J. Exp. Biomed. Sci. 10 (2004) 479-483

Induction of FSTL1 Gene in Rat Myometrium by Exogenous Estrogen

Yoon-Sik Kim†, Yeon Kim[1] and Hyung-Joon Bae[2]

Department of Cytogenetics & In Vitro Fertilization Division, Kwangju Christian Hospital, Gwangju 503-715, Korea, [1]Department of Laboratory Medicine, Kwangju Christian Hospital, Gwangju 503-715, Korea, [2]Department of Clinical Laboratory Science Seoul Health College, Seongnam 461-713, Korea

The aim of this study was carried to the induction of follistatin-like 1 (FSTL1) in rat myometrium tissue by exogenous estrogen. PCR was performed by using estrogen treatment after ovariectomy of myometrium mRNA and only ovariectomy of myometrium mRNA and on ovariectomy of myometrium mRNA in rat normal uterus tissue. The PCR products were visualized on agarose gel (1.2%) electrophoresis. FSTL1 mRNA expression level was significantly higher (**P<0.001 or *P<0.05) in estrogen treatment after ovariectomy than in only ovariectomy, and was significantly higher (**P<0.001) in no ovariectomy than in estrogen with treatment after ovariectomy. In conclusion, Although the mechanisms of FSTL1 gene were uncertain, It also might be inducted by exogenous estrogen. And also it is thought to be related to the estorgen mechanism.

Key Words: Follistatin-like 1 (FSTL1), Exogenous estrogen, Myometrium

서 론

자궁근종 (uterine myoma)은 자궁평활근층내에 존재하는 양성종양으로 30~45세의 여성에서 호발하는 질환이지만, 지금까지는 자궁적출술 (hysterectomy)이라는 방법으로 치료해 오고 있으나 단순자궁적출만으로도 여성으로서 건강한 느낌의 장애 (여성상실감, 우울증)가 나타난다 (Jo et al., 2001). 또한 자궁근종은 조기폐경증상을 유발하는데 이는 자궁적출시 초래되는 자궁부속기의 양측난관절제 등으로 인한 난소의 혈류에 장애가 유발되어 난소의 기능저하로 인해 나타난다 (Mosselman et al., 1996; Culter et al., 1998). 자궁근종은 자궁적출술 이외에 다른 확실한 치료법이 없는 이유는 자궁근종의 발생과 성장기전에 대하여 아직 명확히 규명되어 있지 않고 있기 때문이다. 다만 이전의 연구자들의 결과를 보면 내인성 에스트로겐의 자극이 자궁근종 성장인자로 여겨져 왔으며 (Lumsde et al., 1987; Rein et al., 1990) 최근에 자궁근종의 성장인자나 억제인자를 규명하기 위한 많은 연구자들의 노력이 이어지고 있다 (Mosselman et al., 1996). 저자들은 Kim 등 (2004)이 자궁근종억제인자로 발표한 follistatin-like 1 (FSTL1)이 외인성 에스트로겐에 의해 발현이 유도되는지 알아보기 위한 연구를 실험용 쥐 (rat)의 정상자궁근조직을 이용하여 연구하였다.

*논 문 접 수: 2004년 8월 11일
수정재접수: 2004년 10월 26일
†교신저자: 김윤식, (우) 503-715 광주광역시 남구 양림동 264, 광주기독병원 시험관아기실 및 세포유전학실
Tel: 062-650-5126, Fax: 062-650-5000
e-mail: kys2982@hanmail.net

재료 및 방법

1. 실험동물

한국화학연구소 실험실에서 구입한 *sprague-dawely* (specific pathogenic free female) rat을 실험에 사용하였다. 생후 6~8주의 약 100±20 g무게의 쥐 6마리를 전신흡입마취제 (Enflurane; 중외제약)를 거즈에 묻혀 비강을 통한 흡입마취를 실시한 후 Fig. 1과 같이 등쪽 부위를 통한 난소제거수술을 실시한 후 48시간 후부터 24시간 간격으로 3마리 쥐에는 estradiol benzoate (에스트; 삼일제약) 1 μg/g을 근육주사 하였으며, 난소가 제거된 나머지 3마리 쥐에는 아무 것도 주사하지 않았다. 대조군으로 이용한 3마리는 난소제거 수술을 실시하지 않았으며, 아무런 약제도 투여하지 않았다. 난소제거 후 사육기간 및 약제 주사기간은 10일간 실시하였다. 사료와 물은 자유롭게 먹게 하였으며, 사육실의 온도는 21~24℃, 상대습도는 40~60%로 유지했다. 또한 사육실의 밤과 낮이 12시간마다 반복되도록 조절하였다.

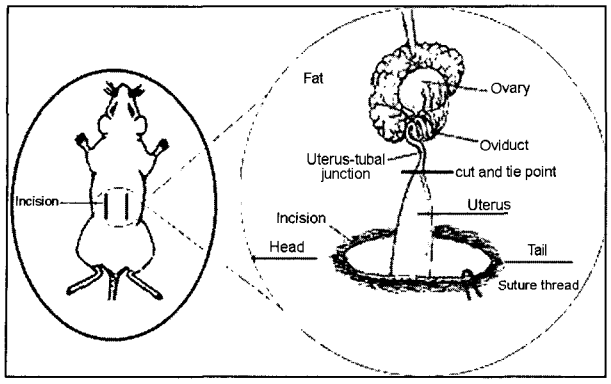

Fig. 1. The rat of both ovariectomy on inhalation anaesthesia.

Table 1. The oligonucleotide primers used in this study

Primers	Product size (bp)
FSTL1 (rat)	
F 5'-AAGAAGTCTGCGAGTCCATC-3'	381
R 5'-TTGAAGGATGGGTTGAGGGA-3'	
β-Actin (rat)	
F 5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'	155
R 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'	

*β-actin (Rat) were used for normalization of the amounts of RNA preset in a range of sample. F: forward primer, R: reverse primer

2. 검체 채취

실험재료의 검체 채취는 디자인되어 사육된 쥐를 경추탈골법에 의해 처리하였으며, 혈액 채취는 경추탈골 후 바로 심장에 주사기를 삽입하고 total estrogen 측정을 위해 혈액 1.5~2.5 ml을 채취하고 혈청분리한 후 검사하였다. 자궁의 적출은 복부절개법을 이용하여 자궁전체를 적출하여 액체질소 (liquid nitrogen)를 이용하여 급속냉동 시킨 후 실험에 사용 직전까지 -70℃에서 보관 후 사용하였다.

3. RNA의 분리

-70℃에 보관되었던 쥐의 자궁근조직에서 total RNA의 분리는 Chomezynski와 Sacchi (1987)의 변형방법으로 Trizol (Life Technologies, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA 중 2 μl을 취해서 자외선 분광광도계 (UV spectrophotometer)의 260 nm 파장에서 흡광도를 구하고 RNA 농도를 측정한 다음 total RNA 2 μg을 1.2% 한천 겔 전기영동 (1.2% agarose electrophoresis)에서 28S rRNA, 18S rRNA의 띠가 뚜렷하였던 표본만을 -20℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

4. Estrogen측정

실험동물로 디자인되어 사육된 쥐의 혈액은 혈청을 분리하여 radioimmunoassay (RIA)를 이용한 경쟁반응법으로 측정하였다.

5. Reverse transcription

쥐의 자궁근조직에서 추출한 total RNA을 각각 2 μg씩 cDNA합성의 주형으로 사용하여 역전사 반응용액 (2 mM dNTPs, 15 units RNase inhibitor, 1 μg of oligo dT, 200 units of M-MLTV reverse transcriptase, Bioneer Co., Korea)을 DEPC용액과 혼합하여 총량을 20 μl로 만든 다음 Polymerase Chain Reaction (PCR, Perkin-Elmer, USA)에서 72℃에서 5분, 42℃에서 90분, 95℃에서 2분간 반응시킨 후 RNase (10 mg/μl)를 1 μl 첨가한 후 37℃에서 45분간 처리하여 cDNA를 합성하였다.

6. PCR을 이용한 cDNA 증폭

쥐의 follistatin-like1 (FSTL1) cDNA증폭을 위한 primer는 Table 1과 같이 377번째와 757번째 사이의 381 bp (Strausberg et al., 2002), β-actin은 876번째와 1030번째 사이의 155 bp (Nude et al., 1983)을 증폭시켰다. 각각 10 pmole의 전방 시발체 (forward primer)와 역시발체 (reverse primer), Taq DNA polymerase 1.25 unit, dNTP 0.2 mM, 10 X PCR buffer 2 μl (Bioneer Co., Korea), cDNA 2 μg을 섞은 후 증류수로 총량을 20 μl로 조절하였으며, PCR은 94℃ 5분간 반응 후 94℃에서 1분 변성 (denaturation), 54℃에서 1분 서냉복원 (annealing), 72℃에서 1분 동안 신장 (extension)을 25회 실시한 후 마지막으로 72℃ 5분간 반응시켰다. β-actin은 94℃에서 1분 변성, 56℃에서 1분 서냉복원, 72℃에서 1분 동안 신장을 25회 실시한 후 마지막으로 72℃ 5분간 반응시켰다.

7. 전기영동 및 통계분석

각각의 PCR 산물들은 PCR 산물 15 μl과 6×loading buffer 2 μl을 혼합하여 1.2% 한천 겔에 100 V로 전기영동을 시행하였으며, 전기영동 후 겔은 1 μg/ml EtBr (ethidium bromide, Sigma) 용액에 염색하고 UV-transilluminator하에서 증폭산물을 확인하였다. 증폭산물은 digital camera로 촬영한 후 영상처리하였으며, 사진상의 농도 측정은 imageMasterR VDS software (Pharmacia Biotechnol.)를 사용하여 3회 반복하여 측정하였다. 통계처리 방식은 각각 서로를 비교군으로 하여 sample 중 가장 발현비가 높은 증폭산물을 100%로 하였으며, β-actin을 이용하여 보정하였다. 유의 값의 판정은 실험군과 대조군 각각을 서로 비교군으로 하여 paired *t* test를 이용하였으며, p값이 0.05 이하일 때를 유의 값으로 하였다.

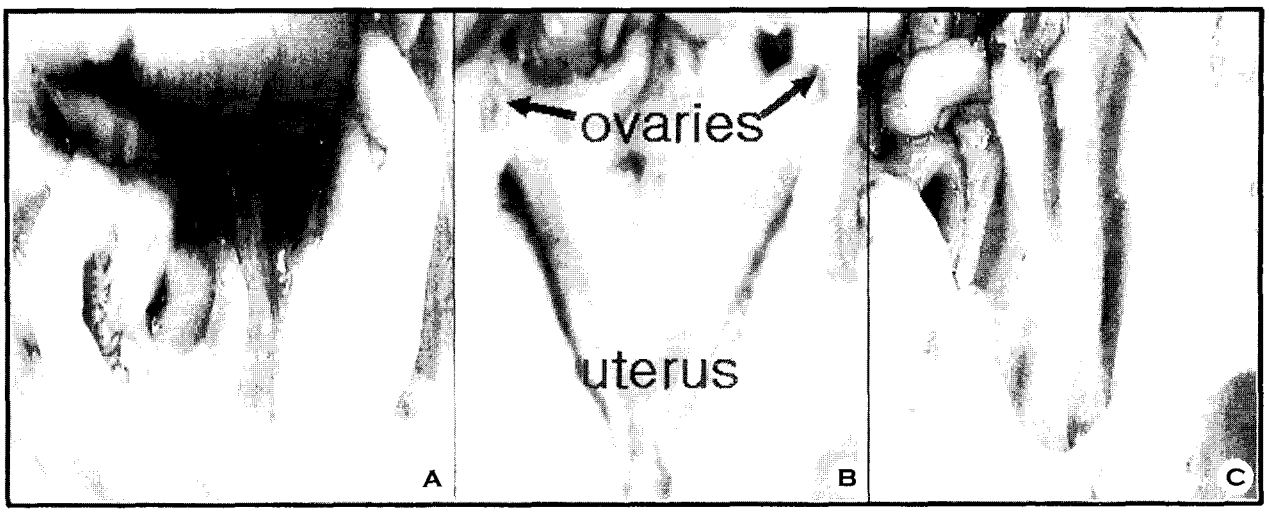

Fig. 2. Rat uterus. **A.** Uteotrophic effect of uterus in rat with estrogen treated after both sides ovariectomy. **B.** Normal uterus in rat. **C.** Atrophic uterus of both sides ovariectomized.

Table 2. Total estrogen of serum in rat measured by Radioimmunoassay

Treatment	Total estrogen
Rat (intact ovary)	120±50 pg/ml
Rat (remove ovary)	50±20 pg/ml
Rat (remove ovary + Estradiol benzoate 1 μg/g)	800±200 pg/ml

결 과

1. 혈중 에스트로겐 투여에 따른 자궁반응양상

전처리가 없었던 정상 쥐를 대조군으로 하여 자궁의 변화를 관찰한 결과 단지 양측난소를 제거한 실험 그룹의 자궁은 위축되었고, 양측난소를 제거하고 에스트로겐을 투여한 쥐에게서는 자궁의 비대효과 (uteotrophic effect)가 있음을 관찰하였으며, 결과적으로 에스트로겐이 자궁의 위축과 자궁의 비대를 가져다 주는 호르몬임을 증명할 수 있었다 (Fig. 2).

2. Estrogen 측정 결과

측정 결과 양측난소를 제거하고 에스트로겐 (에스트; estradiol benzoate, 삼일제약)을 투여한 쥐에서 총 estrogen은 정상 쥐보다는 6.7배, 난소만을 제거한 쥐보다는 16배 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 (P<0.001) (Table 2).

3. 쥐에서 FSTL1의 발현양상

에스트로겐에 의해 FSTL1 유전자가 정상자궁조직에서 유도되는지를 치료군과 비치료군에서 PCR 산물에 의한 FSTL1 유전자 발현양을 비교·분석한 결과 Fig. 3과 같이 estrogen

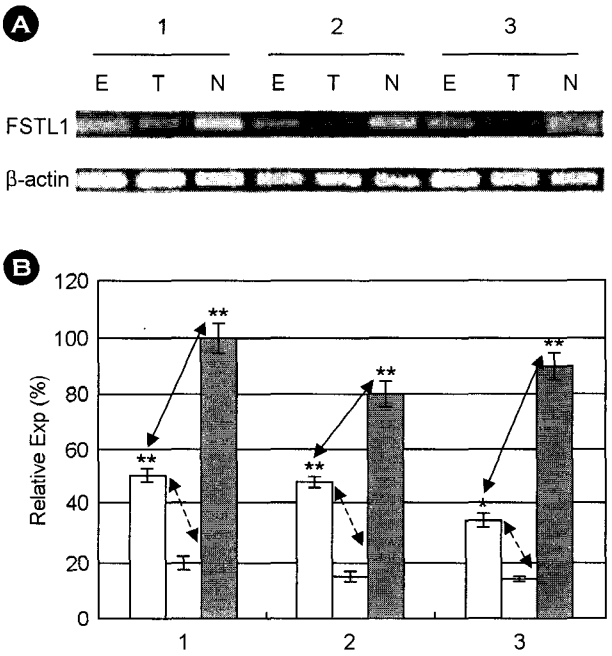

Fig. 3. Expression pattern of FSTL1 mRNA in uterus of rats. Estrogen treatment after ovariectomy (E), only ovariectomy (T), No ovariectomy treated (N). FSTL1 mRNA expression level was significantly higher (**P<0.001 or *P<0.05) in estrogen treatment after ovariectomy than in only ovariectomy, and was significantly higher (**P<0.001) in no ovariectomy than in estrogen with treatment after ovariectomy. Set of three were classified according to like age. The PCR products were visualized on agarose gel (1.2%) electrophoresis (**A**). The relative % of the level of FSTL1 mRNA were expressed in panel **B**. Each bar shows the mean ± SD of triplicate experiments. Empty bar indicates the estrogen treatment after ovariectomy normal myometrium mRNA and gray bar indicates the only ovariectomy of normal myometrium mRNA, and filled bar indicates the no ovariectomy of normal myometrium mRNA. It was analyzed with the image Master VDS software and statistical significance was defined as *P<0.05 or **P<0.001 by paired t test.

치료군에서 1.9~2.7배로 유의하게 높게 발현되었다 (*P<0.05 or **P<0.001). 전처리가 없었던 정상 쥐와 난소제거 하고 에스트로겐을 투여한 쥐에서 FSTL1의 발현양을 비교 분석해 본 결과 정상 쥐에서 1.7~2.4배로 유의하게 높게 발현되었다 (**P<0.001).

고 찰

자궁근종의 발생과 성장기전에 대하여 아직 명확히 규명되지 않았고, 다만 이전의 연구자들의 결과들을 보면 내인성 에스트로겐 (estrogen)의 자극이 자궁근종의 성장인자로 여겨져 왔었다 (Lemsde et al., 1987; Rein et al., 1990; Ross et al., 1986). 이후 Kim 등 (1997), Kim 등 (1998; 1999)은 자궁근종조직과 정상자궁근조직사이에 있어서 에스트로겐 유전인자의 발현양이 차이가 없는 것으로 밝혀냄으로써 새로운 유전인자가 자궁근종의 발생과 성장인자일 가능성과 에스트로겐이 다른 유전물질을 매개체로 해서 자궁근종에 영향을 미치는 것으로 보고 새로운 유전인자를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Lim et al., 2002). 최근 Kim 등 (1997)은 자궁근종과 정상자궁근조직사에서 발현양의 차이를 보이는 FSTL1 유전자를 클로닝해 내고 발현양상을 비교해 본 결과 정상자궁근조직에서 자궁근종조직보다 높게 발현됨 등을 통해 자궁근종억제인자임을 증명하였으며, 또한 FSTL1 유전자는 에스트로겐과의 연관성을 가진 유전자라고 보고하였다. 지금까지 밝혀진 FSTL1은 처음 Zwijsen 등 (1994)이 rat C6 glioma (신경교종) 세포에서 full-length follistatin-like cDNA을 분리하였다. Kunhiro 등 (2000)은 인간과 생쥐 (mouse)에서 조직내 분포를 Northern blotting을 통해 placenta, heart, aorta, testis, adrenal gland, lung, ovary, liver 등에서 발현되고 있음을 증명하였다. 구조적으로는 activin과 결합하여 FSH (follicle stimulation hormone)의 분비를 억제시키는 follistatin (FS)의 3개의 domain 중 2개를 공유하고 있어 FS와 매우 유사하고, 308개의 아미노산 단백질로 구성되어 있으며, 20개의 아미노산 N-terminal signal peptide를 가지고, TGF (transforming growth factor)-β family에 속한다고 하였다 (Kunihiro et al., 2000; Phillips et al., 1998). 그러나 FSTL 유전자의 기능에 대한 연구는 밝혀진 것이 거의 없다. 다만 현재 밝혀진 것으로는 Alan 등 (2001)이 FSTL1 유전자가 과발현된 형질전환 생쥐에서 수정 (fertility)과 난포 (follicle) 발달이 중단 (interruption)됨을 보고한 바 있다. 또한 Wang 등 (2003)은 인간 자궁내막 기질세포의 배양에서 17β-estradiol과 progesterone을 함께 투여할 경우 FSTL1이 발현이 증가됨을 증명하였다. 이러한 FSTL1 유전자와 에스트로겐과의 연관성을 밝혀 보고자 본 저자들은 쥐 실험을 통해 에스트로겐이 FSTL1 유전자 발현을 유도할 수 있는 가를 증명하기 위한 실험에서 쥐의 난소를 제거하고 estrogen 투여군과 비투여군 비교에서 estrogen 투여군에서 FSTL1 유전자 발현이 유의하게 높은 것을 발견하였다. 또한 쥐에 estrogen을 투여한 군의 혈중 총 에스트로겐의 농도는 정상 쥐보다 높게 나타났으나, FSTL1 유전자 발현은 정상 쥐에서 유의하게 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 Rein 등 (1990)과 Ross 등 (1986)이 주장한 외인성보다 내인성 에스트로겐이 자궁근조직에 발현하는 유전자들을 더 발현시킬 수 있다는 결과와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

FSTL1 유전자의 기전이나 발현양상 등은 아직까지 구체적으로 밝혀지지는 않고 있다. 다만 Kim 등 (2004)이 보고한 바와 같이 정상자궁근조직이나 자궁근종조직에서 서로 다르게 발현됨을 밝혀 자궁근종의 성장과 어떠한 관련성이 있을 것으로 보고한 바 있는 FSTL1에 대한 연구와 자궁근종과 에스트로겐과 관련성 등에 있어서 많은 연구가 지속되어야 하겠지만 본 연구 결과를 정리해 보면 FSTL1 유전자는 외인성보다 내인성 에스트로겐에 의한 발현이 유의하게 높게 유도된 것으로 나타난 것으로 보아 FSTL1 유전자는 자궁근조직에서 에스트로겐의 기전에 의해 발현이 유도되는 유전자 중 하나일 것으로 사료된다.

REFERENCES

Alan S, Drew T, Yisrael S, Henry K, Toshiya M, William H. Follistatin-related protein (FSRP); a new member of the follistatin gene family. Mol Cell Endocrinol. 2001. 180: 33-38.

Chomezynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocynate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987. 162: 156-159.

Culter WB, Genovese SE. Wellness in women after 40 years of age; the role of sex hormones and pheromones. Dis Mon. 1998. 44: 421-446.

Jo HH, Yoo SW, Lee JE, Kwon DJ, Lew YO, Kim JH, Kim JH. Change of serum sex hormone levels in hysterectomized patients according to type of adnexal surgery. Kor J Obstet Gynecol. 2001. 44: 2283-2288.

Kim JK, Kim SH, Choi YM, Shin CJ, Moon SY, Chang YS, Lee JY. The Effects of 17β-estradiol on the Preduction of Insuline-like Growth Factor-Binding Proteins in Explans Cultured from Human Uterine Leiomyoma. Kor J Obstet Gynecol. 1996. 41: 1575-1565.

Kim JK, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Kang SB, Lee JY. Expression of insulin-like growth factor [IGF] -Ia, IGF-Ib, and IGF-II messenger ribonucleic acid in uterine leiomyoma. Kor J Obstet Gynecol. 1999. 42: 777-783.

Kim YS, Kim JS, Qian YR, Li MH, Kim JE, Chun YY, Kee KS, Cheon, HS, Kim SJ. Cloning and Expression Pattern of FSTL1 mRNA in Normal Myometrium and Uterine Leiomyoma. Kor J Obstet Gynecol. 2004. 47: 1086-1092.

Kunihiro T, Koji Y, Aari Y, Kuramoto NY, Hasegawa Y, Sugino H. Identification and Characterization of a Novel Follistatin-like Protein as a Binding Protein for the TGF-β Family. J Biol Chem. 2000. 275: 40788-40796.

Lim KS, Kim JG. Expression of estrogen receptor (ER)α, Erβ and insulin - like growth factor binding protein related peptide-1 messenger ribonucleic acid in Uterine leiomyoma and normal myometrium. Kor J Obstet Gynecol. 2000. 45: 391-397.

Lumsden MA, West CP, Gaird PT. Goserelin therapy before surgery for fibrosis. Lancet. 1987. 1: 36-37.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett. 1996. 392: 49-53.

Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D. The nucleotide sequence of he rat cytoplasmic beta-actin gene. Nucleic Acids Res. 1983. 11: 1759-1771.

Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. Frontiers in Neuroendocrinol. 1998. 19: 287-322.

Rein MS, Friendman AJ, Stuart JM, Maclaughlin DT. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin releasing hormone agonist leuprolide acetate. Fertil Steri. 1990. 53: 1018-1027.

Ross PK, Pike MC, Vessey MP, Bull D, Yeates D, Casagrande JT. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. Br Med J. 1986. 293: 359-363.

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Moore T, Max SI. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 99: 16899-16903.

Wang HQ, Takebyashi K, Tsuchida K, Nihimura M, Noda Y. Follistatin-Related gene (FLRG) Expression in Human Enometrium: Sex Steroid Hormones Regulate the Expression of FLRG in Cultured Human Endometrial Stromal Cells. J Clini Enocrinol Metab. 2003. 88: 4432-4439.

Zwijsen A, Blockx H, van Arhem W, Willems J, Fransen L, Devos K. Characterization of a rat C6 Glioma-secreted follistatin-related protein (FRP): Cloning and sequence of the human homologue. Eur J Biochem. 1994. 225: 937-946.