

자궁내막증 환자와 정상 여성의 자궁내막에서 Pleiotrophin (PTN)과 Midkine (MK) mRNA 발현 차이에 관한 연구

정혜원[†] · 허성은 · 문혜성

이화여자대학교 의과대학 산부인과학 교실

Endometrium from Women with Endometriosis Expresses Increased Levels of Pleiotrophin (PTN) and Midkine (MK) mRNA Compared to Normal Endometrium

Hye-Won Chung[†], Sung-Eun Hur and Hye-Sung Moon

Department of Obstetrics and Gynecology, Ewha Womans University, College of Medicine,
Seoul 158-070, Korea

요 약: 자궁내막증은 흔한 부인과적 질병이며 여성 불임의 한 원인이 되나 그 발생 원인에 대하여는 아직 논란의 여지가 많다. 최근 월경혈의 역류에 의하여 자궁내막증이 생긴다는 가설이 가장 유력한데 자궁내막증 환자가 정상여성에서 보다 역류되는 월경혈의 양이 많거나 침습성이 강한 것이 자궁내막증의 발생원인이 될 수 있다는 이론들이 소개되었다. Pleiotrophin (PTN)이나 midkine(MK)은 성장 및 분화에 관여하는 인자로서 여러 종류의 악성 종양에서 그 발현이 보고되어 있으며 증양화 (carcinogenesis), 맥관형성 (angiogenesis), plasminogen activator의 활성화 증가 등에 관여한다고 보고된 바 있다. 이에 자궁내막증 환자의 자궁 내막과 대조군의 자궁내막에서 PTN과 MK mRNA의 발현의 차이를 quantitative competitive RT PCR로 비교하였다. 그 결과 자궁내막증 환자의 황체기 자궁내막에서 대조군의 자궁내막에 비하여 PTN과 MK의 발현이 높게 나타났다. 이러한 PTN과 MK의 발현의 증가로 자궁내막증 환자의 자궁내막이 복강 내에서 더욱 쉽게 맥관형성을 하고 성장이 촉진되어 자궁내막증이 발생될 것으로 생각되어 PTN과 MK가 자궁내막증의 초기 발생과정에 관여할 가능성이 있다.

ABSTRACT: Objectives: The pleiotrophin (PTN) and midkine (MK) are secreted heparin-binding neurokinins that share 50% sequence homology. PTN and MK are expressed in the range of primary human tumors. The association of PTN and MK with carcinogenesis, enhancement of plasminogen activator activity and angiogenic factor are reported. Patients with endometriosis are characterized by the ability of the endometrium to implant; angiogenic and growth factors may play a significant role in the pathogenesis of endometriosis. To test the hypothesis that higher expression of PTN and MK in endometrium from women with endometriosis might be increase angiogenesis and growth ectopic endometriosis implants, we investigated PTN and MK expression by quantitative and competitive polymerase chain reaction (QC-PCR) in endometrium from women with and without endometriosis throughout the menstrual cycle. **Design:** MK and PTN mRNA expression in endometrium from women with endometriosis and control patients without endometriosis were determined by QC-PCR throughout the menstrual cycle. **Methods:** Endometrial tissue was obtained from 25 patients with severe endometriosis and 30 patients without endometriosis undergoing hysterectomy or endometrial biopsy. Stage of endometrial cycle and a diagnosis of endometriosis were confirmed histologically. Total RNA was extracted and reverse transcribed into c-DNA. QC-PCR was performed to evaluate PTN and MK mRNA expression. Results were analysed by Post Hoc test. **Results:** MK and PTN were expressed throughout the menstrual cycle in both groups. MK expression was higher in follicular phase than luteal phase in endometrium from normal women. Endometrium from endometriosis patients showed increased expression of PTN and MK compared to endometrium from normal women in the luteal phase ($p < 0.05$). **Conclusion:** Our results suggest that uterine endometrium from women with endometriosis expresses higher levels of MK and PTN than endometrium from normal women during luteal phase. Increased MK and PTN expression may be related to the initiation of ectopic endometrial implants and their subsequent peritoneal invasion.

Key words: Pleiotrophin, Midkine, Ectopic and eutopic endometriosis.

[†]교신저자: 서울시 양천구 목6동 911-1, 이화여자대학교 목동병원 산부
인과 (우) 58-070 (전) 650-568 (팩) 647-9860 e-mail: hyewon@mm.ewha.ac.kr

서론

자궁내막증은 비교적 흔한 부인과적 질병이며 여성 불임의 원인이 되지만 그 발생 원인에 대하여는 아직 논란의 여지가 있으나 월경혈이 역류하여 복강 내에 착상하여 발생한다는 설이 가장 유력하며 (Sampson, 1927) 역류된 자궁내막 조직이 착상 후에는 주위 조직을 침습, 분해하고 성장하여 맥관 형성을 함으로서 자궁내막증을 발생시킨다. 자궁 내막증은 양성 질환이지만 성장 및 전이를 하는데 있어서 악성 종양과 유사한 양태를 보이며 이러한 성장 및 전이에 성장 인자, 맥관형성(angiogenesis) 인자, 신호전달(signal transduction)이 중요한 역할을 수행한다. 악성 종양과 자궁내막증의 발생, 성장, 전이에 관여하는 물질로는 basic fibroblast growth factor(bFGF)- α , vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF) 등과 그 수용체 등이 관여한다 (Heldin et al., 1989). 맥관형성은 암 및 자궁내막증 발생에 중요하며 혈관형성을 자극하거나 저해하는 물질의 상호작용에 의해 결정된다. 맥관형성 인자 중 VEGF군은 자궁내막증의 발생 및 유지에 중요한 역할을 하며 이 VEGF는 자궁내막증 조직 혹은 복강액내 거식세포에서 나와서 자궁내막증의 발생 및 맥관형성에 관여하는 것으로 보고되어 있다 (McLaren, 2000).

헤파린에 결합하는 polypeptide 유사체중 PTN 과 MK는 염기서열의 50%가 동일한 성장과 분화에 관여하는 유일한 분비성 cytokine으로서 발생을 조절한다 (Czubayko et al., 1995). 이들은 신경계 발달과 맥관형성(angiogenesis), 상피성-중간엽성(epithelial-mesenchymal) 상호작용에 중요한 역할을 한다.

MK(Midkine)는 주로 초기 태생기에 발현되나 PTN(pleiotropin)은 태아뿐 아니라 성인의 뇌, 자궁, 자궁내막, 유선, 뼈등에서도 일정량 발현되어 성인에서도 중요한 생리 작용을 할 것으로 생각된다 (Raulo et al., 1994). 또한 PTN은 손상 부위에 매우 높게 발현되며 염증성 자극에 의하여 그 발현이 유발되므로 PTN이 조직 손상과 상처 치유에 중요한 역할을 한다고 생각된다.

PTN은 18 kDa 크기로 소의 자궁에서 fibroblast의 분열을 조절하는 물질로부터 처음 정화되었으며 heparin과 세포 외 간질에 강한 친화력을 보이면서 결합한다. 자궁에서의 PTN mRNA 발현은 호르몬에 의하여 영향을 받는다. PTN은 태어나 신생아의 뇌 발달에 중요한 역할을 하며 혈관의 endothelial cell과 섬유아세포, endothelial cell에서 분비되며 유사분열 및 맥관 형성에 관여하고 유방암, 흑색종, 폐암, 전립선암 등

에서 발현되며 종양의 성장 및 맥관형성에 관여한다(Courty et al., 1991; Fang et al., 1992; Laaruoui et al., 1994; Delbe et al., 1995).

Midkine(MK)은 retinoic acid에 반응하는 성장 및 분화인자로써 분자량이 13kDa인 단백질이며 1988년 태생암(embryonal cell)에서 처음 발견되었으며 고형성 암에서 매우 증가하는 것으로 알려졌다 (Kadomatsu et al., 1988). MK는 주로 혈관 내피세포, 태아 성상세포(fetal astrocyte), 신장 근위 세관 세포(proximal renal tubular cell)에서 생성되며 주로 신경계 발달과 맥관형성(angiogenesis), 상피성-중간엽성(epithelial-mesenchymal) 상호작용에 중요한 역할을 하며 유사분열에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Li et al., 1990; Tsutsui et al., 1993; Kadomatsu et al., 1997). 정상 조직에서의 MK 발현은 극히 제한되어 있으나 신장, 폐, 갑상선 등에서 MK가 발현되는 것으로 보고되었으며 소장 점막에서는 아주 강하게 발현된다 (Tsutsui et al., 1993). 자궁내막의 상피세포 배양액에서 MK가 분비되며 17-beta estradiol을 처리하면 2배 이상 증가되어 MK의 발현은 호르몬에 의하여 영향을 받는다(Zhang et al., 1995). MK는 정상조직에서 발현이 제한되어 있으므로 병변 조직에서의 MK의 과발현은 매우 의미가 있다고 하겠다. MK는 여러 고형성 암에서의 암화 과정에 관여한다고 보고되었는데 정상조직에 비해 윌름씨 종양 (Wilm's tumor), 간암, 유방암, 폐암, 위암, 방광암 등에서 높게 발현된다 (Garver et al., 1993; Tsutsui et al., 1993; Graver et al., 1994; Ariodome et al., 1995). 침습성 방광암 (invasive bladder carcinoma)과 신경모 세포종(neuroblastoma)에서의 MK의 과발현은 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다 (Nakagawara et al., 1995; O'Brien et al., 1996).

성장 및 맥관 형성, tumorigenesis에 관여하며 호르몬에 의하여 그 발현이 조절되는 PTN 과MK가 호르몬에 의하여 성장이 촉진되고 성장인자와 맥관 형성이 그 발생에 중요한 역할을 하는 자궁내막증 발생에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 자궁내막증의 병인 중 가장 유력한 것이 자궁혈의 역류설이므로 자궁내막내에 맥관형성과 성장에 관여하는 PTN과 MK가 많은 여성의 자궁내막이 역류되면 그렇지 않은 여성에 비하여 역류된 자궁내막이 복강 내에 착상하여 성장하고 맥관 형성을 하므로써 자궁 내막증이 발생, 침습 및 성장될 가능성이 높다. 따라서 PTN과 MK가 자궁 내막증이 있는 여성의 자궁내막에서 대조군의 자궁내막에서 보다 높게 발현되는지를 알기 위하여 QC-PCR을 이용하여 정상 여성의 자궁내막과 자궁 내막증 환자의 자궁내막의 PTN과 MK mRNA 발현을 월경 주기별로 비교하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

자궁내막은 자궁내막에 병변이 있거나 악성 종양이 아닌 이유로 전 자궁적출술을 시행받거나 골반경 수술을 시행받은 환자에서 얻었다. 자궁내막증의 진단은 골반경이나 개복술을 시행할 때 진단하였으며 American Fertility Society의 modified criteria를 이용하여 병기를 정하여 stage III와 IV인 경우만 연구군에 포함시켰다 (American Fertility Society, 1985). 대조군은 개복술 및 골반경 수술시 자궁내막증이 없는 것이 확인된 환자로 양성 난소종양, 자궁근종 등을 이유로 수술을 받은 환자를 대상으로 하였다. 환자를 이들은 24~42세 사이였으며 정상월경 주기를 가진 환자로 월경중인 환자나 수술 전 호르몬제 치료를 받은 환자는 제외하였다.

2. 조직 채취 및 RNA 추출

자궁 내막조직은 수술실에서 얻어지자마자 일부는 진단 및 자궁내막의 dating을 위하여 고정하였고 Noyes criteria에 따라 난포기와 황체기로 나누었다 (Noyes et al., 1950). 나머지 부분은 혈액제거를 위하여 Phosphate buffered saline (이하 PBS)으로 세척한 후 조직 100mg당 1ml의 RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX)을 넣은 후 균질화 하였다. RNA-STAT-60 1ml 당 500 μ l의 chloroform을 넣고 원심 분리 후 상층액을 isopropanol 500 μ l에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기 중에서 말려 diethylpyocarbonate (DEPC)로 처리한 물에 녹였다. RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기로 측정하였다.

3. 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오타이드 시발체(Oligonucleotide Primer)의 설계

PTN과 MK의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Center for Biotechnology Information의 Gene Bank Database에서 얻은 후 OLIGO 5.0 Primer Analysis Software (National Bioscience, Plymouth, MN)를 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체(Oligonucleotide Primer)를 고안하였다. 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 1과 같다.

4. 역 전사 (Reverse Transcription)

역 전사 중합효소 연쇄 반응에는 Gen Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA)를 사용하였다. 5mmol/L MgCl₂, IX PCR buffer II, dNTP 1mmol/L, 2.5 μ l/L Oligo deoxythymidine, 20IU ribonuclease inhibitor, 50IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (이상 Perkin Elmer)를 포함한 역 전사용 혼합물 19 μ l에 1 μ l당 1 μ g이 되게 희석한 RNA 1 μ l를 넣은 후 역 전사하였다. 역 전사는 Perkin-Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600을 이용하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분 반응시켜서 4°C로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였다. 음성대조는 RNA 1 μ l 대신 DEPC로 처리한 물 1 μ l를 넣고 역 전사하였다.

5. PTN과 MK-3 Competitive와 Target cDNA 의 합성

자궁내막조직에서 추출한 RNA로부터 역 전사 후 정상 3', 5' 시발체를 넣고 중합효소 연쇄반응을 통하여 367bp의 PTN과 316 bp의 MK target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동 시키고 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출하였다. Competitive cDNA를 만들기 위하여 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 cDNA를 추출하였다. 이렇게 만들어진 competitive cDNA는 PTN의 경우 127bp가 잘

Table 1. The Sequences of MK Oligonucleotide Primer

mRNA		5end to 3-end	Size(bp)	Position on mRNA
MDK	Upstream	GCG GCG TGG TCC GCG	316	179-197
	Downstream	TCT GAC ACC AGG GGC TCC		
	Competitor	TGT GAC ACC AGG GGC TOC GGT GCC TTG GOG GAC	182	478-495, 329-343
PTN	Upstream	AAT GCA GGC TCA ACA GTA	367	1541-1558
	Downstream	CAG ACT TCC AGT TCT GGT		
	Competitor	CAG ACT TCC AGT TCT GGT GCT CCA GTC OGA GTG	240	1889-1907,1748-1762

려져 나가서 240bp의 크기가 되었고 MK의 경우 134 bp가 잘려져 나가서 182 bp의 크기가 되었다.

6. Standard Curve 작성과 Qunatitative Competitive PCR

PTN과 MK의 standard curve는 일정한 양의 competitive cDNA (PTN은 1 at mol, MK는 50 at mol)와 점차 감소시킨 양의 target cDNA (PTN은 46.875 at mol~0.97656 at mol, MK는 4000 at mol~7.8125 at mol)를 동시에 증폭하여 만든다. standard curve는 1.9mM MgCl₂, 10X PCR buffer II, 0.2mM dNTP, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 40μl와 competitive와 target cDNA를 혼합한 용액 60μl를 넣었고, 역 전사된 sample에 1.9mM MgCl₂, 10X PCR buffer II, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 80μl를 넣은 후 Perkin Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600으로 95°C 5분간 모든 단백질을 denaturation 시켜서 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 30주기 반응시키고 72°C 7분 elongation 시킨 후 4°C로 냉각시켰다. Ethidium Bromide(ETB)로 염색한 1% agarose gel에 standard curve 및 sample PCR 산물 25μl씩을 100 bp의 DNA ladder와 함께 전기영동시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 UV 농도계로 gel blot을 분석하였다. standard curve에 사용한 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/ competitive cDNA의 gel blot 농도의 비를 log로 전환하여 standard curve를 얻었다. 이 standard curve는 반복해서 얻어졌으며 y=b+mx로 표현될 수 있어서 이로부터 농도를 알 수 없는 sample의 cDNA양을 계산해 내었다. 각 환자에서 얻어진 두개 이상의 RT sample을 QC PCR 하였는데 두개의 오차는 ±5% 미만이었다.

7. 통계분석

통계분석은 SPSS 9.0을 이용하여 ANOVA (Post Hoc) test하였고, p값이 <0.05인 경우를 통계적으로 유의하다고 보았다.

결 과

1. 자궁내막증 환자와 대조군의 월경주기에 따른 자궁내막에서의 PTN mRNA의 정량 분석

Quantitative competitive PCR을 한 결과 모든 자궁내막 표본에서 target과 competitive 두개의 band가 보여서 (Fig. 1A) standard curve를 이용하여 연구군의 mRNA량을 정량한 결과 난포기와 황체기 간의 mRNA 발현의 차이는 없었다. 황체기 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 대조군의 자궁내막보다

PTN mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 높았다(Fig. 2A).

2. 자궁내막증환자와 대조군의 월경주기에 따른 자궁내막에서의 MK mRNA의 정량 분석

Quantitative competitive PCR을 한 결과 모든 자궁내막 표본에서 target과 competitive 두개의 band가 보여서 (Fig. 1B) standard curve를 이용하여 연구군의 mRNA량을 정량한 결과 정상인의 자궁내막에서 난포기에 MK mRNA 발현이 황체기에 비하여 유의하게 높았다. 자궁내막증 환자의 황체기 자궁내막에서 대조군의 황체기 자궁내막보다 MK mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 높았다(Fig. 2B).

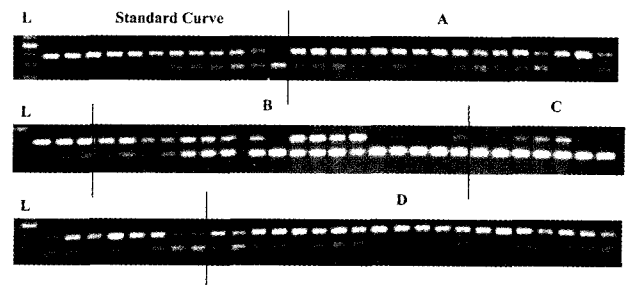


Fig. 1A. QC PCR of PTN in total endometrium throughout the menstrual phase L: 100bp ladder DNA Lane A: Follicular phase endometrium from normal patients. Lane B: Follicular phase endometrium from endometriosis patients. Lane C: Luteal phase endometrium from normal patients. Lane D: Luteal phase endometrium from endometriosis patients.

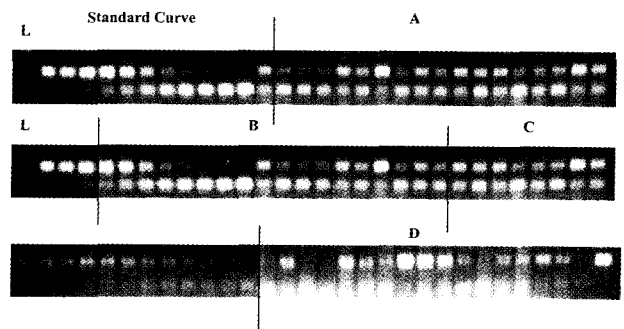


Fig. 1B. QC PCR of MK in total endometrium throughout the menstrual phase L: 100bp ladder DNA Lane A: Follicular phase endometrium from normal patients. Lane B: Follicular phase endometrium from endometriosis patients. Lane C: Luteal phase endometrium from normal patients. Lane D: Luteal phase endometrium from endometriosis patients.

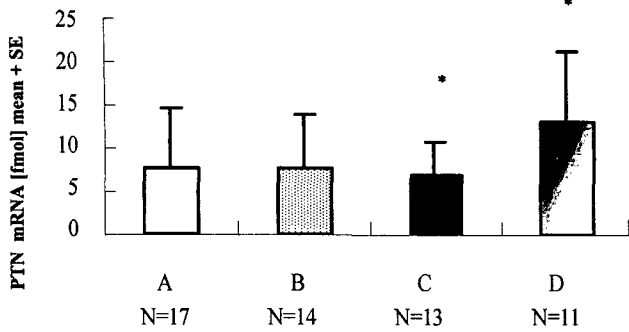


Fig. 2A. QC PCR of PTN in total endometrium throughout the menstrual phase L: 100bp ladder DNA Lane A: Follicular phase endometrium from normal patients. Lane B: Follicular phase endometrium from endometriosis patients. Lane C: Luteal phase endometrium from normal patients. Lane D: Luteal phase endometrium from endometriosis patients. Quantitative PTN levels from all patients were correlated and analyzed. * p<0.05.

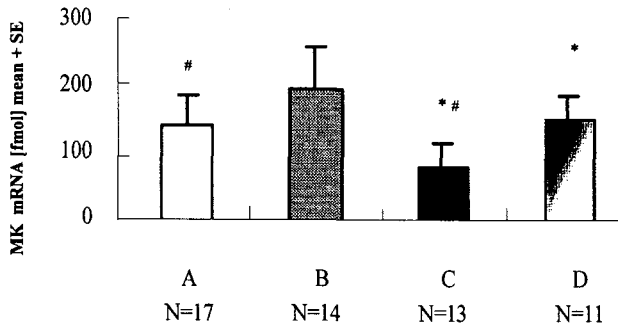


Fig. 2B. QC PCR of MK in total endometrium throughout the menstrual phase L: 100bp ladder DNA Lane A: Follicular phase endometrium from normal patients. Lane B: Follicular phase endometrium from endometriosis patients. Lane C: Luteal phase endometrium from normal patients. Lane D: Luteal phase endometrium from endometriosis patients. Quantitative MK levels from all patients were correlated and analyzed. #:p<0.05.

고 찰

자궁내막증은 자궁내막 조직이 자궁 외에 위치하는 것을 말하며 가임기 여성의 10%, 불임여성의 50%에서 발견되는 비교적 흔한 질환이다. 자궁내막증이 생기는 기전에 대하여서는 아직 논란의 여지가 많으나 월경 동안 나팔관을 통하여 복강 내로 역류된 월경혈이 착상되고 침습되어 발생한다는 retrograde menstruation 이론이 가장 유력하다. 그러나 월경혈의 역류는 월경을 하는 많은 여성에서 발견되나 이들에서 모두 자궁내막증이 발생하는 것이 아니므로 역류된 월경혈이

조직이 쉽게 성장하고 침습하도록 하는 특성이 있던지 그 양이 많은 경우에 자궁내막증이 생길 것이라는 이론이 소개되었다 (Gaetje et al., 1995).

PTN과 MK는 헤파린에 결합하는 성장 및 분화에 관여하는 것으로서 맥관 형성 및 종양 성장요소로 알려져 있다. MK는 retinoic acid에 반응하는 유전자로 clone 되었으며 Wilms tumor의 autocrine 성장 요소이며 신경모세포종과 방광암의 불량한 예후와 관련이 있으며 그 외의 여러 가지 암에서 발견된다 (Nakagawara et al., 1995; O'Brien et al., 1996). MK발현은 양성 난소종양에 비해 난소암에서 증가되며 난소암의 기질세포에서 과발현되는데 반해 정상 난소의 기질세포에서는 약하게 발현되므로 난소암의 암화 과정에 MK의 과발현 (overexpression)이 관계된다고 보고되었다 (Nakanishi et al., 1997). 전립선암에서도 정상 전립선에 비해 강하게 발현되며 전립선 전암단계에서 부터 발현되며 (Konishi et al., 1995) 대장 항문암의 초기 암화에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있어 (Ye et al., 1999) 이 유전자의 증가가 암 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 일반적으로 일차 암보다 전이 암에서 더 강하게 MK가 발현되는 것은 분화되지 않은 암세포에 MK 발현이 증가되기 때문이다. MK는 *in vitro*상에서 유사 분열, 맥관형성, 변형에 관여하는 oncogenic한 성장인자의 하나로 antisense MK RNA는 교아종(glioblastoma) 세포주의 성장을 억제하며 MK 항체치리에 의해 Wilms tumor 배양이 부분적으로 억제되었다 (Tsutsui et al., 1993).

최근에 MK와 염기 서열이 50%가 동일한 pleiotropin(PTN)이 발견되었다. PTN은 MK와 염기서열이 비슷하지만 17~18kDa 자궁과 뇌조직에서 생기는 다른 heparin 결합 단백질로써 MK와 기능이 동일하지는 않다고 한다. PTN은 많은 일차 암에서 발현되는 강력한 protooncogen으로 알려져 있으며 (Zhang et al., 1997) 소화기계 암환자의 혈청에서 높게 나타나서 암의 추적 관찰이나 치료에 이용될 수 있을 것이라는 보고가 있다 (Souttou et al., 1998). 또한 MK와는 달리 정상 유방조직에서도 발현되며 유방암 조직에서는 MK와 동시에 발견된다 (Garver et al., 1994). 정상 폐 조직에서는 PTN만 발현되며 폐암 조직에서는 MK만 발현된다. 모든 신경모 세포종 세포주에서는 MK가 발현되나 PTN은 예후가 좋은 신경모세포종에서만 관찰되며 (Nakagawara et al., 1995) 대장 항문암의 경우 MK는 암 조직에서 높게 발현되나 PTN은 오히려 낮게 발현되며 (Yamakawa et al., 1999) 흑색종의 전이에 rate-limiting factor로 보고되어 (Czubayko et al., 1996) heparin 결합 성장/분화인자간의 발현에 차이가 있음이 보고되었다 (Li et al., 1990). 이 두 관련 유전자는 양성과 악성조직에 다

르게 발현되어 기능이 다른 것으로 생각되기 때문에 이런 유전자의 발현 차이를 연구하는 것은 암세포의 침윤 및 전이의 기전을 이해하는데 중요하다고 하겠다.

맥관 형성은 암의 중요한 예후 인자이며 자궁내막증의 발생과도 관계가 있는데 맥관 형성에 관여하는 polypeptide들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있다. 유방암에서 VEGF, acidic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta와 platelet derived endothelial cell growth factor의 발현이 상호 관련성이 있는 것으로 되어 있는데 이들의 공통된 억제제인 heparin에 결합기능을 억제하는 제제가 맥관형성을 억제하여 암치료를 향후 적용될 새로운 약재로 연구되고 있다 (Relf et al., 1997). 따라서 자궁내막증의 병인에 있어서 맥관형성의 역할과 맥관형성에 관여하는 polypeptide의 역할을 규명한 후 이러한 치료제를 현재 사용하고 있는 치료제와 병용하면 더욱 효과적인 치료가 될 것으로 생각된다.

증합요소 연쇄반응(PCR)은 그 민감도가 매우 높은 실험 방법으로 적은 양의 mRNA 역전사하여 cDNA로 만든 후 증폭하여 발현 여부를 알 수 있다 (Chelly et al., 1989). 그러나 PCR은 증폭하는 매 주기마다 PCR 산물이 기하 급수적으로 늘어나기 때문에 증폭의 효율에 영향을 미칠 수 있는 미세한 차이도 최종 결과에 매우 큰 영향을 미칠 수 있어 정량 분석으로서는 그 신뢰도가 떨어진다. RNA의 정량 분석에는 Northern blot이 널리 알려져 있으나 이를 위해서는 total RNA 10 µg 이상이 필요하므로 검체의 RNA량이 적을 때는 이 방법을 사용할 수가 없으므로 betaactin등의 reporter gene을 이용한 semiquantitation한 분석이 보고된 바 있다 (Frye et al., 1989). 그러나 이들 방법은 ratio 등으로 얻은 semiquantitation이라는 제한점이 있어 최근 target cDNA에서 일정부위를 삭제하여 만든 내부 표준물질을 넣고 시료와 동시에 PCR을 하면 실험간의 variation없이 시료의 m-RNA량을 정량 분석하는 것이 소개되어(Uberla et al 1991; Huang et al., 1998) 조직내의 미세한 양의 mRNA량을 연구하는데 적합하다고 생각되어 본 연구에서 월경 주기별 PTN과 MK의 발현 정도를 비교하기 위하여 자궁내막을 역전사한 후 QC PCR 방법을 이용하였다.

자궁내막증의 원인이 되는 조직이 자궁내막이라면 자궁내막증이 있는 여성의 자궁내막은 정상인의 자궁내막에 비하여 다른 생물학적인 특징을 가질 가능성이 있는데 이에 대하여 본 저자는 urokinase plasminogen activator system과 matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase -3의 발현이 자궁내막증이 있는 여성에서 더 높은 proteolytic activity를 보인다고 보고한 바 있다 (Chung et al., 1999a;

Chung et al., 1999b; Chung, 1999). 한편 MK와 PTN이 자궁내막증의 병인과 연관되어 있다는 연구 보고가 아직 없으나 자궁내막증 발생에 VEGF 같은 맥관 형성인자가 관계된다는 보고가 있어 자궁내막증에서 염기서열이 비슷하면서 성장 및 맥관 형성에 관여하는 PTN과 MK의 발현을 연구하였다. 그 결과 자궁내막증 환자의 황체기 자궁내막에서 MK와 PTN이 정상인에서 보다 높게 발현되어 이러한 발현의 증가로 인하여 자궁내막증 환자의 자궁내막이 복강 내에서 더욱 쉽게 맥관형성을 하고 성장이 촉진되어 자궁내막증이 더욱 쉽게 발생할 것으로 생각되어 PTN과 MK가 자궁내막증의 초기 발생과정에 관여할 가능성이 있다. 또한 MK와 PTN의 발현과 VEGF와의 연관성을 연구하면 자궁내막증 발생에 있어서 angiogenesis에 의한 pathogenesis 연구에 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 정상 대조군의 자궁내막에서 난포기에 MK의 발현이 황체기에 비하여 높은 것으로 나타나 자궁내막이 활발히 증식하는데 있어서 MK가 성장인자로 작용할 것으로 생각되나 이에 대하여서는 월경 주기를 세분화하여 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Ariodome K, Tsutsui J, Takao S, Kadomatsu K, Ozawa M, Aikou T, et al. (1995) Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancer. *Jpn J Cancer Res* 86: 655-661.
- Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. (1989) Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2617-2621.
- Chung HW, Wen Y, Nehzat C, Woo BH, Polan ML (1999) Endometrium from Women with Endometriosis Expresses Decreased Levels of Plasminogen Activator Inhibitor 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Compared to Normal Endometrium. Society of Gynecology Investigation, Atlanta, USA, 10-13 Mar, pp. 220.
- Chung HW, Wen Y, BH, Polan ML, K Smith K, Li H, Yu HK, ML Polan (1999) Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor mRNA Expression in Ectopic and Eutopic Endometrium. ASRM/CFAS Conjoint Annual Meeting, Toronto, Canada, 25-30 Sep, 1999, pp. S81.
- Chung HW (1999) Endometrium from Women with Endometriosis Expresses Decreased Levels of Plasminogen

- Activator Inhibitor-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 compared to Normal Endometrium. *Dev Reprod* 3: 29-38.
- Courty J, Dauchel MC, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D (1991) Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 145-151.
- Czubayko F, Schulte AM, Missner SC, Hsieh SS, Colley KJ, Anton VD (1995) Molecular and pharmacologic targeting of angiogenesis factors-the example of pleiotrophin. *Breast Cancer Res and Treat* 36: 157-168.
- Czubayko F, Schulte AM, Berchem GJ, Wellstein A (1996) Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14753-14758.
- Delbe J, Vacherot F, Laaroubi K, Barritault D, Courty J (1995) Effect of heparin on bovine epithelial lens cell proliferation induced by heparin affinity regulatory peptide. *J Cell Physiol* 164: 47-54.
- Fang W, Hartmann N, Chow DT, Riegel AT, Wellstein A (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* 267: 25889-25897.
- Frye RA, Benz CC, Liu E. (1989) Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 4: 1153-1157.
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A (1995) Invasiveness of endometriotic cells *in vitro*. *Lancet* 150: 1463-1464.
- Garver R Jr, Chan CS, Milner PG. (1993) Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 463-466.
- Garver R Jr, Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG.(1994) Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* 74: 1584-1590.
- Heldin CH, Westermark B. (1989) Growth factors as transforming proteins. *Eur J Biochem* 184: 487-496.
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML.(1998) Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1721-1729.
- Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. (1988) cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1312-1328.
- Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan Q-W, Muramatsu H, Muramatsu T. 1997) Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer* 75: 354-359.
- Konishi N, Hiasa Y, Hayashi I, Matsuda H, Tsuzuki T, tao M, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J. (1995) p53 mutations occur in clinical, but not latent, human prostate carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 86: 57-63.
- Laaroubi K, Delbe J, Vacherot F, Desgranges P, Tardieu M, Jaye M, Barritault D, Courty J (1994) Mitogenic and *in vitro* angiogenic activity of human recombinant heparin affinity regulatory peptide. *Growth Factors* 10(2): 89-98.
- Li YS, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM, Kodner CM, Milbrandt J, Deuel T. (1990) Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 250: 1690-1694.
- McLaren J (2000) Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis *Hum Reprod Update* 6: 45-55.
- Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, et al. (1995) Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 55: 1792-1797.
- Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Tomoda Y, Muramatsu T.(1997) Expression of Midkine and Pleiotropin in Ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 90: 285-290.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1: 3-25.
- O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL (1996) The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and over-expression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 56: 2515-2518.
- Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H (1994) Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem* 269: 1299-3004.

- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57: 963-969.
- Sampson JA (1927) Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14: 422-469.
- Souttou B, Juhl H, Hackenbruck J, Rockseisen M, Klomp HJ, Raulais D, Vigny M, Wellstein A (1998) Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors. *J Natl Cancer Inst* 90: 1468-1473.
- Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, et al. (1993) A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: Increased midkine expression Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53: 1281-1285.
- Tsutsui K, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, Shimazu H, Ohi Y, Muramatsu T. (1993) A new family of heparin binding growth/differentiation factors. Increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53: 1281-1285.
- Uberla K, Platzer C, Diamantstein T, Blankenstein T (1991) Generation of competitor DNA fragments for quantitative PCR. *PCR Methods Appl* 1: 136-139.
- Yamakawa T, Kurosawa N, Kadomatsu K, Matsui T, Itoh K, Maeda N, Noda M, Muramatsu T (1999) Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase zeta are decreased in human colorectal cancers. *Cancer Lett* 135: 91-96.
- Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasai Y, Matsuyama M, Muramatsu T, Kadomatsu K (1999) Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 79: 179-184.
- Zhang L, Rees MC, Bicknell R (1995) The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J Cell Sci* 108: 323-331.
- Zhang N, Zhong R, Wang ZY, Deuel TF (1997) Human breast cancer growth inhibited *in vivo* by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J Biol Chem* 272: 16733-16736.