

자궁 근종 세포에서 ATP-민감성 칼륨 통로의 동정

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, *생리학교실
차순도 · 송대규* · 조치흠

=ABSTRACT=

Identification of ATP-sensitive K⁺ Channel in an Uterine Leiomyoma Cell

Soon-Do Cha, M.D., Dae-Kyu Song, M.D.*, Chi-Heum Cho, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, *Physiology, School of Medicine,
Keimyung University, Daegu, Korea

Objective : The purpose of this study was to identify the ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel subtypes in uterine leiomyoma and normal myometrial cells, and to compare the difference in its expression between uterine leiomyoma and normal myometrial cells.

Methods : Fresh ten uterine leiomyomas and their adjacent normal myometrial tissues were obtained from hysterectomies that were conducted on benign diseases. With the use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis, we analysed the expression of K_{ATP} channel subtypes in tissues and primary cultured leiomyoma cells. To demonstrate the K_{ATP} channel activity in uterine leiomyoma cells, whole cell patch-clamp recordings were made.

Results : The uterine leiomyoma and normal myometrial tissues contained Kir6.1/SUR2B and Kir6.2/SUR2B mRNAs, although the expression of SUR1 and SUR2A mRNAs were not expressed in the uterine leiomyoma and normal myometrial tissues. Primary cultured uterine leiomyoma and normal myometrial cells demonstrated same patterns. To determine the expression levels of K_{ATP} channel subunits, high levels of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B were detected by western-blot analysis in uterine leiomyoma compared with normal myometrial tissues. K_{ATP} channel currents were increased by estrogen application in uterine leiomyoma cells.

Conclusion : These studies provide new knowledge concerning K_{ATP} channels in uterine leiomyoma and normal myometrial cells. we demonstrated uterine leiomyoma and normal myometrial tissues contained Kir6.1/SUR2B and Kir6.2/SUR2B subunits and showed an increased expression in uterine leiomyoma compared with normal myometrial tissues. These results suggest that K_{ATP} channels are important elements in growth of uterine leiomyoma.

Key Words : Uterine leiomyoma, K_{ATP} channel

자궁 근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종 (myoma) 또는 평활근종 (leiomyoma)이라 불리고 있다. 이 양성 종양은 가임 연령 여성의 30-40%에서 존재하고, 40세 이상의 여성에서는 40-50%가 발견된다.¹ 이러한 종양으로 인해 불임, 임신 합병증과 비정상적인 질 출혈의 원인이 되고 전자궁 적출술을 시행하는 가장 흔한 원인이 된다.² 자궁 근종의 원인은 현재까지 정확하게 알려져 있지 않고, 자궁 평활근내에 있는 하나의 neoplastic cell로부터 기인한다

고 한다.³ 이외에 가족적 경향이 있고, 호르몬의 영향을 받아 임신중에는 크기가 커지고 폐경후에는 크기가 줄어드는 형태를 보이나 이것이 원인이라 말할 수는 없다. 또한 자궁 근종은 불임의 원인으로 아기를 원하는 여성에서는 자궁의 보존이 무엇보다도 중요하다고 하겠다. 이것은 암보다도 부인과 의사는 많이 접하는 질병이나 단순히 수술로 제거하기보다는 많은 환자들이 약물 치료나 보존적 치료를 원하고 있다. 지금까지 사용하는 약물적 치료는 GnRH agonist 투여로 호르몬 생성을 일시적

접수일 : 2003. 7. 14.
주관책임자 : 조치흠

* 본 연구는 2001년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

으로 감소시킴으로, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다.

최근의 전기생리학의 발전과 더불어 세포막의 많은 ion channel (이온통로)들이 양성 혹은 악성 종양의 발생과 성장에 깊이 관련된다는 사실이 밝혀지면서 많은 연구가 진행되고 있다. 세포막 칼륨이온통로 (K channel)는 흥분성세포에서 안정막전압의 유지나, 활동전압의 빈도 그리고, 재분극의 속도 등을 결정하는 중요한 ion channel이다.⁴ ATP-민감성 칼륨통로 (ATP-sensitive potassium channel, K_{ATP} channel)는 기본적으로 세포내 ATP의 농도변화에 따라 개폐확률이 결정되는 통로로서, 세포내 대사와 전기현상을 연결하는 기능을 한다. K_{ATP} channel은 인슐린을 분비하는 췌장 베타세포와 더불어 심근, 골격근, 평활근에 이르는 인체의 거의 모든 근육세포에서 발견된다.^{5,7} 심근에서는 허혈시 K_{ATP} channel이 열려 심근의 과도한 에너지 소모를 막아주는 역할이 있다. 혈관 평활근에서는 이 channel의 개폐로 혈관저항이 조절되기도 한다. 뇌 세포 (시상하부)에서는 식이 조절을 비롯한 인체대사의 조절에 K_{ATP} channel은 중요한 위치를 잡고 있다. K_{ATP} channel은 두개의 subunit (inwardly rectifying K⁺ channel (Kir) 및 sulfonylurea receptor (SUR))으로 구성되며, 심근이나 골격근에서는 Kir6.2/SUR2A이나, 평활근에서는 Kir6.1 또는 Kir6.2/SUR2B type들로 주로 이루어져 있다. 신경계에서의 이들 아형의 구성은 더욱 복잡해진다. 같은 평활근이라 하더라도 Kir6.1이나 Kir6.2냐에 따라서 그것의 조절기전은 현저히 다를 수 있다. 이러한 아형의 연구들이 환자들에게 많은 불편함과 고통을 주면서도 단지 악성이 아니라는 이유만으로 연구가 등한시 되어온 자궁 근종에서는 전혀 연구가 되지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 먼저 인체의 자궁 근종에 분포한 K_{ATP} channel의 아형 종류를 규명하고, 이들의 조절특성을 밝히고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 재료

계명대학교 동산의료원에서 조직학적으로 자궁 근종으로 확진된 환자의 전자궁 적출술시 신선한 자궁 근종 조직 10예와 정상 자궁근 조직 10예를 얻어 78℃ 냉동고에 실험 때까지 보관하였다. 단일 세포 배양을 위해서는 수술시 즉시 조직에서 단일 세포들을 collagenase를 사용하여 분리, 배양하며 실험을 실시하였다. 자궁 내막의 주기는 증식기 5예와 분비기 5예를 선택하였고, 환자의 동의를 얻고 실험을 시행하였다.

2. 실험내용 및 방법

1) RT-PCR

cDNA합성은 분리된 RNA 2 µg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40 µL 용량으로 역전사 (reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 µg, 5 mmol/L MgCl₂, 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/µL RNase inhibitor (Perkin-Elmer Co.), 2.5 U/µL MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co.), 2.5 µmol/L oligo d (T)₁₆로, 반응 조건은 42℃ 1시간, 99℃ 5분, 5℃ 5분으로 하였다. PCR은 10 X reaction buffer (15 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl) 5 µL와 10 mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 µL씩, 그리고 30 µmol/L K_{ATP} 통로 수용체 아형인 Kir6.1 (5'-CGCATAAGAACATCCGTGAG-3' 및 5'-CAGGAATGTCCAGTTGGTGA-3'), Kir 6.2 (5'-TGTGTCACCAGCATCCACTC-3' 및 5'-CCGTCCTCTCAGCTACAAT-3') SUR1 (5'-GCTGGAAGTCCGAATGGAGT-3' 및 5'-TCTGCAAGGCTGTCATCAC-3'), SUR2A (5'-TGCTGGAACGTACGGATACA-3' 및 5'-AAGAGACACGGTGAGCCATT-3'), SUR2B (5'-GTGCAGTGAAGAAGGTGAAC-3' 및 5'-GTCTGCCGTCAGAAATAGTGT-3'), 각각 1 µL를 넣은 mixture에 1 µL의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin-Elmer Co.)를 넣은 후 증류수로 50 µL로 용량을 맞추고 30 µL의 mineral oil을 중층한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 µL를 1% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

2) Western blot analysis

분쇄한 조직에서 Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M 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 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동 (electrotransfer)를 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액 (5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking 하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체 (Santa Cruze Biotechnology Inc., USA)인 Kir6.1, Kir6.2, SUR1과 SUR2를 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 넣

고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (santa Cruze Biotechnology 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 비특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

3) 일차 세포 배양

정상 자궁 평활근 조직과 자궁 근종 조직을 수술 후 얻어 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단한 후 15 ml tube에 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 절단한 tissue에 HEPES (25 mmol/L), penicillin (200 U/mL), streptomycin (200 µg/mL), collagenase type IV (1.5 mg/mL), DNase (0.2 mg/mL)를 HBSS에 넣고 37°C 수조에서 3-4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일 세포로 분리한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 Phosphate-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°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 24-48시간 후 배양액을 교환하였다.

4) 전기생리 실험

K_{ATP} 통로의 전기적인 활성도를 측정하기 위하여 patch clamp 기법의 whole-cell mode를 사용하였다. 세포에 접촉하는 유리전극은 borosilicate 유리 제품 (TW120-4, World Precision Instrument inc., USA)이었으며 증력형 puller (PP-83, Narishige Co., Japan)를 이용하여 3-5 MΩ의 저항을 가지도록 하였고 열 가공 (MF-83, Narishige Co., Japan)하여 실험에 사용하였다. 막전압 고정 증폭기는 Axopatch 200 A amplifier (Axon Instrument Inc., USA)를 사용하였으며, 증폭된 전류는 analog-digital 변환기를 거쳐 컴퓨터에 저장하였고, pClamp 8.1 (Axon Instrument Inc., USA) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

단일 세포를 도립 현미경위에 장치된 관류형 수조에 위치시키고, 20초 안에 수조의 용액을 모두 교환할 수 있는 속도로 관류액을 흘렸다. 유리전극 (세포내) 용액의 조성 (단위는 mmol/L)은 KCl (110), KOH (30), MgCl₂ (1), CaCl₂ (1), EGTA (10), HEPES (10), Na₂ATP (2), ADP (0.1), GTP (0.5)이며 KOH를 이용하여 pH 7.2로 조정하였다. 수조 용액은 2가지를 사용하였는데 seal을 형성시키는 단계에 사용한 수조 용액의 조성 (단위는 mmol/L)은 NaCl (134), KCl (6), MgCl₂ (1), CaCl₂ (0.1), HEPES

(10), glucose (10)이며 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 조정하였다. Whole-cell mode에서 K_{ATP} 통로를 통한 칼륨 전류를 크게 하기 위해 사용한 수조 용액의 조성 (단위는 mmol/L)은 KCl (140), MgCl₂ (1), CaCl₂ (0.1), HEPES (10), glucose (10)이며 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 조정하였다. 17β-estradiol과 glibenclamide는 실험 농도의 1000배로 만들어서 실험 직전에 희석하여 사용하였다. Whole-cell mode에서 BK_{Ca} 통로의 활성을 제거하기 위하여 유리전극내 용액에 칼슘 이온 chelater인 EGTA를 처리하였다. 막전압은 -60 mV로 고정하였으며, 기록된 전류는 1 KHz에서 filtering한 후 5 KHz의 sampling rate로 수집하여 분석에 사용하였다.

결 과

자궁 근종과 정상 자궁 근조직에서의 RT-PCR을 통한 K_{ATP} channel의 아형의 검사에서 Kir6.1, Kir6.2, SUR 2B는 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 모두 발현이 있었으나, SUR1과 SUR2A의 발현은 보이지 않았고, 세포를 일차 배양한 세포에서도 동일한 결과를 보였다 (Fig. 1A). Kir6.2의 경우에는 발현 차이가 있어 많은 수를 대상으로 시행하여 자궁 근종과 정상에서 발현을 보여주었다 (Fig. 1B). 단백질에서의 발현 차이를 보기 위해 Western

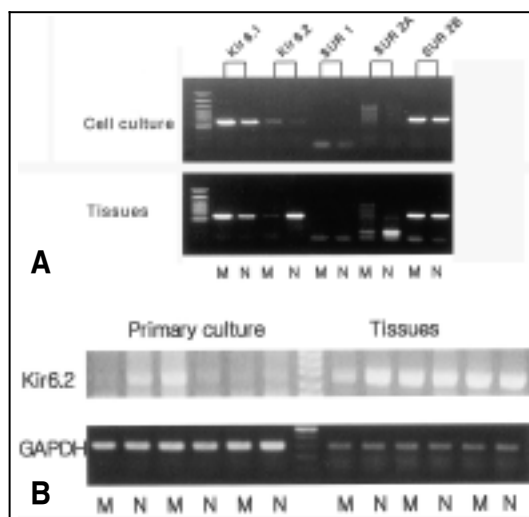


Fig. 1. RT-PCR analysis of KATP channels in Myocytes. A, Analysis of mRNAs for the presence of Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A, and SUR2B in the uterine leiomyoma (M), normal myometrial (N) tissues, primary cultured myometrial, and leiomyoma cells. B, Expression analysis of Kir6.2 mRNA in tissues and primary cell cultures. Data were normalized to GAPDH expression.

Blot을 시행하여 Kir6.1, Kir6.2, SUR2는 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 모두 발현이 있었고, SUR1의 발현은 보이지 않았다 (Fig. 2). SUR2의 경우 아형이 구별되는 일차 항체가 없어, SUR2A와 2B의 구별은 할 수 없었다 (Fig. 2). K_{ATP} channel의 아형의 발현 양상에서는 SUR2, Kir6.1과 Kir6.2는 자궁 근종에서 자궁 근조직보다 높은 발현 양상을 보였다 (Fig. 2). 자궁 근종에서 발현된 K_{ATP} channel이 자궁근의 기능 및 증식에 중요한 에스트로겐에 반응하는가를 보기 위하여 전기 생리학적 실험을 실시하였다. 세포막 전압을 안정막 전압 (-60 mV)으로 고정된 상태에서 전류를 측정하였다. 먼저 세포외부에 고농도의 140 mM KCl을 투여하였을 때, whole-cell mode에서 K^+ 이온이 야기하는 내향성 전류가 관찰되었으며 (Fig. 3), 이때 10 nM의 에스트로겐을 세포외부 용액에 관류시키면 그 내향성 K^+ 전류는 더욱 증가하였다. K^+ 전류 중에서 K_{ATP} channel을 통한 전류를 동정하고자, 선택적 K_{ATP} channel 차단제인 glibenclamide를 투여하여 약

50% 정도의 내향성 K^+ 전류가 감소함을 관찰하였다. 이것으로 자궁근종에서 에스트로겐 노출시 초기 신호전달에 세포막의 K_{ATP} channel을 통한 전류의 증가가 관여한다는 것을 알 수 있었다.

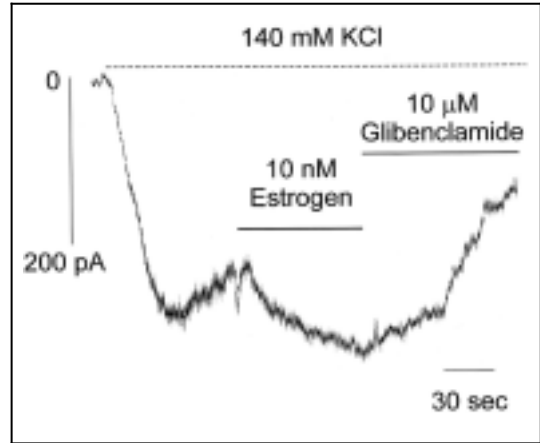


Fig. 3. Effect of estrogen on K_{ATP} channel current. Estrogen (10 nM) was applied in the bath solution containing 140 mM KCl during the period of the bar indicated. Membrane potential was held at -60 mV, and the current elicited by the channel openings was shown as the downward deflection. The dotted line represents a level of zero current.

고 찰

본 연구는 지금까지 자궁 근종의 K_{ATP} channel 아형에 관한 연구가 없어, 자궁 근종이나 정상 자궁 근에서의 K_{ATP} channel의 존재와 역할을 밝히는데 중요한 것으로 생각된다. 저자들은 자궁 근조직과 자궁 근종에서의 K_{ATP} channel 아형의 존재를 확인하고, 또한 일차 배양 세포를 통해 단일 자궁 근종 세포에서 그의 존재를 확인하고자 하였다.

자궁 평활근의 수축에 관여하는 K^+ channel로는 Ca^{++} -sensitive K^+ channel과 K_{ATP} channel이 관찰된다. 이 두 channel이 닫히면 자궁수축력의 빈도는 많아지고, 반대로 이 channel들의 열림 확률이 높아지면 근육수축 빈도는 작아져 자궁 근 수축이 유발하는 조기진통의 치료에 K_{ATP} channel opener가 사용되고 있다.⁸ 그러나 K_{ATP} channel은 각 조직마다 그 아형이 다를 수 있다. 이 channel은 octamer로서 각각 4개로 구성되는 2종류의 아형인 inwardly rectifying K^+ channel (Kir6.x)과 sulfonylurea receptor (SUR) subunit으로 구성된다.⁹ Kir 아형은 pore를 형성하고, SUR 아형들은 조절 작용에 관여한다.¹⁰ K_{ATP}

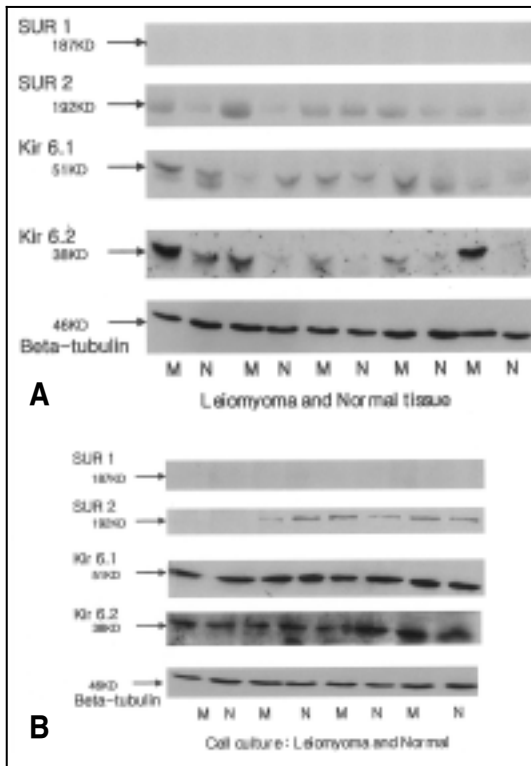


Fig. 2. Western blot analysis of SUR1, SUR2, Kir6.1, and Kir6.2 in uterine leiomyoma (M) and corresponding normal myometrium (N). A. Tissues, B. Primary cultured cells. Beta tubulin was used as internal control.

channel은 ATP-binding cassette superfamily에 속하는 세포막 이온통로로서 기본적으로 세포내 ATP나 ADP같은 nucleotide에 의해 활성이 조절되는 바 세포내 대사와 세포의 전기적 활성도를 연결하는데 중요한 이온통로로 알려져 있다. K_{ATP} channel은 당뇨병시에 치료제로 사용되는 sulfonyleurea에 의해 그 활성이 억제되며, benzopyrans (cromakalim, levcromakalim, pinacidil), cyanoguanidines, thiogormamides, pyrimidines (minoxidil) 그리고 benzothiadiazines (diazoxide) 등에 의해 활성화된다.^{11,12} 여러 아형들 (Kir6.1, Kir6.2; SUR1, SUR2)은 각기 다른 조합으로 여러 조직들에서 다양하게 분포한다. 췌장 베타세포에서는 Kir6.2/SUR1으로 구성되며, 혈중 포도당 증가시 channel 활성이 줄어들어 Ca^{++} 유입을 촉발해 인슐린을 분비시킨다.¹¹ 골격근 및 심근세포에서는 특이적으로 Kir6.2/SUR2A type의 channel이 관찰된다. 그러나 평활근에서의 K_{ATP} channel은 Kir6.1과 Kir6.2가 조직마다 다르게 분포하며 이 때문에 그 조절기전도 상당히 달라진다.¹³ 혈관 평활근에서는 대개 안정막 전압을 결정하며, 이것으로 전압의존성 Ca^{++} channel을 통한 Ca^{++} 유입정도를 결정하여 혈관 긴장도를 조절, 혈압에 관계되는 것으로 알려져 있다. 이외에 간세포에서의 동정에서는 Kir6.1과 SUR1이 주로 관찰되었고, SUR2는 약하게 발현을 보인다 한다.¹⁴ 내장 근에서는 근 수축력과 빈도를 결정한다고 알려져 있으나 조직마다 다른 이온 channel들의 역할과 복합되어 그 기전이 다른 곳에 비해 이해하기가 어렵다. 그러므로 그 조직 자체에서의 동정이 이루어지지 않는다면 다른 곳에서의 결과로 역할을 유추할 수 없어, 본 연구에서는 자궁 평활근에서의 K_{ATP} channel 아형을 동정한 결과 자궁 근 조직과 근종 조직 모두에서 Kir6.1, Kir6.2와 SUR2B는 존재하였으나 SUR1과 SUR2A는 보이지 않았다. 이것은 세포를 일차 배양한 세포의 결과에서도 동일한 결과를 보여주었다 (Fig. 1A). Kir6.2의 경우 발현의 차이가 있었으나 여러 샘플을 반복 실험하여 발현이 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 이상의 결과는 위에서 언급한 골격근과는 다른 결과를 보이니, 혈관 평활근과는 유사한 결과를 보였다. 단 백질에서의 발현과 양적 차이를 보기 위해 Western-Blot을 시행하여, 자궁 근종과 정상 자궁 근과의 발현의 차이는 아형인 Kir6.1, Kir6.2와 SUR2B 모두에서 자궁 근종에서 더 많은 발현 정도를 보여주었다. 이는 K_{ATP} channel이 자궁 근종의 발생과 증식에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다 하겠다. 이러한 발현의 차이가 정상 자궁근과 자궁근종에서 세포 성장과 증식이 차이가 나는 한 원인이라 볼 수 있겠다. 이것을 뒷받침해주는 근거로 많은 조직에서 K^{+} channel은 세포 성장과 증식을 조절한다는 것은 주목할 만한 사실이다. 예를 들면, receptor-coupled, 전압-의존성, Ca^{++} -의존성 K^{+} channel이

임과귀, 지방세포, 피부, 유방, 방광, 위장 등의 상피세포에 증식을 조절한다.¹⁵⁻¹⁷ 이들 조절은 DNA 합성과 연관된다고 보는 바 K^{+} channel의 역제는 세포 주기회로에서 G0/G1를 지연시킬 수 있다.¹⁷ 또한 fibroblast에서는 Ca^{++} -의존성 K^{+} channel이 세포분열과 관련된 세포내 신호 경로를 조절하는 것이 발견되었다.¹⁸ 본 연구에서는 K_{ATP} channel 아형을 동정하여 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 그 아형의 존재를 밝혔으며, 또한 자궁 근종 세포에서 K_{ATP} channel의 발현이 증가함을 확인하였다. 이 결과를 이용하여 자궁 근종 세포 증식의 조절 기전을 밝히는데 도움이 되리라 생각되며, 향후 K_{ATP} channel 이온 통로 조절 인자를 이용한 자궁 근종의 치료에 이용할 수 있리라 사료된다.

- 참고문헌 -

- Buttram VC Jr, Reiter RC. Utrine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Fertil Steril* 1981; 36: 433-45.
- West CP, Lumsden MA. Fibroid and menorrhagia. *Baillieres Clin Obstet Gynecol* 1989; 3: 357-74.
- Townsend DE, Sparkes RE, Baluda MC, McClelland G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 107: 1169-73.
- Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed., pp.115-139 and 472-503, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 1992.
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985; 316: 736-8.
- Lee K, Dixon AK, Freeman TC, Richardson PJ. Identification of an ATP-sensitive potassium channel current in rat striatal cholinergic interneurons. *The Journal of Physiology* 1998; 510: 441-53.
- Russ U, Rauch U, Quast U. Pharmacological evidence for a K_{ATP} channel in renin-secreting cells from rat kidney. *The Journal of Physiology* 1999; 517: 781-90.
- Sanborn BM. Ion channels and the control of myometrial electrical activity. *Semin Perinatol* 1995; 19: 31-40.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonyleurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-6.
- D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P, Vivaudou M. A transmembrane domain of the sulfonyleurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K^{+} channels by K^{+} channel openers. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 308-15.
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of SUR/KIR6.X, K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 667-87.
- Edwards G, Weston AH. Pharmacology of the potassium channel openers. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 185-93.
- Reimann F, Gribble F, Ashcroft FM. Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1318-25.
- Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Sudicani SO, Spray DC, McDonald TV, et al. K_{ATP} channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 2000; 275: 26050-7.
- Harmon CS, Luts D, Ducote J. Potassium channel openers stimulate DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures. *Skin Pharmacol* 1993; 6: 170-8.
- Wondergem R, Cregan M, Strickler L, Miller R, Suttles J. Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties.

- J Membr Biol 1998; 161: 257-62.
17. Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA, Strobl JS. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. J Cell Physiol 1995; 162: 163-71.
18. Stanley RG. Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 1999; 33: 107-27.

=국문초록=

목적 : 본 연구는 지금까지 자궁 근종의 K_{ATP} channel 아형에 관한 연구가 없어, 자궁 근종이나 정상 자궁 근에서의 K_{ATP} channel의 존재와 아형의 종류를 확인하고, 또한 발현의 차이를 확인하고자 하였다.

연구 방법 : 자궁근종으로 전자궁 적출술을 시행하는 10예의 환자를 대상으로 자궁 근종과 인접한 정상 자궁 조직을 얻어 실험하였고, 또한 일차 세포배양을 하였다. 자궁내막의 주기는 증식기 5예와 분비기 5예로 하였다. 조직과 일차배양세포에서 K_{ATP} channel 아형의 RT-PCR, western-blot 분석을 하였으며, K_{ATP} 통로의 전기적인 활성도를 측정하기 위하여 patch clamp 기법의 whole-cell mode를 사용하였다.

결과 : RT-PCR을 통한 K_{ATP} channel의 아형의 검사에서 Kir6.1, Kir6.2, SUR 2B는 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 모두 발현이 있었으나, SUR1과 SUR2A의 발현은 보이지 않았고, 세포를 일차 배양한 세포에서도 동일한 결과를 보였다. Western Blot 분석에서는 Kir6.1, Kir6.2, SUR 2는 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 모두 발현이 있었고, SUR1의 발현은 보이지 않았다. K_{ATP} channel의 아형의 발현 양상에서는 SUR2, Kir6.1과 Kir6.2는 자궁 근종에서 자궁 근조직보다 높은 발현을 보였다. whole-cell mode에서 K⁺ 이온이 야기하는 내향성 전류가 관찰되었으며, 에스트로겐에 노출시 초기 신호전달에 세포막의 K_{ATP} channel을 통한 전류의 증가를 관찰하였다.

결론 : 본 연구에서는 K_{ATP} channel 아형을 동정하여 자궁 근종과 정상 자궁 근에서 Kir6.1/SUR2B와 Kir6.2/SUR2B가 존재하는 것을 밝혔으며, 또한 자궁 근종 세포에서 K_{ATP} channel의 발현이 증가함을 확인하였다. 이 결과를 이용하여 자궁 근종 세포 증식의 조절 기전을 밝히는데 도움이 되리라 생각되며, 향후 K_{ATP} channel 이온 통로 조절 인자를 이용한 자궁 근종의 치료에 이용할 수 있으리라 사료된다.

중심단어 : 자궁근종, K_{ATP} channel