

## 한우 자궁내막염에서 발현 변화를 보이는 유전자

강다원<sup>†</sup>

경상대학교 의과대학 생리학교실, 건강과학연구원

## Gene Expression Altered in Endometrium of Korean Cattle with Endometritis

Dawon Kang<sup>†</sup>

Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-751, Korea

## ABSTRACT

This study was carried out to examine gene expression altered in endometrium of Korean cattle (Hanwoo) with endometritis using microarray. In this study, 4,560 differentially expressed genes (DEGs) were identified in the endometrium of Hanwoo. Of 4,560 DEGs, 2,026 genes were up-regulated, while 2,536 genes were down-regulated in endometritis. Of them, top 10 regulated genes were listed. Filamin A, pancreatic anionic trypsinogen, Rho GDP dissociation inhibitor alpha, collagen type VI alpha 1, butyrate response factor 2, aggrecanses-2, annexin 14, aminopeptidase A, orphan transporter v7-3, and epithelial stromal interaction 1 were up-regulated, while MHC class II antigen, integrin-binding sialoprotein, uterine milk protein precursor, down-regulated in colon cancer 1, glycoprotein 330, dickkopf-1, cfh protein, Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion activator, UL16 binding protein 3, and proenkephalin were down-regulated in the endometritis. Our results suggest that these genes could be useful biomarkers for diagnosis Hanwoo's endometritis.

(Key words : Microarray, Korean cattle, Endometritis)

## 요 약

본 연구는 한우의 자궁내막염에서 발현 변화를 보이는 유전자를 마이크로어레이를 이용하여 조사하였다. 정상적인 자궁내막과 자궁내막염이 있는 자궁내막을 비교한 결과, 전체 확인된 4,560개의 유전자 중 2,026개의 유전자가 자궁내막염에서 증가하였고, 2,534개의 유전자가 감소하였다. 본 연구에서는 상위 조절되는 유전자 10개씩을 정리하였다. 자궁내막염에서 filamin A, pancreatic anionic trypsinogen, Rho GDP dissociation inhibitor alpha, collagen type VI alpha 1, butyrate response factor 2, aggrecanses-2, annexin 14, aminopeptidase A, orphan transporter v7-3 및 epithelial stromal interaction 1의 발현율이 2<sup>6</sup>배 이상 증가하였다. MHC class II antigen, integrin-binding sialoprotein, uterine milk protein precursor, down-regulated in colon cancer 1, glycoprotein 330, dickkopf-1, cfh protein, Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion activator, UL16 binding protein 3 및 proenkephalin은 2<sup>5.5</sup>배 이상 감소하였다. 본 연구에서 얻어진 유전자 정보는 한우의 자궁내막염 진단에 필요한 유용한 생물지표로 사용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

## 서 론

자궁 질환 중 가장 많이 발생하는 자궁내막염(endometritis)은 자궁내막에 염증이 발생한 것으로 만성적으로 진행되면 자궁축농증이 될 수 있다. 자궁내막염은 번식장애의 주요 원인이 되는데, 정자의 운동성을 방해하여 자궁내의 상행을 어렵게 하며, 수정란이 자궁내막에 착상하

는 것을 저해하고, 또한 착상하여도 조기에 수정란이 사멸하게 된다. 자궁내막염은 인공수정, 자궁 세척, 조산, 후산정체의 제거 시에 세균이 자궁 내에 침입하여 발생하게 되는데, 자궁내막의 세균 감염 방어 능력은 호르몬 환경에 영향을 받는다. 에스트로젠(estrogen)은 자궁의 세균 감염에 대한 방어력을 높이지만 프로게스테론(progesterone)은 방어력이 약하다. 자궁내막염이 발생하면 조직학적으로는 자궁점막 상피세포의 변성과 박리가 일어나

\* 본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 20070401080057)의 지원에 의해 이루어진 것임.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-55-751-8744, Email: dawon@gnu.ac.kr

고, 점막층에 여러 종류의 백혈구나 원형세포의 침윤이 나타나며 자궁선이 변성된다. 치료법으로서는 자궁 세척 후 항생물질을 자궁 내에 주입하는 것이 유효한 것으로 알려져 있으나, 중증의 자궁내막염은 완전한 치료가 어려운 실정이다.

그러나 자궁내막염의 완전한 치료에 앞서 자궁내막에서 일어나는 세포들의 다양한 변화를 아는 것은 자궁내막염의 치료 방법을 모색하는데 있어 선행되어야 한다. 특히 질병 시 변화되는 세포들의 다양한 변화는 유전자의 변화를 연구함으로써 접근할 수 있다. 유전자가 mRNA 형태로 나타나는 현상을 유전자 발현(gene expression)이라 한다. 유전자는 항상 발현되는 것이 아니라, 특정 상황 하에서 필요한 단백질을 만들기 위해 발현된다. 또, 각 유전자의 발현은 복잡한 상호 작용에 의해 지배되고 있어서 어느 유전자의 발현으로 인해 다른 유전자의 발현이 촉진되거나 억제될 수도 있다. 유전적인 변화는 자손에게 전달되므로, 특히 질병과 관련되는 유전적 특징을 나타내는 유전자 연구는 중요하게 다루어져야 한다. 임신 유지에 필요한 자궁내막에 있어서 사이토카인, 효소들과 같은 유전자들의 중요성이 보고되었다. Cyclooxygenase 1과 2 (COX-1/COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), inducible nitric oxide synthase (iNOS), haptoglobin, interleukin 1과 6 (IL-1/IL-6)는 소의 생식기에서 생리학적인 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 감염 질환에서 염증의 매개체로서 역할을 하고 자궁 감염시 IL-1, IL-2, lipopolysaccharide (LPS)는 prostaglandin (PG) F<sub>2a</sub>의 생산을 증가시킨다는 보고들이 있었다 (Leung 등, 2001; Kim 등, 2005; Fischer 등, 2006). 이러한 유전자들은 질환의 생물학적 지표 및 치료제 연구에 중요한 정보를 제공한다. 유전자의 연구를 효율적으로 하기 위해서는 대단위 규모로 진행할 수 있는 연구 방법을 활용하여야 하는데, 그 방법 중 분자 생물학과 공학 기술의 결합체인 마이크로어레이(microarray, chip)는 수 천 개의 유전자와 EST (Expressed Sequence Tag)의 발현 양상을 동시 다발적으로 분석이 가능하므로 효율적인 방법으로 사용되고 있다. 특히 올리고 칩은 짧은 probe(15~25 mer)를 이용하여 표본과 결합시킴으로써 이상결합을 줄이고 감도를 높여 유전적 다형성을 감지할 수 있게 하여 유전병을 진단하고 예측하는데 도움을 준다(이, 2003).

본 연구에서는 올리고 칩을 이용하여 중증의 자궁내막염 있는 한우의 자궁내막에서 변화되는 유전자를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 배양액

본 연구에 이용된 한우 자궁은 도축장으로부터 회수되었고, 자궁내막 조직은 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 0.5 cm보다 얇게 썰어 신속하게 10배 이상 부피의 RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)에 담가 4°C에서 12시간 이상 보관하였다. 준비된 시료에서 RNAlater를 제거하여 -80°C로 옮겨 실험 시까지 보관하

였다.

### RNA 추출 및 정제

Total RNA는 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 이용하여 제조사의 실험 과정에 따라 추출되었다. 조직(100 mg)을 액체질소에 담가 얼려진 상태로 막자 사발에 넣고 액체질소를 약간씩 부어 가면서 막자를 이용하여 가루가 될 때까지 갈아 미리 액체질소로 차갑게 만든 튜브에 모은 다음, 조직 100 mg당 1 ml의 비율로 TRIzol을 첨가하여 조직을 손가락(tapping)과 진탕기(vortexing)를 이용하여 완전히 녹였다. 완전히 녹은 시료를 얼음에 5분간 둔 후 용해물(lysate)이 끈적거리지 않을 때까지 주사기를 통과시키고 0.5 ml chloroform을 첨가하여 손으로 15초간 강하게 흔든 뒤 25°C에서 2~3분간 두었다. 12,000 ×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 시료를 두 층으로 나눈 다음 상층액을 새 튜브로 옮기고 0.5 ml isopropanol을 첨가한 뒤 손으로 몇 번 흔들어 주고 상온에서 10분간 방치하였다. 그 상층액을 12,000 ×g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 침전물만 취하였다. 침전물에 4°C에서 이미 차갑게 해둔 75% ethanol (1 ml)을 첨가하여 잘 혼합한 다음 4°C, 7,500 ×g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물을 말린 다음, 100 μl의 물(RNase-free water)을 넣어 녹이고 RLT buffer 350 μl를 첨가하여 완벽하게 잘 섞은 다음 250 μl ethanol을 첨가하여 다시 섞는다. 섞은 시료 700 μl를 RNeasy Mini column(이하 column이라 함)으로 옮겨 8,000 ×g에서 15초간 원심분리하였다. Column을 새로운 2 ml 튜브로 옮겨 500 μl RPE buffer를 첨가한 뒤 8,000 ×g에서 15초간 원심분리하고, 다시 500 μl의 RPE buffer를 column에 넣어 8,000 ×g에서 2분간 원심분리하였다. Column을 새로운 2 ml 튜브로 옮긴 뒤 최대 속도로 1분간 원심분리한 후 column을 뚜껑이 있는 1.5 ml 튜브로 옮겨 RNA 분해효소가 없는 물 30 μl을 넣어 8,000 ×g에서 1분간 원심분리하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 시료를 다시 파이프트로 회수하여 각 추출 과정을 반복하여 최종 RNA 농도가 1 μg/μl 이상이 되도록 하였다. Total RNA의 순수 정도는 NanoDrop(NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)과 Experion(Biorad, Hercules, USA)을 사용하여 확인하였다.

### cRNA 합성 및 정제

분광광도계로 확인된 total RNA를 전기영동하여 순수 정도와 질을 재확인하였다. Total RNA 5 μg을 0.2 ml PCR 튜브에 넣고 희석된 2 μl의 poly-A RNA와 2 μl의 50 μM T7-oligomer를 넣은 후 RNA 분해효소가 없는 물로 용량을 12 μl로 맞추어 튜브를 손가락으로 가볍게 치면서 섞어준 뒤 5초 정도 침전시켰다(spin-down). PCR 장치를 이용하여 튜브를 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에서 5분간 식히고 침전시켜 5× First-strand reaction mix 4 μl, 0.1 M DTT 2 μl, 10 mM dNTP mix 1 μl를 첨가하여 튜브를 손가락으로 가볍게 쳐서 섞은 다음 PCR 장치에서 42°C로 2분간 반응시켰다. 튜브에 Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 1 μl 첨가하여 42°C에서 1시간 더 반응시킨 후 얼음에 넣어 2분간 식히고, 내용물을 침전시켜 RNA 분해효소가 없는 물 91 μl,

5×second-strand reaction mix 30  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 3  $\mu$ l, *E. coli* DNA ligase 1  $\mu$ l, *E. coli* DNA polymerase I 4  $\mu$ l 및 *E. coli* RNase H 1  $\mu$ l를 첨가하였다. 첨가 후 튜브를 손가락으로 가볍게 쳐서 내용물을 섞어준 뒤 5초 정도 침전시켜 PCR 장치에서 16°C로 2시간 동안 반응시키고, T4 DNA polymerase 2  $\mu$ l를 넣어 5분간 재반응시켰다. 반응 후 0.5 M EDTA 10  $\mu$ l를 첨가하여 cDNA 정제 과정을 진행하였다. cDNA binding buffer 600  $\mu$ l(노란색)를 double-strand cDNA 용액이 들어 있는 튜브에 첨가한 뒤 3초 동안 진탕하여 잘 섞은 다음, 이 중에서 500  $\mu$ l의 시료를 취하여 cDNA Cleanup column에 넣어 1분 동안 12,000  $\times$ g로 원심분리하고 남아 있는 시료 262  $\mu$ l도 동일한 방법으로 원심분리하였다. cDNA Cleanup column을 새로운 1.5 ml 튜브로 옮기고 cDNA 추출 buffer 14  $\mu$ l를 넣어 1분 동안 상온에서 방치한 후에 12,000  $\times$ g에서 1분 동안 원심분리하였다. 정량 및 전기영동 후 cDNA의 질을 확인하여 *in vitro* transcription(IVT)에 사용하였다. Labeling을 위해 total RNA 5  $\mu$ g이 사용되었다. cDNA는 biotin-labeled CTP와 UTP 존재하에서 GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix)을 이용하여 전사되었다. Biotin이 결합된 cRNA를 합성하기 위하여 template cDNA 11  $\mu$ l, RNase-free water, 10× IVT labeling buffer 4  $\mu$ l, IVT-labeling NTP mix 12  $\mu$ l 및 IVT-labeling enzyme mix 4  $\mu$ l로 최종 용량 40  $\mu$ l를 맞추어 진탕한 뒤 침전시켜 PCR 장치에서 37°C, 16시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 정제 과정을 거쳐 cRNA의 순수 정도가 A260/280 비율, 1.9~2.1 사이가 되면 전기영동을 하여 cRNA의 정제 정도를 확인하였다.

#### 마이크로어레이 분석

정제 후, 표지된 cRNA 10~15  $\mu$ g은 Fragmentation buffer(Affymetrix)에 의해 35에서 200 bp까지 분절시켰다. 만들어진 cRNA, Fragmentation buffer, RNase-free water를 0.2 ml PCR tube에 넣어 PCR 장치에서 94°C로 35분간 반응시킨 후 얼음에 넣어 식혔다. 분절된 cRNA는

GeneChip<sup>®</sup> Bovine Genome Array Chips(Affymetrix, Inc, CA, USA)을 가지고 제조사의 실험 과정을 따라 45°C에서 16시간 동안 결합 반응(hybridization)을 시키고, 실온(25°C), GeneChip Fluidics Station 450에서 non-stringent wash buffer를 가지고 세정 후 50°C에서 stringent wash buffer로 다시 세정하였다. 어레이(array)들은 streptavidin-phycoerythrin complex를 가지고 염색하고 GeneChip Operating Software(Affymetrix, CA, USA)로 강도를 조정하여 GeneChip scanner 3000(Affymetrix)을 이용하여 스캔하고 발현 패턴을 분석하였다.

## 결 과

정상 및 중증의 자궁내막염(점조한 화농성 분비물 존재)이 있는 한우의 자궁내막에서 2배 이상 변화되는 유전자(differentially expressed genes: DEG)를 bovine array를 사용하여 선별하였다. 대조군에 비해 실험군 어레이에서 상향(up)/하향(down) 조절되는 유전자를 DEG로 선별하였다. 전체 확인된 4,560개의 유전자 중 2,026개의 유전자가 자궁내막염에서 상승하였고, 2,534개의 유전자가 감소하였다. 유전자 존재론(Gene ontology) 정보 분석은 유전자의 생물학적 연관성을 조사한 것으로써 상향/하향 조절되는 유전자 중 최상위 200개의 유전자를 선별하여 BINGO (biological network gene ontology)를 이용하여 통계적으로 일치하는 유전자 존재론 그룹을 결정하였다. 200개의 유전자 중 자궁내막염에서 상승하는 63개 유전자와 감소하는 51개 유전자가 유전자 존재 정보를 가지고 있었다. 그 정보로는 biological process, molecular function 및 cellular component가 있다. 자궁내막염에서 조절되는 많은 유전자들 중 본 연구에서는 상위 조절 유전자 10개씩을 도표로 나타내었다(Table 1, 2).

자궁내막염에서 filamin A(ABP280), pancreatic anionic trypsinogen(PRSS2), Rho GDP dissociation inhibitor(Rho

Table 1. Top 10 genes up-regulated in endometrium of Korean native cow with endometritis

Gene title	Accession number	Fold change (2 <sup>x</sup> )
Filamin A, alpha (actin binding protein 280, ABP280)	XM_614269	8.1
Pancreatic anionic trypsinogen (PRSS2)	NM_174690	7.9
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	NM_176650	7.2
Similar to collagen, type VI, alpha 1 (COL6A1)	XM_588755	7.1
Butyrate response factor 2 (ZFP36L2)	XM_001251996	6.8
A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2, ADAMTS5)	XM_589193	6.4
Similar to Annexin A10 (Annexin-14)	XM_581595	6.3
Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	NM_001038027	6.1
Homolog of rat orphan transporter v7-3 (NTT73)	NM_181023	6.1
Epithelial stromal interaction 1 (breast) (EPST1)	XM_866098	6.1

Table 2. Top 10 genes down-regulated in endometrium of Korean native cow with endometritis

Gene title	Accession number	Fold change (2 <sup>x</sup> )
MHC class II antigen (BLA-DQB)	NM_001034668	-7.1
Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II, IBSP)	NM_174084	-6.8
Uterine milk protein precursor (UTMP)	NM_174797	-6.8
Similar to down-regulated in colon cancer 1, transcript variant 2 (LOC511430), mRNA	XM_865756	-6.8
Similar to low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Megalin) (Glycoprotein 330) (gp330)	XR_028042	-6.7
Similar to Dickkopf-1 (hdkk-1)	XM_580572	-6.2
Similar to Cfh protein	XM_864225	-5.7
Ca <sup>2+</sup> -dependent secretion activator (CAPS)	NM_001076020	-5.5
Similar to UL16 binding protein (ULBP) 3	XM_587883	-5.4
Proenkephalin (PENK)	NM_174141	-5.4

GDI) alpha, collagen type VI alpha 1(COL6A1), butyrate response factor 2(ZFP36L2), aggrecanses-2, annexin 14, aminopeptidase A, orphan transporter v7-3(NTT73) 및 epithelial stromal interaction 1(EPSTi1)은 발현율이 2<sup>6</sup> 배 이상 증가하였고, MHC class II antigen(BLA-DQB), integrin-binding siaprotein(BSP), uterine milk protein precursor(UTMP), down-regulated in colon cancer 1, glycoprotein 330(gp330), dickkopf-1(hdck-1), cfh protein, Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion activator(CAPS), UL16 binding protein 3(ULBP) 및 proenkephalin(PENK)은 2<sup>5.5</sup> 배 이상 감소하였다. 프로테오믹스 방법을 이용한 단백질 발현의 변화를 살펴보았을 때, actin binding protein의 발현이 자궁내막염에서 증가하는 것을 확인하였다(미제시).

## 고찰

본 연구는 한우의 자궁내막염에서 변화되는 유전자를 마이크로어레이 방식을 이용하여 조사한 결과이다. 본 연구에서 발현이 유의하게 증가되거나 억제된 유전자들 중에는 현재까지 그 기능이 명확히 밝혀져 있지 않은 유전자들이 다수 포함되어 있다. 본 연구에서는 자궁내막염에서 유전자 발현율이 2<sup>5</sup>배 이상 증가하는 유전자와 감소하는 유전자를 설명한다. 먼저 증가하는 유전자들 중 filamin-A는 세포막에 근접해 있는 액틴 필라멘트를 구성하는 액틴 결합 단백질이다. 이는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화에 phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate에 비의존적인 신호 전달 체계에 관여하는 것으로 알려져 있는데(Rey 등, 2005), 자궁내막염에서 이러한 액틴 결합 유전자의 증가를 보였다. PRSS2는 만성 체강염으로부터 보호하는 역할을 한다(Witt 등, 2006). 키모트립신과 트립신을 함유한 소염제는 자궁내막염과 같은 염증 질환을 치료할 때 광범위하게 사용되고 있다. 자궁내막염에서 PRSS2의 증가는 염증에 의해 유도된 것으로 생각된다. Rho GTPase의

생리학적 억제제인 GDI alpha는 만성 골수성 백혈병 및 암의 화학치료제로 사용되는 busulfan에 대한 세포 독성에 영향을 주었고, 세포주기와는 상관없이 세포 사멸을 증가시켰다(Reimer 등, 2007). Rho GDI alpha는 Rho 단백질의 활성 주기를 조절하여 임파구의 이주(migration)와 발달(development)을 조절하였다(Ishizaki 등, 2006). 본 연구에서 자궁내막염에서 Rho GDI의 증가는 세포의 증식 및 분화에 영향을 줄 것으로 생각된다. COL6A1은 기질유래 혈청 섬유증(fibrosis) 표지자로 사용되어지고 있다(Lebensztejn 등, 2006). ZFP36L2는 생쥐에서 수정력 및 초기 배발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ramos 등, 2004). 그리고 종양 억제 유전자로 잘 알려진 p53 의존적 세포 사멸에 관여하는 것이 보고되었다(Jackson 등, 2006). Aggrecanase-2는 연골 대사 과정과 병리적 상태에서 작용하는 단백질 분해 효소로써(Gendron 등 2007) ADAMTD (adamalysin with thrombospondin type 1 motifs)에 속하는 metalloproteinases이다. Metalloprotease는 다양한 염증의 진행 과정과 암에 의해 유발된 카넥시아(전신적 영양실조)에 관련되어 있으며, 배란 과정 시에도 관여할 것으로 생각되어 왔다(Ohnishi 등, 2005). 특히, metalloproteinases-2와 9는 자궁내막에서 발현하였고, 만성 자궁내막염이 있는 사람의 혈청에서 metalloproteinases-2와 9의 수치가 감소하였다(Soboleva 등, 2006). Annexin-14은 전이성 체강암 세포주에서 발현이 증가하였고, 급성 골수성 백혈병에서는 Rho GDI2와 함께 감소하였다. 특히 Annexin-14의 감소는 악성종양의 전이를 막는데 관여할 것이라고 주장해 왔다(Lopez-Pedreria 등, 2006). Aminopeptidase A는 oligopeptide의 아미노기로부터 산성의 아미노산 잔기를 선택적으로 가수분해하는 세포외효소(ectoenzyme)의 하나이다(Song 등, 1994). NTT73은 Sakata 등(1999)이 bovine retina library의 스크리닝으로부터 클로닝하였는데, 이 유전자의 정확한 기능은 알려져 있지 않다. NTT73은 Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-의존성 신경전달물질 수송 유전자 그룹 중의 하나이고, 뇌조직과 상피세포에서 아미노산 수송에 관여하는 신경전달물질을 제거하는 역

할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 생쥐 NTT73은 중성 아미노산을 수송한다(Farmer 등, 2000; Broer 등, 2006). EPSTi1은 침윤성(invasive) 유방암에서 증가하였다. EPSTi1은 종양세포와 스트로마(stromal) 세포에 직접 작용한다. 이 유전자의 발현은 암의 침윤과 전이에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다(Nielsen 등, 2002). 그리고 최근 EPSTi1은 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, SLE) 환자의 혈액세포에서 증가되는 것을 확인하였다(Ishii 등, 2005). 한우의 자궁내막염에서 증가된 10개의 유전자를 스크리닝한 결과, 자궁내막염에서 증가된다는 기존의 연구 결과는 찾을 수 없었다. 그러나 본 연구에서 조사된 유전자들이 세포의 분화, 증식, 사멸 및 암에 관련된 유전자들이 많았다. 자궁내막염 역시 세포의 생존에 영향을 주는 것이므로 기존의 연구 결과와 완전히 독립된 결과라고는 말할 수 없다.

주 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)는 T 림프구에 의해 인식되는 펩티드-결합 분자를 지정하는 고도로 다형인 유전자를 포함하고 있는 커다란 유전자 좌이다. 구조적으로 두 개의 독특한 유형의 MHC 분자가 있는데(class I, class II), MHC class II 분자는 주로 전문적 항원제시세포(큰포식세포, 수지상 세포, B 세포)에서 발견되고, 세포 내 이입(endocytosis)된 단백질로부터 유래된 펩티드와 결합하며, CD4<sup>+</sup> T 세포에 의해 인식되어 면역작용을 나타낸다. 세포 매개성 면역는 주로 세포 내 기생 세균, 기생충 알레르겐에 의해 반응하는 것으로 알려져 있다(강 등, 2004). 자궁내막염에서 MHC class II 항원의 감소는 자궁내막염이 CD4<sup>+</sup>의 작용보다 CD8<sup>+</sup>의 작용에 의한 반응으로 진행되는 것을 시사한다. BSP는 뼈, 상아질, 시멘트질 및 석회질로 된 연골과 같은 광물이 함유된 조직에서 풍부하게 발현하는 비아교질 당단백질이다. BSP는 인회석 크리스탈 생성과 뼈모세포 분화를 직접적으로 촉진시키는 기질과 관계된 신호에 작용하여 광물화된 기질 생산을 증가시켰다(Gordon 등, 2007). 뼈끝 연골(growth plate, epiphyseal cartilage)의 방사선 조사는 BSP의 상승과 metalloproteinases의 감소를 보였다(Zhang 등, 2007). UTMP는 프로게스테론의 조절하에 있는 자궁내막에서 주로 분비되는 serine protease 억제제 그룹의 분비 단백질로서, 생식기관에서 발현량이 높게 나타나는데(Khatib 등, 2007), 그들의 잘 알려진 기능으로는 단백질 분해 억제, 수태물의 영양, 성장 조절, 그리고 모체 면역 체계를 억제하며, 분열 촉진 물질(mitogen)에 의한 림프구의 증식을 억제하고, 자궁의 면역기능을 조절하는 중요 인자로 설명되고 있다. 생쥐에 있어서는 유산을 막는 역할을 한다. UTMP mRNA는 발정기에 같은 쪽 자궁각 머리부에서 현저하게 증가되었는데, 발정 주기 동안 자궁내막의 변화를 조절하는데 관여할 것이라고 주장하였다(Bauersachs 등, 2005). 자궁내막염에서 UTMP 전구체의 감소는 빈식장애를 초래할 수 있다는 사실을 유추해볼 수 있다. 자궁내막염에서 colon cancer에서 감소하는 유전자가 확인되었다. 그리고 세포내 이입성(endocytic) 수용체 gp330은 여러 종류의 상피세포에서 발현되었으며 특히, 액체들이 채워지는 공간에 노출되는 상피는 꼭대기쪽 표면에서 발현되어 세포내 이입을 중재하여 염증, 암, 상처치유를 조절하는 것으로 보고하였다(Piccard 등, 2007). 자궁내막 상피세포에서 gp330의 발현은 세포내 이입 현상에 의한 분비를 조절할 것으로 기대

된다. Dkk-1 유전자는 포유동물세포에서 DNA 손상의 주요 인자로 작용하는 종양억제단백질인 p53의 전사목표물(transcriptional target)이다. p53 발현의 증가는 DNA의 손상으로부터 회복을 촉진한다. 남성호르몬(androgen)에 의해 dkk-1은 세포 사멸을 유도하고 여러 종류의 암세포 증식을 촉진하였다(Kwack 등, 2007; Liu 등, 2007). CFH는 간에서 합성되는 혈장 단백질의 하나로써 자궁내막염에서 감소하였다. 착상시에는 임신성 혈장 단백질과 자궁내막 단백질이 생산되는데, 이러한 결과로 자궁내막염에서 혈장 단백질이 감소할 수 있을 것 같다. CAPS는 신경내분비성 세포의 특이 단백질로서 세포막과 조밀중심소포(dense-core vesicle)의 칼슘 의존성 융합에 필요하다(Spees 등, 2007). ULBP는 사람의 CMV 당단백, UL16의 목표물인 MHC class I 관련 분자의 특이 그룹이다. ULBP는 종양세포에 의해 빈번하게 발현하며, 자연 살해세포(natural killer cells)의 독성을 증대한다고 알려져 있다. PENK는 아편유사제(opioid) 유전자로서 성숙 신경계 및 신경내분비계에서 광범위하게 발현하고 특히, 기관이 분화하는 동안 배아중간엽 조직(embryonic mesenchymal tissues)에서 발현율이 높았다. 출생 직후에는 그들의 발현율은 현저히 낮았다(Rosen 등, 1995). 핵단백질 PENK는 p53의 과발현 및 활성화에 반응하여 세포 사멸 유도에 필요한 것으로 보고되고 있다(McTavish 등, 2007).

지금까지 자궁내막염에서 보고된 변화·조절되는 유전자들 뿐만 아니라 새로운 유전자들의 변화를 본 연구에서 조사하였다. 이들 유전자의 발현 변화를 단백질 수준에서 재검토한 후 유용한 유전자의 검색이 필요하겠지만, 본 연구에 제시된 유전자들은 상위 조절되는 20개의 유전자로서 그리고 대부분이 세포의 사멸, 증식 및 염증과 관련되어 있으므로 본 연구 결과를 잘 활용한다면 자궁내막염에서의 유전자 변이 및 병태생리를 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 그리고 본 연구의 결과는 자궁내막염에 있어서 유용한 생물지표(biomarker)를 찾는 데 도움이 될 것이다.

## 인용문헌

1. Broer A, Tietze N, Kowalczyk S, Chubb S, Munzinger M, Bak LK, Broer S (2006): The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2). *Biochem J* 393(Pt 1):421-430.
2. Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Einspanier R, Wenigerkind H, Vermehren M, Blum H, Sinowatz F, Wolf E (2005): Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J Mol Endocrinol* 34(3): 889-908.
3. Farmer MK, Robbins MJ, Medhurst AD, Campbell DA, Ellington K, Duckworth M, Brown AM, Middlemiss DN, Price GW, Pangalos MN (2000): Cloning and characterization of human NTT5 and v7-3: two orphan transporters of the Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent

- neurotransmitter transporter gene family. *Genomics* 70:241-252.
4. Fischer C, Drillich M, Gabler C, Heuwieser W, Einspanier R (2006): Postpartum reproductive failure in cattle: is the examination of the gene expression in the bovine endometrium a way to success? *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119:197-202.
  5. Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thøgersen IB, Hughes C, Caterson B, Nagase H (2007): Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem* 282:18294-18306.
  6. Gordon JA, Tye CE, Sampiao AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA (2007): Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. *Bone* 41:462-473.
  7. Ishii T, Onda H, Tanigawa A, Ohshima S, Fujiwara H, Mima T, Katada Y, Deguchi H, Suemura M, Miyake T, Miyatake K, Kawase I, Zhao H, Tomiyama Y, Saeki Y, Nojima H (2005): Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *DNA Res* 12:429-439.
  8. Ishizaki H, Togawa A, Tanaka-Okamoto M, Hori K, Nishimura M, Hamaguchi A, Imai T, Takai Y, Miyoshi J (2006): Defective chemokine-directed lymphocyte migration and development in the absence of Rho guanosine diphosphate-dissociation inhibitors alpha and beta. *J Immunol* 177:8512-8521.
  9. Jackson RS 2nd, Cho YJ, Liang P (2006): TIS11D is a candidate pro-apoptotic p53 target gene. *Cell Cycle* 5:2889-2893.
  10. Khatib H, Schutzkus V, Chang YM, Rosa GJ (2007): Pattern of expression of the uterine milk protein gene and its association with productive life in dairy cattle. *J Dairy Sci* 90:2427-2433.
  11. Kim IH, Na KJ, Yang MP (2005): Immune responses during the peripartum period in dairy cow with postpartum endometritis. *J Reprod Dev* 51:757-764.
  12. Kwack MH, Sung YK, Chung EJ, Im SU, Ahn JS, Kim MK, Kim JC (2007): Dihydrotestosterone-inducible Dickkopf 1 from balding dermal papilla cells causes apoptosis in follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol*, in press.
  13. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarzski M, Voelker M, Schuppan D (2006): Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 12:3338-3343.
  14. Leung ST, Cheng Z, Sheldrick EL, Derecka K, Derecka K, Flint AP, Wathes DC (2001): The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1alpha, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. *J Endocrinol* 168:497-508.
  15. López-Pedreira C, Villalba JM, Siendones E, Barbarroja N, Gómez-Díaz C, Rodríguez-Ariza A, Buendía P, Torres A, Velasco F (2006): Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* 6 (Suppl 1):S293-299.
  16. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Liu G, Aaronson SA, Levine AC (2007): Androgen-induced Wnt signaling in preosteoblasts promotes the growth of MDA-PCa-2b human prostate cancer cells. *Cancer Res* 67:5747-5753.
  17. McTavish N, Copeland LA, Saville MK, Perkins ND, Spruce BA (2007): Proenkephalin assists stress-activated apoptosis through transcriptional repression of NF-kappaB- and p53-regulated gene targets. 1: *Cell Death Differ* 14:1700-1710.
  18. Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Petersen OW (2002): Identification of EPSTI1, a novel gene induced by epithelial-stromal interaction in human breast cancer. *Genomics* 79:703-710.
  19. Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H, Takahashi T (2005): Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta* 1751:95-109.
  20. Piccard H, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007): Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukoc Biol* 81:870-892.
  21. Reimer J, Bien S, Sonnemann J, Beck JF, Wieland T, Kroemer HK, Ritter CA (2007): Reduced expression of Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor-alpha modulates the cytotoxic effect of busulfan in HEK293 cells. *Anticancer Drugs* 18:333-340.
  22. Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E (2005): Amino acid-stimulated Ca<sup>2+</sup> oscillations produced by the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G12, Rho, filament-A, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 280:22875-22882.
  23. Ramos SB, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F, Blackshear PJ (2004): The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* 131:4883-4893.
  24. Rosen H, Krichevsky A, Polakiewicz RD, Benzakine S, Bar-Shavit Z (1995): Developmental regulation of proenkephalin gene expression in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 9:1621-1631.
  25. Sakata K, Shimada S, Yamashita T, Inoue K, Tohyama M (1999): Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant. *FEBS Lett* 443:267-270.
  26. Soboleva GM, Shurshalina AV, Sukhikh GT (2006): Serum activity of matrix metalloproteinases -2 and -9. *Bull Exp Biol Med* 141:247-9.
  27. Song L, Ye M, Troyanovskaya M, Wilk E, Wilk S, Healy DP (1994): Rat kidney glutamyl aminope-

- ptidase (aminopeptidase A): molecular identity and cellular localization. *Am J Physiol* 267(Pt 2):F546-557.
28. Speese S, Petrie M, Schuske K, Ailion M, Ann K, Iwasaki K, Jorgensen EM, Martin TF (2007): UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 27:6150-6162.
  29. Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Maréchal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Böck W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfützer R, Löhr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Güldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Férec C (2006): A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet* 38:668-673.
  30. Zhang M, Wang Y, Middleton FA, Horton JA, Farnum CE, Damron TA (2007): Growth plate zonal microarray analysis shows upregulation of extracellular matrix genes and downregulation of metalloproteinases and cathepsins following irradiation. *Calcif Tissue Int* 81:26-38.
  31. 강재성 외 31명 (2004) 구조적적합성 복합체, 세포분자면역학, 5판, 범문사:65-80.
  32. 이정문 (2003): 유전알고리즘을 이용한 마이크로어레이 표분류에 유용한 유전자 선택. 서울대학교 대학원 석사학위논문.  
(접수일자: 2007. 8. 19 / 채택일자: 2007. 9. 17)