

진행성 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 추정줄기세포의 과다발현

부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실¹, 부산대학교병원 불임클리닉²
부산대학교 생명자원과학대학 동물생명자원과³, 가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실⁴

최종렬¹ · 주종길¹ · 나용진¹ · 고경래² · 이흥구³ · 이규섭¹ · 임용택⁴

The hyperexpressions of putative stem cells in the eutopic endometrium of patients with advanced endometriosis

Jong-Ryeol Choi, M.D.¹, Jong-Kil Joo, M.D.¹, Yong-Jin Na, M.D.¹,
Kyung-Rae Ko, Ph.D.², Hong-Gu Lee, Ph.D.³, Kyu-Sup Lee, M.D.¹, Yong-Taek Lim, M.D.⁴

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Pusan National University School of Medicine,

²Infertility clinic, Pusan National University Hospital,

³Department of Animal Science & PNU-Special Animal Technology Center, Pusan National University, Busan;

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: Recently it has been proposed that stem cells may be associated with the pathogenesis of endometriosis. The purposes of this study are to investigate whether the eutopic endometrial cells of women with or without endometriosis show the characteristics of stem cells *in vitro* and have a difference of the expressions of the undifferentiated stem cell markers as OCT-4 and CXCR4.

Methods: A total of 6 women with advanced endometriosis and a total of 10 women without endometriosis, adenomyosis or leiomyoma were included in this study. The eutopic endometrial cells, which were obtained from the menstrual blood at menstrual cycle day 2 to 4, were cultured *in vitro* for approximately 2 weeks, subsequently the putative very small stem cells were separated by Percoll density gradient method and were cultured. The expressions of OCT-4 and CXCR4 were analyzed by real time RT-PCR.

Results: The eutopic endometrial cells of the group of endometriosis compared with the control group showed the different morphological characteristics *in vitro*; more commonly heterogeneous supportive cells, very small round cells less than 3 μm and 5~15 μm sized hyperchromatic round cells. After the separation of very small round cells by Percoll density gradient method, these cells showed the several characteristics of stem cells; self-renewal, asymmetric cell division, colony formation and embryoid body-like formation. Also These cells showed the similar characteristics of very small embryonic-like stem cells; the mobile cells smaller than erythrocyte, the cell migration or adhesion to supportive cells, the sphere formation by cell aggregation and the formation of new differentiated cell by cell fusion. The expressions of OCT-4 and CXCR4 in the group of endometriosis are respectively 5.66 times and 17.69 times as high as the control group ($P<0.05$).

Conclusion: The very small round cells less than 3 μm and 5~15 μm sized hyperchromatic round cells, which showed the several characteristics of stem cells *in vitro*, were more common in eutopic endometrial cells of patients with endometriosis and the expressions of OCT-4 and CXCR4 were significantly higher. This study suggests that stem cells might play a key role in the pathogenesis of endometriosis and OCT-4 and CXCR4 might be used as a tool for diagnosis or follow-up.

Key Words: Endometriosis, Stem cells, OCT-4, CXCR4

접 수 일 : 2009. 10. 26.
채 택 일 : 2010. 2. 8.
교신저자 : 이규섭
E-mail : kuslee@pusan.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A080416).

자궁내막증은 자궁내강 이외의 장소에 자궁내막 선과 기질 조직이 증식하는 질환으로서, 흔히 복막, 난소, 나팔관, 더글라스와에서 발견되며, 드물게 흉막, 폐, 뇌에서 발견되기도 한다. 자궁내막증은 가임기 여성의 3~10%에서

발생하는 흔한 질환으로서, 골반통을 호소하는 여성 중 5~20%, 불임 여성 중 20~50%에서 발견된다.¹⁻³

자궁내막증의 병인으로는 월경혈 역류, 비정상적인 자궁내막, 변화된 복강 환경, 증가된 혈관형성능, 부적절한 면역학적 반응, 유전적인 요인, 환경적인 요인 등이 복합적으로 관여하며, 흔히 알려진 가설로는 월경혈 역류설 (retrograde menstruation theory), 체강상피 화생설 (coelomic metaplasia theory), 태생 잔존세포설 (embryonic rest theory), 림프혈관 전이설 (lymphovascular metastasis theory) 등이 있으나,³⁻⁷ 어느 한 가지 가설만으로 자궁내막증의 병인을 완전히 설명할 수 없다.

최근 자궁내막에서 줄기세포 (stem cell)와 전구세포 (progenitor cell)가 자궁내막의 기저층과 기질의 혈관조직 주위에 많이 존재하며 자궁내막조직의 성장, 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려지면서 자궁내막증을 이해하기 위한 새로운 전환점을 맞이하고 있다.⁸ 또한 자궁내막증이 줄기세포 혹은 전구세포에 의하여 발생한다는 가설이 새롭게 제시되고 있는데, 이는 이소성 자궁내막 (ectopic endometrium)의 발생과 관련된 여러 자궁내막증 가설들을 세포 수준에서 설명할 수 있으며 자궁내막증과 연관된 신체 변화들을 설명할 수도 있다.³

자궁내막 줄기세포 혹은 전구세포의 월경혈 역류설을 뒷받침하는 연구로서 자궁내막증 환자의 정상부위 자궁내막 기저층과 이소성 자궁내막 간에 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 사이토크린 p450 표현형이 유사하다는 보고가 있는데,⁹ 이는 줄기세포가 많이 존재하는 자궁내막 기저층의 세포 중 일부가 이소성 자궁내막으로 이식될 수 있음을 의미한다. Microarray를 이용한 다른 연구에서는 자궁내막증 환자의 정상부위 자궁내막과 이소성 자궁내막 간의 유전자 발현 양상이 다르며, 자궁내막증 환자와 정상인의 정상부위 자궁내막 간의 유전자 발현 양상에도 차이가 있었는데,¹⁰ 이는 자궁내막증 환자의 정상부위 자궁내막에서 일반적인 자궁내막과는 다른 유전자 발현 양상을 보일 수 있으며, 자궁내막의 기능 자체가 변할 수 있다는 것을 뜻하고 있다.

줄기세포의 미분화표지자 OCT-4는 미분화 배아줄기세포의 자가 재생, 다능성 (pluripotency) 유지 및 분화 방지에 관여하는 전사인자로서 배아줄기세포의 표지자 단백질로 알려져 왔는데, 최근에는 성체줄기세포와 종양에서도

발견되는 것으로 알려져 있다.¹¹ CXCR4는 기질에서 유래하는 SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) 리간드와 상호 결합하는 수용체로서, 저산소성 손상시 기질에서 SDF-1을 분비하면 CXCR4를 지닌 줄기세포들이 유입되는 것으로 보고되고 있다. CXCR4는 배아줄기세포, 원시생식세포 (primordial germ cell), 극소배아양줄기세포 (very small embryonic-like stem cell), 조혈모세포 (hematopoietic stem cell), 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell), 혈관내피줄기세포, 신경줄기세포, 간, 근육, 상피 등에서 발견되며 일부 종양에서도 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이외에도 배아의 착상시기 동안에 자궁내막 내에서 증가되어 배아의 부착을 조장하는 것으로 알려져 있다.^{12,13}

줄기세포는 손상된 조직의 재생과정에서 증가하는 것으로 알려져 있는데, 자궁내막도 세포의 탈락 및 재생이라는 관점에서 비슷한 양상을 보일 것이다.¹²

저자들은 자궁내막증이 줄기세포 혹은 전구세포로부터 발생한다면 월경 기간 중 탈락되는 자궁내막세포의 증식 및 분화 과정이 정상인과 다를 수 있으므로, 월경혈에서 자궁내막세포를 채취하여 세포의 증식 및 분화 과정을 관찰하고, 줄기세포의 미분화표지자 OCT-4와 CXCR4의 발현율을 비교하여 자궁내막증이 줄기세포와 관련된 질환인지를 알아보려고 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2009년 3월부터 7월까지 본원 산부인과를 방문한 25세에서 40세 사이의 여성 중, 수술로 진단된 중등도 및 중증 자궁내막증 (moderate or severe endometriosis) 환자 6명을 실험군으로 하였으며, 초음파검사에서 자궁, 난소 및 나팔관 소견이 정상이면서 골반통 및 월경 장애 증상을 나타내지 않는 정상 월경주기의 여성 10명을 대조군으로 하였다.

2. 자궁내막세포의 채취 및 배양

자궁내막세포의 채취는 월경 주기 2일째에서 4일째 사

Table 1. cDNA primer pairs for undifferentiated markers of stem cells²⁶

Genes		Primer sequences
OCT-4	Forward primer	5'-GGA AGG TAT TCA GCC AAA CG-3'
	Reverse primer	5'-TAG CCT GGG GTA CCA AAA TG-3'
CXCR4	Forward primer	5'-AAT CTT CCT GCC CAC CAT CT-3'
	Reverse primer	5'-GAC GCC AAC ATA GAC CAC CT-3'
Alpha-tubulin	Forward primer	5'-GTA CCG TGG TGA CGT GGT TC-3'
	Reverse primer	5'-CTT GGC ATA CAT CAG GTC AA-3'

이에 시행하였으며, 흡입용 카테타를 이용하여 자궁내막의 손상을 최대한 줄이면서 월경혈을 1 mL 정도 채취하였다. 채취한 세포들은 digestion 용액 [DMEM/F-12+5% FBS (Hyclone, Logan, UT)+0.2% collagenase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)] 10 mL를 첨가한 후 20분마다 부드럽게 피펫팅하면서 5% CO₂, 37°C 환경에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 1,000 rpm 조건에서 10분간 원심분리를 시행하여 세포들만 따로 회수하였고, 회수된 세포들은 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% amphotericin B가 첨가된 DMEM/F-12 배지로 옮겨 48시간 동안 배양하였다. 이후 적혈구 등의 부유물을 제거하기 위해 PBS 용액으로 3회 수세한 뒤 다시 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 배지에서 배양하였다. 배양 2주 혹은 배양 접시의 70~80% 가량 세포가 배양된 후에는 0.05% trypsin-EDTA (Invitrogen, Gibco, USA) 처리하여 세포를 회수하였다. Real time RT-PCR 검사를 위한 검체는 -79°C에서 냉동 보관하였으며, 일부 자궁내막증 환자의 검체는 Percoll density gradient method를 이용하여 적혈구보다 작은 세포들을 따로 분리 배양하여 줄기세포의 특성을 나타내는지 관찰하였다.

3. Real time RT-PCR 검사

분리 자궁내막세포에서 total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출을 하였다. 추출 과정을 간단히 요약하면 먼저 Trizol reagent 1 mL를 넣고 분리된 자궁내막 세포를 분해시킨 후, 200 µL chloroform을 첨가하여 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하였다. 이후 상층액을 채취하여 500 µL isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시킨 뒤 12,000 rpm, 4°C

에서 10분간 원심분리를 하였다. 이후 상층액을 제거한 다음 pellet을 75% 알콜로 2회 세척하고 건조시킨 뒤 DEPC-water로 pellet을 희석하여 60°C에서 10분 동안 방치 -80°C에서 보관하였다. 추출된 total RNA 3 µg을 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer, 10 mM dNTP Mix, 0.1 M DTT, 5x First-Strand buffer, M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 시약을 이용하여 reverse transcriptase 실시하여 cDNA를 합성하였다. 선정된 유전자의 PCR amplification을 위하여 제작된 forward primer와 reverse primer 서열은 Table 1과 같으며, alpha-tubulin은 internal control로 사용하였다. 합성된 cDNA 2 µg를 사용하여 iQ SYBR Green supermix (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) 반응액과 총 20 µL을 96 well plate에서 iQ5 real-time PCR detection system (Bio-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PCR하였다. 반응 조건은 95°C에서 3분, 그 후 94°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 총 40 cycles 반응시켰다. 유전자 발현의 relative quantification은 2^{-ΔΔCT} method를 이용하여 분석하였다. 분석된 그룹의 평균값의 비교는 SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하여 two-sample *t*-test로 통계 분석하였으며, *P*<0.05 미만인 경우를 통계유의성 있음으로 판정하였다.

결 과

1. 대조군 자궁내막세포의 증식 양상

배양 1~2일 째에 대조군의 자궁내막세포들은 대부분 다각형 과립모양 상피세포와 길쭉한 기질세포가 배양접시에 부착되어 있었다. 간헐적으로 군집으로 뭉쳐진 세포군들이

발견되었으나 자궁내막증 환자군에 비하면 현저히 드물다. 군집으로 뭉쳐진 세포군 중에는 다수의 상피세포가 관찰되었으며, 이외에도 과다염색질 원형세포들 (hyperchromatic round cells)과 적혈구보다 작은 $3\ \mu\text{m}$ 미만의 극소 원형세포들 (very small round cells)이 관찰되기도 하였다 (Fig. 1). 배양 3~4일 쯤에는 군집을 이룬 세포들의 증식, 이주 및 변연부 부착을 확실히 관찰할 수 있었으며, 배양 7일 쯤에는 섬유아세포와 유사한 세포 (fibroblastoid cell)들이 많이 관찰되었다. 배양 14일 쯤로 갈수록 20~30

μm 이상의 커다란 세포 위주의 증식 및 대칭분열이 관찰되었다.

2. 실험군 자궁내막세포의 증식 양상

배양 1~2일 쯤에 배양접시에 부착된 상피세포와 기질세포들은 대조군에 비하여 현저히 많았으며, 특징적으로 부착된 지지세포들은 편평형, 원형, 원주형, 방추형, 별모양형 등 이질적인 형태를 나타내었다. 이 외에도 대조군에서

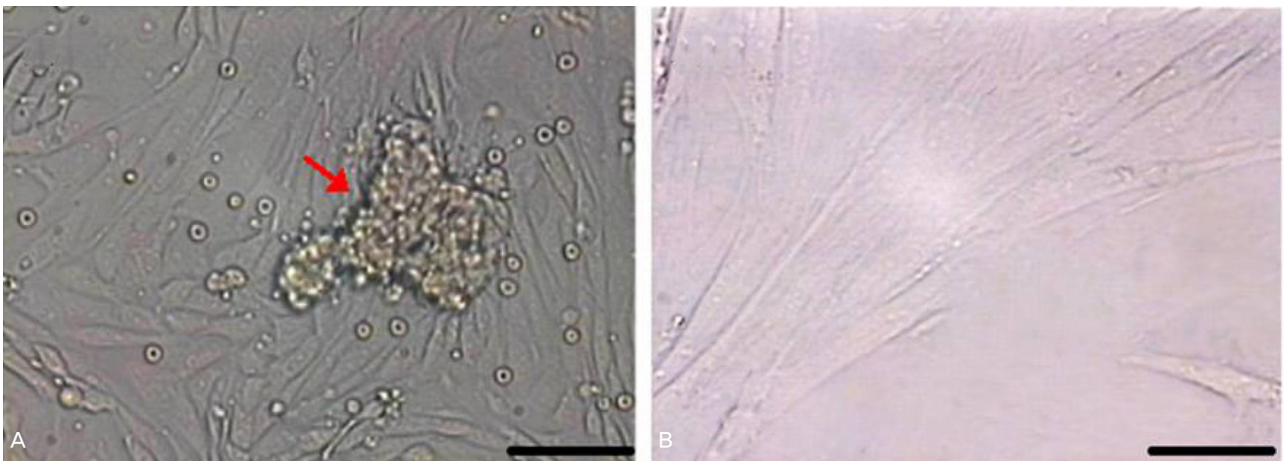


Fig. 1. The epithelial cells (A) and stromal cells (B) in the control group.

Most of epithelial cells and stromal cells in the control group show homogeneous pattern. The colonies (arrow), which are composed of approximately $5\sim 15\ \mu\text{m}$ hyperchromatic round cells and very small round cells less than $3\ \mu\text{m}$, are rarely as compared with the group of endometriosis (scale bar: $50\ \mu\text{m}$).

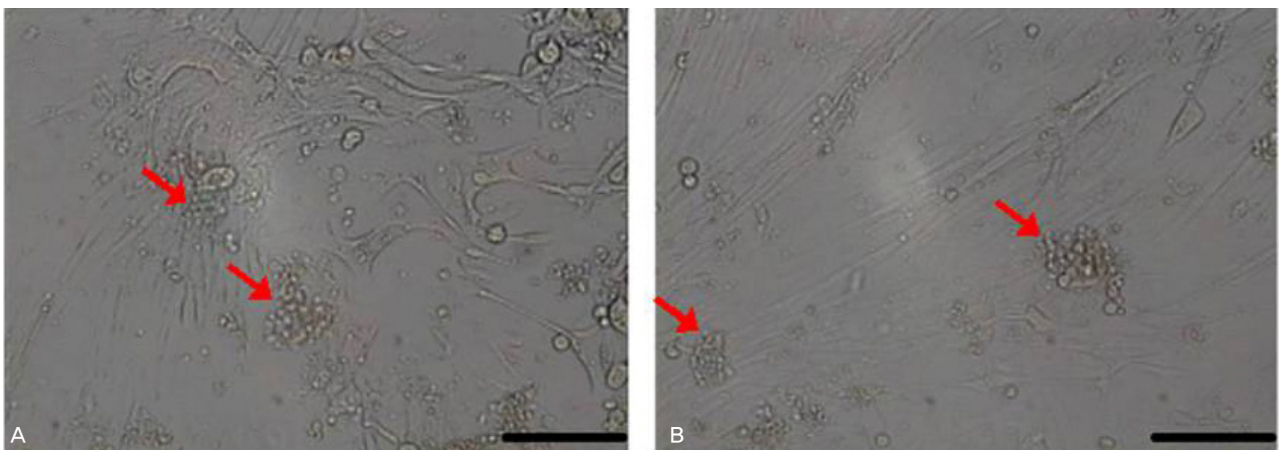


Fig. 2. The epithelial cells (A) and stromal cells (B) in the group of endometriosis.

The supportive cells in the group of endometriosis show heterogeneous pattern. Very small round cells (arrow) and the colonies such as Figure 1-A are more common in the group of endometriosis compared with the control group. Very small round cells show the similar characteristics of very small embryonic-like stem cells; the mobile cells smaller than erythrocyte, the cell migration or adhesion to supportive cells, the cell aggregation (arrow) and sphere formation (scale bar: $50\ \mu\text{m}$).

관찰되었던 군집으로 뭉쳐진 세포군들이 더욱 흔히 관찰되었는데, 군집의 중심부에는 약 5~15 μm 크기의 과다염색질 원형세포들과 3 μm 미만의 극소원형세포들이 다수 관찰되었다. 배양 3~4일째에는 3 μm 미만의 극소원형세포들이 현저히 관찰되었는데, 이 세포들 중 어떤 세포들은 지지세포 없이 움직이거나 또는 지지세포 위를 타고 이동하였으며, 또 다른 세포들은 지지세포 위에 부착되어 있거나 다발적으로 존재하는 것도 관찰되었다 (Fig. 2). 일부 세포들은 서로 다발적으로 응집되면서 10~20 μm 크기의 구형세포들 (sphere-shaped cells)을 형성한 후 지지세포에서 떨어져나가 이주하여 다른 장소에 부착하였다. 구형

세포들 중 일부 세포들은 내부에 존재하는 극소원형세포들이 융합하면서 전혀 다른 세포 형태로 분화하였는데, 이러한 과정은 마치 상실배, 포배아, 부화를 거치는 배아의 발달 과정과 유사한 면을 보였다 (Fig. 3). 배양 7일째에는 초기에 다발적으로 부착한 세포를 중심으로 더욱 많은 세포들이 생성되었고, 부착했던 장소의 주변에는 섬유아세포와 유사한 길쭉한 세포들이 가득 증식한 것을 관찰할 수 있었다. 배양 14일째에는 섬유아세포 모양의 세포들이 배양 접시의 대부분을 차지하였고, 편평형 혹은 원주형 세포가 대부분이었다. 특징적으로 초기에 다발적으로 부착한 세포를 중심으로 시간이 흐를수록 과다염색질 원형세포들

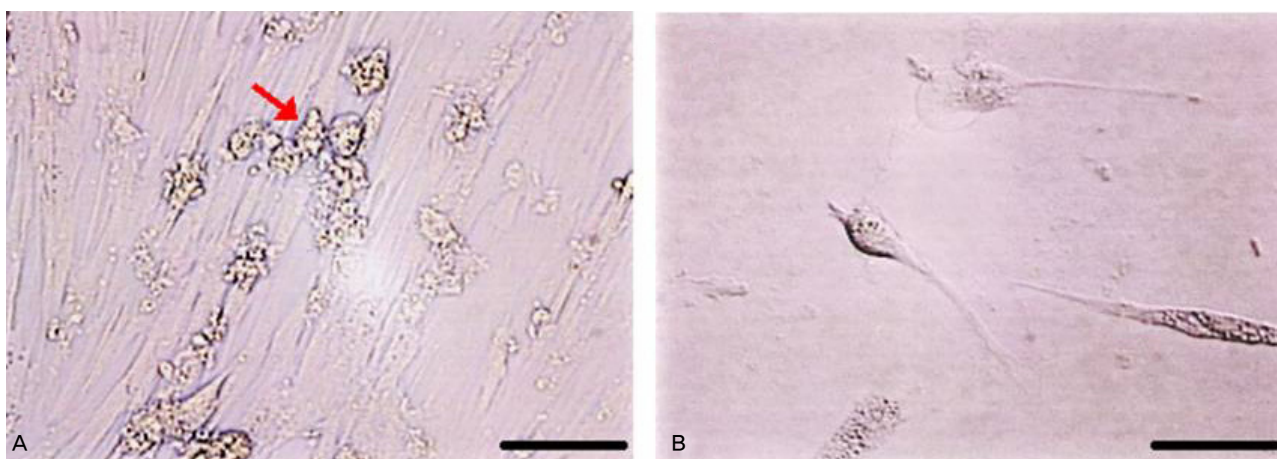


Fig. 3. The asymmetric cell division of sphere-shaped cells derived from very small round cells. Very small round cells form the sphere-shaped cells (arrow) by cell aggregation. These sphere-shaped cells adhere to other site for the undifferentiated cells (A) or adhere to for the differentiated cell by cell fusion and nuclear recombination (B) (scale bar: 50 μm).

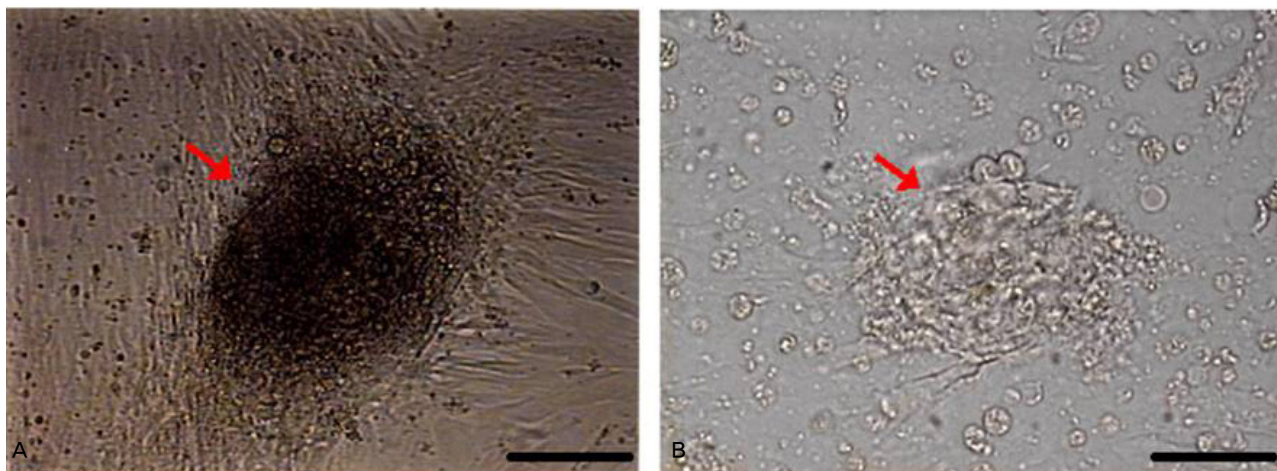


Fig. 4. Colony formation (A) and embryoid body-like formation (B). These phenomena are the morphological characteristics of stem cells *in vitro* culture (scale bar: 100 μm).

과 극소원형세포들이 더욱 치밀히 뭉쳐지면서 마치 자갈돌 (cobble stone) 모양을 나타내었다 (Fig. 4). 세포 밀도가 높아지면 수많은 극소원형세포들과 구형세포들이 서로 응집하여 배아체 (embryoid body)와 유사한 형성을 나타내기도 하였다 (Fig. 4).

극소원형세포들만 따로 분리하여 7일 정도 배양을 해 보면 배양 접시를 가득 메운 극소원형세포들을 확인할 수 있으며, 이후에는 점진적으로 극소원형세포들이 모여면서 커다란 세포로 분화해 나가거나 배아체와 유사한 형성을 나타내는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 5). 초기에 형성되는

세포들은 편평형, 원형, 원주형, 방추형, 별모양형 등 여러 가지 이질적인 형태의 세포들이 관찰되고 간헐적으로 신경 세포와 유사한 세포들도 관찰되었다. 배양을 지속할수록 섬유아세포와 유사한 기질세포 위주의 증식이 관찰되었다 (Fig. 6).

3. 미분화 줄기세포 표지자 OCT-4와 CXCR4 발현율

배양된 자궁내막세포를 대상으로 줄기세포의 미분화표지자인 OCT-4와 CXCR4의 발현율에 차이가 있는지를

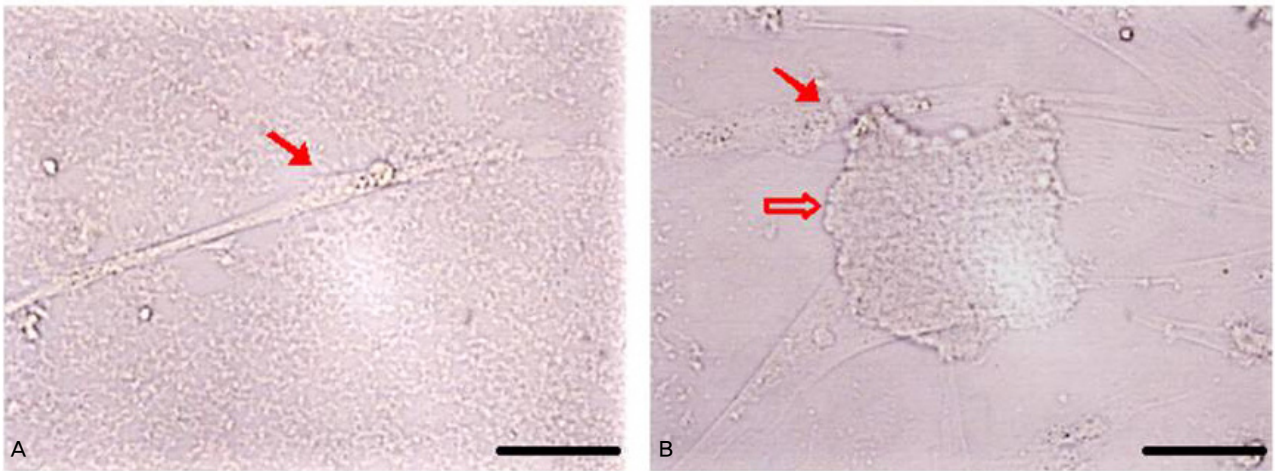


Fig. 5. Self renewal (A) and embryoid body-like formation (B) of very small round cells.

At day 7 *in vitro* culture, the very small round cells separated by Percoll density gradient method are confluent on petri dish. Thereafter these cells differentiate gradually larger cells by cell fusion (filled arrow) or form embryoid body-like formation (open arrow) (scale bar: 50 μ m).

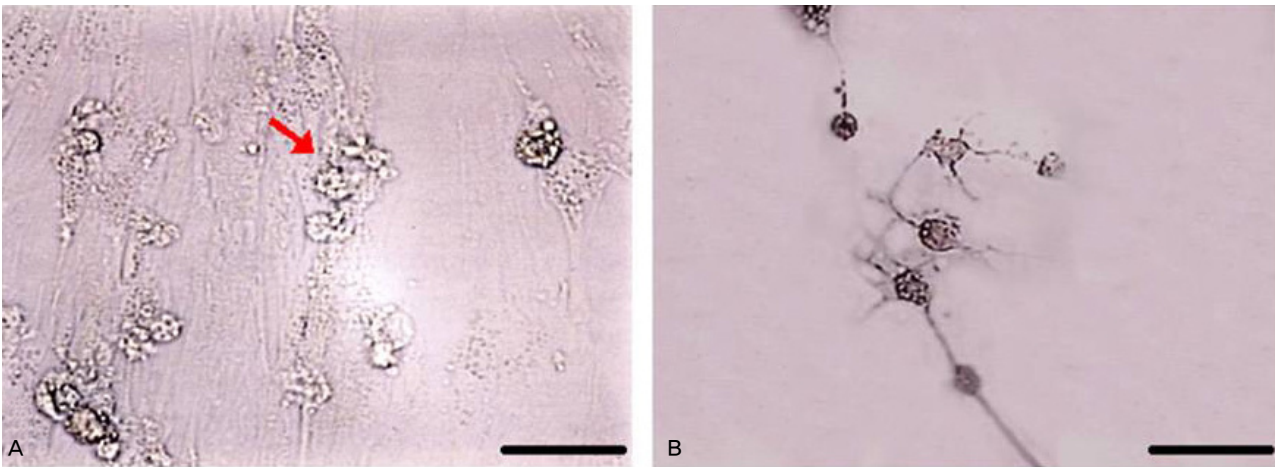


Fig. 6. Asymmetric cell division (A) and neuron-like cells (B).

The sphere-shaped cells derived from very small round cells show frequently asymmetric cell division (arrow). Especially neuron-like cells are often detected (scale bar: 50 μ m).

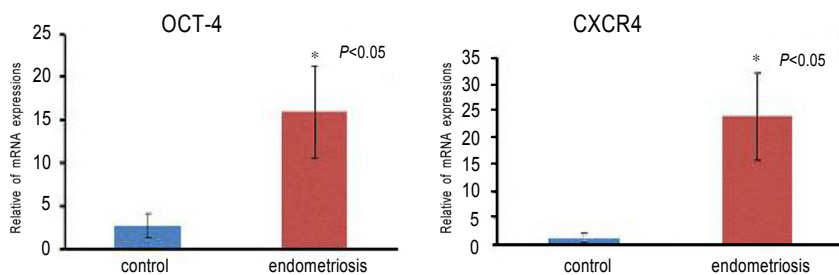


Fig. 7. Real time RT-PCR for OCT-4 and CXCR4.

The expressions of OCT-4 and CXCR4 in the group of endometriosis are respectively 5.66 times and 17.69 times as high as the control group ($P < 0.05$).

real time RT-PCR 방법으로 조사하였다. 실험군의 자궁 내막세포는 대조군에 비하여 OCT-4와 CXCR4 모두에서 높은 발현율을 나타내었는데, OCT-4의 발현율은 5.66배 ($P < 0.05$), CXCR4의 발현율은 17.69배 높게 발현되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 7).

고 찰

자궁내막증의 발생 가설로서 월경혈 역류설, 체강상피 화생설, 태생 잔존세포설, 림프혈관 전이설 등이 있으나, 아직까지 자궁내막증의 병인을 완전히 설명할 수 있는 가설은 없다. 최근 제시되고 있는 자궁내막증이 줄기세포 혹은 전구세포에 의해 발생한다는 가설은 세포 수준에서 앞에서 제시된 대표적인 자궁내막증 가설들과 신체 내에서 일어나는 여러 현상들을 모두 설명할 수 있어 매우 설득력이 높다.³ 월경혈 역류설은 기저층에 상주하고 있는 자궁 내막 줄기세포가 월경 기간 중 복강 내로 탈락 이식되어 자궁내막증이 발생한다고 설명할 수 있으며, 체강상피 화생설은 장막이나 복막에 존재하는 자궁내막 혹은 기타 부위 유래의 줄기세포가 어떤 자극인과 함께 상호작용하여 체강상피 화생을 일으킨다고 설명할 수 있으며, 태생 잔존 세포설은 물리관에 잔존해 있던 줄기세포가 어떠한 자극인에 의해 자궁내막증으로 유도된다고 설명할 수 있으며, 림프혈관 전이설은 자궁내막 줄기세포가 림프혈관을 통하여 원거리 전이로 발생한다고 설명할 수 있다.³ 이외에도 자궁내막증 환자의 비정상적인 사이토카인, 성장인자, 기질금속단백분해효소의 증가 현상은 줄기세포의 손상된 조직의 재생 과정에서 일어나는 현상과 유사한 면이 있으며, 부적절한 면역 기능은 줄기세포 고유의 면역회피 능력으로 설명할 수 있다.

이러한 줄기세포 가설을 뒷받침하는 근거로는 첫째, 자궁내막의 기저층과 기질의 혈관 주위에서 자궁내막의 줄기세포 혹은 전구세포가 다수 발견된다는 점,⁸ 둘째, 자궁내막의 줄기세포와 전구세포로부터 평활근, 뼈, 연골, 지방으로 분화할 수 있다는 점,¹⁴ 셋째, 생리혈에서 발견된 자궁내막 줄기세포가 3배엽의 9가지 조직으로 분화할 수 있다는 점,¹⁵ 넷째, 자궁내막증 환자의 정상부위 자궁내막, 이소성 자궁내막, 자궁근층에서 신경세포가 발견된다는 점,¹⁶ 다섯째, 심부층 자궁내막조직의 섬유근층 분화 과정은 이소성 자궁내막과 그 주변조직의 상호 반응의 결과라는 점,¹⁷ 여섯째, 자궁내막증 환자의 복강액 중 줄기세포인자의 농도가 증가되어 있으며 이소성 자궁내막조직에 수용체 지표인 c-kit가 발현된다는 점,¹⁸ 일곱째, 줄기세포의 활성도 검사, 즉 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 사이토크롬 p450 표현형 검사에서 자궁내막증과 자궁선근증 병변은 자궁내막 기저층과 유사한 주기적 패턴을 보인다는 점,⁹ 여덟째, microarray를 이용한 연구에서 자궁내막증 여성의 정상부위 및 이소성 자궁내막이 정상인과는 다른 유전자 변화를 나타낸다는 점,¹⁰ 아홉째, 복강 내 부착된 이소성 자궁내막조직에 줄기세포의 특성을 나타내는 미분화된 세포가 많다는 점¹⁹ 등이 있다.

줄기세포는 반복 분열하여 자가 재생능이 있으면서 더욱 분화된 세포를 생산할 수 있는 미분화된 세포로서 일반적으로 배아줄기세포와 성체줄기세포로 크게 나눈다. 배아줄기세포는 배반포 유래의 세포로서 3배엽으로 모두 분화할 수 있는 미분화세포를 말하며, 성체줄기세포는 발생이 끝난 이후에도 신체의 각 부분에 남아있는 미분화세포이다. 성체줄기세포의 대표적인 특징으로는 자가 재생능 (self-renewal), 비대칭 분열 (asymmetric cell division), 분화 유연성 (differentiation plasticity)이 있다.

자가 재생능은 줄기세포가 미분화성과 다중분화능을 가진 세포를 재생산해내는 것을 말하고, 비대칭 분열은 일부는 미분화 세포로 분열하고 나머지 일부는 분화된 세포로 분열이 일어나는 것을 말하며, 분화의 유연성은 본래 세포가 가지고 있던 분화의 프로그램과는 다른 종류의 세포로 분화하는 것을 말한다. 대표적인 성체줄기세포의 예로는 조혈모세포, 중간엽 줄기세포, 신경줄기세포, 제대혈 줄기세포, 각종 조직 특유의 줄기세포 (tissue committed stem cell) 등이 있으며 자궁에서도 줄기세포가 발견되었다.⁸ 최근 기존의 알려진 줄기세포 이외에도 낭배 (gastrula)의 외피 (epiblast) 유래의 만능줄기세포로 추정되는 극소배아양줄기세포가 존재한다고 보고되고 있는데, 이 세포는 조혈모세포, 중간엽줄기세포, 신경줄기세포, 혈관내피줄기세포, 조직 특유의 줄기세포로 분화할 수 있으며, 쥐의 모든 장기, 인간의 제대혈, 골수 및 말초혈액에서 발견되었다.^{12,20-22}

줄기세포 여부를 확인하는 방법으로는 *in vitro* 평가방법과 *in vivo* 평가방법이 있다. *in vitro* 평가방법에는 군집형성능 (clonogenicity), 증식능, 자가 재생능, 분화능을 조사하는 방법이 있고, *in vivo* 평가방법에는 조직재구성법, label-retaining cell (LRC), 자가 재생능 평가방법을 사용하기도 한다. 이러한 줄기세포를 신체에서 손쉽게 찾아낼 수 있는 방법을 연구 중에 있으나 아직까지는 한계가 있으며, 최종적으로 줄기세포 여부를 확인하기 위해서는 여러 평가방법을 사용해야 한다.^{3,8}

본 연구에서는 줄기세포 여부를 확인하기 위하여 *in vitro* 평가방법을 이용하여 배양시 줄기세포의 특징적인 현상들이 나타나는지 관찰하였고, 보조적으로 줄기세포의 미분화표지자 발현양에 차이가 있는지 조사하였다. 자궁내막증 환자의 월경혈에서 채취한 자궁내막세포들 중에는 매우 이질적인 모양의 부착된 기질세포들이 다수 발견되며, 이후 지속적으로 배양해 보면 점진적으로 섬유아세포와 유사한 세포들로 배양 접시를 채워 나가는 것을 볼 수 있는데, 이러한 현상들은 중간엽 줄기세포가 포함된 조직 배양시에 나타나는 특징들이다. 특히 자궁내막증 환자의 세포들 중에는 적혈구보다 작은 극소원형세포들이 다수 발견되었는데, 이 세포들은 여러 문헌에서 보고하고 있는 극소배

아양 줄기세포의 형태학적 특징 및 움직임들과 매우 유사하다. Kucia 등은 생쥐의 모든 조직과 인간의 골수에서 유세포 분석기 (flow cytometry)를 이용하여 극소배아양 줄기세포를 동정하였는데, OCT-4, SSEA-4, CXCR4 등을 발현하는 6-8 μ m 세포라고 보고하였다.^{12,20-22} 이 외에도 Virant-Klun 등은 인간의 난소 표면 상피에서 SSEA-4, OCT-4, Nanog, SOX-2, c-kit를 발현하는 2-4 m 줄기세포가 존재한다고 보고하였으며,²³ McGuckin 등은 인간의 제대혈에서 OCT-4, SOX-2를 발현하는 2-3 μ m 줄기세포가 존재한다고 보고하였으며,²⁴ Hung 등은 3 μ m보다 더욱 작은 줄기세포가 인간의 골수에 존재한다고 보고하였다.²⁵ 저자들이 관찰한 이 세포들이 줄기세포인지를 다시 확인하기 위하여 추가적으로 Percoll density gradient method를 이용하여 분리 및 배양하였더니 자가 재생, 세포 융합 및 구형 세포 형성, 비대칭 분열, 군집 형성, 배아 체양 형성, 핵의 재조합과 같은 줄기세포의 전형적인 특징들이 모두 나타났다.

저자들은 이러한 세포배양 관찰을 토대로 자궁내막증 군과 대조군 간에 추정줄기세포의 양적인 차이가 있는지를 확인하기 위하여 OCT-4와 CXCR4 발현율을 real time RT-PCR 방법으로 조사하였으며, 자궁내막증에서 정상인과 비교시 OCT-4는 5.66배 그리고 CXCR4는 17.69배 높게 발현되었다 ($P<0.05$). 이러한 결과들을 보았을 때 자궁내막증 환자는 월경기 동안에 많은 자궁내막 추정줄기세포들이 탈락되는 것을 간접적으로 알 수 있다.

한편 극소원형세포들이 OCT-4와 CXCR4 발현과 직접적인 상관관계가 있는지를 추가적으로 확인할 필요성이 있어, 현재 저자들은 극소원형세포가 직접적으로 OCT-4와 CXCR4를 발현시키는 것인지 혹은 극소원형세포에서 유래한 세포가 OCT-4와 CXCR4를 발현시키는 것인지를 연구 중에 있다. 또한 본 연구는 연구 대상자가 적어 향후 더 많은 모집단을 대상으로 한 연구가 필요할 것이며, 추가적으로 이 추정줄기세포들이 월경기에 자궁으로 유입된 것인지, 월경 이전 분비기에 자궁으로 유입된 것인지, 또는 만성적으로 자궁에 다량 잠복되어 있는 것인지에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30: 1-19, vii.
3. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 106-15.
4. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69.
5. Gruenewald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of coelomic walls. *Am J Obstet Gynecol* 1942; 44: 470-4.
6. Von Recklinghausen F. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the Wolffian body. *Wien Klin Wochenschr* 1896; 8: 530.
7. Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 1927; 3: 109.
8. Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update* 2007; 13: 87-101.
9. Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, Mall G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod.* 2002; 17: 2725-36.
10. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Wang Y, Halverson G, Jailwala P, et al. Genomic alterations in ectopic and eutopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62: 148-59.
11. Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 299-305.
12. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006; 20: 1915-24.
13. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008; 267: 226-44.
14. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80: 1136-45.
15. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5: 57.
16. Medina MG, Lebovic DI. Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88: 968-75.
17. Van Kaam KJ, Schouten JP, Nap AW, Dunselman GA, Groothuis PG. Fibromuscular differentiation in deeply infiltrating endometriosis is a reaction of resident fibroblasts to the presence of ectopic endometrium. *Hum Reprod.* 2008; 23: 2692-700.
18. Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Igarashi T, Okagaki R, Takai Y, et al. Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 231-5.
19. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. [Endometriosis -- a stem cell disease?] *Zentralbl Gynakol* 2003; 125 (7-8): 235-8.
20. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4 (+) SSEA-1 (+) Oct-4 (+) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857-69.
21. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Exp Hematol* 2008; 36: 742-51.
22. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. "Small stem cells" in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry A* 2009; 75: 4-13.
23. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjetanin B, Vrtacnik-Bokal E, Novakovic S, Rijlic T, et al. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 137-50.
24. McGuckin C, Jurga M, Ali H, Strbad M, Forraz N. Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat Protoc* 2008; 3: 1046-55.
25. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20: 249-58.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

= 국문초록 =

목적: 최근 줄기세포가 자궁내막증의 병인에 관련될 것이라는 가설이 제시되었다. 이 연구의 목적은 자궁내막증 여성과 대조군 여성의 월경혈에서 채취한 자궁내막세포를 배양하여 줄기세포의 특성을 나타내는지 확인하고, 두 군 간에 줄기세포의 미분화표지자인 OCT-4와 CXCR4의 발현율에 차이가 있는지 알아보고자 한다.

연구 방법: 진행성 자궁내막증 여성 6명과 자궁내막증, 자궁선근증, 자궁근종이 없는 여성 10명을 대상으로 하였다. 자궁내막세포는 월경주기 2~4일 째에 월경혈에서 채취하여 약 2주 정도 배양하였으며, 이후 추정줄기세포를 Percoll density gradient method 방법으로 분리 및 배양하면서 세포의 특징을 관찰하였다. OCT-4와 CXCR4 발현율 차이는 real time RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

결과: 자궁내막증 환자의 자궁내막세포들은 대조군에 비하여 형태학적으로 다른 특징을 나타내었는데, 이질적인 지지세포들과 3 μ m 미만의 극소원형세포들과 약 5~15 μ m의 과다염색질 원형세포들이 더욱 흔히 관찰되었다. 이후 3 μ m 미만의 극소원형세포들만 다시 분리하여 배양한 결과, 자가 재생, 비대칭 분열, 군집 형성, 배아체 형성과 같은 줄기세포의 여러 특징들을 나타내었다. 3 μ m 미만 극소원형세포들은 극소배아양 줄기세포와 유사한 특성을 나타내었는데, 적혈구보다 작은 세포가 움직이거나, 지지세포로 이동 혹은 부착하기도 하고, 세포 응집을 통해 구형세포를 형성하거나, 세포 융합을 통해 새로운 분화된 세포를 형성하기도 하였다. real time RT-PCR을 이용한 OCT-4와 CXCR4 검사에서는 자궁내막증 환자가 대조군에 비하여 각각 5.66배, 17.69배 높게 발현하였다 ($P<0.05$).

결론: 자궁내막증 환자의 자궁내막세포에서 줄기세포의 특성을 나타내는 3 μ m 미만의 극소원형세포와 약 5~15 μ m의 과다염색질 원형세포들이 더욱 흔히 존재하였으며, 자궁내막증 환자 군의 OCT-4와 CXCR4의 발현율은 통계학적으로 유의하게 높았다. 이는 줄기세포가 자궁내막증의 병인에 있어 주된 역할을 할 수도 있다는 것을 암시하며, 향후 OCT-4와 CXCR4가 자궁내막증의 진단 또는 경과관찰에 유용한 도구로 사용될 수도 있을 것으로 사료된다.

중심단어: 자궁내막증, 줄기세포, OCT-4, CXCR4
