

TGF- β 1에 의하여 유도된 인간자궁내막의 탈락막화 (Decidualization)에 있어서 ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase)와 PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)의 역할

아주대학교 분자과학기술학과¹, 아주대학교 의과대학 산부인과학교실²

장혜진² · 이재훈^{1,2} · 김미란² · 황경주² · 박동욱¹ · 민철기¹

Role of ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) and PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma) on TGF- β 1 Induced Human Endometrial Stromal Cell Decidualization

Hye Jin Chang², Jae Hoon Lee^{1,2}, Mi Ran Kim², Kyung Joo Hwang², Dong Wook Park¹, Churl K. Min¹

¹Department Molecular Science and Technology, ²Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

Objective: To investigate the role of ERK and PPAR γ on the TGF- β 1 induced human endometrial stromal cell decidualization *in vitro*.

Method: Endometrial stromal cells are cultured under the following condition: DMEM/F12 (10% FBS, 1 nM E2 and 100 nM P4). TGF- β 1 (5 ng/ml), Rosiglitazone (50 nM), and PD98059 (20 μ M) were added according to experimental purposes. Trypan-Blue and hemacytometer were utilized to count cell number. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting were utilized to detect proteins.

Result: TGF- β 1 inhibited proliferation of cultured human endometrial stromal cells and induced expression of PGE2 and prolactin. This effect was mediated by Smad and ERK activation. Administration of rosiglitazone, PPAR γ agonist, prevented TGF- β 1 effect on cell proliferation. Furthermore, Rosiglitazone inhibited TGF- β 1 induced activation of ERK, consequently reduced PGE2 and prolactin production.

Conclusion: TGF- β 1 induced decidualization of endometrial stromal cell through Smad and ERK phosphorylation. PPAR γ acts as a negative regulator of human endometrial cell decidualization *in vitro*.

Key Words: Decidualization, TGF- β 1, PPAR γ , ERK, Smad

자궁내막은 난소 steroid hormone의 조절 하에서 생리주기를 통하여 생화학적, 형태학적 변화를 일으킨다. 이러한 변화는 난소에서 분비되는 스테로이드 호르몬과 이에 따른 성장인자, cytokines 및 chemokines 조절을 통하여 일어난다. 또한, 스테로이드 호르몬은 정상적인 자궁내막 활성화와 비정상적인 자궁

내막에 모두 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵ 자궁내막 기질세포의 탈락막화 (decidualization)란 자궁내막 분화 과정의 일환으로, 배아 착상과 임신 유지를 위해서 자궁내막 기질세포 (endometrial stromal cell; ESC)가 형태적 기능적으로 변화하는 과정을 의미한다. 이러한 자궁내막 기질세포의 탈락막

화는 생체 내 자궁내막 기질세포의 수많은 유전자 발현의 변화에 의해 일어난다.⁶ 현재까지 progesterone이 자궁내막 기질세포의 탈락막화를 유도하는 것은 잘 알려져 있다. 자궁내막 기질세포의 탈락막화를 유도하는 물질로는 이외에도 cAMP,⁷ Gonadotropin,⁸ PGE^{2,9} Relaxin¹⁰ 등이 보고되었으며, 최근에는 Heparin-Binding Epidermal Growth Factor와 그것의 수용체가 탈락막화를 매개한다고 보고가 되었다.¹¹

Transforming Growth factor (TGF)는 흰쥐 육종의 섬유모세포의 배지 속에서 처음 발견이 되었다.¹² TGF-superfamily는 activin, BMP, inhibin, growth/differentiation factor 등을 포함하는 단백질성 cytokine 등의 일족으로 비활성화 상태 (latent form)로 만들어져 분비되며, plasmin에 의해 잘려 활성화 된다.¹³ TGF는 세포의 성장¹⁴ 및 분화¹⁵에 많은 역할을 하는 것으로 알려졌고, 그 외에도 스테로이드 생합성,¹⁶ 혈관형성 및 종양의 침윤과 전이에서도 중요한 역할을 한다.¹⁷

PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors)는 nuclear hormone receptor superfamily의 한 종류로서 현재까지 3가지 종류 (PPAR α , PPAR β , PPAR γ)의 이형체가 보고되었으며 이들은 각기 다양한 기능을 가진 것으로 알려져 있다. PPAR의 활성화는 세포의 성장, 염증반응 및 지방세포의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다.^{18,19} 이외에도 대장암, 유방암, 전립선암 등 많은 암에서 발현되며 일반적으로 증식 억제인자로 작용하는 것으로도 알려져 있다.²⁰ PPAR의 과발현이 TGF- β 1에 의해 유도되는 Smad 활성화를 억제할 수 있으며,²¹ 인간자궁내막세포에서 PPAR가 VEGF (vascular endothelial growth factor)의 발현을 억제할 수도 있다고 보고되었다.²²

본 연구진은 자궁내막 상피세포와 자궁내막 기질세포를 공배양하게 되면 progesterone이 자궁내막 상피세포에서 TGF- β 1을 발현시키고, TGF- β 1에 의해 기질세포가 탈락막화 되며, anti-TGF- β 1 antibody에 의해 탈락막화가 억제되는 것을 확인한 바 있다.²³ 다양한 연구에서 TGF- β 에 의한 세포의 분화는 PPAR γ 의 활성화에 의하여 억제됨을 보고하였다.

ERK (extracellular signal-regulated kinase)는 MAP (Mitogen-activated protein) kinase의 일종으로 세포의 증식 및 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져

있다.²⁴ 또한, ERK는 특정 세포의 분화에 있어서 분화/G0 arrest를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁵

Prostaglandins (PGs)는 arachidonic acid로부터 유래된 지질의 일종으로 통증 및 각종 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 PGs의 합성 과정은 Cyclooxygenase (COX)-1과 -2와 같은 효소에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다. COX-1의 경우 일반적으로 house keeping 작용을 하는 효소인데 반하여 COX-2는 각종 자극에 의하여 발현이 증감되는 양상을 보인다. 또한 COX-2는 백서 자궁의 탈락막화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁶

따라서 본 연구에서는 TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화 과정이 ERK의 인산화, COX-2에 의하여 조절됨을 관찰하고자 하였으며, 이러한 과정은 PPAR γ 의 활성화에 의하여 억제됨을 관찰하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 자궁내막 조직의 획득

자궁내막 조직은 아주대병원 산부인과를 내원한 환자 중 자궁내막 질환 이외의 양성 질환 (자궁근종)으로 인해 전자궁적출술을 시행한 환자들을 대상으로 하였다. 이들은 모두 생리일을 기준으로 중기 및 후기 분열기인 여성들이었으며 적출된 자궁 후저부로부터 자궁내막 조직을 획득하였다.

2. 시약 및 antibodies

Human recombinant TGF- β 1 및 ELISA 분석에 필요한 시약은 Sigma (USA)사로부터, Rosiglitazone은 Alexin (USA)사로부터, PD98059는 Calbiochem (USA)사로부터 구입을 하였다. Prolactin polyclonal goat antibody, p-Smad polyclonal goat antibody, p-ERK polyclonal mouse antibody, PPAR polyclonal rabbit antibody, COX-2 polyclonal goat antibody 등은 Santa Cruz (USA)사로부터, Anti-goat HRP antibody, anti-mouse HRP antibody, anti-rabbit HRP antibody 등은 chemicon (USA)사로부터 구입을 하였다.

3. 자궁내막 기질세포의 분리배양

적출된 자궁 검체로부터 획득한 자궁내막 조직을 DMEM F/12 (10% FBS)가 들어 있는 conical tube (Falcon, USA)에 담아 무균 실험대로 운반하였고, PBS로 여러 번 세척하여 혈액 및 FBS를 제거하였다. 자궁내막 조직을 PBS가 들어 있는 dish에서 잘게 자른 후 원심분리하여 상층액을 제거하고, trypsin-EDTA (Gibco, USA) 10 ml을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응 후 FBS 1 ml을 첨가하여 효소반응을 정지시키고, 원심분리하여 상등층액을 제거하였다. 다시 PBS 5 ml을 첨가하여 현탁시킨 후 원심분리하여 상등층액을 제거하고 DMEM F/12 (10% FBS) 10 ml을 첨가하여 재 현탁시킨 후 상층액 8 ml을 100 mm 배양접시 (Corning, USA)에 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 부유하는 세포 및 적혈구를 PBS로 씻어내고 2회 계대배양하였다. 실험에 사용한 세포는 DMEM F/12 (10% FBS; 1 nM E2; 100 nM P4) 조건 하에서 72시간 동안 배양하였으며, 실험 목적에 따라 5 ng/ml의 TGF- β 1 (Sigma, USA), 50 nM의 Rosiglitazone (PPAR γ specific ligand, Alexin, USA), 20 μ M의 PD98059 (pERK inhibitor) 등을 처리하여 배양하였다.

4. Trypan-Blue를 이용한 세포 증식 측정

자궁내막 기질세포를 배양한 후 PBS로 세척한 후 Trypsin-EDTA를 처리하여 기질세포를 회수하고, Media로 기질세포 부유액을 만든 다음 동일한 부피의 Trypan-Blue (Gibco, USA) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후 혈구 계수기를 이용하여 Trypan-Blue에 염색이 되지 않은 기질세포의 개수를 측정하였다.

5. Western을 이용한 protein의 발현 비교

배양된 세포를 protease inhibitor를 포함하는 lysis buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40)에 용해시킨 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 획득하여 SDS-PAGE (8%, 10%, 15%)를 수행하였다. Gel에 존재하는 단백질을 nitrocellulose membrane으로 blotting한 후 membrane을 5% nonfat dry milk를 포함하는 Tris-buffered saline에서 blocking한 후 각각의 primary antibodies

와 4°C에서 overnight 반응시켰다. Membrane을 각각의 peroxidase-conjugated secondary antibodies와 반응을 시킨 후 ECL procedures (Santa Cruz, USA)를 사용하여 가시화시켰다.

6. 세포배양액 내 prostaglandin E2 (PGE2)의 농도 측정

배양액 내 prostaglandin E2의 농도는 세포를 실험 조건에 따라 72시간 배양한 후 배양액을 채취하여 실험일 까지 -75°C에서 보관 후 사용하였다. 보관된 배양액을 상온에서 해동한 후 prostaglandin E2 ELISA kit (Sigma, USA)를 사용하여 수행하였으며, SpectraMAX 190 (Molecular device, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 측정은 동일한 조건의 각기 다른 3개의 시료에서 측정하였다.

결 과

1. TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 세포 증식 억제

자궁내막 기질세포에 TGF- β 1를 처리하여 72시간 동안 배양을 한 다음 Trypan-blue로 염색하여 기질세포의 증식을 측정하여 비교해 본 결과 TGF- β 1을 처리하지 않은 대조군에 비해 세포 증식이 감소함을 알 수 있었다 (Figure 1).

2. TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막 화에 있어서 prolactin, PPAR γ , 인산화된 Smad2/3 (p-Smad2/3)의 발현

자궁내막 기질세포에 TGF- β 1를 처리하여 72시간 동안 배양한 후 기질세포를 용해하여 Western blotting을 수행하였다. 이 결과 TGF- β 1을 처리하지 않은 대조군에 비해 TGF- β 1을 처리한 군에서 탈락막화의 표지 단백질인 prolactin의 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Smad의 인산화가 TGF- β 1에 의해 증가된 것을 확인할 수 있었으며, PPAR γ 의 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 2). Smad의 인산화가 TGF- β 1에 의해 증가된 것을 확인함으로써 TGF- β 1 처리에 의한 기질세포의 증식 억제 (Figure 1)는 Smad의 신호전달 과정을 활성화시켜 세포의 증식 주기를 차단함으로써 이루어

짐을 알 수 있었다.

3. Rosiglitazone에 의한 TGF- β 1에 의해 억제된 자궁내막 기질세포의 세포 증식 회복

자궁내막 기질세포에서 TGF- β 1의 신호전달이

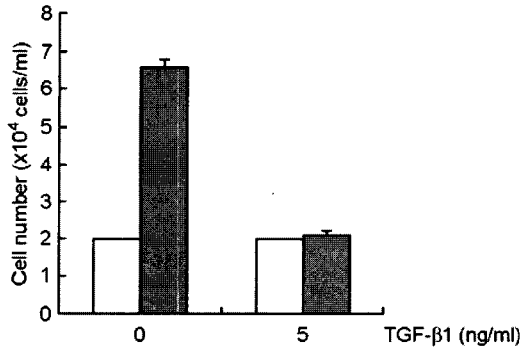


Figure 1. Effect of TGF- β 1 on the endometrial stromal cell proliferation. Endometrial stromal cells were treated with or without TGF- β 1 (5 ng/ml) for 72 hr. Cells were stained with Trypan-Blue and counted using hemacyotometer. TGF- β 1 inhibited proliferation of cultured endometrial stromal cells. Data are the means \pm SE of three independent experiments. Open bar; 0 hr, Black bar; 72 hr.

PPAR γ 에 의해 조절 되는 지를 확인하기 위하여 PPAR γ 의 specific ligand로 알려진 Rosiglitazone을 50 nM의 농도로 TGF- β 1 (5 ng/ml)와 같이 기질세포에 처리하여 본 결과 TGF- β 1에 의해 억제되었던 기질세포의 증식이 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3).

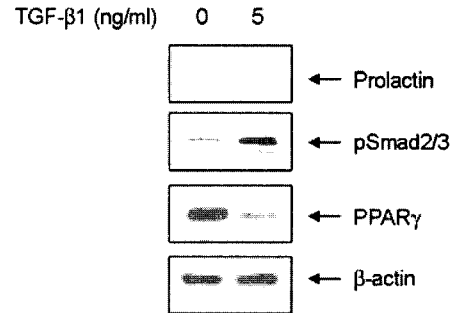


Figure 2. Expression of prolactin, PPAR γ and pSmad 2/3 in cultured endometrial stromal cells. Endometrial stromal cells were treated with or without TGF- β 1 (5 ng/ml) for 72 hr. Cell lysates were subjected to western blot analysis using anti-prolactin, phosphorylated Smad2/3 and PPAR antibodies. TGF- β 1 induced expression of prolactin and pSmad2/3 after 72 hr treatment. Expression of PPAR γ was inhibited by TGF- β 1 treatment for 72 hr.

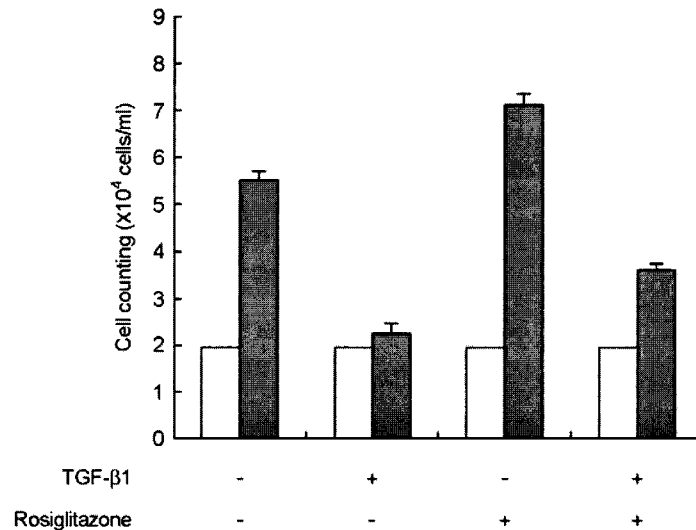


Figure 3. Effect of TGF- β 1 on the cell proliferation was prevented by Rosiglitazone (PPAR agonist) treatment. Endometrial stromal cells were treated with TGF- β 1 (5 ng/ml) and/or rosiglitazone (50 nM) for 72 hr. Cells were stained with Trypan-Blue and counted using hemacyotometer. Cell proliferation was increased by co-treatment of TGF- β 1 and rosiglitazone compared with TGF- β 1 treatment. Data are the means \pm SE of three independent experiments. Open bar; 0 hr, Black bar; 72 hr.

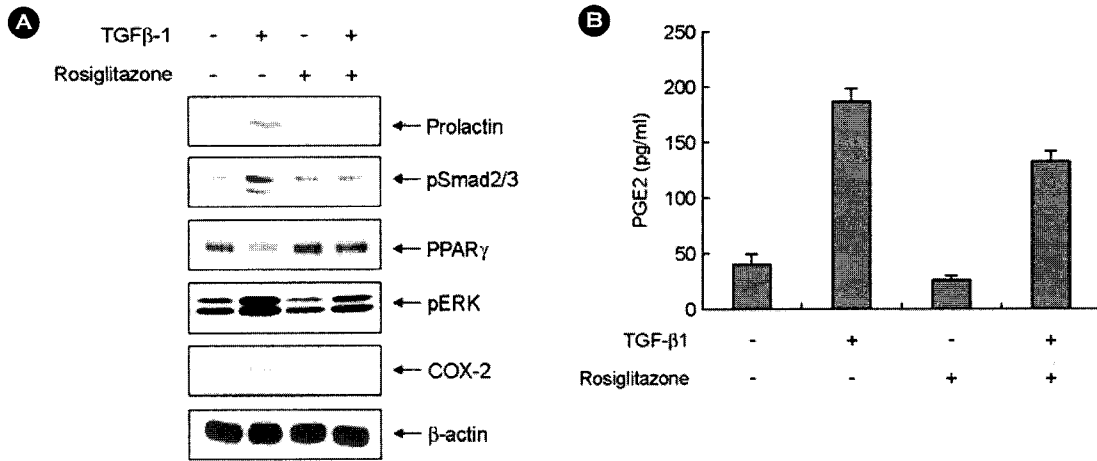


Figure 4. Rosiglitazone reduced expression of pSmad, pERK, COX-2 and PGE2 in cultured endometrial stromal cells. Endometrial stromal cells were treated with TGF-1 (5 ng/ml) and/or rosiglitazone (50 nM) for 72 hr. Cell lysates were subjected to Western blot analysis using anti-prolactin, pSmad2/3, PPAR, pERK, COX-2 antibodies. TGF-β1 induced expression of prolactin, pSmad2/3, pERK, and COX-2 were prevented by co-treatment of rosiglitazone (A). Concentration of PGE2 in culture medium was measured by ELISA. TGF-β1 induced PGE2 releasing from cultured endometrial stromal cells was inhibited by co-treatment of rosiglitazone. Data are the mean \pm SE of three independent experiments (B).

4. Rosiglitazone에 의한 prolactin, pSmad2/3, PPAR γ , pERK, COX-2 및 PGE2의 변화 양상

Rosiglitazone을 단독 처리한 경우 prolactin의 발현이 TGF-β1을 처리한 군과 비교하여 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4A). 또한 TGF-β1의 단독 처리에 의하여 증가되었던 Smad 인산화 역시 Rosiglitazone과의 병행 처리에서 감소가 되었다 (Figure 4A). 또한 TGF-β1과 Rosiglitazone을 동시에 처리한 군에 있어서도 Smad의 인산화 및 prolactin의 발현량이 유의하게 감소함을 알 수 있었다. 이 결과로 미루어 TGF-β1의 세포 내 신호전달이 Smad pathway를 통한 TGF-β1의 세포 내 신호전달 기전은 PPAR γ 에 의하여 억제됨을 알 수 있었다. 탈락막화를 유도하는 것으로 알려져 있는 PGE2의 변화를 자궁내막 기질세포의 배양액 내에서 ELISA를 통하여 측정하여 비교하였다. TGF-β1의 단독 처리에 의하여 증가되었던 PGE2의 발현이 Rosiglitazone과 병행 처리하면 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4B). PGE2를 생산하는 효소로 알려진 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 역시 TGF-β1의 단독 처리에 의하여 증가되었으나 Rosiglitazone에 의하여 감소되는 것을 확인하였다. ERK의 인산화

정도를 확인하여 본 결과 Rosiglitazone에 의하여 인산화가 감소되는 것을 확인하였다 (Figure 4A).

5. PD98059에 의한 prolactin, pERK, COX-2 및 PGE2의 발현 변화 양상

TGF-β1 처리에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화가 ERK의 인산화에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 ERK의 인산화 저해제인 PD98059를 TGF-β1과 병행 처리하였다. 이 결과 탈락막화의 표지 단백질인 prolactin이 발현이 감소가 되는 것을 확인할 수가 있었고, 또한 COX-2의 발현과 PGE2의 분비가 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5A, B).

고 찰

일반적으로 세포의 분화는 세포의 증식 과정이 정지한 후 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 연구진은 이전의 연구에서 progesterone에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화는 자궁내막 상피세포로부터 분비된 TGF-β1에 의하여 매개된다는 것을 보고한 바 있다.²³ 따라서 TGF-β1이 자궁내막 기질세포의 증식에도 영향을 미치는지를 관찰하였다. 관찰 결과 5 ng/ml의 농도로 TGF-β1을 처리하여 72시간 자궁

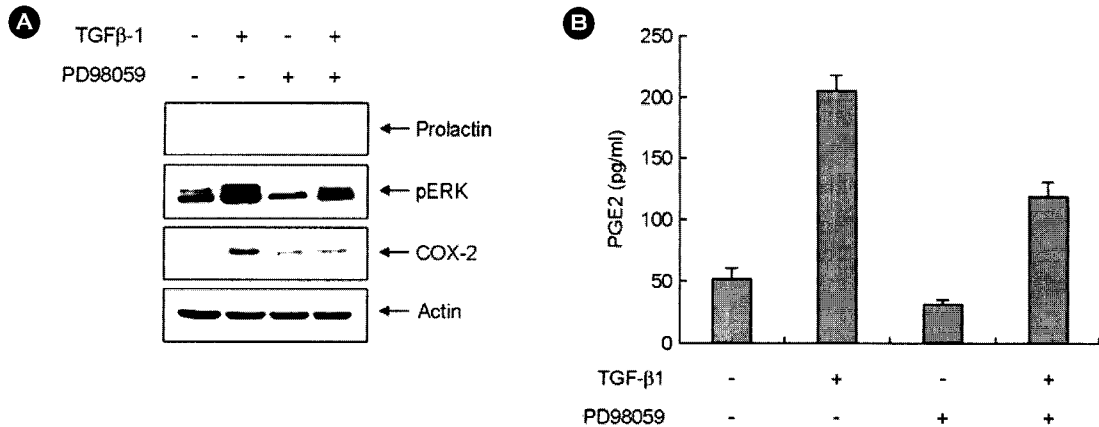


Figure 5. PD98059 reduced expression of pERK, COX-2 and PGE2 in cultured endometrial stromal cells. Endometrial stromal cells were treated with TGF-1 (5 ng/ml) and/or PD98059 (20 μ M) for 72 hr. Cell lysates were subjected to Western blot analysis using anti-prolactin, pSmad2/3, PPAR, pERK, COX-2 antibodies. TGF- β 1 induced expression of prolactin, pSmad2/3, pERK, and COX-2 were prevented by co-treatment of PD98059 (A). Concentration of PGE2 in culture medium was measured by ELISA. TGF- β 1 induced PGE2 releasing from cultured endometrial stromal cells was inhibited by co-treatment of PD98059. Data are the mean \pm SE of three independent experiments (B).

내막 기질세포를 배양한 결과 세포의 증식 과정이 억제된다는 것을 알 수 있었다 (Figure 1). 이러한 연구 결과는 TGF 수용체와 Smad의 인산화를 통한 세포 내 신호전달 기전이 자궁내막 기질세포의 분화 이외에도 세포 증식과 연관된 분자들과 연계되어 있을 가능성을 시사한다.

PPAR γ 는 현재까지 인간 태반, 양막, choriondecidual tissue에서 발견되는 것으로 알려져 있으나 이들 조직 내부에서의 정확한 역할은 아직도 많은 부분이 밝혀져 있지 못하다.²⁷ 본 연구에서 TGF- β 1에 의하여 유도된 자궁내막 기질세포의 탈락막화 과정에서 PPAR γ 가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 2). 따라서 TGF- β 1에 의한 탈락막화 과정에서의 PPAR γ 의 역할을 확인하고자 하였다. PPAR γ 의 활성화에 의하여 TGF- β 1에 의한 세포의 변화를 관찰하기 위하여 TGF- β 1 및 PPAR γ 의 기질 (specific ligand)로 알려진 Rosiglitazone을 단독으로 또는 모두 세포 배양액에 첨가하여 세포 증식의 변화를 관찰하였다. 이 결과 TGF- β 1에 의해 감소된 세포 증식이 Rosiglitazone의 첨가에 의하여 역전 되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 3). 뿐만 아니라 Rosiglitazone에 의한 PPAR γ 의 활성화는 Smad의 인산화 역시 억제하는 것을 알 수 있었다 (Figure 4). 이 결과를 토대로 TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 탈

락막화 과정은 Smad의 인산화를 통하여 일어나며, 이 결과 세포의 증식이 억제되며 동시에 기질세포가 탈락막으로 분화되는 것으로 결론지을 수 있었다. 또한 이러한 과정은 PPAR γ 에 의하여 억제 되는 것으로 보인다. 이러한 연구 결과는 TGF- β 1에 의하여 유도된 폐 근섬유세포 (pulmonary myofibroblast)의 분화에 있어서 PPAR γ 의 활성이 이 과정을 억제 한다는 이전의 연구 결과²⁸와도 잘 일치한다. 이 결론을 좀 더 확인하기 위하여 TGF- β 1의 세포 내 신호 전달이 세포 증식 인자의 활성화에도 영향을 미치는지를 관찰하였다.

ERK는 특정 세포의 분화에 있어서 세포 증식 억제를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁵ 본 연구에서도 TGF- β 1은 자궁내막 기질세포의 분화를 유도할 뿐만 아니라 세포의 증식을 감소 시켰으며 동시에 ERK의 인산화 역시 증가 시켰다. 이 결과로 미루어 TGF에 의한 Smad의 활성화는 ERK의 활성화를 유도하여 자궁내막 기질세포의 분화/G0 arrest를 가져 오는 것으로 알 수 있다. 또한 TGF- β 수용체와 Smad의 인산화를 통한 ERK의 활성화는 PPAR γ 의 활성화를 통하여 억제 되는 것을 알 수 있었다 (Figure 4).

이전 연구에서 prostaglandin (PG)은 여성의 생식 기관에서 배란, 착상, 생리 및 분만에 중요한 역할

을 하는 것으로 알려져 있다.²⁹ 더욱이 자궁내막의 탈락막화에 있어서 PG의 생합성 억제는 인공적으로 유도된 탈락막화를 억제하는 것으로 알려져 있다.³⁰ 따라서 본 연구에서도 TGF- β 1에 의하여 배양된 인간자궁내막 기질세포에서 PG 합성이 증가되는지를 관찰하였으며 이러한 PG 합성이 PPAR γ 의 활성화에 의하여 억제되는 지를 관찰하였다. 관찰 결과 TGF- β 1의 처리가 배양된 자궁내막 기질세포에서 PG 합성 효소인 COX-2의 발현을 증가시켰으며, 배양액 내로 PGE2의 분비를 증가 시켰다. 뿐만 아니라 Rosiglitazone에 의해 유도된 PPAR γ 의 활성화에 의해 이러한 기전이 억제되는 것을 관찰하였다 (Figure 4A, B). 지금까지 TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화 과정은 Smad의 인산화와 ERK의 인산화 과정을 거침을 알 수 있었다. 따라서 ERK의 인산화 과정이 기질세포의 PGE2 생합성에 영향을 미치는가를 관찰하였다. 배양된 기질세포에 ERK 인산화 억제제인 PD98059를 첨가하여 COX-2 및 PGE2의 발현을 관찰하였다. 관찰 결과 PD-98059는 COX-2 발현 및 배양액 내 PGE2의 농도를 감소 시켰으며, 이와 더불어 기질세포의 prolactin 발현을 감소 시키는 것을 알 수 있었다 (Figure 5A, B).

결론적으로 TGF- β 1은 인간자궁내막 기질세포의 탈락막화를 직접적으로 유도할 수 있었다. 이러한 TGF- β 1에 의한 탈락막화는 Smad의 인산화와 이에 따른 ERK의 활성화 및 PGE2의 생합성 과정을 통하여 일어나며 결과적으로 기질세포의 증식을 억제하고 prolactin의 발현을 유도한다. 또한 이러한 과정은 PPAR γ 에 의하여 억제 되는 것을 알 수 있었다. 본 연구는 TGF- β 와 PPAR γ 의 인간자궁내막 기질세포의 탈락막화 기전에 있어서의 역할을 처음으로 밝혔으며 자궁내막의 불완전한 탈락막화에 의한 전자간증 및 습관성 유산 연구에 좋은 이론적 기반을 제공할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산자부, 경기도지원 지자체주도 연구 개발사업 (과제명: B-IT 융합 바이오테크놀로지첨단화 사업; 과제번호: RTI04-03-05)을 통하여 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

1. Kauma SW. Cytokines in implantation. *J Reprod Fertil* 2000; 55: 31-42.
2. Chegini N, Williams RS. Implication of growth factor and cytokine networks in endometrium. *Cytokines in human reproduction*. New York: Wiley and Sons; 2000. p.92-132.
3. Selam B, Arici AL. Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid. *J Reprod Fertil* 2000; 55: 121-8.
4. Burton JL, Wells M. Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium. *Histopathology* 1998; 33: 297-303.
5. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, Tamura M, Sebastian S, Zhou J, Amin S', et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 21-33.
6. Popovici, RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in *in vitro* decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; 141: 3510-3.
7. Tang B, Guller S, Gurpid E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 1993; 133: 2197-203.
8. Tang B, Grupide E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 47: 115-21.
9. Frank GR, Brar AK, Cedars MI, Handwerger S. Prostaglandin E2 enhances human endometrial cell differentiation. *Endocrinology* 1994; 134: 258-63.
10. Tseng L, Gao JG, Chen R, Zhu HH, Mazella J, Powell DR. Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1992; 47: 441-50.
11. Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, et al. Heparin-Binding

- Epidermal Growth Factor and Its Receptors Mediate Decidualization and Potentiate Survival of Human Endometrial Stromal Cells. *J Clinical Endocrinol Metabol* 2005; 90(2): 913-9.
12. Delarco JE, Todaro GJ. Growth factors form murine sarcoma virus-transfected cells. *Proc Nath Acad USA*. 1978; 75: 4001-5.
 13. Odekone LE, Blasi F, Rifkin DB. Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF beta. *J Cell Physiol* 1994; 158: 398-407.
 14. Moses HL, Coffey RJ Jr, Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J Cell Physiol* 1987; 5: 1-7.
 15. Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 581-6.
 16. Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, et al. Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3759-65.
 17. Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: s44-51.
 18. Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(12): 469-74.
 19. MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 5-11.
 20. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 2004; 5: 419-29.
 21. Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, Wu T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE)2/EP1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF-beta-induced mitoinhibition. *J Biol Chem* 2004; 279(43): 44344-54.
 22. Peeters LL, Vigne JL, Tee MK, Zhao D, Waite LL, Taylor RN. PPAR γ represses VEGF expression in human endometrial cells: Implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis* 2006; 8(4): 373-9.
 23. Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(11): 801-8.
 24. Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 136(5): 557-61.
 25. Yen A, Varvayanis S, Smith JL, Lamkin TJ. Retinoic acid induces expression of SLP-76: expression with c-FMS enhances ERK activation and retinoic acid-induced differentiation/G0 arrest of HL-60 cells. *Eur J Cell Biol* 2006; 85(2): 117-32.
 26. Scherle PA, Ma W, Lim H, Dey SK, Trzaskos JM. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. An event of early pregnancy. *J Biol Chem* 2000; 275(47): 37086-92.
 27. Marvin KW, Eykholt RL, Keelan JA, Sato TA, Mitchell MD. The 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂Receptor, Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ (PPAR γ) is Expressed in Human Gestational Tissues and is Functionally Active in JEG3 Choriocarcinoma Cells) Placenta 2000; 21(4): 436-40.
 28. Burgess HA, Daugherty LE, Thatcher TH, Lakatos HF, Ray DM, Redonnet M, et al. PPAR gamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(6): L1146-53.
 29. Poyser NL. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995; 53(3): 147-95.

30. Rankin JC, Ledford BE, Jonsson HT Jr, Baggett B. reaction in the mouse uterus. Biol Reprod 1979; Prostaglandins, indomethacin and the decidual cell 20(2): 399-404.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구를 통해 TGF- β 1에 의해 유도된 인간자궁내막의 탈락막화 과정에서 ERK와 PPAR γ 의 역할을 규명하고자 하였다.

연구방법: 자궁내막 기질세포는 DMEM/F12 (10% FBS, 1 nM E2 and 100 nM P4) 조건에서 배양하였다. 연구 목적에 따라 TGF- β 1 (5 ng/ml), Rosiglitazone (50 nM)와 PD98059 (20 μ M)를 배양액에 첨가하였다. Trypan-Blue와 hemacytometer를 이용하여 현미경하에서 세포의 개수를 측정하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 western blotting 방법을 사용하여 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

결과 및 결론: 배양액에 TGF- β 1을 첨가하여 세포의 증식 정도를 측정한 결과 TGF- β 1이 세포의 증식을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한 배양된 세포로부터 PGE2 및 prolactin의 발현을 유도하는 것을 알 수 있었다. 이러한 TGF- β 1의 작용은 Smad 및 ERK의 활성화를 통하여 일어남을 알 수 있었다. PPAR γ 의 기질인 rosiglitazone을 배양액에 첨가한 결과 TGF- β 1에 의한 세포 증식의 억제가 역전되는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 세포 내 ERK의 활성 역시 억제시켰으며 이 결과 PGE2와 prolactin의 발현이 억제 되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 TGF- β 1에 의한 자궁내막 기질세포의 탈락막화는 Smad와 ERK의 활성화를 통하여 이루어지며 이러한 과정은 PPAR γ 에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

중심단어: 탈락막화, TGF- β 1, PPAR γ , ERK, Smad