

자궁내막증의 자궁내막에서 저산소증이 혈관내피성장인자 및 섬유모세포성장인자 발현에 미치는 영향*

이화여자대학교 의학전문대학원 산부인과학교실,** 연세대학교 의과대학 산부인과학교실***
정경아** · 전선희** · 윤정미***

= Abstract =

Effects of Hypoxia on Vascular Endothelial Growth Factor and Fibroblast Growth Factor Expression in Eutopic Endometrium with Endometriosis*

Kyung-Ah Jeong** · Shun Hee Chun** · Jeong-Mi Yoon***

*Department of Obstetrics and Gynecology, ** School of Medicine, Ewha Womans University
Department of Obstetrics and Gynecology, *** Yonsei University College of Medicine*

Objectives : This study was performed to investigate the functional roles of hypoxia and HIF-1 α , leading to expression of VEGF and FGF in the pathogenesis of endometriosis.

Methods : From September 2005 to February 2006, endometrial stromal cells were obtained from the patients with or without endometriosis at the Department of Obstetrics and Gynecology of Ewha Womans University Dongdaemun Hospital. These cells were cultured and treated with 100uM desferrioxamine (DFO) for 0hr and 2hr. After the extraction of total RNA, RT-PCR was performed and the expression level of HIF-1 α , VEGF and FGF mRNA were measured by β -actin as 1. Statistical analysis was performed by Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney U test (SPSS 12.0 version). A p value of 0.05 was considered as the limit for statistical significance.

Results : Chemical hypoxia condition with DFO in normal endometrium results in the up-regulation of HIF-1 α , but it was significantly decreased in the eutopic endometrium of the patients with endometriosis. The expression of VEGF in normal control group was not changed, but it was increased in endometriosis group under chemical hypoxia. Hypoxia with DFO induced the overexpression of FGF in endometriosis group, compared that it was slightly decreased in normal endometrium.

Conclusion : Hypoxia and subsequent production of HIF-1 α might regulate angiogenesis by the expression of VEGF and FGF, that is related to the pathogenesis of endometriosis. However, further studies are warranted to confirm.

KEY WORDS : Hypoxia · Hypoxia inducible factor(HIF)-1 α · Vascular endothelial growth factor · Fibroblast growth Factor · Endometriosis.

*본 연구는 이화여자대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

자궁내막증은 자궁내막 조직이 자궁 이외의 부위에 존재하는 진행성 질환으로 난소, 난관 뿐 아니라 자궁인대, 장, 방광, 복막까지 침범할 수 있다. 자궁내막증은 가임기 여성의 약 3~10%에서 발생하는 비교적 흔한 질환으로 불임 여성에서는 20~40%까지 보고되고 있다¹⁾²⁾. 발생률이 점차 증가되는 추세이며 그 원인과 기전을 규명하려는 여러 연구가 계속되어 왔으나 아직 명확하게 밝혀진 바가 없다.

월경 시에 역류된 월경혈의 자궁내막 세포가 복강 내에 파종, 착상된다는 가설이 가장 보편적으로 받아들여지고 있으나 이러한 월경혈의 역류는 월경을 하는 여성의 90%에서 나타나는 흔한 현상이다. 반면 이들 중 2~10%에서만 자궁내막증의 발병으로 이어지는 것으로 보아 월경혈 역류 기전 이외의 다른 요인이 자궁내막증의 발생에 관여하고 있을 것으로 생각된다³⁻⁵⁾.

최근에는 자궁내막의 비정상적인 증식과 혈관형성(angiogenesis)을 통해 자궁내막증이 발병된다는 가설들이 제시되고 있어 자궁내막증을 가진 환자에서 정상인에 비해 자궁내막 내에 상피세포, 기질세포, 혈관내피세포의 증식이 증가되어 있음을 보고하여 이로 인한 자궁내막증의 발생을 제시한 연구가 있었다⁶⁾. 또한 이러한 혈관형성을 조절하는 인자로서 저산소증(hypoxia)의 영향을 밝히고자 한 실험 연구도 있었으나⁷⁾ 아직 확실하지 않다. 저산소 상태는 월경기에 자궁내막에서 일어날 수 있는 생리적 변화로 월경시의 혈관수축이 자궁내막의 저산소증을 유발하여 혈관형성을 자극하게 된다. 자궁내막의 혈관형성 자극 인자에는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)가 있다.

본 연구는 자궁내막증으로 확진된 환자의 자궁내막 조직을 정상군과 비교하여 저산소증 유도인자(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 의 발현 정도로써 저산소증 발생 여부를 알아보고자 하였으며 자궁내막 세포를 화학적으로 저산소 처리하여 VEGF, FGF의 발현 양상에 변화가 있는지 분석하여 저산소증과 혈관형성이 자궁내막증의 발생기전에 미치는 영향에 관하여 연구하고자 하였다.

1. 연구대상 및 자궁내막 조직의 획득

2005년 9월부터 2006년 2월까지 이화여자대부속 동대문 병원 산부인과에서 자궁내막증이 의심되어 복강경 수술을 받은 환자 중 수술 전에 어떠한 약물 치료도 시행받지 않았던 환자를 대상으로 수술 중 자궁내막증이 확인되면 자궁내막조직을 채취하여 자궁내막증군(8명)으로 하였으며, 대조군(11명)으로는 자궁내막증을 비롯한 자궁근종 등 에스트로겐 의존성 부인과 질환이 아닌 기타 양성 난소 낭종으로 수술을 시행받는 환자에서 자궁내막조직을 채취하였다. 자궁내막증이 있는 환자에서 자궁내막증 병변의 조직과 자궁내막 사이에는 평행적인 관계가 존재하는 것으로 알려져 있어, 자궁내막조직에서 관찰되는 현상이 실제 자궁내막증 병변을 대변한다고 유추할 수 있다⁸⁾. 수술은 월경주기 중 난포기에 시행하였으며 자궁내막 조직은 수술 시 자궁 소파술 또는 절제된 자궁으로부터 Novak's curette를 이용하여 채취하였다.

2. 연구방법

1) 자궁내막 세포 분리 및 배양

환자의 자궁내막 조직을 M199 배양액(Gibco, USA)에 담아 실험실로 운반 후 PBS(Gibco, USA)에 여러 번 세척하여 혈액을 완전히 제거해주었다. 이 자궁내막 조직은 PBS가 든 dish에서 잘게 다진 후 원심 분리로 상층액을 제거하여 1mg/ml의 collagenase (Sigma, USA)에 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 효소 활성도(enzyme activity)를 멈추기 위해 10% FBS가 든 M199 배양액에서 여러 번 세척하여 자궁내막 세포를 얻었다. 자궁내막조직의 기질 세포는 Matthews 등이 보고한 방법을 사용하였다⁹⁾. 이렇게 얻어진 자궁내막 기질세포는 각 실험 목적에 따라 T75 flask와 유리 슬라이드가 든 100 mm culture dish에 24시간 배양 후 조직이나 세포 부유물이 포함된 상층액을 버리고 10% FBS가 첨가된 M199 배양액을 넣어 배양하였다.

2) Immunocytochemistry

자궁내막 조직으로부터 얻은 자궁내막 기질세포를 유리 슬라이드에 키워 PBS로 세척 후 30분간 상온에서 건조시키고 cold acetone으로 10초간 고정하였다. 세포 내에 내재된 peroxide를 제거하기 위해 3% H₂O₂ 용액

에 10분간 방치 후 증류수로 세척하였다. Tris buffer로 세척 후 1차 항체 Vimentin(Dako, Denmark), CK-19(Dako, Denmark) 그리고 Factor VIII(Dako, Denmark)에 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Tris buffer로 3회 세척 후 peroxidase-conjugated streptavidin(Dako, Denmark)을 20분간 반응시키고 Tris buffer에 세척하여 DAB(3,3-diaminobenzidine)에 2분간 발색시킨 다음 물에 세척하였다. Mayer's hematoxylin으로 2분간 대조염색을 한 뒤, crystal mount로 봉입하였다.

3) DFO(desferrioxamine ; Calbiochem, Germany) 처리

자궁내막 기질세포를 T75 flask에 2일간 배양한 뒤 10%FBS와 100uM DFO가 첨가된 새로운 M199 배양액에 각각 0시간, 그리고 2시간 배양 후 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 회수하여 원심분리를 이용하여 세포 침전물을 얻었다. RNA isolation을 하기 전 까지 -80°C에서 보관했다.

4) RT-PCR

RNA 추출은 배양된 자궁내막 기질세포를 수거하여 in-tronbio의 easy-spin™[DNA free] total RNA Extraction Kit을 이용했다. 추출된 RNA는 GenQuant RNA/DNA calculator(Pharmacia Biotech LTd., Cambridge, UK)를 사용하여 spectrophotometry로 측정하였고 RT-PCR은 Perkinelmer 9600을 사용하였다.

추출된 RNA(1 µg)는 oligo dT를 primer로 해서 역전사(reverse transcription)를 실시했다. 역전사를 통한 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA) 합성은 역전사 효소(Reverse transcriptase, Fomentas life sciences)를 이용했으며 이 때의 상태는 70°C 5min, 37°C 60min, 70°C 10min을 사용했다. 합성된 cDNA는 -20°C

에 사용 전까지 보관되었다.

PCR 증폭은 각 HIF-1α, VEGF, FGF 그리고 β-actin에 대한 특이적 primer(Table 1)와 Taq polymerase(Promega, Madison, Wisc., USA)를 이용하여 실험을 진행하였다. PCR product는 1.5% agarose gel 상에 전기영동을 통하여 분획시킨 후 분석하였고, RNA 양의 정량화를 위해 laser densitometer와 analysis software(IMAGE READER LAS-1000 lite, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다. HIF-1α, VEGF 그리고 FGF의 RT-PCR product 값은 각각의 β-actin product 값을 1로 하였을 때의 상대적인 값으로 산출하였다.

5) 통계분석

Wilcoxon signed rank test, Mann-Whitney U test (SPSS 12.0 version)를 이용하여 통계처리를 하였으며, p 값은 0.05미만일 때 통계학적으로 유의하다고 하였다.

결 과

자궁내막조직에서 분리 및 배양 후 얻어진 세포가 자궁내막 기질세포임을 확인하기 위해 면역염색 해 본 결과 기질세포에 특이적으로 발현되는 Vimentin과 FactorVIII은 95%이상의 순도를 보였고 CK-19는 거의 발현되지 않는 것으로 보아 자궁내막 기질세포임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

대조군과 자궁내막증군의 자궁내막조직으로부터 자궁내막 기질세포를 분리하여 화학적 저산소증(chemical hypoxia)에 따른 각 세포증식인자들의 발현양상을 RT-PCR을 이용해 비교해 보았다(Fig. 2). DFO를 처리하지 않은 상태에서 자궁내막증군은 대조군에 비해 HIF-

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Gene		Sequences	Annealing temp(°C)	Product size(bp)
HIF-1α	Forward	5'-CCCAGCCTAATAGTCCC-3'	60	314
	Reverse	5'-GGTGGCATTAGCAGTAGG-3'		
VEGF	Forward	5'-TCTGGGTGCATTGGAGCCTC-3'	59	345
	Reverse	5'-AGCTCATCTCTCCTATGTGC-3'		
FGF	Forward	5'-GAACGGGGGCTTCTTCCT-3'	55	288
	Reverse	5'-CCCAGTTCGTTTCAGTGCC-3'		
β-actin	Forward	5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC-3'	64	320
	Reverse	5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC-3'		

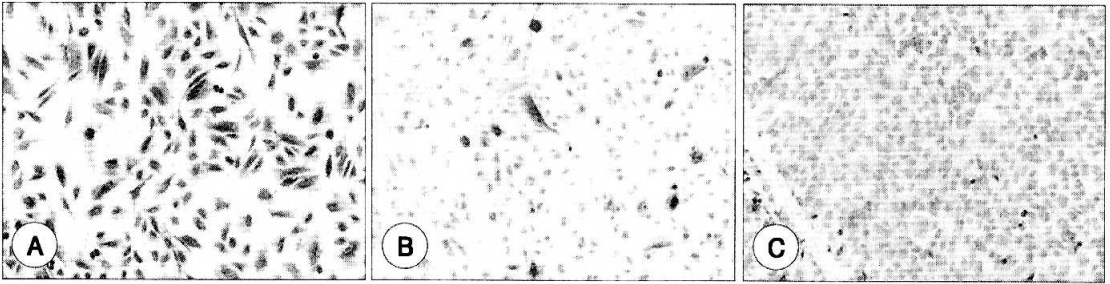


Fig. 1. Immunocytochemistry in the endometrial epithelial cells for Vimentin (A), CK-19(B), and Factor VIII(C) ($\times 100$).

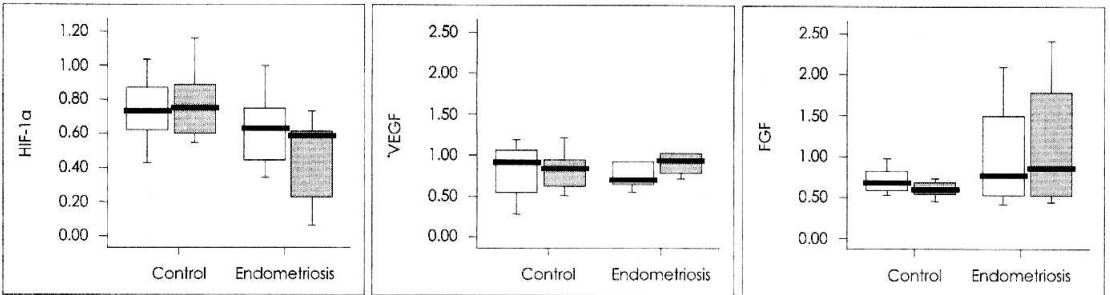


Fig. 2. HIF-1 α , VEGF and FGF in cultured endometrial cells in normal and endometriosis. Endometrial epithelial cells were treated with or without DFO(100uM) for 2hr. Cells were subjected to RT-PCR using HIF-1 α , VEGF and FGF antibodies. Open bar; without DFO, Black bar ; with DFO.

1 α 와 VEGF의 발현량이 비교적 감소되어 있는 것을 볼 수 있었고 FGF의 경우 자궁내막증군에서 증가되어 있는 것으로 나타났다. 각 그룹에 DFO를 처리하여 인위적인 화학적 저산소증 환경(chemical hypoxic condition)을 만들어주었을 때 HIF-1 α 의 경우 대조군은 증가된 양상으로 나타났으나 자궁내막증군은 현저하게 감소되었다. 또한 대조군의 VEGF는 화학적 저산소증에 영향을 받지 않았으나 자궁내막증군에서는 증가됨을 알 수 있었다. 이에 비해 FGF는 대조군에서 화학적 저산소증에 의해 비교적 발현량이 감소되었으나 자궁내막증군에서는 증가되었다.

즉, 저산소증 환경에 의해 대조군의 경우 HIF-1 α 는 증가되고 FGF는 약간 감소되었으나, 자궁내막증 환자의 경우 HIF-1 α 는 감소를, VEGF와 FGF는 증가되는 것을 알 수 있었다.

고 안

자궁내막증은 가장 흔한 양성 부인과 질환 중 하나이며, 특히 불임이나 만성 골반통이 있는 여성에서 그 빈

도가 증가하므로 중요하다. 또한 자궁내막증은 양성 질환이지만 형태 변화, 조절 불가능한 병변의 성장, 침범과 같은 진행양상이 마치 악성종양과 유사하여 더욱 흥미롭다. 그 발생기전이 아직 확실하게 밝혀지지 않았으며 자궁내막 세포가 자궁 이외의 부위에 이식된다는 사실로 생각하고 있어, 이에 관여되는 다른 요인을 규명하고자 하는 연구가 필요하다. 최근의 실험 연구는 이러한 자궁내막증의 발생과 진행에서 일어나는 혈관의 생성과 저산소증의 역할에 대해서도 시도되고 있다.

저산소증 환경하에서는 저산소증에 의해서 돌연변이(mutation)가 일어난 세포들이 축적되는 것을 막기 위해서 세포자멸사(apoptosis)가 일어나는데¹⁰⁾ 이러한 저산소증 유도하 세포자멸사(hypoxia-induced apoptosis)에는 여러 다른 기작들이 관여한다. 이 저산소증 유도하 세포자멸사에 가장 직접적으로 영향을 미치는 것이 미토콘드리아(mitochondria) 내막(inner membrane)의 electron transport chain의 억제와 reactive oxygen species(ROS)의 생성이다. 이들의 변화는 mitochondrial transmembrane potentials의 감소를 야기하고 cytochrome C를 cytosol로 방출시켜 Apaf-1, cy-

tochrome C 그리고 caspase-9의 multimeric protein complex를 형성시킨다¹¹⁾. 이러한 미토콘드리아와 세포사 수용체(cell death receptor)에 의한 세포자멸사 경로(apoptotic pathway)는 구강암 세포에서도 저산소증으로 유도된 세포자멸사에 관여하는 것으로 보고 되었다¹²⁾.

DFO는 일반적으로 저산소증과 유사한 환경을 만들어 주는 화학 물질로 세포 내 HIF-1 α 단백질을 증가시킨다¹³⁾. DFO는 미토콘드리아 경로(mitochondrial pathway) 의존적인, 그리고 HIF-1 α 에 독립적인 기작으로 leukemic cell에 세포자멸사를 유도한다¹⁴⁾.

정상 자궁내막 기질 세포(Eutopic endometrial stromal cells)에 DFO를 처리하면 렙틴 유전자 발현(leptin gene expression)이 시간 의존적으로 증가한다¹⁵⁾. 자궁내막증 조직에서 렙틴의 발현이 증가되면 기질 세포의 증식이 증가하고 결국 자궁내막증으로 발전하는데 기여할 것으로 여겨지고 있다. 최근 태반조직, 피부 진피 섬유모세포(skin dermal fibroblasts), 그리고 지방 세포에서 저산소증에 의해 렙틴이 발현됨이 보고되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. HIF-1 α 는 혈관형성, 적혈구생성(erythropoiesis), 포도당 운반(glucose transport), 당분해(glycolysis), 철 운반(iron transport), 세포 생존(cell survival)과 증식(proliferation)과 같은 저산소증 영향(hypoxic effect)를 매개하는 주 전사 인자(transcription factor)이다. HIF-1 α 전사 경로(transcriptional pathway)로 저산소증에 의해 렙틴 유전자가 발현된다¹⁶⁾¹⁹⁾. 그러나 자궁내막증에 있어서 이러한 유전자 발현간의 연관성은 아직 명확하지 않으며, 정상 자궁내막의 기질내에 렙틴 유전자 발현은 HIF-1 α 에 의해 조절되기는 하지만 직접적인지 혹은 간접적인 경로인지 아직 확실하지 않다.

저산소증은 자궁내막에 원위부 허혈(distal ischemia)을 일으켜 월경기에 나선형의 소동맥을 형성하는데, 저산소증에 의해 VEGF의 발현이 증가하는 것은 혈관형성과 월경 후 자궁내막 복구(endometrial repair)에 중요한 역할을 할 것이다.

본 연구의 결과에 따르면 DFO에 의해서 자궁내막 기질 세포의 HIF-1 α 가 증가됨을 확인할 수 있었으나 자궁내막증 환자의 자궁내막 기질 세포의 경우에는 오히려 감소하였고, VEGF와 FGF는 증가되어 있는 것을 볼 수 있는데 이는 이미 저산소증에 의해 증식된 자궁내막 기질 세포는 정상 자궁내막과는 다른 세포신호 경로를 갖게 되는 것으로 추정된다.

Becker 등의 연구에서는 자궁내막증 쥐를 이용한 실험 결과, 일시적 저산소증이 자궁내막증 유사 병변에서 HIF-1 α 를 상승 조절(up-regulation)시키고 VEGF 발현을 일으킨다고 하여²⁰⁾ 본 연구 결과와는 차이가 있었다. 하지만 이러한 최신의 연구는 확실하게 설명되지 않은 자궁내막증의 발생기전에 저산소증이 관여할 수 있는 가능성과, 이로 인한 HIF-1 α 의 역할에 따른 VEGF, FGF와 같은 혈관형성인자 발현으로 유도되는 새로운 혈관형성이 자궁내막증의 특이한 진행과 연관성이 있을 것을 제시하고 있다.

아직 이러한 실험 연구는 부족한 실정이며, 본 연구를 비롯한 다른 연구들에서 일관성이 없는 결과가 보고되기도 할 뿐 아니라, 동물 실험에 국한되어 있거나, 자궁내막증 환자를 대상으로 하였지만 소수에 불과하다는 제한점이 있다. 따라서 앞으로 자궁내막증의 발생기전에 대한 보다 적극적인 실험적 접근으로 대규모의 자궁내막증 환자들을 대상으로 한 많은 연구가 필요할 것이다.

요 약

목 적

본 연구는 저산소증과 저산소증 유도인자(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 의 역할에 따른 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF) 발현이 자궁내막증의 발생기전에서 미치는 영향에 관하여 연구하고자 하였다.

방 법

2005년 9월부터 2006년 2월까지 이화의대부속 동대문 병원 산부인과에서 자궁내막증으로 복강경 수술을 받은 환자의 자궁내막 조직과 자궁내막증이 없는 환자의 자궁내막 조직을 채취하였다. 자궁내막 세포를 분리 및 배양하고 desferrioxamine (DFO) 처리하였다. DFO는 100 μ M, 배양시간은 0시간과 2시간으로 정하여 실험하였다. 전체RNA 추출 후에, RT-PCR을 이용하여, HIF-1 α , VEGF, FGF mRNA 발현량을 측정하였으며, β -actin product 값을 1로 하였을 때의 상대적인 값으로 산출하였다. Wilcoxon signed rank test, Mann-Whitney U test (SPSS 12.0 version)를 이용하여 통계처리를 하였으며, p값은 0.05미만일 때 통계학적으로 유의하다고 하였다.

결 과

DFO를 처리하여 화학적 저산소증 환경을 만들어주었을 때 HIF-1 α 의 경우 대조군은 증가된 양상으로 나타났으나 자궁내막증군은 현저하게 감소되었다. 또한 대조군의 VEGF는 화학적 저산소증에 영향을 받지 않았으나 자궁내막증군에서는 증가됨을 알 수 있었다. 이에 비해 FGF는 대조군에서 화학적 저산소증에 의해 발현량이 약간 감소되었으나 자궁내막증군에서는 증가되었다.

결 론

자궁내막증의 발생기전에서 저산소증으로 인한 HIF-1 α 의 역할과 VEGF, FGF 발현으로 유도되는 혈관생성이 연관성이 있을 것으로 추정되며, 앞으로 이에 대한 많은 연구가 필요할 것이다.

중심 단어 : 저산소증 · 저산소증 유도인자-1 α · 혈관피 성장인자 · 섬유모세포성장인자 · 자궁내막증.

References

- 1) Cramer DW, Missmer SA : *The epidemiology of endometriosis. Ann NY Acad Sci* 2002 ; 955 : 11-22
- 2) Eskenazi B, Warner ML : *Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am* 1997 ; 24 : 235-258
- 3) Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, et al : *The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. JAMA* 1986 ; 255 : 1904-1908
- 4) Ramey JW, Archer DF : *Peritoneal fluid : its relevance to the development of endometriosis. Fertil Steril* 1993 ; 60 : 1-14
- 5) Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR : *Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Fertil Steril* 1991 ; 56 : 45-51
- 6) Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PAW : *Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. Fertil Steril* 1995 ; 64 : 340-346
- 7) Sharkey AM, Day K, Mcpherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, et al : *Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 402-409
- 8) Surrey EX, Halme J : *Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. Obstet Gynecol* 1990 ; 76 : 792-797
- 9) Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ : *Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. Fertil Steril* 1992 ; 57 : 990-997
- 10) Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM : *Genetic instability induced by the tumor microenvironment. Cancer Res* 1996 ; 56 : 5754-57547
- 11) Hajra KM, Liu JR : *Apoptosome dysfunction in human cancer. Apoptosis* 2004 ; 9 : 691-704
- 12) Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W : *Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs via two independent pathways. Mol Cancer* 2004 ; 3 : 38
- 13) An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM : *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . Nature* 1998 ; 392 : 405-408
- 14) Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ : *Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms. Apoptosis* 2006 ; 11 (1) : 67-77
- 15) Wu MH, Chen KF, Lin SC, Lgu CW, Tsai SJ : *Aberant expression of leptin in human endometriotic stromal cells is induced by elevated levels of hypoxia inducible factor-1 α . Am J Pathol* 2007 ; 170 (2) : 590-598
- 16) Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J : *Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia : involvement of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem* 2002 ; 277 : 34601-34609
- 17) Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, et al : *Augmented placental production of leptin in preeclampsia : possible involvement of placental hypoxia. J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; 83 : 3225-3229
- 18) Grosfeld A, Turban S, Andre J, Cauzac M, Challier JC, Hauguel-de Mouzon S, et al : *Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. FEBS Lett* 2001 ; 502 : 122-126
- 19) Grosfeld A, Andre J, Hauguel-De Mouzon S, Berra E, Pouyssegur J, Guerre-Millo M : *Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. J Biol Chem* 2002 ; 277 : 42953-42957
- 20) Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, et al : *2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. Am J Pathol* 2008 ; 172 (2) : 534-544