

인간의 정상 자궁내막조직에서의 BCL-2와 BAX 단백질의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실¹, 가천의과대학부속 길병원 산부인과학교실²,
포천 중문의과대학 산부인과학교실³

홍순옥 · 이병석 · 양우익¹ · 이지성² · 차동현 · 조용선³
김정연 · 박기현 · 조동제 · 송찬호

BCL-2 and BAX Expression in Normal Human Endometrium

Soon Oak Hong, Byung Seok Lee, Woo Ick Yang¹, Jee Sung Lee², Dong Hyun Cha,
Yong Seon Cho³, Jeong Yeon Kim, Ki Hyun Park, Dong Jae Cho, Chan Ho Song

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology¹, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Department of Obstetrics and Gynecology, Gachon Medical College, Gil Medical Center², Incheon, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Pochon CHA university³, Seoul, Korea

Objective: To investigate the distribution of BCL-2, BAX proteins and DNA fragmented cells in the normal human endometrium during at each menstrual cycle in order to find out whether apoptosis regulates cyclic endometrial change.

Methods: Normal endometrial tissues were obtained from 40 patients, 32~45 year of age, all with regular menstrual cycle, who were undergoing abdominal hysterectomy for myoma of uterus or cervical intraepithelial neoplasia for the period from 1992 through 1997. Immunohistochemical staining was used to determine the expression of BCL-2 and BAX protein with paraffin-embedded tissues.

Results: BCL-2 was expressed on the glandular epithelial cells and stromal cells during the proliferative phase. The intensity of BCL-2 was increased predominantly on the basal layer than the functional layer in late proliferative phase. However, BCL-2 immunoreactivity was decreased in the secretory phase. BAX was expressed predominantly during the secretory phase. The intensity was increased in late secretory phase rather than early secretory phase. DNA fragmented cells were detected in a few cells at each phase. However, it was increased during the late secretory phase.

Conclusion: Apoptosis-related genes, BCL-2 and BAX, may play a role in the regulation of cyclic endometrial change.

Key Words: Endometrium, BCL-2, BAX, Apoptosis

1972년 Kerr 등이 apoptosis가 생리적 형태의 세포사이며, 조직의 평형 (homeostasis)을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 보고한 이래로, 여러 조직에서 apoptosis에 관한 연구가 활발하게 지속되고 있다. Apoptosis 혹은 programmed cell death

는 조직의 remodeling 과정중에 일어나는 일반적인 일련의 생리적 과정으로 인지되고 있으며, 특히 여성의 생식기 중 난소와 자궁내막은 여성의 reproductive life 동안 주기적으로 조직의 remodeling이 일어나는 역동적인 조직으로서 apoptosis의

좋은 예로 생각되어지고 있다.

인간의 자궁내막은 난소에서 분비되는 성스테로이드 호르몬의 농도에 따라서 증식기, 분비기 및 생리기를 거치게 되는데, 이러한 호르몬 뿐만 아니라 성장인자와 Cytokines 등이 자궁내막의 성장 및 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.

세포에서 apoptosis가 일어날 때 능동적인 유전자의 발현과 단백질의 합성이 일어난다는 개념은 세포의 사멸에 선행하여 특정 단백질과 mRNA가 합성된다는 사실로 지지되고 있다.^{1,2} 그리고 이러한 특정 단백질들이 직접적으로 혹은 성호르몬, 성장인자 및 Cytokines 등을 통해 death signals과 survival signals을 전달하는 것으로 추정된다. 특히 이러한 apoptosis와 관련된 유전자들로서는 BCL-2 유전자군, BAX, p53, fas 등이 보고되고 있다.³

많은 연구 보고에서 apoptotic control의 중요한 인자로 BCL-2군의 중요성이 확립되었다. B-cell leukaemia/lymphoma-2 (BCL-2) 유전자는 18q21 염색체에 위치하고 있으며, 대다수의 follicular lymphoma와 B-cell leukaemia에서 관찰되는 t(14;18) 전위 (translocation)의 중지점 (breakpoint)에서 처음으로 발견되었다. 포유류에서 BCL-2와 유의하게 상동의 아미노산 서열을 공유하는 단백질을 부호화하는 세포의 유전자가 적어도 10개 정도 발견되었다. 이러한 단백질은 그 기능에 따라서 크게 두 개의 군으로 분류할 수 있다. BCL-2, BCL-Xlong, BCL-W, MCL-1은 apoptosis를 방해하는 유전자로, BAX, BCL-Xshort, BAK, BAD는 apoptosis를 유발하는 유전자로 알려져 있다.⁴

최근들어, 생리주기에 따른 자궁내막의 변화가 apoptosis에 의해 조절된다고 보고되고 있다.⁵ Tao 등 (1997)도 BCL-2와 연관된 단백질 사이의 균형이 자궁내막의 성장과 퇴축을 조절하는데 관련된다고 보고하였다.⁶ 특히, 분비기의 선상피세포에서 BCL-2의 면역반응성이 소실되는 것과 동시에 BAX 수치가 현저하게 증가하는 것이 apoptosis의 시작과 관련이 있음을 보고하였다. 이와 같이, 대개의 세포체계에서 apoptosis의 조절이 BCL-2군에 속하는 여러 인자 사이의 상호관계와 관련이 있다고 알려져 있으므로, 이에 본 연구에서는 정상적인 인간의 자궁내막에서 각각의 생리주기 동안 BCL-2, BAX 단백질과 DNA fragmented cells의 분포를 조사하여 과연 apoptosis가 주기적인 자궁내막의 변화를 조절하는지 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 재 료

1992년부터 1997년 사이에, 연세대학교 의과대학 부속병원에서 자궁근종이나 자궁경부상피내 종양으로 복식자궁적출술을 시행받은, 생리주기가 규칙적인 32~45세의 환자 40명에서 정상적인 자궁내막조직을 얻어내었다. 환자 중에서 호르몬 치료를 받은 사람은 없었다. 생리의 기왕력과 생리주기는 다음과 같이 4가지 기로 나누었다.

- 1) 초기 증식기 (early proliferative phase) (10예)
- 2) 후기 증식기 (late proliferative phase) (10예)
- 3) 초기 분비기 (early secretory phase) (10예)
- 4) 후기 분비기 (late secretory phase) (10예)

2. 방 법

1) 면역조직화학염색 및 점수산정 방법 (Immunohistochemical staining and scoring method)

선택된 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직절편 (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections)에 극초단파 오븐처리 (microwave oven heating)와 avidin-biotin complex method로 면역조직화학염색 (Immunohistochemical staining)을 시행하였다. Xylene과 graded alcohols로 파라핀을 제거 (dewaxing)한 후에, 3% hydrogen peroxidase로 10분간 반응시켜서 내인성 페록시다제의 활동 (endogenous peroxidase activity)을 봉쇄하였다. 절편은 pressure cooker 내에서 citrate 완충용액 (0.01 M, pH 6.0)에 담근 뒤, 극초단파 오븐에서 750W로 15분간 처리하였다. 상온에서 20분간 냉각시킨 뒤, 절편들은 상온에서 60분간 BCL-2에 대한 monoclonal antibody (1:40, Dako, Carpinteria, CA, USA)와 BAX에 대한 polyclonal antibody (1:1000, Pharmingen)로 반응시켰다.

Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)가 사용되었고, BCL-2와 BAX의 면역염색에 대한 chromogen으로서는 각각 3,3'-diaminobenzidine과 aminoethylcarbazole을 사용하였다. 면역조직의 결과는 반정량적으로 측정되었다. 염색된 세포의 분획 (percentage of positive stained cells)은 다음과 같이 등급을 매겼다; 1: 5% 미만, 2: 6 내지 25%, 3: 26 내지 50%, 4: 50% 이상. 염색의 강도 (intensity of staining)는 다음과 같이 측정하였다; 1: 전혀 없음 (none), 2: 약함 (weak), 3: 중등

Table 1. Summary of data of immunoreactive staining of BCL-2 and BAX in the proliferative human endometrium

	Early				Late			
	Gland		Stroma		Gland		Stroma	
	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	
BCL-2	2.8	3.1	1.7	1.9	3.1	3.2	2.3	2.5
BAX	2.4	1.7	1.5	1.6	2.2	2.3	1.4	1.5

Each value was expressed with mean score, %*: score of % of stained cells

Table 2. Summary of data of immunoreactive staining of BCL-2 and BAX in the secretory human endometrium

	Early				Late			
	Gland		Stroma		Gland		Stroma	
	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	Intensity %*	
BCL-2	2.5	1.6	2.2	1.4	2.3	1.3	2.0	1.1
BAX	2.7	1.5	2.5	1.2	2.8	3.2	2.5	1.6

Each value was expressed with mean score, %*: score of % of stained cells

Table 3. Expression of BCL-2, BAX and Apoptotic cells in human endometrium

		EP	LP	ES	LS
Functional layer	BCL-2	+	++	-	+/-
	BAX	-	-	-	+
Basal layer	BCL-2	++	+++	+	-
	BAX	-	-	-	+
Apoptotic cells		-	-	-	++

EP; early proliferative phase, LP; late proliferative phase, ES; early secretory phase, LS; late secretory phase, -; none, +/-; trace, +; weak, ++; moderate, +++; intense

도 (moderate), 4: 강함 (intense). 다양한 염색 강도를 보여주는 경우에는, 대다수의 수치를 채택하였다. 각각의 경우에 대한 면역반응성 점수 (immunoreactive scores)는 두 개의 지표에 대한 수치를 곱함으로써 측정하였다.

2) DNA fragmented cells의 검출

DNA fragmented cells을 검출해 내기 위해서, "DNA Fragment Detection Kit" (Tdt Frag^{EL}, Oncogene)을 사용하였다. 과정을 요약하면 다음과 같다.

- (1) 조직절편의 파라핀을 제거하고 수화시킨다.
- (2) 검체의 permeabilization
- (3) endogenous peroxidase의 불활성화
- (4) Equilibrium and labeling reaction
- (5) Termination of labeling reaction
- (6) DAB 용액의 검출 (Detection of DAB solution)
- (7) 대조염색 (Counterstaining)

결 과

1. BCL-2의 표현

BCL-2의 면역반응도 (immunoreactivity)는 증식기 동안 선상피세포와 일부 기질세포에서 우세하게 관찰되었다. BCL-2의 강도는 후기 증식기에 증가하고, 기능층보다 기저층에서 강하였다. BCL-2는 초기 및 후기 증식기에 선상피세포, 기질세포 및 자궁근층 세포까지 강하게 염색되었고, 면역반응도가 심층부터 강하게 나타나며 표면으로 갈수록 그 면역반응도가 떨어짐을 알 수 있었다. 초기 분비기에는 BCL-2의 면역반응도가 떨어지면서 초기 후기 분비기 (early late secretory phase)에는 표현되지 않았지만 후기 분비기의 선상피에서는 일부에서만 발현됨을 알 수 있었다

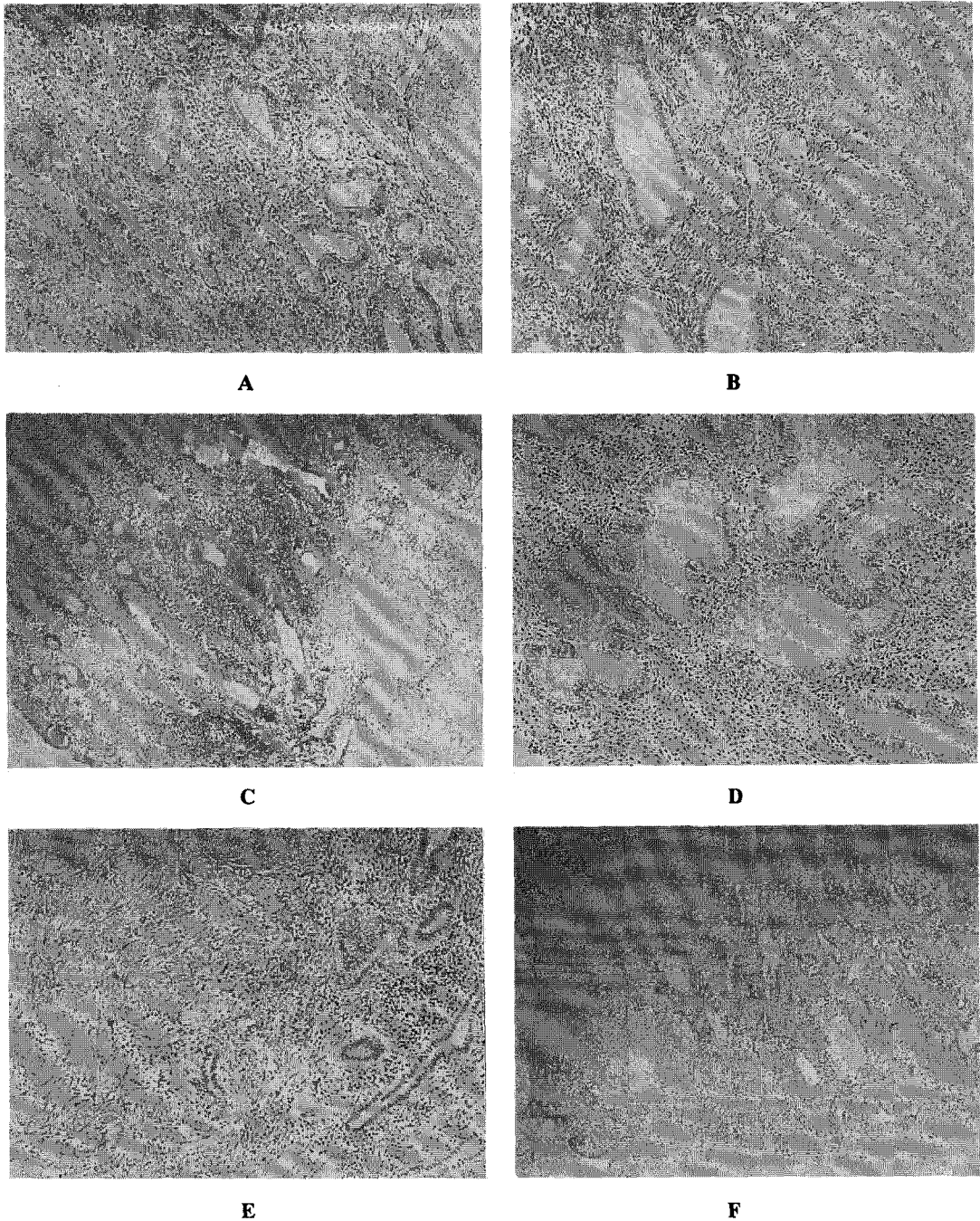
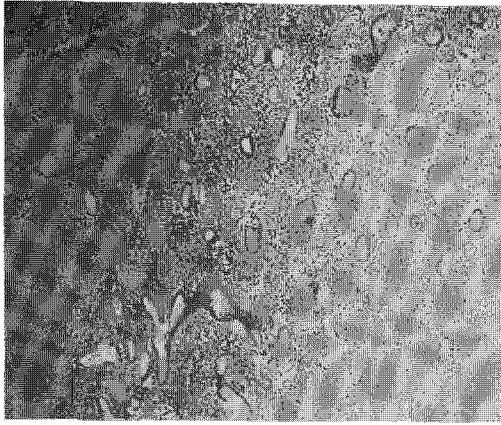
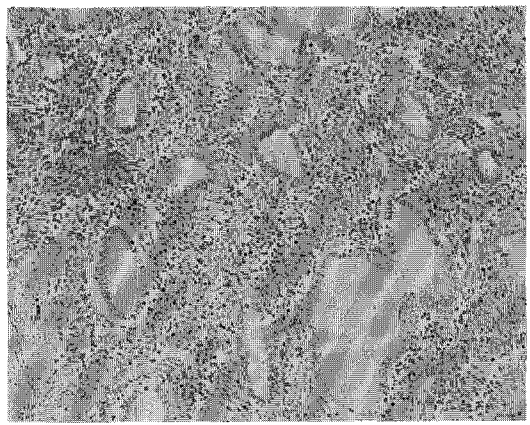


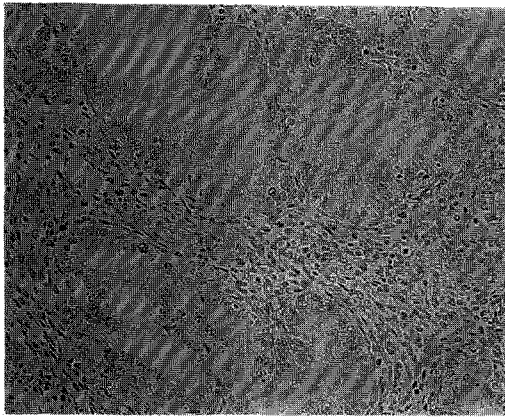
Figure 1. Immunohistochemical analysis of BCL-2 in the human proliferative and secretory endometria. Human endometrial sections were stained with specific antibodies for BCL-2 (A~F). Note that BCL-2 shows strikingly different expression in proliferative endometrium compared with that in secretory endometrium. BCL-2 immunoreactivity was intense and predominated in the basal layer of proliferative endometrium (A~C), decreasing dramatically in secretory endometrium (D~F). BCL-2 immunoreactivity was increased markedly in glandular epithelial cells, stromal cells, and myometrial cells of the early, early late, and late proliferative endometria (A~C). BCL-2 immunoreactivity was not observed during the early and early late secretory endometria (D and E), but it was increased in glandular epithelial cells of the late secretory phase (F). Magnifications: A~F x 20.



A



B



C

Figure 2. Immunohistochemical analysis of BAX and In situ analysis of DNA integrity (apoptosis) in the human early late secretory and late secretory endometria. **A** and **B**, Immunohistochemical analysis of BAX distribution in human early late secretory and late secretory endometrial samples. BAX immunoreactivity was increased in glandular epithelial cells of the early late secretory endometrium (**A**). In late secretory phase, BAX immunoreactivity was increased markedly in glandular epithelial cells and stromal cells (**B**). **C**, DNA fragmented cells (Apoptotic cell death) were detected by In situ labeling of DNA stromal breaks in late secretory endometrial specimens. Secretory endometrium demonstrated widespread apoptotic cells in the glandular epithelium of the functionalis layer. All sections were counterstained with hematoxylin. Magnifications: **A** and **B**, x 20, **C** x 80.

(Table 1~3, Figure 1).

2. BAX의 표현

BAX는 주로 분비기 동안 선상피세포와 기질세포에서 발현되었다. 증식기에는 기질세포와 선상피세포에서 발현되지 않았다. 초기 분비기에도 그 발현은 매우 약하였고, 초기 후기 분비기부터 주로 선상피세포에서 염색되었고, 후기 분비기에는 선상피세포 및 기질세포까지 강하게 염색되었다 (Table 1~3, Figure 2A, B).

3. DNA fragmented cells

Apoptotic cells은 각 시기마다 약간의 세포에서 검출되었다. 그러나, 후기 분비기 동안 증가하는 것으로 관찰되었다 (Table 3, Figure 2C). 요약하면, BCL-2와 BAX가 주기적인 자궁내막의 변화와 관

련이 있는 것으로 사료된다.

고 찰

Apoptosis는 세포괴사 (necrosis)와는 다른 세포사 (死)의 한 형태로서, 조직 및 세포의 평형을 이루는데 매우 중요한 역할을 한다.^{7,8}

Apoptosis의 형태적인 특성은 세포의 수축 (cell shrinkage), 염색질의 응축 (condensation of chromatin)과 apoptotic bodies로 알려진 막으로 둘러싸인 구형의 작은 소체의 형성이며,⁹ apoptosis에 특이한 생화학적 현상은 DNA의 internucleosomal cleavage이다.¹⁰

인간의 자궁내막은 호르몬의 변화에 따라 주기적인 변화를 일으키며, 일정한 월경주기를 갖는 여성에서 매주기마다 자라난 내막이 떨어져 나오게 된다. 이러한 변화는 호르몬의 변화에 따

라 일어나지만 이러한 주기는 이미 예정되어 있는 것으로 여겨지고 있다.

따라서, Hopwood와 Levison 등은 인간의 정상 자궁내막조직을 이용한 연구에서 증식기 동안 apoptotic bodies의 존재와 생리 시작 전기와 생리 기간 동안 그 숫자가 증가함을 보고하였고,¹¹ Kokawa 등은 초기 증식기, 후기 분비기, 생리기 등 생리주기의 각각 다른 세 시점에서 DNA가 저분자 용량의 분획으로 분열되는 특징적인 사다리 형태 (ladder pattern)의 apoptotic cleavage를 관찰하였으며, 고분자 용량의 DNA는 후기 증식기, 초기 분비기, 중기 분비기에 우세하게 관찰된다고 보고함으로써 이러한 자궁내막의 주기적 변화가 apoptosis에 의한 기전으로 설명될 수 있는 증거를 제시하였다.⁵

또한, apoptosis 과정을 거치고 있는 세포는 초기 증식기 자궁내막의 기능층에 산재되어 있으나, 후기 증식기 동안에는 관찰할 수 없으며, 중기 분비기에는 전혀 관찰되지 않고, 후기 분비기가 시작되면서 기질세포에서 다시 나타나면서 기능층의 거의 모든 구성요소로 퍼지게 되는 반면, 기저층의 세포에서는 생리주기 내내 apoptosis가 관찰되지 않았다고 보고하였다.

이와 같이 자궁내막세포의 turnover에서 apoptosis의 역할이 확립되면서, 다음 단계로 자궁내막에서 apoptosis와 세포사를 조절하는 유전자 사이의 관계에 대해 관심이 모아지게 되었고, 이러한 유전자의 단백질의 발현으로, BCL-2, BAX, BCL-X 등의 발현에 관한 연구 결과가 발표되었다.

그러한 연구 결과로서, BCL-2의 면역염색이 생리주기의 증식기선상피에서 현저하며, 후기 증식기에 가장 높았으며, 분비기가 시작되면서 사라지게 되었는데, 아마도 이로써 분비기가 끝날 무렵 자궁내막에서 선상피세포들이 apoptotic cell death로 이르게 되는 신호에 민감하게 된다는 보고도 있다.⁶

본 연구 결과에서도 이전의 연구 결과와 마찬가지로 BCL-2가 주로 증식기의 자궁내막에서 발현되었고 강도는 후기 증식기에 증가하였다. 이는 아마도 estrogen의 효과가 극대화되고 이러한 호르몬의 효과가 apoptosis 관련 유전자에 영향을 미쳐 생존신호 (survival signal)가 세포에 전달되는 것으로 생각된다.

BAX는 세포의 성장에 미치는 BCL-2의 영향을 heterodimer interaction을 통해 방해함으로써 세포

사의 민감도를 향상시키는 BCL-2군의 일종이다.

본 연구에서 BAX의 면역염색은 분비기의 자궁내막에서 증가되며, 그 발현이 기능층내에 있는 선상피세포에서 우세한 것으로 관찰되었다.

또한, 선상피세포내에서 BAX와 BCL-2 비율의 변화가 자궁내막세포의 apoptosis에서 주기와 관련된 변화와 평행하게 이루어졌다.⁶ 따라서, 각각의 apoptosis 관련 유전자의 역할도 중요하지만, 유전자들의 비율 또한 매우 중요한 인자로 생각되며, 이러한 결과는 BCL-2/BCL-Xlong에 대한 BAX/BCL-Xshort 비율의 변화가 세포의 생존 또는 세포사와 관련되어 중요한 역할을 하는데, BCL-2와 BCL-Xlong의 발현이 커질수록 세포생존이 향상되고, BAX와 BCL-Xshort의 발현이 커질수록 세포사가 증가된다는 Tilly 등의 보고를 뒷받침한다.¹²

그 외에도 BCL-2 유전자군의 다른 요소인 BCL-X와 같은 유전자 산물이 BCL-2의 작용과 독립적으로, 또는 상호보완적으로 apoptosis를 조절하는데 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.¹³

이와 관련되어 결론적으로 본 연구의 결과에 따르면 Apoptosis - 관련 유전자 (apoptosis-related genes)인 BCL-2와 BAX가 주기적으로 자궁내막의 변화를 조절하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Owens GP, Hahn WE, Cohen J. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4177-88.
2. Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest* 1995; 2: 565-73.
3. Collard MW, Griswold MD. Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochem* 1987; 26: 3297.
4. Hengartner MD, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homology of the mammalian proto-oncogene BCL-2. *Cell* 1997; 76: 665.
5. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the men-

- strual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4144-7.
6. Tao XJ. BCL-2 gene family in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2738-46.
 7. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
 8. Singh N, Anand S. Cell death by apoptosis. *Ind J Exp Biol* 1994; 32: 843-7.
 9. Err JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
 10. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
 11. Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1975; 119: 159-66.
 12. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the BCL-2 gene family in the immature rat ovary: Equine Chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased BAX and constitutive BCL-2 and BCL-Xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995; 136: 232-41.
 13. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Pstema CE. BCL-X, a BCL-2 related gene that functions as dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
-