

## 자궁내막에서 Endothelin의 조직면역화학

계명대학교 의과대학 산부인과학교실·병리학교실\*\*

김종인·김택훈·김상표\*\*

=Abstract=

### Immunohistochemistry of the Endothelin in Endometrium

Jong In Kim, M.D., Taek Hoon Kim, M.D., Sang Pyo Kim, M.D.\*\*

Department of Obstetrics and Gynecology, Pathology\*\*, School of Medicine, Keimyung University

The endometrium is a target tissue for the actions of ovarian estradiol and progesterone, which are responsible for its growth and differentiation in preparation for implantation. Recently peptide endothelin may be a paracrine factor in the endometrium. Our objective was to determine the localization of immunoreactive endothelin in human cyclic endometrium and gynecologic disease.

Fixed dated endometrial tissue(n=42) and tissues of adenomyosis(n=16), adenomatous hyperplasia(n=11), cystic hyperplasia(n=12), endometrial cancer(n=19), endometrioma(n=10). Intensity of positive staining was given a score of 0 (negative), 1 (low), 2 (moderate) or 3 (strongly positive) for each group within each section. Comparison of immunohistochemistry with endothelin from different group(proliferative, secretory, menstrual, senile phase) were conducted with Kruskal Wallis one way analysis.

Comparison of each section(adenomyosis, hyperplasia, endometrial cancer, endometrioma) with luminal epithelium were conducted with Bonferroni-adjusted Mann Whitney test. Positive immunostaining for endothelin was observed in all endometrial tissue. Low level of immunoreactivity were observed in endometrial stroma in all tissues. The strongest staining was seen in luminal epithelium throughout the secretory phase. And moderate staining of luminal epithelium in adenomyosis, hyperplasia, endometrial cancer and endometrioma were showed.

---

Key Words : Endothelin, Menstrual cycle, Adenomyosis, Hyperplasia.

\* 이 논문은 1994년도 계명대학교 비사연구비 및 동산의료원 을종연구비로 이루어졌음.

\*\* 본 연구의 요지는 1994년 10월 22일 제 74차 대한산부인과학회에서 발표하였음.

## I. 서 론

자궁내막은 난소호르몬인 estradiol과 progesterone의 작용에 대한 target organ이며, 착상을 위한 준비를 위한 성장과 분화가 계속 일어나는 곳으로서, 최근 자궁내막 기능에서의 paracrine과 autocrine 조절에 대한 개념이 도입되면서, 자궁내막내에 국소적으로 작용하는 몇 가지 요소중(Findlay & Salamonsen, 1991 : Pollard, 1990) 1988년 Yanagisawa (Yanagisawa et al., 1988)에 의해 돼지 대동맥 혈관 내피세포로부터 21-residue peptide로 구성된 강력한 혈관 수축제인 endothelin이 자궁근육세포에 대한 강력한 수축작용이 있다는 것과 자궁내막에 paracrine action이 있다는 것이 알려졌다. 면역화학적 인 endothelin은 신장(Kosaka T, 1989), rat and mouse의 trachea(Black et al., 1989 : Rosengurt et al., 1991), human lung(Giaid et al., 1991)의 epithelial cell의 것으로 알려져 있으며 또한 혈관조직이 없는 amnion에서도, endothelin의 mRNA가 측정되고 있다(Sunnergren et al., 1990). 또한 동물(특히 토끼) 실험에서 endothelin의 epithelial cell에서의 endothelin의 면역조직화학적 존재가 규명되었으며 (Maggi M et al., 1991). 인간의 자궁내막에서의 luminal & glandular epithelium에서의 endothelin에 대한 특별한 binding site의 존재가 확인되어 보고되고 있다(Nakamura et al., 1990).

본 연구의 목적은 정상여성의 월경주기 동안의 자궁내막에서의 조직면역화학법에 의한 endothelin의 존재유무와 각 월경주기간의 endothelin 존재의 차이 및 부인과적으로 혼란 자궁내막 증식증, 자궁선종, 자궁내막암, 폐경 등에서의 조직면역화학법에 의한 endothelin의 존재유무와 각 월경주기와 부인과 질환 사이에서의 endothelin의 역할을 규명하기 위해 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과교실에 볼임, 월경불순, 질출혈 등을 주소로 내원한 환자에서 진단적 소파슬 및 전자궁적출술을 시행하여 병리 조직 검사상 진단이 확정된 예에서 월경기 11예, 증식기 10예, 분비기 11예, 노인성 변화 10예, adeno-

matous hyperplasia 11예, cystic hyperplasia 12예, 자궁선종 16예, 자궁내막암 19예, endometrioma 10 예를 임의로 선별하여 채취한 검사체를 저자들에 의한 고정 및 염색 방법으로(김택훈, 김종인, 서영옥, 박관규, 1994 in press) 관찰하였다.

면역조직화학 염색정도는 저자들이 정한 0~3으로 배점하여 비교하였는데, 0은 염색이 전혀 안된 경우, 1은 약하게, 3은 아주 강하게 염색된 경우, 2는 1 보다는 강하고 3 보다는 약한 경우로 하였다 (Table 1).

Table 1. Scoring system of the immunohistochemistry

Scoring	Satatus of staining
0	No staining
1	Weak staining
2	Strong staining
3	Intense staining

판독은 한명의 병리의사가 시행하였으며 자궁내막의 stroma, glandular epithelium, luminal epithelium의 염색정도를 비교분석 하였다. 통계처리는 동일조직에서 glandular & luminal epithelium, stroma 사이의 비교는 nonparametric method인 Kruskal-Wallis test를 이용하였으며, 각기 관찰 조직사이에 는 Bonferroni-adjusted Mann-Whitney test를 이용하였으며,  $\alpha < 0.003$ 을 유지수준으로 하였다.

## III. 결 과

본 연구에 이용한 모든 자궁내막 조직에서 endothelin에 대한 면역조직화학법의 검사에 양성반응을 나타내고 있으며, 모든 자궁내막조직의 stroma에서는 저자들이 정한 score system에 0~1의 낮은 조직면역화학반응을 보였으며 epithelium에서는 전 검사체에서 luminal epithelium에서 glandular epithelium보다 score가 높은 염색의 결과를 보여 주었다 (Fig. 1~9). 가장 강한 염색은(score 3) 분비기의 luminal epithelium이었으며, 다른 월경주기의 luminal epithelium에 비해 통계적으로 유의한 소견을 보였다(Table 2).

Table 2. Distribution and relative intensity of positive immunoreactivity for endothelin in human endometrial tissue throughout menstrual cycle

Group	Proliferative (n=10)	Secretory (n=11)	Menstrual (n=11)	Senile (n=10)
Glandular ep.*	0.8±0.43	1.64±0.67	1.27±0.47	0.2±0.38
Luminal ep.*	0.8±0.43	2.18±0.75**	1.27±1.03	0.2±0.38
Stroma ep.*	0.2±0.6	0.73±0.45	0.18±0.37	0.0±0.0

\*\*a<0.003 Compared with luminal epithelium in other menstrual phase

\*ep. : epithelium

자궁내막 증식증, 자궁선종, 자궁내막암 및 자궁내막종의 luminal epithelium에서는 score 2 정도의 비교적 진한 endothelin의 염색소견을 보였다(Fig. 5~8). 월경주기의 증식기와 관련된 자궁내막 증식증의 luminal epithelium에서의 endothelin의 존재는 통

계적으로 유의한 차이를 보여 주었으며, 월경기와 관련된 자궁선종 및 자궁내막종에서의 luminal epithelium에서의 endothelin의 존재는 통계적으로 유의한 비교적 진한 염색을 보여주었다(Table 3).



Fig. 2. Immunostaining of endothelin in secretory phase.  
The luminal epithelium is strong positive(×100).



Fig. 1. Immunostaining of endothelin in proliferative phase.  
The luminal epithelium is weak positive(×100).



Fig. 3. Immunostaining of endothelin in menstrual phase.  
The luminal epithelium is weak positive(×100).

Table 3. Distribution and relative intensity of positive immunoreactivity for endothelin in gynecological disease

Group	Ademomatous hyperplasia (n=11)	Cystic hyperplasia (n=12)	Adenomyosis (n=10)	Endometrial cancer (n=9)	Endometrioma (n=10)
Glandular	1.0±0.63	1.33±0.49	2.1±0.74	1.33±0.50	2.2±0.48
Luminal	1.55±0.69***	1.83±0.72**	2.3±0.82****	1.78±0.67	2.8±0.88***
Stroma	0.09±0.29	0.42±0.39	0.1±0.3	0.18±0.31	0.83±0.7

\*\*\* a<0.003 Compared with proliferative phase

\*\*\*\* a<0.003 Compared with menstrual phase

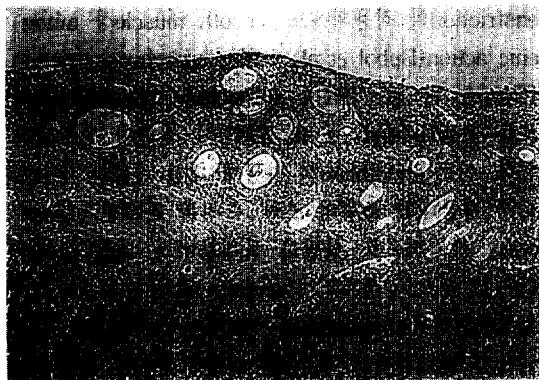


Fig. 4. Immunostaining of endothelin in serile phase.  
The luminal epithelium is weak positive( $\times 100$ ).



Fig. 7. Immunostaining of endothelin in cystic hyperplasia.  
The luminal epithelium is strong positive( $\times 100$ ).



Fig. 5. Immunostaining of endothelin in endometrial adenocarcinoma.  
The luminal epithelium is weak positive( $\times 100$ ).

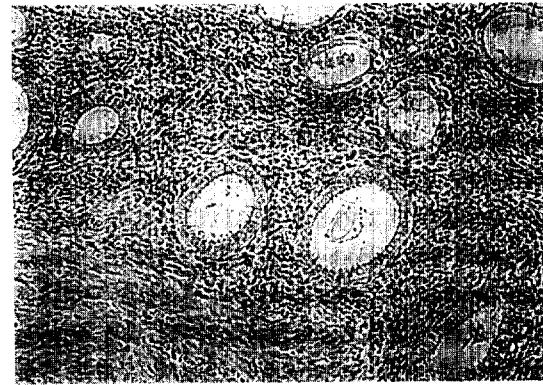


Fig. 8. Immunostaining of endothelin in adenomyosis.  
The luminal epithelium is strong positive( $\times 100$ ).

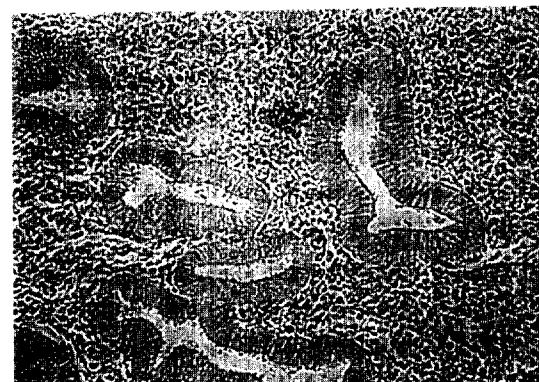


Fig. 6. Immunostaining of endothelin in adenomatous hyperplasia phase.  
The luminal epithelium is strong positive( $\times 100$ ).

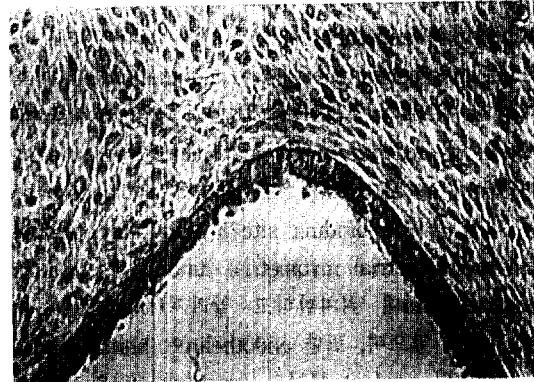


Fig. 9. Immunostaining of endothelin in endometrioma.  
The luminal epithelium is strong positive( $\times 100$ ).

#### IV. 고 칠

21-amino acid peptides로된 endothelin는 각기 다른 genes로 coding된 endothelin 1, 2, 3가 있다. Endothelin 1은 태반의 complementary DNA로부터 처음 clone되었고, 인간 제대혈관 내피세포 및 양막세포로 부터 생성되는 것으로 알려졌다(Sunnergren et al., 1990). 조직면역화학적인 endothelin이 여성의 endometrium의 stroma와 epithelial cell내에서 존재는 규명되었으나, luminal & glandular epithelial cell에서의 월경주기에 따른 endothelin 유무의 차이는 ovarian steroid 등의 다른 조절에 의한 것으로 추측되며, Papendrop 등(Nakamura et al., 1990)은 면역조직화학적 endothelin이 endometrial gland에 많이 존재하며 특히 endometrial-myometrial junction에 많이 존재한다고 보고하였다. Maggi 등(Maggi et al., 1991)은 동물실험에서 endometrial epithelia에 면역조직화학적으로 강한 endothelin이 존재하며,  $17\beta$  estradiol 처치후 endothelin은 uterine stroma에만 존재함을 보고하였다. 이는 epithelial cell에서의 endothelin의 표출을 위해서는 estrogen priming 후 progesterone이 필요함을 나타내고 있다. 또한 배양된 epithelial cell에서 다른 peptide hormone과 같이 endothelin도 Golgi체 주위에 특히 운집한것을 보고하였다(Nakamura et al., 1990). 특히 끌기체 주위에서 세포내 단백의 운송을 방해하는 monesin을(Mollenhauer et al., 1990), endometrial tissue와 함께 배양함으로서 endothelin이 합성되는 세포내에서 endothelin의 축적을 유발하여 자궁내막 세포에서의 endothelin의 합성치를 측정할 수도 있으나, endometrial tissue내의 endothelin에 대한 특이한 m-RNA의 규명이 남아 있다. Human endothelin은 myometrium에서의 contraction을 promote하며(Word et al., 1990), 자궁내막에서의 endothelin에 대한 특이한 binding site가 glandular epithelium과 endometrial-myometrial junction의 vascular endometrium내 위치한다고 알려져(Davenport et al., 1991) 있으며, 또한 endothelin이 human endometrium의 explants에서의 prostaglandin의 유리를 증가함을 보고하였다(Cametron et al., 1991). 이는 자궁에 대한 endothelin의 paracrine activity에 대한 가능성을 나타내고 있으며, endothelin은 vasoc-

onstriction의 작용외에도 smooth muscle상 mitogenic action(Bpbol et al., 1990), bronchoconstriction (Turner et al., 1989), autonomic transmission의 조율 등(Wiklund et al., 1988)의 작용이 보고되고 있다. 이는 endothelin의 자궁에 대한 가능한 기능으로서 자궁내막 출혈의 조절, 수정과 관계된 vasoactivity, 생리적으로 활발한 물질분비의 조절 등에도 관여할 것으로 생각되며 endothelin의 자궁내에서의 합성조절과 endothelin의 국소적 기능에 대한 많은 연구가 필요하리라 사료되며, 또한 부인과 질환에서의 endothelin의 존재여부는 처음 시도된 것으로 향후 자궁내막증식증, 자궁선종, 자궁내막암, endometrioma 등에서의 endothelin의 국소적인 역할, 발생기전과의 관계, 각 질환에서의 증상발현과의 관계에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

#### V. 결 론

제명대학교 의과대학 산부인과 교실에서 볼임, 월경불순, 질출을로 주소로 내원한 환자에서 진단적 소파술 및 자궁적출술을 시행한 후, 병리조직 검사상 진단이 확정된 각군간(월경주기)의 조직면역화학법에 의한 endothelin 존재 차이 여부와 각질환(자궁내막 증식증, 자궁선종, 자궁내막암)에서의 endothelin 존재 차이 여부를 측정하여, 면역조직화학 염색정도는 저자들이 정한 scoring system으로 0~3으로 배점하여, 월경주기간의 비교는 nonparametric method인 Kruskal-Wallis 검사를, 각 부인과적 질환과 월경주기간의 비교는 Bonferroni-adjusted Mann Whitney 검사를 이용하여 검정한 결과, 본 연구에 이용한 모든 자궁내막 조직에서 endothelin에 대한 면역조직화학법의 검사에 양성반응을 나타내고 있으며, 모든 자궁내막조직의 stroma에서는 저자들이 정한 scroe system에 0~1의 낮은 조직면역화학반응을 보였으며 epithelium에서는 전 검사체에서 luminal epithelium에서 glandular epithelium보다 score가 높은 염색의 결과를 보여 주었다. 가장 강한염색은(score 3) 분비기의 luminal epithelium이었으며, 다른 월경주기의 luminal epithelium에 비해 통계적으로 유의한 소견을 보였다.

자궁내막 증식증, 자궁선종, 자궁내막암 및 자궁내막종의 luminal epithelium에서는 score 2 정도의

비교적 진한 endothelin의 염색소견을 보였다. 월경 주기의 중식기와 관련된 자궁내막중식증의 luminal epithelium에서의 endothelin의 존재는 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었으며, 월경기와 관련된 자궁선종 및 자궁내막종에서의 luminal epithelium에서의 endothelin의 존재는 통계적으로 유의한 비교적 진한 염색을 보여주었다. 부인과 질환에서의 endothelin의 존재여부는 처음 시도된 것으로 향후 자궁내막 중식증, 자궁선종, 자궁내막암에서의 endothelin의 국소적인 역할, 발생기전과의 관계, 각 질환에서의 증상발현과의 관계에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

#### -References-

- 김택훈·김종인·서영옥·박관규. 양막 및 제대에서 Endothelin의 조직면역화학. 대한산부회지 1994(in press).
- Black PN, Ghatei MA, Takahashi K. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. FEBS Lett 1989; 255: 129-132.
- Bphol A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. Am J Physiol 1990; 258: C408-415.
- Cameron IT, Davenport AP, Brown MJ, Smith SK. Endothelin-1 stimulates prostaglandin F<sub>2α</sub> release from human endometrium. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1991; 42: 155-8.
- Davenport AP, Cameron IT, Smith SK, Brown MJ. binding sites for iodinated endothelin-1, endothelin-2 and endothelin-3 demonstrated on human uterine glandular epithelial cells by quantitative high-resolution autoradiography. I Endocrinol 1991; 129: 149-154.
- Findlay JK, Salamonsen LA. Paracrine regulation of implantation and uterine function. In : Seppälä M. ed. Ballier's clinical obstetrics and Gynaecology. London : Balliere Tindall, 1991 ; 5 : 117-132.
- Giaid A, Polak JM, Gaitonde V, et al. Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 4 : 1044-1049.
- Kosaka T, Suzuki N, Matsumoto H, et al. Synthesis of the vasoconstrictor peptide endothelin in kidney cells COS, 7. FEBS Lett 1989; 249: 42-46.
- Maggi M, Vannelli GB, Peri A, et al. Immunolocalization, binding and biological activity of endothelin in rabbit uterus, effect of ovarian steroids. Am J Physiol 1991; 260: E292-305.
- Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin : mechanism, specificity and relationship to toxicity. Biochim Biophys Acta 1990; 1031: 225-246.
- Nakamura S, Naurese M, Narse K, Demura H, Uemura H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. Histochemistry 1990; 945: 475-477.
- Pollard JW. Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. J Reprod Fertil 1990; 88: 721-731.
- Rosengurt N, Springall DR, Polak JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 4 : 1044-1049.
- Sunnergren KP, Word RA, Sambrook JF, MacDonald PC, Casey ML. Expression and regulation of endothelin precursor mRNA in avascular human amnion. Mol Cell Endocrinol 1990; 68: R7-14.
- Truner NC, Power RF, Polak JM, et al. Contraction of rattracheal smooth muscle by endothelin. Br J Pharmacol 1989; 96: 103.p.
- Word RA, Kamm KE, Stull JT, Casey ML. Endothelin increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. Am J Obstet Gynecol 1990; 162: 1103-1108.
- Wiklund NP, Ohlen A, Cedervist B. Inhibition of adrenergic neurotransmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. Acta Physiol Scand 1988; 134: 311-312.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988; 332: 411-145.