

자궁내막증 환자의 자궁내막에서  
thioredoxin 및 thioredoxin binding  
protein-2 mRNA 발현의 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

서 석 교

자궁내막증 환자의 자궁내막에서  
thioredoxin 및 thioredoxin binding  
protein-2 mRNA 발현의 역할

지도교수 이 병 석

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과

서 석 교

# 서석교의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2009 년 6 월

## 감사의 글

진료와 연구로 바쁘신 가운데도 본 논문이 완성되도록 아낌없는 배려와 충고로 이끌어 주신 이병석 교수님께 진심으로 감사드리며, 본 연구에 각별한 관심으로 세심한 지도를 베풀어 주신 김정호 교수님과 황경주 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 지금 이 자리까지 이끌어 주신 여러 산부인과 교수님과 의국원 모두에게 감사드립니다.

언제나 무한한 사랑과 격려로 이끌어 주시는 어머니, 의학의 길로 들어서는데 큰 힘이 되어주신 하늘에 계신 아버지, 소중한 가족 분들께도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로, 사랑하는 아내 혜정과 삶의 힘이 되어주는 예쁜 두 딸 재현, 주현에게 이 작은 논문을 바칩니다.

저자 씀

# 차례

국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 연구 대상 .....	6
2. 연구 방법 .....	7
가. 자궁내막조직과 복강액의 채취 .....	7
나. 검체의 처리 .....	7
다. RNA 회수 및 실시간 역전사증합효소연쇄반응 .....	7
라. 혈액 및 복강액의 TRX와 TBP-2의 농도 측정 .....	8
마. 통계 분석 .....	8
III. 결과 .....	9
1. 자궁내막증군과 대조군의 임상적 특성 .....	9
2. 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현 비교 .....	9
3. 혈액과 복강액에서 TRX와 TBP-2의 농도 비교 .....	9
4. 자궁내막조직, 혈액, 복강액에서 TRX와 TBP-2의 상관관계 .....	13
IV. 고찰 .....	15
V. 결론 .....	19
참고문헌 .....	20
영문요약 .....	26

## 그림 차례

- 그림 1. Comparison of TRX and TBP-2 mRNA expression in the endometrium between endometriosis and control groups..... 10
- 그림 2. TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium at different stage of the menstrual cycle..... 11

## 표 차례

표 1. Clinical and laboratory characteristics of study groups.....	9
표 2. Comparison of TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium of endometriosis and control groups.....	13
표 3. Comparison of serum TRX and TBP-2 levels between endometriosis and control groups.....	14
표 4. Pearson's correlation coefficients between TRX and TBP-2 of endometriosis and control groups.....	14

## 국문요약

### 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 thioredoxin 및 thioredoxin binding protein-2 mRNA 발현의 역할

**목적** : 본 연구에서는 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 thioredoxin (TRX) 및 thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) mRNA 발현과 더불어 혈액과 복강액에서 TRX와 TBP-2의 농도를 대조군과 비교하여 자궁내막증과 산화 스트레스 (oxidative stress)와의 관련성을 알아보고자 한다.

**연구 방법** : 강남세브란스병원 산부인과에서 양성 부인과 질환으로 수술을 받은 환자 중 병리조직학적 검사 상 자궁내막증으로 확진된 30명을 실험군으로 하고, 자궁내막증 이외에 다른 양성 부인과 질환으로 진단 받은 28명을 대조군으로 하였다. 자궁내막의 TRX와 TBP-2 mRNA 발현은 실시간 역전사증합효소연쇄반응을 이용하여 정량화하였고, 혈액과 복강액의 TRX와 TBP-2 농도는 효소면역측정법을 사용하였다.

**결과** : 자궁내막조직에서 양 군간 TRX의 발현에는 차이가 없었으나 ( $19.69 \pm 47.03$ -fold vs  $20.16 \pm 20.09$ -fold,  $P=0.058$ ), TBP-2의 발현은 자궁내막증군에서 유의하게 낮았으며 ( $4.69 \pm 4.14$ -fold vs  $16.80 \pm 22.16$ -fold,  $P=0.000$ ), TRX/TBP-2의 비율은 자궁내막증군에서 유의하게 높았다 ( $5.63 \pm 9.16$  vs  $2.01 \pm 3.10$ ,  $P=0.017$ ). 생리주기를 나누어 분석한 결과 자궁내막증군에서 초기 증식기에 TRX와 TBP-2의 발현이 유의하게 낮았고 (TRX:  $3.71 \pm 1.85$ -fold vs  $26.00 \pm 17.10$ -fold,  $P=0.010$ , TBP-2:  $2.89 \pm 2.69$ -fold vs  $10.33 \pm 4.42$ -fold,



$P=0.019$ ), TRX/TBP-2의 비율은 후기 분비기에 유의성은 없었으나 높게 나타났으며 ( $4.28 \pm 7.03$  vs  $1.07 \pm 0.64$ ,  $P=0.074$ ), 생리기에는 유의하게 높았다 ( $14.36 \pm 14.33$  vs  $0.74 \pm 0.28$ ,  $P=0.029$ ). 혈액과 복강액에서는 양 군간 TRX와 TBP-2의 농도차이는 보이지 않았다. 대조군의 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA 발현은 유의한 상관관계를 보였지만 ( $r=0.737$ ,  $P=0.000$ ), 자궁내막증군의 자궁내막조직에서는 상관관계가 없었다 ( $r=0.319$ ,  $P=0.086$ ). 대조군에서 자궁내막조직의 TRX mRNA 발현과 혈액 및 복강액에서의 TRX 농도사이에는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

**결론** : 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서는 산화 스트레스의 영향으로 TRX와 TBP-2사이의 불균형이 발생하는데, TRX의 발현이 증가하지는 않지만 TBP-2의 발현이 감소하여 TRX가 상대적으로 높은 활성도를 나타내며, 이러한 변화가 자궁내막증의 발생과 관련이 있는 것으로 생각된다. 따라서 산화 스트레스가 자궁내막증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말 : 자궁내막증, 산화 스트레스, thioredoxin, thioredoxin binding protein-2

# 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 thioredoxin 및 thioredoxin binding protein-2 mRNA 발현의 역할

<지도교수 이병석>

연세대학교 대학원 의학과

## 서 석 교

### I. 서론

자궁내막증 (endometriosis)은 자궁 이외의 장소에 자궁내막의 선 (gland)과 기질 (stroma) 조직이 존재하는 상태로, 생리통, 성교통, 만성 골반통 및 불임을 유발하는 매우 흔한 질환이다. 주로 젊은 여성에서 발생하여 가임기 여성의 5%-15% 정도 발생률을 보이는 것으로 알려져 있고, 최근에는 50%까지도 보고하고 있으며, 우리나라에서도 생활양식의 서구화에 따라 점차 발병률이 증가하는 추세에 있다.<sup>1-2</sup> 특히, 불임여성의 20-50%가 자궁내막증에 의해 불임이 초래되는 것으로 보고되고 있어 여성 불임의 가장 중요한 원인으로 생각되고 있다.<sup>3</sup>

자궁내막증의 병리기전은 명확히 밝혀져 있지 않으나 생리혈의 역류현상,<sup>4</sup> 체강 상피 이행설,<sup>5</sup> 혈액 또는 림프관을 통한 전이<sup>6</sup> 등으로 설명되고 있다. 가장 일반적인 학설은 자궁내막세포가 생리혈의 역류현상으로 복강 내에 도달하여 착상한다는 이론으로, 현재는 이러한 기전에 면역학적, 생물학적 요인이 복합적으로 작용하여 자궁내막증이 발생하는 것으로 설명하고 있다. 생리혈의 역류현상은 대부분의 여성

에서 일어나는 현상으로, 실제로 자궁내막증이 발생하기 위해서는 복강 내로 역류된 자궁내막세포가 면역반응에 의해 제거, 흡수되지 않아야 하고, 세포고사 (apoptosis)를 피해야 하며, 난소나 복막 등에 붙어서 세포간질에 침습하고 신생혈관을 공급해야한다. 최근 이러한 현상을 일으키는 근본적인 이유 중의 하나로 산화 스트레스 (oxidative stress)가 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되고 있다.<sup>7,8</sup>

산화 스트레스는 살아있는 세포에서 항산화 방어기전에 대하여 산화기전이 우세하여 세포의 단백질, 지질, 핵산에 산화 손상을 일으키는 상태라고 정의할 수 있다. 산화 스트레스는 세포의 단백질과 지질의 변형을 초래할 뿐만 아니라 DNA도 손상시키며, 세포의 증식, 성장 및 분화를 억제하고 여러 가지 신호전달체계를 활성화시킴으로써 세포의 노화와 고사에 영향을 미치게 된다. 이러한 과정을 통하여 산화 스트레스는 죽상동맥경화증, 악성종양, 자가면역질환, 파킨슨병이나 알츠하이머병 같은 신경퇴행성 질환, 노화 등을 일으키는 주요 원인으로 여겨지고 있다.

Thioredoxin (TRX)은 본래 리보뉴클레오티드 (ribonucleotide)의 전자 공여체로 동정되었으며,<sup>9</sup> 산화-환원 반응에 의한 생체의 신호전달 체계에서 중심적인 역할을 하는 내인성 항산화단백질로서, 산화 손상 시 발현이 증가함으로써 산화 스트레스 상태에서 생체방어와 적응반응에 필요한 단백질로 인식되고 있다. Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)는 thioredoxin interaction protein 또는 vitamin D<sub>3</sub>-upregulated protein-1로 알려져 있으며, TRX와 상호작용을 통하여 그 기능을 나타낸다.<sup>10</sup> TBP-2가 과 발현 되는 경우에는 TRX의 활동성이 감소되어 세포의 성장이 감소되고, 고사가 증진된다.<sup>11,12</sup> 따라서 TRX와 TBP-2는 산화 스트레스와 관련하여 상호작용을 통해 세포의 증식, 성장 및 고사에 관여한다고 할 수 있다.

자궁내막증과 산화 스트레스의 관련성에 관하여 보고된 연구들의 경우, 동일하지 않은 결과를 보여 자궁내막증과 산화 스트레스의 관련

성에 대하여 확실한 결론을 지을 수 없다.<sup>13-19</sup> 현재까지 조직학적으로 진단된 자궁내막증 환자를 대상으로 하여 환자의 자궁내막조직, 혈액, 복강액 모두를 대상으로 한 연구는 없으며, 특히 항산화체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있는 TRX와 TBP-2에 대한 연구는 전무한 상태이다.

본 연구에서는 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA 발현과 더불어 혈액과 복강액에서 TRX와 TBP-2의 농도를 대조군과 비교하여 자궁내막증과 산화 스트레스와의 관련성을 알아보고자 한다. 또한 자궁내막조직, 혈액, 복강액 등 각각의 검체에서 측정된 농도를 비교하여 산화 스트레스가 자궁내막증의 발생에 미치는 영향을 단계적으로 이해하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구는 강남세브란스 병원에서 난소 종양으로 수술을 받은 환자들 중 병리조직학적 검사 상 자궁내막증으로 확진된 환자들 30명을 실험군으로 하였고 자궁내막증 소견이 보이지 않았던 28명을 대조군으로 하였다. 자궁경부상피내종양 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN)으로 수술을 받은 환자들 중 수술 전 초음파 검사 상 정상 소견을 보인 환자도 대조군에 포함시켰다.

이들은 모두 최근 6개월 이내에 성선자극호르몬 유리호르몬 작용제 (gonadotropin releasing hormone agonist, GnRH-a)나 경구 피임제 등을 사용한 치료를 받은 적이 없었고, 임신이 아님이 확인된 환자들로서 정상 월경주기를 갖는 여성들이었다.

수술을 시행 받은 환자 중 산화 스트레스와 밀접한 연관이 있다고 보고된 질병 (예: 심혈관 질환, 악성 종양 등)으로 치료받은 과거력이 있는 환자와 자궁근종으로 수술 받은 환자 및 자궁내막의 병변 (자궁내막증식증, 자궁내막폴립, 점막하자궁근종 등)이 있는 환자는 본 연구 대상에서 제외하였다.

정상 생리주기는 초기 증식기 (배란 전 5일~10일), 후기 증식기 (배란 전 4일~배란일), 초기 분비기 (배란 후 1일~7일), 후기 분비기 (배란 후 8일~14일), 생리기로 나누었다.

자궁내막증의 병기는 1996년 개정된 미국생식의학회 분류기준 (revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis, 1996)을 따랐다.

## 2. 연구 방법

### 가. 자궁내막조직과 복강액의 채취

실험군과 대조군의 자궁내막조직은 수술 당시 자궁내막조직 생검을 통하여 채취되었다. 실험군의 경우 이소성 자궁내막조직은 병리조직학적으로 자궁내막증임을 확인하였다. 복강액의 경우 수술 시 복벽의 출혈이 복강 내로 흘러들어가지 않도록 주의하면서 더글러스와 (cul-de-sac)에서 채취하였다.

### 나. 검체의 처리

수술 당시 얻어진 조직들은 생리식염수와 세척액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 각각 세척하여 혈액을 제거한 후 실험이 이루어질 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결해두었다. 채취한 복강액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 세포를 분리시키고 상층액만을 보관 용기에 담아 실험 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

### 다. RNA 회수 및 실시간 역전사중합효소연쇄반응

동결해 두었던 자궁내막조직은 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 자궁내막조직에서 추출된 총 RNA 2  $\mu\text{g}$ 으로 SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

각 군의 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현 정도는 ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 이용하여 정량화하였다. 제조된 2  $\mu\text{L}$  cDNA에 power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems)와 각 유전자에

대한 primer를 혼합한 다음 총 20  $\mu$ L로 실시간 정량적 중합효소연쇄 반응을 시행하였다. 각각의 primer는 다음과 같다. TRX (forward primer 5'-AGC AGA TCG AGA GCA AGA CT-3', reverse primer 5'-CTC TGA AGC AAC ATC CTG AC-3'), TBP-2 (forward primer 5'-ATA GCG CAG GTA CTC CGA AG-3', reverse primer 5'-GGT GAT AGT GGA GGT GTG TG-3'). 각 유전자의 발현 정도를 평가하기 위해 Delta-Delta Ct값을 이용하여 상대적 정량 분석을 시행하였다

#### 라. 혈액 및 복강액의 TRX와 TBP-2의 농도 측정

혈액 및 복강액의 TRX (Panpacific Tech, Missouri, TX, USA)와 TBP-2(Panpacific Tech, Missouri, TX, USA)의 농도는 상업화된 효소면역측정키트 (enzyme-linked immunosorbent assay kit)를 사용하였다.

#### 마. 통계분석

자궁내막증군과 대조군의 임상적 특성 비교는 Student's t-test를 사용하였다. 양 군간 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA 발현과 TRX/TBP-2 비율의 비교는 Mann-Whitney U-test를 이용하였다. 양 군간 혈액과 복강액에서 TRX와 TBP-2의 농도 비교 또한 Mann-Whitney U-test를 이용하였다. 각 군내에서 생리주기에 따른 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현정도의 차이는 Kruskal-Wallis test를 사용하였다. 자궁내막조직, 혈액, 복강액에서 TRX와 TBP-2의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 이용하였다. 실험값은 평균  $\pm$  표준편차로 표시하며,  $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### III 결과

#### 1. 자궁내막증군과 대조군의 임상적 특성

30명의 자궁내막증 환자와 28명의 대조군 환자의 평균 연령은 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, 체질량지수는 자궁내막증군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다. 평균 임신 횟수와 분만 횟수는 자궁내막증군이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았고, 생리통은 심하였다. 자궁내막증군에서 CA-125 수치는 통계학적으로 유의하게 증가하였으나, 염증지표인 백혈구수와 neutrophil to lymphocyte ratio (NLR)은 두 군간 차이가 없었다 (Table 1).

자궁내막증군의 경우 자궁내막증 1-2기가 6명 이었으며, 3-4기는 24명이었다. 대조군의 경우 유피낭종 9명, 점액낭샘종 2명, 장액낭샘종 1명, 자궁경부상피내종양 10명, 가성낭종 1명, 수난관 (hydrosalpinx) 1명, 특별한 병변이 없는 정상 대조군 4명이었다.

**Table 1. Clinical and laboratory characteristics of study groups**

	Endometriosis (n = 30)	Control (n = 28)	<i>P</i> value
Age (years)	32.20 ± 7.72	34.78 ± 6.72	0.181
BMI (m <sup>2</sup> /kg)	19.76 ± 2.18	21.24 ± 1.96	0.010
Gravidarum (n)	1.03 ± 1.03	2.39 ± 1.93	0.002
Parity (n)	0.60 ± 0.81	1.03 ± 0.79	0.044
Dysmenorrhea (0-3)	1.90 ± 1.06	0.75 ± 0.70	0.000
Serum CA-125 (IU/mL)	47.73 ± 34.10	25.38 ± 27.60 <sup>a</sup>	0.029
WBC count (10 <sup>3</sup> /μL)	6.52 ± 2.70	6.19 ± 2.26	0.638
NLR	2.42 ± 1.40	2.04 ± 0.82	0.239

BMI, body mass index; WBC, white blood cell; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio.

<sup>a</sup>n = 14



양 군의 조직학적 생리주기를 살펴보면 자궁내막증 환자의 경우 초기 증식기 6명, 후기 증식기 4명, 초기 분비기 7명, 후기 분비기 9명, 생리기가 4명이었으며, 대조군의 경우 초기 증식기 4명, 후기 증식기 8명, 초기 분비기 5명, 후기 분비기 7명, 생리기가 4명이었다.

## 2. 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현 비교

모든 생리주기를 통합하여 분석한 결과, 양 군간 TRX mRNA의 발현에는 차이가 없었으나 ( $19.69 \pm 47.03$ -fold vs  $20.16 \pm 20.09$ -fold,  $P=0.058$ ), TBP-2 mRNA의 발현은 자궁내막증군에서 통계학적으로 유의하게 낮았으며 ( $4.69 \pm 4.14$ -fold vs  $16.80 \pm 22.16$ -fold,  $P=0.000$ ), TRX/TBP-2의 비율은 유의하게 높았다 ( $5.63 \pm 9.16$  vs  $2.01 \pm 3.10$ ,  $P=0.017$ )(Fig. 1).

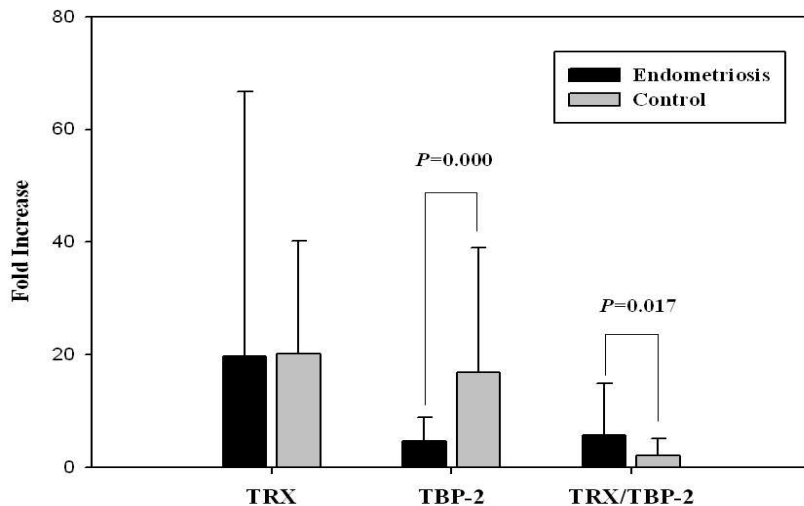


Fig. 1. Comparison of TRX and TBP-2 mRNA expression in the endometrium between endometriosis and control groups

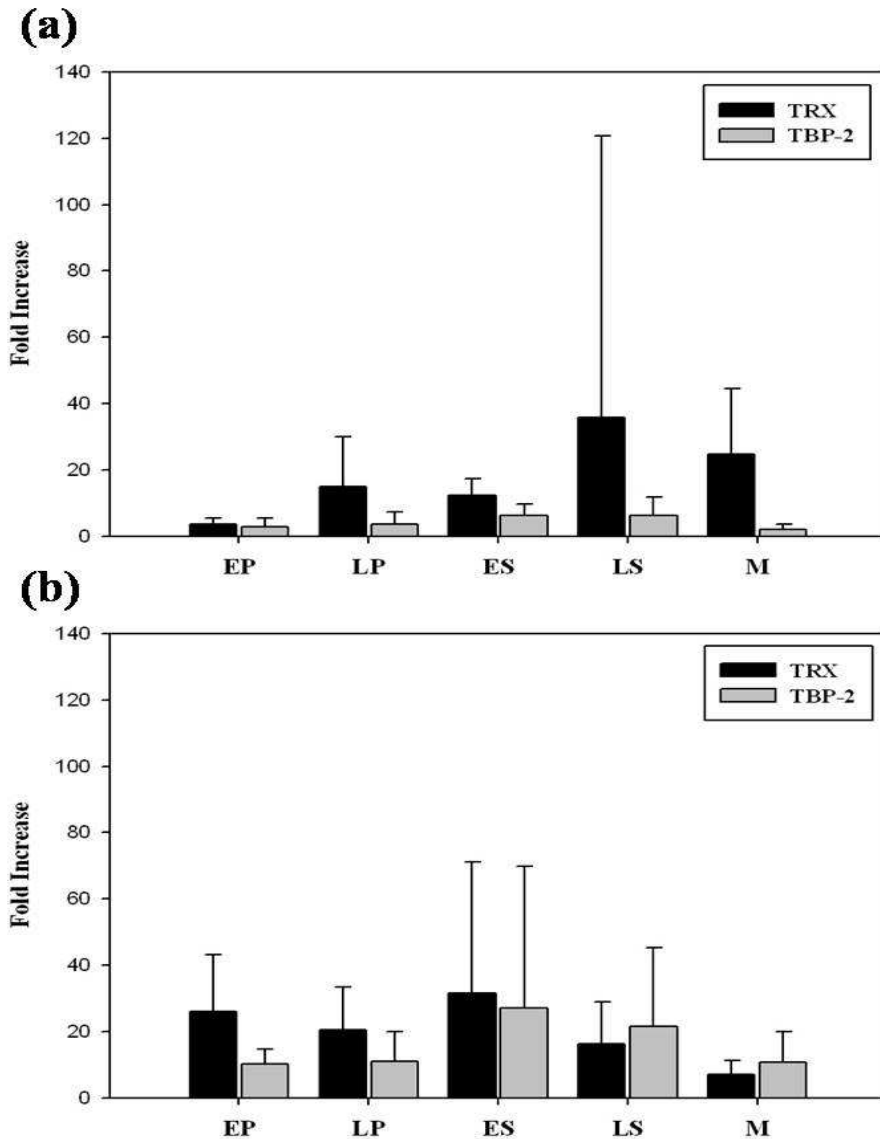


Fig. 2. TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium at different stage of the menstrual cycle. (a) Endometriosis group. (b) Control group. EP, early proliferative phase; LP, late proliferative phase; ES, early secretory phase; LS, late secretory phase; M, menstrual phase.

생리주기를 나누어 분석한 결과, 후기 증식기, 초기 분비기, 후기 분비기, 생리기에는 양 구간 TRX와 TBP-2의 발현의 차이는 없었으나 초기 증식기에 자궁내막증군에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다. TRX/TBP-2의 비율은 후기 분비기에서 통계학적인 유의성은 없었으나 자궁내막증군에서 높았으며, 생리기에는 통계학적으로 유의하게 높았다. 하지만 초기 증식기, 후기 증식기, 초기 분비기에는 양 구간 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

자궁내막증군과 대조군 내에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현을 생리주기를 나누어 분석하여 보았으나 양 군 모두 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 자궁내막증군의 경우 증식기보다 분비기에서 TRX의 발현이 증가하여 TRX/TBP-2의 비율이 증가하는 경향을 나타냈으며, 대조군의 경우 TBP-2가 증식기에는 TRX에 비하여 낮은 발현을 보였으나 분비기와 생리기에는 TRX와 비슷한 발현을 보이거나 오히려 TRX보다 증가하여 TRX/TBP-2의 비율이 감소하는 경향을 보였다. 또한 TRX와 TBP-2가 통계학적인 유의성은 없었지만 초기 분비기에 증가하는 소견을 보였다 (Fig. 2 and Table 2).

### 3. 혈액과 복강액에서 TRX와 TBP-2의 농도 비교

혈액과 복강액에서의 TRX와 TBP-2의 농도는 대상 환자 중 혈액과 복강액 모두를 채취한 환자를 대상으로 측정하였으며, 자궁내막증군에서 16명이었고 대조군에서 17명이었다.

혈액과 복강액 모두에서 양 구간 TRX와 TBP-2의 농도 차이는 보이지 않았다. 혈액에서는 TRX가 TBP-2에 비하여 높게 나타났으며 복강액에서는 TBP-2가 높은 경향을 보였다 (Table 3).

**Table 2. Comparison of TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium of endometriosis and control groups**

		EP	LP	ES	LS	M	<i>P</i> value <sup>a</sup>
TRX (fold)	EMS	3.71 ± 1.85	14.91 ± 15.11	12.33 ± 5.03	35.92 ± 84.89	24.82 ± 19.72	0.066
	Control	26.00 ± 17.10	20.52 ± 12.99	31.64 ± 39.48	16.35 ± 12.58	6.96 ± 4.41	0.208
	<i>P</i> value <sup>b</sup>	0.010	0.315	0.268	0.370	0.200	
TBP-2 (fold)	EMS	2.89 ± 2.69	3.57 ± 3.67	6.21 ± 3.58	6.36 ± 5.56	2.18 ± 1.37	0.559
	Control	10.32 ± 4.42	11.04 ± 8.84	27.21 ± 42.52	21.54 ± 23.87	10.87 ± 9.16	0.957
	<i>P</i> value <sup>b</sup>	0.019	0.164	0.530	0.083	0.057	
TRX/TBP-2	EMS	1.75 ± 1.03	9.96 ± 16.51	3.21 ± 3.36	4.28 ± 7.04	14.36 ± 14.34	0.221
	Control	2.44 ± 1.19	3.76 ± 5.93	1.71 ± 1.01	1.08 ± 0.64	0.75 ± 0.29	0.087
	<i>P</i> value <sup>b</sup>	0.914	0.927	0.432	0.074	0.029	

TRX, thioredoxin; TBP-2, thioredoxin binding protein-2; EMS, endometriosis; EP, early proliferative phase; LP, late proliferative phase; ES, early secretory phase; LS, late secretory phase; M, menstrual phase.

<sup>a</sup>Kruskal-Wallis test was used to analyze differences of TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium through menstrual phase within each group

<sup>b</sup>Mann-Whitney U-test was used to analyze differences of TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium between two groups

#### 4. 자궁내막조직, 혈액, 복강액에서 TRX와 TBP-2의 상관관계

대조군의 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2 mRNA 발현 사이에는 통계학적으로 유의한 양의 상관관계가 있었으나, 자궁내막증군에서는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

한편 자궁내막조직, 혈액, 복강액 모두를 채취한 대조군은 모두 11명을 대상으로 하여 각각의 조직 사이에 TRX의 발현이 상관관계가 있는지 분석하였으나 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (Table 4).

**Table 3. Comparison of serum TRX and TBP-2 levels between endometriosis and control groups**

	Endometriosis (n = 16)	Control (n = 17)	<i>P</i> value
TRX in S (ng/mL)	667.0 ± 109.1	716.4 ± 150.0	0.191
TBP-2 in S (ng/mL)	213.6 ± 63.6	213.3 ± 73.1	0.958
TRX in PF (ng/mL)	349.7 ± 260.5	390.2 ± 189.1	0.488
TBP-2 in PF (ng/mL)	461.5 ± 77.3	459.3 ± 104.5	0.260

S, serum; PF, peritoneal fluid.

**Table 4. Pearson's correlation coefficients between TRX and TBP-2 of endometriosis and control groups**

		<i>r</i>	<i>P</i> value
Endometriosis	TRX and TBP-2 in EM	0.319	0.086
	TRX and TBP-2 in S	0.095	0.725
	TRX and TBP-2 in PF	0.527	0.036
Control	TRX and TBP-2 in EM	0.737	0.000
	TRX and TBP-2 in S	0.637	0.006
	TRX and TBP-2 in PF	0.707	0.002
	TRX in EM and TRX in S	0.489	0.127
	TRX in EM and TRX in PF	0.482	0.133
	TRX in S and TRX in PF	0.351	0.290

EM, endometrium; S, serum; PF, peritoneal fluid.

#### IV 고찰

본 논문에서는 항산화체계에서 중요한 역할을 하는 TRX와 TBP-2를 이용하여 산화 스트레스와 자궁내막증 사이의 연관성을 살펴보고, 자궁내막조직에서의 mRNA 발현과 더불어 혈액과 복강액에서의 농도를 비교함으로써 산화 스트레스가 자궁내막증의 발생에 미치는 영향을 단계적으로 이해하려고 노력하였다.

자궁내막증군과 대조군간 자궁내막에서의 TRX mRNA 발현은 차이가 없었으나 TBP-2 mRNA의 발현은 자궁내막증군에서 유의하게 낮았으며, TRX/TBP-2의 비율은 자궁내막증군에서 유의하게 높음을 확인할 수 있었다. 한편, 대조군의 경우 자궁내막에서 TRX와 TBP-2의 mRNA 발현은 서로 유의한 상관관계를 보였으나 자궁내막증군의 경우 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 자궁내막증군에서는 산화 스트레스의 영향으로 TRX와 TBP-2의 상호 불균형이 발생함을 알 수 있으며, TRX의 발현이 증가하기 보다는 TRX의 조절 인자 (negative regulator)인 TBP-2의 발현이 감소하여 상대적으로 TRX가 높은 활성도를 갖는 것으로 생각할 수 있다.

두 군간 생리주기에 따른 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현 양상을 비교해 보면, 대부분의 주기에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, 초기 증식기에 자궁내막증군에서 TRX와 TBP mRNA의 발현이 유의하게 낮은 것을 확인할 수 있었지만 TRX/TBP-2의 비율은 유의한 차이를 보이지 않았다. 두 군간 TRX/TBP-2의 비율은 후기 분비기에 유의하지는 않았지만 상당한 차이를 보였고 ( $P=0.068$ ) 생리기에는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ( $P=0.028$ ). 따라서 대조군과 비교해 볼 때, 자궁내막증군에서는 다른 생리 주기에 비하여 후기 분비기와 생리기에 상대적인 TRX의 활성도가 높음을 알 수 있다.

세포고사란 다세포 생물에서 유전자적으로 계획된 세포사망기전 (programmed cell death)으로 세포의 증식과 세포의 소실이 균형을

이름으로써 적절한 세포의 수를 유지하게 하거나 세포의 분화 및 발달을 조절하는 기능을 한다. 자궁내막도 세포고사를 통하여 자궁내막 기능층 (functional layer)의 노화된 세포를 제거함으로써 세포의 항상성 유지에 기여하는데, 자궁내막증 환자의 역류된 자궁내막세포는 세포고사 과정이 현저하게 감소되었고,<sup>20</sup> 선상피세포 (glandular epithelium)에서 세포고사 지수 (apoptotic index)도 감소된다고 보고되고 있다.<sup>21</sup> 이러한 현상은 자궁내막의 생리주기 중에 후기 분비기, 생리기 및 초기 증식기에 걸쳐 나타났는데, 정상적인 세포고사 과정이 일어나지 않음으로써 역류된 자궁내막세포가 생존하여 자궁내막이 아닌 다른 부위에 착상하게 되고 자궁내막증을 일으키는 것으로 생각되고 있다. TRX가 세포의 성장을 증가시키는 정확한 기전은 알려지지 않았으나 nuclear factor-kB (NF-kB),<sup>22</sup> p53,<sup>23</sup> activator protein 1 (AP-1)<sup>24</sup>와 같이 산화-환원 (redox)에 민감한 전사인자 (transcription factor)들을 활성화시키는데 관여할 것으로 생각되며, apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1)<sup>25</sup>와 같은 고사촉진 단백질과 phosphatase and tensin homolog (PTEN)<sup>26</sup>과 같은 종양억제 단백질의 발현을 저하시켜 세포고사를 억제하기도 한다. 따라서 후기 분비기와 생리기에 자궁내막조직 내 TRX 활성의 증가는 자궁내막세포의 성장을 증진시키고 세포고사를 감소시켜, 복강 내로 역류된 자궁내막 세포들이 부착, 증식, 침윤하여 자궁내막증의 병변을 유도하는데 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있다.

Maruyama 등은 정상인들의 자궁내막에서 생리주기에 따른 TRX의 발현을 보고하였는데 초기 분비기에 TRX 발현이 증가되어 있음을 확인하였으며,<sup>27</sup> 세포 배양을 통하여 에스트로겐이 TRX의 발현을 증가시키고 에스트로겐 길항제인 tamoxifen이 TRX의 발현을 감소시키는 것을 보고하였다.<sup>28</sup> 이러한 사실에 근거하여 자궁내막에서 TRX의 발현은 에스트로겐의 농도와 밀접한 연관이 있으며, 포배 (blastocyst)의 착상에 중요한 역할을 할 것으로 주장하였다. Stavreus-Evers 등

은 정상인의 자궁내막에서 분비기 동안에는 TRX 발현의 차이가 없음을 보고하였지만 증식기에 비하여 분비기에 TRX의 발현이 상대적으로 높았고,<sup>29</sup> Clarke 등은 TRX가 임신 초기에 관여하는 인자로 보고하였으며,<sup>30</sup> Matsui 등은 TRX 유전자를 제거한 생쥐에서 착상시기에 배아 (embryo) 발달이 억제된다는 연구결과를 보고하였다.<sup>31</sup> 따라서 TRX는 포배의 착상과 배아의 발달 모두에 관여하고 있는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서도 통계학적으로 의미 있는 차이는 없었지만 대조군에서 다른 생리주기에 비하여 초기 분비기에 TRX와 TBP-2의 발현이 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, TBP-2의 발현은 TRX와 유의한 상관관계를 보였다. 이러한 결과는 TRX 뿐만 아니라 TBP-2의 발현도 에스트로겐의 영향을 받는 것으로 생각할 수 있으며, 착상과 배아의 발달에 영향을 미치는 것으로 추측할 수 있다. 한편, Ota 등은 산화질소와 superoxide dismutase가 생리주기에 따른 변화를 보이고 분비기에 높은 발현을 나타내며, 자궁내막증 환자에서는 이러한 변화가 없어지는 것으로 보고하면서 불임에 중요한 원인으로 생각하였다.<sup>32</sup> 본 연구에서도 자궁내막증 환자의 경우 생리주기에 따른 TRX와 TBP-2의 발현에 문제가 있음을 알 수 있었고 이러한 변화는 자궁내막증의 발생 뿐 아니라 자궁내막증 환자에서의 불임과도 연관이 있을 가능성이 있을 수 있음을 시사한다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 항산화제는 자궁내막조직에서 생리주기에 따라 발현이 변화되고 그 변화는 에스트로겐이나 프로게스테론의 영향을 받는 것으로 생각해 볼 수 있으며, 이러한 방어기전에 문제가 있을 경우 자궁내막증에 이환될 가능성이 증가되며 불임과도 연관이 있을 가능성이 있다.

한편 혈액과 복강액에서의 TRX와 TBP-2의 농도는 양 군에서 차이를 보이지 않았고 자궁내막에서의 mRNA의 발현과도 상관관계가 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 자궁내막에서의 TRX와 TBP-2의 변화는 혈액과 복강액에서 변화를 일으키지 않으며, 혈액과 복강액에



서의 TRX와 TBP-2 농도는 자궁내막증의 발생과 무관한 것으로 생각된다. Lambrinouadaki 등도 혈액의 TRX농도는 자궁내막증과 무관한 것으로 보고하여 본 연구과 일치된 결과를 보였다.<sup>19</sup> 혈액을 대상으로 한 연구에서 비타민 A, 비타민 E,  $\beta$ -catotene, lycopene 등 대부분의 항산화제에서 양 군간 차이를 나타내지 않았고, 복강액을 대상으로 한 연구에서도 nitric oxide, total antioxidant status, 활성 산소종 등의 차이가 없었다. 자궁내막증과 산화 스트레스간의 유의한 관계가 있음을 보고한 연구들도 대부분 일부 항산화제나 산화 스트레스 지표에서 차이를 보였을 뿐 모든 지표가 유의한 차이를 보이지는 않았다.<sup>13-19,33</sup> 혈액이나 복강액내의 항산화제들은 산화 스트레스에 의한 변화가 매우 미미하거나 국소적으로 발현하여 검출이 어려운 것으로 생각되나 명확한 이유는 알 수 없으며 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 논문은 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 TRX와 TBP-2 mRNA의 발현을 대조군과 비교함으로써 산화 스트레스가 자궁내막증의 발생에 미치는 영향을 보고한 최초의 연구이다. 산화 스트레스와 관련하여 자궁내막조직에서 TRX와 TBP-2의 발현은 보고된 적이 없으며, 특히 TBP-2의 경우 정상 자궁내막조직에서의 발현과 생리주기에 따른 변화를 최초로 보고하였다. 또한 자궁내막증과 산화 스트레스와의 연관성을 연구함에 있어 자궁내막조직, 복강액, 혈액 모두를 대상으로 하였으며, 각각의 검체에서 TRX 발현의 연관성도 함께 연구하였다.

한편, 혈액 및 복강액에서 효소면역측정법을 사용하여 TRX와 TBP-2의 농도를 정량적으로 측정하긴 했지만 자궁내막조직에서의 발현은 실시간 정량적 중합효소연쇄반응만을 사용하였기 때문에 면역조직화학검사를 통하여 TRX와 TBP-2가 발현되는 부분 (선 또는 기질)을 확인하고 실시간 정량적 중합효소연쇄반응의 결과와의 연관성을 분석할 필요가 있으며, TRX와 TBP-2가 자궁내막증을 일으키는 병리기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서

자궁내막증 환자군 수는 30명이고 대조군 수는 28명으로 전체적인 TRX와 TBP-2의 발현에 대한 분석에는 충분하였지만, 생리주기별로 나누었을 때는 각 주기 당 4-9명으로 더 많은 수의 환자를 대상으로 한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

## V 결론

자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서는 산화 스트레스의 영향으로 TRX와 TBP-2사이의 불균형이 발생하는데, TRX의 발현이 증가되지는 않았지만 TBP-2의 발현이 감소하여 TRX/TBP-2의 비율이 증가하고, 상대적으로 TRX가 높은 활성도를 나타내는 것을 알 수 있었다. 자궁내막증 환자의 TRX/TBP-2의 비율은 대조군에 비하여 특히 후기 증식기와 생리기에 증가함을 알 수 있었는데, 이는 역류되는 자궁내막 세포의 성장을 증가시키고 세포고사를 억제하여 자궁내막증의 발생에 대한 감수성을 높일 것으로 추측된다. 이러한 결과는 산화 스트레스와 자궁내막증 사이에 밀접한 연관성이 있음을 의미하며, TRX와 TBP-2의 변화가 자궁내막증의 발생에 관여하는 병리기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993;328:1759-69.
2. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002;955:11-22.
3. Pritts EA, Taylor RN. An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:653-67.
4. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
5. Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:214-8.
6. Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 1949;2:399-410.
7. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:325-32.
8. Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:861-70.
9. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol*

Chem 1964;239:3436-44.

10. Chen KS, DeLuca HF. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:26-32.
11. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D<sub>3</sub> up-regulated protein as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 1999;274:21645-50.
12. Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EW, Um HD, et al. Vitamin D<sub>3</sub> up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* 2000;164:6287-95.
13. Verit FF, Erel O, Celik N. Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Hum Reprod* 2008;23:100-4.
14. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2014-20.
15. Ho HN, Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS. Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12:2810-5.
16. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1999;71:1115-8.
17. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikoajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle.

- Fertil Steril 2003;79:1288-93.
18. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 1997;68:826-30.
  19. Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE, Economou EV, Kaparos G, Kontoravdis A, et al. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91:46-50.
  20. Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69:1042-7.
  21. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001;16:1802-8.
  22. Qin J, Clore GM, Kennedy WP, Hutch JR, Gronenborn AM. Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF-kappa B. *Structure* 1994;3:289-97.
  23. Ueno M, Masutani H, Jun Arai R, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 2000;274:35809-15.
  24. Abate C, Patel L, Rauscher FJ III, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990;249:1157-61.
  25. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of

- apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596-606.
26. Powis G, Meuillet E, Berggren M, Williams R, Coon A. The tumor suppressor PTEN is inhibited by binding of thioredoxin-1 in a redox dependent manner. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2001;42:2247.
27. Maruyama T, Kitaoka Y, Sachi Y, Nakanoin K, Hirota K, Shiozawa T, et al. Thioredoxin expression in the human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1993;3:989-93.
28. Maruyama T, Sachi Y, Furuke K, Kitaoka Y, Kanzaki H, Yoshimura Y, et al. Induction of thioredoxin, a redox-active protein, by ovarian steroid hormones during growth and differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology* 1999;140:365-72.
29. Stavreus-Evers A, Masironi B, Landgren BM, Holmgren A, Eriksson H, Sahlin L. Immunohistochemical localization of glutaredoxin and thioredoxin in human endometrium: a possible association with pinopodes. *Mol Hum Reprod* 2002;8:546-51
30. Clarke FM, Orozco C, Perkins AV, Cock I, Tonissen KF, Robins AJ, et al. Identification of molecules involved in the 'early pregnancy factor' phenomenon. *J Reprod Fertil* 1991;93:525-39.
31. Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 1996;178:179-85.
32. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T.

Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 1999;72:129-34.



## **Abstract**

The role of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 mRNA expression in eutopic endometrium of patients with endometriosis

Seok Kyo Seo

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Byung Seok Lee)

**Objective** : The aim of this study was to evaluate the association between endometriosis and oxidative stress through thioredoxin (TRX) and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) mRNA expression in endometrium. We also measured TRX and TBP-2 levels in serum and peritoneal fluid to compare the levels of oxidative stress among endometrium, serum and peritoneal fluid.

**Methods** : A total of 30 patients with histologically confirmed endometriosis and 28 patients without endometriosis participated in this study. Real-time polymerase chain reaction was used to quantify TRX and TBP-2 mRNA expression in endometrium. Serum levels of TRX and TBP-2 were measured using a specific commercial enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results** : There was no significant difference in TRX mRNA expression of endometrium between endometriosis and control groups ( $19.69 \pm 47.03$ -fold vs  $20.16 \pm 20.09$ -fold,  $P=0.058$ ). TBP-2 mRNA expression of endometrium was significantly lower in

endometriosis group than in control group ( $4.69 \pm 4.14$ -fold vs  $16.80 \pm 22.16$ -fold,  $P=0.000$ ) and TRX to TBP-2 ratio is significantly higher in endometriosis group than in control group ( $5.63 \pm 9.16$  vs  $2.01 \pm 3.10$ ,  $P=0.017$ ). TRX and TBP-2 mRNA expression is significantly lower in endometriosis group than in control group during early proliferative phase (TRX:  $3.71 \pm 1.85$ -fold vs  $26.00 \pm 17.10$ -fold,  $P=0.010$ , TBP-2:  $2.89 \pm 2.69$ -fold vs  $10.33 \pm 4.42$ -fold,  $P=0.019$ ). TRX to TBP-2 ratio is significantly higher in endometriosis group than in control group during menstrual phase ( $14.36 \pm 14.33$  vs  $0.74 \pm 0.28$ ,  $P=0.029$ ). There was no significant difference in TRX and TBP-2 levels of serum and peritoneal fluid between two groups. There was significant correlation between TRX and TBP-2 mRNA expression of endometrium in control group ( $r=0.737$ ,  $P=0.000$ ), but not in endometriosis group ( $r=0.319$ ,  $P=0.086$ ). TRX mRNA expression of endometrium was not associated with TRX levels of serum and peritoneal fluid in control group.

**Conclusion :** The expression of TBP-2 mRNA of endometrium is significantly lower and TRX to TBP-2 ratio is significantly higher in endometriosis group than in control group. These results mean that TRX activity is relatively higher in endometriosis patients, which may be associated with development of endometriosis. These results suggest that increased oxidative stress is associated with the development of endometriosis.

---

Key Words : endometriosis, oxidative stress, thioredoxin, thioredoxin binding protein-2