

THE EFFECT OF ESTROGEN ON EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES ACTIVATION IN UTERINE ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS DURING PREGNANCY

Yong Woo Lee, MD, Ho Yeon Kim, MD, Sang Min Park, MD, Soo Ran Choi, MD, Ji Youn Chung, MD, Chong Soo Moon, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective

To explore the endothelium-independent mechanisms of estrogen induced uterine vasodilatation, this study was performed to determine whether uterine artery smooth muscle (UASM) cells are direct targets of estrogen, and estradiol (E2) stimulates extracellular signal-regulated kinases (ERK2/1) in endothelium denuded UASMs.

Methods

The uterine arteries were obtained from late gestation pregnant sheep and the endothelium was denuded with collagenase digestion. The uterine artery smooth muscle segments were digested, collected and cultured. Endothelial integrity and smooth muscle status were assessed by Double immunofluorescence staining and flow cytometry. The UASM cells were treated with increasing concentrations of E2 (10^{-14} to 10^{-6} M), and pretreated with ICI 182,780 followed by different concentrations (10^{-10} and 10^{-7} M) of E2. Western blot analysis of ERK2/1 phosphorylation with a phospho-mitogen activated protein kinases (MAPKs) antibody were carried out to total cell extracts.

Results

The loss of endothelial function and adequacy of smooth muscle integrity were confirmed. When challenged with increasing concentrations of E2, a bi-phase ERK2/1 phosphorylation was observed. Treatment with low doses (10^{-14} to 10^{-10} M) of E2, ERK2/1 phosphorylation was dose-dependently increased, whereas high doses (10^{-9} to 10^{-8} M) did not phosphorylate ERK2/1. However, treatment with pharmacological doses (10^{-7} to 10^{-6} M) drastically phosphorylated ERK2/1. In the presence of ICI 182,780, E2 induced ERK2/1 phosphorylation were abolished in both.

Conclusion

It suggests that UASM is the target tissue of estrogen during uterine vasodilatation, and estrogen stimulation of ERK2/1 activation is mediated by an estrogen receptor-dependent mechanism. It also is presumed that endothelium independent mechanism exists in estrogen induced vasodilatation.

Keywords: Estrogen; Uterine artery smooth muscle; Vasodilatation; ERK2/1

임신이 진행됨에 따라 임신부와 태아가 필요로 하는 대사 요구량은 점점 증가하게 되어, 이를 수용하기 위하여 모체에는 많은 생리적 변화가 일어나게 된다. 특히 모체의 심혈관계에서는 전체 순환 혈류량(total circulating blood volume)의 급속한 증가, 심박동수의 증가, 일회 박출량 및 일분 심박출량의 증가와 같은 변화가 나타난다[1-6]. 또한 임신 중에는 혈관수축제에 대한 반응이 둔화되고 혈관저항이 감소하며 신장혈류역학과 부피 항상성유지에도 변화가 생기게 되는데, 이런 임신에 따른 “혈류역학적 순응(hemodynamic adaptation)”은 대개 임신 5주경이면 나타난다[7-9]. 이와 더불어 국소적으로 일어나는 중요한 변화는 바로 자궁-태반 혈류의 급속한 증가이다. 자궁-태반 혈류는 임신 중에 태

Received: 2011. 5.30. Revised: 2011. 6.27. Accepted: 2011. 6.27.

Corresponding author: Chong Soo Moon, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, 445 Gil-dong, Gangdong-gu, Seoul 134-701, Korea

Tel: +82-2-2224-2259 Fax: +82-2-2224-2265

E-mail: obgyn25@hallym.or.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

아의 성장과 발육에 충분한 산소와 영양을 공급하기 위하여 급격하게 증가하게 되는데, 인간의 임신에서는 자궁혈류량이 약 15~20배 정도나 증가하는 것으로 밝혀져 있다[10,11]. 불충분한 자궁-태반 혈류는 태아의 산소와 영양 공급의 부족을 초래하여 자궁내 발육지연이나 심각한 신생아 결손을 유발할 수 있고, 신생아뿐만 아니라 모체의 이환율과 사망률에도 영향을 미치게 된다[12].

이와 같이 임신 중에는 지속적인 충분한 태반혈류의 공급을 위하여 자궁혈류량이 증가하게 되는데, 지속적인 자궁혈류의 증가는 자궁동맥 내피에 자극을 주어 자궁동맥의 내강은 넓어지고 동맥벽의 두께는 더욱 두꺼워지는 “자궁동맥 재형성(uterine artery remodeling)”을 일어나게 한다. 이와 같은 자궁혈류의 증가와 자궁동맥 재형성에는 난포호르몬이 중추적인 역할을 하게 된다. 생리주기의 난포기와 임신 중에는 혈중 난포호르몬의 농도가 증가하고 이와 동반하여 자궁혈류가 상승하게 되고, 난소의 제거 후에 난포호르몬 보충치료를 받는 경우에도 자궁혈류가 증가하게 되는 것으로 보아 난포호르몬이 자궁혈류의 증가에 중추적인 역할을 하는 것으로 증명되고 있다[12,13]. 난포호르몬이나 임신과 관련되어 자궁혈류가 증가하는 것은 주로 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 단백질 발현과 활성도가 증가되어 혈관확장 물질인 산화질소(nitric oxide, NO)가 많이 생산되기 때문인 것으로 알려져 있다[14~18]. 난포호르몬에 의한 혈관이완은 생식계 동맥뿐 아니라 비생식계동맥 등 동맥혈관 전체에 대한 일반적인 효과이며, 이는 산화질소 이외에도 prostacyclin과 같은 혈관 확장물질의 생성의 증가와 endothelin-1과 thromboxane과 같은 혈관 수축물질의 역할을 통한 이중 효과에 의한 것으로 추정된다[19].

혈관내피 세포와 산화질소-의존성 기전이 난포호르몬과 임신에 의한 자궁혈류 증가에 중요한 역할을 하지만, 특이적인 내피세포 산화질소 합성효소 억제제를 이용하여 내피세포에서 산화질소 작용을 차단하더라도 난포호르몬이 유발한 자궁혈류 증가는 부분적(-65%)으로만 억제되고[14,15], 내피를 제거한 혈관에서도 난포호르몬에 의한 혈관확장 작용이 여전히 존재하는 것이 증명되었다[18~20]. 그러므로 난포호르몬에 의한 자궁동맥의 혈관확장 작용에는 혈관내피 세포/산화질소-의존성 기전뿐 아니라 -비의존성 기전도 존재한다는 것을 추측할 수 있다[18~21]. 사실 지금까지 난포호르몬에 의한 혈관확장 작용에 관한 연구들은 주로 혈관 내피세포-의존성 기전에 대해서 이루어졌고, 혈관긴장도의 조절에서 혈관 평활근의 역할이나 내피세포-비의존성 혈관확장 기전에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않다. Extracellular signal-regulated kinases (ERK2/1)는 특이적인 자극에 의하여 활성화되면 세포내에서 전사인자를 활성화시켜서 세포내 신호를 전달하게 되는 세포내 신호 전달 물질(cell signaling molecule)의 일종이다[18,21]. 이에 저자들은 내피세포를 제거한 자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 투여하여 난포호르몬이 자궁동맥 평활근세포에 직접적으로 작용하는지 여부와 세포내에서 ERK2/1의 표현에 미치는 효과를 확인하여, 난포호르몬의 내피세포-비의존성 혈관확장 기전을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 인간의 만삭임신에 해당하는 재태기간 120일에서 130일의 임신한 양을 대상으로 자궁절제 후 절제된 자궁동맥을 실험재료로 이용하였다. 본 연구는 한림대학교 연구윤리위원회 심의를 통과하고 실험동물에 대해서는 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 연구를 시행하였다.

2. 실험방법

1) 자궁동맥 평활근세포의 분리와 배양

절제된 자궁으로부터 내경 3 mm 이상의 자궁동맥을 박리한 후 100% 산소로 포화된 생리적 용액 내에서 입체현미경을 보면서 결합조직으로부터 분리하였다. 박리된 자궁동맥에 0.1% 콜라겐 분해효소와 0.1% 엘라스타아제로 37°C에서 25분간 처리하여 혈관내피를 제거하였다. 내피세포 제거 후 자궁동맥을 약 1 cm 길이로 자른 후, 입체현미경을 보면서 혈관벽의 결합조직을 박리하였다. 이후 내피세포의 완전제거를 위하여 다시 자궁동맥 평활근을 37°C에서 45분간 0.1% 콜라겐 분해효소로 재처리하였다. 이렇게 수집된 세포들은 성장배지(Dulbecco modified eagle medium [DMEM], Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA), 10% fetal calf serum (FCS, Life Technologies, Inc.), 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin에서 배양하여 액화질소에 냉동 저장하였다. 저장된 자궁동맥 평활근세포는 실험에 사용하기 위하여 7계대까지 계대배양하였고, 각 실험은 8회 이상 반복 시행하였다.

2) 혈관 내피세포와 평활근 상태의 평가

(1) 평활근 알파-액틴(smooth muscle α -actin)과 caveolin-1의 중보면역형광 염색(double immunofluorescence staining)

자궁동맥 평활근세포는 군집 형성을 위하여 젤라틴 막 덮개유리 위에 파종시켜 100 mm 배양접시의 성장배지에서 배양하였다. 85~90%의 군집이 확인되면 배양된 세포에 차가운 phosphate buffered solution (PBS, Life Technologies, Inc.)로 두 번 이상 세척한 후, 실내 온도에서 20분 동안 4% 포름알데하이드로 고정시켰다. 고정된 세포들은 다시 50 mM 글리신 PBS로 두세 차례 더 행군 후 1% 젤라틴, 1% 소혈청알부민 bovine serum albumin (BSA, Life Technologies, Inc.) 그리고 0.15% 사포닌(막 투과 인자)을 함유한 PBS에서 차단하였다. 그 후에 세포들은 0.5% 젤라틴, 0.5% 소혈청알부민, 0.075% 사포닌을 함유한 PBS에서 1 시간 동안 항caveolin-1 다클론 항체(anti-caveolin-1 pAb, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 항평활근 알파-액틴 단일클론 항체(anti-SM- α -actin mAb, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 처리하여 배양시켰다. 동일한 완충제로 세 차례 더 세척한 후에, 세포들은 Cy2 (green) labeled anti-mouse IgG와 Cy3 (Red) labeled anti-rabbit IgG (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)에서 45분간 배양하였다. 이후 다수의 세척 후에 세포들을 표본제작하여 형광현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 조사하여 이미지를 촬영하였고, 포토샵

(Adobe Photoshop, Silicon valley, CA, USA)을 사용하여 녹색과 적색의 융합영상을 얻을 수 있었다. 토끼와 생쥐의 면역글로불린G에 상응하는 농도를 비특이적인 결합 대조군으로 하였다.

(2) 흐름세포측정(Flow cytometry)

4-7계대의 자궁동맥 평활근세포를 적절한 군집을 형성할 때까지 100 mm 배양접시의 DMEM-10% FCS의 성장배지에서 배양하였다. 80-90% 정도의 군집이 확인되면 세포들을 트립신으로 분해한 후 배양 배지를 이용하여 한차례 세척하였다. 배양 접시의 약 1×10^6 개의 세포들은 상기 실험과 동일하게 고정하여 실내온도에서 20분 동안 형광표지세포분류기(fluorescence activated cell sorter, FACS) 투과용액(BD Transduction Lab., Lexington, KY, USA)으로 투과시켰다. 투과된 세포들은 항평활근 알파-액틴 단일클론 항체(1:50), 항내피세포 산화질소 합성효소 단일클론 항체(anti-eNOS mAb, BD Transduction Lab., 2 ug/mL), 항caveolin-1 다클론 항체(1 ug/mL)으로 처리하여 실내온도에서 30분 동안 배양하였다. 처리된 세포들은 염색 완충제로 두 차례 세척한 후, 염색 완충제에 재부유시켜 양 항-생쥐 면역글로불린G-플루오레세인 이소티오시아나염 접합체(goat anti-mouse IgG Fluorescein isothiocyanate conjugated, FITC), 1 ug/mL (BD Transduction Lab.) 과 당나귀 항-토끼 면역글로불린G-이소티오시아나염 접합체(donkey anti-rabbit IgG-FITC, 1 ug/mL, BD Transduction Lab.)로 재처리하여 실내온도에서 30분 동안 배양하였다. 각 표본당 적어도 10,000개의 세포들을 Cell-Quest software를 이용하여 형광표지세포분류기 구경흐름 세포측정기(FACS Caliber flow cytometry, Lexington, KY, USA)를 사용하여 분석하였다. 최고점의 우측이동은 표지단백질이 발현되는 것을 나타내는 것이며, 각각의 항체를 처리하여 표현되는 세포의 백분율은 생존 세포로부터 구하였다. 생쥐와 토끼의 면역글로불린G는 각각 단일클론 항체와 다클론 항체에 대한 대조군으로 상응하게 제공되었다.

3) Western blot 분석

실험에 사용한 항체는 송아지 자궁 아미노산 495-595에 대하여 형성된 생쥐 항난포호르몬 알파-수용체 단일클론 항체(murine anti-ER α monoclonal antibody, AER320, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA), 인간 난포호르몬 베타-수용체의 아미노산 55-70에 대항하여 만들어진 토끼 항난포호르몬 베타-수용체 다클론 항체(rabbit anti-ER β polyclonal antibody, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), 항인산 특이 MAPK 다클론 항체(anti-phospho-specific MAPK pAb, New England Biolabs, Beverly, MA, USA)와 항베타-액틴 단일클론 항체(anti- β -actin mAb, Ambion Inc., Austin, TX, USA)를 이용하였다. 2차 항체로는 항생쥐와 항토끼의 과산화효소 접합성 면역글로불린G (antimouse, antirabbit peroxidase conjugated IgG)를 각각 1:2000과 1:4000으로 희석하여 처리하였다.

해동된 7계대의 평활근세포를 상기 서술한 바와 같이 100 mm 배양접시에서 성장배지(DMEM, 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin)에서 배양하여 85-90% 이상의 군집을 확인하여 용해시킨 후 다시 20 mm의 6면 배지에 파종하여 재배양하였다. 재배양 후 적절한 군집을 보이면 냉장 PBS로 두 번 이상 세척한 후 4°C에서 혈청이

없는 Phenol-red free M-199 (Life Technologies, Inc.)-0.1% BSA 배지에 밤 동안 공복상태로 유지하였다. 다음 날, 먼저 자궁동맥 평활근세포에서 난포호르몬 수용체 단백질의 존재를 확인하기 위하여 생쥐 항난포호르몬 알파-수용체 단일클론 항체와 토끼 항난포호르몬 베타-수용체 다클론 항체에 대한 western blot 분석을 하였다. 밤 동안의 공복배양용액을 버리고 새로운 M-199 10 mL와 난포호르몬(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 각 배지에 10^{-14} M부터 10^{-6} M까지 10배 간격으로 각각 처리하여 37°C에서 10분간 배양하여 인산화 ERK2/1 (phosphorylated ERK2/1, pERK2/1)의 단백질 발현을 비교하기 위하여 western blot 분석을 하였다. 또한 2차 실험으로 난포호르몬의 직접적인 작용여부를 확인하기 위하여 난포호르몬 수용체 길항제인 ICI 182,780 (Tocris, Ballwin, MO, USA) 1 μ M을 60분간 미리 전처리한 후 난포호르몬을 대표적인 저농도(10^{-10} M)와 고농도(10^{-7} M)로 10분간 처리한 후 ERK2/1의 western blot 분석을 하여 전처리하지 않은 경우와 비교하였다.

난포호르몬 처리 후 각각의 처리된 배지는 배양액을 버리고 냉동 PBS를 이용하여 2회 세척한 후, 얼음 속의 용해 완충액에서 30분간 진동하면서 용해하였다. 전체 세포 추출물은 세포 스크레퍼를 이용하여 모은 후 소용돌이와 5분간 원심분리(13,000 \times g)하여 그 추출된 단백질은 1.5 mL 시험관으로 옮겼다. 단백질 추출물은 Laemmli 완충액에서 95°C 10분간 열 변성시킨 SDS-PAGE 젤(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에 20 μ g씩 부하하여 전기영동(100 V, 2시간)하여 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)에 조영증강 전이하였다. 이후 상기 서술한 1차 항체와 2차 항체로 처리하여 결합된 항체는 화학발광 시약으로 증강하였고, 나타나는 면역활성 신호는 Gel-Pro 분석 소프트웨어를 이용하여 밀도계측(densitometry)으로 분석하였다.

4) 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타내었으며, 통계분석은 SPSS ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 모수적인 검정방법으로 Student's *t*-test를 이용하여 단백질의 표현정도를 비교하였고 *P*-value가 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 자궁동맥 평활근 배양과 평활근 상태의 평가

자궁동맥은 세 개의 층으로 구성되어 있다. 가장 내부에는 내피세포와 내피세포를 둘러싸고 있는 속탄력막(intimal elastic membrane)으로 이루어진 혈관내막(tunica intima)이 있고, 가장 두꺼운 중간층은 혈관의 긴장도와 유연성을 결정하는 평활근세포 콜라겐과 탄력섬유로 구성되어 혈관중간막(tunica media)을 형성하고 있다. 그리고 바깥층은 섬유조직과 자율신경섬유로 구성된 혈관바깥막(tunica adventitia)으로 이루어져 있다.

7계대의 자궁동맥 평활근세포를 배양하여 85% 이상의 군집을 이룬 세포에 대하여 평활근세포의 전형적인 형태인 "hill and valley" 양상을 확인할 수 있었고, 또 이들 세포에 대하여 평활근 알파-액틴과

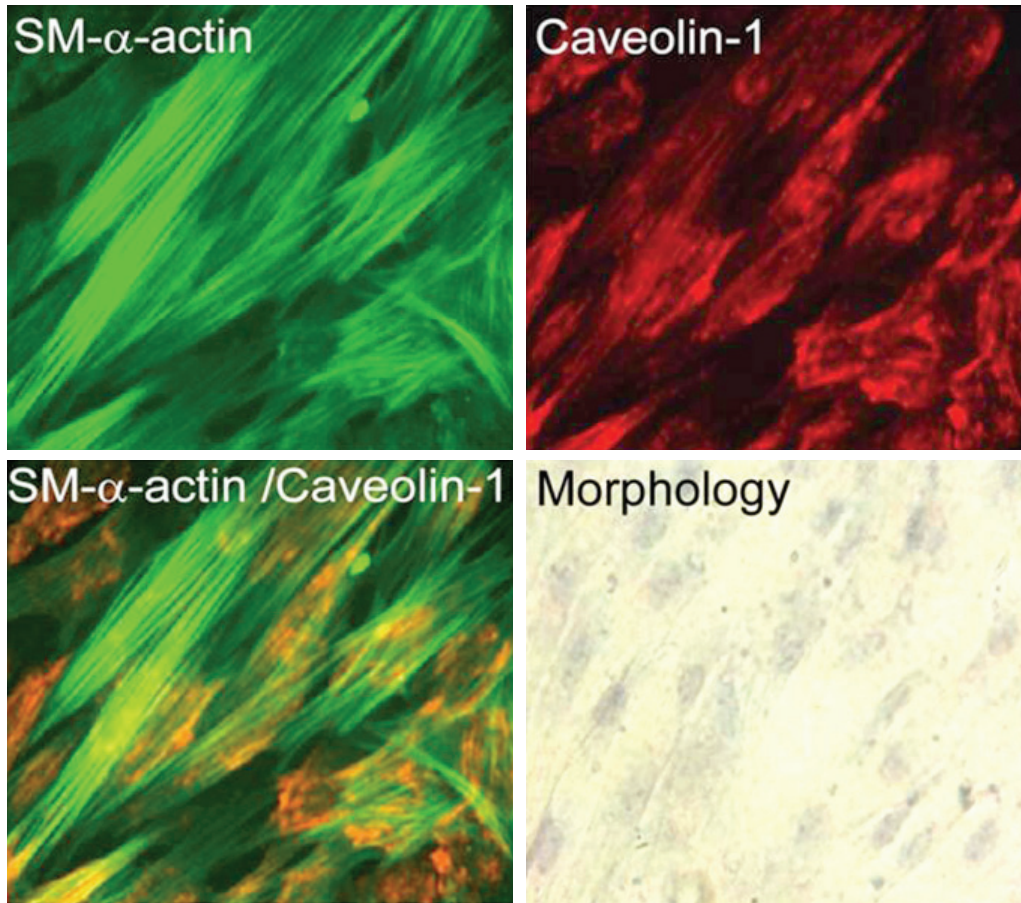


Fig. 1. Morphology of uterine artery smooth muscle cells in culture and double immunofluorescence staining of α -actin and caveolin-1 ($\times 400$). SM- α -actin, smooth muscle α -actin.

caveolin-1의 면역형광 염색을 시행하여 세포내에 뚜렷하게 염색이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

배양된 평활근세포에 대하여 흐름세포측정 분석을 하여 배양된 세포에서 평활근 알파-액틴과 caveolin-1은 각각 99.96%와 99.98%가 발현되어 100%에 가까운 높은 비율로 표출되었지만, 내피세포 산화질소 합성효소 단백질은 26.12%의 적은 양으로 거의 흔적으로만 표현되었다 (Fig. 2).

2. 자궁동맥 평활근세포에서 난포호르몬 수용체의 발현

자궁동맥 평활근과 여기서 분리 배양한 자궁동맥 평활근세포에서도 난포호르몬 알파-수용체와 베타-수용체 단백질들이 발현되는 것을 western blot 분석을 통하여 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

3. ERK2/1 활성화에 대한 난포호르몬의 효과

ERK2/1의 활성화를 판단하기 위하여 배양된 자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 10^{-14} M에서 10^{-6} M의 농도로 처리하여 western blot 분석으로 인산화 ERK2/1 단백질의 발현을 확인하였다. 자궁동맥 평활근세포에서 ERK2/1의 인산화는 난포호르몬의 농도가 증가함에 따라 증가-감소-증가의 양상으로 이상성(biphasic) 증가반응을 보였다. 난포호르몬의 생체내 농도인 10^{-14} – 10^{-10} M에서는 인산화 ERK2/1의 발현은 용량-의존적으로 증가하였다. 반면 고농도인 10^{-9} – 10^{-8} M에서는 오히려

ERK2/1 인산화가 감소하였으며, 약물농도에 해당하는 10^{-7} – 10^{-6} M의 고농도 구간에서는 ERK2/1의 인산화가 급격하게 증가하였다 (Fig. 4). 자궁동맥 평활근세포에서 ERK2/1의 인산화는 난포호르몬의 농도에 따라 이상성 증가 양상을 보였지만, 특히 난포호르몬의 생체내 농도에서는 농도에 비례하여 증가하였다.

4. 난포호르몬의 ERK2/1 인산화에 난포호르몬 수용체의 역할

자궁동맥 평활근과 평활근세포에서 난포호르몬 수용체(알파, 베타)가 발현되고, 난포호르몬은 자궁동맥 평활근과 평활근세포에서 ERK2/1의 활성화를 증가시킨다. 그렇다면 난포호르몬에 의한 ERK2/1 인산화가 난포호르몬 수용체를 통하여 이루어지는지를 확인할 필요가 있다. 이를 위하여 자궁동맥 평활근세포에 미리 난포호르몬 수용체 길항제인 ICI 182,780을 전처리하여 수용체의 기능을 차단한 후에 난포호르몬을 투여하여 그 효과가 나타나는 지를 확인하였다.

ICI 182,780을 전처리하지 않은 대조군에서는 앞선 실험과 동일하게 난포호르몬에 의한 ERK2/1의 인산화는 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 ICI 182,780을 전처리한 경우에는 난포호르몬을 투여하더라도 ERK2/1의 인산화는 전혀 나타나지 않았다. 난포호르몬을 고농도(10^{-7} M)와 저농도(10^{-10} M)로 다르게 처리하였지만 농도에 상관없이 모두 인산화가 나타나지 않았다. 난포호르몬을 투여하지 않은 대조군에서는 인산화가

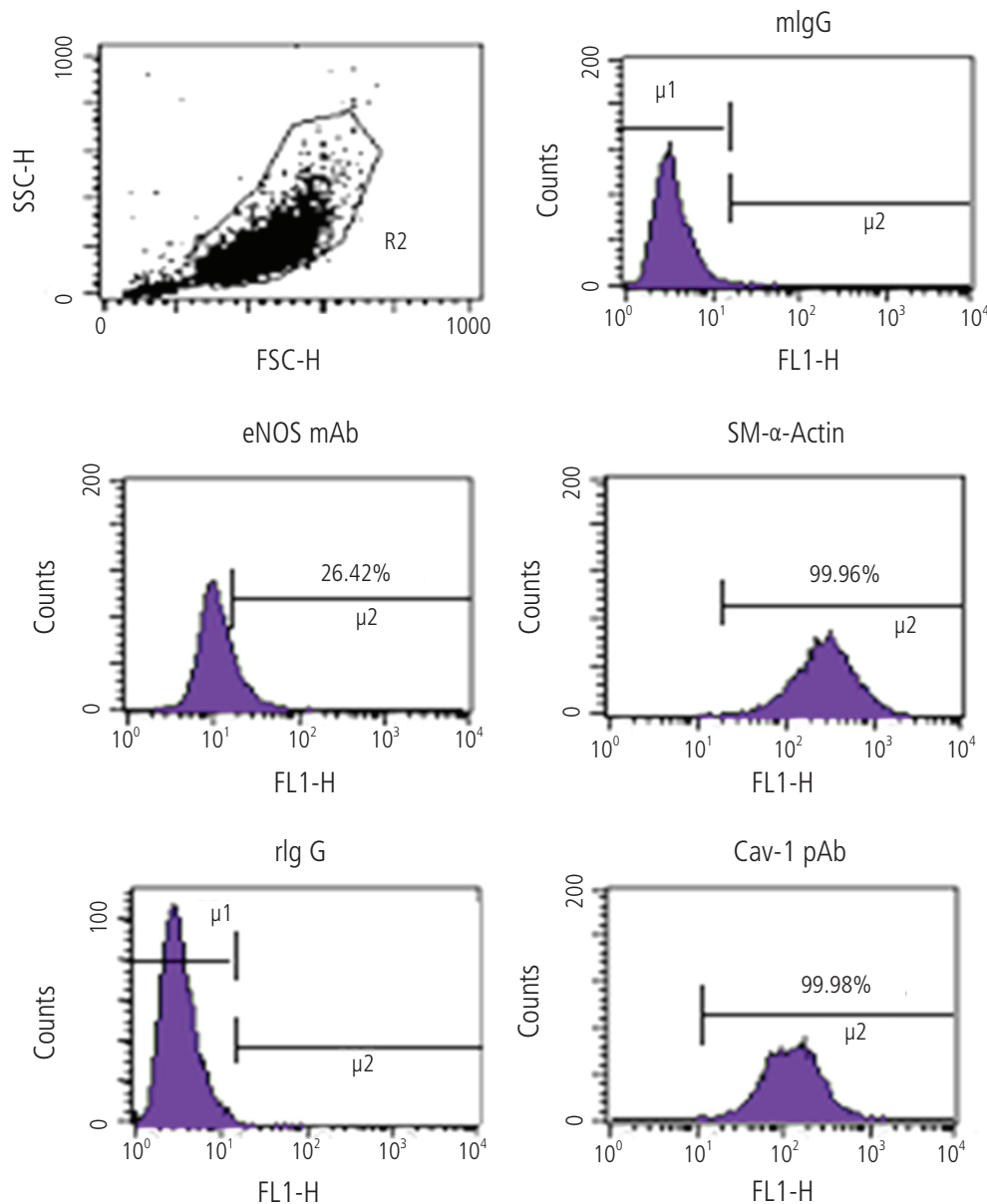


Fig. 2. Flow cytometric analysis of uterine artery smooth muscle cells. SSC-H, stained smooth muscle cells; FSC-H, fluorescence activated cells; FL1-H, flow cytometric analysis; eNOS mAb, endothelial nitric oxide synthase monoclonal antibody; SM- α -actin, smooth muscle α -actin; rlgG, anti rabbit immunoglobulin G fluorescein isothiocyanate conjugate; Cav-1 pAb, caveolin-1 polyclonal antibody.

전혀 발생하지 않았다(Fig. 5).

고 찰

포유류의 임신은 모체의 해부학적인 변화와 호르몬의 변화뿐 아니라 생리학적으로도 여러 변화가 발생하는데, 이런 변화는 임신부의 안녕은 물론 정상적인 태아의 성장과 임신의 유지를 위한 필수 조건이다. 특히 자궁-태반 혈류량의 증가는 임신의 가장 중요한 생리적 변화로서 이는 임신의 예후에도 커다란 영향을 미치게 된다[1-12].

모든 혈관은 항상 혈류에 의한 혈관 전층 압력과 벽 엇갈림 부하의 혈

류역동학적인 힘에 노출되어 있으며, 그 외에도 호르몬이나 혈관확장/수축제 등의 자극에도 민감하게 반응을 하여 긴장도를 유지하게 된다. 급속한 혈류량의 증가나 감소는 주로 혈관 중간막의 혈관 평활근세포의 수축과 이완을 통하여 혈관의 직경이 조절되지만, 만성적인 혈류의 변화는 혈관 평활근세포의 유전자 발현과 단백질 합성을 변화시켜 혈관의 구조적인 재형성(vascular structural remodeling)이 일어나게 한다. 이러한 변화는 운동이나 월경주기에 따라 나타나고 성장기에 나타나지만 특히 임신기간 동안 뚜렷하게 관찰된다[22,23].

임신 중에는 자궁혈류량이 급격하게 증가하고 이에 상응하여 자궁동맥의 구조적 변화가 발생하는데, 이러한 혈류량의 증가와 혈관의 변화에는 난포호르몬이 중요한 역할을 한다[24-26]. 활성화된 난포호르몬인 에스트라

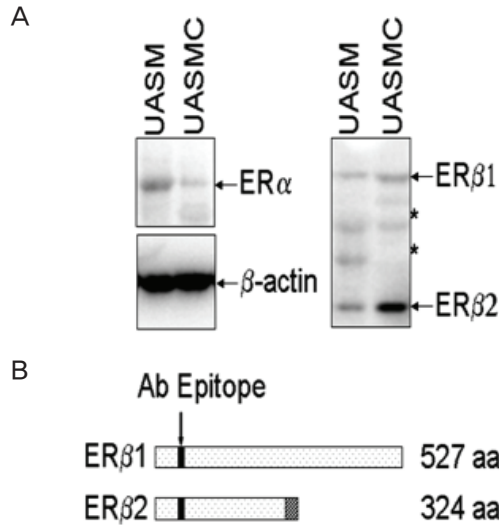


Fig. 3. Western blot analysis of estrogen receptor α and β in uterine artery smooth muscle and uterine artery smooth muscle cell. UASM, uterine artery smooth muscle; UASMC, uterine artery smooth muscle cell; ER, estrogen receptor.

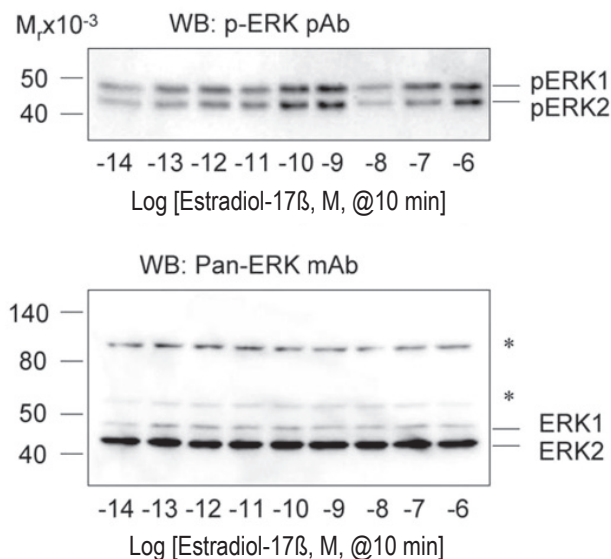


Fig. 4. Effects of estrogen on extracellular signal-regulated kinases (ERK2/1) activation in uterine artery smooth muscle cell. WB: p-ERK pAb, western blot phospho-extracellular signal-regulated kinases polyclonal antibodies; pERK, phospho-ERK; M, molecular weight.

다음이 자궁동맥에서 내피세포 산화질소 합성효소의 발현을 증가시키고 동시에 자궁혈류를 증가시키는 것이 증명되어 난포호르몬에 의한 내피세포-의존성 혈관확장 기전이 확인되었다[20,27]. 혈류 증가에 의한 혈관의 구조적 재형성에도 내피세포가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 내피세포를 제거한 총경동맥과 제거하지 않은 혈관에 만성적으로 혈류를 증가시켜보면, 무손상 혈관에서는 혈관의 구조적 재형성이 발생하지만 내피세포

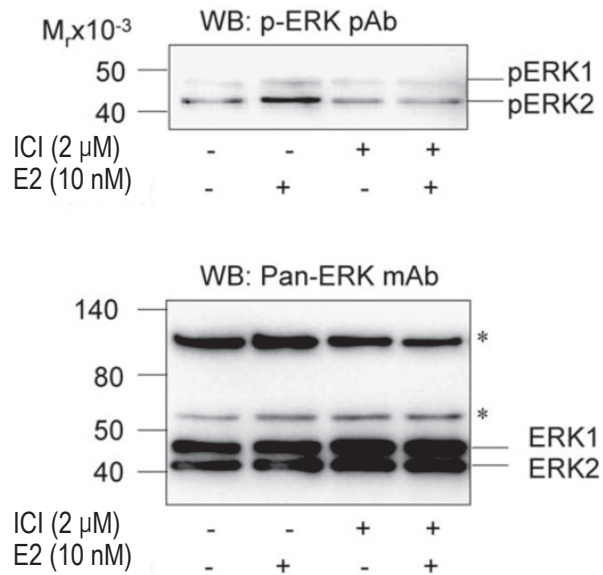


Fig. 5. Role of estrogen receptor in estrogen induced extracellular signal-regulated kinases (ERK2/1) activation in uterine artery smooth muscle cell. WB: p-ERK pAb, western blot phospho-extracellular signal-regulated kinases polyclonal antibodies; pERK, phospho-ERK; ICI, ICI 182,780; E2, estradiol; WB: Pan-ERK mAb, western blot phospho-extracellular signal-regulated kinases monoclonal antibodies.

포충이 제거된 혈관에서는 혈관 내강의 증가가 전혀 일어나지 않는 것으로 보아 혈관의 구조적 변화에서 내피세포의 역할을 확인할 수 있다[28].

혈관 내피세포에서는 endothelin-1, angiotensin II, cyclooxygenase pathway 등의 혈관수축인자 외에도 내피유래 이완인자(endothelium derived relaxing factors)를 분비하여 혈관의 긴장과 이완을 조절한다. 산화질소는 대표적인 내피유래 이완인자로 주로 산화질소 합성효소에 의하여 L-arginine으로부터 생성된다[29]. 산화질소 합성효소는 대표적으로 신경세포 산화질소 합성효소(neuronal NOS, nNOS, NOS1), 유발형 산화질소 합성효소(inducible NOS, iNOS, NOS2)와 내피세포 산화질소 합성효소(eNOS, NOS3)의 세 가지 아형이 있다. 내피세포 산화질소 합성효소가 대표적인 아형으로 주로 혈관 내피세포에서 발현되며[30], 난포호르몬에 의하여 상향조절되어 산화질소의 생성을 증가시킨다[31]. 생성된 산화질소는 내피세포에서 guanylyl cyclase를 활성화시켜 cGMP를 증가시키고, cGMP는 혈관 평활근세포를 이완시켜 결국 혈관확장을 일으키게 된다[32,33]. 이와 같이 난포호르몬에 의한 혈관확장 작용에 관한 연구는 주로 혈관의 내피세포에 기인하여 이루어져 난포호르몬에 의한 내피세포-의존성 혈관확장 기전에 대해서는 비교적 잘 밝혀져 있지만, 혈관긴장도의 조절에서 혈관 평활근의 역할과 내피세포-비의존성 기전에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않다. 하지만 내피를 제거한 혈관에서도 난포호르몬에 의한 혈관확장이 여전히 증명됨으로써 내피세포-비의존성 혈관확장 기전도 작용하고 있음을 추측할 수 있다[18-21].

이에 본 연구는 난포호르몬에 의한 내피세포-비의존성 혈관확장 기전을 알아보기 위하여, 자궁동맥 평활근세포가 난포호르몬의 직접적인

표적조직인지와 난포호르몬이 자궁동맥 평활근세포에서 ERK2/1을 활성화시키는지 알아보았다. ERK2/1의 활성화 여부는 인산화 되는지를 확인하여 평가하였다. 세포내 신호전달 물질인 ERK2/1은 미토겐 활성화 단백질 키나아제(mitogen activated protein kinases)의 일종으로 특이적인 자극에 의하여 활성화되면 세포내부의 신호전달 체계를 통하여 C-myc이나 cyclic AMP response element binding protein 등의 전사인자를 활성화시켜서 생물학적 작용을 나타내게 된다. 자궁동맥 평활근에서는 ERK2/1가 활성화되면 세포내 신호가 전사되어 세포분열과 평활근의 구조적 재형성이 일어나, 평활근이 이완되고 혈관이 확장되어 결국 자궁동맥의 혈류량 증가가 발생하게 된다[18,21,34].

본 연구는 재태기간 120일에서 130일의 임신 양을 대상으로 자궁동맥을 적출하여 내피세포를 완전히 제거하고 배양한 자궁동맥 평활근세포를 대상으로 하였다. 임신기간이 144일인 양에서는 재태기간 120일에서 130일은 인간의 만삭임신에 해당하는 기간이다. 배양된 세포에서 전형적인 평활근세포 형태인 “hill and valley” 양상을 확인할 수 있었고, 중독 면역형광 염색하여 세포내에서 평활근세포의 특이 표지단백질인 평활근 알파-액틴과 caveolin-1이 확인되었다(Fig. 1). 평활근 알파-액틴은 혈관 평활근세포의 특이적인 표지단백질로서, 평활근세포임을 확인할 수 있는 역할을 한다. Caveolin-1은 세포의 증식을 억제하고 platelet derived growth factor에 의한 증식신호를 세포자멸을 일으키는 신호로 전환시켜 결국은 세포가 고사하게 되는 역할을 하는 신호전달 물질로서 caveolin-1이 표현되는 것은 세포의 기능이 존재한다는 것을 의미한다[35]. 흐름세포측정 분석에서는 평활근 알파-액틴과 Cav-1은 각각 99.96%와 99.98%로 거의 100% 가까이 발현되었지만, 내피세포 산화질소 합성효소는 26.12%로 적은 양만 발현되었다(Fig. 2). 이는 배양된 세포가 대부분이 세포의 기능이 존재하는 평활근세포이고 내피세포는 거의 존재하지 않는 것으로 볼 수 있다. 이는 본 연구의 목적인 난포호르몬의 내피세포-비 의존성 혈관확장 작용을 파악할 수 있는 적절한 상태를 확인할 수 있다.

자궁동맥과 난소에는 난포호르몬 수용체가 존재한다. 자궁동맥에는 내피세포와 평활근세포 모두에서 난포호르몬 수용체가 확인되고, 난소에서는 주로 과립막세포에서 확인된다. 평활근세포의 면역조직화학 염색과 western blot 분석에서 난포호르몬 알파-와 베타-수용체 단백질이 발현되고, reverse transcription-polymerase chain reaction에서 수용체 mRNA가 발현된다[36,37]. 생체내의 자궁동맥 평활근은 물론이고 실험실에서 배양된 자궁동맥 평활근세포에서도 난포호르몬 수용체의 mRNA와 단백질이 발현되는 것으로 보아, 난포호르몬은 자궁동맥 평활근과 평활근세포에 직접적으로 효과를 미칠 수 있다는 것을 추측할 수 있다.

자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 농도를 다르게(10^{-14} – 10^{-6} M) 처리하여 시행한 ERK2/1 인산화의 western blot 분석에서, 저농도(10^{-14} – 10^{-10} M)에서는 ERK2/1 인산화가 용량-의존적으로 증가하다가, 고농도(10^{-9} – 10^{-6} M)에서는 오히려 감소하였으며 초고농도(10^{-7} – 10^{-5} M)에서는 다시 용량-의존적으로 급격하게 증가하였다(Fig. 6). 결론적으로 자궁동맥 평활근세포에서 ERK2/1 인산화는 난포호르몬의 농도에 따라 증가-감소-증가의 이중적인 용량-의존적 증가반응을 보이고, 특히 난포

호르몬의 생체내 농도에서는 ERK2/1 인산화는 용량-의존적으로 증가한다는 사실을 알 수 있었다.

자궁동맥 평활근과 평활근세포에서 난포호르몬 수용체(알파, 베타)가 발현되고, 난포호르몬은 자궁동맥 평활근과 평활근세포에서 ERK2/1의 인산화를 증가시킨다. 그렇다면 ERK2/1 인산화가 난포호르몬의 직접적인 작용에 의하여 이루어지는지를 확인하기 위하여 ERK2/1 인산화 기전인 난포호르몬 수용체를 통하여 이루어지는지를 확인할 필요가 있다. 이를 위하여 자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 투여하기 전에 먼저 난포호르몬 수용체 길항제인 ICI 182,780을 전처치하여 수용체의 기능을 차단한 후에도 난포호르몬의 효과가 지속되는지를 western blot 분석하였다. ICI 182,780을 전처치하지 않은 경우에는 같은 농도의 난포호르몬을 투여하여 뚜렷한 ERK2/1의 인산화가 나타나지만, 반면에 ICI 182,780을 전처치하여 난포호르몬 수용체를 차단한 경우에는 난포호르몬을 투여하더라도 ERK2/1의 인산화는 전혀 나타나지 않았다(Fig. 5). 이는 난포호르몬은 자궁동맥 평활근세포에서 난포호르몬 수용체를 통하여 ERK2/1을 인산화하며, 난포호르몬 수용체를 차단하면 난포호르몬에 의한 ERK2/1 활성화는 소멸된다는 것을 알 수 있다. 인산화된 ERK2/1은 세포내 전사인자를 활성화하여, 평활근세포의 세포분열과 혈관의 구조적인 변화를 일으켜 결국 자궁동맥의 혈류량 증가가 발생하는 것으로 생각된다.

결론적으로 자궁동맥 평활근은 난포호르몬의 직접적인 표적조직이며, 자궁동맥 평활근에서 난포호르몬은 난포호르몬 수용체를 통하여 ERK2/1을 활성화한다. 이것으로 보아 난포호르몬의 혈관확장 작용에는 평활근세포의 ERK2/1 활성화를 포함한 혈관내피 비의존성 기전도 존재한다는 것을 확인할 수 있다.

References

1. Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol* 1989;256:H1060-5.
2. Clapp JF 3rd, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 1997;80:1469-73.
3. Slangen BF, Out IC, Verkeste CM, Peeters LL. Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol* 1996;270:H1779-84.
4. Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, et al. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998;54:2056-63.
5. van Oppen AC, van der Tweel I, Alsbach GP, Heethaar RM, Bruinse HW. A longitudinal study of maternal hemodynamics during normal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1996;88:40-6.
6. Wong AY, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Ad-

- amson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H918-25.
7. Duvekot JJ, Peeters LL. Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994;49:830-9.
8. Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Peeters LH. Early pregnancy changes in hemodynamics and volume homeostasis are consecutive adjustments triggered by a primary fall in systemic vascular tone. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1382-92.
9. Spaanderman ME, Meertens M, van Bussel M, Ekharth TH, Peeters LL. Cardiac output increases independently of basal metabolic rate in early human pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1585-8.
10. Magness RR, Zheng J. Maternal cardiovascular alteration during pregnancy. In: Gluckman PD, Heymann MA, editors. *Pediatric and perinatal perspectives: the scientific basis*. London: 1996. p.762-72.
11. Rosenfeld CR. Changes in uterine blood flow during pregnancy. In: Rosenfeld CR, editor. *Reproductive and perinatal medicine: the uterine circulation*. vol. X. Ithaca (NY): Perinatology Press; 1989. p.135-56.
12. Magness RR, Rosenfeld CR. The role of steroid hormones in the control of uterine blood flow. In: Rosenfeld CR, editor. *Reproductive and perinatal medicine: the uterine circulation*. vol. X. Ithaca (NY): Perinatology Press; 1989. p.239-71.
13. Ford SP. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. *J Anim Sci* 1982;55 Suppl 2:32-42.
14. Van Buren GA, Yang DS, Clark KE. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:828-33.
15. Rosenfeld CR, Cox BE, Roy T, Magness RR. Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *J Clin Invest* 1996;98:2158-66.
16. Magness RR, Sullivan JA, Li Y, Phernetton TM, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1692-8.
17. Rupnow HL, Phernetton TM, Shaw CE, Modrick ML, Bird IM, Magness RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and progesterone effects on eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1699-705.
18. Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004;145:113-25.
19. Moon CS, Park HM, Hur M, Lee MY. The effect of progestogens on the tone of human vascular smooth muscles. *Korean J Obstet Gynecol* 2001;44:714-26.
20. Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms. *Coron Artery Dis* 1995;6:417-22.
21. Bird IM, Sullivan JA, Di T, Cale JM, Zhang L, Zheng J, et al. Pregnancy-dependent changes in cell signaling underlie changes in differential control of vasodilator production in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2000;141:1107-17.
22. Cho A, Courtman DW, Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res* 1995;76:168-75.
23. Wong LC, Langille BL. Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circ Res* 1996;78:799-805.
24. Dzau VJ, Gibbons GH. Vascular remodeling: mechanisms and implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21 Suppl 1:S1-5.
25. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-8.
26. Langille BL. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:834-41.
27. Salhab WA, Shaul PW, Cox BE, Rosenfeld CR. Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H2134-42.
28. Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986;231:405-7.
29. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100:2146-52.
30. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199:8-17.
31. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 1997;81:355-62.
32. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H1145-9.

33. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8:37-44.
34. Chen D, Zangl AL, Zhao Q, Markley JL, Zheng J, Bird IM, et al. Ovine caveolin-1: cDNA cloning, E. coli expression, and association with endothelial nitric oxide synthase. *Mol Cell Endocrinol* 2001;175:41-56.
35. Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, Kleppe LS, Mueske CS, Mookadam M, et al. Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1521-7.
36. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 2002;91:814-20.
37. Liao WX, Magness RR, Chen DB. Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in the pregnant ovine uterine artery endothelial cells in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2005;72:530-7.

난포호르몬이 임신 자궁동맥 평활근세포에서 extracellular signal-regulated kinases 활성화에 미치는 영향

한림대학교 의과대학 산부인과학교실

이용우, 김호연, 박상민, 최수란, 정지윤, 문종수

목적

내피세포를 제거한 자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 투여하여 자궁동맥 평활근세포가 난포호르몬의 직접적인 표적조직인지와 난포호르몬이 자궁동맥 평활근세포에서 직접적으로 extracellular signal-regulated kinases (ERK2/1) 활성화하는지 여부를 파악하여 난포호르몬의 자궁동맥 혈관확장 중에서 내피세포-비 의존성 기전을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구방법

만삭임신의 양에서 절제된 자궁동맥을 대상으로 콜라겐 분해효소로 내피세포를 제거하였다. 내피세포가 제거된 자궁동맥 평활근 분절은 소화효소처리 후에 평활근세포를 수집하여 성장배지에서 계대배양하였다. 혈관 내피세포와 평활근 상태의 평가는 항평활근 알파-액틴 단일클론 항체, 항내피세포 산화질소 합성효소 단일클론 항체, 항caveolin-1 다클론 항체를 처리하여 중독 면역형광 염색과 흐름세포측정으로 판정하였다. 자궁동맥 평활근세포에 난포호르몬을 농도를 달리하여(10^{-14} M에서 10^{-6} M까지) 투여하여 전체 세포 추출물에 대하여 항인산 특이 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 다클론 항체로 ERK2/1 인산화의 western blot 분석을 하였다. 난포호르몬 수용체 길항제인 ICI 182,780으로 전처리한 후에 다시 난포호르몬을 낮은 농도(10^{-10} M)와 높은 농도(10^{-7} M)로 투여하여 인산화 ERK2/1의 western blot 분석을 하여 전처리하지 않은 경우와 비교하였다.

결과

평활근세포의 전형적인 "hill and valley" 양상과 세포 내에 평활근 알파-액틴과 caveolin-1이 뚜렷하게 염색되었다. 흐름세포측정 분석에서 평활근 알파-액틴과 caveolin-1은 각각 99.96%와 99.98%가 발현되었지만 내피세포 산화질소 합성효소 단백질은 26.12%에서만 발현되었다. 난포호르몬의 농도의 증가에 따라 인산화 ERK2/1의 발현은 이상성 증가반응을 보였다. 난포호르몬이 저농도(10^{-14} – 10^{-10} M)에서는 ERK2/1의 인산화는 용량-의존적으로 증가하였지만, 고농도(10^{-9} – 10^{-8} M)에서는 ERK2/1의 인산화는 오히려 감소하였으며, 약물농도인 초고농도(10^{-7} – 10^{-5} M)에서는 ERK2/1의 인산화가 급격하게 증가하였다. 난포호르몬 수용체 길항제인 ICI 182,780으로 전처리하면 난포호르몬을 저농도(10^{-10} M) 혹은 고농도(10^{-7} M)로 투여하더라도 ERK2/1 인산화는 소멸되었다. Reverse transcription-polymerase chain reaction 분석에서 난포호르몬 알파-수용체와 베타-수용체는 자궁동맥 평활근과 자궁동맥 평활근세포에서 모두 발현되었다.

결론

자궁동맥 평활근은 난포호르몬 수용체를 지니고 있는 난포호르몬의 표적조직이며, 난포호르몬의 혈관확장 작용에는 자궁동맥 평활근세포에서 직접적인 ERK2/1 활성화를 통한 혈관내피 비의존성 기전도 존재한다는 것을 확인할 수 있다.

중심단어: 난포호르몬, 자궁동맥 평활근, 혈관확장, ERK2/1