대한산부회지 제47권 제6호 2004
*Vol. 47 No. 6 June 2004*

# Selective Estrogen Receptor Modulator에 의한 자궁근종의 증식 억제

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, *계명대학교 의과대학 생리학교실
이민용 · 조치흠 · 권상훈 · 송대규* · 정선욱 · 강형옥 · 윤성도 · 차순도

=ABSTRACT=

## Growth Inhibition of Human Uterine Leiomyoma Cells by Selective Estrogen Receptor Modulator

Min Yong Lee, M.D., Chi Heum Cho, M.D., Sang Hoon Kwon, M.D., Dae-Kyu Song, M.D.*, Sun Wok Chung, M.D., Hyoung Ok Kang, M.D., Sung Do Yoon, M.D., Soon Do Cha, M.D.
*Department of Obstetrics and Gynecology, *Department of Physiology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea*

**Objective :** Our purpose was to evaluate potential efficacy of selective estrogen receptor modulators (raloxifene and tamoxifen) to human uterine leiomyoma cells.

**Methods :** The samples were collected from ten hysterectomized specimen. we evaluated the estrogen-responsive growth of human uterine leiomyoma and normal myometrial cells. The potential efficacy of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs: raloxifene and tamoxifen) to human uterine leiomyoma cells were conducted by MTS, cell count assay and Western-blot.

**Results :** Human uterine leiomyoma and normal myometrial cells that expressed estrogen receptor (ER) showed increases the cell number in the presence of estrogen compared with ER negative uterine leiomyoma cells. Raloxifene and tamoxifen inhibited estrogen-stimulated proliferation of ER-containing human uterine leiomyoma and normal myometrial cells. Raloxifene was more effective in inhibiting estrogen-induced increases of cell number compared with tamoxifen.

**Conclusion :** The effect of SERMs on leiomyoma was inhibited the cell proliferation without apoptosis or cell cycle arrest. These data suggest that SERM should be examined as candidate of nonsurgical therapeutic agents for uterine leiomyoma.

*Key Words* : Uterine myoma, SERM

자궁근종은 일반적으로 가임 여성의 20-25%에서 발생하며, 40대 이후에는 빈도가 증가하여 증상이 나타나지 않은 경우까지 포함하면 40-50%에서 생기는 가장 흔한 자궁 종양이다.[1] 모든 여성이 근종으로 인해 증상을 가지는 것은 아니지만, 개개인마다 다양한 증상을 초래하여 자궁적출술을 시행하는 가장 흔한 적응증 중의 하나이다.[2] 그러나 임신을 원하는 여성에서는 자궁의 보존이 무엇보다도 중요함으로[3] 자궁근종을 가진 많은 환자들이 단순히 수술로 제거하기보다는 약물 치료나 보존적 치료를 원하고 있다. 따라서 자궁근종의 원인을 밝히고 이 원인을 근본적으로 치유하여 모든 여성에서 전자궁적출술을 통한 수술적 치료보다는 약제 개발을 통한 비수술적 치료의 접근이 이루어진다면 자궁근종으로 고생하는 여성에게 신체적, 정신적 고통을 덜어주는 좋은 치료법의 길잡이가 될 것이다.

지금까지 사용하는 약물 치료로서 여성호르몬 생성을

접수일 : 2003. 12. 4.
주관책임자 : 조치흠

* 본 연구는 한국과학재단 MRC연구센타 (R13-2002-028-01003-0) 지원으로 수행되었음.
* This work was supported by grant No. (R13-2002-028-01003-0) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation

일시적으로 감소시키는 생식선자극호르몬 분비호르몬투여가 시행되고 있으나, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다.[4]

Selective estrogen receptor Modulator (SERM)이 에스트로겐 수용체에 작용하여 자궁근종 증식 억제효과가 있을 것이라 추측되며, 동물 모델에서 효과를 보고한 적은 있지만,[5] 사람 자궁근종에서의 영향은 보고된 바 없다. SERM은 에스트로겐 수용체와 결합하여, 조직마다 다르게 작용하여 길항이나 대항의 역할을 수행한다.[6] 이러한 SERM 중의 하나인 raloxifene은 여성호르몬 수용체와 강한 친화력을 가지고, 조직에 따라 길항제와 대항제로 작용한다. 즉 뼈와 지질에는 에스트로겐 길항제로 작용하고, 유방과 자궁에는 대항제로 작용한다. Tamoxifen은 또 다른 SERM으로 길항제와 대항제의 양면성을 자궁 내막에서 보인다. 따라서 저자들은 SERM인 tamoxifen과 raloxifene을 사람 자궁근종 세포에 투여하여 세포증식 억제효과를 알아보고자 이 연구를 계획하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

계명대학교 동산의료원 산부인과학교실에서 자궁근종으로 수술 받은 10예의 환자를 대상으로 하였다. 모든 예는 병리조직학적으로 자궁근종으로 확진을 받았으며, 환자의 평균 연령은 41세로 모두 폐경전 여성이었으며, 자궁내막주기는 증식기가 5예, 분비기가 5예 이었다. 수술시 신선한 자궁근종과 자궁 근 조직을 채취하여 실험시까지 -78℃에서 냉동 보관하였으며, 조직의 채취는 환자의 동의와 윤리 위원회를 통과한 지침서에 준해서 시행하였다. 이외에 1차 조직배양을 위해 수술시 신선한 조직을 얻어 자궁근종과 정상 자궁근 세포를 배양하였고, 동물 모델에서 얻은 ELT-3 세포주도 실험 재료로 사용하였다.

### 2. RT-PCR

cDNA합성은 분리된 RNA 2 $\mu$g을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40 $\mu$L 용량으로 역전사 (reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 $\mu$g, 5 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1 mmol/L dATP, 1 mmol/L dTTP, 1 mmol/L dCTP, 1 mmol/L dGTP, 1 U/uL RNase inhibitor (Perkin-Elmer Co., USA), 2.5 U/uL MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co., USA), 2.5 $\mu$mol/L oligo $d(T)_{16}$로, 반응 조건은 42℃ 1시간, 99℃ 5분, 5℃ 5분으로 하였다. PCR은 10 X reaction buffer (15 mmol/L $MgCl_2$, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl) 5 $\mu$L와 10 mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 $\mu$L씩, 그리고 30 $\mu$mol/L 난포호르몬 수용체 (sense; TCCTTCTAGACCCTTCAGTGAAGCC, antisense; ACATGTCAAAGATCTCCACCATGCC)와 황체호르몬 수용체 (sense; CCATGTGGCAGATCCCACAGGAGTT, antisense; TGGAAATTCAACACTCAGTGCCCGG) 시발체를 각각 1 $\mu$L를 넣은 혼합물에 1 $\mu$L의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin-Elmer Co. USA)를 넣은 후 증류수로 50 $\mu$L로 용량을 맞추고 30 $\mu$L의 mineral oil을 중층 한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 $\mu$L를 1% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

### 3. 일차 세포 배양

정상 자궁 평활근 조직과 자궁근종 조직을 수술 후 얻어 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15 mL 튜브에 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층 액은 제거하였다. 절단한 조직에 HEPES (25 mmol/L), penicillin (200 U/mL), streptomycin (200 $\mu$g/mL), collagenase type Ⅳ (1.5 mg/mL), DNase (0.2 mg/mL)를 HBSS에 넣고 37℃ 수조에서 3-4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일 세포로 분리한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 Phospate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하고, 24-48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 양상에 따라 근육 세포인지를 확인하였다.

### 4. Western Blot Analysis

SERM의 투여후 자궁근종과 정상 자궁 근조직에서의 세포 주기회로 유전자의 발현을 비교하고, 세포자멸사에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.4), 5 mmol/L EDTA (pH 8.0), 130 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 mol/L phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계 (Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper

TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 흔들었다. Blocking용액을 제거하고 일차항체 (Santa Cruze (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동을 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액 (5% skim dry milk in

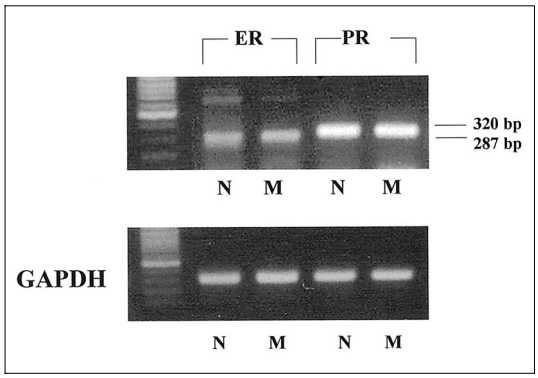


Fig. 1. RT-PCR amplification of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in uterine leiomyoma (M) and normal myometrial cells (N).

Biotecnology Inc., USA)인 cyclin G1을 1:1,000으로 희석한 blocking 용액 (실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1 X TBS-T 용액 (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (santa Cruze Biotecnology Inc., USA)를 1;1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1 X TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

### 5. MTS (Tritiated Yhtmidine Incorporation) 분석

정상 자궁 근과 자궁근종 세포를 96 well plate에 multi pipet을 사용하여 $4\times10^3$로 분주하였다. 배양기에 24시간 배양 후 SERM을 처리 한 후 MTS 측정시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37℃에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 $\mu$L multi pipet을 이용하

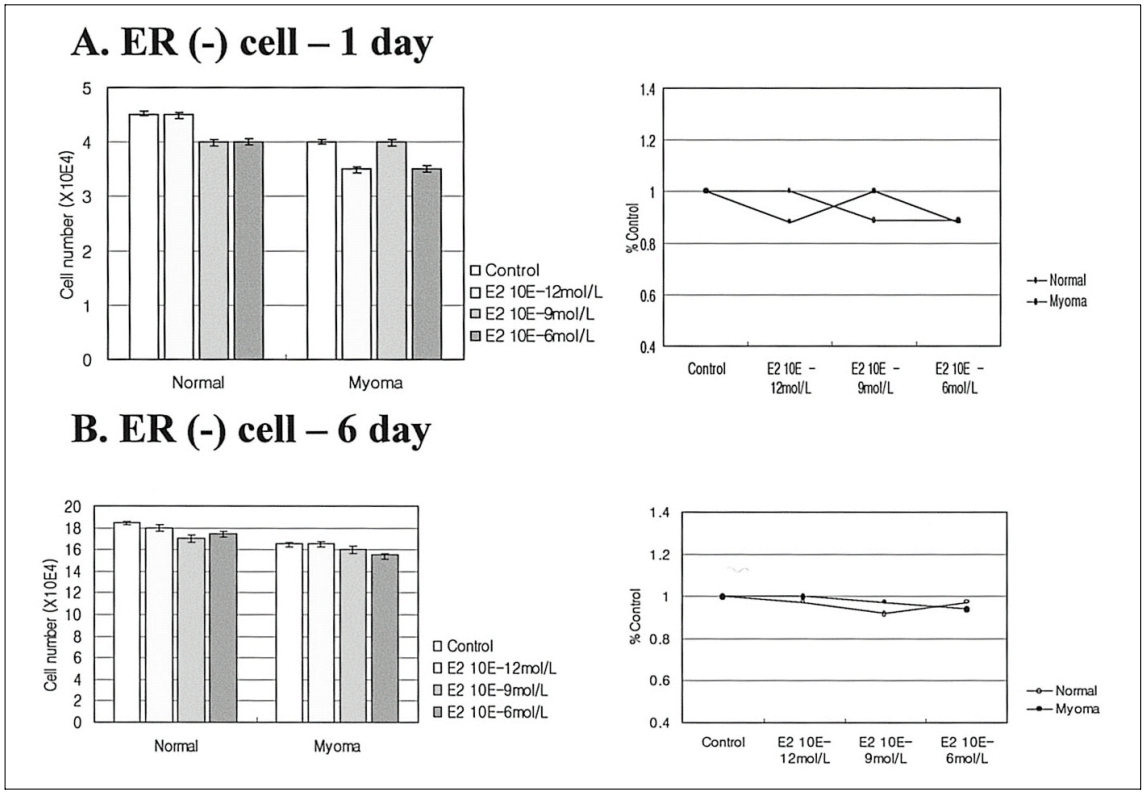


Fig. 2. Estrogen stimulated growth of estrogen and progesterone receptor negative cells on uterine leiomyoma and normal myometrial cells. A: one-day estrogen treatment, B: six-days estrogen treatment.

여 pipeting하여 cell이 suspension된 후 well 당 100 $\mu$L 되도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 $\mu$L 넣고 37℃, 5% $CO_2$ incubator에 배양한 후 1-4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. 생존 세포수 산정

자궁근종 세포를 60 mm tissue culture dish에 $2\times10^5$ cell/dish로 세포를 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 SERM인 raloxifene (Sigma, USA), tamoxifen (Sigma, USA)를 농도별 시간별로 투여하였다. 24-48시간 배양시킨 세포를 PBS 수세후, 1×trypsin-EDTA로 resuspension 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 수세하여 resuspension 시킨 후, cell suspension 20 $\mu$L와 동량의 trypan blue solution을 혼합하여 1분간 두었다. Hemocytometer 상에서 살아있는 세포만 계산하였다 (3회 반복 실시).

### 7. FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)에 의한 세포주기 분석

ELT-3 세포를 60 mm tissue culture dish에 $3\times10^5$ cells/dish로 세포를 분주하였다. 배양기에 24시간 배양 후 SERM을 용량별로 투여하였다. 24-48시간 배양시킨 세포를 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유 시킨 뒤, 1.5 mL tube에 옮겼다. 1000 rpm 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 mL넣고 재부유 시킨 후, 4℃에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심 분리한 후 상층액 제거하고 PBS 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/mL, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색하였다. 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

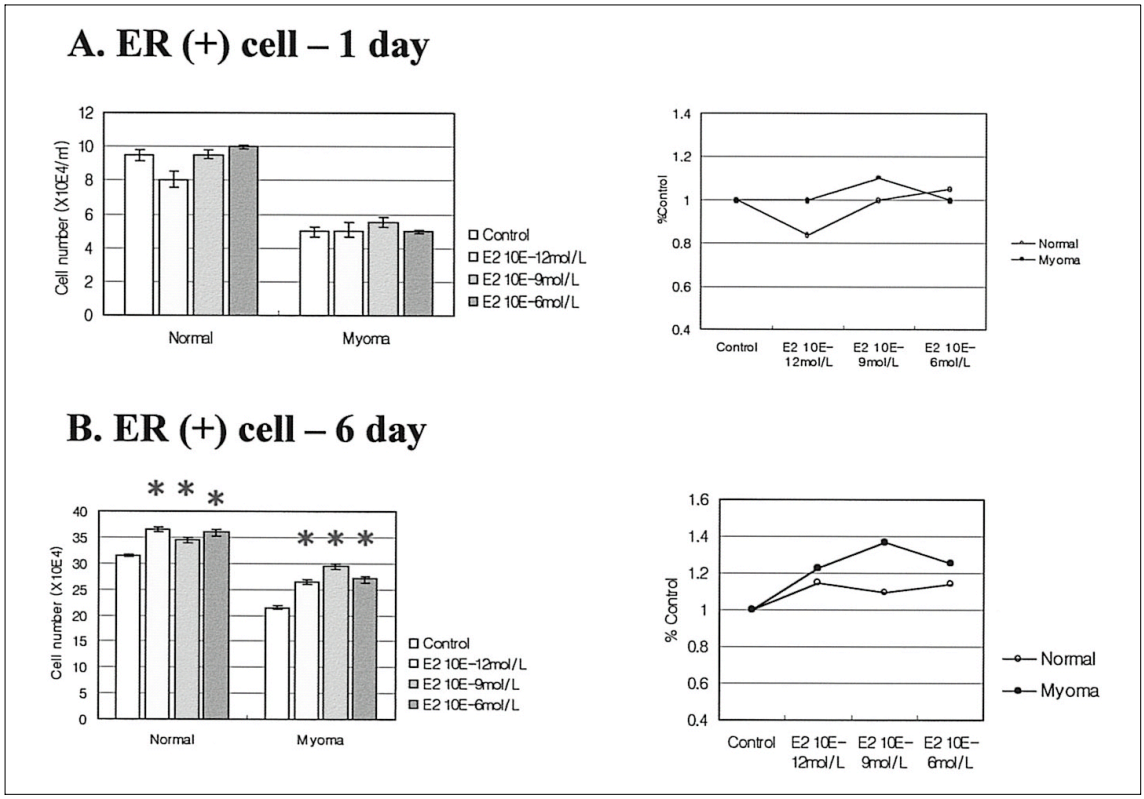


Fig. 3. Estrogen stimulated growth of estrogen and progesterone receptor positive cells on uterine leiomyoma and normal myometrial cells. A: one-day estrogen treatment, B: six-days estrogen treatment. Data are mean±SEM values of three separate experiments. *p<0.05

8. 통계분석

통계학적 분석은 student-t test를 이용하였고, $p<0.05$를 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

## 결 과

일차 배양된 자궁근종과 정상 자궁근 세포에서 에스트로겐과 황체호르몬 수용체의 발현을 확인하고 수용체 양성군과 음성군으로 구별하였다 (Fig. 1). 에스트로겐 수용체 음성군에서는 에스트로겐을 $10^{-12}$에서 $10^{-6}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하였으나 세포의 증식은 자궁근종 세포나 정상에서는 보이지 않았다 (Fig. 2). 반대로 에스트로겐 수용체양성군에서는 에스트로겐을 용량의 증가와 투여 일수를 증가하여 Fig. 3B에서와 같이 통계학적으로 의미 있게 세포의 증식이 용량에 비례하여 증가하는 것을 보여주었다 (Fig. 3). 자궁근종과 정상 자궁근 세포에 에스트로겐을 $10^{-6}$ mol/L을 6일간 투여 후 raloxifene을 $10^{-11}$에서 $10^{-7}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하여, 에스트로겐 수용체 음성군에서는 세포 증식의 억제가 없었으나 (Fig. 4A), 양성군에서는 증식의 억제가 정상 자궁근에서는 raloxifene $10^{-11}$ mol/L부터, 자궁근종 세포에서는 $10^{-10}$ mol/L에서 통계학적으로 의미 있는 억제를 관찰하였다 (Fig. 4B). 같은 조건으로 tamoxifen을 $10^{-11}$에서 $10^{-7}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하여, 에스트로겐 수용체 음성군에서는 변화가 없었고 (Fig. 5A), 수용체 양성군에서는 증식의 억제가 관찰되었으나 통계학적인 의의가 없었다 (Fig. 5B). 설치류의 자궁근종 세포주인 ELT-3 세포주는 에스트로겐 수용체가 있는 것으로 확인된 세포주이며, 세포주 배양시 에스트로겐 투여를 지속적으로 하였다. 이러한 ELT-3 세포주에 tamoxifen, raloxifene을 투여하여 효과를 비교하여, 두 약제에 모두 세포 증식 억제의 효과가 있음을 통계학적으로 확인하였다 (Fig. 6).

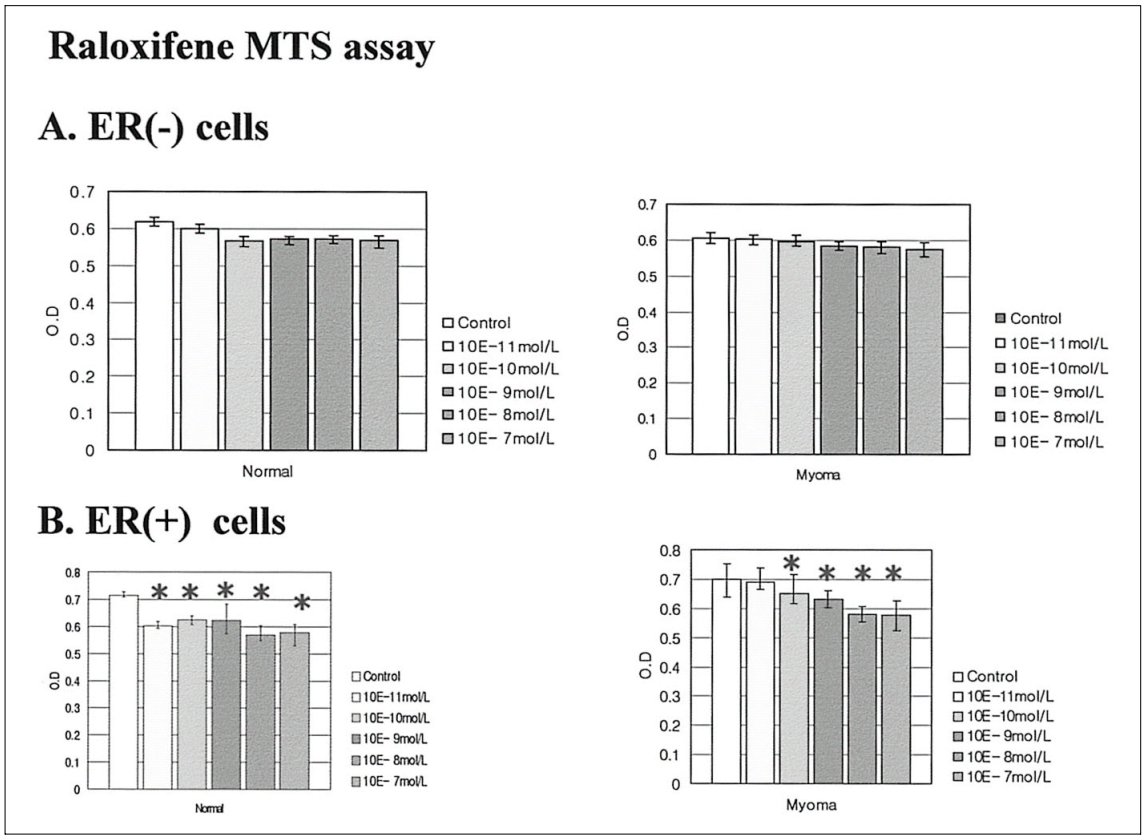


Fig. 4. Inhibition of uterine leiomyoma and normal myometrial cells growth by raloxifene. A: Estrogen receptor (ER) negative cells, B: ER positive cells. Data are mean±SEM values of three separate experiments. * $p<0.05$

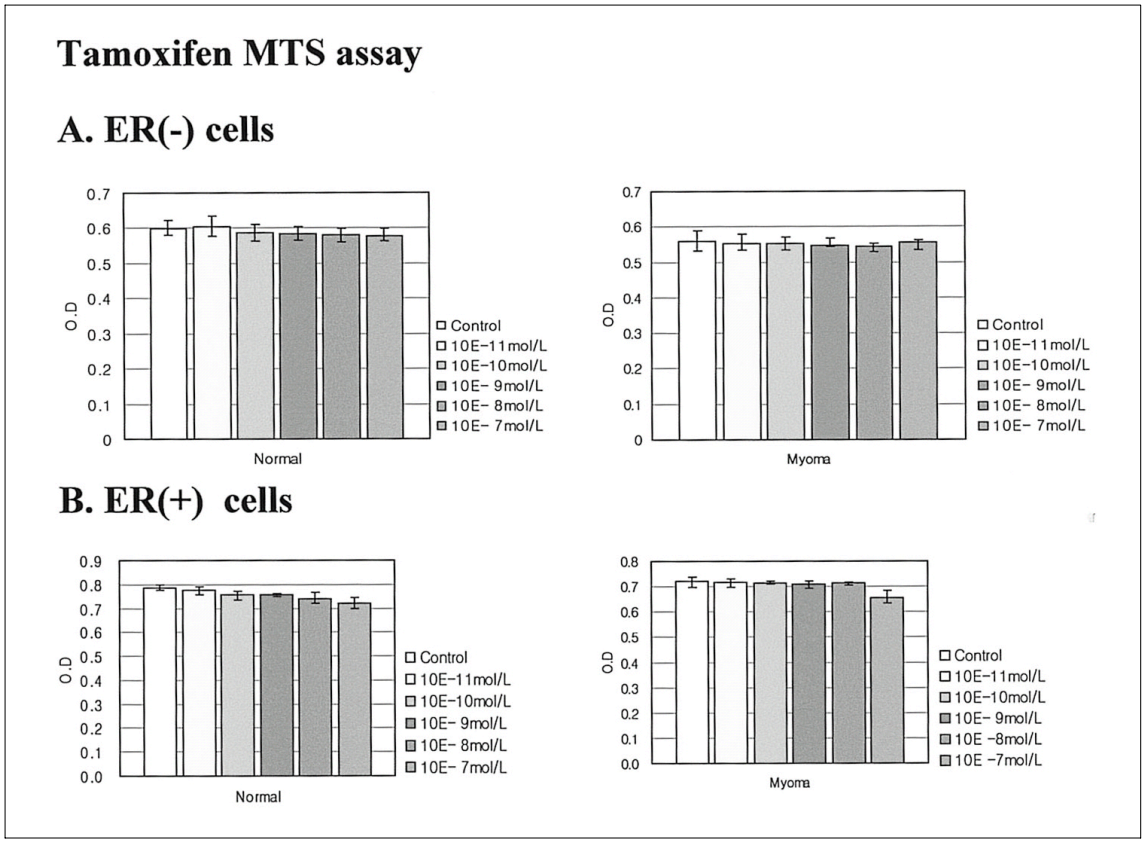


Fig. 5. Inhibition of uterine leiomyoma and normal myometrial cells growth by tamoxifen. A: Estrogen receptor (ER) negative cells, B: Estrogen receptor (ER) positive cells.

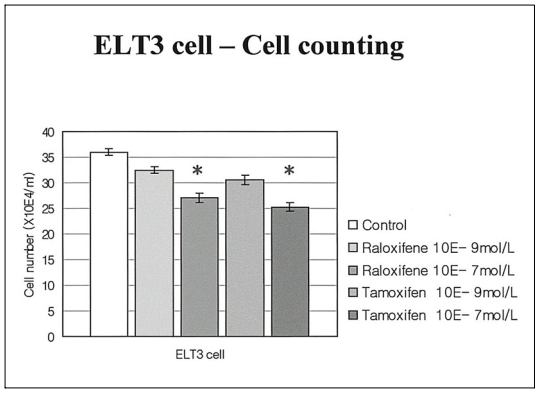


Fig. 6. Inhibition of ELT-3 growth by raloxifene and tamoxifen. Data are mean±SEM values of three separate experiments. * $p<0.05$

세포 증식 억제 효과와 세포 주기 회로와의 상관관계를 보기 위해 일차 배양 세포를 대상으로 FACS를 시행하였으나, 일차 배양 세포의 한계로 실패하여 ELT-3 세포주로 시행하였다. FACS를 이용한 세포 주기회로 분석에서 어느 특정한 주기도 증가하는 것을 관찰할 수 없었다 (Fig. 7). 세포 증식의 억제가 세포자멸사와 관계가 있는지를 보았으나, 세포자멸사와 관계하는 caspase 3나 PARP에 대해서는 변화가 없었다 (Fig. 8). 세포 주기 회로에 관계하는 cdk2, cdk4, cyclin A와 cyclin E를 Western-blot하여 발현을 보았으나, 약제 투여 전이나 후에서 발현의 차이가 없음을 확인하였다 (Fig. 9).

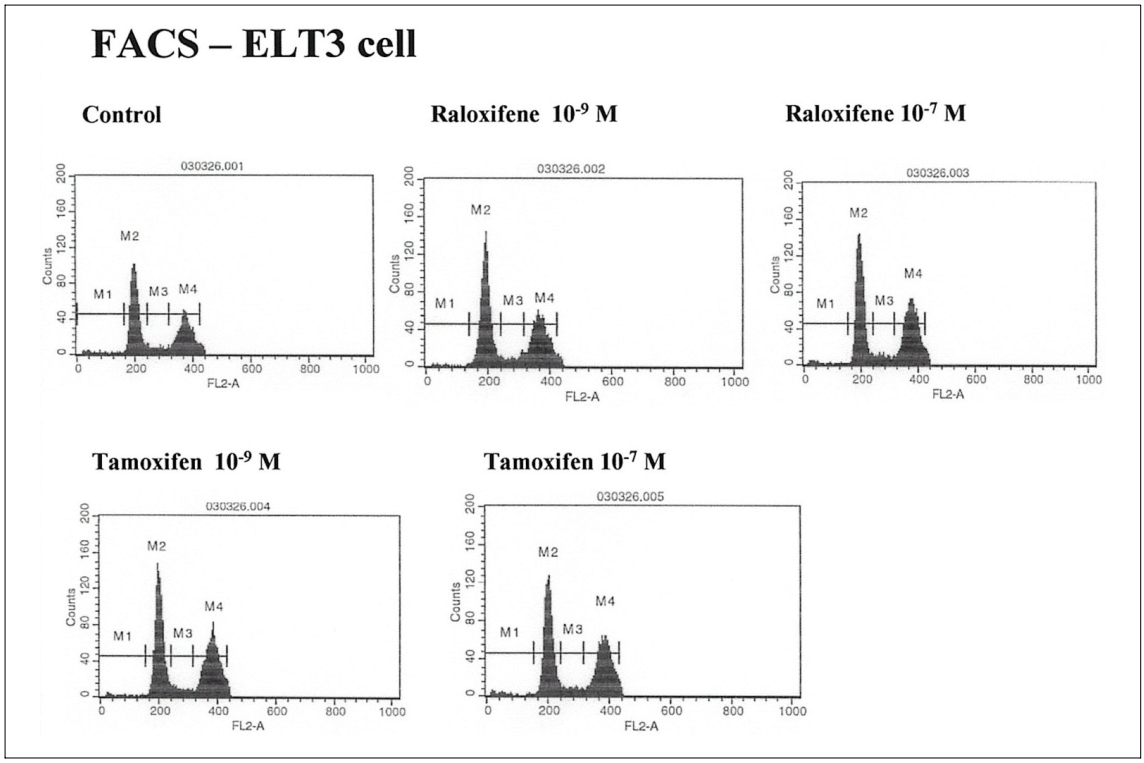


Fig. 7. Effects of raloxifene and tamoxifen on cell cycle profile by FACS.

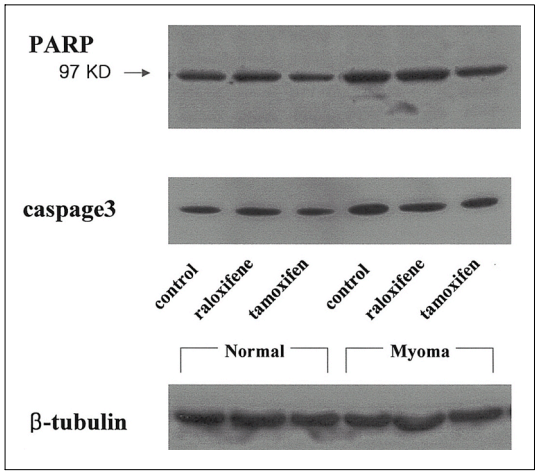


Fig. 8. Effects of treatment with raloxifene and tamoxifen on caspase 3 and PARP protein expression levels in uterine leiomyoma and normal myometrial cells.

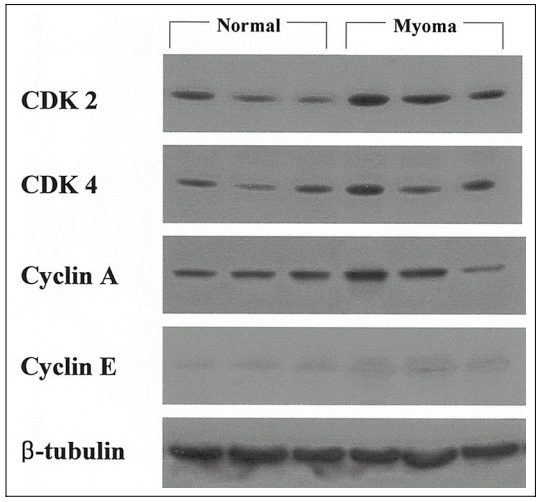


Fig. 9. Effects of treatment with raloxifene and tamoxifen on cdk 2, cdk 4, cyclin A, and cyclin E protein expression levels in uterine leiomyoma and normal myometrial cells.

## 고 찰

자궁근종은 일반적으로 에스트로겐에 반응하여 성장하는 양성 종양이다. 이러한 근거는 자궁근종이 에스트로겐을 투여하거나 임신 시에는 커지는 경향이 있으며,[7] 반대로 폐경기나 생식샘자극호르몬 분비호르몬투여로 인해 저에스트로겐 상태로 되면 작아지는 것으로 설명한다.[4] 그러나 자궁근종의 성장에 에스트로겐이 중요하지만, 항에스트로겐인 clomiphene citrate의 투여 후에 자궁근종의 성장을 보고하였고,[8] 배란 유도를 위해 사용하는 생식샘자극호르몬 투여로 인해 혈중 에스트로겐이 증가하지만 근종의 크기는 변화하지 않는다는 보고도 있다.[9] 그러나 자궁근종에서 에스트로겐 수용체가 정상 자궁 근보다 의미 있게 많이 존재한다는 사실은 에스트로겐과의 밀접한 관계를 설명하는 것이다.[10] 이외에 황체호르몬 수용체는 자궁근종에서 훨씬 많이 존재하고 있어,[11] 황체호르몬 수용체도 자궁근종의 성장에 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다. 그 증거로는 생식샘자극호르몬 분비호르몬투여 환자에서 황체호르몬의 투여로 성장이 촉진된다는 사실과,[11] 반대로 항황체호르몬 투여로 근종의 크기가 감소된다는 보고가 있다.[13]

Tamoxifen의 성분은 triphenylethylene이며, Raloxifene은 benzothiophene이다. 이러한 약제는 폐경 후 여성에서는 골 소실 방지와 심혈관계에서도 방어의 역할을 수행하고, 유방에서는 대항제로 역할을 수행한다.[14-16] Tamoxifen은 유방암 환자 수술 후 보조치료제로서 사용하고 있는 약제로 가끔은 자궁 내막의 증식과 자궁내막암의 위험성을 증가시킨다.[17] Raloxifene은 이와는 다르게 자궁 내막에는 영향이 없는 것으로 알려져 있다.[18] 최근의 연구에서 폐경기 여성에서 자궁근종이 있는 경우에 raloxifene을 6개월에서 1년간 투여하여 근종의 크기가 유의하게 감소하였다고 발표하였다.[19] 그러나 이것은 폐경기 후에 자연히 크기가 감소하는 것을 배제하지 못한 임상적 연구이었다. 일반적으로 SERMs는 골격근 강화와 골소실을 방지하는 에스트로겐의 효과가 있고, 심혈관계에는 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있다.[20] 현재까지는 tamoxifen이 유방암 수술 후에 많이 사용되는 약제이지만, 최근에는 raloxifene을 폐경전 여성에서 사용하여 유방암의 유병율을 낮추었다고 한다.[21] 이러한 SERMs의 조직에 따른 작용의 차이로 인해 향후에는 자궁근종의 치료에 사용될 가능성이 높다 하겠다.

이번 연구에서는 먼저 자궁근종과 정상 자궁 근에서 에스트로겐과 황체호르몬 수용체 양성군과 음성군으로 구별하였다. 일반적으로 에스트로겐 수용체가 있으면, 황체호르몬 수용체도 가지고 있었다. 두 종류의 세포를 자궁근종과 정상 자궁 근으로 나누어 일차 세포 배양을 하여 에스트로겐 투여로 증식 효과를 보았는데, 에스트로겐 수용체 양성군에서는 음성군에 비해서 세포 증식의 효과가 있었지만, 에스트로겐이 증식에 미치는 영향이 아주 높은 것은 아니었다. 이것으로 볼 때 에스트로겐이 자궁근종의 성장에 영향을 절대적으로 미치지는 않는다는 Lev-Toaff 등[8]과 같은 소견이었다. 에스트로겐 수용체가 있는 자궁근종과 정상 자궁근 세포에 에스트로겐을 6일간 전처치 후, raloxifene을 투여하여 세포의 수를 10-15% 정도 감소시키는 세포 증식의 억제 효과를 확인하였다. 그러나 수용체 음성군은 증식 억제가 미미하였다. 같은 방법으로 tamoxifen을 투여하였을 때 수용체 양성군은 세포 증식 억제가 5% 정도에서 용량과 비례하여 보였고, 수용체가 없는 경우에는 증식 억제 작용을 보이지 않았다. 이 결과로 tamoxifen에 비해 raloxifene이 자궁근종 세포의 증식 억제 작용이 우수하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 것은 tamoxifen은 자궁내막에 길항작용을 한다는 근거와 비슷하게 자궁근종 세포에서도 대항 작용이 적다는 것을 나타내었다. ELT-3 세포주에서의 두 약제간의 차이를 비교하여서는 두 약제 모두에서 억제작용이 관찰되었고, 억제 양상도 비슷한 양상이어서 Fuchs-Young[22]의 결과와 일치하였다. 억제 작용이 세포주기회로 조절에 미치는 영향을 보았으나, 세포 주기에 미치는 영향은 발견되지 않았다. 또한 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현에도 차이가 없었다. 이외에 세포자멸사에 관계하는 유전자인 caspase3나 PARP의 발현에도 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 SERM의 자궁근종 세포의 증식억제는 세포자멸사나 세포주기회로에 영향을 미치지는 않고, 단순히 세포증식의 억제만 있음을 알았다.

이상의 결과로 보아 SERM는 자궁근종의 세포 증식을 억제하는 역할을 하며, raloxifene의 억제작용이 tamoxifen보다 우수하여 이 약제가 가임기 여성의 자궁근종치료에 가능성을 보여주었다고 생각한다.

- 참고문헌 -


1. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. Am J Clin Pathol 1990; 94: 435-8.
2. Carlson KJ, Nichols DH, Schiff I. Indications for hysterectomy. N Engl J Med 1993; 328: 856-60.
3. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata. etiology, symptomatology, and management. Fertil Steril 1981; 36: 433-45.
4. West CP, Lumsden MA, Lawson S, Williamson J, Baird DT. Shirinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin(Zoradex): a lutenizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. Fertil Steril 1987; 48: 45-51.
5. Walker CL, Burroughs KD, Davis B, Sowell K, Everitt JI, Fuchs-Young R. Preclinical evidence for therapeutic efficacy of selective estrogen receptor modulators for uterine leiomyoma. J Soc Gynecol Investig 2000; 7: 249-56.
6. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, et al. Raloxifene(LY139481 HCI) prevents bone loss and reduces serum

cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. J Clin Invest 1994; 93: 63-9.
7. Stewart EA, Friedman AJ. Steroidal Treatment of Myomas: Preoperative and Long-term Medical Therapy. New York, Thieme, 1992.
8. Felmingham JE, Corcoran R. Rapid enlargement of a uterine fibroid after clomiphene therapy. Br J Obstet Gynaecol. 1975; 82: 431-2.
9. Lev-Toaff AS, Coleman BG, Arger PH, Mintz MC, Arenson RL, Toaff ME. Leiomyomas in pregnancy: sonographic study. Radiology 1987; 164: 375-80.
10. Soules MR, McCarty Jr. KS. Leiomyomas: steroid receptor content. Variation within normal menstrual cycles. Am J Obstet Gynecol 1982; 143: 6-11.
11. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, et al. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 78-85.
12. Carr BR, Marshburn PB, Weatherall PT, Bradshaw KD, Breslau NA, Byrd W, et al. An evaluation of the effect of gonadotropin-releasing hormone analogs and medroxyprogesterone acetate on uterine leiomyomata volume by magnetic resonance imaging: a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled, crossover trial. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 1217-23.
13. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, Yen SS. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogesterone RU486: dose-response effect. Fertil Steril 1995; 64: 187-90.
14. Grese TA, Sluka JP, Bryant HU. Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 14105-10.
15. Jordan VC. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. Curr Prob Cancer 1992; 16: 129-76.
16. Jordan VC, Phelps E, Lindgren JU. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. Breast Cancer Res Treat 1987; 10: 31-5.
17. Gusberg SB. Tamoxifen for breast cancer: associated endometrial cancer. Cancer 1990; 65: 1463-4.
18. Sato M, Rippy MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. FASEB J 1996; 10: 905-12.
19. Stefano P, Annalidia S, Costantino DC, Pietro A, Fulvio Z, Carmine N. Effects of raloxifene treatment on uterine leiomyoma in postmenopausal women. Fertil Steril 2001; 76: 38-43.
20. Grese TA, Dodge JA. Selective estrogen receptor modulators. Curr Pharmaceut Design 1998; 4: 71-92.
21. Lippman ME, Krueger KA, Eckert S, Sashegyi A, Walls EL, Jamal S, et al. Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants. J Clin Oncol 2001; 19: 3111-6.
22. Fuchs-Young R, Howe S, Hale L, Miles R, Walker C. Inhibition of estrogen-stimulated growth of uterine leiomyomas by selective estrogen receptor modulators. Molecular Carcinogenesis 1996; 17: 151-9.

=국문초록=

Selective estrogen receptor Modulator (SERM)은 에스트로겐 수용체와 결합하여, 조직마다 다르게 작용하여 길항이나 대항의 역할을 수행한다. 이러한 SERM 중의 하나인 raloxifene은 여성호르몬 수용체와 nanomolar 친화력을 가지고, 조직에 따라 길항제와 대항제로 작용한다. 즉 뼈와 지질에는 에스트로겐 길항제로 작용하고, 유방과 자궁에는 대항제로 작용한다. Tamoxifen은 다른 종류의 SERM으로 길항제와 대항제의 양면성을 자궁 내막에 작용한다. 그러므로 자궁근종은 에스트로겐 의존성이므로 SERM을 이용하여 사람 자궁근종 세포에 투여함으로써 치료의 가능성을 보고자 이 연구를 계획하였다.

자궁근종과 정상 자궁 근 세포를 일차 배양하여 에스트로겐의 투여 전후의 반응을 보았으며, SERM 투여 후의 반응을 MTS 및 생존세포수 계산을 하였고, 세포주기회로 및 세포자멸사를 보기 위해 FACS와 Western-blot을 시행하였다.

일차 배양된 자궁근종과 정상 자궁근 세포에서 에스트로겐과 황체호르몬 수용체의 발현을 확인하고 수용체 양성군과 음성군으로 구별하였다. 에스트로겐 수용체 음성군에서는 에스트로겐을 $10^{-12}$에서 $10^{-6}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하였으나 세포의 증식은 자궁근종 세포나 정상에서는 보이지 않았다. 반대로 에스트로겐 수용체양성군에서는 에스트로겐을 용량의 증가와 투여 일수를 증가하여 세포의 증식이 용량에 비례하여 증가하는 것을 보여주었다. 자궁근종과 정상 자궁근 세포에 에스트로겐을 $10^{-6}$ mol/L을 6일간 투여 후 raloxifene을 $10^{-11}$에서 $10^{-7}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하여, 에스트로겐 수용체 음성군에서는 세포 증식의 억제가 거의 없었으나, 양성군에서는 증식의 억제를 관찰하였다. 같은 조건으로 tamoxifen을 $10^{-11}$에서 $10^{-7}$ mol/L까지 용량을 증가하면서 투여하여, 에스트로겐 수용체 음성군에서는 변화가 없었고, 수용체 양성군에서는 증식의 억제가 관찰되었으나 raloxifene의 증식 억제보다는 적었다. ELT-3 세포주에 tamoxifen, raloxifene을 투여하여 효과를 비교하여, 두 약제에 모두 세포 증시 억제의 효과를 확인하였다. ELT-3 세포를 FACS를 이용한 세포 주기회로 분석에서 어느 특정한 주기도 증가하는 것을 보이지 않았다. 세포 증식의 억제가 세포자멸사와 세포 주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보았으나, 약제 투여 전이나 후의 발현의 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 SERM은 자궁근종의 세포 증식을 억제하는 역할을 하며, raloxifene의 억제작용이 tamoxifen보다 우수하여 raloxifene이 가임기 여성의 자궁근종의 약물 치료법에 가능성을 보여주었다고 생각한다. 향후 좀더 많은 조사 군을 상대로 다양한 용량에 따른 변화를 조사하여, SERM이 자궁근종에 미치는 기전을 더 확실하게 밝혀, raloxifene이 가임기 여성의 자궁근종 약물치료 개발에 길잡이가 될 것으로 사료된다.

*중심단어* : 자궁근종, SERM