O-03

3차원적 자궁내막 세포배양 체계의 확립: 성선 호르몬에 의한 분화유도 및 특성

Establishment of Three Dimensional *In-vitro* Culture System with Human Endometrial Cells: Induction of Molecular Biologic Differentiation & Characterization by Sex Steroid Hormone

권혁찬[1], 양현원[2], 김해권[3], 김세광[4], 조동제[4]

봄 여성병원 산부인과, 불임 및 생식내분비 연구소[1]
을지대학교 의과대학 대학원 의학과, 생명과학 연구소[2]
서울여자대학교 생명공학과[3]
연세대학교 의과대학 산부인과학 교실[4]

Hyuck Chan Kwon[1], Hyun Won Yang[2], Hae Kwon Kim[3], Sei Kwang Kim[4], Dong Jae Cho[4]

Research Institute of Infertility and Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Bom Woman's Hospital, Goyang[1]
Research Institute of Life Science, Medical Graduate School, Eulji University School of Medicine, Seoul[2]
Department of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul[3]
Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul[4]

I. 서론

인간의 자궁 내막 조직은 생리 주기에 따라 다양한 변화를 보인다. 이러한 자궁내막의 변화는 증식기, 분비기, 생리기로 나뉘며 중기 분비기(mid secretory phase)에 배아의 착상이 일어 날 수 있는 상태로 분화된다. 이러한 자궁내막 조직의 분열 및 분화는 에스트로젠(estrogen)과 프로게스테론(progesteron)과 같은 성선 호르몬(sex steroid hormone) 및 주기적인 발현양상을 보이는 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine) 들에 의해 조절된다(Guidice, 1994). 또한 기질세포(stromal cell, ESC)와 상피세포(epithelial cell, EEC)간의 상호 작용이 자궁 내막 조직의 분화에 중요한 영향을 미친다고 보고되고 있다(Osteen et al.,

1994).

최근에는 생리 주기에 따라 자궁내막 상피세포(EEC)와 기질세포(ESC)에서 integrin(Lessey et al., 1994), Matrix metalloproteinase(MMPs) (Hulboy et al., 1997), COX(Jones et al., 1997; Kwon et al., 1999)의 발현 양상이 변화되는 것이 보고되었다. 착상기에는 pinopods가 분화(Martel et al., 1989)되고 integrin α1, α4, β3, αvβ3(Lessey et al., 1994)가 동시에 발현되며 조직의 분화(tissue remodeling)에 관여하는 COX-2(Jones et al., 1997; Kwon et al., 1999)와 MMP-9 (Skinner et al., 1999)의 발현이 증가된다고 보고되고 있어, 체외 배양된 자궁내막세포의 분화를 평가할 유용한 지표로 활용될 수 있다고 생각된다.

인간 자궁내막의 분화 및 착상기전을 밝히기 위하여서는 확립된 세포 배양 체계(established cell culture system)가 매우 중요하다. 그러나 최근 EEC 또는 ESC의 일차배양(primary culture) 혹은 공배양(co-culture) 체계를 이용한 생체 표지 물질(biological marker molecule)의 일종인 integrin의 발현과 조절에 관한 실험에서 상반된 보고가 된 바 있다 (Sillem et al., 1997; Simon et al., 1997). 이러한 상반된 견해는 단층 배양된 자궁내막세포(monolayered endometrial cell *in vitro*)가 기능적인 분화 특성을 유지하지 못한다는 Hearn 등(1986)의 보고와 일치한다. Bentin-Ley 등(1994)은 이러한 2차원 배양의 단점을 보완하기 위하여 collagen gel과 Matrigel의 세포간 물질(extracellular matrix, ECM)을 이용하여 EEC와 ESC를 3차원적으로 배양하는 방법을 개발하였으며, 이어서 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포가 성선 호르몬 첨가 시에 형태학적으로 체내의 착상기 자궁내막 조직과 유사한 구조를 하고 있음을 보고하였다.

본 연구는 EEC-ESC-ECM의 3차원적 공배양 체계(three-dimensionally cultured endometrial cell)를 확립하고 복합세포 배양과 성선 호르몬의 첨가에 따른 생체활성 물질(biological marker)의 발현 양상과 전자현미경적 구조가 생체의 착상기 자궁내막 세포의 형태적, 생화학적 특성과 유사한지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 EEC 혹은 ESC 단층배양 체계, ESC-collagen 배양체계, EEC-ESC-ECM의 배양체계를 각각의 표본에서 준비하여 배양액에 에스트로젠과 프로게스테론을 가감하여 배양 48시간째 배양액을 추출하여 gelatin substrate zymography를 수행하였고 배양조직은 투사(Transmission electron microscopy) 및 주사 전자현미경(Scanning electron microscopy)으로 세포의 특성을 관찰했으며 같은 조직에서 integrins, COX, MMPs에 대한 면역조직학적 염색(immunohistochemistry)을 시행하여 관찰하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 자궁내막세포의 획득

자궁내막 조직은 자궁내막 질환 이외의 원인(자궁 근종 및 자궁선 근종)으로 인해 전자궁적출술을 시행한 환자 중에서 배란 일을 기준으로 6일에서 14일까지의 중기 및 후기 증식기를 보이는 환자의 적출된 자궁 후저부로부터 획득하여 조직학적 분류(Noyes et al., 1975)를 통해 확인한 후에 실험에 포함시켰다.

2. 자궁내막 세포배양 방법

채취된 자궁내막조직은 PBS가 들어 있는 conical tube (Falcon, Becton Dikinson, New Jersey, USA)에 담아 실험실로 운반했으며, 다시 PBS로 여러 번 세척하여 남아 있는 혈액을 제거하였다. 배양 접시에 Dulbeco's Modified Eagle's Media (DMEM; Gibco, Life Technologies, Roskilde, USA)를 2-3 ml을 부어준 후 조직을 넣고 멸균된 가위를 이용하여 1-2mm의 크기로 잘랐다. 잘게 잘린 조직은 다시 conical tube에 trypsin-EDTA (Gibco, USA)용액으로 상온에서 15분간 진탕 배양하였다. 15분 경과 후 1 % penicillin-streptomycin (Gibco, USA), 10 % fetal bovine serum (Gibco, USA), 1nM estradiol (Sigma, USA)이 포함된 DMEM 배양액을 5mL 첨가하여 2회 세척한 후 ESC들이 포함된 용액 상층부 7mL과 EEC들이 포함된 하층부 3mL을 각각 나누어 60mm 배양 접시 (Falcon, Becton Dikinson, New Jersey, USA)에 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 EEC는 세포괴를 이루고 ESC는 배양접시에 부착되어 넓게 자라는 상태가 되며, 해부현미경하에서 덩어리진 EEC괴는 배양접시에서 파이펫으로 흡입과정을 반복하여 쉽게 분리 수거하였다. 분리된 EEC는 단일 세포로 분리하기 위하여 conical tube에 옮긴후 400rpm에서 10분간 원심 분리하여 남아 있는 배양액을 제거한 다음 1,000 units/mL collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 상온에서 20분간 진탕 배양하였다. 배양후 혈청이 첨가된 배양액을 첨가하여 원심분리법으로 2회 세척하였다. 이와 동시에 배양접시에 부착된 ESC는 배양액을 제거한 후 trypsin-EDTA 2mL을 첨가하여 5분 경과 후 conical tube에 넣고 혈청이 첨가된 배양액 5mL을 첨가한 후 원심 분리법으로 2회 세척하였다.

3차원 배양을 위해서 ESC를 collagen gel에 묻고 gel위에 matrigel로 표면을 처리하고 ECC를 그 위에 접종하였다. 먼저 collagen gel (Biocoat, rat tail

type I, 3.6mg/mL)을 5배의 기본배양액과 NaOH를 이용하여 약 알칼리화 (pH 7.2~7.4) 시킨 후 단일세포로 분리된 ESC를 collagen 용액과 1대 4 비율로 섞어서 1×106 cells/mL의 농도가 되도록 하였다. cell culture insert (Sigma)에 ESC가 섞인 collagen 용액 200㎕를 부은 후 37℃에서 30분 이상 배양하여 collagen이 중합되도록 하였다. 30분 후 중합된 collagen gel 위에 1mg/mL의 matrigel (Sigma, USA) 50μL를 부어 37℃에서 30초간 방치한 후 남아 있는 액체를 제거하였다. 여기에 단일 세포로 분리된 EEC를 1x106 cells/mL의 농도가 되도록 배양액과 섞어 200μL을 collagen gel 위에 접종하였다. 이렇게 만들어진 cell culture insert를 4-well이나 24-well 배양접시 (Nunc A/S, Roskilde, Denmark)에 넣고 배양액 200μL를 well에 첨가한 후 48시간 배양하였다. 세포 배양 중 세포의 상태가 좋지 않거나 융합성 형태(confluent pattern)가 없는 것은 배제하였으며 측분비 작용의 연구를 위해 EEC, ESC 단층배양 체계, ESC-collagen과 EEC-ESC-Matrigel/collagen의 배양 체계를 각각 준비한 후에 1nM estradiol (Sigma, USA)와 100-200 nM progesterone (Sigma, USA) 첨가하여 배양하였다.

3. 투사전자현미경 (Transmission electron microscopy; TEM)

3차원적으로 배양된 자궁내막 세포는 3% glutaraldehyde (0.1M Millonig's phosphate buffer, pH 7.3) 고정 액에서 3시간 전 고정하였다. 동일한 완충 용액으로 세척시킨 다음, 1% osmium tetraoxide (0.1M Millonig's phosphate buffer, pH 7.3) 고정 액으로 후 고정 용액에 다시 1시간 20분 동안 고정하였다. 동일한 완충 용액으로 세척시킨 후 ethanol 농도를 증가시키면서 탈수시키고, propylene oxide로 치환하였다. Epon 포매재를 사용하여 포매하고 열 중합하였다. 평판 포매된 block을 ultramicrotome으로 1μm 두께의 절편으로 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰된 부분 중에서 필요한 부분을 제외하고 모두 제거한 다음 초발절기 (ultramicrotome, MT2-B)로 50-70nm 두께의 초박절편을 제작하여 copper grid (200 mesh)에 부착시켰다. 부착된 재료를 2% uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 건조시키고 투사전자현미경 (Hitach, H-600, 80kV, Japan)으로 관찰하였다.

4. 주사전자현미경 (Scanning electron microscope, SEM)

3차원적으로 배양된 자궁내막 세포는 투사전자현미경과 동일한 방법으로 고정과 세척 및 탈수 과정을 시행하였다. Isoamyl acetate로 3회 처리한 후 임

계점 건조기 (critical point dryer, HCP-2)에서 건조시켰다. 재료를 제물 대에 부착시키고, 금속 이온 증착은 ion sputter (E-1010)를 사용하여 약 20nm 두께로 금을 도금하였다. 준비된 재료는 주사전자현미경 (Phillips, S-2380N)으로 25kV에서 관찰하였다.

5. 면역조직화학적 염색

Cytokeratin 및 integrin α1, α4, β3와 COX-1, -2, matrix metalloproteinase (MMP)-1, -2, -3, -9 및 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1, -2 에 대한 면역조직화학적 염색은 먼저 박절한 표본에서 paraffin을 제거한 후 4% H_2O_2 용액에 5분간 전 처리하여 조직에 남아 있는 peroxydase를 제거하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 1/400으로 희석한 cytokeratin에 대한 일차항체 (Anti-human mouse monoclonal, Santa Cruz, Biotechnology Inc., California, USA) 및 integrin α 1, α4, β3 각각에 대한 일차항체 (Anti-human mouse monoclonal, Santa Cruz, USA), COX-1, COX-2 일차항체 (Anti-human goat polyclonal, Santa Cruz, USA), MMP-1, -2, -3, -9 (Anti-human goat polyclonal, Santa Cruz, USA) 및 TIMP-1, -2 (Anti-human goat polyclonal, Santa Cruz, USA)로 상온에서 1 시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB-kit (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)에 포함된 2차 항체를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 TB buffer로 세척한 후 5분간 diaminobenzidine (DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 10초간 대조 염색하여 canadian balsam으로 봉입한 후 관찰하였다.

6. Gelatin substrate zymography

배양액을 전기영동용 sample buffer [10% SDS, 4% sucrose, 0.25M Tris-HCl(pH 6.8), 0.1% bromophenol blue]와 1:1로 섞은 후 10μl의 sample을 9% 농도의 polyacrylamaide에 전기영동을 시행하였다. 이때 resolving gel에는 0.1%의 gelatin을 첨가해 사용하였다. 단백질의 전개는 10cm X 8cm의 소형 전기영동기구(Hoefer mini gel, USA)로 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 2.5% Triton X-100이 들어 있는 detergent solution으로 30분간 두 차례 세척하였다. 그런 후, 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3로 구성된 substrate buffer를 처리하고 37℃에서 24시간 동안 활성화 시켰다. 활성화가 끝난 gel은 염색액(0.5% Coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, 30% isopropyl alcohol)으로 30분 동안 염색한 후 상온에서 증류수로 5시

간 이상 탈색시켰다. 이때 gel에 나타나는 투명한 부분을 효소의 활성이 나타난 부분으로 간주하였다.

III. 결과

채취된 자궁내막조직은 조직학적 분류(Noyes et al., 1975)에 따라 중기 및 후기 증식기(late proliferative phase; n=30)에 해당되는 조직을 선별하여 연구대상에 포함하였고 배양하여 조직상태가 나쁜 것(non-confluent or very shrunken cultures; n=8)은 제외하였다.

1. 자궁 내막 세포 배양체계의 형태적 특성

ESC-collagen 배양체계(n=6)에서는 프로게스테론과 에스트로젠의 첨가 여부에 관계없이 collagen matrix가 수축(contraction)은 되지만 용해되지 않고 구조를 유지하였다. EEC-ESC-ECM 공 배양체계에서 배양액에 프로게스테론과 에스트로젠이 첨가되지 않은 배양 체는 배양 12시간 내에 collagen matrix가 용해되어 EEC와 ESC를 구분되지 않았다 (n=5). 그러나 프로게스테론과 에스트로젠을 첨가한 배양 체는 배양 48-96시간까지는 collagen matrix가 다소 수축된 상태로 용해되지 않고 3차원적 구조를 유지하였고 용해되는 시간은 프로게스테론의 농도가 높을수록 지연되는 특징을 보였다(n=6).

2. Gelatin substrate zymography와 MMPs, TIMP의 면역조직화학적 발현 양상

배양 24시간째 Gelatin substrate zymography 결과는 EEC-ESC-ECM 공배양체계에서 성선 호르몬을 첨가하지 않은 군에서 97, 92, 72, 60과 57kD 효소 반응이 강하게 나타났으며, 84kD의 효소 반응은 다소 약하게 나타났다 (n=3). 그러나 성선 호르몬을 첨가한 군에서는 72, 60, 57kD 효소 반응이 감소하였으나, 97, 92kD 효소 반응은 오히려 증가하였다 (n=2). ESC-Collagen 배양체계에 있어서는 성선 호르몬의 첨가여부에 관계없이 84, 60, 57kD의 효소가 발현되었으나 효소 반응은 미약하였다 (n=4). .

48시간째 3차원적인 형태를 유지하고 있는 성선 호르몬이 첨가된 EEC-ESC-ECM 공배양 체계에서 MMP-1, -2, -3, -9 및 TIMP-1, -2의 면역조직화학적 염색을 시행한 결과, EEC와 ESC 모두에서 MMP-1, -2, -3, -9, TIMP-1, -2가 발현되었으나(n=2), ESC-collagen 배양체계와 EEC 및 ESC 단층 배양에서

는 EEC와 ESC 모두에서 MMPs는 발현되지 않았으나 TIMP-1과 -2는 발현되었다(n=3).

3. Cytokeratin, integrin 및 COX의 발현 양상

48시간째 EEC, ESC 단층배양 체계(n=4)와 ESC-collagen 배양체계(n=2)에서는 성선 호르몬 첨가 여부에 관계없이 integrin α1, α4, β3의 발현은 없거나 극히 미약하였으나 COX-1과 COX-2는 강한 염색을 보였다.

그러나 3차원적인 형태를 유지하고 있는 성선 호르몬이 첨가된 EEC-ESC-ECM 공배양 체계에서 integrin α1, α4, β3의 발현은 EEC에서는 강한 발현을 보였으나, 일부의 기질세포에서도 염색되었다. COX-1과 COX-2의 염색도 EEC, ESC 모두에서 강한 염색결과를 보였다(n=5).

4, 배양 48시간째 에스트로겐과 프로게스테론이 첨가된 EEC-ESC-ECM 공배양체계에서의 EEC의 전자현미경 소견

이러한 배양된 자궁내막 세포괴를 1μm로 절편을 만들어서 1% toluidine blue로 염색한 결과 상층에 단일 층으로 자라는 상피세포 및 하층에 collagen gel 내에서 자라는 기질세포를 확인할 수 있었다. 투사전자현미경으로 상피세포의 미세구조를 확인한 결과 세포 상층부로 microvilli 들이 형성되어 있었고, 세포들 간에는 tight junction과 desmosome이 형성되어 있었다. 반면 matrigel과 접하고 있는 상피세포의 아래쪽에는 위쪽과 같은 microvilli들의 형성을 찾아볼 수 없었다. 3차원적으로 배양된 상피세포는 원주 형태로 전형적인 상피세포 형태를 하고 있었고, 핵과 mitochondria들이 아래쪽에 존재하는 것이 관찰되었다. 과립들이 핵과 세포막 사이에 일렬로 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 과립 주위에 많은 rough endoplasmic reticulum (RER)들이 존재하고 있었다 (n=2). 배양된 자궁내막 세포의 입체적인 형태를 확인하기 위하여 주사전자현미경으로 확인한 결과 그물처럼 형성된 collagen fibril 위에 상피세포들이 부착되어 성장하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 배양된 대부분의 상피세포에서 microvilli와 cilia들이 형성되어 있었고, 일부 세포에서는 microvilli가 감소하면서 pinopode 형태의 돌기가 돌출 되어 있은 것을 관찰할 수 있었다 (n=2).

IV. 고찰

인간 자궁내막은 EEC와 ESC 그리고 대부분 collagen으로 구성된 ECM으로 이루어져 있고 성선 호르몬의 변화에 따라 세포간의 상호작용에 의해 특징적인 증식 및 분화 양상을 보인다(Edwards, 1995). 이 과정에서 EEC, ESC 및 ECM간의 측분비 현상(paracrine action)에 의한 상호작용은 매우 중요하다고 하겠다(Wegner and Carson, 1992; Klentzeris, 1997).

그 동안 주로 진행된 생검된 자궁내막 조직에서의 접합 분자(Lessy et al., 1994), 성호르몬(Singer et al., 1997), 사이토카인(Simon et al., 1996) 그리고 성장 인자(Giudice., 1994) 등 착상에 관여하는 것으로 알려진 물질들의 면역조직화학적 염색 방법이나 분자생물학적 방법은 다양한 생체활성 물질에 의한 내막세포의 분화, 자궁내막 세포간에 상호작용 및 착상과정의 분자생물학적 연구 등을 진행하기에 많은 제약이 있다고 하겠다. 그러나 최근에 체외에서 자궁내막 세포를 기질세포와 상피세포로 분리 배양하는 방법이 확립되면서 (Lindenberg et al., 1984) 체외 세포 배양 체계(cell culture system)를 이용하여 성선 호르몬과 자궁 내막 세포간의 측분비 현상에 의한 상호작용이 자궁내막의 분화에 미치는 영향에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Sillem등(1997)은 증식기의 EEC와 ESC의 일차적 공배양(primary co-culture)시에 α1β1, α4β1, αvβ3, β3가 발현되나 성선 호르몬에 의해서 조절되지 않는다는 보고를 하였으나 Simon등(1997, 1998)은 분비기(secretory phase)의 내막에서 얻은 EEC 단층 배양 세포에서는 integrin α1, α4, β3가 발현되지 않으나 IL-1의 투여와 embryo의 공배양에 의해 integrin β3 만이 발현되는 것을 보고하였다. Wegner 등(1992)은 murine에서 EEC에서 분비되는 용해 단백(soluble protein)이 ESC의 기능 조절에 관여함을 보고했으며, Singer 등(1997)은 인간에서 성선 호르몬이 배양액에서 제거되었을 때 EEC에서 interleukin-1α가 분비되어 ESC로부터 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현을 유발시키는 반면 프로게스테론 첨가에 의해서 억제됨을 보고하여 세포간의 측분비 작용이 내막의 변화와 분화에 필수적임을 밝힌 바 있다. 그러나, 이러한 실험 모델은 EEC와 ESC가 각각 분리 배양되었거나 ECM가 없는 상태로써 세포와 세포 혹은 세포와 ECM 간의 상호작용이 결여되어 있을 뿐 아니라 기능적인 분화 특성을 유지하지 못하는 단점을 가지고 있다. 따라서 생체에서 일어나는 인간의 자궁내막 조직의 분화에 영향을 미치는 성선 호르몬에 의한 세포간의 상호작용과 배아의 착상기전을 연구하기 위해서는 *in-vivo* 내막 조직과 유사한 EEC-ESC-ECM의 3차원 공 배

양체계의 확립과 특성 규명은 필수적이라고 할 수 있겠다.

Bentin-Ley 등(1994)은 이러한 2차원 배양의 단점을 보완하기 위하여 collagen gel과 Matrigel을 이용하여 EEC-ESC-ECM로 구성된 3차원적 공배양 체계를 개발하였으며, 성선 호르몬 투여에 의해 ESC의 형태학적 특성이 *in-vivo*의 착상기 내막상태로 분화됨을 보고한 바 있다 (Bentin-Ley et al., 1995). 이러한 연구 결과는 자궁내막 구성 요소간의 상호 작용이 내막의 분화 및 기능 조절에 중요한 역할을 담당함을 시사하며, 체외배양 체계에서 *in-vivo*의 조절 기전을 재현할 수 있음을 보여준다고 하겠다.

본 연구는 Bentin-Ley 등의 방법 (Bentin-Ley et al., 1994)에 의한 EEC-ESC-Matrigel/collagen의 3차원적 공 배양체계와 ESC-collagen의 배양체계를 각기 확립한 후에 성선 호르몬의 투여에 의한 integrins, MMPs, COXs의 발현 여부를 관찰하여 EEC-ESC-ECM의 상호작용과 성선 호르몬의 조절작용을 규명하며 EEC-ESC-ECM의 3차원적 배양체계에서 *in-vivo*의 착상기 내막조직의 특성이 유도되는지 확인하고자 하였다.

배양체계를 확립하는 과정에서 ESC-collagen 배양체계와 배양액에 프로게스테론과 에스트로젠이 첨가된 EEC-ESC-ECM 공 배양체계에서는 collagen matrix가 용해되지 않고 3차원적 구조를 유지하였으나 성선 호르몬이 첨가되지 않은 배양 체는 배양 12시간 내에 collagen matrix가 용해되었고 ESC-Collagen 배양체계와 EEC-ESC-ECM 공배양체계에서 97, 92, 72 kD의 효소의 작용, 면역조직화학적 MMP-1, -2, -3, -9의 발현과 성선 호르몬의 첨가에 따른 효소작용의 차이점은 이러한 효소의 발현에 EEC와 ESC의 상호작용이 관여한다는 것과 성선 호르몬에 의해 발현이 조절된다고 결론 내릴 수 있겠다. 본 연구에서의 gelatin substrate zymography의 57 kD 효소작용은 MMP-1, -2, 60 kD의 효소작용은 MMP-2, 72 kD의 효소작용은 proMMP-2, 84 kD의 효소작용은 protease, 92-97kD의 효소작용은 proMMP-9으로 각각 추정된다.

MMPs는 ECM의 변화를 유발하여 생리주기에 따른 내막조직의 변성(remodeling)에 관여한다고 알려져 왔다 (Rudolph-Owen et al., 1998). 이러한 MMP 분자들은 생리주기에 따라 다양한 발현 양상을 보이며 배란 및 착상과정에 관여한다 (Hulboy et al., 1997). 또한 *in-vivo*와 *in-vitro*에서 프로게스테론의 제거는 이들 MMPs 의 발현을 증가시키며, *in-vivo* 에서 조직 탈락 (tissue shedding)에 따른 여성의 생리를 유발시키는 것으로 알려져 있고 (Salamonsen et al., 1997; Marbaix et al., 1996) EEC와 ESC의 상호작용에 의해 조절된다고 보고되고 있다 (Osteen et al., 1994; Singer et al., 1997; Lockwood et al., 1998).

MMP-1의 경우에는 생리기에 기질세포층에서 강하게 발현되며 분비기에는 거의 발현되지 않는 것으로 알려져 있으며 (Rodgers et al., 1994), MMP-2의 경우에는 전 생리주기에 걸쳐 기질세포층에서 고르게 발현된다 (Tabibzadeh, 1995). MMP-3의 경우에는 분비기와 증식기에서는 약한 발현을 보이다가 생리기에 기질세포층에서 발현이 증가한다 (Rodgers et al., 1994). 이러한 MMP의 발현은 프로게스테론에 의해 조직 내에서 억제되며, 이들을 억제하는 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)의 발현은 프로게스테론에 의해 영향받지 않는 것으로 알려졌다.(Salamonsen et al., 1997). 특히 본 실험에서 EEC-ESC 공배양 체제에서 성선 호르몬 투여 시 MMP-9으로 추정되는 92-97kD의 효소반응이 증가되었으며 MMP-9의 경우에는 프로게스테론에 의한 조절 기작이 명확히 밝혀지지 않았으나 생리기 및 프로게스테론의 농도가 최고가 되는 전-중 분비기에 발현이 증가하여 후기분비기 및 생리기의 조직변성에 관여한다고 보고되고 있다 (Skinner et al., 1999).

단층배양체계에서는 세포의 모양이 모두 섬유아 세포와 유사한 변형 양상을 보였으나 EEC-ESC-ECM 공 배양체계에서 배양된 세포에서는 microvilli, tight junction과 desmosome이 형성되어 상피세포로써의 분화된 기능과 극성(polarity)을 유지(reservation)할 뿐 아니라 세포 상호간의 연결되어 생체내 조직의 특성과 잘 일치하는 특성을 보였으며(Alberts et al., 1994) 특히 분비과립의 형태와 pinopode의 분화는 생체의 착상기 내막의 특징과 일치한다고 하겠다 (Noyes et al., 1975; Martel et al, 1989). 이 조직에서의 면역조직화학적 발현 양상에 있어서도 단층배양체계와 달리 EEC와 ESC 모두에서 integrin α1, α4, β3가 발현되어 integrins의 발현이 EEC와 ESC 및 ECM 간의 측분비 작용 기전에 의해 조절됨을 알 수 있었다. 인간 자궁내막조직의 상피세포에서의 integrin의 발현 양상은 α_1, α_4, β_3 모두 증식기에는 거의 나타나지 않으나, α_1은 전기 분비기부터 시작하여 전 분비기 동안 강한 염색을 나타내고, α_4는 전기와 중기 분비기에 강하게 염색된 후에 후기 분비기에 사라지는 양상을 보이며, β_3는 중기 분비기 이후에 나타난 후에 후기 분비기까지 지속되는 특징적인 발현 양상을 보임으로써 Integrin α1, α4, β3 모두 착상기 자궁내막 조직, 즉 'implantation window'에서 강한 발현을 보인다고 보고되고 있어 (Lessy et al., 1994), 착상기 내막분화 평가의 유용한 생체 지표물질로 인식되고 있다 (Lessey et al., 2000). 특히 integrin β_3 는 배아가 착상되는 과정에 영양모세포(trophoblast)와 자궁 내막세포가 상호 인식하는 수용체로 작용하는 것으로 알려지고 있으며 (Yoshinaga, 1989) 내막세포에서 분비되는 IL-1에 의해 발현되고 포배기 배아와

의 공 배양시 배아의 IL-1에 의해 발현이 강화(Simon et al., 1997, 1998)된다고 알려져 있어 착상과정에 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있다. Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandins(PGs)의 생성에 관여하는 중요한 효소로써 COX-1과 COX-2라는 두 가지 이성체를 가지고 있다. COX-1은 생체내 많은 조직에 존재하는 내재성 효소인 반면, COX-2는 내분비적 자극에 의해 유도되는 유도성 효소의 특징을 가지고 있다 (Fletcher et al., 1992; DeWitt et al., 1995). COX-2의 발현은 자궁내막 조직에서 PGs의 생성을 유발하여 혈관의 투과성(vascular permeability)을 변화시켜, 탈락막 반응(decidual reaction)에 관여하며 (Rees et al., 1982; Malathy et al., 1986; Jacobs et al., 1993) 일부 동물에서는 착상 및 임신 유지에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 보고되고 있다 (Charkraborty et al., 1996; Charpigny et al., 1997). 인간에 있어서도 자궁내막의 상피세포에서 COX-2의 발현을 확인한 이래 태반 및 자궁내막에서 COX-2의 발현을 확인하였으나 (Rees et al., 1982; Wetzka et al., 1997; Han et al., 1996) 생리 주기에 따른 자궁내막에서의 발현 양상은 아직 확립되어 있지 않다. Jones(1997) 등은 자궁내막 조직의 선상피세포에서 COX-2의 발현이 전 생리기간에 걸쳐 일어나며, 특히 후기 분비기와 생리기에 높게 나타난다고 보고하였으나 Kwon 등(1999)은 선상피세포에서는 생리주기에 관련 없이 미약한 발현을 보이고 내강 상피세포에서는 증식기에서 발현이 미약하다가 분비기에 발현이 뚜렷하게 증가하여 후기 분비기까지 지속되는 양상을 보인다고 보고하였다. 최근의 연구보고는 COX-2가 VEGF, TGF-β1, PDGF의 발현에 관여하여 혈관 신생(angiogenesis)을 유발하며 (Tsujii et al., 1998; Chiarugi et al., 1998; Uefuji et al., 2000) 세포와 세포간 물질간의 부착(adhesion)과 E-cadherin의 발현을 억제하여 내막의 조직 변형 (tissue remodeling)과 착상 과정에 관여함을 보고하고 있다 (Tsujii and DuBois, 1995).

본 연구의 결과는 EEC-ESC-Matrigel/collagen의 3차원적 공 배양체계가 EEC 혹은 ESC 단층배양 체계 및 ESC-collagen의 배양체계와 다르게 성선 호르몬의 영향하에서 EEC와 ESC의 측분비 작용에 의해 *in-vivo* 에서 착상기 내막세포와 유사한 형태와 생체 활성 물질 의 발현을 유발한다는 것을 보여주고 있다. 이러한 체외 자궁내막 세포 배양 체계는 내막조직의 분화 및 배아의 착상기전 뿐 아니라 착상관련 질환의 병리학적 연구에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. *In:* Molecular Biology of The Cell. 3rd edition. pp. 950-1006. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1994.
2. Bentin-Ley, U., Lindenberg, S., Horn, T., Larsen, J. F. Ultrastructure of endometrial epithelial cells in a three-dimensional cell culture system for human implantation studies. J Assist Reprod Genet., *12(9)*:632-8, 1995.
3. Bentin-Ley, U., Pedersen, B., Lindenberg, S., Larsen, J. F., Hamberger L., Horn T. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. J Reprod Fertil., *101*:327-32, 1994.
4. Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J. P., Creminon, C., Martal, J., Maclouf, J., Guillomot, M. Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. Endocrinology, 138(5):2163-71, 1997.
5. Charkraborty, I., Das, S. K., Wang, J., Dey, S. K. Developmental expression of the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroid. J Mol Endocrinol., 16: 107-22, 1996.
6. Chiarugi, V., Magnelli, L., Gallo, O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. Int J Mol Med., 2(6):715-9, 1998.
7. DeWitt, D., Smith, W. L. Yes, but do they still get headaches? Cell, 83:345-8, 1995.
8. Edwards, R. G. Physiological and molecular aspects of human implantation. Human Reprod., 10 Suppl 2: 1-13, 1995.
9. Fletcher, B. S., Kujubu, D. A., Perrin, D. M., Herchman, H. R. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. J Biol Chem., 267:4338-44, 1992.
10. Guidice, L. C. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. Fertil Steril., 61:1-17, 1994.

11. Han, S. W., Lei, Z. M., Rao, C. V. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. Endocrinology, 137:1791-7, 1996.
12. Hearn, J. P. The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates. J Reprod Fertil., 76:809-19, 1986.
13. Hulboy, D. L., Martrisian, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol Hum Reprod., 3(1):27-45, 1997.
14. Jacobs, A. L., Carson, D. D. Uterine epithelial cell secretion of interleukin-1α induces prostaglandin E_2 (PGE_2) and $PGF_{2\alpha}$ secretion by uterine stromal cells *in vitro*. Endocrinology, 132:300-8, 1993.
15. Jones, R. L., Kelly, R. W., Critchley, H. O. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. Hum Reprod., 12:1300-6, 1997.
16. Klentzeris, L. D. The role of endometrium in implantation. Hum Reprod., 12(11 Suppl):170-5, 1997.
17. Kwon, H. C., Yang, H. W., Hwang, K. J., Kim, S. K., Cho, D. J., Oh, K. S. Pattern of cyclooxygenase expression in the human endometrium during the menstrual cycle. Human Reprod. 14(abstract book 1):270-271, 1999
18. Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Buck, C. A., Lei, Y., Yowell, C. W., Sun, J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. Fertil Steril., 62(3):497-506, 1994.
19. Lessey, B. A., Castelbaum, A.J., Wolf, L., Greene, W., Paulson, M., Meyer, W. R., Fritz, M. A. Use of integrins to date the endometrium. Fertil Steril., 73(4): 779-87, 2000.
20. Lindenberg, S., Lauritsen, J. G., Nielsen, M. J., Larsen, J. F. Isolation and culture of human endometrial cells. Fertil Steril., 41:650-652, 1984.
21. Lockwood, C. J., Krikun, G., Hausknecht, V. A., Papp, C., Schatz, F. Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. Endocrinology, 139:4607-13, 1998.
22. Malathy, P. V., Cheng, H. C., Dey, S. K. Production of leukotrienes and prostaglandins in the rat uterus during peri-implantation period. Prostaglandins, 32: 605-14, 1986.

23. Marbaix, E., Kokorine, I., Moulin, P., Donnez, J., Eeckhout, Y., Courtoy, P. J. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked *in vitro* and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. Proc Natl Acad Sci U S A., 20;93(17):9120-5, 1996.
24. Martel, D., Frydman, R., Sarantis, D. Scanning electron microscopy of the uterine luminal epithelium as a marker of the implantation window. *In:* Koji Yoshinaga (eds.), Blastocyst implantation, pp 219-30. Adams publishing group, Ltd, 1989.
25. Noyes, R. W., Hertig, A. T., Rock, J. Dating the endometrial biopsy. Am J Obstet Gynecol., 122(2):262-3, 1975.
26. Osteen, K. G., Rodgers, W. H., Gaire, M., Hargrove, J. T., Gorstein, F., Matrisian, L. M. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. Proc Natl Acad Sci U S A., 11;91(21):10129-33, 1994.
27. Rees, M. C., Parry, D. M., Anderson, A. B., Turnbull, A. C. Immunohistochemical localisation of cyclooxygenase in the human uterus. Prostaglandins, 23: 207-14, 1982.
28. Rodgers, W. H., Matrisian, L. M., Giudice, L. C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F., Osteen, K. G. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. J Clin Invest., 94(3):946-53, 1994.
29. Rudolph-Owen, L. A., Slayden, O. D., Matrisian, L. M., Brenner, R. M. Matrix metalloproteinase expression in Macaca mulatta endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients. Biol Reprod., 59(6):1349-59, 1998.
30. Salamonsen, L. A., Butt, A. R., Hammond, F. R., Garcia, S., Zhang, J. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an *in vitro* model for menstruation. J Clin Endocrinol Metab., 82(5):1409-15, 1997.
31. Sillem, M., Prifti, S., Schmidt, M., Rabe, T., Runnebaum, B. Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment *in vitro*. Fertil Steril, 67:877-82, 1997.
32. Simon, C., Gimeno, M. J., Mercader, A., O'Connor, J. E., Remohi, J., Polan,

M. L., Pellicer, A. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells *in vitro*. J Clin Endocrinol Metab., 82(8):2607-16, 1997.

33. Simon, C., Gimeno, M. J., Mercader, A., Frances, A., Garcia Velasco, J., Remohi, J., Polan, M. L., Pellicer, A. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? Mol Hum Reprod., 2(6):405-24, 1996.
34. Simon, S., Moreno, C., Remohi, J., Pellicer, A. Cytokines and embryo implantation. J Reprod Immunol., 39:117-31, 1998.
35. Singer, C. F., Marbaix, E., Kokorine, I., Lemoine, P., Donnez, J., Eeckhout, Y., Courtoy, P. J. Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1alpha and its dual block by ovarian steroids. Proc Natl Acad Sci U S A., 16;94(19):10341-5, 1997.
36. Skinner, J. L., Riley, S. C., Gebbie, A. E., Glasier, A. F., Critchley, H. O. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. Hum Reprod., 14(3):793-9, 1999.
37. Tabibzadeh, S. Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. Hum Reprod Update., 1(4):303-23,1995.
38. Tsujii, M., DuBois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell. 83(3):493-501, 1995.
39. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell, 93(5):705-16, 1998.
40. Uefuji, K., Ichikura, T., Mochizuki, H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. Clin Cancer Res, 6(1):135-8, 2000.
41. Wegner, C. C., Carson, D. D. Mouse uterine stromal cells secrete a 30 kilodalton protein in response to coculture with uterine epithelial cells. Endocrinology, 131:2565-72, 1992.
42. Wetzka, B., Nusing, R., Charnock-Jones, D. S., Schafer, W., Zahradnik, H.

P., Smith, S. K. Cyclooxygenase-1 and -2 in human placenta and placental bed after normal and pre-eclamptic pregnancies. Hum Reprod., 12: 2313-20, 1997.

43. Yoshinaga, K. Receptor concept in implantation research. *In:* Yoshinaga K, Mori T (eds), Development of preimplantation embryos and their environment. pp 379-94.. New York: Alan R. Liss, 1989.