

아로마타제 억제제(레트로졸)가
자궁내막증 환자에서 배양된
자궁내막세포의 염증사이토카인에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

정 다 정

아로마타제 억제제(레트로졸)가 자궁내막증
환자에서 배양된 자궁내막세포의 염증사이토카인에
미치는 영향

지도 교수 조 동 제

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 7 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 다 정

정다정의 석사 학위논문을 인준함.

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 각별한 노고와 관심을 아끼지 않으신 조동제 교수님께 진심으로 감사드리며, 논문 준비 및 작성에 세심한 지도를 베풀어 주신 박용원 교수님, 이수곤 교수님, 그리고 실험을 도와주신 윤정미 선생님, 산부인과 동기들 모두에게 감사드립니다.

오늘 이 자리에 설 수 있게 이끌어 주신 여러 교수님들, 양가 부모님, 사랑하는 남편과 딸 지민, 그리고 친구들에게 이 논문을 드립니다.

저자 씀

<차 례>

그림차례.....iii

표 차례..... v

국문요약.....vi

I. 서론..... 1

II. 재료 및 방법 4

 1. 환자 및 샘플 채취..... 4

 2. 조직 분리 및 세포배양..... 6

 3. 레트로졸첨가 후 에스트라디올, 인터루킨-1 베타, 인터루킨-8,
 종양괴사인자알파 발현정도 측정..... 7

 가. 방사선 면역 측정법 7

 나. 효소면역측정법..... 8

 다. 역전사 중합연쇄반응..... 8

 4. 통계..... 10

III. 결과..... 10

IV. 고찰	16
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	28

그림 차례

Figure 1. RIA results for estradiol in endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows mean value and standard deviation. Estradiol levels were suppressed by increasing letrozole concentrations in endometriosis patients ($p < 0.05$), but not in control group. 11

Figure 2. ELISA for interleukin-8 levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. Interleukin-8 levels were suppressed by increasing letrozole concentrations ($p < 0.05$) in endometriosis patients, but not in control group. 12

Figure 3. ELISA for interleukin-1 beta levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. The levels on interleukin-1 beta didn't show significant decrease according to increasing letrozole concentrations both in endometriosis patients ($p = 0.255$) and control group. 13

Figure 4. ELISA for TNF-alpha levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. TNF-alpha levels decreased according to increasing letrozole concentrations in endometriosis patients ($p < 0.05$), but not in control group..... 14

Figure 5. RT-PCR for each proinflammatory cytokine in endometriosis patient. The picture is only from one endometriosis patients. The overall results didn't show a significant difference according to increasing letrozole concentrations. 16

표 차례

Table 1. List of primers used for PCR	9
---	---

국문요약

아로마타제 억제제(레트로졸)가 자궁내막증 환자에서 배양된

자궁내막세포의 염증사이토카인에 미치는 영향

흔한 부인과 질환의 하나인 자궁내막증의 병인론에 대해서 많은 연구가 진행되고 있지만 정확한 기전이나 획기적인 치료는 아직 밝혀져 있지 않은 실정이다. 자궁내막조직이 생리시 역류되어 복강내에 진입하면 염증반응과 기타 기질적 요인에 의해 주위 조직에 착상한 후 에스트로겐에 의존하여 성장하게 된다는 가설이 가장 유력하다. 아로마타제 억제제는 에스트로겐 의존성 조직의 성장을 저해하는 약제로 유방암의 치료제로 먼저 개발되었으나 최근 동물 실험 및 임상실험에서 자궁내막증의 치료에도 효과가 있다는 것이 발표되었다. 따라서 본 연구에서는 자궁내막증 환자에서 배양된 자궁내막세포에 아로마타제 억제제인 레트로졸을 처리했을 경우 직접적인 에스트로겐 합성 억제 작용 외에 조직 착상에 기여하는 염증사이토카인에도 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

2005년부터 2006년까지 본원 산부인과에서 자궁내막증으로 수술받는 환자의 자궁내막조직과 기타 양성 난소종양으로 수술을 받는 환자의 자궁내막조직을 채취하여 세포배양한 후 아로마타제 억제제인 레트로졸 (Femara[®], 노바티스, 바젤, 스위스)을 0, 1, 10, 100, 1000nM 의 농도로 각각 나누어 첨가하여 48 시간 배양하였다. 역전사 중합연쇄반응을 이용하여 염증사이토카인인 인터루킨-1 베타, 인터루킨-8, 종양괴사인자 알파의 mRNA 농도를 측정하였고, 배양액에서 에스트라디올 및 각 염증사이토카인의 단백질 농도를 측정하였다. 각각 다른 레트로졸의 농도에 따라 염증사이토카인의 발현정도가 달라지는지 관찰하였고, 자궁내막증 환자군과 비환자군 사이에 차이가 있는지 비교하였다. SPSS 12.0 version 을 이용하여 통계처리를 하였으며, p 값은 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 하였다.

자궁내막증 환자 5 명 및 비환자 6 명의 자궁내막세포를 배양하였다. 에스트라디올은 전반적으로 발현이 미미하였으나, 자궁내막증 환자에서 레트로졸에 의해 용량 의존적인 형태로 감소되는 양상을 보였다.

레트로졸을 첨가하지 않은 경우 인터루킨-8의 발현정도는 대조군에 비해서 자궁내막증 환자에서 현저히 높았다. 자궁내막증 환자에서 인터루킨-8의 단백질 농도는 레트로졸에 의해 용량 의존적인 형태로 억제되었으나 ($p < 0.05$), mRNA 발현은 영향을 받지 않았다. 종양괴사인자알파의 단백질 농도는 발현은 미미했으나 레트로졸에 의해 용량 의존적으로 감소하는 양상을 보였다. ($p < 0.05$)

아로마타제 억제제는 에스트로겐의 합성 뿐 아니라 일부 염증사이토카인의 합성도 억제시키는 것으로 유추된다. 앞으로 자궁내막조직이 복강내로 역류되어 복막이나 주변 조직에 착상되는 과정에 관여하는 염증반응에 대한 더욱 깊이있는 연구가 시행되면 자궁내막증의 병태생리를 이해하는데 한층 도움이 될 것이며 본 연구 결과를 토대로 아로마타제 억제제와 함께 특정 항염증제제를 추가하는 것이 자궁내막증 조직억제 작용에 상승효과를 보일 수 있으리라 생각된다.

핵심되는 말 : 자궁내막증, 아로마타제 억제제, 염증사이토카인

아로마타제 억제제(레트로졸)가 자궁내막증 환자에서 배양된

자궁내막세포의 염증사이토카인에 미치는 영향

<지도교수 조동제>

연세대학교 대학원 의학과

정 다 정

I. 서론

자궁내막증은 자궁강 외에 자궁내막 조직이 존재하는 질환으로 가임기 여성의 약 10%에서 골반통 및 불임의 원인으로 추정되고 있는 양성 부인과 질환이다. 자궁내막증의 병인론 및 병태 생리에 대해서 명확히 밝혀지지는 않았지만 가장 널리 받아들여지는 가설로는 생리 시 자궁내막조직이 역류한 후 복강 내에 착상, 성장한다는 것이다.¹ 생리혈의 역류는 정상적으로 생리를 하는 거의 대부분의 여성에서 일어나는 현상이지만² 왜 이중 일부의 여성에서만 자궁내막 조직이 복강 내에 착상하여 자라는 지는 확실히 알려져 있지 않다.

몇몇 연구는 인터루킨-1과 8 등과 같은 염증사이토카인이 자궁내막증환자의 복수에서 증가되어 있다고 보고하였으며^{3,4}, 정상적으로는 제거되어야 할 역류된 자궁내막조직이 제거되지 않고 복강 내에 착상하는 과정에 염증반응인자가 연관되어 있을 것으로 추정되고 있다. 특히 인터루킨-8은 다핵백혈구와 혈관생성인자에 대한 화학유인물질로 작용하며, 흑색종 등 특정 세포의 성장을 유도한다.⁵

자궁내막조직은 에스트로겐 의존성 조직이며 또 자궁내막증 환자의 조직은 스스로 에스트로겐을 분비하는 것으로 밝혀졌다. 아로마타제는 에스트로겐의 합성에 있어 마지막 단계인 안드로겐을 에스트로겐으로 전환하는 효소로 성호르몬 합성의 여러 단계 중 가장 중요한 단계 중 하나로 알려져 있다. 정상적으로 아로마타제는 난소의 과립층 세포 및 말초 체지방 세포 등 특정 장소에만 발현되며 정상 자궁내막조직에서는 발현되지 않지만 자궁내막증이 있는 여성의 자궁내막 및 자궁내막증병변에서는 아로마타제가 비정상적으로 발현되는 것으로 밝혀졌고⁶ 자체적으로 에스트로겐을 생산하여 착상 후 자궁내막조직의

성장에 영향을 미치는 것으로 추정되고 있다. 또한 아로마타제는 시클로옥시게나아제-2를 활성화하여 자궁내막 주변조직의 염증반응과도 연관이 있을 것으로 추정되며, 또한 시클로옥시게나아제-2에 의해서 아라키돈산이 프로스타글란딘 E₂로 전환되면 이것은 다시 아로마타제를 활성화시켜 에스트로겐 생산과 염증 반응 간의 양성 되먹임 기전이 생성되는 것으로 알려져 있다.⁶

아로마타제 억제제는 에스트로겐 합성을 차단함으로써 에스트로겐 의존성 조직의 증식을 억제하는 것으로 알려져 유방암의 치료제로 쓰이고 있으며 동물 실험 및 임상시험에서 프록에스틴이나 피임약 등과의 병합요법으로 골반통의 경감 및 자궁내막증조직의 크기 감소 등의 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.⁷⁻⁹ 또한 자궁내막증이 있는 환자의 자궁내막조직을 채취하여 아로마타제 억제제를 처리했을 때 세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도한다는 보고가 있으며¹⁰ 자궁내막조직의 혈관내피세포에서 에스트로겐에 의해 염증사이토카인인 인터루킨-8의 발현이 증가된다는 보고가 있다.¹¹ 또한 유방암 세포에서 아로마타제

억제제가 기질 금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase-2, 9)의 합성도 억제한다는 보고가 있다.¹² 그러나 에스트로겐 합성을 억제하는 아로마타제 억제제가 직접적으로 자궁내막증 환자의 염증사이토카인에 미치는 영향에 대한 보고는 아직까지 없다. 따라서 본 연구에서는 3세대 아로마타제 억제제인 레트로졸이 자궁내막증 조직에서 성장을 유지시키는 에스트로겐의 합성 억제뿐 아니라 착상에 영향을 미치는 염증사이토카인의 합성에 어떤 영향을 미치는지 보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 환자 및 샘플 채취

2005년 9월부터 2006년 2월에 걸쳐 연세의료원 산부인과에서 자궁내막증이 의심되어 수술을 시행받는 환자 중 수술 전에 어떠한 약물 치료도 시행받지 않았던 환자를 대상으로 수술 중 자궁내막증이 확인되면 자궁내막조직을 채취하였고, 대조군으로 자궁내막증을 비롯한 자궁근종 등

에스트로겐 의존성 부인과 질환이 아닌 기타 양성 난소 낭종으로 수술을 시행받는 환자에서 자궁내막조직을 채취하였다. 자궁내막증이 있는 환자에서 실제 자궁내막증 병변의 조직과 자궁내막 조직 사이에는 평행적인 관계가 존재하는 것으로 알려져 있어, 자궁내막 조직에서 관찰되는 현상이 복강 내의 자궁내막증병변을 대변한다고 보아 기존 보고들도 자궁내막 조직으로 연구가 진행된 경우가 많았다.^{10, 13} 자궁내막조직의 채취, 분리, 배양은 기존에 보고된 방법을 따라 시행하여¹⁴ 자궁내막샘세포 (endometrial glandular cell)와 간질 세포 (stromal cell)를 분리하였으며 염증사이토카인은 주로 포식세포 (macrophage), 섬유아세포 (fibroblasts), 중피세포 (mesothelial cells) 등에서 생산되는 것으로 알려져 있어 본 실험에서는 자궁내막조직의 간질 세포에서의 인터루킨 1, 8과 종양괴사인자알파의 발현정도를 측정하였다. 수술실에서 Novak's curette를 이용하여 자궁내막조직을 채취한 후 생리식염수에 넣고 30분 이내에 실험실로 옮겨졌다. 본 실험은 연세의료원 Institutional Review Board (IRB)의 승인을 받은 후 진행되었다.

2. 조직 분리 및 세포배양

자궁내막조직의 간질 세포는 효소를 이용하여 분리하고 원심분리를 이용하여 정제하였으며 일차배양을 위해 Matthews 등이 보고한 방법을 사용하였다.¹⁴

요약하면, 자궁내막조직을 잘게 다진 후 100 IU/mL의 페니실린, 100 ug/mL의 스트렙토마이신, 25 ug/mL의 암포테리신 B 와 1 mg/mL의 아교질분해효소 (Gibco, IA)가 첨가된 기본 배양액 (MED D-Val; Gibco, 페즐리, 영국) 10 mL에 넣은 후 5% CO₂의 대기 하에 37° C에서 2시간 배양하였다. 이후 100 X g의 속도로 5분간 원심분리한 후 간질 세포가 주로 포함되어 있는 상층액 8 mL를 분리하여 다시 원심분리 및 세척을 통하여 세포를 분리하였다. 간질세포에 특이적으로 발현되는 비멘틴 (vimentin)을 면역염색해 본 결과 95%이상의 순도를 보였다.

이렇게 해서 얻어진 간질세포는 2일 동안 37° C에서 배양한 후 Ham's F-12와 Dulbecco's modified Eagle's medium 을 1:1로 섞은 배양액에 2%

Ultroser G, 10ug/ml의 인슐린, 10mM 글루타민, 20mM HEPES, 100 U/ml 페니실린, 100ug/mL 스트렙토마이신, 25ug/mL 암포테리신 B, 50ug/mL 겐타마이신을 첨가하여 95% 대기:5% CO₂에 노출시키며 37°C에서 추가로 배양하였다.

3. 레트로졸 첨가 후 에스트라디올, 인터루킨-1 베타, 인터루킨-8, 종양괴사인자알파 발현정도 측정

배양된 자궁내막조직에 각각 다른 농도의 레트로졸 (0, 1, 10, 100, 1000nM)을 첨가한 후 48시간동안 배양하였다. 이후 배양액으로 분리되는 에스트라디올 농도는 방사선면역측정법 (radioimmunoassay), 인터루킨-1, 인터루킨-8, 종양괴사인자알파 농도는 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 를 사용하여 측정하고, 세포 내 mRNA 농도는 역전사 중합연쇄반응 (reverse-transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR) 을 이용하여 측정하였다.

가. 방사선 면역 측정법

배양액으로 분비되는 에스트라디올 농도는 방사선 면역 측정법을 이용하여 측정하였으며 (DPC , 로스엔젤레스, 미국) 판독 가능한 가장 낮은 농도는 8 pg/ml 였다.

나. 효소면역측정법

배양액으로 분비되는 인터루킨-1 베타, 인터루킨-8, 종양괴사인자알파의 단백질 농도를 측정하기 위해 상업적으로 시판되는 효소면역측정기구 (BioSource, Camarillo, CA, 미국) 를 이용하였다. 제조업체의 지시에 따라 반응을 시킨 후 ELISA 판독기로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 판독기로 판독 가능한 가장 낮은 농도는 인터루킨-1 베타가 1 pg/mL, 인터루킨-8이 5 pg/mL, 종양괴사인자알파가 1.7 pg/mL였다.

다. 역전사 중합연쇄반응

Easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction kit (Intron Biotechnology, 서울, 한국)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출한 후, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, CA, 미국)를 이용하여 cDNA로

역전사시켰다. 사용한 시발체 순서 (primer sequence)는 다음 표와 같다.

(Table 1)

Table 1. List of primers used for PCR

	Primer sequences (5'-3')
Interleukin-1 beta	CAC AGA CCT TCC AGA AGA AT TTC AAC ACG CAG GAC AGA TA
Interleukin-8	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GT TCC TTG GCA AAA CTG CAC CT
Tumor necrosis factor alpha	TAG CCC ATG TTG TAG CAA ACC CTC AAG CT TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CT
Beta-actin	AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC GAA GTC CAG GGC GAC GTA GCA C

증폭은 Perkin-Elmer (Oak Brook, IL, 미국) 2400 GeneAmp PCR System을 이용하여 각각 인터루킨-1 베타는 94°C 에서 30초, 56°C 에서 1분, 72°C 에서 1분씩, 인터루킨-8은 94°C 에서 30초, 57°C 에서 1분, 72°C 에서 1분씩, 종양괴사인자알파는 94°C 에서 30초,

63°C 에서 1분, 72°C 에서 1분씩, 베타액틴은 94°C 에서 30초, 65°C 에서 30초, 72°C 에서 30초씩 온도 변경을 하면서 35 cycle 시행하였다. cDNA는 2% 아가로스 겔에 용해시킨 후 전기영동하여 UNIDocMv version 99.03을 이용해 분석하였다.

4. 통계

Kruskall-Wallis test, Mann-Whitney U test (SPSS 12.0 version)를 이용하여 통계처리를 하였으며, p 값은 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 하였다.

III. 결과

자궁내막증 환자 5 명 및 비환자 6 명의 자궁내막세포를 배양하였다. 배양액에 분비되는 에스트라디올 농도는 전반적으로 낮았으나 자궁내막증 환자에서 레트로졸을 처리하지 않았을 때는 14.4 ± 3.2 pg/mL, 1 nM 에서는 14.4 ± 3.5 pg/mL, 10nM 에서는 11 ± 1.6 pg/mL, 100nM 에서는 10.2 ± 1.9 pg/mL, 1000nM 에서는 8.8 ± 0.8 pg/mL 로

통계학적으로 유의하게 레트로졸 용량이 증가함에 따라 감소하는 양상을 보였다. ($p < 0.05$) 비환자군에서의 에스트라디올 발현은 레트로졸 농도가 증가함에 따라 각각 9 ± 0.89 pg/mL, 11.3 ± 2.58 pg/mL, 10.17 ± 1.47 pg/mL, 10.33 ± 1.75 pg/mL, 11.67 ± 2.16 pg/mL 로 변화 양상이 없이 미미하였다. ($p = 0.157$)(Fig 1)

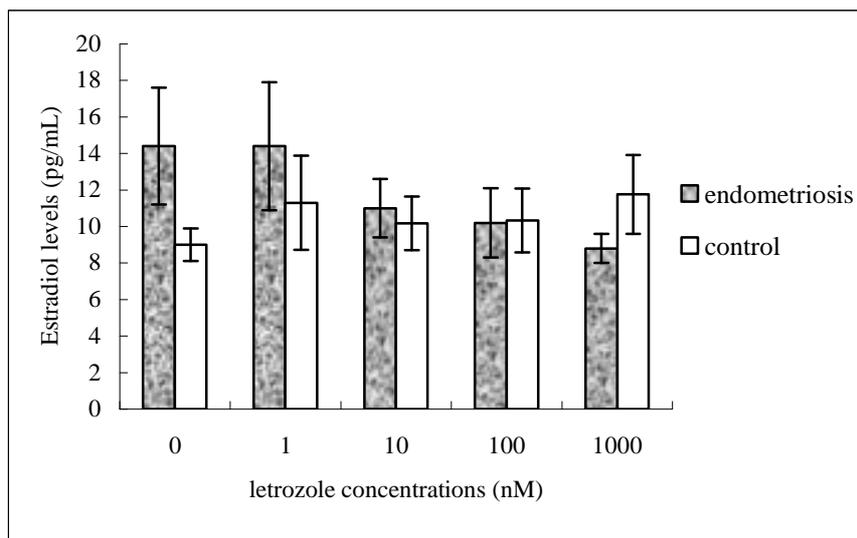


Figure 1. RIA results for estradiol in endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows mean value and standard deviation. Estradiol levels were suppressed by increasing letrozole concentrations in endometriosis patients ($p < 0.05$), but not in control group.

인터루킨-8 의 단백질 농도는 ELISA 로 측정했을 때 각각 증가하는 레트로졸의 용량에 따라 407 ± 55.6 pg/mL, 281 ± 118.9 pg/mL, 222.2 ± 122.6 pg/mL, 220.6 ± 127.9 pg/mL, 176.6 ± 73.7 pg/mL 로 나타나 레트로졸에 의해 용량에 의존적인 형태로 억제되었다 ($p < 0.05$)(Fig 2).

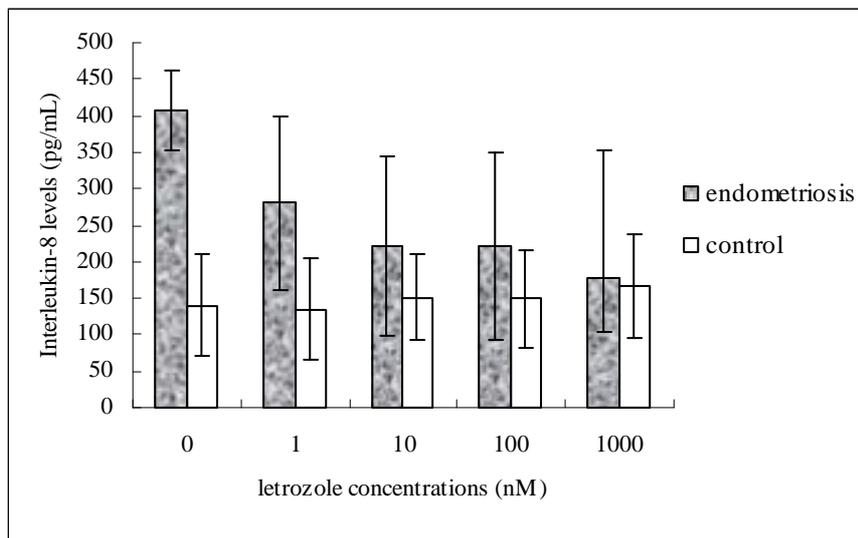


Figure 2. ELISA for interleukin-8 levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. Interleukin-8 levels were suppressed by increasing letrozole concentrations ($p < 0.05$) in endometriosis patients, but not in control group.

인터루킨-1 베타와 종양괴사인자 알파의 단백질 농도는 전반적으로 미미했다. 인터루킨-1 베타의 단백질 농도가 자궁내막증 환자에서 각각

6.4 ± 4.7 pg/mL, 6.0 ± 2.9 pg/mL, 5.2 ± 3.2 pg/mL, 3.6 ± 1.5 pg/mL, 2.2 ± 0.4 pg/mL 로 나타나 레트로졸에 의해 용량 의존적인 형태로 억제되는 양상을 보였으나, 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.(p=0.255)(Fig 3).

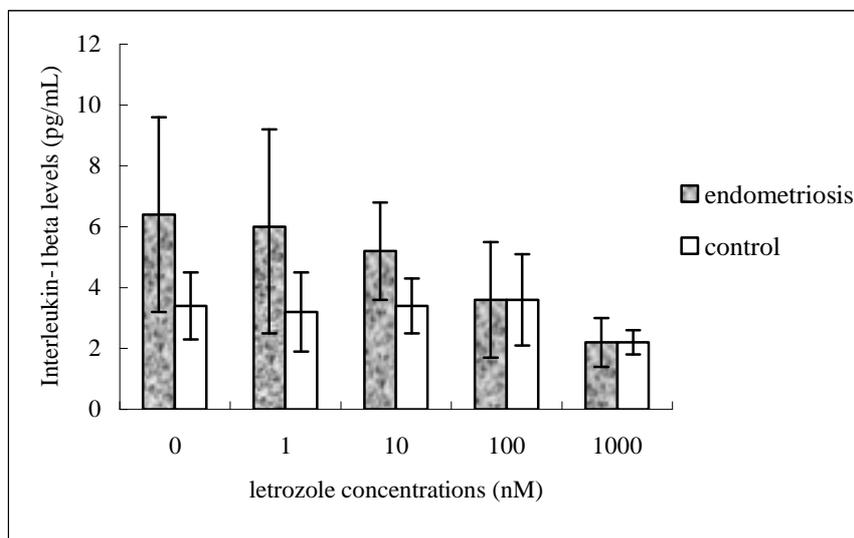


Figure 3. ELISA for interleukin-1 beta levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. The levels on interleukin-1 beta didn't show significant decrease according to increasing letrozole concentrations both in endometriosis patients (p =0.255) and control group.

반면, 종양괴사인자알파의 기저 농도는 낮았지만 레트로졸에 의해 농도 의존적으로 억제되는 양상을 보였다. (15.8 ± 5.4 pg/mL, 13.6 ±

2.9 pg/mL, 11.4 ± 3.0 pg/mL, 9.8 ± 1.1 pg/mL, 9.4 ± 1.8 pg/mL) ($p < 0.05$)(Fig 4)

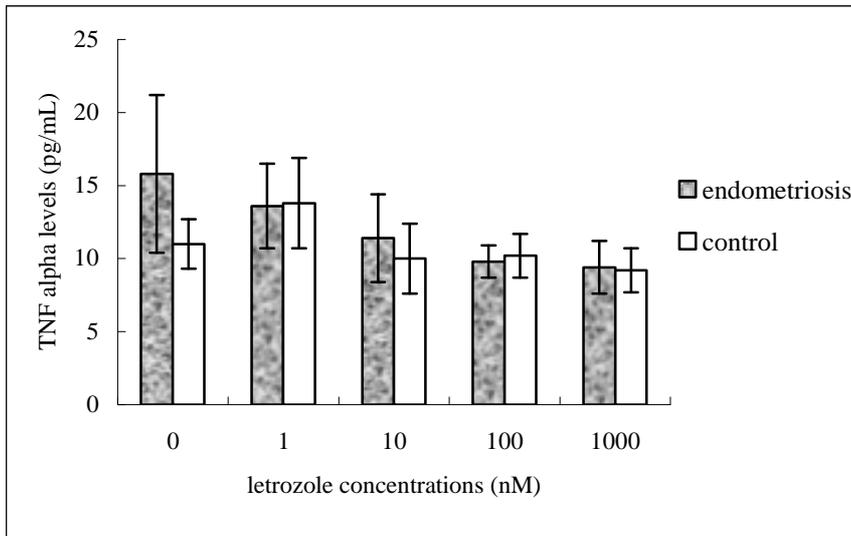


Figure 4. ELISA for TNF-alpha levels in culture media of endometrial stromal cells from endometriosis patients and control. Each bar shows the mean value and standard deviation. TNF-alpha levels decreased according to increasing letrozole concentrations in endometriosis patients ($p < 0.05$), but not in control group.

레트로졸을 첨가하지 않은 경우의 발현정도를 환자군과 대조군 간에 비교했을 때 대조군에서의 인터루킨-8 의 기저 발현정도는 자궁내막증 환자에 비해 낮았으나 ($p < 0.05$) (Fig 2) 인터루킨-1 베타 및

중양괴사인자알파의 기저 발현은 대조군과 자궁내막증 환자군 사이에 차이를 보이지 않았다.($p=0.497$, $p=0.116$) (Fig 3, 4)

각 인자의 mRNA 농도의 relative density 를 측정한 결과 인터루킨-1 베타는 레트로졸 용량이 증가함에 따라 각각, 0.41 ± 0.16 , 0.47 ± 0.23 , 0.42 ± 0.11 , 0.52 ± 0.2 , 0.3 ± 0.15 로 나타나 통계학적으로 의미있는 변화를 관찰할 수 없었다.($p = 0.345$) 중양괴사인자 역시 각각 0.74 ± 0.21 , 0.82 ± 0.18 , 0.86 ± 0.17 , 0.68 ± 0.13 , 0.88 ± 0.13 으로 나타나 레트로졸에 의해 억제되는 양상을 보이지 않았다. ($p = 0.31$) 인터루킨-8 역시 단백질 농도가 레트로졸에 의해 억제되는 양상을 보인 것에 반해 mRNA 는 1.02 ± 0.22 , 1.16 ± 0.31 , 1.08 ± 0.17 , 1.16 ± 0.23 , 1.14 ± 0.31 로 나타나 용량의존적인 형태로 억제 되지 않았다. ($p = 0.891$) (Fig 5)

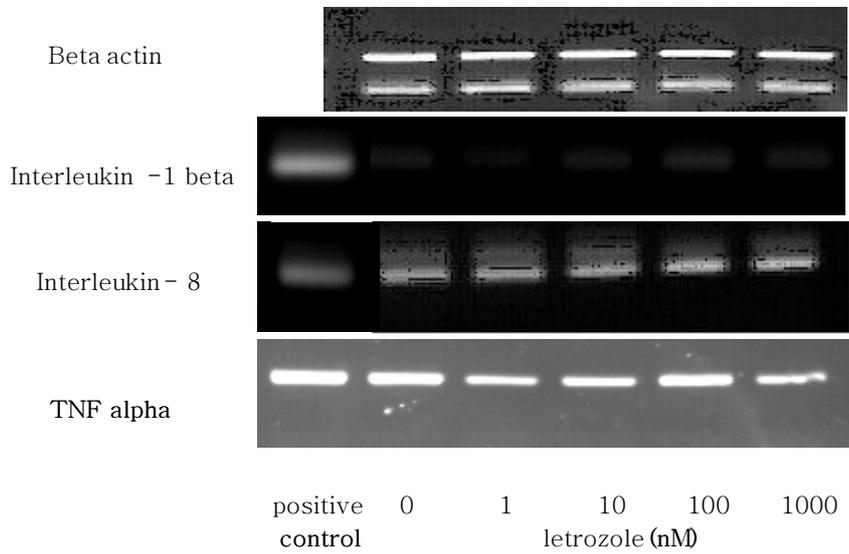


Figure 5. RT-PCR for each proinflammatory cytokine in endometriosis patient. The picture is only from one endometriosis patients. The overall results didn't show a significant difference according to increasing letrozole concentrations.

IV. 고찰

본 연구에서는 자궁내막증 환자에서 배양된 자궁내막 기질세포에 레트로졸을 처리했을 때 몇몇 염증사이토카인의 생성이 억제된다는 것을 알 수 있었다.

자궁내막증은 자궁내막조직이 자궁 외의 조직에 착상, 성장함으로써 임상적 증상을 나타내는 질환으로 자궁내막조직이 특정 환자들에서만

착상하고 성장하는 병태생리에 대해서 많은 연구가 있어왔다. 자궁내막증 환자의 자궁내막증병변 조직을 면역염색했을 때 간질 세포에서 발현되는 기질 금속단백분해효소-1 및 인터루킨-1의 농도가 비환자군에 비해 현저히 높다고 하며,¹⁵ 인터루킨-1, 8 등의 염증사이토카인이 자궁내막증 환자의 복수에서 비환자군에 비해 증가되어 있다는 보고도 있다.^{3,16} 또한, 최근에는 인터루킨-1의 작용을 중성화시키는 인터루킨-1 수용체의 발현이 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 감소되어 있다는 보고도 있어,¹⁷ 자궁내막조직이 복강 내에 착상하고 성장하는데 기질 금속단백분해효소 및 여러 염증사이토카인이 연관되어 있는 것을 추정할 수 있다.

또한, 이렇게 착상된 자궁내막조직이 계속 성장하기 위한 주요 인자가 에스트로겐인 만큼 자궁내막증 병변이 자체적으로 에스트로겐을 생산하는데 중요한 역할을 담당하는 아로마타제에 대한 연구도 최근들어 활발히 진행되어,^{6,18} 정상적으로는 아로마타제가 발현되지 않는 조직인 자궁내막이지만 자궁내막증 환자의 경우 자궁내막 간질 세포에 아로마타제가 비정상적으로 발현되어 있다는 것이 밝혀졌고,⁶ 아로마타제

억제제의 임상적 유용성에 대한 연구도 이어서 발표되고 있다.^{8,9} 동물실험에서 자궁내막샘세포에서 에스트로겐이 종양괴사인자알파의 분비를 증가시킨다는 보고가 있으며,¹⁹ 유방의 지방섬유아세포에서는 에스트로겐이 종양괴사인자 수용체의 발현 및 생성을 유도한다는 보고가 있다.²⁰ 폐경여성에서 호르몬치료 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절물(selective estrogen receptor modulator, SERM) 등을 투여했을 때 혈중 인터루킨, 종양괴사인자알파 등의 농도가 변화하는 것을 봐도²¹ 에스트로겐이 염증사이토카인의 생성 및 작용에 영향을 미침을 알 수 있다.

자궁내막증 환자에서 배양된 자궁내막 간질세포에서 아로마타제 억제제가 일차적인 약리작용인 에스트로겐 합성을 억제함으로써 부수적으로 염증사이토카인에서 변화가 있는지 확인하기 위해 본 실험을 진행하였고, 실제로 에스트라디올 농도가 배양액에 첨가된 레트로졸의 농도가 높아짐에 따라 낮아지는 것을 확인하였다. 이에 따라 인터루킨-1베타, 인터루킨-8 및 종양괴사인자 알파의 단백질 농도는 약물 농도에 비례해서 억제됨을 알 수 있었다. 단백질 농도와는 달리 mRNA 농도는 인터루킨-8을 제외한 나

머지 염증사이토카인의 발현 농도가 전반적으로 낮았기 때문에 레트로졸에 의해 뚜렷한 차이를 보이지 않은 것일 수도 있으나 이것은 전사 (transcription)보다는 번역 (translation)과정에만 레트로졸이 영향을 미쳐 결과적 생산물인 단백질 농도에 변화를 유발하기 때문이라고 추측할 수도 있다. 번역 단계의 어떤 과정에 영향을 미치는지 분자생물학적 연구가 앞으로 수반되어야 할 것이다. 또한, 인터루킨-1의 단백질 농도가 레트로졸에 의해 감소하는 패턴을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 전반적으로 농도 자체가 낮았기 때문으로 사료된다. 따라서, 샘플 수를 늘리면 유의있는 결과가 나올 수 있을 것으로 생각된다.

Hudelist 등은 자궁내막증이 있는 환자 37명에서 자궁내막증병변과 자궁내막조직의 인터루킨-1과 기질 금속단백분해효소의 발현정도를 비환자 37명과 비교했을 때 자궁내막증병변의 샘세포와 간질세포 모두에서 비환자군보다 발현정도가 증가되어 있으며 자궁내막조직의 발현정도는 큰 차이가 없는 것으로 보고한 바가 있다.¹⁵ 본 연구에서는 비환자군에서 환자군에 비해 인터루킨-1의 발현정도는 차이가 없었으나 인터루킨-8의

발현은 감소 되어 있었으며 레트로졸에 의해 억제되는 양상을 보이지 않았다. 이런 차이는 본 연구의 비교적 적은 환자수에 기인한다고 생각된다. 또한, 비환자군에서 발현되는 인터루킨의 농도자체가 환자군에 비해 낮기도 하지만 레트로졸에 의해 생산이 뚜렷하게 억제되지 않은 것은 아로마타제 자체를 발현하지 않기 때문일 것으로 생각된다.

종양괴사인자는 초기에 내독성인자에 의해 활성화된 포식세포에서 분비되며 종양조직의 괴사를 유발하는 것으로 알려졌으나, 타 조직에도 발현되어 염증, 세포분열, 항바이러스 작용, 성장억제 등에 관여하는 것으로 보고되었다. 자궁내막증 환자에서는 비환자군에 비해 자궁내막병변 및 복수 내에서 발현이 증가되어 있으며 복강 내 포식세포의 활성화에 기인하는 것으로 추측된다. 그 작용을 상쇄시키는 종양괴사인자 결합단백-1 을 원숭이에게 투여하였을 때 자궁내막증이 치료되었고, 생리혈의 역류가 일어나기 전 원숭이의 자궁내막에 투여하면 자궁내막증병변의 발생이 억제되었다는 보고가 있다.²² 또한, 실험 쥐의 자궁내막샘세포에서 에스트로겐이 종양괴사인자알파의 분비를 증가시킨다는 보고가 있어 복강

내의 포식세포에서 분비되는 종양괴사인자 및 에스트로겐과의 관계가 자궁내막증의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되어, 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 발현되는 종양괴사인자알파가 레트로졸에 의해 영향을 받는지 살펴보았다. 이에 대한 실험 결과로는 발현이 전반적으로 미미하여 mRNA 농도는 레트로졸에 의해 영향을 받는 양상을 보이지 않았으나 단백질 농도는 레트로졸이 고농도로 첨가되었을 때 통계학적으로 유의하게 억제되는 양상을 보였다. 자궁내막증 환자에서의 발현 정도도 비환자군에 비해 증가되어 있지 않았는데 이것 역시 기존에 보고된 바와 차이가 있다. 그 이유는 샘플 수가 적기 때문일 수도 있지만 종양괴사인자를 분비하는 다른 주요 세포인 활성화된 포식세포와 자궁내막조직이 공존할 때 레트로졸이 더욱 뚜렷한 억제 효과를 나타내기 때문이라 생각해 볼 수도 있다.

V. 결론

아로마타제 억제제인 레트로졸을 자궁내막증환자에서 배양된 자궁내막세포에 처리했을 때 세포에서 분비되는 일부 염증사이토카인이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 레트로졸이 정확히 어떤 경로를 통해 세포에서 염증사이토카인의 분비를 억제하는지는 연구되어야 할 부분이다. 기존의 자궁내막증 치료제와는 달리 자궁내막조직 자체의 에스트로겐 생성을 차단하는 레트로졸의 부가적인 치료효과를 알아보는 것은 자궁내막증의 치료를 한 단계 발전시키는데 도움이 될 수 있고, 이 연구 결과를 토대로 적절한 항염증제제의 병합사용이 어떤 상승효과를 볼 수 있는지 알아보는 것도 자궁내막증 치료 연구에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-469.
2. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;64:151-154.
3. Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1783-1787.
4. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein(NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464-1466.
5. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnecki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993;151:2667-2675.

6. Bulun SE, Fang Z, Imir G, Gurates B, Tamura M, Yilmaz B, et al. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2004;22:45-50.
7. Yano S, Ikegami Y, Nakao K. Studies on the effect of the new non-steroidal aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in an endometriosis model in rats. *Arzneimittelforschung* 1996;46:192-195.
8. Ailawadi R, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, and Bulun S. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:290-296.
9. Soysal S, Soysal M, Ozer S, Gul N, Gezgin T. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2003;19:160-167.
10. Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, Sueldo C. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:459-463.

11. Luk J, Seval Y, Kayisli UA, Ulukus M, Ulukus CE, and Arici A. Regulation of interleukin-8 expression in human endometrial endothelial cells: a potential mechanism for the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1805-1811.
12. Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, Karamanos NK. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;104:155-160.
13. Surrey EX, Halme J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Obstet Gynecol* 1990;76:792-797.
14. Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 1992;57:990-997.
15. Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, Mueller T, Czerwenka K, Kubista E, Singer CF. Interleukin 1 alpha and tissue-lytic matrix

- metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:1695-1701.
16. Fakh H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO. Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1987;47:213-217.
17. Bellehumeur C, Collette T, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, Akoum A. Increased soluble interleukin-1 receptor type II proteolysis in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:1177-1184.
18. Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 1998;69:709-713.
19. Grandt-Tschudy KS, Wira CR. Effect of oestradiol on mouse uterine epithelial cell tumor necrosis factor alpha release is mediated through uterine stromal cell. *Immunology* 2005;115:99-107.

20. Deb S, Amin S, Imir AG, Yilmax MB, Suzuki T, Sasano H, Bulun SE. Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4018-4024.
21. Gianni W, Ricci A, Gazzaniga P, Brama M, Pietropaolo M, Votano S, et al. Comment: Raloxifene modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- α synthesis in vivo: results from a pilot clinical study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6097-6099.
22. D'Hooghe TM, Cuneo S, Nugent N, et al. Recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) inhibits the development of endometriosis in baboons; a prospective, randomized, placebo and drug controlled study. *Fertil Steril* 2001;76:S1.

Abstract

Effects of aromatase inhibitor (Letrozole) on proinflammatory
cytokines from cultured endometrial cells of endometriosis patients

Da Jung Chung

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dong Jae Cho)

Many studies are being conducted on endometriosis, which is one of the most common and debilitating benign gynecologic disease, but exact pathophysiology or epochal treatment are not available yet. One of the best accepted theories is that endometrial tissue is regurgated into the pelvic cavity during the menstruation and implanted into neighboring organs and peritoneum through inflammatory and other various pathways, after which growth is maintained by autologous estrogen production. Aromatase inhibitor was first

clinically applied for treatment of breast cancer by its action mechanism of suppressing the growth of estrogen-dependent tissue, but recently is known to be also effective for endometriosis patients, reported by several animal experiments and clinical trials. Thus, this study is aimed at evaluating the additional actions of aromatase inhibitor, other than suppressing tissue growth by inhibiting estrogen production, by assessing the effects on proinflammatory cytokines in cultured endometrial cells from endometriosis patients.

Through 2005 to 2006, endometrial tissue was obtained from patients who were operated for either endometriosis or other benign ovarian tumor. Endometrial stromal cells were cultured and letrozole, an aromatase inhibitor, (Femara[®]; Novartis, Basel, Switzerland) was added in concentrations of 0, 1, 10, 100, 1000nM, followed by additional 48 hours of incubation. Estradiol levels in culture media secreted by endometrial cells were assayed by RIA. mRNA levels of interleukine-1 (IL-1) beta, interleukine-8 (IL-8) and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) were assessed by RT-PCR and protein levels of these proinflammatory cytokines were assayed by

ELISA. Expression levels were compared according to different letrozole concentrations and difference between endometriosis patient group and control group was also assessed. For statistical analysis, SPSS 12.0 version was used and p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Endometrial tissue was obtained and cultured from 5 endometriosis patients and 6 benign ovarian cyst patients. In endometriosis patients, protein levels of IL-8 were suppressed by letrozole in dose-dependent manner. ($p < 0.05$), but not mRNA levels. The baseline expression of IL-8 in control group was significantly lower than endometriosis group, when assessing the levels without addition of letrozole (0 nM). The expression of TNF alpha and IL-1beta was minimal in both endometriosis and control group, but the protein level of TNF alpha was suppressed when high concentration of letrozole was added in the media.

Aromatase inhibitor seems to suppress not only estrogen production but also certain proinflammatory cytokines. Further studies on inflammatory pathways involved in implantation of endometrial tissue would bring more insight into

pathogenesis and pathophysiology of endometriosis and additional treatment with anti-inflammatory agents with aromatase inhibitor could exert synergistic effects on suppressing endometriosis lesions.

Key Words : endometriosis, aromatase inhibitor, proinflammatory cytokines