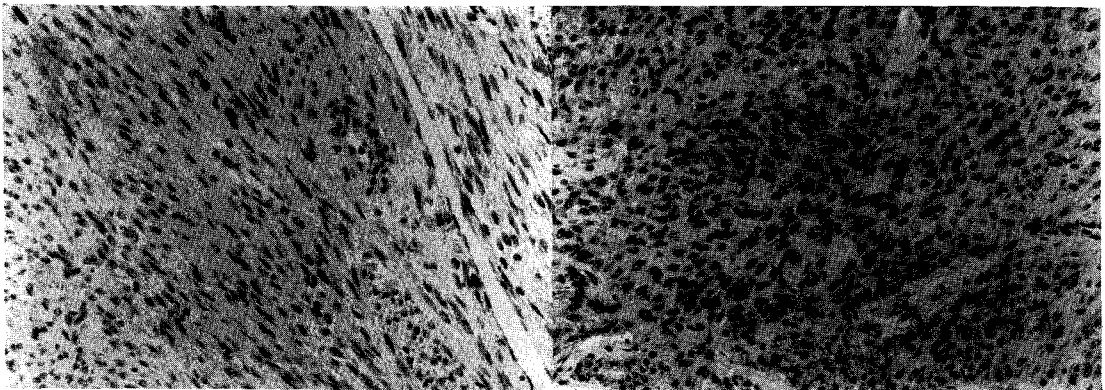


Fig. 3. Direct immunohistochemical staining of PCNA($\times 400$). A) Staining of non-treated fibroid, B) Staining of fibroid treated with GnRH-analogue.

(Neuman et al., 1991)이 보고는 되었으나 아직 그 기전은 확실치 않다.

정상세포나 혹은 이형세포의 분열기 세포에서 핵항원이 표현된다는 것이 발견되고(Briggs et al., 1980; Tan 1982; Busch et al., 1982) proliferating cell nuclear antigen(PCNA)이 자가면역 환자의 혈청에서 발견되고 이것이 핵단백질인 cyclin과 동일한 것임이 밝혀지므로서(Bravo et al., 1981; Mathews et al., 1984) 혈중내 세포분열의 규명을 위해 사용되기 시작하였다.

현재까지 세포의 분열능을 측정하는 방법은 여러가지가 알려져 있는데 이중 가장 간편한 방법은 광학 현미경하에서 유사분열 수를 측정하는 것이다. 그러나 유사분열은 분열기에 있는 세포중 M phase에 있는 세포만을 측정하는 것이므로 정확한 세포분열능을 측정한다고 보기는 어렵다.

Bromodexyridine(BrdU)을 이용한 분열기 세포측정은 좀더 객관적이긴 하나 검색전에 생체내에 BrdU를 주사하여야 하므로 임상적 응용이 불가능하다. 그러나 최근 이러한 모든 분열기 세포에서 분비되는 물질을 단클론항체로 이용하여 세포분열능을 객관적으로 분석할 수 있는 방법이 도입되었다.

본 연구에서 부피감소에 따른 PCNA의 분열능을 조사하였으나 상관관계가 없는 것으로 보아 부피가 많이 감소하였다고 해서 반드시 세포분열의 활동성이 감소하는 것은 아닌 것으로 사료되며 세포분열에 영향을 주는 그 밖의 여러 성장 인자들도 관여되는 것으로 생각된다. 그 중에서도 최근 자궁근종 조직에서 Epidermal growth factor나 Insulin like factor 등의 성장인자 수용체가 발견되고 이러한 수용체들이 estrogen의 영향을 받음이 보고되므로서 여성 호르몬뿐 아니라 이들 성장인자들이 근종 성장에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다(Carpenter & Zenegi, 1986).

또한 GnRH 유사체 투여를 중단하면 근종의 재 성장을 일으키는 기전 역시 확실히 밝혀져 있지는 않다. Rein등(1991)은 GnRH 유사체 사용후 자궁근종 조직의 에스트로젠 및 프로제스테론 수용체를 조사하여 근종내 에스트로젠 수용체가 의의있게 증가하여 있으므로 GnRH 유사체 사용후 근종이 매우 급격히 증가한다고 보고한 바와 같이 가능성 에스트로젠 및 프로제스테론 수용체가 근종성장의 조절에 중요한 역할을 할 것이라고 추측된다.

본 연구에서는 GnRH 유사체 사용후 PCNA의 생성이 급속히 감소하므로서 GnRH 유사체의 사용이 중단된 경우 다시 난소의 기능이 돌아옴에 따라 여성 호르몬의 생성이 증가하기 시작하여 PCNA의 생성이 증가하므로서 재 성장이 이루어진다고 생각되어진다.

결 론

자궁근종 환자 16명을 대상으로 하여 GnRH 유사체를 투여하고 난후 채취한 검체와 10명의 대조군에서 채취한 검체를 대상으로 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 환자군의 GnRH-a 투여전 근종의 부피는 $413.5 \pm 326.5cc$ 에서 투여후 $224.4 \pm 80.2cc$ 로 매우 의의있게 감소하였다($p < 0.001$).
2. 환자군의 GnRH-a 투여후 proliferating index는 8.82 ± 1.8 , 대조군은 2.25 ± 0.7 로 매우 의의있게 감소하였다($p < 0.001$).
3. 자궁근종의 부피감소에 따른 PCNA의 활동성은 상관관계를 보이지 않았다.

참 고 문 헌

- Bravo R, Fey SJ, Bellatin I, Zhao G, Busch H: Novel cell cycle-related nuclear proteins found in rat and human cells with monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1981, 136, 311.
- Briggs RC, Krajewska WM, Hnilica LS, Lincoln GSJ, Stein G: Tissue- and species-specific nuclear antigens and the cell cycle. In: GL Whitson(ed.), Nuclear-cytoplasmic interactions in the cell cycle, pp. 181-201, Academic Press, New York, 1980.
- Busch H, Busch RK, Chan PK, Kelsey D, Takahashi K: H, Busch and LC, Yeoman(eds.), Methods in cancer research, Vol. 19, pp. 109-118, Academic Press, New York, 1982.
- Carpenter C, Zenegui JG: Epidermal growth factor, its receptor and related proteins. *Exp Cell Res* 1986, 164, 1.
- Cellis JE, Madsen P, Nielsen S, Celis A: Nuclear patterns of cyclin (PCNA) antigen distribution subdivide S-phase in cultured cells—some applications of PCNA antibodies. *Leu-*

- kemia Res* 1986, 10, 237.
- Friedman AJ, Barbieri RL, Benacerraf BR, Schiff I: Treatment of leiomyoma with intranasal or subcutaneous leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1987, 48, 560.
- Kawaguchi K, Fujii S, Konsishi I, Nanbu Y, Nonogaki H, Mori T: Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 16, 637.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JL: Identification of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984, 309, 374.
- Muram D, Gilleson M, Walters JH: Myomas of the uterus in pregnancy: Ultrasonographic follow up. *Am J Obstet Gynecol* 1980, 138, 16.
- Neuman M, Bukovsky I, Langer R, Caspi E, Golan A, Koch Y: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action on uterine leiomyomata in not mediated by uterine GnRH receptors. *Fertil and Steril* 1991, 56, 364.
- Pasqualini JR, Cornier E, Grenier J, Vella C, Schaty B, Netter A: Effect of Decapeptyl, an agonistic analog of gonadotropin-releasing hormone on estrogens, estrogen sulfates, and progesterone receptors in leiomyoma and myometrium. *Fertil Steril* 1990, 53, 1012.
- Park KH, Shin MC, Lee BY, Lee BS, Song CH: Electronmicroscopic ultrastructural changes of leiomyoma after treatment with D-Trp 6-Luteinizing Hormone Releasing Hormone. *Kor J Fertil Steril* 1991, 18, 9.
- Rein MS, Friedman J, Stuart JM, MacLaughlin DT: Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate. *Fertil Steril* 1990, 53, 1018.
- Soules MR, McCarty KS Jr.: Leiomyomas: Steroid receptor content-variation within normal menstrual cycles. *Am J Obstet and Gynecol* 1982, 143, 6.
- Tamaya T, Motoyama T, Ohono Y, Ide N, Tsurusaki T, Okada H: Estradiol-17 beta, progesterone and 5-alpha-dihydrotestosterone receptors of uterine myometrium and myoma in the human subject. *J Steroid Biochem* 1978, 10, 625.
- Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens. Their immunobiology and medicine. *Advanc Immunol* 1982, 33, 167.
- Van Leusden HAM: Rapid reduction of uterine myomas after short-term treatment with micro-encapsulated D-Trp 6-LHRH. *Lancet* 1986, 2, 1213.