

골반 장기 탈출증 여성에서의
fibulin-5와 lysyl oxidase-like
protein 1의 발현도 차이

연세대학교 대학원

의 학 과

정 현 주

골반 장기 탈출증 여성에서의
fibulin-5와 lysyl oxidase-like
protein 1의 발현도 차이

지도 배 상 욱 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 현 주

정현주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 각별한 노고와 관심을 가지고 지도해 주신 배상욱 교수님께 진심으로 감사를 드리며, 지도 편달을 아끼지 않으신 김세광, 김종선 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 실험을 도와준 최종락 교수님과 이은경 연구원께 감사를 드립니다.

지금 이 자리에 이르기까지 무한한 사랑과 격려로 이끌어주신 그 무엇보다도 소중한 가족들, 그리고 항상 곁에서 든든한 버팀목이 되어준 사랑하는 남편 문재훈과 뱃속의 아기에게 이 논문을 드립니다.

차 례

그림 및 표 차례	vii
국문 요약	1
I. 서 론	4
II. 연구대상 및 방법	8
1. 환자 선택 및 검체 채취	8
2. 실험 방법	10
가. Total RNA의 추출	10
나. Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of fibulin-5	12
다. Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of lysyl oxidase-like protein	14
3. 통계 분석	17

III. 결 과	18
1. 임상소견	18
2. 골반 장기 탈출증 환자와 대조군의 자궁 천골 인대에서 시행한 quantitative real time RT-PCR에 의한 fibulin-5와 lysyl oxydase-like protein 1의 mRNA 발현 분석	21
3. 골반 장기 탈출증 환자에서 severity에 따른 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현도 분석	26
IV. 고 찰	28
V. 결 론	34
참고 문헌	35
영문 요약	40

그림 차례

Figure 1. Real time PCR of target mRNA (A) and reference mRNA (B)	16
Figure 2. Comparison of mRNA expression of fibulin-5 between patients group and control group by real time RT PCR	24
Figure 3. Comparison of mRNA expression of lysyl oxidase-like protein 1 between patients group and control group by real time RT- PCR	25

표 차례

Table 1. Sequence of the primer and the probe	15
Table 2. Clinical characteristics	20
Table 3. Comparison of mRNA expression of fibulin-5 and lysyl oxidase-	

like protein 1 between patients group and control group · 23

Table 4. Comparison of the expression of mRNA of fibulin-5 and lysyl

oxidase-like protein 1 between stage III and stage

IV · · · · · 27

국문요약

골반 장기 탈출증 여성에서의 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 발현도 차이

인간의 수명 연장으로 인해 골반 장기 탈출증으로 미국에서 일생 동안 수술을 경험하는 여성은 11%에 달하고, 국내에서도 그 환자가 증가하는 추세이며 그에 따른 사회적 비용 또한 증가하고 있다. 그간 골반 장기 탈출증의 병인론을 분자생물학적으로 밝히기 위해 골반저의 결체 조직과의 연관성에 대한 연구가 활발히 이루어졌고, 최근에는 콜라겐에 이어 탄력 섬유가 그 대상이 되고 있다. 실제로 골반 장기 탈출증 환자에서 탄력 섬유가 감소되어 있다는 보고들은 많다. 따라서, 본 연구는 골반 장기 탈출증 환자와 정상 대조군의 자궁 천골 인대 조직에서 탄력 섬유의 형성 관련 인자인 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 발현 양상을 정량적으로 측정 한 후, 이들과 골반 장기 탈출증과의 상관 관계를 밝히고자 하였다.

2006년 5월부터 2006년 9월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원 산부인과에 내원하여 중증 골반 장기 탈출증으로 자궁 적출술을 시행 받은 환자 15명과 골반 탈출증 이외의 다른 양성 질환으로 자궁 적출술을 받은 환자 15명을 대상으로 두 군간의 연령, 폐경 상태, 체질량 지수를 matching하였고, 내외과적 과거력, 흡연력 등의 골반 장기 탈출증의 위험 인자들도 두 군간에 큰 차이가 없음을 확인하였다. 환자군과 대조군에서 자궁 천골 인대 조직을 채취하여 quantitative real time RT PCR을 이용하여 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현 양상을 확인하고 골반 장기 탈출증 환자의 중증도에 따른 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA 발현도를 비교 분석하였다.

실험 결과, 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 fibulin-5의 mRNA의 발현은 대조군에 비해 감소되어 있었고, lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현은 대조군에 비해 다소 증가하였으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.043, 0.079$). 골반 장기 탈출증의 중증도에 따른 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA는 환자

군과 대조군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.156$, 0.697).

본 연구를 통하여, fibulin-5는 골반 장기 탈출증에 있어서 이미 밝혀진 위험 인자에 독립적 인자가 될 수 있음을 알 수 있었으며 골반 장기 탈출증 환자에서는 감소되어 있다는 사실을 밝혀 내었다. 이는 탄력 섬유의 형성 과정 중 tropoelastin과 microfibril의 결합에 결함이 있어 탄력 섬유의 형성에 장애가 발생함이 골반 장기 탈출증의 한 원인이 될 수 있음을 의미한다.

핵심 되는 말: fibulin-5, lysyl oxidase like protein 1, 골반 탈출증, 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응

골반 장기 탈출증 여성에서의 fibulin-5와 lysyl oxidase-like
protein 1의 발현도 차이

<지도교수 배 상 옥>

연세대학교 대학원 의학과

정 현 주

I. 서론

골반 장기 탈출증은 골반저 이완에 의해 나타나는 증상으로 골반을 지지하는 근육, 근막, 인대 등의 손상으로 인해 발생한다.¹ 골반 장기 탈출증으로 일생 동안 수술을 경험하는 여성은 11%에 달하며, 그로 인한 사회적 비용 또한 증가하는 추세이다.² 골반 장기 탈출증을 포함한 골반저의 질환

들은 만성 골반통과 하중감, 배뇨장애, 요실금, 배변 장애, 변실금, 성기능 장애와 그로 인한 사회적 고립 등을 유발할 수 있다.³ 골반 장기 탈출증이 연령과 연관하여 그 발생빈도가 증가하는 것을 볼 때, 인간의 수명 연장, 폐경 여성의 증가, 삶의 질 측면에서 골반 장기 탈출증에 대한 병인론의 중요성이 더욱 부각되고 있다.^{2,4}

골반 장기 탈출증은 분만, 골반 수술력, 노화 과정으로 인한 근육신경계의 구조적, 해부학적인 변화에 기인한다고 알려져 있다.⁵ 좀 더 근본적인 분자 생물학적인 원인을 밝히기 위해 골반저의 결체 조직과의 연관성에 대한 연구가 이루어졌고 콜라겐이 그 초점이 되어 왔다.^{1,6,7} 골반저 질환 환자에서 질방광 근막, 복부 피부, 원형인대에서 콜라겐의 농도가 감소되어 있고,^{6,8} 콜라겐과 결체 조직에 결함이 있는 질환인 Ehlers-Danlos 증후군, Marfan 증후군 환자에서 골반 장기 탈출증의 발생 빈도가 증가하는 것이 알려져 있으나,^{9,10} 아직 콜라겐 대사과정의 결함이 일차적으로 골반 장기 탈출증을 유발하는지는 불명확하다.¹¹ 최근 들어, 콜라겐과 더불어 여성의 생식기관에 풍부하게 분포되어 있는 결체 조직 중 하나인 탄력 섬유가

콜라겐에 이어 골반 장기 탈출증의 병인론으로 주목받고 있으며 이에 대한 연구가 시작되고 있다.¹¹

탄력 섬유는 보통 성인에서는 한 번 형성되면 안정적으로 유지되나,¹² 예외적으로 임신과 분만 시에는 활발하게 재구성된다.^{13,14} 탄력 섬유의 형성 과정을 보면, fibrillin이 세포 주변에서 integrin 수용체와 연관되어 조립이 일어나 microfibril array를 형성하고 transglutaminase에 의해 cross-link를 형성하여 cross-linked microfibril이 된다. 성숙된 microfibril은 평행하게 다발을 형성하고 inter-microfibrillar cross-link를 형성하여 안정화 되며, 세포 주위에서 세포로부터 분비된 tropoelastin에 microfibril에 놓여 lysyl oxidase-derived cross link를 통해 중합체가 된다.¹⁵ Fibulin-5는 elastic fiber assembly 를 이끄는 물질로, tropoelastin 과 결합하여 세포 주위에서 integrin과 연계하여 microfibril에 tropoelastin이 결합하는 것을 조절한다고 생각되고 있다.¹⁶ 실제로 fibulin-5의 유전인자인 FBLN-5에 결함이 있는 쥐에서 피부, 폐, 혈관 구조에서 elastinopathy를 유발되는 것이 보고 된 바가 있

다.^{17,18} Lysyl oxidase는 중합 반응의 초기 단계에 관련되는 효소로서, 포유류의 유전체에는 LOX와 LOX-like protein (LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4)를 coding하는 5개의 유전자가 있다.¹⁹ 이중에서도 LOXL1은 여성 골반 구조를 포함한 여러 조직에서 탄력 섬유의 항상성에 핵심적인 것으로, LOXL1의 gene에 결함이 있는 쥐에서 분만 후에 탄력 섬유를 형성되지 않고 골반 장기 탈출증 발생이 보고된 바 있다.¹¹ 하지만, 아직 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein1이 임상적으로 골반 장기 탈출증과 연관이 있는가에 대한 연구는 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 정상 자궁 천골 인대 조직과 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직의 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA 발현 양상을 정량적으로 측정 한 후, 골반 장기 탈출증 발생과의 연관성 및 골반 장기 탈출증의 중증도와의 상관관계를 밝히고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 환자 선택 및 검체 채취

연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원 산부인과에서 2006년 5월부터 2006년 9월까지 중증 골반 장기 탈출증으로 자궁 적출술을 받는 환자와 골반 탈출증을 제외한 다른 양성 질환으로 자궁 적출술을 받는 환자를 대상으로 하였다. 중증 골반 장기 탈출증으로 자궁 적출술을 시행 받은 환자는 모두 16명이었으며, 이 중에서 결체 조직 질환인 전신 홍반성 루푸스 환자 1명은 연구 대상에서 제외하였다. 환자군 15명과 나이와 분만력, 폐경 상태를 matching한 양성 질환으로 자궁 적출술을 시행 받은 환자 15명을 대조군을 선정하였다.

이들은 모두 내원시 표준화된 비뇨 부인과 문진과 철저한 이학적 검사를 시행 하였으며, 골반 장기 탈출증은 국제 요자제 학회 (International Continence Society)의 Pelvic Organ Prolapse Quantification (POPQ) system을 이용하여 등급화 하였다.²⁰ 분만대에서 앙아위 (supine

position)와 45° 상체 직립자세 (upright position)로 골반내진을 시행하였고, valsalva법을 이용한 내진도 시행하였다. 환자의 동의 하에, 조직은 수술 중 적출된 자궁에서 자궁 천공 인대를 1cm x 1cm의 크기로 잘라 cryotube에 담아 즉시 질소액체에 넣어 냉각시켜 영하 70℃에 보관하였다.

2. 실험 방법

가. Total RNA의 추출

Total RNA를 추출하기 위하여 Bio Masher(NIPPI Recerch Institute of Biomatrix. Tokyo, Japan) 의 filter tube와 회수용 tube를 set하여 filter tube에 조직을 0.3cm cubic 형으로 넣었다. 조직이 filter면에 확실하게 접촉할 때까지 파쇄봉을 삽입하고 필요에 따라 파쇄봉을 회전시켜 갈아 잘게 부수어 원심분리기에 넣고 14,000rpm 으로 1분간 원심 분리를 하였다. 시료가 충분히 회수될 때까지 위 과정을 3~4번을 반복하였고, 시료를 회수한 후 filter tube와 파쇄봉을 파기하였다. 회수된 시료 200 μ l에 Tri-Reagent(Molecular research center inc. Cincinnati OH, USA) 750 μ l를 넣은 후 5분간 방치 후, chloroform(Junsei chemical co. Tokyo, Japan) 200 μ l를 첨가하고 다시 5분간 방치하였다. 15,000rpm에서 15분간 4°C에서 원심분리한 후 상층액과 Isopropanol (Duksan pure chemical co. Suwon, Korea) 500 μ l를 첨가하고 실온에서 10분간 방치시켰다. 다시 15,000 rpm에서 8분간 4°C에서 원심 분리 후 상층액은 버리고, 남아있는 pellet에 75% ethanol 을 1,000 μ l첨가하

고 15,000 rpm에서 5분간 4°C에서 원심 분리 하였다. 상층액을 버린 후 알코올을 완전히 제거하고 3분 정도 공기 중에 건조시켰다. 이에 멸균 증류수 20~40 μ l를 첨가, 용해시킨 후 260nm와 280nm의 파장에서 흡광도와 정제도를 측정하고 -70°C 초저온 급속 냉동기기에 보관하였다.

나. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction of fibulin-5

조절인자들의 전사단계 발현양상을 알아보기 위해 total RNA를 2.0 μ l의 10X Reaction Buffer, 4.0 μ l의 25mM MgCl₂, 2.0 μ l의 Deoxynucleotide Mix, 2.0 μ l의 Random Primer p(dN)₆, 1.0 μ l의 Rnase Inhibitor, 0.8 μ l의 AMV Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Germany), sterile water를 포함하는 반응 용액 속에서 65 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응 시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다. 이후 25 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 반응 시킨 후, 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 효소를 불활성화 시켰다. Real-time RT PCR은 Mastercycler gradient (Eppendorf AG. Hamburg, Germany)를 이용하였다. Fibulin-5와 GAPDH의 real-time 중합 반응을 위해, 각각에 합성된 cDNA 5.0 μ l, Primer(Forward) 0.4 μ l, Primer(Reverse) 0.4 μ l, Universal ProbeLibrary Probe 0.2 μ l LightCycler[®] TaqMan[®] Master (Roche, Mannheim, Germany) 4.0 μ l, Water를 넣어 수행하였다. 실험에 사용된 fibulin-5와 GAPDH의 Universal ProbeLibrary Probe는 GenBank 에 등록된 cDNA sequences를 기초로 연구 목적에

적합하도록 고안되어 상품화된 제품을 이용하였으며 각각의 Primer(Bioneer, Taejeon, Korea)는 probe에 맞게 제조되었다(Table 1). PCR 반응 물질 내에 UNG(Ureacil-N-Glycosylase)를 미리 첨가하여 오염 산물들을 선택적으로 파괴하였고, 40°C에서 2분간 반응을 한 뒤 최초 95 °C에서 10분간 변성 시키고, 95 °C에서 10 초, 60°C에서 30초간 효소 반응시키는 것을 한 cycle로 하여 총 45 회 반복하여 증폭하고, 마지막으로 40 °C에서 30초 둔 뒤 반응을 끝냈다(Figure 1).

다. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction of lysyl oxidase-like protein 1

선행과정에 의해 생성된 cDNA를 주형 (template)으로 real-time 증합 효소 반응을 시행하였다. Lysyl oxidase-like protein 1과 β -Globin의 검사를 위해 각각에 동일한 양의 합성된 cDNA에 $2.4\mu\text{l}$ 의 MgCl_2 가 함유된 10 X Reaction buffer, Forward Primer(Tib molbiol. Berlin, Germany) I $1.0\mu\text{l}$, Reverse Primer II $1.0\mu\text{l}$, Probes (FL) I $0.4\mu\text{l}$, Probes (Red 640) II $0.4\mu\text{l}$ 를 이용하여 증합 반응을 수행하였다. 최초 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10분간 변성 시키고, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10 초, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10초 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10초 효소 반응시키는 것을 한 cycle로 하여 총 45 회 반복하여 증폭하고, 마지막으로 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 30초 extension을 수행하였다 (Figure 1). 실험에 사용된 lysyl oxydase-like protein 1과 β -Globin의 Probe 와 primer는 GenBank 에 등록된 cDNA sequences를 기초로 연구 목적에 적합하도록 고안되어 제조되었다(Table 1).

Table 1. Sequence of the primer and the probe

Gene		Sequence	
Fibulin-5	Primer	Sence	5' -CTGCCCTCCAGGCTACATC
		Antisence	5' -CCTGTGCTCACATTCGTTGA
	Probe	Left	CTGCCCTCCAGGCTACATC
		Right	CCTGTGCTCACATTCGTTGA
*GAPDH	Primer	Sence	5' -AGCCACATCGCTCAGACAC
		Antisence	5' -GCCCAATACGACCAAATCC
	Probe	Left	AGCCACATCGCTCAGACAC
		Right	GCCCAATACGACCAAATCC
LOXL 1	Primer	Sence	5' -CCTGGGA ACTACATCCECAA
		Antisence	5' -CGGAGATCAGGATTGGACA
	Probe	FL	5' -GTGGTGAGATGCAAVATTCACTACACA-FL
		LC	5' - Red640-TCGCTACGTTTCTGCAACAAACTG -PH
β-Globin	Primer	Sence	5' -ACACA ACTGTGTTCACTAGC
		Antisence	5' - CAACTTCATCCACGTTCCACC
	Probe	FL	5' -CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGA GGA-FL
		LC	5' - LC Red640-AAGTCTGCCGTTACTGCCCT GTGGGGCAA-PH

*GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

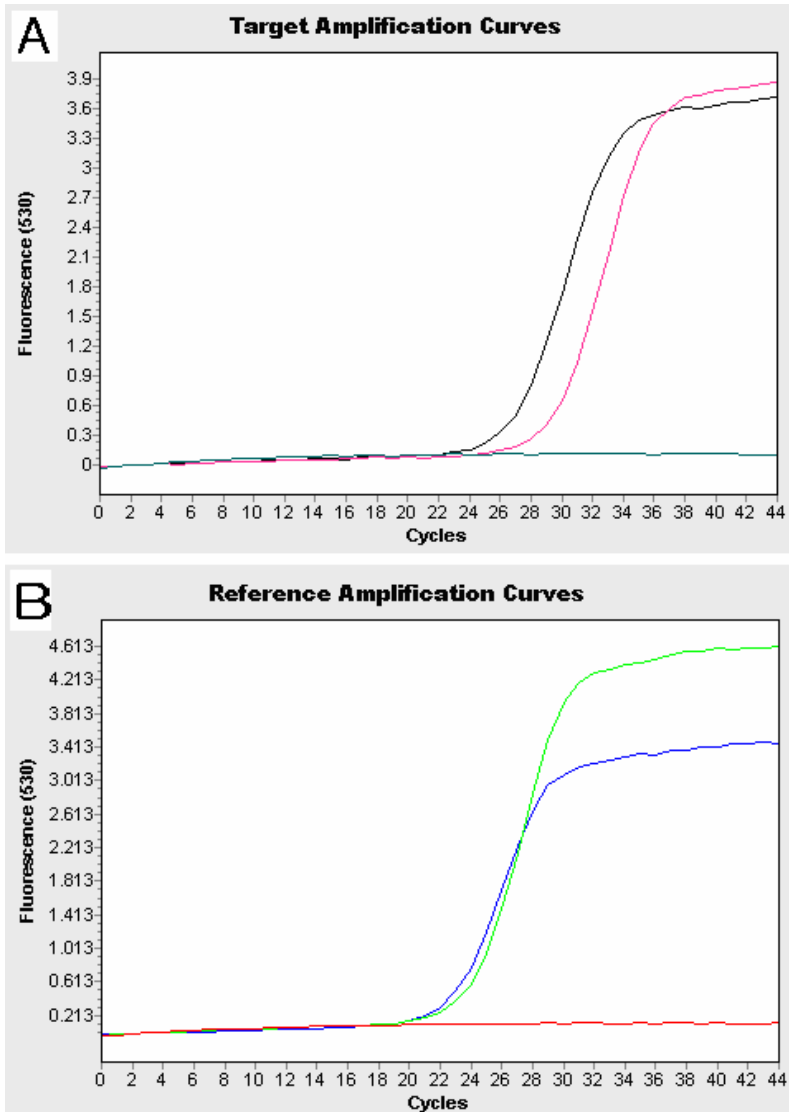


Figure 1. Real time PCR of target mRNA (A) and reference mRNA (B)

3. 통계 분석

자료분석은 서술적 통계를 사용하였고, 통계학적 결과 분석은 SPSS version 13.0 (SPSS inc. Chicago IL, USA) 프로그램의 Student independent t-test 등을 사용하였으며, p-value 가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결과

1. 임상 소견

본원에서 2006년 5월부터 2006년 9월까지 골반 장기 탈출증으로 자궁 적출술을 받은 환자 15명을 환자군으로 하였으며, 골반 탈출증을 제외한 다른 양성 질환으로 자궁 적출술을 받은 환자 중에서 환자군과 나이와 분만력, 폐경 상태를 matching한 15명을 대조군으로 하였다.

환자군과 대조군의 일반적인 특성을 비교해보면, 연령면에서는 환자군의 평균이 60.5 ± 8.7 세이고, 대조군 평균이 60.1 ± 8.0 세이었으며, 분만력은 환자군에서는 평균 3.4 ± 0.7 회이고 대조군에서는 평균 3.3 ± 0.8 회이었고, 체질량 지수는 환자군의 평균은 24.0 ± 3.3 이고 대조군 평균은 25.4 ± 3.3 으로 모두 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 환자군과 대조군 모두 폐경 후 여성이었으며, 호르몬 대체요법을 받은 경력은 없었다. 동반된 다른 내외과적 질환을 보면, 당뇨의 경우 환자군에서는 4명(27%), 대조군에서는 4명(27%)이었으며, 고혈압은 환자군에서 4명(27%), 대조군에서 3명(20%) 이었고, 만성 폐쇄성

폐질환에서는 환자군에서 2명(13%), 대조군에서 없었으며, 요추 간판 탈출증은 환자군에서 1명(7%), 대조군에서 없었으며 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이전에 골반 수술을 받은 경력은 환자군과 대조군 모두 없었으며, 흡연력이 있는 사람은 환자군에서는 1명(7%), 대조군에서는 2명(13%)로 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2).

환자군의 골반 장기 탈출증 정도를 Pelvic Organ Prolapse Quantification (POPQ) system을 이용하여 나타내면, stage III 환자가 8명, stage IV 환자가 7명이었다.

Table 2. Clinical characteristics

	Patients group	Control group	p-Value
	n = 15	n = 15	
Mean of age (years)	60.5 ± 8.7	60.1 ± 8.0	NS
Mean of parity	3.4 ± 0.7	3.3 ± 0.8	NS
Mean of BMI (Kg/m ²)	24.0 ± 3.3	25.4 ± 3.3	NS
Menopause status	15/15 (100%)	15/15 (100%)	NS
HRT history	0/15 (0%)	0/15 (0%)	NS
Medical illness			
Diabetes mellitus	4/15 (27%)	4/15 (27%)	NS
Hypertension	4/15 (27%)	3/15 (20%)	NS
COPD	2/15 (13%)	0/15 (0%)	NS
HLD	1/15 (0%)	0/15 (0%)	NS
Previous pelvic surgery history	0/15 (0%)	0/15 (0%)	NS
Smoking	1/15 (7%)	2/15 (13%)	NS

NS : Not significant.

BMI : Body mass index

HRT : Hormone replacement therapy

COPD : Chronic obstructive pulmonary disease

HLD : Herniated lumbar disk

2. 골반 장기 탈출증 환자와 대조군의 자궁 천골 인대에서 시행한 quantitative real time RT-PCR에 의한 fibulin-5와 lysyl oxydase-like protein 1의 mRNA 발현 분석

신선한 정상 대조군 자궁 천골 인대 조직과 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 fibulin-5의 mRNA 발현을 측정하기 위해서 TaqMan method를 이용한 quantitative real time RT-PCR을 사용하였다. Fibulin-5의 real time RT-PCR의 정량은 GAPDH를 internal control로 하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 구하였는데 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 fibulin-5의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값은 0.705 (0.20~1.23)이었고, 대조군의 조직에서는 1.251 (0.65~2.57)로 골반 장기 탈출증 환자의 조직에서 발현이 감소하였고($p = 0.043$), 두 그룹간의 차이는 통계적으로 유의하였다(Figure 2, Table 3). Lysyl oxydase-like protein 1의 mRNA 발현을 측정하기 위해서는 Hybridization method를 이용한 quantitative real time RT-PCR을 사용하였고, β -globulin을 internal control로 하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 구하였다.

골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 lysyl oxidase-like protein 1의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값은 3.759 (0.55~7.38)이었고, 대조군의 조직에서는 2.435 (0.26~6.25)로 골반 장기 탈출증 환자에서 다소 증가하였으나, 두 그룹간의 통계학적 차이는 보이지 않았다($p = 0.079$) (Figure 3, Table 3).

Table 3. Comparison of mRNA expression of fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1 between patients group and control group

	Patient group	Control group	p-Value
Fibulin-5 level*	0.705	1.251	0.043
LOXL1 level*	3.759	2.435	0.079

* : $2^{-\Delta \Delta Ct}$ values

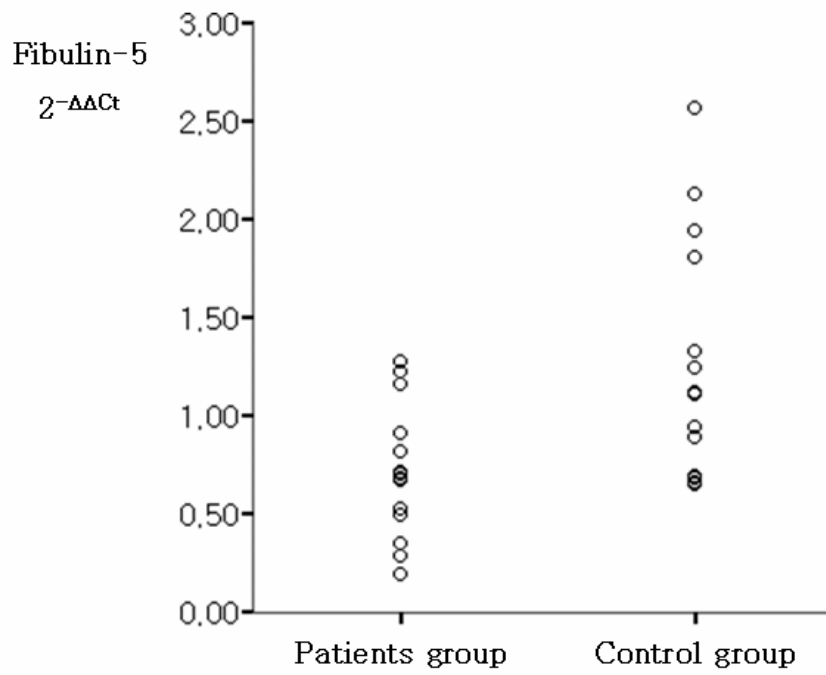


Figure 2. Comparison of mRNA expression of fibulin-5 between patients group and control group by real time RT-PCR

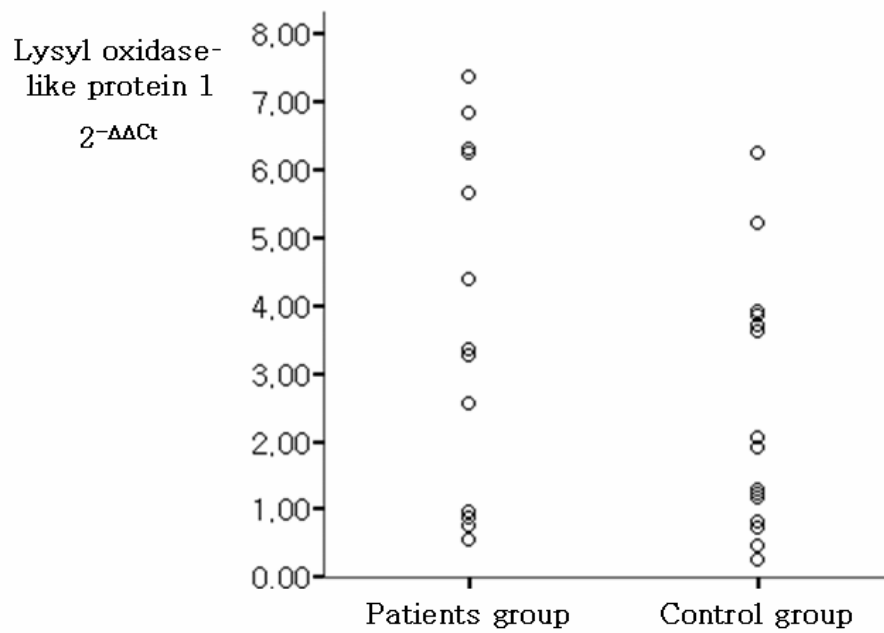


Figure 3. Comparison of mRNA expression of lysyl oxidase-like protein 1 between patients group and control group by real time RT-PCR

3. 골반 장기 탈출증 환자에서 severity에 따른 fibulin-5와 lysyl

oxydase-like protein 1의 mRNA 발현도 분석

골반 장기 탈출증 환자 15명 중에서 Pelvic Organ Prolapse Quantification (POPQ) system으로 stageⅢ와 stageⅣ에 해당하는 환자들의 fibulin-5의 발현도를 비교해보면 stageⅢ의 경우 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 0.971 (0.69~2.57)이었고 stageⅣ의 경우에는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 0.471 (0.20~0.72) 으로 골반 장기 탈출증이 심할수록 fibulin-5의 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였지만 통계학적으로 의미는 없었다($p = 0.156$). 또한, lysyl oxidase-like protein 1의 경우에도 stageⅢ의 경우에는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 3.570 (0.55~6.31)이고, stageⅣ의 경우에는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 3.925 (0.75~7.38)으로 골반 장기 탈출증이 심할수록 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA 발현이 증가하지만 통계학적으로 의미를 보이지는 않았다($p = 0.697$) (Table4).

Table 4. Comparison of the expression of mRNA of fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1 between stage III and stage IV

	Stage III	Stage IV	p-Value
Fibulin-5 level*	0.971	0.471	0.156
LOXL1 level*	3.570	3.925	0.697

* : $2^{-\Delta \Delta Ct}$ values

IV. 고 찰

골반 장기 탈출증은 인간의 수명 연장으로 그 유병율이 증가하고 있으며 이와 더불어 삶의 질을 중시하는 사회적인 분위기에 힘입어 그 중요성이 더욱 부각되고 있는 질환이다.^{2,3} 따라서, 골반 장기 탈출증의 병인론을 밝히고자 하는 노력이 시도되고 있고 골반 장기 탈출증은 여러 가지 병인이 복합적으로 작용하여 발생하는 다인자성 질환으로 생각되어지고 있다.^{2,4} 이러한 병인 중 하나로 주목 받고 있는 것이 결체 조직의 결함으로, 현재까지 결체 조직 중 하나인 콜라겐과 골반 장기 탈출증간의 연관성을 밝히고자 하는 많은 연구가 이루어졌으며 관련성 또한 어느 정도 증명되었다.^{1,6-11} 최근 탄력 섬유와 골반 장기 탈출증간의 연관성에 대한 연구가 이루어지고 있고, 골반 장기 탈출증에서 탄력 섬유가 감소되어 있는 것이 다수의 연구에서 증명된 바가 있다.^{21,22} 따라서, 정상 자궁 천골 인대 조직과 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 탄력 섬유의 형성에 관여하는 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현 양상

을 비교하여 골반 장기 탈출증 환자와 탄력 섬유 형성과의 연관성을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

탄력 섬유는 elastic core를 중심으로 microfibril이 둘러싸는 구조를 이루고 있으며, 세포 외 공간에서 tropoelastin과 microfibril의 결합하고 microfibril은 cross-link를 통해 안정화되어 형성된다.¹³ 이러한 형성 과정에 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1이 관여하는데, fibulin-5는 tropoelastin과 microfibril의 결합에 관여하고, lysyl oxidase-like protein 1은 microfibril의 cross-link을 담당 한다고 알려져 있다.¹⁵

먼저 골반 장기 탈출증 발생의 요인으로 알려져 있는 연령, 분만력, 폐경 여부는 연구계획 단계에서 matching 하였으며, 여성 호르몬 대체 요법 유무, 골반 수술 과거력, 당뇨나 고혈압, 만성 폐질환, 요추 간판 탈출증, 흡연력 등 골반 장기 탈출증의 위험 인자도 환자군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았다.²³ 이는 fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1이 현재까지 알려진 여러 위험 인자와 독립적인 인자가 될 수 있음을 의미한다.

본 연구 결과에서는 정상 자궁 천골 인대의 조직에 비해 골반 장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대의 조직에서 fibulin-5의 mRNA의 발현이 유의하게 감소되어 있었다. Fibulin-5는 탄력 섬유의 형성 과정 중에 관여하여,¹⁶ fibulin-5에 결함이 있을 경우 탄력 섬유 장애로 인한 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다.^{17,18} 동물 실험에 의하면, fibulin-5의 유전인자인 FBLN-5에 결함이 있는 쥐에서 피부, 폐, 혈관 구조에서 elastinopathy를 유발되는 것이 보고 된 바가 있다.^{17,18,24} 또한, Wang등의 연구에 따르면, thoracic aortic dissection환자에서 fibulin-5의 mRNA의 발현이 감소되어 있는 것을 볼 수 있었다.²⁴ 골반 장기 탈출증의 환자에서 정상 대조군에 비해 fibulin-5의 mRNA의 발현이 감소되어 있는 것은 골반 장기 탈출증의 경우에도 탄력 섬유의 형성 과정 중에서 tropoelastin과 microfibril의 결합 과정에 장애가 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다.

하지만, lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA는 골반 장기 탈출증의 자궁 천골 인대 조직에서 대조군의 조직과 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 앞서 Lysyl oxidase-like protein 1의 유전 인자인 LOXL1 gene

에 결함이 있는 쥐에서 분만 후에 탄력 섬유를 형성되지 않고 골반 장기 탈출증을 발생이 보고된 바 있다.¹¹ LOXL 1 gene에 결함이 있다는 것은 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA와 protein형성이 이루어지지 않고, 이로 인해 elastic fiber가 형성되지 않았음을 보여주는 것으로 lysyl oxidase-like protein 1이 elastic fiber 형성과정에 중요한 역할을 담당하는 사실과 elastic fiber가 형성되지 않으면 골반 장기 탈출증이 발생한다는 사실을 증명하는 것으로 본 실험은 그를 토대로 과연 골반 장기 탈출증 환자에서 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현이 감소되어 있는지를 밝히는 것이었다. 하지만, 본 연구의 결과는 환자군과 대조군과의 통계학적 차이를 보이지 않을 뿐만 아니라 오히려, 골반 장기 탈출증 환자에서 증가되는 경향을 보여 주었다. 이는 골반 장기 탈출증의 발생이 탄력 섬유의 형성 과정에서 lysyl oxidase-like protein 1이 관여하는 과정, 즉 microfibril의 cross-linking 과정에는 장애가 없다는 것을 암시하는 것이다. 따라서, fibulin-5와 연관 지어 생각할 때 골반 장기 탈출증은 tropoelastin과 microfibril과의 결합 과정의 장애로 인해 발생하는 것이

고, 이 과정의 장애로 인해 기존에 형성된 microfibril은 오히려 과도하게 cross-link가 형성되었을 가능성을 시사하고 있다. 그러나, 이를 증명하기 위해서는 골반 장기 탈출증 환자에서 microfibril cross-linking이 증가되어 있음을 밝힐 수 있는 추가 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

본 연구의 결과, 골반 장기 탈출증의 중등도와 fibulin-5, lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA의 발현도를 비교하였으나, 모두 환자군과 대조군간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 본 연구가 Pelvic Organ Prolapse Quantification (POPQ) system stage III와 IV만을 대상으로 하는 중증 골반 장기 탈출증 환자만을 대상으로 하여 Stage I 과 stage II의 경증 골반 장기 탈출증과 비교할 수 없었던 한계 때문으로 해석할 수도 있는데, 경한 골반 장기 탈출증 환자들이 수술적 치료를 받지 않는 현실적인 상황도 한 원인으로 작용한 듯 했다. 추후에 자궁 적출술을 필요로 하는 다른 양성 질환 동반한 환자군을 포함하여 광범위한 연구를 시행한다면, 이러한 점을 보완할 수 있을 것이라 사료되었다.

Chen등에 따르면, 골반 장기 탈출증 환자의 질벽 조직에서 정상인에 비

해 elasolytic activity는 차이를 보이지 않았으나, elastinase inhibitor 인 α 1-antitrypsin의 발현은 감소되어 있는 것을 발견하였으며 이로 미루어 elastic fiber의 대사의 변화가 결체 조직의 변화를 유발했을 것이라 주장한 바 있다.²⁵ 본 연구에서는 골반 장기 탈출증 환자에서 탄력 섬유 형성 과정에만 초점을 두었지만, 탄력 섬유의 분해과정에 대한 연구도 이루어 진다면 골반 장기 탈출증에 있어 탄력 섬유의 형성과 대사과정에 대한 총체적인 이해가 이루어질 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구에서는 fibulin-5의 mRNA가 정상 대조군의 자궁 천골 인대 조직에 비해 골반장기 탈출증 환자의 자궁 천골 인대 조직에서 낮게 발현됨이 관찰되므로, 골반 장기 탈출증의 병인에 있어서 fibulin-5가 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. 반면에 lysyl oxidase-like protein 1의 mRNA는 정상 대조군과 골반 장기 탈출증 환자와 발현의 큰 차이를 보이지 않는 것으로 미루어 골반 장기 탈출증의 발생에 있어 tropoelastin과 microfibril의 결합 과정에서의 결함이 골반 장기 탈출증을 유발한다는 추론을 할 수 있다. Fibulin-5와 lysyl oxidase-like protein 1 모두 골반 장기 탈출증의 중증도와는 큰 연관성이 있어 보이지 않았다.

참고 문헌

1. Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA, Zyczynski HM, Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblast that are derived from the pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:72-79.
2. Bump RC, Norton PA. Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1998;25:723-746.
3. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 1997;89:501-506.
4. Romanzi LJ. Urinary incontinence in women and men. *J Gend Specific Med* 2001;4:14-20.
5. Ulmsten U, Falconer C. Connective tissue in female urinary incontinence. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:509-515.
6. Norton PA. Pelvic floor disorders: The role of fascia and

ligaments. Clin Obstet Gynecol 1993;36:926-938.

7. Jackson SR, Avery NC, Tarton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ.

Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. Lancet 1996;347:1659-1661.

8. Rechberger T, Donica H, Baranowski W, Jakowicki J. Female urinary stress incontinence in terms of connective tissue biochemistry. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1993;49:187-191.

9. McIntosh LJ, Mallett VT, Frahm JD, Richardson DA, Evans MI.

Gynecologic disorders in women with Ehlers-Danlos syndrome. J Soc Gynecol investing. 1995;2:559-564.

10. Carley Me, Schaffer J. Urinary incontinence and pelvic organ

prolapse in women with Marfan or Ehlers Danlos syndrome. Am J Obstet Gynecol 2000;182:1021-1023.

11. Liu X, Zhao Y, Pawlyk B, Damaser M, Li T. Failure of elastic

fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders. Am J Pathol

2006;168:519-528.

12. Starcher B, Percival S. Elastin turnover in the rat uterus.

Connat Tissue Res 1985;13:207-215.

13. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. J Cell

Sic 2002;115:2817-2828.

14. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M,

Richardson JA, et al. Fibulin-5 is an elastin-binding protein

essential for elastic fibre development in vivo. Nature 2002;415:168-

171.

15. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S,

et al. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. Nature

2002;415:171-175.

16 Midwood KS., Schwarzbauer JE. Elastic fiber: building bridges

between cells and their matrix. Curr Biol. 2002;12:279-281.

17. Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Marson A, et

al. Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J Biol Chem.* 2004;279:23748-23758.

18. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 2003;88:660-672.

19. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis require lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004;36:178-182.

20. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:10-17.

21. Ewies AA, Al-Azzawi F, Thompson J. Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of post-menopausal women

with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis. *Hum Reprod* 2003;18:2189-2195.

22. Lin SY, Tee YT, Ng SC, Chang H, Lin P, Chen GD. Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007;18:43-48.

23. Schaffer JI, Wai CY, Boreham MK. Etiology of pelvic organ prolapse. *Clinic Obstet Gynecol* 2005;48:639-647.

24. Wang X, LeMaire SA, Chen L, Carter SA, Shen YH, Gan Y, et al. Decreased expression of fibulin-5 correlates with reduced elastin in thoracic aortic dissection. *Surgery* 2005;138:352-359.

25. Chen B, Wen Y, Polan ML. Elastolytic activity in women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Neurourol and Urodyn* 2004;23:119-126.

Abstract

Expression of fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1 in pelvic
organ prolapse

Hyun Joo Jung

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sang Wook Bai)

Objective: The fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1 were essential proteins for elastic fiber development. The aim of this study was to determine the relationship between the expression levels of mRNA of fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1 in pelvic organ prolapse.

Materials and methods: Fifteen patients diagnosed with severe pelvic organ prolapse who visited the division of Urogynecology, Department of Obstetrics and Gynecology between May 2006 and September 2006 and fifteen patients without pelvic organ prolapse were enrolled in this prospective study. A quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction was used to analyze the expression levels of mRNA of fibulin-5 and lysyl oxidase-like protein 1.

Results: There were no differences in the characteristics such as the age, menopause status, parity, BMI (Body mass index), history of the pelvic surgery and the medico-surgical illness between the two groups. The mRNA expression of fibulin-5 was decreased significantly in pelvic organ prolapse group (ratio of mRNA expression: 0.705 vs. 1.215, $p = 0.043$).

However, there were no significant differences in mRNA expression of lysyl oxidase-like protein (ratio of mRNA expression: 3.759 vs. 2.435, $p = 0.079$).

There were no difference in mRNA expression of fibulin-5 and lysyl oxidase-

like protein 1 in proportion to the severity of pelvic organ prolapse($p = 0.156, 0.697$).

Conclusion: Our results showed that the mRNA expression of fibulin-5 was independently lower in pelvic organ prolapse group than in those of control group. This suggests that failure to the binding of tropoelastin to microfibrils in elastic fiber development could be one possible cause of pelvic organ prolapse.

Key Words : fibulin-5, lysyl oxidase-like protein 1, pelvic organ prolapse, real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction