

DNA Chip을 이용한 자궁평활근종과 정상 자궁근조직에서의 유전자발현 비교 분석

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, 미생물학교실*,
경북대학교 의과대학 면역학교실[†]
권상훈 · 조치흠 · 차순도 · 백원기* · 김문규[†] · 김정철[†]

=ABSTRACT=

Gene Expression Analysis between Uterine Leiomyoma and Normal Myometrial Tissues by DNA Chip

Sang Hoon Kwon, M.D., Chi Hum Cho, M.D., Soon Do Cha, M.D.,
Won Ki Back, M.D.* , Moon Kyu Kim, M.D.[†], Jung-Chul Kim, M.D.[†]

*Department of Obstetrics and Gynecology, Microbiology, School of Medicine,
Keimyung University,

[†]Department of Immunology, Kyungpook University, School of Medicine, Daegu, Korea

Objective : To investigate the difference of gene expressions between leiomyoma and normal myometrial tissue was analyzed by DNA Chip.

Methods : cDNAs retro-transcribed from equal quantities of mRNA derived from leiomyoma and corresponding normal myometrial tissue were labeled with Cy5 and Cy3 fluorescein as probes. The mixed probe was hybridized with two pieces of 3,066 double dot from a human dermal papilla cell cDNA library and scanned with a laser scanner. The acquired image was analyzed by ImaGene 3.0 software. Validation of gene expression was performed by reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) in 5 leiomyomas and corresponding normal myometrial tissues.

Results : Among many differentially expressed genes, genes with expression levels more than 3 times were found by comparing leiomyoma with corresponding normal myometrial tissue. One gene with expression levels lesser than 3 times in leiomyoma tissue compared to normal myometrial tissue was also detected. Although alterations of several genes, such as osteoblast specific factor 2, PAI-1 mRNA-binding protein, hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase alpha subunit (HADHA), p311, DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1 (DDX1), Hexokinase 1, 2 were identified in a significant high fraction of uterine leiomyoma compared to normal myometrial tissue. Cyr61 gene was shown to be markedly down-regulated in leiomyoma compared with the matched uterine myometrial control. I validated differential expression of genes by RT-PCR and demonstrated overexpression of OSF-2, HADHA, p311, DDX1, Hexokinase 1, 2.

Conclusion : DNA chip techniques are effective in screening differential gene expression between leiomyoma tissue and normal myometrial tissue. These genes may be related to the genesis and development of uterine leiomyoma. Analysis of the human leiomyoma gene expression profile by DNA chip may be helpful gene diagnosis, treatment and prevention of this disease.

Key Words : Uterine myoma, DNA chip

자궁근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종 (myoma) 또는 평활근종

(leiomyoma)이라 불리고 있다. 이 양성 종양은 가임 연령 여성의 20%에서 존재하고, 40세 이상의 여성에서는 40-

50%가 발견된다.¹² 자궁근종의 원인은 현재까지 그 원인이 정확하게 알려져 있지 않으나, 자궁 평활근내에 있는 하나의 신생세포 (neoplastic cell)에서부터 기인한다고 알려져 있다.³ 이외에 가족적 경향도 있고, 임신중에는 크기가 커지고 폐경 후에는 크기가 줄어드는 형태를 보이므로 여성호르몬의 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 이것이 주된 원인이라 말할 수는 없다. 우리나라에서 시행되는 전자궁적출술에 있어 45%에서 자궁근종을 적응증으로 시술되고 있다.⁴ 미국에서는 연간 150,000-175,000명의 환자가 자궁근종 때문에 자궁적출술을 시행하고 있다.⁵ 그러나 자궁근종을 가진 환자 중 아기를 원하는 여성에서는 자궁의 보존이 무엇보다도 중요하다고 하겠다.⁶ 자궁근종을 가진 많은 환자들이 단순히 수술로 제거하기보다는 약물 치료나 보존적 치료를 원하고 있다. 그러므로 자궁근종의 원인을 밝히고 이 원인을 근본적으로 치유하여 모든 여성에서 전자궁적출술이라는 수술적 치료보다는 약제 개발을 통한 비수술적 치료의 접근이 이루어진다면 획기적인 치료법이 될 것이다. 지금까지 사용하는 약물 치료로서 여성호르몬 생성을 일시적으로 감소시키는 GnRH (Gonadotropin releasing hormone) 효능제 투여가 시행되고 있으나, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다.⁷ 이에 동일인에서 자궁근종과 정상 자궁조직이 상존하므로, 같은 유전자의 발현을 비교 분석하는 좋은 모델이 된다는 생각과, 양쪽을 비교 분석하면 분명히 차이가 있는 것이 존재할 것으로 생각되어, DNA chip을 이용한 분석을 통하여 유전자 치료 target으로서의 새로운 유전자를 발견하고자 본 연구를 계획하였다.

연구 대상 및 방법

계명대학교 의과대학 산부인과에서 조직학적으로 확진된 4명의 자궁근종 환자의 전자궁적출술시 조직을 채취하여 즉시 RNA를 분리하였다. 환자들의 특성은 연령별로 43세에서 48세 사이였고, 월경 주기는 증식기 3예, 분비기 1예 이었다. DNA chip 분석 후 선택된 유전자는 10쌍의 자궁근종과 정상 자궁 조직에서 분리된 RNA를 대상으로 RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction)을 이용하여 확인하였다. Triagent (Sigma, Inc., USA)를 사용하여 total RNA를 분리한 후 mRNA만을 분리하였다.

Total RNA 분리는 다음과 같이 시행하였다. 조직 100 mg에 Triagent를 2 mL 넣고 homogenizer로 15,000 rpm에서 3분 정도 조직을 파쇄시키고, 세포 용해액 2 mL 당 0.2 mL의 chloroform을 넣고 15초간 잘 혼합하고 4℃

로 15분 원심하여 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 동량의 2-propanol을 넣고 -70℃에 2시간 방치하였다. 이를 12,000 rpm에서 4℃로 15분 원심하여 RNA 침사를 얻은 후 75% cold ethanol로 세척하고 Speedvac concentrator (Savant Co., USA)에서 5분간 건조시킨 다음 여기에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수 100 μ L를 넣어 녹인 후 UV 분광광도계 (spectrophotometer)로 농도 및 순도를 측정하고 -70℃에 보관하였다. 대조군 및 시료의 total RNA 30-50 μ g을 20.5 μ L 내에서 oligo (dT)와 annealing시켰다. Cy3 (정상자궁 RNA)과 Cy5 (자궁근종 RNA)에 total RNA (~3 μ g/ μ L)를 15 μ L 이하, Lambda 1.0 kb mRNA (1 ng/L)를 1 μ L, Oligo dT (1.5 μ g/ μ L)를 3 μ L, DEPC-water를 넣어 20.5 μ L를 맞추어 annealing시켰다. 튜브를 70℃에서 5분간 반응시킨 후 바로 얼음에 넣고 RT 반응을 위해 reaction mixture를 20.5 μ L, 5 X RT buffer 8 μ L, low dT NTP (dTTP 2 mmol/L, dATP, dCTP, dGTP 5 mmol/L) 4 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L, RT (20 U/ μ L) 2.5 μ L를 넣어 전체 양을 40 μ L로 하였다. 형광물질을 사용하기 때문에 가능한 빛을 차단하고 실험하였다. 42℃에서 1시간 동안 반응시키고 RT (20 U/ μ L)를 2.5 μ L 더 넣고 42℃에서 1시간 더 추가로 반응시켰다. 0.5 mol/L EDTA 5 μ L 넣어 반응을 멈추게 하고 1N NaOH를 10 μ L 넣고 37℃에서 10분간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 1 mol Tris-Cl, pH 7.5를 25 μ L 넣어 중화시켰고 CentriSep spin column을 이용해 표지된 first strand cDNA를 정제하였다. 0.1배의 3 mol/L NaOAc와 2.5배의 100% ethanol을 넣어 잘 섞어준 후, -70℃ deep freezer에 15분 이상 두어 침전시키고 14,000 rpm 4℃ 15분간 원심하였다. 차게 해놓은 70% ethanol 1 mL로 세척하고 14,000 rpm 5분간 원심하였다. DNA 침전을 잘 말린 후에 hybridization buffer 15 μ L에 녹였다. DNA chip slide glass의 probe 위에 prehybridization buffer를 15 μ L 정도 떨어뜨리고 cover glass를 덮고 상온에 2시간 동안 방치하였다. 2 X SSC 용액에 담귀 cover glass를 떼어내고 이때 slide glass에 손상이 되지 않도록 주의하였다. 2 X SSC 용액으로 2분간 세척하고 다시 0.2 X SSC 용액에서 2분간 세척하였다. Slide glass를 원심분리기에서 1,000 rpm으로 3분간 원심하여 완전히 말렸다. Labeled target cDNA를 95℃ 물중탕에 2분간 놓은 뒤 바로 얼음에 놓고 튜브를 14,000 rpm에서 8분간 원심하여 용액을 모았다. Probe가 놓여 있는 부위에 labeled target을 떨어뜨리고 prehybridization때와 동일하게 cover glass를 덮었다. DNA chip slide glass를 62℃에서 12-16시간 동안 반응시켰다. 50 mL tube에 Kimwipes같은 2 X SSC를 1 mL 뿌려 건조를 방지하였다. 58℃로 가온시킨 2 X SSC/0.2% SDS 용액에 DNA chip을 담귀서 cover glass를 떼어내고 2 X

SSC/0.2% SDS로 58℃에서 30분간 2번 세척하였다. 50 mL tube에 세척 용액과 함께 slide를 넣고 hybridization oven에서 회전시키며 30분간 세척하였다. 0.05 X SSC 용액으로 상온에서 5분간 세척하고 원심분리기에서 1,000 rpm으로 3분간 원침하여 완전히 말렸다. DNA chip 전용 slide scanner를 사용하여 형광 강도를 분석하였다. 계명대학교 동산의료원 산부인과에서 자궁근종 수술 시 얻어지는 조직 10예를 대상으로 cDNA microarray 법으로 얻어진 유전자 발현 정보를 RT-PCR법으로 확인하였다. 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., USA), 2.5 U/µL MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co., USA), 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 osteoblast specific factor 2 (OSF-2), PAI-1 mRNA-binding protein (PAI-RBP1), hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase alpha subunit (HADHA), p311, DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1 (DDX1), Hexokinase 1, 2 유전자의 sense 및 antisense primer를 각각 1 µL (30 µmol/L)를 넣은 mixture에 1 µL의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin-Elmer Co., USA)를 넣은 후 증류수로 50 µL로 용량을 맞추고 30 µL의 mineral oil을 증충한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 µL를 1% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

결 과

조직학적으로 확진된 자궁근종 4예의 환자에서 자궁근종 조직과 정상자궁근 조직을 3,066개의 유전자를 배열한 DNA Chip 분석을 시행하였다. 개체간의 오차를 줄이기 위해 동일 검체에서 2번의 실험을 하였다. 분석 결과 3배 이상의 발현증가가 있는 유전자와 3배 이하의 감소를 보이는 유전자를 선택하였다 (Fig. 1).

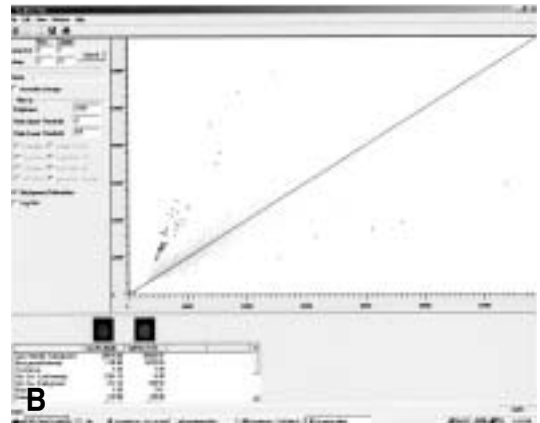
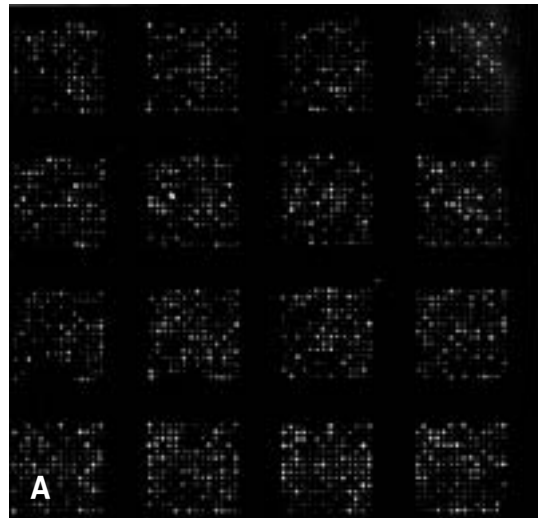


Fig. 1. A: Cy3 (green) and Cy5 (red) images of a sub-grid of M2500 slides after self-against-self hybridization were overlaid to show relative expression of each spots in both channels, B: DNA labeled targets were hybridized to M2500 slides, containing 3,066 spots. The scatter plot indicates a majority of spots lie within 2-fold lines.

자궁근종에서 발현 감소를 보인 유전자는 Cyr61이었으며, 3배 이상의 증가를 보인 것은 OSF-2, PAI-RBP1, HADHA, p311, DDX1, Hexokinase 1, 2 등이었다. 이러한 증감의 변화를 관찰하기 위해 RT-PCR을 이용하였다. 이 중에 OSF-2, HADHA, p311이 근종에서 증가를 보였으며 (Fig. 2 & 3), 특히 OSF-2의 경우에는 80% 이상에서 증가를 관찰할 수 있었다.

고 찰

자궁근종은 양성 질환으로서 대부분 수술적 제거로써 쉽게 치료가 되기 때문에 본 연구와 같은 분자 생물학적인 접근을 통한 원인 분석이나 유전자 치료에 대해서는 많은 연구가 행해지지 않고 있다. 또한 근종을 일으키는 원인에 대해서도 잘 알려져 있지 않다. 그러나 많은 연구 보고에서 estrogen과 progesterone이 근종이 자라는데 기여하고 있다는 것은 잘 알려진 사실이다.⁸⁻¹⁰ 자궁근종은 여성에서는 가장 흔한 질병 중의 하나이지만, 지금까지 적절한 치료는 수술 밖에는 없는 실정이다. 약물 치료로서 단기간의 효과를 얻는 GnRH 효능제 치료가 있지만 장기간 사용시 폐경을 유도하여 6개월 이상 사용은 불가능하다.¹¹ 그러므로 장기간 사용하거나 부작용 없이 사용할 수 있는 약제의 개발이 절실하다. 현재 외국에서는 다양한 각도에서 자궁근종의 약물 치료를 개발하고 있으나 아직까지는 우수한 치료법이 없다. 자궁근종이 호르몬과 관계한다고 생각하여 progesterone receptor blocker인 RU-486을 세포주 수준에서 검사하여 효과가 있다는 보고가 있으나¹² 이것도 장기간의 효과에 대해서는 검증되지 않았다. 이외에 폐섬유증 (pulmonary fibrosis)의 치료제로 시험하고 있는 antifibrotic agent인 pirfenidon을 이용하여 근종의 세포 증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다.¹³ Nowak 등^{14,15}은 성장인자가 근종 세포의 증식 및 collagen이나 혈관 등을 자극하여 자궁근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장인자를 차단함으로써 치료 약제로서의 가능성을 연구하고 있다. 또한 유전적인 연구도 진행되어 근종의 40%에서 염색체 이상을 동반한다고 알려져 있고 이것이 자매간이나 수직으로 영향을 받는 인자에 대한 연구도 행해지고 있다.¹⁶ 이와 같이 자궁근종의 약제를 이용한 치료는 원인이 밝혀지지 않았기에 도전할 가치가 충분히 있는 것으로 생각되고, 자궁근종은 DNA chip을 사용할 때 정상과 비정상이 동일인에 존재하므로 비교가 용이한 것으로 생각되며, 또한 이것을 4회 연속 반복함으로써 개체간의 오차도 줄일 수 있다고 생각되어 실험을 수행하였다.

DNA chip 실험은 Human dermal papilla cell cDNA library로부터 구축된 3,066개의 유전자를 이용하여 자궁근종과 정상자궁조직의 유전자 발현 차이를 비교 분석하였다. 근종에서 정상과 비교해서 낮게 발현된 것은 Cyr61이고, 자궁근종에서 Cyr61유전자 발현감소가 난포 호르몬과 basic fibroblast growth factor에 의한 조절장애와 관련이 있다는 것이 이미 알려져 있어,¹⁷ 이것을 제외하고 근종에서 발현이 높게 나타난 유전자이면서 현재

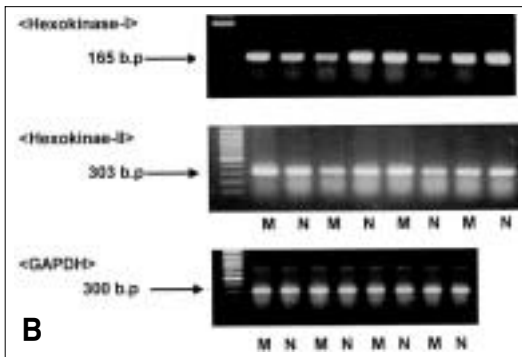
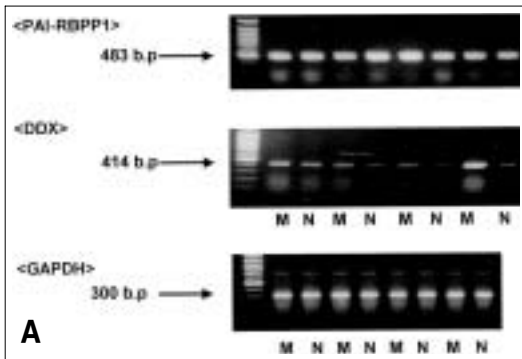


Fig. 2. A: RT-PCR analysis of PAI-RBP1, DDX1 and GAPDH mRNA expression in leiomyomas and normal myometrial tissues, B: RT-PCR analysis of Hexokinase 1, 2 and GAPDH mRNA expression in leiomyomas and normal myometrial tissues. M: leiomyoma, N: normal myometrium.

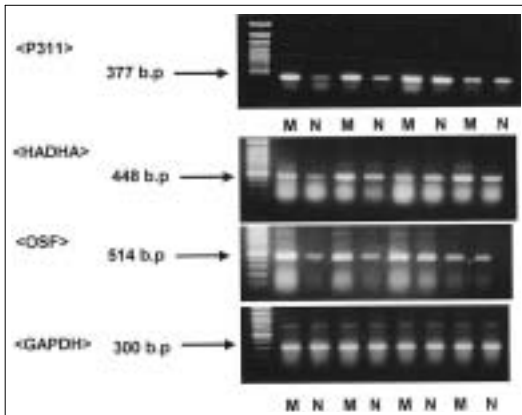


Fig. 3. RT-PCR analysis of p311, HADHA, OSF-2 and GAPDH mRNA expression in leiomyomas and normal myometrial tissues. M: leiomyoma, N: normal myometrium.

까지 근종과의 관계가 밝혀져 있지 않은 유전자들을 대상으로 10예의 새로운 조직에서 RT-PCR을 이용하여 발현을 비교분석 하였다. 정상과 비교해서 3배 이상의 발현 증가를 보인 것은 OSF-2, PAI-RBP1, HADHA, p311, DDX1, Hexokinase 1, 2 등이었다. 이러한 유전자들은 현재까지 그 기능이 정확히 밝혀지지 않은 것으로 자궁근종과의 상관 관계에 대한 보고가 없는 경우들이었다. 그러나 이 유전자들이 다른 자궁근종의 조직에서도 정상 자궁조직보다 많은 발현이 있는지 검증이 필요하였다. 이러한 검증 중의 하나로 초기적으로 RT-PCR을 시행하여 무작위 추출한 자궁근종에서의 발현을 비교하여 HADHA, p311과 OSF-2 유전자들의 의미 있는 증가가 관찰되었다 (Fig. 2 & 3). HADHA와 p311은 유전자의 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않아, 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. OSF-2는 다른 용어로 periostin 이라고도 불리며, mouse 세포주인 MC3T3-E1에서 분리 동정되었다. 이후에 human periostin은 골육종과 태반에서 clon되었다.^{18,19} OSF-2는 β igH3와 homology를 보이며, transforming growth factor (TGF)- β 1에 의해서 유도되어 fibroblast의 유착과 전이에 영향을 끼친다.^{20,21} 또한 fasciclin과도 homology가 있어, 세포 유착에도 관계하는 것으로 알려져 있다.²² 또한 장암이나 유방암과 임신중독 증 환자에서도 증가를 보고하였다.²³ 이러한 것과 지금까지 밝혀진 자궁근종에서의 분자생물학적 변화와 연결하면, 자궁근종에서 TGF- β 의 증가는 collagen type I, III와 fibronectin의 생산 증가로 나타난다.¹⁵ 이외에 자궁근종에서 angiogenic growth factor의 증가도 보고되어, fibroblast growth factor와 vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor의 증가가 근종의 증가와 밀접한 관계가 있다고 하였다.²⁴ 이러한 것으로 볼 때 OSF-2의 증가는 의미있는 발견으로 생각되어지고, OSF-2와 자궁근종과의 관계를 밝히기 위한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

이 연구의 주목적은 DNA Chip을 이용하여 자궁근종의 원인 인자를 규명하고자 하였고, 몇몇의 관련 유전자를 발견하여 의미있는 결과를 얻었다. 그러나 저자가 사용한 유전자는 human dermal papilla cell cDNA library로부터 구축된 3,066개의 유전자를 이용하여 실험하였고, 과거보다는 많이 수가 증가된 것이지만, 자궁근종의 연구에 더 적합한 library를 구축하여 실험을 하는 것이 바람직하다 하겠다. 이러한 결과의 기초적인 의미를 가지고, 원인 규명에 따른 작용 기전을 밝히고, 치료의 방법을 찾을 수 있다면 DNA Chip을 이용한 실험은 매우 중요하다 하겠다. 이 연구를 통해 저자는 자궁근종에서 증가하는 유전자를 찾을 수 있었고, 향후 연관성과 기전을 밝혀 진단 및 치료에 도움이 될 수 있는 연구가 계속 되어야 할 것으로 생각된다.

자궁근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종 (myoma) 또는 평활근종 (leiomyoma)이라 불리고 있다. 이 양성 종양은 가임 연령 여성의 20%에서 존재하고, 40세 이상의 여성에서는 40-50%가 발견되는 가장 흔한 양성 종양중의 하나이다. 자궁근종의 원인 규명을 위해서는 자궁근종과 정상자궁근에서의 유전자발현 변화에 대한 연구가 필요하며, 동일인에서 근종과 정상근의 사이에 존재하는 다량의 유전자발현 차이 비교가 용이한 DNA chip을 사용하여 자궁근종의 원인 규명과 치료제 개발의 target이 될 수 있는 유전자를 발굴하기 위하여 이 연구를 계획하였다. 대상은 자궁근종 4예와 동일인에서의 정상 자궁근조직 4예를 3,066개의 human genes를 대상으로 DNA chip을 이용하여 비교 분석하였다. 의미 있는 결과를 보인 유전자에 대해서는 reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하여 초기적인 검증을 시행하였다. 환자의 연령은 43-48세였고, 자궁 내막의 월경 주기는 증식기가 3예, 분비기가 1예이었다. 유전자의 증가를 비교하여 근종에서 3배 이상의 증가를 보인 것은 osteoblast specific factor 2, PAI-1 mRNA-binding protein, hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase alpha subunit, p311, DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1, Hexokinase 1, 2 등이었다. 증가된 유전자에 대한 검증은 RT-PCR을 통해 수행하였다. 자궁근종과 인접 정상자궁조직과의 DNA chip을 통한 비교 분석으로 자궁근종에서의 몇 가지 의미있는 유전자의 증가를 확인하였으며, 이는 자궁근종의 원인과 치료를 위한 접근에 도움을 줄 것으로 생각되며 향후 자궁근종 세포주를 통한 유전자 치료의 target으로서의 가능성도 있을 것으로 사료된다.

- 참고문헌 -

1. Zaloudek CJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In Kurman RJ(Eds): Blaesteins' pathology of the female genital tract. 4th ed. New York, 1994, pp484-94.
2. Hendrickson MR, Kempson RL. Pure mesenchymal neoplasms of the uterine corpus. In Fox H and ells M(Eds): Obstetrical and gynecological pathology. 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1995, pp542-73.
3. Townsend DE, sparkes RS, 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.
4. 신영우, 변영진, 나영호, 김창학, 권순옥. 복식 전자공적출술에 관한 임상 통계적 고찰. 대한산부인과학회지 1985; 28: 90.
5. Gambone JC, Reiter RC, Lench JB, Moore JG. The impact of a quality assurance process on the frequency and confirmation rate of hysterectomy. Am J Obstet Gynecol 1990; 63: 545-50.
6. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. Fertil Steril 1981; 36: 433-45.
7. West CP, Lumsden MA, Lawson S, Williamson J, Baird DT. Shirinkage

of uterine fibroids during therapy with goserelin(Zoladex): a lutenizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 1987; 48: 45-51.

8. Farber M, Conrad S, Heinrichs NL, Herrman WL. Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium. *Obstet Gynecol* 1972; 40: 479-83.
9. Wilson EA, Yang F, Rees ED. Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyoma and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol* 1980; 55: 20-4.
10. Otubu JA, Buttrum VC, Besch NF, Besch PK. Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 143: 130-3.
11. Stewart EA, Friedman AJ. Steroidal treatment of myomas: preoperative and long term medical therapy. *Semin Reprod Endocrinol* 1992; 10: 344-57.
12. 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.
13. Lee BS, Marolin SB, Nowa RA. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibit leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clinic Endocrinol Metab* 1998; 83: 219-23.
14. Nowak RA. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. *Environ Health Perspect* 2000; 108(Suppl 5): 849-53.
15. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- β 3(TGF- β 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF β 3. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 913-20.
16. Ligon AH, Morton CC. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 8-14.

17. Sampath D, Zhu Y, Winneker RC, Zhang Z. Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN(CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 β -estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1707-15.
18. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993; 294: 271-8.
19. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor β . *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1239-49.
20. LeBaron RG, Bezverkov KV, Zimmer MP, Pavelec R, Skonier J, Purchio AF. β IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor- β is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 844-9.
21. Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF. cDNA cloning and sequence analysis of β IG-H3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor β . *DNA Cell Biol* 1992; 11: 511-22.
22. Zinn K, McAllister L, Goodman CS. Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and Drosophila. *Cell* 1988; 53: 577-87.
23. Sasaki H, Roberts J, Lykins D, Fujii Y, Auclair D, Chen L. Novel chemiluminescence assay for serum periostin levels in women with preeclampsia and in normotensive pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 103-8.
24. Klagsbrun M, Druz S. Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 213-7.

=국문초록=

자궁근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종 (myoma) 또는 평활근종 (leiomyoma)이라 불리고 있다. 이 양성 종양은 가임 연령 여성의 20%에서 존재하고, 40세 이상의 여성에서는 40-50%가 발견되는 가장 흔한 양성 종양중의 하나이다. 자궁근종의 원인 규명을 위해서는 자궁근종과 정상자궁근에서의 유전자발현 변화에 대한 연구가 필요하며, 동일인에서 근종과 정상근의 사이에 존재하는 다량의 유전자발현 차이 비교가 용이한 DNA chip을 사용하여 자궁근종의 원인 규명과 치료제 개발의 target이 될 수 있는 유전자를 찾기 위하여 이 연구를 계획하였다. 대상은 자궁근종 4예와 동일인에서의 정상 자궁근조직 4예를 3,066개의 human genes를 대상으로 DNA chip을 이용하여 비교 분석하였다. 의미 있는 결과를 보인 유전자에 대해서는 reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하여 초기적인 검증을 시행하였다. 환자의 연령은 43-48세였고, 자궁 내막의 월경 주기는 증식기가 3예, 분비기가 1예이었다. 유전자의 증가를 비교하여 근종에서 3배 이상의 증가를 보인 것은 osteoblast specific factor 2, PAI-1 mRNA-binding protein, hydroxacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase alpha subunit, p311, DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 1, Hexokinase 1, 2 등이었다. 증가된 유전자에 대한 검증은 RT-PCR을 통해 수행하였다. 자궁근종과 인접 정상자궁근조직과의 DNA chip을 통한 비교 분석으로 자궁근종에서의 몇 가지 의미있는 유전자의 증가를 확인하였으며, 이는 자궁근종의 원인과 치료를 위한 접근에 도움을 줄 것으로 생각되며 향후 자궁근종 세포주를 통한 유전자 치료의 target으로서의 가능성도 있을 것으로 사료된다.

중심단어 : 자궁평활근종, DNA chip