: 31 4 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 4, 2004, 12

난포자극호르몬이 인간의 자궁 기질세포의 유전자 발현 양상에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실[1], 산부인과[2],
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실[3]

최혜원[1] · 전진현[1*] · 이형송[1] · 홍인선[3] · 강경선[3] · 궁미경[2]

Alteration of Gene Expressions in Human Endometrial Stromal Cells by Exogeneous FSH Treatments

Hye Won Choi[1], Jin Hyun Jun[1*], Hyoung Song Lee[1], In-Sun Hong[3], Kyung-Sun Kang[3], Mi Kyoung Koong[2]

[1]Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, [2]Department of Ob/Gyn, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seou, Korea
[3]Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Objective: To evaluate the effects of recombinant FSH (rFSH) and urinary FSH (uFSH) on the gene expressions of human endometrial stromal cells *in vitro*.

Methods: Endometrial tissue was obtained from a pre-menopausal women undergoing hysterectomy. Primary endometrial stromal cells were isolated and *in vitro* cultured with FBS-free DMEM/F-12 containing 0, 10, 100, and 1,000 mIU/ml of rFSH and uFSH for 48 hours, respectively. Total RNA was extracted from the cultured cells and subjected to real time RT-PCR for the quantitative analysis of *progesterone receptor* (PR), *estrogen receptor* α/β (ER-α/β), cyclooxygenase 2 (Cox-2), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *homeobox A10-1 and -2* (HoxA10-1/-2).

Results: Both hormone treatments slightly increased (< 3 folds) the expressions of PR, ER-β and HoxA10-1/-2 gene. However, ER-α expression was increased up to five folds by treatments of both FSH for 48 hours. The LIF expression by the 10 mIU/ml of uFSH for 12 hours was significantly higher than that of rFSH ($p<0.01$). After 24 hours treatment of two kinds of hormones, the expression patterns of LIF were similar. The 100 and 1,000 mIU/ml of rFSH induced significantly higher amount of Cox-2 expression than those of uFSH, respectively ($p<0.05$).

Conclusion: This study represents no adversely effect of exogeneous gonadotropins, rFSH and uFSH, on the expression of implantation related genes. We suggest that rFSH is applicable for the assisted reproductive technology without any concern on the endometrial receptivity.

Key Words: Recombinant FSH, Urinary FSH, Endometrial stromal cell, Implantation related genes, Endometrial receptivity

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 02-2000-7590, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: junjh55@hanmail.net
*본 연구는 Organon 사의 연구비 지원 (GL 071)으로 수행되었습니다.

난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)을 이용한 과배란 유도는 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART)에서 다수의 양질의 난자를 획득하기 위해 광범위하게 사용되어 왔다. 초창기에는 폐경 여성의 소변에서 분리, 정제한 urinary FSH (uFSH)가 사용되었으며, 최근에는 분자생물학적 방법을 이용하여 제조한 recombinant FSH (rFSH)가 효과적으로 이용되고 있다.[1~3] 두 가지 FSH의 차이점은 uFSH의 분리, 정제과정에서 잔존할 수 있는 황체화호르몬 (luteinizing hormone, LH)과 같은 생체활성 물질의 포함 여부와 FSH 활성도의 항상성 (consistency)에 대한 것들이 있을 수 있다.

일반적으로 FSH에 대한 수용체 (FSH receptor, FSH-R)와 LH에 대한 수용체 (LH receptor, LH-R)는 난소에 존재하며 난포와 난자의 성장과 성숙 그리고 황체기의 유지에 있어 매우 중요한 역할을 수행하고 있다.[4,5] 근래에 발표된 논문들에서 난소 이외에 자궁의 근육층, 혈관세포, 기질세포, 상피세포뿐만 아니라 난자와 초기 배아 등에서도 FSH-R와 LH-R 발현이 관찰되며, 이들이 FSH 또는 LH에 반응하여 여러 가지 생리학적인 변화를 나타내는 것으로 보고되었다.[6~9] 특히, 인간 자궁 기질세포의 체외배양 과정에서 LH-R에 결합하는 것으로 알려져 있는 융모막호르몬 (chorionic gonadotropin, CG)을 처리하면 탈락막현상 (decidualization)이 유발되고 prolactin과 cyclooxygenase-2 (Cox-2)의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 보고되었다.[10,11]

최근 여러 연구자들에 의해 과배란 유도과정과 임상에서의 임신율 등에서 그 효용성이 확인된 rFSH의 사용 범위가 계속해서 확대되어 가고 있다.[1~3] 그러나 일부의 연구자들은 uFSH에 존재하고 있는 LH와 같은 생체 활성 물질이 난자의 성숙과 자궁의 착상과정에 영향을 줄 수 있으며, 이와 같은 rFSH의 상이함으로 인해 나타날 수 있는 임상에서의 차이점에 대한 가능성을 제시하였다.[12~14]

현재까지 보조생식술의 과배란 유도과정에서 과량으로 사용되는 FSH에 의한 직접적인 자궁의 변화와 uFSH와 rFSH의 조성 차이에 의한 상이한 반응에 대한 연구가 많이 진행되지는 못하였다.[15] 따라서, 본 연구에서는 폐경기 이전의 자궁에서 분리한 기질세포를 체외배양하면서 rFSH와 uFSH를 처리하여, 이들이 착상과 관련된 유전자의 발현 양상에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보았다.

연구 대상 및 방법

1. 자궁 조직의 획득과 기질세포의 분리 및 배양

자궁 조직으로부터의 기질세포의 분리 및 배양은 Julia 등과 홍 등이 보고한 방법을 이용하였다.[16,17] 자궁의 이상이 아닌 다른 원인으로 자궁적출술을 시행하는 환자의 자궁 조직에서 일부의 조직 (2×3 cm)을 절개한 후 기본배양액 (M199/F-12 medium; Gibco Life Technologies, MD, USA)으로 수세하였다. 자궁 조직을 멸균된 해부기구를 사용하여 1~2 mm^2로 조각낸 후 기본배양액에 collagenase (2 mg/ml; Sigma, MO, USA)를 첨가하여 2~3시간 동안 처리하였다. 이렇게 효소를 처리하여 분리한 세포들을 두 종류의 wire sieve (140 μm, 37 μm; Newark Wire Co., NJ, USA)를 이용하여 선별하였다. 기본배양액으로 수세하는 과정에서 sieve를 통과한 세포를 포함한 배양액을 원심분리하여 기질세포를 수획하였다. 이렇게 분리된 세포들은 기본배양액에 10% fetal bovine serum (FBS), insulin, transferring, selenium, bovine serum albumin, linoleic acid 등을 첨가하여 배양하였으며, 배양액은 2~3일 주기로 교체하였다.

2. 기질세포 확인을 위한 세포면역화학 염색

배양 중인 기질세포의 분리 효율성을 확인하기 위해 상피세포 특이적인 cytokeratin과 기질세포 특이적인 vimentin에 대한 세포면역화학 염색 (immunocytochemical staining)을 실시하였다. 세포를 고정하기 위해 3.7% formaldehyde-PBS를 10분 동안 처리하고, 100% methanol과 100% acetone으로 각각 10분과 5분 처리한 후, 0.4% Triton X-100-PBS를 10분 동안 처리하여 세포막을 연화시켰다. 비특이적인 염색을 방지하기 위해 2% goat serum과 4% bovine serum albumin이 첨가된 PBS를 1시간 동안 처리하였다. 일차 항체로는 cytokeratin 8/18 (Santa Cruz Biotech., CA, USA)과 vimentin (chemicon, CA, USA)을 1:100으로 희석하여 1시간 동안 처리하였으며, PBS로 수세한 후에 이차 항체로는 FITC conjugated anti-mouse IgG (Zymed Lab. Inc., CA, USA)을 1:100으로

희석하여 1시간 동안 처리하였다. 염색된 시료는 anti-fade mounting medium (Fisher Scientific, PA, USA)을 이용해 봉입하고 형광현미경으로 관찰하였다.

3. 배양 중인 자궁 기질세포에 난포자극호르몬(FSH)의 처리

배양 중인 기질세포들 가운데 증식 능력이 확인되고 기질세포의 비율이 95% 이상인 세포주를 선별하여 본 실험에 사용하였다. 혈청에 존재하는 여러 가지 물질들의 영향을 배제하기 위해 FBS를 첨가하지 않은 기본배양액에 insulin, estradiol, progesterone을 첨가하여 4~5일 정도 배양한 후에 FSH를 처리하였다. 대조군은 FSH를 첨가하지 않은 배양액에서 배양하였으며, 실험군은 rFSH (Puregon; Organon, Netherlands)와 uFSH (Metrodin HP; Serono, Switzerland)을 각각 10, 100, 1,000 mIU/ml의 농도로 첨가하여 12, 24, 48시간 동안 배양하였다. 실험군의 배양액은 FSH의 반감기를 고려하여 24시간을 주기로 교체하였다.

4. 유전자 발현 양상 분석을 위한 real time RT - PCR

각각의 배양 중인 시료에서 Qiagen RNeasy kit (Qiagen, WA, USA)를 사용하여 RNA를 추출하여, 분석하기 전까지 -70℃에 보관하였다. 동량의 RNA를 사용하여 M-MLV kit (Promega Co., WI, USA)로 역전사 반응을 수행한 후, 이들을 대상으로 착상 관련 유전자들의 발현 양상을 Dynamo kit (Finnzyme, Finland)와 DNA engine Opticon 2 fluorescence detection system (MJ Research, MA, USA)를 이용하여 real time RT-PCR 방법으로 분석하였다. 착상 관련 유전자들에 대한 정보와 primer들의 염기 서열은 Table 1에 나타내었다. 예비 실험을 통해 각각의 primer에 대한 real time PCR 조건을 최적화하였으며, internal control 유전자로는 β-actin을 이용하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 대조군에 대한 상대적인 정량분석

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions for implantation related genes

Genes	Forword primer Reverse Primer	Annealing Tm (℃)	Product size (bp)
PR	5'-GATTCAGAAGCCAGCCAGAG-3' 5'-AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC-3'	62	163
ER-α	5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3' 5'-GGTCTTTTCGTATCCCACCTTTC-3'	65	108
ER-β	5'-AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG-3' 5'-GACAGCGCAGAAGTGAGCATC-3'	65	143
Cox-2	5'-CTGGCTGAGGGAACACAACA-3' 5'-GCAATTTGCCTGGTGAATGA-3'	62	381
LIF	5'-GCTGTTGGTTCTGCACTGGA-3' 5'-TCCCCCTGGGCTGTGTAATA-3'	59	183
HoxA10-1	5'-GAGAAGGATTCCCTGGGCAA-3' 5'-TTCATCCTGCGGTTCTGAAA-3'	59	227
HoxA10-2	5'-GTGTCAAGGCAATTCCAAAG-3' 5'-CCGGTTTTCTCGATTCATTT-3'	59	247
β-actin	5'-TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3' 5'-GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC-3'	62	396

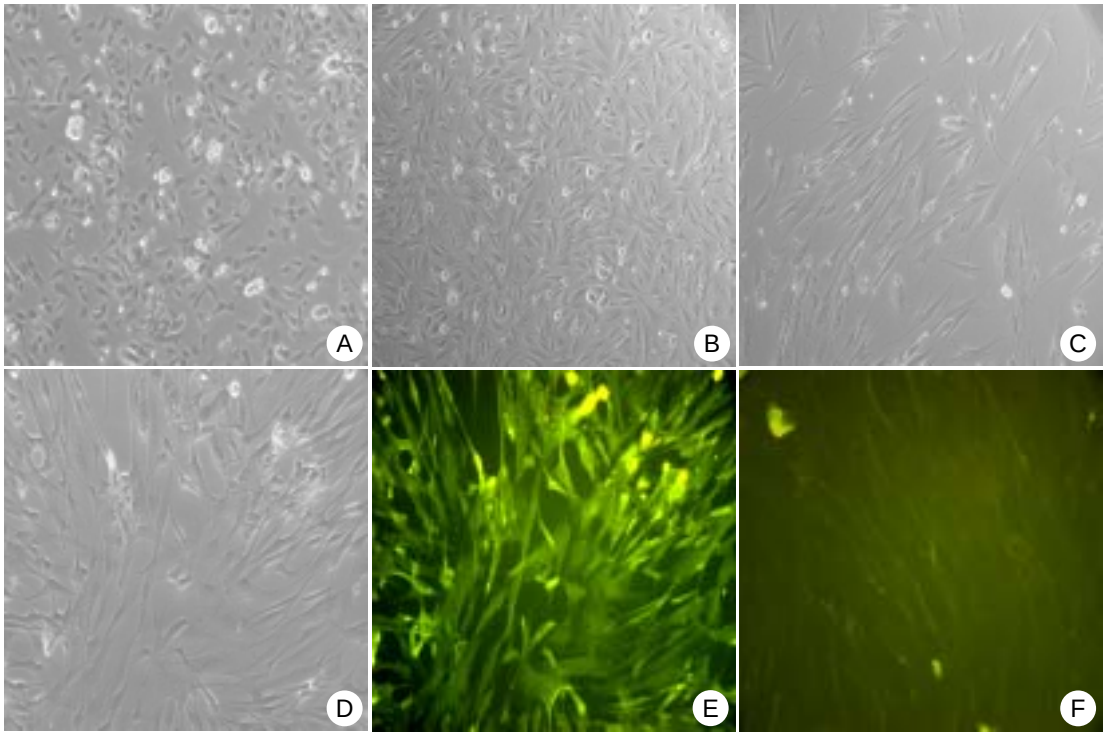

Figure 1. Morphological changes and immunocytochemical staining of endometrial stromal cells during *in vitro* culture. Early passage cells **(A)** were polygonal. It became more spindle-shaped in passage 3 **(B)** and more than passage 5 **(C)** of subculture. Stromal cells **(D)** was localized with the primary antibody to vimentin **(E)** and without the primary antibody **(F)**. Bar indicates 10 μm.

을 실시하였다.[18] 통계적인 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 p 값이 0.05 보다 작은 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 인간 자궁 기질세포의 분리 및 배양

자궁 조직으로부터 분리한 자궁 기질세포는 계대 배양 과정에서 초기에는 다각형의 형태를 나타내다가 계대가 지남에 따라 방추사형의 세포들로 그 형태가 변화되었다 (Figure 1). 이들의 특성을 확인하기 위해 기질세포에 특이적인 vimentin에 대한 세포면역화학 염색법을 실시하여 95% 이상의 세포들이 기질세포임을 확인하였다 (Figure 1). 또한, 배양 중인 기질세포에서 FSH-R와 LH-R의 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하였다 (data not shown).

2. 착상 관련 유전자 발현 양상의 변화

Real time RT-PCR 방법으로 분석한 FSH 처리에 따른 착상 관련 유전자 발현 양상은 Figure 2에 나타내었다. 대조군에 비해 1,000 mIU/ml의 FSH 처리군을 제외한 모든 실험군에서 착상 관련 유전자들의 발현 양이 증가하였으며, 그 양상은 rFSH와 uFSH에서 유사하게 나타났다. 그 증가가 3배 이하인 양상을 나타낸 유전자로는 PR, ER-β와 HoxA10-1/-2가 있었으며, 5배 이상 증가한 유전자로는 Cox-2가 관찰되었다. LIF는 10 mIU/ml의 uFSH를 12시간 동안 처리한 실험군에서 그 발현양이 rFSH 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났으나 ($p<0.01$), 24시간 이후와 100과 1,000 mIU/ml 처리군에서는 증가 양상이 비슷하였다. Cox-2 유전자는 100과 1,000 mIU/ml의 rFSH를 48시간 동안 처리하였을 때, 그 발현양이 uFSH에 비해 각각 통계적으

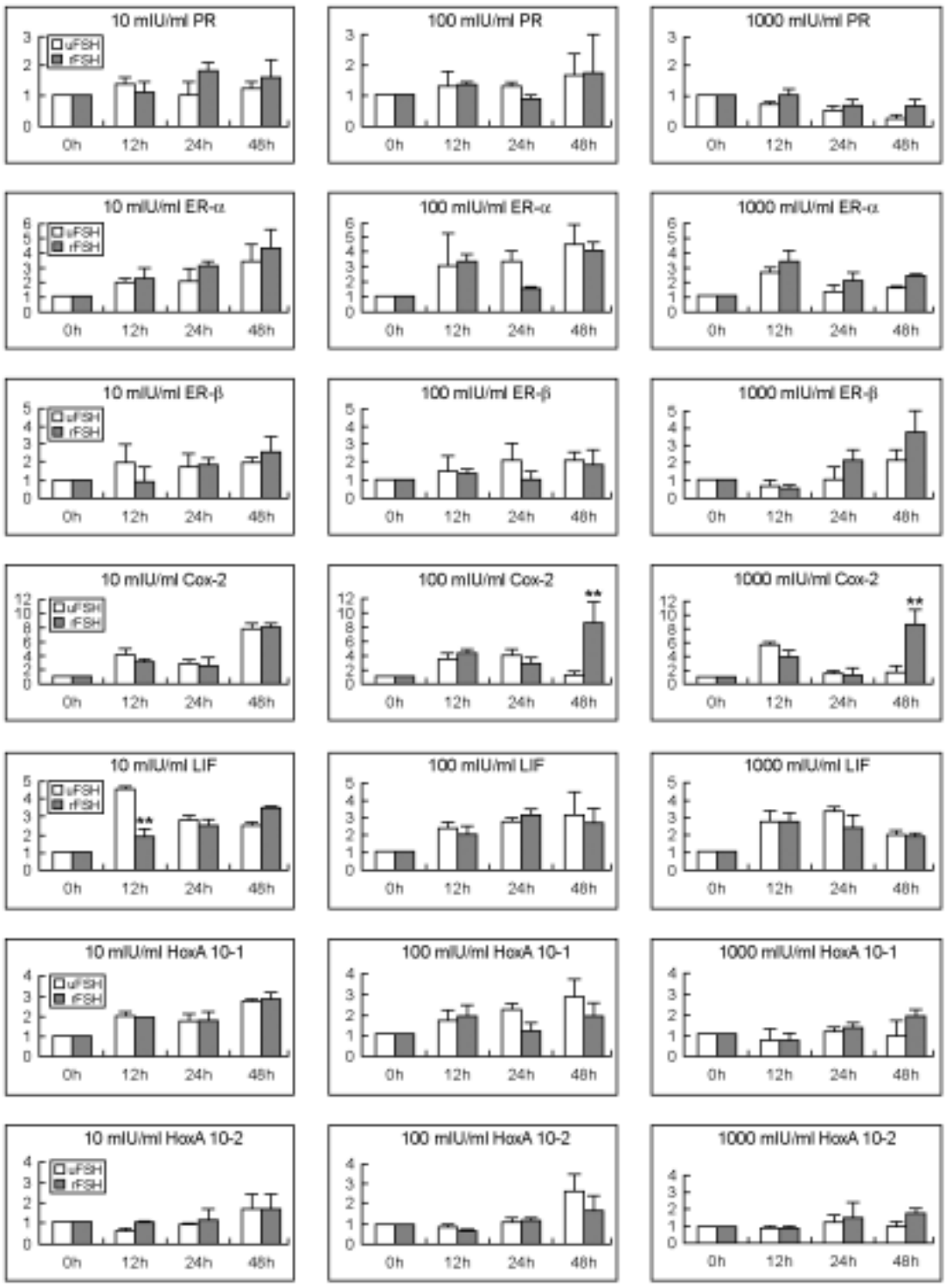

Figure 2. Effects of recombinant FSH and urinary FSH on the expression of implantation related genes by quantitative analysis using real time RT-PCR in human endometrial stromal cells. ** indicate the significant difference ($p<0.01$).

로 유의하게 증가하였다 ($p<0.01$).

고 찰

현재 인간의 보조생식술에서 광범위하게 이용되고 있는 FSH는 다수의 난자를 확보하기 위해 그 사용량이 생리적인 농도에 비해 과량으로 사용되고 있다. 따라서 이러한 과량의 FSH가 난소 또는 자궁에 직접 또는 간접적으로 좋지 않은 영향을 주어 자궁의 착상 능력을 저해할 수 있다는 의견이 제시되어 왔지만,[18~21] 이에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 자궁 기질세포를 체외배양하는 과정에서 rFSH와 uFSH를 처리하고 이들이 착상 관련 유전자의 발현 양상에 어떠한 영향을 주는 가를 살펴보았다. PR, ER-α/β, Cox-2, LIF, HoxA10-1/-2 등과 같이 착상과정과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 유전자들을 대상으로 하였다. 대부분의 유전자들의 발현 양은 FSH의 처리 시간에 따라 증가하였으며, 농도와는 크게 관련이 없는 것으로 나타났다. 그리고 rFSH와 uFSH의 처리군에서 대부분 유사한 발현 양상의 변화를 보여주었다 (Figure 2).

분석 대상 유전자 중에서 PR 유전자의 발현 양은 거의 증가하지 않았는데, 이는 일반적인 FSH의 특징 중의 하나인 난포 성장 및 성숙과정에서의 estrogen 관련 대사의 활성화와 ER 유전자의 발현 증가와 관련이 있을 것으로 생각된다. 착상과정에서 가장 중요한 유전자 중의 하나로 알려져 있는 LIF의 발현이 10 mIU/ml의 uFSH 12시간 처리군에서 통계적으로 유의하게 증가하였는데, 이는 uFSH에 포함되어 있는 LH성분에 의해 나타난 현상으로 사료된다. 시간이 지남에 따라 그 효과가 감소한 것은 LH-R의 발현양이 상대적으로 낮기 때문에 대부분의 LH-R들이 포화되어 이러한 경향이 나타난 것으로 생각된다. 본 연구에서 관찰된 rFSH에 의한 Cox-2 유전자의 발현 증가는 자궁 기질세포에 CG를 처리하면 progesterone과의 상승작용으로 탈락막 현상과 Cox-2 유전자의 발현이 증가한다는 보고와 유사한 기작을 통해 유발된 것으로 생각된다.[10,11]

또한, 근래에 rFSH를 사용한 과배란 유도 후에 자궁 조직에서의 HoxA10 유전자의 발현 양상이 과배란 유도를 시행하지 않은 대조군과 차이가 없고, 자궁에서 유래한 Ishikawa cell line을 이용한 체외배양 실험에서도 과배란 유도에 사용되는 GnRH agonist, GnRH antagonist와 rFSH 등에 영향이 받지 않음이 보고된 바 있다.[15] 본 연구에서도 HoxA10 유전자의 발현은 FSH 처리에 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 세포의 체외배양액에 일반적으로 첨가하는 혈청 성분인 FBS를 첨가하지 않았기 때문에 보다 직접적인 FSH의 영향을 관찰할 수 있었지만, 자궁 기질세포의 계대배양 과정에서 관찰된 형태적인 변화와 유전자 발현 또는 생리학적 특성의 변화와의 관련성을 배제하기는 어려운 것 같다. 결론적으로, rFSH와 uFSH의 처리에 의해 체외배양 중인 자궁 기질세포에서 착상 관련 유전자 발현 양상이 변화되었으며, 이러한 변화는 착상 과정에 좋지 않은 영향을 주지는 않을 것으로 사료된다. 본 연구를 기초로 *in vivo* 상태에서 과량의 FSH에 의한 자궁의 변화에 대한 연구가 수행되면, 인간 배아의 착상과정에서 발생할 수 있는 여러 가지 문제점을 해결하는데 중요한 기초 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Giudice E, Crisci C, Eshkol A, Papoian R. Composition of commercial gonadotrophin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterization of non-gonadotrophin proteins. Hum Reprod 1994; 9: 2291-9.
2. Daya S, Gunby J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. Hum Reprod 1999; 14: 2207-15.
3. Goldfarb JM, Desai N. Follitropin-α versus human menopausal gonadotropin in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 2003; 80: 1094-9.
4. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev 2000; 21: 551-83.

5. Fowler PA, Huhtaniemi IT. The ovarian gonadotropin receptors in health and disease. Rev Endocr Metab Disord 2002; 3: 55-63.
6. Murdoch WJ. Immunolocalization of a gonadotropin-releasing hormone receptor site in murine endometrium that mediates apoptosis. Cell Tissue Res 1995; 282: 527-9.
7. 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.
8. Shemesh M. Actions of gonadotrophins on the uterus. Reproduction 2001; 121: 835-42.
9. Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Michalas L, Bletsa R, Michalas S. Messenger RNA expression for the follicle stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation stage embryos. Fertil Steril 2003; 79: 1187-93.
10. Han SW, Lei ZM, Rao ChV. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. Endocrinology 1996; 137: 1791-7.
11. Zhou XL, Lei ZM, Rao ChV. Treatment of human endometrial gland epithelial cells with chorionic gonadotropin/luteinizing hormone increases the expression of the cyclooxygenase-2 gene. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 3364-77.
12. Fisch B, Avrech OM, Pinkas H, Neri A, Rufas O, Ovadia J, et al. Superovulation before IVF by recombinant versus urinary human FSH (combined with a long GnRH analog protocol): a comparative study. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 26-31.
13. Loumaye E, Martineau I, Piazzi A, O'Dea L, Ince S, Howles C, et al. Clinical assessment of human gonadotrophins produced by recombinant DNA technology. Hum Reprod 1996; 11: 95-107.
14. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Ciampaglia W. Choice of ovarian stimulation regimens in assisted reproduction: finding the thread in the gonadotropin maze. Fertil Steril 2003; 80: 1114-6.
15. Taylor HS, Daftary GS, Selam B. Endometrial HOXA10 expression after controlled ovarian hyperstimulation with recombinant follicle-stimulating hormone. Fertil Steril 2003; 80: 839-43.
16. Julia TA, Lessey BA, Seppala M, Kaufman DG. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. Hum Reprod 2001; 16: 836-45.
17. 홍인선, 김석현, 궁미경, 전진현, 이영순, 강경선. 자궁내막 세포의 분리 및 배양 그리고 불멸화된 세포주의 확립. 대한불임학회지 2003; 12: 317-24.
18. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. Fertil Steril 1990; 53: 870-4.
19. Simon C, Cano F, Valbuena D, Remohi J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. Hum Reprod 1995; 10: 2432-7.
20. Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohi J, Simon C. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. Fertil Steril 1996; 65: 1190-5.
21. Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following *in vitro* fertilization-embryo transfer. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 416-20.