

## 자궁내막증에서 Cyclins-CDKs와 CDKIs에 의한 세포주기 조절경로에 관한 연구

\*이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실, 연세대학교 의과대학 산부인과학교실  
정경아\* · 박기현 · 윤현숙 · 윤정미 · 손우현 배상욱 · 김영태  
이병석 · 서 경 · 김세광 · 조동제 · 송찬호

=ABSTRACT=

### Cell Cycle Signaling Pathway by Cyclins-CDKs and CDKIs in Endometriosis

Kyung-Ah Jeong, M.D.\*, Ki-Hyun Park, M.D., Hyun-Sook Yoon, Ph.D.,  
Jeong-Mi Yoon, Ph.D., Woo-Hyun Sohn, M.D., Sang-Wook Bai, M.D.,  
Young-Tae Kim, M.D., Byung-Seok Lee, M.D., Kyung Seo, M.D.,  
Sei-Kwang Kim, M.D., Dong-Jae Cho, M.D., Chan-Ho Song, M.D.

\*Department of Obstetrics and Gynecology, Ewha Womans University College of Medicine,  
Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective :** This study was undertaken to evaluate the cell cycle signaling pathway by cyclins-cyclin dependent kinases (CDKs) and cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs) in endometriosis.

**Methods :** 38 women with endometriosis were recruited. Endometrioma and the normal ovarian tissues were obtained during laparoscopic surgery on the follicular phase of menstrual cycle. And then, the normal endometrial tissues were taken by curettage. Nuclear proteins (cyclin D1, cyclin E etc), CDK molecules and CDK inhibitors (p27<sup>kip1</sup>, p21 etc) were quantitated on transcriptional and translational levels by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis.

**Results :** In RT-PCR analysis, the expression of cyclin D1-CDK6, cyclin E-CDK2 of endometrioma and eutopic endometrium was increased, and the expression of p27<sup>kip1</sup> was decreased compared with normal ovary. The mRNA expression of cyclins-CDKs and p27<sup>kip1</sup> was not significantly different between endometrioma and eutopic endometrium. In Western blot analysis, the expression of cyclin D1-CDK6, cyclin E-CDK2 was significantly increased and the expression of p27<sup>kip1</sup> was significantly decreased in endometrioma and eutopic endometrium compared with normal ovary. And, the expression of p27<sup>kip1</sup> in endometrioma was further decreased than that of eutopic endometrium.

**Conclusion :** These results suggest that p27<sup>kip1</sup> on the translational level, in the cell cycle signaling pathway, was closely related to endometriosis. In future, further experimental studies will be needed for the understanding of the cell cycle signaling pathway in endometriosis.

**Key Words :** Endometriosis, Cyclin, Cyclin dependent kinase, Cyclin dependent kinase inhibitor, Cell cycle signaling pathway

자궁내막증은 가임기 여성의 약 3-10%에서 발생하는 비교적 흔한 질환으로 불임 여성에서는 25-30%까지 보고되고 있다.<sup>1,2</sup> 자궁내막증은 자궁내막 조직이 자궁 이

외의 부위에 존재하는 진행성 질환으로 난소, 난관 뿐만 아니라 자궁인대, 장, 방광, 복막까지 침범할 수 있다. 그 발생기전을 규명하려는 여러 연구가 계속되어 왔으나

접수일 : 2002. 11. 12.  
주관책임자 : 박기현

\* 본 논문은 2001년 연세대학교 의과대학 강사연구비 지원으로 연구되었음.

아직 확실하게 밝혀진 바 없고 특히 분자생물학적인 기전에 대한 연구는 많이 시행되어 있지 않다.

세포주기 (cell cycle)에서 다음 단계로의 이행 (transition)은 각 단계에 특정한 cyclin과 그 촉매작용을 일으키는 cyclin-dependent kinase (CDK)의 상호작용에 의해 조절된다.<sup>3,4</sup> Cyclin-CDK complex의 활성도는 세포주기의 진행을 억제하는 CDK 억제제 (CDKI)에 의하여 조절되는데<sup>5</sup> 대표적으로 CDK4, CDK6, cyclin D의 활성을 억제함으로써 세포주기의 초기단계에 억제효과를 나타내는 INK4 family ( $p15^{Ink4b}$ ,  $p16^{Ink4a}$ ,  $p18^{Ink4c}$ ,  $p19^{Ink4d}$ )와 여러 cyclin-CDK complex에 작용하여 세포주기의 여러 단계에서 억제효과를 보이는 CIP/KIP family ( $p21^{Waf/Cip1}$ ,  $p27^{Kip1}$ ,  $p57^{Kip2}$ )가 있다.

CDKI는 암억제유전자로 제시되어 이에 관한 여러 연구가 진행되어져 왔으며<sup>6,7</sup> 난소암에서의  $p27^{Kip1}$  발현의 소실과 cyclin E, CDK2의 유의한 과발현이 보고된 바 있다.<sup>8</sup> 자궁내막에서는  $p16^{Ink4a}$ 와  $p21^{Waf/Cip1}$ 의 면역반응이 부분적으로 약화되어 있음이 발견되었으며,<sup>9,10</sup> 최근 연구에서는 CDKI  $p27^{Kip1}$ 이 프로세스테론으로 유도된 자궁내막의 성장 억제에 관여하고 자궁내막 선세포를 음성적으로 조절한다고 밝혀졌다.<sup>11</sup> 또한  $p27^{Kip1}$ 은 TGF- $\beta$ 와 같은 세포의 항증식성 신호 (extracellular antiproliferative signal)에 반응하여 세포주기의 정지를 유도한다.<sup>12,13</sup>

본 연구는 자궁내막종과 연관된 cyclin-CDK, CDKI의 세포주기 조절경로에서의 이상에 관하여 알아보고자 시행하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 환자 선택 및 검체 채취

2002년 1월부터 8월까지 신촌세브란스병원 산부인과에 불임 또는 심한 생리통을 주소로 내원하여, 월경 주기 중 난포기에 복강경을 시행한 환자의 조직 검사에서 자궁내막종으로 진단받은 38명을 대상으로 시행하였다. 이들은 수술 전 6개월 이내에 호르몬 치료를 시행받지 않았다. 환자들은 수술 중에 난소의 자궁내막종 조직 및 대조군으로 정상 조직을 일부 채취하였고 소파술로 자궁내막 조직을 채취하였다.

### 2. Total RNA의 추출

Total RNA의 추출을 위하여 500  $\mu$ l의 Trizol<sup>®</sup> (Gibco BRL)이 들어있는 tube에 조직을 0.3 cm cubic형으로 첨가하였다. Tube를 4°C로 유지한 상태에서 plastic pestle로 조직을 마쇄하여 상온에서 5분간 방치했다. 총량의 10%에 해당하는 50  $\mu$ l의 chloroform (Sigma)을 첨가하여 15초간 고루 섞어 준 후 4°C에서 14분간 방치했다. 12,000

rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액과 동량의 isopropanol (Sigma)을 고르게 섞어 30분간 -70°C에서 방치하거나 -20°C에서 overnight한 뒤 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물에 70% ethanol을 첨가한 후 7,500 rpm에서 8분간 원심분리하고 상층액을 버린 다음 공기중에서 건조시켰다. 이에 DEPC (diethyl pyrocarbonate, Sigma) 증류수 30  $\mu$ l를 첨가, 55°C에서 10분간 용해시킨 후 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도와 정제도를 측정하고 (UV-1601PC, Shimadzu), -70°C 급속냉동 냉장고에 보관하였다.

### 3. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

세포주기 조절인자들의 전사단계 발현양상을 알아보기 위해 total RNA 1  $\mu$ g을 5 $\times$  RNA PCR buffer, dNTP (2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), oligo dT primer, RNase inhibitor, AMV reverse transcriptase (Promega)를 포함하는 반응용액 속에서 70분 동안 42°C에서 반응시킨 후, 95°C에서 5분간 효소를 불활성화시켰다 (GeneAmp PCR System 9600). 선행과정에 의해 생성된 cDNA를 주형 (template)으로 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 시행했다. 동량의 cDNA에 MgCl<sub>2</sub>가 함유된 10 $\times$  PCR buffer, dNTP (2.5 mM), 각각의 10 pmol primer pairs들을 이용하여 Taq DNA polymerase (Promega) 용액 속에 중합 반응을 수행하였다. 최초 94°C에서 1분간 변성 (denaturation)시킨 후, 94°C에서 1분, 각각의 primer sequence에 따라 결정된 annealing 온도에서 1분, 72°C에서 50초 효소 반응시키는 것을 한 cycle로 하여 28회 반복하여 증폭하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 수행했다. 반응 후 5  $\mu$ l의 PCR product에 6 $\times$  loading buffer (0.25% bromophenol blue in 40% glycerol) 1  $\mu$ l를 넣은 후, 2% agarose gel에서 전기 영동하여 그 존재를 확인하고, densitometric analysis 과정을 통해 결과를 정량적으로 분석하였다.

실험에 사용된 primer는 GenBank에 등록된 cDNA sequences를 기초로 computer program (DNA STAR)를 이용하여 GC함량과 구조적 특성이 연구 목적에 적합하도록 고안하였으며, 염기서열과 생성물의 크기는 Table 1과 같았다. 각각의 생성물들은 GenBank에 등록된 cDNA의 서열과 비교 검증하기 위하여 sequencing을 시행하였다. PCR은 각 primer set에서 GC content에 의거하여 최적온도를 계산하여 실행하였고, 위양성 결과를 피하기 위해 총 cycle의 수는 35 cycle을 넘지 않도록 조절하였다.

### 4. 단백질 추출 (protein extraction)

전사 후 과정에서 각각의 세포주기 조절인자 단백질

Table 1. Primer sequences of reverse transcription- polymerase chain reactoin

	Forward	Reverse	Product size
*GAPDH	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	452 bp
Cyclin D1	5'-AGG AGA ACA AAC AGA TCA-3'	5'-TAG GAC AGG AAG TTG TTG-3'	162 bp
Cdk6	5'-CGA ATG CGT GGC GGA GAT C-3'	5'-CCA CTG AGG TTA GAG CCA TC-3'	449 bp
Cyclin E	5'-AAT AGA GAG GAA GTC TGG-3'	5'-AGA TAT GCA ACC TGC ATG-3'	440 bp
Cdk2	5'-GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG-3'	5'-GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT-3'	316 bp
p27 <sup>kip1</sup>	5'-CCG GCT AAC TCT GAG GAC AC-3'	5'-AGA AGA ATC GTC GGT TGC AG-3'	120 bp

\*GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

의 발현 및 활성형태를 확인하고자 Western blot analysis를 실시하였다. 각각의 실험군으로부터 얻어진 조직에 500  $\mu$ l의 lysis buffer (NP-40 homogenization buffer, 1 mM PMSG, 1  $\mu$ g/ml aprotinin & leupeptin)를 첨가하여 조직을 분쇄한 후 4 $^{\circ}$ C 30분간 방치하고 13,000 rpm에서 4 $^{\circ}$ C 10분간 원심분리한 뒤 bovine serum albumin (BSA)을 표준 시료로 하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 (UV-1601PC, Shimadzu) 각 시료의 단백질량을 정량했다.

### 5. Western blot analysis

각 실험군으로부터 20  $\mu$ g의 단백질에 aceton 100  $\mu$ l를 첨가하고 잘 섞은 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리했다. 침전물을 공기중에서 건조시킨 후 sample buffer (0.125 M Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue) 20  $\mu$ l를 첨가, 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 중탕한 뒤 SDS-polyacrylamid gel (15%)를 이용하여 100 V에서 1시간 30분 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 electroblotting하기 위한 transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol, 3.75 ml 10% SDS/L)에 옮기고, blotting에 사용한 Immobilon<sup>TM</sup>-P membrane (Milipore)을 gel 크기로 잘라 methanol에 적셔 흡습성을 부여한 후 transfer buffer에 담가두었다. Electroblotting은 semi-dry transfer system (Bio-Rad Trans-blot SD semidry transfer cell)을 사용하며, 12 V로 45분 동안 실시했다. Blotting이 끝난 membrane은 tween-tris buffered saline (TTBS; 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, Tween-20 1 ml/L)에 충분히 세척한 다음 blocking buffer (5% skim milk in TTBS)로 옮겨 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Blocking이 끝난 membrane은 적절하게 희석된 각 이차항체에 적합한 일차항체로 한 시간 이상 상온에서 반응 혹은 overnight시켜 반응시키고, TTBS로 10분간 3번 세척하여 일차항체를 충분히 제거한 후 이차항체 (BD PharMingen Co.)로 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 이차항체를 충분히 제거하기 위하여 TTBS로 5분씩 5회 세척한 후 TTBS를 제거하고 ECL kit (Amersham Pharmacia Co.)를 사용하여 발색하고 필름에 감광하였다.

### 6. 통계학적 분석

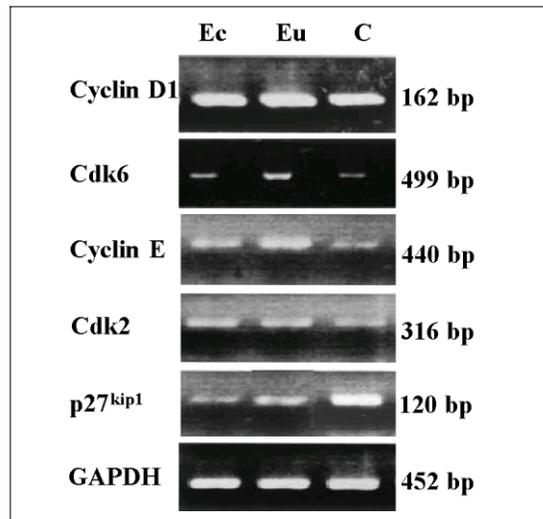
통계 처리는 SPSS (10.0)을 사용하였으며 유의성 검정은 one-way ANOVA, t-test 방법에 의하여 유의수준을 0.05로 기준하였다.

## 결 과

본 연구의 대상이 된 환자들의 평균 연령은 32.0 $\pm$ 6.4세 (범위: 22-45세)였다.

### 1. RT-PCR

분리정제된 RNA를 이용하여 RT-PCR의 방법으로 각 유전자의 발현정도를 확인하였다 (Fig. 1). GAPDH



Ec; Endometrioma  
Eu; Eutopic endometrium  
C; Normal ovary  
GAPDH; Internal control

Fig. 1. mRNA expression by reverse transcription-polymerase chain reactoin (RT-PCR).

(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 internal control로 사용하여 semiquantitative하게 각 유전자의 발현 정도를 비교한 결과 cyclin D1, CDK6, cyclin E, CDK2의 발현이 정상 난소에 비해 자궁내막종과 자궁내막에서 유의하게 증가되어 있었다. 반면 p27<sup>kip1</sup>의 경우 자궁내막종과 자궁내막 조직에서 정상 난소군에 비해 명확한 발현량의 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

자궁내막종과 자궁내막 조직군 간의 비교시에는 각 유전자 발현의 증감 정도의 유의한 차이를 발견할 수는 없었다.

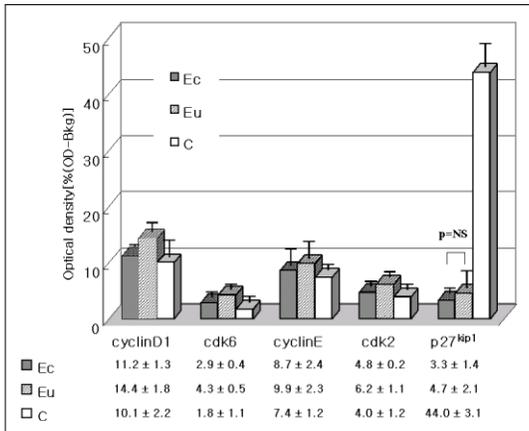


Fig. 2. Quantization of mRNA expression by RT-PCR.

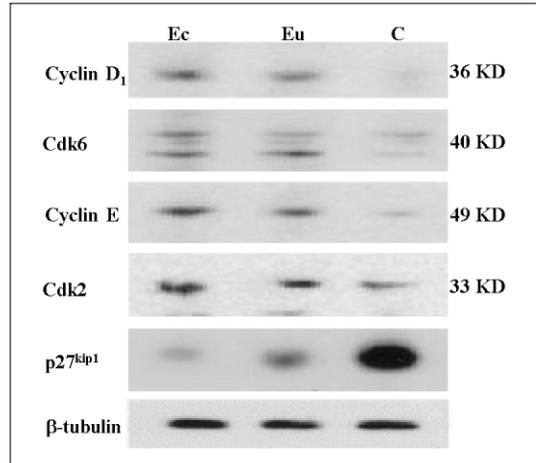
2. Western blot analysis

환자의 조직으로부터 분리, 정제한 단백질을 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. 정상 난소군에 비해 자궁내막종과 자궁내막에서 cyclin D1과 그 kinase인 CDK6, cyclin E와 CDK2의 발현도가 유의하게 증가하였으며 p27<sup>kip1</sup>의 발현도는 감소하였다 (Fig. 3).

각각의 결과를 internal control인 β-tubulin과 비교하여 competitive하게 densitometer를 이용하여 수치화시킨 결과에 의하면 특히 p27<sup>kip1</sup>의 발현도는 자궁내막 조직군에 비해 자궁내막종 조직에서 현저한 감소 경향을 보였다 (Fig. 4).

고 찰

자궁내막종은 양성 질환이나 마치 악성 종양과 유사한 경향을 보일 만큼 특징적인 진행성 질환으로 그 양상이 흥미롭다. 여러 연구에도 불구하고 명확한 발생기전은 아직 알려지지 않았으며 특히 분자생물학적인 기전에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 난소에 발생한 자궁내막종, 정상 난소, 자궁내



Ec; Endometrioma  
Eu; Eutopic endometrium  
C; Normal ovary  
β-tubulin; Internal control

Fig. 3. Western blot analysis of cyclins, cyclin dependent kinases, and p27<sup>kip1</sup>.

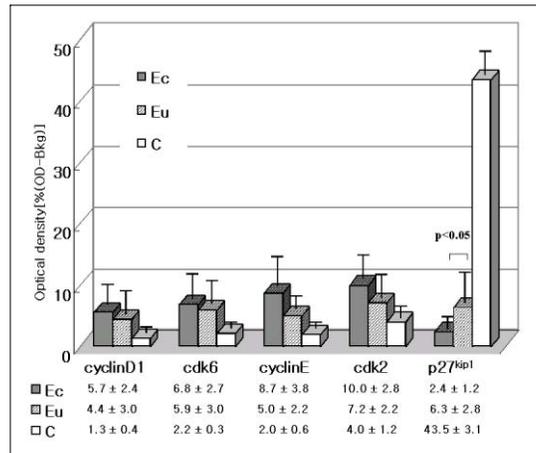


Fig. 4. Quantization of protein expression by Western blotting analysis.

막으로부터 각각 조직을 채취하여 RT-PCR, Western blot analysis 방법에 의해 cyclin-CDK와 CDKI의 차이를 비교 분석하여 자궁내막종과 연관된 세포주기 조절경로의 이상을 규명하고자 시행하였다.

일반적으로 세포주기의 조절기전은 복잡하고 많은 조절 분자들이 관여하며 세포주기의 여러 단계에서 외부 신호에 의해 변경될 수 있다. 포유류에서 G1 증식의 조절인자로 가장 잘 알려진 것은 D-type의 cyclin이며 어떠한 특정 요소에 의한 자극에 반응하느냐 따라 전체적인

세포군 농도가 결정된다.<sup>14-16</sup> D-type G1 cyclin은 CDK4, CDK6와 짝을 지어, 증식하는 세포에서 특징적으로 다르게 발현되는 활성형의 효소를 형성한다. 분열유발인자가 cyclin D 유전자의 전사를 촉진시켜 G1기 후반에 rate-limiting 기능을 수행할 효소 활성화된 cyclin D-CDK 복합체를 유도한다.<sup>17</sup>

Cyclin D1은 핵단백질로 이것의 발현은 G1기의 진행에 있어 필수적인 것일 뿐만 아니라 rate-limiting 인자로서 작용하는 것으로 여겨진다. 즉 cyclin D1이 과발현되면 G1기의 시간이 단축되는 반면 G1기 초기에 cyclin D1 항체를 미량주사하여 cyclin D1의 작용을 저해하면 세포들은 S기로 들어가지 못하고 세포주기를 멈추게 된다.<sup>18</sup> 이 결과로 알 수 있는 것은 cyclin D1이 mid-G1기의 진행을 조절하여 세포들을 late-G1기에 이르게 하고 이 때 또 다른 신호가 작용하여 S기로의 진행을 자극하게 된다는 것이다. Cyclin D1의 대표적인 짝은 CDK4와 CDK6이며 이것의 활성화는 CAK (cdk activating kinase)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 포유동물세포에서 cyclin E의 발현은 cyclin D1보다 늦게 일어난다. 그리고 cyclin E-CDK2 kinase 활성화는 세포가 S기로 들어가기 직전에 일어난다. Cyclin E 또한 cyclin D1과 마찬가지로 과발현되면 G1기의 단축을 야기하게 되고 항체를 미량주사하여 그 기능을 방해하면 세포들은 S기로 들어가지 못하고 세포주기는 정지하게 된다.<sup>19</sup> CDKI의 발현은 세포주기의 진행을 자극하거나 억제하는 신호들에 의한 세포주기 조절 기전과 밀접하게 관련되어 있다. P27은 유사분열인자에 의해 발현이 억제되고 TGF- $\beta$ 와 같은 항유사분열인자에 의해 발현이 유도되며 p21은 유사분열인자뿐만 아니라 다른 종류의 신호에도 반응한다.

현재까지 진행되어진 여러 연구 결과에 따르면 CDKI 중 자궁내막의 증식과 쇠퇴에 가장 밀접한 관련성이 밝혀진 단백질은 p27<sup>kip1</sup>이며 이와 연관된 cyclin이나 CDK에 관한 연구는 아직까지 주로 종양에 국한되고 있다. 난소종양을 연구한 Sui 등은 p27<sup>kip1</sup>의 발현이 악성종양에서 명확히 사라지거나 극히 감소하는 반면 cyclin E와 CDK2는 유의하게 과발현되었다고 보고하여 예후인자로서의 가능성을 제시하였다.<sup>8</sup> 월경주기에 따라 자궁내막의 변화를 연구한 보고에 의하면<sup>20</sup> 전체 월경주기에 걸쳐 그 발현을 보이는 cyclin D2 농도가 증식기에는 발현량이 증가되어 있고 분비기에는 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 따라서 본 연구에서는 대상환자의 월경주기를 난포기로 일치시켜 개체별, 주기별 편차를 최소화하였다.

지금까지 자궁내막증은 가장 명확히 알지 못하는 부인과 질환 중 하나로 논의된 바 있으며<sup>21</sup> 불임과의 연관성에 관해서는 더욱 불명확하다. 뚜렷한 골반내 유착이 없는 경우에는 자궁내막증이 불임을 일으키는 기전을

이해하기가 특히 어려우며 따라서 치료도 난해하다.<sup>22</sup> 이에 관하여 Toya 등은 자궁내막증에서 S기 과립막 세포가 유의하게 증가하고 G2/M기 과립막 세포가 유의하게 감소하는 세포주기의 손상으로 인해 난포 형성을 방해한다고 보고하였고,<sup>23</sup> Matsuzaki 등은 복강을 침범한 자궁내막증에서 그 진행에 CDKI인 p27<sup>kip1</sup>이 관련한다고 하였다.<sup>24</sup> 최근 Fauvet 등은 자궁내막증에서 p21의 발현이 난소의 양성 및 악성 종양에 비해서도 더 증가하였으며 자궁내막증에서 p53의 발현은 양성 난소 종양보다는 증가해 있었으나 악성 난소 종양에서와는 차이가 없었다고 보고하였다.<sup>25</sup>

본 연구의 실험 결과, RT-PCR과 Western blot analysis에서 모두 정상 난소 조직에서보다 자궁내막증과 자궁내막 조직에서 G1기 특이적인 cyclin D1-CDK6, S기 특이적인 cyclin E-CDK2의 발현이 유의하게 증가하였던 것은 이러한 세포주기 조절경로의 이상이 자궁내막증과 연관성이 있기 때문이라고 생각된다. 특히 p27<sup>kip1</sup>은 RT-PCR과 Western blot analysis에서 모두 정상 난소 조직에서보다 자궁내막증과 자궁내막 조직에서 그 발현이 유의하게 감소하였을 뿐 아니라 자궁내막증군과 자궁내막 조직군 간의 비교에서 RT-PCR에 의한 mRNA 발현량에는 유의한 차이가 없었으나 Western blot analysis에 의해 밝혀진 결과에서는 자궁내막증군에서 보다 현저한 감소를 보였다. 이는 이들 세포상태를 결정하는 주요 조절인자로써의 p27<sup>kip1</sup>의 역할을 제시하고 있으며 특히 자궁내막증의 세포주기 조절경로에서 번역 단계에 중요한 조절인자라고 해석되어진다. 즉, 전사, 번역에 의한 단순한 발현농도에 의거하기보다 각 조절인자들의 조절 조합에 따른 활성형 농도에 의한 것으로 생각되며 특히 p27<sup>kip1</sup>의 증감이 자궁내막증과 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

이번 연구에서의 제한점으로는, 대상이 된 환자 수가 38명에 그쳤던 점과 자궁내막증 조직을 정상난소와 자궁내막 조직군 간에만 비교하였던 점으로 생각할 수 있겠다. 앞으로 자궁내막증에서의 세포주기 조절경로를 확립하기 위한 보다 대규모의 연구가 필요할 것이며 저자들은 난소의 양성 종양, 악성 종양과의 비교 및 세포자연사 (apoptosis)와의 연관성에 이르기까지 실험을 확대하고자 한다.

- 참고문헌 -

1. Cramer DW. Epidemiology of endometriosis. In: Wilson EA, ed. Endometriosis. New York: Alan R. Liss Inc 1987. p5.
2. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. New Engl J Med 1993; 328: 1759-69.
3. Sherr CJ. G phase progression: cycling on cue. Cell 1991; 79: 551-5.

4. Lew DJ, Dulic V, Reed SI. Isolation of the three novel human cyclins by rescue of cyclin(Cln) function in yeast cell. *Cell* 1991; 66: 1197-206.
5. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9: 1149-63.
6. Hirama T, Koeffler HP. Role of cyclin-depend kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 86: 841-54.
7. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-4.
8. Sui L, Dong Y, Ohno M, Sugimoto K, Tai Y, Hando T, et al. Implication of malignancy and prognosis of p27<sup>kip1</sup>, cyclin E, and cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 56-63.
9. Shiozawa T, Nikaïdo T, Shimizu M, Zhai Y, Fujii S. Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16<sup>ink4</sup> in human endometrioid-type endometrial carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 2250-6.
10. Toki T, Mori A, Shimizu M, Nikaïdo T, Fujii S. Localization of apoptotic cells within the human endometrium and correlation between apoptosis and p21 expression. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1157-64.
11. Shiozawa T, Nikaïdo K, Nakayama X, Lu X, Fujii S. Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup> in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 899-905.
12. Toyoshima H, Hunter T. P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.
13. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. P27<sup>kip1</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
14. Robker RL, Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: A coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27<sup>kip1</sup>. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 924-40.
15. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin-dependent kinases, growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Oncogene* 1995; 11: 211-9.
16. Hunter T, Pines F. Cyclins and cancer II: Cycin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-82.
17. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; 7: 812-21.
18. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 1993; 7: 1559-71.
19. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, A nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2612-24.
20. Choi DS, Yoon SR, Lee EY, Hwang SS, Song SY, Kim JY, et al. Characterization of cyclin D2 expression in human endometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2002; 9: 41-6.
21. Audebert A, Backstrom T, Barlow DH, Benagiano G, Brosens I, Buhler K, et al. Endometriosis 1991: a discussion document. *Hum Reprod* 1992; 7: 432-5.
22. Gleicher N. Endometriosis: a new approach is needed. *Hum Reprod* 1992; 7: 821-4.
23. Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 344-50.
24. Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, Dechelotte P, Bruhat MA, Okamura K. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup> in eutopic endometrium and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75: 956-60.
25. Fauvet R, Poncelet C, Hugol D, Lavour A, Feldmann G, Daraj E. Expression of apoptosis-related in proteins in endometriomas and benign and malignant ovarian tumours. *Virchows Arch* 2003; 443: 38-43.

=국문초록=

**목적 :** 본 연구는 자궁내막증과 연관된 cyclin-cyclin dependent kinase (CDK), cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI)에 의한 세포주기 조절경로의 이상에 관하여 알아보고자 하였다.

**연구 방법 :** 자궁내막증 환자 38명에서 월경주기 중 난포기에 복강경 수술 및 소파술을 시행하여 난소에 발생한 자궁내막증 조직과 정상 조직 및 자궁내막 조직을 채취하였다. 각각으로부터 세포주기의 각 단계에 특이적인 cyclin D1, cyclin E 등의 핵단백질과 그들의 활성도에 직접적으로 기여하는 CDK molecule, CDKI인 p27<sup>kip1</sup>, p21 등의 발현도를 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 과 Western blot analysis를 통해 전사 단계 (transcriptional level)와 번역 단계 (translational level)에서 각각 정량하였다.

**결과 :** 채취한 자궁내막증 조직과 정상 조직 및 자궁내막 조직으로 RT-PCR을 수행하여 cyclin D1, cyclin E와 그에 각각 작용하는 CDK molecule, p27<sup>kip1</sup>, p21의 mRNA 발현양상을 정량한 실험 결과, 정상 난소 조직에서보다 자궁내막증과 자궁내막 조직에서 cyclin D1-CDK6, cyclin E-CDK2의 발현이 유의하게 증가하였고 p27<sup>kip1</sup>의 발현은 유의하게 감소하였으나 자궁내막증 조직과 자궁내막 조직에서의 발현양상은 유의한 차이가 없었다. 한편 Western blot analysis에 의하면 마찬가지로 정상 난소 조직에서보다 자궁내막증과 자궁내막 조직에서 cyclin D1-CDK6, cyclin E-CDK2의 발현이 유의하게 증가하였고 p27<sup>kip1</sup>의 발현은 유의하게 감소하였으며 특히 자궁내막증 조직에서의 p27<sup>kip1</sup>의 발현량 감소가 현저하여 자궁내막 조직에서보다도 유의하게 감소되었다.

**결론 :** 본 연구 결과에 따르면 세포주기 조절경로에서 번역 단계에서의 p27<sup>kip1</sup>이 자궁내막증과 밀접한 연관성이 있을 것으로 사료된다. 앞으로 자궁내막증과 관련된 세포주기 조절경로를 규명하기 위한 보다 많은 실험적 연구가 필요할 것이다.

**중심단어 :** 자궁내막증, Cyclin, Cyclin dependent kinase, Cyclin dependent kinase inhibitor, 세포주기 조절경로