

관립구대식세포 증식인자가 사람 영양막세포의 유전자 발현에 미치는 영향

을지대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 생명과학연구소², 관동대학교 의과대학 제일병원 분자종양연구소³,
이화여자대학교 의학전문대학원 산부인과학교실⁴

이현열¹·김상수²·안창숙²·박영주²·전진현²·송행석³·문혜성⁴·박은주¹·홍서유¹·박원일¹

The effect of granulocyte-macrophage-stimulating factor on the gene expression in human trophoblast of early pregnancy

Hun Yul Lee, M.D., Sang Soo Kim¹, Ph.D., Chang Suk Ahn¹, M.S., Young Joo Park¹, B.S.,
Jin Hyun Jun¹, Ph.D., Haengsuk Song², Ph.D., Hye Sung Moon³, M.D., Eun Joo Park, M.D.,
Seo You Hong, M.D., Won Il Park, M.D.

¹Department of Obstetrics and Gynecology; ²Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Daejeon;

³Laboratory of Molecular Oncology, Cheil General Hospital, Kwandong University College of Medicine;

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Ewha Woman's University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) facilitates mammalian embryonic development and implantation. However, its biological function after implantation is not elucidated. The aim of this study is to assess the changes of gene expression by GM-CSF in human trophoblast obtained in early pregnancy.

Methods: Human trophoblast obtained in early pregnancy was cultured with or without GM-CSF. The difference of gene expression was evaluated with microarray and selected genes were reevaluated with real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Microarray analysis revealed that the expressions of 468 genes were increased while those of 40 genes were decreased by GM-CSF. These genes were evaluated according to the known biologic pathways. The regulation of actin cytoskeleton and focal adhesion pathways were mostly influenced by GM-CSF. Annexin A2, thymosin-like 3, vimentin, myogenin, ACK1, and tensin1 genes were selected for real-time RT-PCR. The increased expressions of vimentin and ACK1, and decreased expressions of tensin1 were confirmed by real-time RT-PCR.

Conclusion: GM-CSF activates focal adhesion pathway in human trophoblast by increasing the expression of vimentin and ACK1, and decreasing the expression of tensin1.

Key Words: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Trophoblast, Focal adhesion, Invasion

착상은 포배의 영양막 세포가 자궁내막의 상피세포층을

침윤하는 과정을 시작으로 하여 basal lamina를 통과한 후 탈락막(decidua)의 기질에 embedding하는 과정으로 진행된다. 태반형성에서는 영양막세포가 만든 용모 내부에 태아의 혈관이 생성되고 동시에 모체 쪽에서 자궁과 탈락막에 분포하는 혈관의 형태가 변하여 모체-태아 순환(maternal-fetal circulation)을 형성한다. 이러한 복잡한

접 수 일 : 2010. 6. 30.
수 정 일 : 2010. 9. 3.
채 택 일 : 2010. 9. 17.
교신저자 : 박원일
E-mail : pwi3110@eulji.ac.kr

과정이 완성되기 위해서는 모체와 태아 양쪽에서 세포의 침윤, 신혈관 생성 등에 관여하는 여러 가지 물질들이 공간과 시간적으로 적절하게 조절되어야 한다. 영양막 세포는 배아에서 유래한 세포로서 착상과 태반형성의 주체가 되는 세포이다. 착상과 태반형성에서 모체 쪽의 자궁과 태아 쪽의 영양막세포가 상호 신호전달을 원활히 하는 과정은 필수적이라고 할 수 있다.¹ 이러한 상호 신호전달에는 성호르몬, 사이토카인, 유착물질(adhesion molecule) 등 매우 많은 물질이 포함된다.² 그러나 현재까지 사람 배아의 착상의 과정에서 이러한 물질이 어떤 과정을 통하여 분비되고 작용하는지는 거의 알려져 있지 않다.

포유동물의 배아의 발생과 임신 그리고 출산 과정에 관련된 대식세포 증식인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)가 중요한 역할을 한다는 사실은 1990년대부터 알려지기 시작했다.³ 그러나 대부분의 연구는 배아를 대상으로 이루어진 것이며 착상 이후와 태반형성에서 GM-CSF의 작용은 알려진 바가 거의 없다. 현재까지 발표된 착상 이후의 GM-CSF에 관한 연구 결과는 임신 일분기와 만삭 태반의 영양막세포에서 GM-CSF의 mRNA와 단백질이 존재한다는 사실과,⁴ 모체의 탈락막 세포에서도 GM-CSF의 mRNA가 존재한다는 것이다.⁵ 또 GM-CSF의 수용체도 사람의 영양막세포에 존재한다는 것이 확인되었다.⁶ 사람에서 착상 이후의 GM-CSF의 역할에 관한 연구는 syncytiotrophoblast의 형성과 hCG, hPL의 분비를 증가시킨다는 것 외에는 발표된 바가 없다.⁷

근래의 연구들에서 GM-CSF가 사람 포배의 착상과정에서 영양막세포의 침윤성을 증가시키고 또 생쥐의 배아에서 영양막세포의 침윤에 중요한 작용을 하는 interleukin (IL)-1과 matrix metalloproteinase (MMP)-2를 증가시킨다는 사실이 보고되었다.^{8,9}

본 연구에서는 영양막세포의 침윤성을 증가시키는 GM-CSF의 작용이 임신 초기의 영양막 세포에서도 지속되는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 임신 초기 영양막 세포를 분리, 배양하면서 GM-CSF를 첨가하여 그 영향을 microarray 방법을 이용하여 분석하였다. 이를 통해 영양막세포에서 GM-CSF에 의해 발현이 조절되는 유전자들을 선별하고, 이를 바탕으로 actin cytoskeleton의 조절에 관여하는 유전자 2 개(annexinA2, myogenin) 및 focal adhesion에 관여하는 유전자 4개(thymosin like 3, vi-

mentin, ACK1, tensin1)의 mRNA 발현량을 정량적으로 분석함으로써 GM-CSF가 착상과 태반형성에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 임신 초기 착상과 태반형성과정에서 GM-CSF의 역할이 규명된다면 자연유산이나 태반의 침투와 관련이 있다고 알려진 임신성고혈압 등의 질환 연구에도 중요한 기초자료가 될 수 있을 것이다.

연구 대상 및 방법

1. 영양막세포의 획득과 배양

본인의 질병에 의한 의학적 이유로 임신을 유지하기 곤란하여 치료적 임신중절을 시행 받은 6명의 여성에서 영양막세포를 획득하였다. 여성의 연령은 26~34세 사이였으며 임신주수는 5~6주 사이였다. 계류유산 등의 비정상 임신의 경우는 없었다. 시료 획득은 환자에게 연구목적만으로 사용됨을 설명하고 동의서를 받은 후 이루어졌다. 본 연구는 을지병원 유전자 연구윤리위원회의 승인하에 이루어졌다(승인번호 G10-01).

채취된 유산물 조직은 Hank's buffered salt solution으로 세척한 후 육안적으로 태반조직과 탈락막을 분리한 후 태반조직을 가위로 3~4곳을 잘라내었다. 잘라낸 조직을 Bio-AMF-2 배양액으로 다시 세척한 후 현미경하에서 영양막세포를 확인하였다. 조직을 forceps와 가위로 잘게 자른 후 4 mL의 Bio-AMF-2에 담아 37°C 5% CO₂에서 배양하였다. 72시간 후 배양액의 1/2을 교체하면서 위상차 현미경(phase contrast microscope)으로 flask의 바닥에 colony가 부착, 형성되었는지를 확인하였다. 배양 8~10일 후 바닥 면적의 1/2 이상에서 colony가 형성되면 serum free Bio-AMF-2으로 교체하면서 대조군과 GM-CSF 2 ng/ mL로 처리한 두 군으로 나누어 24시간 동안 추가 배양하였다.

2. Total RNA 추출 및 RNA 적정성 분석

전체 RNA의 추출은 guanidium thiocyanate phenol chloroform 추출 방법을 적용하였다. 상기 방법을 적용하여 제작된 Trizol (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% (wt/vol) N-lauroylsarcos-

sine, 0.1 M 2-mercaptoethanol) 1 mL로 세척한 세포를 분쇄하여 상온에서 5분간 방치하였다. 200 mL chloroform을 첨가하여 15초간 섞고 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심분리를 하였다. Glycogen을 첨가하여 혼합하고 isopropyl alcohol을 동량으로 첨가한 뒤 4°C에서 14,000 rpm으로 원심분리하여 RNA 침전물을 얻고 이를 75% ethanol로 세척하였다. RNA 침전물은 공기 중에 건조시킨 후 증류수에 용해하고 -70°C에서 보관하였다.

추출된 total RNA 1 µg을 agarose gel에 전기영동 후 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 RNA density를 측정하였다. 결과는 28S ribosomal RNA와 18S ribosomal RNA의 peak를 가지는 그래프에서 28S/18S의 비율을 측정하여 표시하였다.

3. Microarray 분석

정제된 RNA 11 µL를 T7 Oligo (dT) primer 1 mL와 혼합하고 70°C에서 10분 동안 반응시켰으며 얼음 위에서 식힌 뒤 reverse transcription master mix 8 µL을 첨가하였다. 위의 혼합물을 42°C에서 반응시킨 후 얼음위에서 식혔다. Second strand cDNA 합성을 위해 T7 Oligo (dA) primer가 포함된 second strand synthesis master mix 80 µL을 첨가하여 혼합한 후 16°C에서 반응시킨 뒤 DNA elution buffer를 첨가해서 DNA purification column을 통해 정제한 뒤 double strand cDNA를 얻었다.

대조군 cDNA는 Cy3 dye (붉은색)로, GM-CSF 처리군은 Cy5 dye (녹색)로 표지한 후 spin column을 이용하여 정제 후 ethanol로 침전시켰다. Human 44K twin oligo chip (Agilent)에 표지된 cRNA probe를 혼합하여 60°C에서 16시간 동안 hybridization시키고 세척하여 원심분리를 이용하여 건조시켰다. 건조된 chip은 GenePix 4000B (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA) 기기를 이용하여 Cy3와 Cy5의 fluorescent image를 각각 scanning하였다. 이어 GenePix Pro 3.0 software (Axon Instruments)를 이용하여 측정된 fluorescence intensity부터 각각의 이미지를 합성하고 분석하고 국소 가중 산점도 평화법(locally weighted scatterplot smoothing, LOWESS)을 이용하여 형광신호의 강도에 Intensity/location-dependent normalization 방법에 의한 표준화 과정을 거쳐, ¹⁰ Cy3 signal 강도와 Cy5 signal 강도의 차이를 log ratio로 전환하여 확인하였다.

4. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

RNA 시료를 Superscript RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사반응을 위하여 600 ng RNA 시료를 12 µL의 반응용액(1 mM Random Hexamer, Invitrogen)에 첨가하여 65°C에서 5분간 반응한 후, 얼음에 옮겨서 냉각하였다. 냉

Table 1. Primers for real-time RT-PCR

Gene name	Oligo ID or primer & probe	GenBank accession no.
Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH)	Hs99999905_m1	
Annexin A2 (ANXA2)	Hs01561520_m1	NM_001002858.2
Tensin1 (TNS1)	Hs00917032_m1	NM_022648.4
Vimentin (VIM)	Hs00958112_g1	NM_003380.2
Myogenin (myogenic factor 4) (MYOG)	Hs01072232_m1	NM_002479.4
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 (PTPN2)	Hs00747429_mH	NM_002828.2
Thymosin-like 3 (TMSL3)	Forward: 5'-AGATGCAAAGAGGTTGGATCAAGTT-3' Reverse: 5'-GCCTTCGTTGTCAGTAGTTCTTTGA-3' Probe FAM: FAM-CTGTGCTGCCCTTTC	NM_183049.2

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

각한 상태에서 8 μ L RT-PCR mastermix (final concentrations/amounts: 0.5 mM each dNTP, 1 \times RT Buffer, 10 units RNase inhibitor, 4 units superscript reverse transcriptase)를 첨가한 후 37°C에서 60분간 반응시켰다. 이후에 95°C 5분간 반응하여 잔여반응물을 불활성화하여 cDNA를 제조하였다.

6가지 유전자에 대한 Taqman PCR을 SLAN (LG Lifescience, Seoul, Korea)을 사용하여 실행하였다. PCR 반응용액은 express qPCR supermix (Invitrogen)를 사용하

였고, primer와 probe (Table 1)는 Taqman gene expression assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 최종농도 200 nM로 하여 반응하였다. PCR 증폭은 50°C에서 2분, 95°C 10분 반응 1회 후, 95°C에서 15초 반응 후 60°C에서 1분 반응하며 형광량 측정을 수행하였고 이 과정을 40회 반복하여 수행하였다. Ct 값은 표준 RNA 시료(Invitrogen)를 이용하여 standard curve를 제작하여 상대값으로 환산하여 표시하였다.

5. 통계 처리

대조군과 GM-CSF 처리군 간의 유전자 발현량 비교는 비모수통계인 Mann Whitney U test를 적용하였으며 P값이 0.05 이하일 경우에 통계학적으로 의미 있다고 정의하였다.

결 과

1. RNA 시료의 적정성 확인

시료에서 추출한 RNA의 적정성을 분석한 결과 전체 6개의 시료 중 E, G, H로 표시된 3개의 시료는 ribosomal RNA의 density 비율을 나타내는 rRNA ratio (28S/18S)가 2.0에 근접하여 분석에 적절한 시료라고 평가되었다 (Table 2, Fig. 1). 이후에 진행된 microarray와 real-time RT-PCR은 이 세 개의 시료만으로 진행하였다.

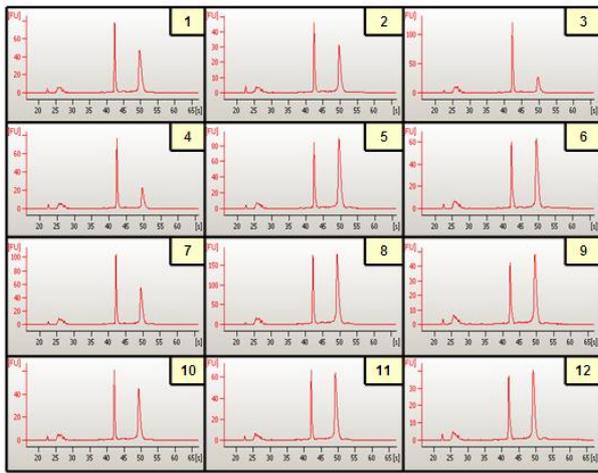


Fig. 1. Diagram showing 28S and 18S peaks of each RNA sample. The ratio of 28S (left peak) and 18S (right peak) was calculated.

Table 2. Evaluation of mRNA quality by rRNA ratio in 6 matched samples

No.	Sample	rRNA ratio (28S/18S ribosomal)
1	C0	1.3
2	C1	1.2
3	D0	0.4
4	D1	0.6
5	E0	1.9
6	E1	1.8
7	F0	1.0
8	F1	1.8
9	G0	1.9
10	G1	1.3
11	H0	1.8
12	H1	1.7

2. Microarray

전체적으로 44,000개의 유전자를 검색한 결과 3개의 시료 모두에서 발현을 확인할 수 있는 유전자는 26,498개였다.

1) 절대적 발현량의 차이

신호강도의 차이를 log ratio로 구하여 2배 이상의 차이를 보이는 유전자들을 의의가 있는 유전자 후보군으로 하였다. 이들 유전자군은 대조군과 비교했을 때 실험군에서 발현이 높은 군과 발현이 낮은 군으로 구분하였다(Fig. 2). 총 26,498개의 유전자 중 대조군에 비하여 GM-CSF 처리군에서 2배 이상 증가한 유전자는 468개, 2배 이상 감소한

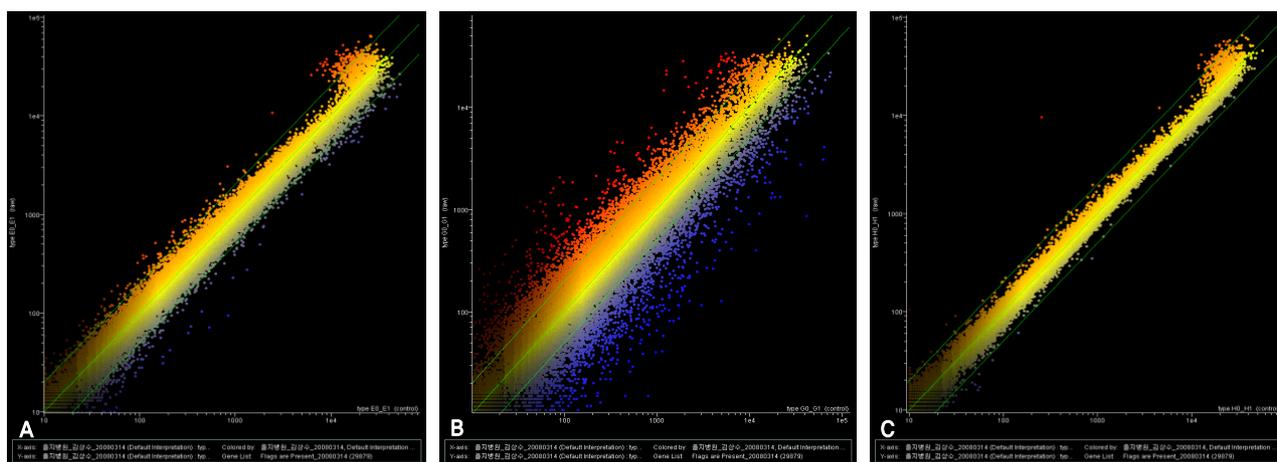


Fig. 2. Photoimage of microarray chip. Green dots represent genes their expression was increased by GM-CSF. Red dots represent genes their expression was decreased by GM-CSF. Linear plot of genes were found in sample E (A), G (B), and H (C). GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Table 3. Function of genes up-regulated by GM-CSF in human trophoblast

Function	n (%)
Unknown	233 (49.8)
Cell cycle	
Protein synthesis	
Cellular physiological process	42 (9.0)
Adhesion and cytoskeleton	7 (1.5)
Transcription	28 (6.0)
Signal transduction	12 (2.6)
Others	123 (26.3)
Total	468 (100.0)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Table 4. Function of genes down-regulated by GM-CSF in human trophoblast

Function	n (%)
Unknown	12 (30.0)
Chemokine activity	3 (7.5)
Metalloendopeptidase activity	2 (5.0)
Protein binding	2 (5.0)
Others	21 (52.5)
Total	40 (100.0)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

유전자는 40개가 선별되었다. 선별된 유전자들을 Table 3과 Table 4에서 기능과 특성을 고려하여 분류하였다.

2) 생물학적 pathway에 의한 분석

선별된 유전자들을 생물학적 pathway에 따라 구분하였

다. 생물학적 pathway는 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)의 웹사이트(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)에서 제공하는 143개의 pathway를 대상으로 수행하였다. 각 생물학적 pathway에 포함된 유전자 중 증가되거나 감소된 유전자가 많은 생물학적 pathway는 다음과 같다.

- Androgen and estrogen metabolism
- Antigen processing and presentation
- Cell adherent molecules
- Cell communication
- Cytokine-cytokine receptor interaction
- ECM-receptor interaction
- Focal adhesion
- GAP junction
- Regulation of actin cytoskeleton
- Ribosome
- TGF- β signaling
- Tight junction

이 외에도 몇 가지 악성종양(대장암, 자궁내막암, 악성 흑색종)에 관련된 생물학적 pathway에서도 유전자 발현 양상에 변화가 있었으나, 그 경향성이 명확하지 않으며 특정 질환에만 해당되기에 본 실험에서는 추가적인 연구를 진행하지 않았다.

Table 5. Selected 5 genes and their fold changes in microarray

Gene	Fold change
Annexin A2	2.85
Thymosin-like 3	2.56
Vimentin	2.55
Myogenin (myogenic factor 4)	1.96
Tyrosine kinase, non-receptor 2 (ACK1, TNK2)	1.69
Tensin1	0.41

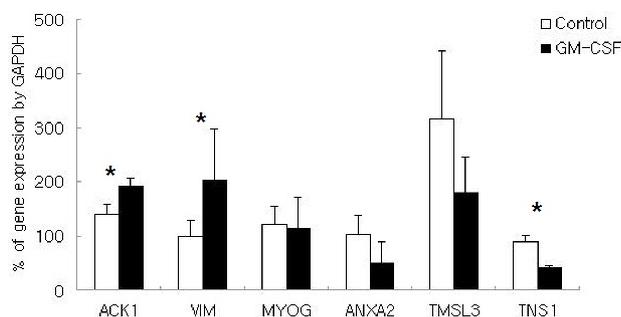


Fig. 3. Quantitative analysis of gene expressions by real time RT-PCR in human trophoblasts after GM-CSF treatment. * $P < 0.05$ by Mann Whitney U test. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase, ACK1: Cdc42-associated kinase, VIM: vimentin, MYOG: myogenin ANXA2: annexin A2, TMSL3: thymosin-like 3, TNS1: tensin1, PTPN2: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

3) Real-time PCR을 위한 유전자 선정

절대적 발현량의 차이와 생물학적 pathway에 의한 분석을 종합한 결과 focal adhesion pathway와 actin cytoskeleton pathway에 포함된 유전자들이 가장 많이 그리고 일관되게 변화되는 것이 확인되었다. 따라서 이들 유전자들의 발현 양상에 대한 보다 정확한 분석을 위해 정량적인 real-time RT-PCR을 수행하였다. 이 pathway에 포함된 유전자 중 3개의 시료에서 절대적 발현량에 일관된 변화를 보이고 현재까지 세포의 침윤이나 이동에 관련되어 어떤 역할을 할 가능성이 높다는 기존의 연구 결과가 발표된 유전자 6개를 최종적으로 선택하였다. 이 중 5가지는 (annexin A2, thymosin-like 3, vimentin, myogenin [myogenic factor 4], tyrosine kinase, non-receptor 2) GM-CSF에 의해 증가된 유전자이고 tensin1은 감소된 유전자이다(Table 5).

3. Real-time PCR

Microarray에서 증가된 것으로 나타난 유전자 5가지 중 non-receptor tyrosine kinase 2와 vimentin은 real-time RT-PCR 분석에서도 유의한 증가를 나타내었고 myogenin, annexin A2, thymosin-like 3는 유의한 차이가 나타나지 않았다. Microarray에서 감소되었던 tensin1은 real-time PCR에서도 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3).

고찰

현재까지 발표된 동물 실험의 결과는 GM-CSF가 배아의 성장 및 발달을 촉진하는 것으로 보고되었다. 생쥐의 경우 GM-CSF는 포배(blastocyst) 발달률과 세포수를 증가시키며,¹¹ GM-CSF 유전자가 결여된 생쥐는 포배강의 형성이 지연될 뿐만 아니라 내부세포 덩이(inner cell mass)의 감소로 인한 적은 수의 할구로 구성된 포배가 형성되고 그 결과 태아의 크기도 작아지고 태아 사망 및 출생 직후 사망이 증가한다.¹² 사람의 체외수정 후 배아의 체외배양과정에서도 재조합 GM-CSF를 첨가한 배양액에서 초기배아의 포배 발달률이 유의하게 증가된다.¹³

그러나 이러한 결과는 국내 연구자들에 의해 다소 상이하게 확인되었는데, 체외수정 및 배아이식술에서 배아의 발달 속도나 배아 질의 향상은 뚜렷하지 않았지만, 임신율의 향상은 분명하였다.¹⁴ 이 현상을 설명하기 위하여 GM-CSF가 배아의 발달 속도나 배아의 질보다는 외배엽 세포의 침윤성을 증가시킴으로써 착상률을 증가시킨다는 가설하에 생쥐의 배아를 대상으로 microarray와 real-time PCR을 통한 실험을 한 결과 GM-CSF은 배아에서 MMP2의 발현을 증가시킴으로써 침윤성을 증가시키고 이에 의해 임신율이 증가될 가능성이 있다는 사실을 규명하였다.⁹ 본 연구에서는 이전 연구의 연장선에서 포배의 침윤성을 증가시키는 GM-CSF의 작용이 초기 임신의 영양막세포까지 이어지는가를 확인하고자 하였다.

사람에서는 착상 이후 GM-CSF의 태반과 영양막세포에 대한 작용이 알려진 것이 거의 없으나 동물실험에서는 착상 직후 획득한 생쥐의 영양막세포에 GM-CSF를 투여하면 DNA 합성이 증가하며, 사람과 마찬가지로 hPL의 분비가

증가된다는 사실이 알려져 있다.¹⁵ 또 GM-CSF null mice의 경우는 착상 후 태반에서 labyrinthine과 junctional zone의 형태가 파괴된다는 사실이 증명되었다.¹² 이상의 결과로 미루어 생쥐에서는 GM-CSF가 태반의 형성과 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 추측이 가능하다.

본 연구에서 GM-CSF에 의해 변화가 있을 것으로 생각되는 두 개의 생물학적 pathway는 actin cytoskeleton과 focal adhesion이었다. 이 두 가지는 서로 상호작용이 강하여 서로 분리시켜 이해하기 힘든 측면도 있다. Actin cytoskeleton의 변화는 세포의 운동성에 관여하는 중요한 요소이다. 세포가 운동성을 가질 때 monomer인 actin filament가 세포막 바로 안에서 polymerization을 통해 polarized filament로 변화한다.¹⁶ 지금까지 actin polymerization을 증가시키는 물질로는 Ena/VASP family, cofilin 등이 알려져 있으며 그 외에도 암세포를 이용한 실험에서 actin을 조절하는 물질로 알려진 것만 20가지가 넘는다.¹⁶ 세포가 이동할 때 actin polymerization은 세포막의 바로 안에서 일어나며 actin filament가 늘어나는 방향으로 세포가 이동한다. 특히 세포막에 존재하는 Rho family의 G 단백질이 actin polymerization을 조절하는 것으로 생각되고 있다.¹⁶ 또 세포가 이동하는 힘을 발휘하는 기전으로는 acto-myosin contraction을 들 수 있다. Acto-myosin contraction을 위해서는 myosin light chain의 인산화가 선행되어야 하며 근육의 수축에는 myosin light chain kinase가 그 역할을 하지만 세포의 이동에서는 calcium과 무관하게 ROCK1과 ROCK2에 의해서도 myosin light chain의 인산화가 일어나기도 한다.¹⁶ 현재까지 착상과 태반형성 과정에서 actin filament의 조절에 관하여 몇 개의 연구가 이루어졌으며 상호결합이 증명된 물질로는 여러 가지 integrin, selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM), platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM), 그리고 몇 가지 cadherin이 알려져 있다.¹⁷ 본 연구에서는 actin cytoskeleton의 조절과 관련된 물질 중 annexin A2와 myogenin을 GM-CSF에 의해 발현이 증가되는지 real-time RT-PCR로 확인하였다.

Annexin A2는 annexin family에 속하는 Ca-regulated membrane-bound protein이다. Annexin A2 세포 내에서 세포막의 지방과 actin filament를 연결하며 actin filament의 polymerization을 억제하며 ROCK에 의한 세

포수축을 촉진하고, 또 actin fiber의 localization을 변화시켜서(dispersing) 세포 간의 분리를 유발한다고 보고가 있다.¹⁸

Myogenin과 MyoD는 근육발달 조절인자인 MyoD family에 속하는 단백질로 최근의 연구에 의하면 섬유아세포와 근육세포에서 이들 MyoD family의 발현은 actin cytoskeleton에 의해 조절된다고 알려져 있다. 즉, actin polymerization과 stabilization은 serum response factor (SRF)에 의한 MyoD family의 발현을 증가시킨다.¹⁹ PhospholipaseD activator인 arginine vasopressin을 근육세포에 투여하면 actin polymerization과 myogenin 발현이 동시에 증가한다는 보고도 있다.²⁰ 본 실험에서 myogenin을 선택한 이유도 GM-CSF가 actin polymerization을 증가시키고 그 결과로 myogenin이 증가하며 이는 임신기간 중에 자궁의 평활근이 상당히 증식하는 현상과 관련이 있을 것이라는 추측에 의한 것이었다 그러나 real-time PCR 결과 annexin A2와 myogenin의 증가는 없는 것으로 나타났다.

영양막세포가 침윤하기 위해서는 자궁내막의 세포외 기질(extracellular matrix, ECM) remodelling이 필수적인데 이 과정 중에는 focal adhesion이 반복되는 과정이 필요하다. Focal adhesion은 integrin과 proteoglycan이 actin cytoskeleton과 결합하여 세포 간의 결합을 이루는 것을 말한다. 이 과정에는 GTPase, kinase, phosphatase, protease, lipase 등 여러 효소의 작용이 필요하지만 가장 중요한 효소는 focal adhesion kinase (FAK)라고 할 수 있다.²¹ Focal adhesion은 그 위치, 크기, 구성물질 등에 따라 여러 가지로 구분이 가능하다. 현재까지 착상과 관련된 focal adhesion에 대한 연구는 매우 미미하여 영양막세포에서 FAK가 발현되며 MMP-2 및 $\alpha 5$ integrin과 colocalization된다는 정도만이 알려져 있다.²² 본 연구에서는 focal adhesion과 관련된 물질로 thymosin-like 3, vimentin, ACK1 및 tensin1을 대상으로 선정하였다.

Thymosin-like 3 단백질은 유전자의 위치는 다르지만 단백질 구조는 thymosin $\beta 4$ 와 동일하고 그 작용도 동일할 것으로 생각되고 있다.²³ Thymosin $\beta 4$ 는 세포내에서 G actin의 sequestration을 일으켜 actin의 polymerization을 억제하지만 actin monomer를 증가시킨다. 따라서 증가된 depolymerized actin filament가 catenin-cadherin

complex을 감소시켜 세포의 motility를 증가시킨다고 알려져 있다.²⁴ 그러나 real-time PCR 실험에서 thymosin-like 3는 변화가 없었다.

본 연구에서 GM-CSF에 의해 가장 뚜렷한 증가를 나타낸 cytoskeleton은 vimentin이었다. Vimentin은 중간엽 세포에 주로 존재하고 intermediate filament를 구성하는 가장 중요한 물질이다. Vimentin은 세포와 조직의 발생단계에서 그 발현이 다양하게 변화하는 것으로 보아 발생에 중요한 작용을 할 것으로 추측되는 반면, vimentin null mice가 매우 양호하게 생존하는 것으로 미루어 발생단계에서 결정적 역할을 하지는 못한다는 설명도 제시되고 있다.²⁵ 형태학적으로 vimentin의 polymer로 형성된 intermediate filament는 세포 내에서 actin microtubule, myosin과 연결되어 있으며, 또 actin과 integrin이 결합하는 위치에 vimentin associated matrix adhesions (VAM)이라는 구조를 이루고있다.²⁶ 세포 내에서 vimentin의 발현을 감소시키면 VAM에서 integrin과 actin의 결합이 약해지고 focal adhesion의 크기도 작아진다.²⁷ Vimentin의 발현이 증가된 경우는 ECM과의 adhesion이 증가할 것으로 추측되지만 아직 세포 내 작용기전이 잘 알려져 있지 않다. 그러나 소화기, 폐, 전립선 등 매우 많은 악성 종양의 경우에 세포의 악성도와 vimentin의 발현이 양의 상관관계를 보인다는 사실은 잘 알려져 있다.²⁸ 최근에는 vimentin이 C-src를 조절하여 세포의 침윤성을 증가시킬 것이라는 연구결과가 발표되었으나 직접적인 증거라고 말하기는 어렵다.²⁹ 본 연구 결과 GM-CSF에 의해 vimentin의 증가가 확인되었으며 그 결과 VAM에서 integrin-actin의 결합이 강해지고 focal adhesion이 증가할 것이라는 추측을 할 수 있으나 downstream에 대하여는 추후 많은 연구가 필요하다.

Non-receptor tyrosine kinase는 ACK1, TNK2 등으로도 불리며 Rho family GTPase들(Rho, Rac, Cdc42) 중 하나인 Cdc42의 target 단백질로 분리되었다. ACK1의 단백질 구조로 볼 때 아마도 focal adhesion kinase family 중 non-receptor tyrosine kinase에 속한다고 생각되고 있다.³⁰ 또 구조적으로 EGF 수용체의 downstream에 해당하는 물질로 여겨졌으나 최근 연구 결과 ACK1은 EGF 수용체를 유지시키고 그에 따라 focal adhesion을 활성화하여 세포의 이동과 침윤을 증가시킨다고 보고되고 있다.³¹

또 ACK1의 발현을 증가시킨 경우 ACK1과 EGF 수용체의 결합이 증가된다는 보고도 있으며 여러 종류의 악성종양에서 ACK1의 발현과 암세포의 전이, oncogene의 발현이 양의 상관관계를 가지는 것으로 증명되었다.³² 본 연구에서는 GM-CSF가 ACK1의 발현을 증가시켰으며 이에 따라 EGF 수용체와 focal adhesion의 활성화에 의해 영양막 세포의 침윤성이 증가될 가능성이 높다고 생각된다. 그러나 영양막세포에서 ACK1 증가 이후의 pathway에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

Tensin family에는 tensin1부터 tensin4까지 4가지가 알려져 있으며 그 발현 양상은 약간 다르지만 작용은 tensin4를 제외한 3가지의 경우는 유사할 것으로 추측된다. 신장암세포의 경우에 정상 세포보다 네 가지 tensin의 발현이 모두 감소된다고 알려져 있다.³³ Tensin-null mice는 신장에 낭종이 생기고 근육에서 미성숙 fiber가 증가한다는 사실도 보고되고 있다.³⁴ Tensin은 focal adhesion에 존재하는 phosphoprotein으로 actin과 β integrin의 cytoplasmic domain을 연결하는 작용을 한다. Tensin은 focal adhesion이 발생할 경우에 위치를 이동하여 actin과 β integrin을 연결한다. 즉, tensin이 작용하면 adhesion이 일어나고 tensin이 떨어지면 세포와 세포의 기질(ECM)의 결합이 감소하게 된다. 이 과정에서 tensin의 이동은 protein phosphatase-1 α 에 의한 인산화에 의해 이루어진다고 생각되고 있다.³⁵ 본 실험결과 GM-CSF는 tensin1의 발현을 감소시켰으며 이는 영양막세포와 세포외기질의 분리를 촉진시켜 세포의 이동성을 증가시킬 가능성을 시사하고 있다.

결론적으로, GM-CSF는 사람의 초기 임신 영양막세포에서 focal adhesion에 관련된 유전자인 vimentin과 ACK1의 발현을 증가시키며, 이러한 유전자의 발현 증가는 focal adhesion을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 tensin1 유전자의 발현이 감소됨을 관찰하였는데 이는 focal adhesion을 감소시킬 가능성이 있다. 이러한 상반된 작용은 focal adhesion이 영양막세포의 침윤과정에서 활성화와 억제가 주기적으로 적절히 조절되어야 한다는 것을 고려한다면 모순된 결과는 아니지만 GM-CSF에 노출된 시기에 따라 차이가 있을 가능성이 있으므로 time-course에 따른 실험도 필요할 것으로 생각된다. 이러한 가설들을 증명하기 위해서는 보다 정확한 침윤과정의 조절에 대한

추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Thie M, Denker HW. In vitro studies on endometrial adhesiveness for trophoblast: cellular dynamics in uterine epithelial cells. *Cells Tissues Organs* 2002; 172: 237-52.
- Harris LK, Jones CJ, Aplin JD. Adhesion molecules in human trophoblast—a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta* 2009; 30: 299-304.
- Robertson SA, Seamark RF. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in the murine reproductive tract: stimulation by seminal factors. *Reprod Fertil Dev* 1990; 2: 359-68.
- Jokhi PP, King A, Loke YW. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum Reprod* 1994; 9: 1660-9.
- Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, et al. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1993; 5: 559-63.
- Jokhi PP, King A, Jubinsky PT, Loke YW. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells. *J Reprod Immunol* 1994; 26: 147-64.
- Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res* 1994; 214: 46-54.
- Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Kang HG, Kim TJ, et al. Effect of GM-CSF on the embryonic development and the expression of implantation related genes of mouse embryos. *Korean J Fertil Steril* 2002; 29: 83-90.
- Kim HJ, Kim HM, Kim JL, Shin JH, Hong SY, Park EJ, et al. The effect of GM-CSF on the expression of implantation-related genes in mouse embryo. *Korean J Obstet Gynecol* 2008; 51: 199-211.
- Yang YH, Dudoit S, Lau P, Lin DM, Peng V, Ngai J, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e15.
- Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001; 64: 1206-15.
- Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod* 1999; 60: 251-61.
- Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol Reprod* 2002; 67: 1817-23.
- Park WI, Kwon HC, Kim DH, Kang HK, Kim MK, Lee HC, et al. The effect of GM-CSF supplementation in culture medium in the human IVF programs. *Korean J Fertil Steril* 2001; 28: 161-8.
- Armstrong DT, Chaouat G. Effects of lymphokines and immune complexes on murine placental cell growth in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40: 466-74.
- Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 273-87.
- Chakraborty C, Gleason LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 116-24.
- Rescher U, Ludwig C, Konietzko V, Kharitonov A, Gerke V. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci* 2008; 121: 2177-85.
- Pomies P, Pashmfouroush M, Vegezzi C, Chien KR, Auffray C, Beckerle MC. The cytoskeleton-associated PDZ-LIM protein, ALP, acts on serum response factor activity to regulate muscle differentiation. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1723-33.
- Komati H, Naro F, Mebarek S, De Arcangelis V, Adamo S, Lagarde M, et al. Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1232-44.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692: 103-19.
- Pollheimer J, Knofler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 2005; 26(SupplA): S21-30.
- Clauss IM, Wathelet MG, Szpirer J, Islam MQ, Levan G, Szpirer C, et al. Human thymosin-beta 4/6-26 gene is part of a multigene family composed of seven members located on seven different chromosomes. *Genomics* 1991; 9: 174-80.
- Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Ju SY, Su Y. Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 3297-306.
- Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 1994; 79: 679-94.
- Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, et al. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 85-100.
- Tsuruta D, Jones JC. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci* 2003; 116: 4977-84.
- Wei J, Xu G, Wu M, Zhang Y, Li Q, Liu P, et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res* 2008; 28: 327-34.
- Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 571-7.
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Tan L, Lim L. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* 1993; 363: 364-7.
- Howlin J, Rosenkvist J, Andersson T. TNK2 preserves epidermal growth factor receptor expression on the cell surface and enhances migration and invasion of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R36.
- Thelemann A, Petti F, Griffin G, Iwata K, Hunt T, Settinaro T, et al. Phosphotyrosine signaling networks in epidermal growth factor receptor overexpressing squamous carcinoma cells. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 356-76.
- Martuszezka D, Ljungberg B, Johansson M, Landberg G, Oslakovic C, Dahlback B, et al. Tensin3 is a negative regulator of cell migration and all four Tensin family members are downregulated in human kidney cancer. *PLoS One* 2009; 4: e4350.
- Lo SH, Yu QC, Degenstein L, Chen LB, Fuchs E. Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J Cell Biol* 1997; 136: 1349-61.
- Eto M, Kirkbride J, Elliott E, Lo SH, Brautigan DL. Association of the tensin N-terminal protein-tyrosine phosphatase domain with the alpha isoform of protein phosphatase-1 in focal adhesions. *J Biol Chem* 2007; 282: 17806-15.

= 국문초록 =

목적: 포유동물의 생식과정에서 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)가 배아의 침윤성을 증가시킨다는 사실은 알려졌으나 착상 이후와 태반형성에서의 작용은 알려진 바가 거의 없다. 본 연구는 GM-CSF가 임신초기 사람의 영양막 세포에서도 침윤성을 증가시키는 작용이 있는지를 확인하는 것이 목적이다.

연구 방법: 임신초기 소파술을 통해 얻은 사람의 영양막세포를 배양한 후 GM-CSF 처리군과 대조군의 유전자 발현 차이를 microarray를 통하여 비교하였고 차이가 있는 유전자 중 착상과 관련된 유전자의 발현을 real-time RT-PCR로 확인하였다.

결과: Microarray 결과 GM-CSF 처리군에서 2배 이상 증가한 유전자는 468개, 2배 이상 감소한 유전자는 40개였다. 이 유전자를 생물학적 pathway에 따라 분석한 결과 actin cytoskeleton 및 focal adhesion에 관여된 유전자가 많았다. Actin cytoskeleton 및 focal adhesion에 관여된 유전자 중 annexin A2, thymosin-like 3, vimentin, myogenin, ACK1, tensin1의 발현을 real-time RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 GM-CSF에 의해 vimentin과 ACK1의 발현은 증가되었고 tensin1의 발현은 감소되었다.

결론: GM-CSF는 사람의 초기 임신 영양막세포에서 vimentin과 ACK1의 발현을 증가시키고 tensin1을 감소시킴으로써 focal adhesion을 증가시킨다고 생각된다.

중심단어: 과립구-대식세포 증식인자, 영양막세포, Focal adhesion, 침윤
