

자궁근종과 자궁평활근 세포분열에 있어 Interferon- α 및 basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)의 효과

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

이병석 · 박정식 · 김진영 · 배상욱 · 박기현 · 조동제 · 이 국 · 김재욱 · 송찬호

The Effect of Interferon- α and bFGF on the Proliferation of Cultured Leiomyoma and Myometrial Cells

B.S. Lee, J.S. Park, J.Y. Kim, S.W. Bae, K.H. Park, D.J. Cho, K. Lee,
J.W. Kim and C.H. Song

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

= Abstract =

Leiomyomas, which are the commonest pelvic tumors in women, are originated from myometrial cells. Although the exact initial pathophysiologic event of the leiomyoma is not known, recent evidences suggested that the effects of sex steroid hormones in the process of tumor growth are mediated by local production of growth factors including epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor-II (IGF-II). If we look at the effects of other cytokines, it was suggested that basic fibroblast growth factor (bFGF) may stimulate the proliferation of myometrial and leiomyomas cells. And it was reported that interferon- α inhibit the action of bFGF. Therefore, we examined the effect of bFGF and interferon- α on the proliferation of leiomyoma and myometrial cells. bFGF stimulated the myometrial and leiomyoma cells significantly at the concentration of 1ng/ml ($p<0.05$) and 5ng/ml ($p<0.05$). However, Interferon- α inhibited the cell proliferation of myometrial and leiomyoma cells significantly at the concentration of 100U/ml ($p<0.05$) and 1000U/ml ($p<0.05$). And the stimulated effects of bFGF with the various concentration on the myometrial and leiomyoma cells were inhibited by interferon- α with 100U/ml. Therefore, we concluded that bFGF may stimulate the myometrial and leiomyoma cell proliferation and interferon- α may inhibit the myometrial and leiomyoma cell proliferation through blocking the effect of basic fibroblast growth factor.

Key Words: Leiomyoma, Myometrium, Basic fibroblast growth factor, Interferon-alfa

서 론

자궁근종은 자궁평활근 세포에서 기원되는 종양으로 여성의 25%에서 발생하며 이로인해 많은 여성에서 불임, 유산, 자궁출혈, 통증 등을 유발한다. 그러나 아직 자궁근종의 병태생리학적

기전은 확실치 않으며 특히 세포 및 분자생물학적 측면에서의 연구는 아직 미진한 상태이다. 자궁근종의 생성이 어떻게 시작되는지 알 수 없으나 여성호르몬인 estrogen과 progesterone이 근종의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Farber *et al*, 1972; Wilson *et al*, 1980; Buttram *et al*, 1986; Fisher *et al*, 1990). 이러한 여성호르몬의

효과는 국소적으로 생성되는 성장인자들에 영향을 주어 그 효과가 발휘되는 것으로 인지되고 있다 (Fisher *et al*, 1990). 특히 epidermal growth factor (EGF)와 Insulin-like growth factor-I (IGF-I), transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 자궁근종 성장에 많이 관여 하는 것으로 알려져 있다 (Harrison-Woolrych *et al*, 1994; Vollenhoven *et al*, 1993; Vollenhoven *et al*, 1995). 또한 basic FGF는 자궁평활근과 자궁근종 세포의 분열을 자극시키는 것으로 알려져 있어 bFGF도 자궁근종의 성장에 중요한 역할을 하리라 생각된다. Basic FGF는 세포분열, 분화 및 증배업 기원의 조직의 성장에 관여하며 (Rifkin & Moscatelli, 1989) bFGF는 이미 인간의 자궁평활근과 자궁근종에서 세포증식 효과가 있음을 보여주었다 (Rauk *et al*, 1995).

Interferon family는 interferon- α , β , γ 등 3개로 구성되어 있으며 세포의 성장, 분화를 조절하며 oncogene 발현의 제한, 그리고 host immunity를 조절하는 기능을 가지고 있다 (Gutterman, 1994). 특히 최근 interferon- α 와 β 는 vascular tumor의 퇴행을 유발하는 것으로 알려져 있으며 (Real *et al*, 1986; Ezekowitz *et al*, 1992) 그 기전은 아직 확실하지 않으나 bFGF의 유전자 및 단백질 발현을 억제하는 것으로 보고되었다 (Singh *et al*, 1995).

따라서 본 연구에서는 자궁평활근 및 자궁근종 세포에서 bFGF 및 interferon- α 의 세포분열에 대한 효과를 조사하고 bFGF와 interferon- α 의 상호작용을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1) 환자

자궁 평활근과 자궁근종 조직은 12명의 폐경전 여성으로 자궁근종으로 인해 전자궁적출술을 받은 환자에서 채취하였으며 이들 환자들은 최근 3개월 동안 약물이나 홀몬 치료를 받지 않은 환자들이었다.

2) 세포배양

자궁평활근과 자궁근종 조직을 잘게 썰은 후 200unit/ml의 collagenase (Gibco-BRL Grand Island, NY)가 함유된 Dulbacco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Whittaker Bioproducts, Walkersville, HO)에 담아 shaking incubator에 약 14~18시간 동안 37°C에서 배양 후 centrifuge하였으며 collagenase

가 함유된 배양액을 제거하고 10% fetal bovine serum이 (FBS; Hyclone, Logan UT) 함유된 DMEM 배양액 하에 75ml 배양기에 분주 하였다.

그후 세포가 자란 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액하에 500,000 cells/dish를 분주 후 confluency가 약 80%가 되었을 때 세포를 획득하여 96 well에 12,000 cells/well를 분주하였다.

3) Thymidine incorporation assay

각 well에 분주된 세포들은 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액에 48시간 배양 후 0.5% FBS가 함유된 DMEM 배양액에 24시간 배양 후 bFGF를 0, 0.1, 0.5, 1, 5ng/ml 되도록, interferon- α 는 0, 10, 100, 1000U/ml이 되도록 첨가하고 18시간 후 0.02 μ ci/ml의 [3 H]-thymidine을 배양액에 첨가하여 6시간 동안 배양 후 각 well의 세포를 획득하여 β -counter로 radioactivity를 측정하였다.

4) 통계

통계적 분석은 two-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하였고 ANOVA 후 pairwise 비교를 위해 contrasts를 사용하였다.

결 과

bFGF를 배양액에 첨가하였을 때 농도변화에 따라 자궁평활근과 자궁근종세포의 thymidine uptake가 증가함을 관찰할 수 있었다. bFGF의 농도가 자궁평활근 배양세포에서 0.1ng/ml, 0.5ng/ml 시 108%, 130%로 약간의 thymidine uptake가 증가되어 있었으나 통계적으로 의의는 없었으며 1ng/ml시에는 154%로 가장 많이 증가하였고 ($p < 0.05$) 5ng/ml시에는 145%로 역시 의의있게 증가하였다 ($p < 0.05$). 자궁근종배양세포에 있어서는 0.1ng/ml, 0.5ng/ml시에는 통계적으로 의의있는 증가는 없었으며, 1ng/ml시에는 142% ($p < 0.05$), 5ng/ml시에는 138% ($p < 0.05$)로 모두 통계적으로 의의있게 증가하였다 (Fig. 1).

Interferon- α 는 첨가 배양액 농도가 10 μ /ml시에는 자궁평활근세포와 자궁근종세포에서 모두 thymidine uptake가 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었으며 100 μ /ml시에는 자궁평활근세포에서는 56% ($p < 0.05$), 자궁근종세포에서는 67% ($p < 0.05$)로 모두 의의있게 thymidine uptake가 감소하였다. 1000 μ /ml에서는 자궁평활근세포에

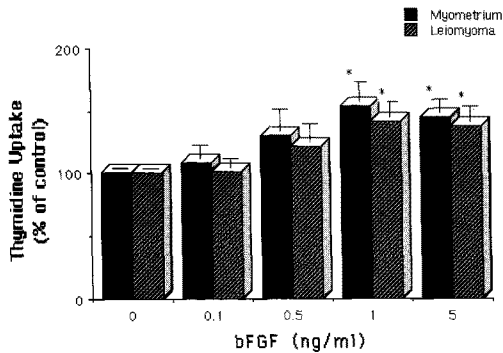


Fig. 1. Effect of basic FGF in various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1.5ng/ml) on thymidine uptake in myometrium, leiomyoma cells. The effect of an thymidine incorporation was expressed with % of control of 0ng/ml value (baseline radioactivity). The DNA synthesis was significantly stimulated in 1 ng/ml ($p < 0.05$) and 5 ng/ml ($p < 0.05$) in myometrial and leiomyoma cells. Each bar represents mean \pm SD.

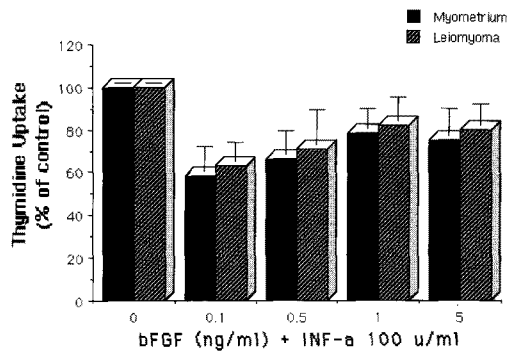


Fig. 3. Effect of basic FGF in various concentrations (0, 0.1, 0.5, 1.5ng/ml) with 100U/ml of interferon- α on thymidine incorporation. The value was expressed with % of control. The stimulated DNA synthesis with basic FGF was inhibited with 100U/ml of interferon- α in myometrium and leiomyoma cells. Each bar represents mean \pm SD.

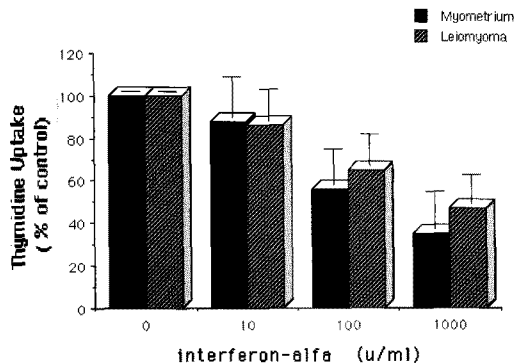


Fig. 2. Effect of Interferon- α in various concentrations (0, 10, 100, 1000U/ml) on thymidine uptake of myometrial and leiomyoma cells. The effect of an thymidine incorporation was expressed with % of control of 0U/ml value (baseline radioactivity). The DNA synthesis was significantly inhibited in 100U/ml ($p < 0.05$) and 1000U/ml ($p < 0.05$) in myometrium and leiomyoma cells. Each bar represents mean \pm SD.

서 37% ($p < 0.05$), 자궁근종세포에서 49% ($p < 0.05$)로 역시 모두에서 유의있게 감소하였다 (Fig. 2).

농도변화에 따른 bFGF와 Interferon- α 100 μ /ml을 같이 배양하였을 때 bFGF의 농도가 0.1ng/ml의 경우 자궁평활근세포와 자궁근종세포의 thymidine uptake가 58%, 63%로 감소되었고 0.5ng/ml시에는 66%, 71%, 1ng/ml시에는 80%, 81% 그리고 5ng/ml 시에는 75%, 80%로 bFGF에 의한 증가된 thymidine uptake가 interferon- α 에 의해 방지되는 것을 관찰할 수 있다 (Fig. 3).

고찰

종양주위의 새로운 혈관 형성인 angiogenesis는 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다 (Folkman, 1995). 혈관분포의 정도는 암의 파급 및 침윤 정도와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 혈관형성에 관여하는 물질중의 하나로 특히 bFGF가 관여하는 것으로 알려져 있다.

자궁평활근과 자궁근종을 대상으로 한 본 연구에서 bFGF는 자궁평활근과 자궁근종세포에서 세포의 DNA 합성을 증가시키므로써 bFGF도 자궁근종의 성장에 관여할 것으로 추측된다. 특히 인간의 자궁평활근에서 bFGF의 specific binding factor가 있는 것으로 보고되었고 (Cardo *et al*, 1990), 또한 bFGF는 이미 중배엽 기원의 조직인 평활근, 위장관근육, 심장근육, neuroectoderm 등에서 mitogen으로 작용한다는 것이 밝혀졌다 (Rifkin & Moscatelli, 1989). 따라서 이러한 결과는 본 논문의 결과를 뒷받침하는 증거가 될 수 있다. 그러나 Becker와 Garner (1992)는 쥐의 자궁평활근에서는 bFGF가 thymidine uptake를 증가시키지 못한다는 보고를 한 바 있다. 종(種)이 다르고 세포 배양액 성분중 insulin을 제거한 것이 달라 비교한다는 것이 어렵다고 할 수 있다. 본 연구에서 bFGF가 dose를 증가시킬수록 세포증식이 증가하나 1ng/ml과 5ng/ml은 큰 차이가 없음을 보여주므로써 비록 본 연구에서 자궁평활근 및 자궁근종세포에서 bFGF의 binding study는 하지 않았으

나 아마도 1ng/ml 이상에서는 receptor binding affinity가 plateau를 나타내는 것으로 추측이 된다. 본 연구에서는 bFGF에 대한 자극에 의해 DNA 합성이 자궁근종세포보다 자궁평활근세포에서 증가하는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 Rauk 등 (1995)이 보고한 결과와 비슷하며 Fayed 등 (1989)은 EGF, insulin, platelet derived growth factor 등에 의한 DNA 합성이 match된 자궁근종세포보다 자궁평활근에서 증가하는 것을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 bFGF 수용체에 대한 실험을 하지 않았으나 Fayed 등 (1989)은 세포의 분열반응과 수용체 농도간의 상관관계가 없음을 보여주었다. 자궁근종세포에서 platelet-derived growth factor (PDGF), insulin, EGF에 대한 세포분열은 증가하며 또한 PDGF와 insulin의 수용체의 농도도 증가하나 EGF에 대한 수용체 농도는 낮은 상태로 유지됨을 보고하였다. 일반적으로 종양이 자라는데는 혈관공급이 필요하며 여러 가지 cytokine들이 혈관의 성장과 관련있는 것으로 보고되고 있다. 그중의 하나가 bFGF로 이러한 성장인자는 angiogenesis에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 이와같이 대부분의 성장인자들은 종양의 성장과 관계가 있으나 성장을 억제하는 인자들은 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나 interferon α 와 β 는 bFGF의 유전자 발현 및 생성을 감소시켜 종양세포의 분열을 억제하는 것으로 보고되었다 (Singh *et al*, 1995). 본 논문에서도 interferon α 는 자궁평활근세포와 자궁근종세포에서 용량에 따라 세포의 DNA 합성을 감소시켰으며 자궁근종보다는 자궁평활근에서 더 감소시키는 경향을 보였다. 또한 bFGF와 interferon α 를 같이 첨가하였을 때 interferon α 는 bFGF의 세포분열 효과를 의의있게 억제시켰다. 따라서 interferon α 는 자궁평활근 및 자궁근종세포의 분열을 억제하며 자궁근종의 치료제로도 활용해 볼 수 있으리라고 사료된다. 또한 추후 배양액 내에 bFGF의 농도와 transcriptional level에서의 bFGF mRNA level을 측정하여 변화가 있는지를 확인하여 interferon- α 가 bFGF의 protein level과 transcriptional level에서도 영향을 미치는지를 알아보아야 할 것이다.

결 론

자궁평활근 및 자궁근종 배양세포에서 bFGF

는 DNA 합성을 모두 의의있게 증가시켰으나 자궁근종 세포보다는 자궁평활근에서 다소 DNA 합성이 증가되었으며 반면에 interferon- α 는 DNA 합성을 두 세포군에서 모두 감소시켰다. 또한 interferon- α 는 bFGF의 두 세포군의 DNA 합성 증진 효과를 감소시키므로서 아마도 interferon- α 의 세포분열 억제효과는 bFGF의 기능 및 합성을 억제하므로서 나타나는 것으로 사료되는 바이다.

인 용 문 헌

- Beck CA, Garner CW: Stimulation of DNA synthesis in rat uterine cells by growth factors and uterine extracts. *Mol Cell Endocrinol* 1992, 84, 109-18.
- Buttram VC, Reiter RC: Uterine leiomyoma: etiology, symptomatology and management. *Fertil Steril* 1981, 36, 433.
- Carlone DL, Rider V: Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus. *Biol Reprod* 1993, 49, 653-65.
- Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z: Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 1990, 63, 832-40.
- Ezekowitz RAB, Mulliken JB & Folkman JN: *Engl J Med* 1992, 326, 1456-1463.
- Farber M, Conrad S, Heinrichs NL, et al: Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium. *Obstet Gynecol* 1972, 40, 479.
- Fayed YM, Tsibris JCM, Langenberg PW, Rwbertson AL: Human uterine leiomyoma cells: Binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin. *Lab Invest* 1989, 60, 30-7.
- Fisher DA, Lakshmanan J: Metabolism and effects of epidermal growth factor and their related growth factor in mammals. *Endocr Rev* 1990, 11, 418.
- Folkman, J: Angiogenesis in cancer, vascular, Rheumatoid and other diseases. 1995, 1, 27-31.
- Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. 1994, 91(4), 1198-1205.
- Harrison-Woolrych ML, Chamock-Jones DS, Smith SK: Quantification of messenger ribonucleic acid

- for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyoma using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78, 1179.
- Phillip N Rauk, Urvashi Surti: Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor and estradiol on cultured human myometrial and leiomyoma cells: *Am J Obstet Gynecol* 1995, 173, 571-577.
- Rakesh K Singh, Mordechai Gutman, Corazon D Bucana, Ricardo Sanchez: Norma Liansa interferon alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 4562-4566.
- Real FS, Oettgen HF & Krown SE: Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome: treatment with high and low doses of recombinant leukocyte. *A Interferon* 1986, 4(4), 544-551.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ: Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992, 395, 550-1.
- Rifkin DB, Moscatelli D: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989, 109, 1-6.
- Vollenhoven BJ, Herington AC, Hwaly DL: Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in uterine fibroids and myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1995, 40, 120.
- White CW, Sondheimer HM, Crouch EC, Wilson H & Fan LL N: *Engl J Med* 1989, 320, 1197-1200.
- Wilson EA, Yang F, Rees ED: Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyoma and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol* 1980, 55, 20.
-