

인간의 착상 기전을 연구하기 위한 3차원적 자궁내막 모델 확립

아주대학교 의과대학 산부인과학교실, 연세대학교 의과대학 산부인과학교실¹

박동욱 · 양현원 · 권혁찬² · 장기홍 · 김세광¹ · 조동제¹ · 오기석

3-Dimensional Culture System of Endometrial Cells for Studying the Human Implantation Mechanism

Dong Wook Park, Hyun Won Yang, Hyuck Chan Kwon², Ki Hong Chang,
Sei Kwang Kim¹, Dong Jae Cho¹ and Kie Suk Oh

Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine,
Suwon, Department of Obstetrics and Gynecology,
Yonsei University College of Medicine¹, Seoul

= Abstract =

In order to study the implantation mechanism various methods for culture of endometrial cells in vitro have been attempted. However, a disadvantage is that primary cultures of stromal and epithelial cells do not have the ability to differentiate, and therefore cannot be reproduced in the same manner as in vivo endometrium. The object of this study is to establish a three dimensional culture of endometrial cells which are both morphologically and functionally identical to in vivo endometrium. Endometrial tissues obtained after hysterectomies were cut into thin slices and treated with collagenase and trypsin-EDTA. The stromal cells and the epithelial cells were separated by centrifugation and cultured for 24 hours in DMEM media containing 10% FCS, 100 nM progesterone, and 1 nM estradiol. The cultured stromal cells were mixed with collagen gel and solidified, after which it was covered with matrigel. Epithelial cells were inoculated on the top and then cultured for 3 days. The three dimensionally cultured endometrial cells were stained for integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$, and cyclooxygenase-1, -2 by immunohistochemistry, which all showed strong expression. The cultured epithelial cells showed the formation of microvilli, tight junctions and pinopodes by electron microscopy. Studies are currently under way utilizing this three dimensional culture model to ascertain the interaction between the embryo and human endometrial cells at the time of implantation, and it is thought that further studies into a new culture environment which would allow longer periods of culture will be necessary.

Key Words: 3-Dimensional culture of human endometrium

서 론

인간의 착상 기전에 관한 연구는 주로 생검된

자궁내막 조직에서 접합분자 (Lessy *et al.*, 1992),
성호르몬 (Singer *et al.*, 1997), cytokine (Simon,
1996) 그리고 성장인자 (Giudice., 1994) 등 착상에
관여하는 것으로 알려진 물질들을 면역조직화학

본 연구는 '98년도 보건과학기술개발연구사업의 지원 (HMP-97-M-1-0006)에 의하여 이루어진 것임.
주관책임자: 권혁찬: 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5번지 아주대학교 산부인과학교실²

적 염색 방법이나 분자생물학적 방법으로 조사함으로써 이루어져 왔다 (Klentzeris, 1997). 그러나 이러한 연구 방법으로는 자궁 내 착상 부위에서 일어나는 포배기 배아와 자궁내막과의 상호작용을 직접적으로 관찰하는 것이 불가능하였으며, 이러한 문제점을 해결하기 위해 체외에서 착상 기전을 연구할 수 있는 새로운 방법들이 개발되어 왔다. 세포 배양 기술이 발달하면서 인간 자궁내막 조직을 상피세포와 기질세포로 분리하여 배양하는데 성공하였고 (Lindenberg *et al.*, 1984), 이후 자궁내막 세포 특성에 관한 많은 연구가 있어 왔다. 그러나 이렇게 2차원적으로 단층 배양된 자궁내막 세포들은 증식은 이루어지나 기능적인 분화 특성을 유지하지 못하여 실질적인 착상 기전 연구에는 도움이 되지 못했다. 그러나 최근에 Bentin-Ley 등 (1994)은 collagen gel을 이용하여 자궁내막 세포를 3차원적으로 배양하는 방법을 개발하였으며, 이어서 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포가 형태학적으로 체내의 자궁내막 조직과 유사한 구조를 하고 있음을 보고하였다 (Bentin-Ley *et al.*, 1995).

체외에서 인간 자궁내막 세포 배양을 통한 착상 기전에 관한 연구는 궁극적으로 포배기 배아와 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포를 공배양함으로써 체외에서 배아와 자궁내막 세포간의 착상 과정을 재현하고, 그때 일어나는 상호작용을 연구하는데 있다. 그러므로 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포가 착상기 자궁내막 조직과 비교해서 형태학적 특성 뿐만 아니라 기능적으로도 착상기 자궁내막 세포의 특성을 그대로 유지시키는 것은 필수적이라 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포가 체내 착상기 자궁내막 조직이 형태학적 특징 뿐만 아니라 기능적 분화 특성을 유지하고 있는지를 알아보기 위하여 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포에서 인간 착상기 자궁내막에서 특이적으로 발현되는 것으로 알려져 있는 integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ (Lessey *et al.*, 1994) 및 COX-1, -2 (박동욱 등, 1998)의 발현을 면역조직화학적 염색 방법으로 확인하였으며, 전자현미경으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 자궁내막 조직의 획득

자궁내막 조직은 아주대병원 산부인과를 내원

한 환자 중 자궁내막 질환 이외의 원인 (자궁 근종 및 자궁선 근종)으로 인해 전자궁적출술을 시행한 환자 중에서 배란일을 기준으로 6일에서 10일까지의 중기 분비기를 보이는 환자의 적출된 자궁 후저부로부터 획득하였다.

2. 자궁내막 세포의 배양

채취된 자궁내막 조직은 PBS가 들어 있는 conical tube (Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA)에 담아 실험실로 운반했으며, 다시 PBS로 여러 번 세척하여 남아 있는 혈액을 제거하였다. 배양 접시에 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM; Gibco, Life Technologies, Roskilde, USA)을 2~3 ml를 부어준 후 조직을 넣고 멸균된 가위를 이용하여 1~2 mm의 크기로 잘랐다. 잘게 잘린 조직은 다시 conical tube에 용액과 함께 부어준 후 원심분리하여 상층액을 따라내고, 1,000 units/ml collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 ml를 첨가하여 37°C에서 회전 배양 (shaking incubation)하였다. 1시간 경과 후 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 100 nM progesterone (Sigma, UAS)과 1 nM estradiol (Sigma, USA)이 포함된 DMEM 배양액을 5 ml 첨가하여 효소 작용을 정지시킨 후 기질세포들이 포함된 용액 상층부 5 ml과 상피세포들이 포함된 하층부 5 ml을 각각 나누어 60 mm 배양접시 (Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA)에 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양된 상피세포를 단일 세포로 분리하기 위하여 새로운 배양액으로 세척한 후 덩어리를 이루고 있는 상피세포를 멸균된 conical tube에 넣고 400 rpm에서 10분간 원심분리하여 남아 있는 배양액을 제거한 다음 trypsin-EDTA (Gibco, USA) 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 회전 배양하였다. 이와 동시에 배양된 기질세포는 배양접시에 배양액을 제거한 후 trypsin-EDTA 2 ml를 첨가하여 10분 경과 후 새로운 배양액 5 ml 첨가한 후 400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 단일 세포로 분리된 기질세포를 5×10^6 cells/ml의 농도로 collagen (Biocoat, Bedford, USA) 용액과 섞어 cell culture insert (Sigma)에 500 μ l를 부은 후 37°C에서 1시간 배양하여 collagen이 중합되도록 하였다. 1시간 후 중합된 collagen gel 위에 matrigel (Biocoat, USA) 50 μ l를 부어 30초간 방치한 후 남아 있는 액체를 제거한다. 여기에 단일 세포로 분리된 상피세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 배양액과

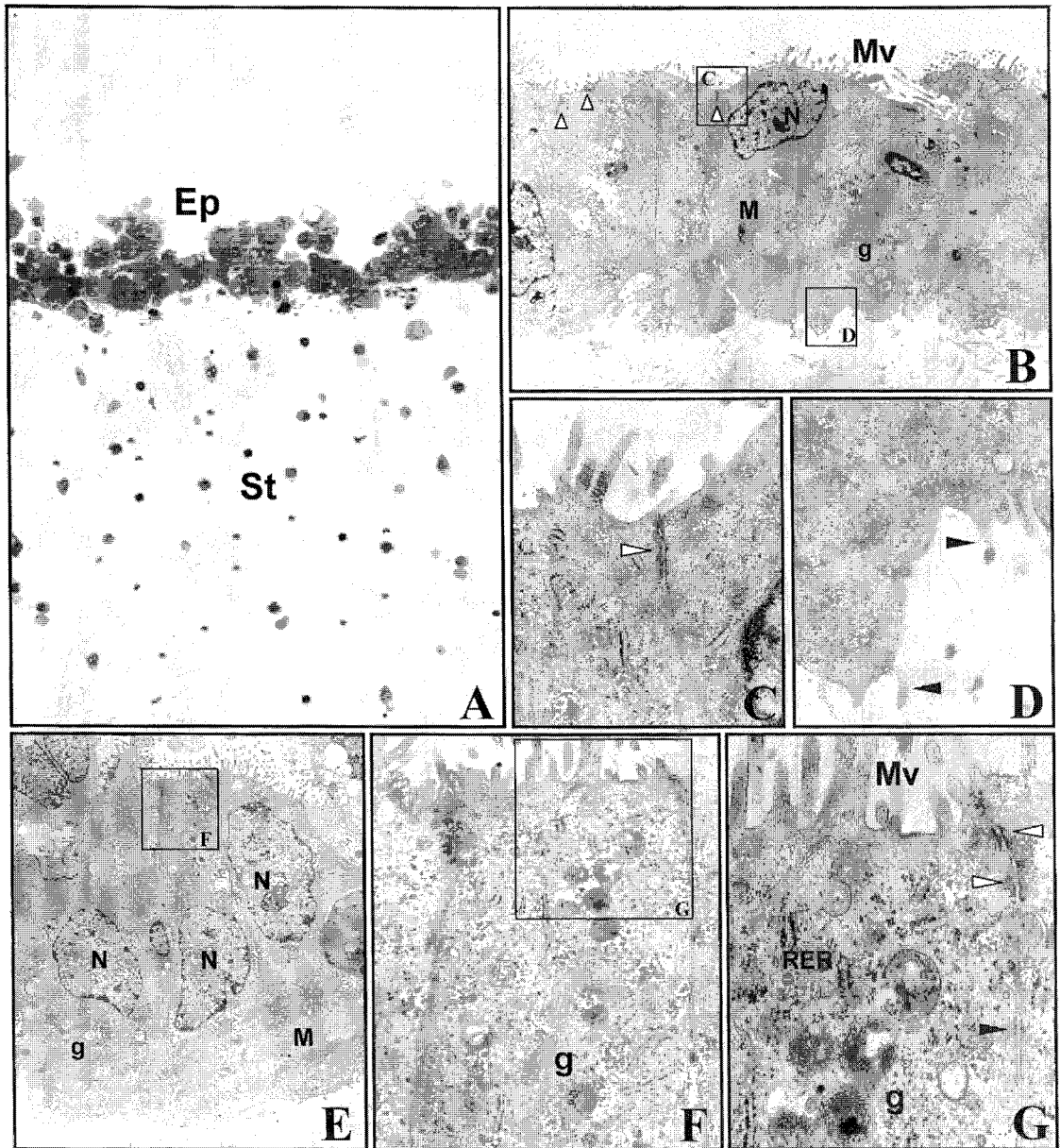


Fig. 1 (A) Light micrograph of cultured endometrial cells. An epithelial cells (Ep) are placed on the top of collagen gel embedding stromal cells (St). (B~G) Transmission electron micrographs of cultured endometrial cells. (B~D) The epithelial cells show microvilli (Mv) on the surface and apical tight junctions (open arrowheads) between the epithelial cells. Some epithelial demonstrate protrusions at the basal surface (close arrowheads). (E~G) The cultured epithelial cells are polarized to columnar cells with basally located nuclei (N) and mitochondria (M). The granules located in a row between the nucleus and the apical membrane of an epithelial cell. The junctions of epithelial cells are comprised of apical tight junctions (open arrowheads) and rivet-like desmosomes (close arrowhead). (A, X400; B, E, X4,000; C, D, G, X30,000; F, X12,000)

섞어 접종한 후 cell culture insert를 6 well 배양접시 (Nunc A/S, Roskilde, Denmark)에 넣고 배양액을 2 ml 부어준 후 48시간 배양하였다.

3. 투사전자현미경

3차원적으로 배양된 자궁내막 세포는 3% glu-

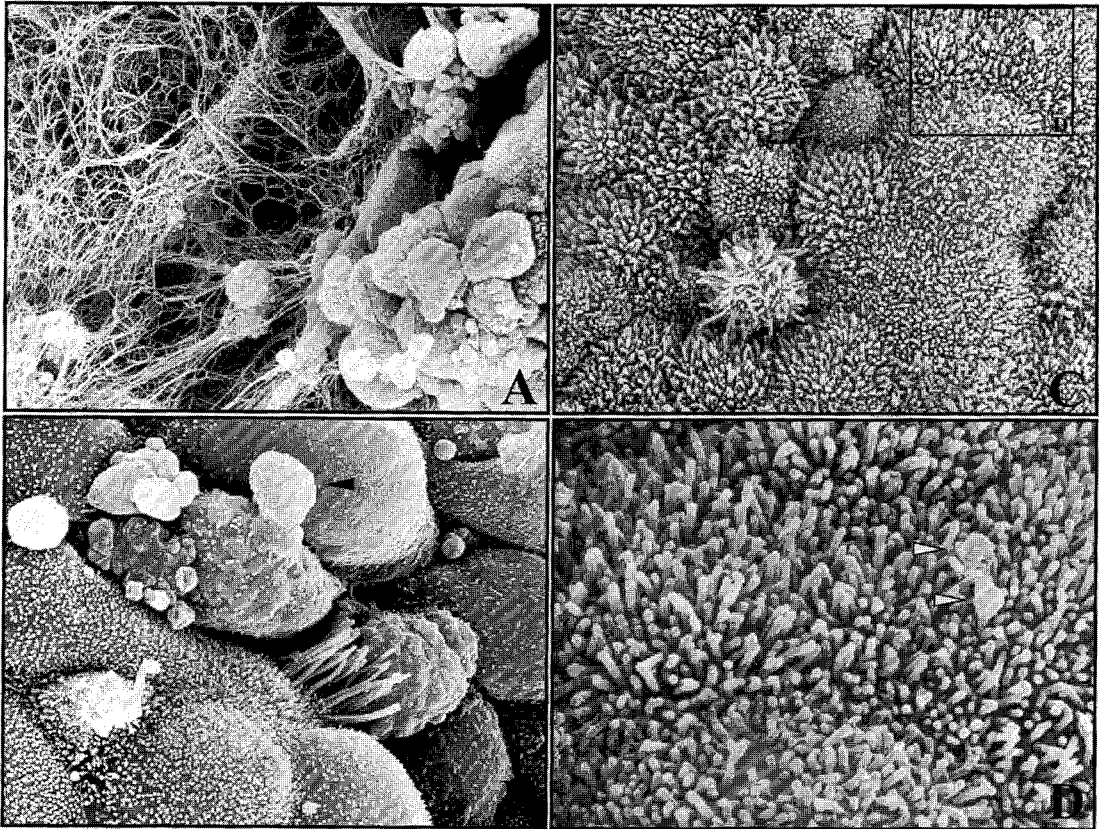


Fig. 2. Scanning electron micrographs of cultured epithelial cells. (A) The collagen lattices are placed underneath the cultured epithelial cells and they attach each other. (B) Some epithelial cells protrude a pinopode (close arrowhead). (C~D) The surface of epithelial cells is covered abundantly with microvilli and some cells are ciliated. Some cells show granule-like protrusions. (A, X2,000; B, C, X5,000; D, X10,000)

taraldehyde (0.1 M Millonig's phosphate buffer, pH 7.3) 고정액에서 3시간 전 고정하였다. 동일한 완충 용액으로 세척시킨 다음, 1% osmium tetroxide (0.1 M Millonig's phosphate buffer, pH 7.3) 고정액으로 후 고정 용액에 다시 1시간 20분 동안 고정하였다. 동일한 완충 용액으로 세척시킨 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수시키고, propylene oxide로 치환하였다. Epon 포매제를 사용하여 포매하고 열중합 하였다. 평판 포매된 block을 ultramicrotome으로 1 μm 두께의 절편으로 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰된 부분 중에서 필요한 부분을 제외하고 모두 제거한 다음 초박절편기 (ultramicrotome, MT2-B)로 50~70 nm 두께의 초박절편을 제작하여 copper grid (200 mesh)에 부착시켰다. 부착된 재료를 2% uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 건조시키고 투사전자현미경 (Hitach,

H-600, 80 kV, Japan)으로 관찰하였다.

4. 주사전자현미경

3차원적으로 배양된 자궁내막 세포는 투사전자현미경과 동일한 방법으로 고정과 세척 및 탈수 과정을 시행하였다. Isoamyl acetate로 3회 처리한 후 임계점 건조기 (critical point dryer, HCP-2)에서 건조시켰다. 재료를 제물대에 부착시키고, 금속 이온 증착은 ion sputter (E-1010)을 사용하여 약 20 nm 두께로 금을 도금하였다. 준비된 재료는 주사 전자현미경 (Phillips, S-2380N)으로 25 kV에서 관찰하였다.

5. 면역조직화학적 염색

Cytokeratin 및 integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ 와 COX-1, -2에 대한 면역조직화학적 염색은 먼저 박절한 표본에서 paraffin을 제거한 후 4% H_2O_2 용액에 5분간 전

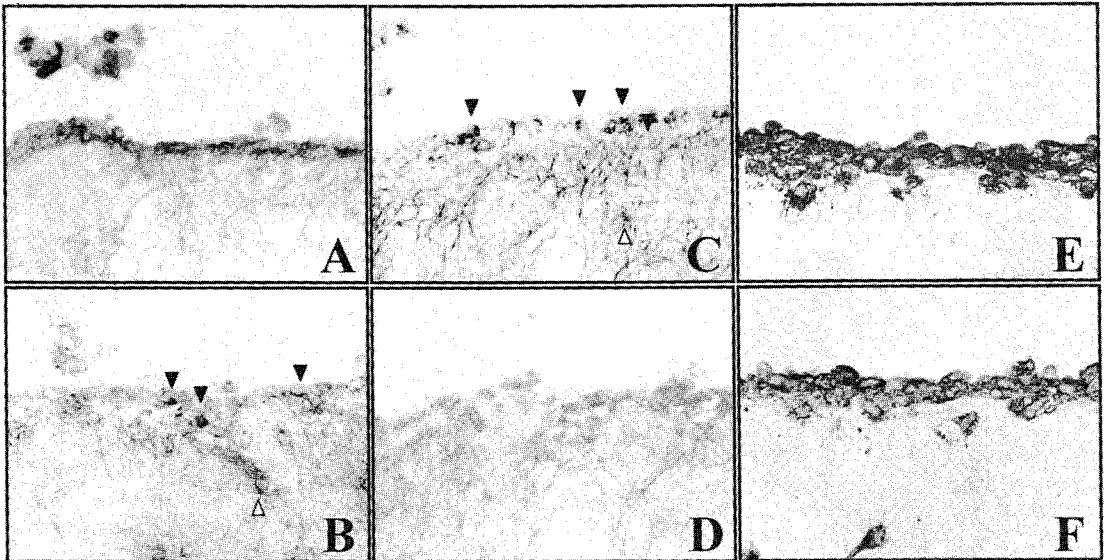


Fig. 3. Light micrographs of immunohistochemically stained cultured cells. (A) Positive cyokeratin staining concentrated at monolayered cells on the top of 3-dimension cultures confirms the epithelial origin of these cells. (B) Positive integrin $\alpha 1$ staining (close arrowheads) demonstrates at the epithelial cells. Some stromal cells show positive integrin $\alpha 1$ staining (open arrowhead). (C) Positive integrin $\beta 3$ staining (close arrowheads) demonstrates at the epithelial cells. Some stromal cells show positive integrin $\beta 3$ staining (open arrowhead). (D) Integrin $\alpha 4$ dose not show at the cultured cells. (E~F) Both epithelial and stromal cells show positive COX-1 and -2 staining. (A~F, X1,000)

처리하여 조직에 남아 있는 peroxydase를 제거하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 1/400으로 희석한 cyokeratin에 대한 일차항체 (Anti-human mouse monoclonal, Santa Cruz, Biotechnology Inc., California, USA) 및 integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ 각각에 대한 일차항체 (Anti-human mouse monoclonal, Santa Cruz, USA)와 COX-1, COX-2 일차항체 (Anti-human goat polyclonal, Santa Cruz, USA)로 상온에서 1시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB-kit (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)에 포함된 2차항체를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 diaminobenzidine (DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 10초간 대조 염색하여 canadian balsam으로 봉입한 후 관찰하였다.

결 과

1. 3차원 배양된 자궁내막 세포의 확인

배양된 자궁내막 세포를 1 μm 로 절편을 만들어서 1% toluidine blue로 염색한 결과 상층에 단일 층으로 자라는 상피세포 및 하층에 collagen

gel 내에서 자라는 기질세포를 확인할 수 있었다 (Fig. 1, A). 투사전자현미경으로 상피세포의 미세 구조를 확인한 결과 epithelial cell 위쪽으로 microvilli들이 형성되어 있었고, 세포들간에는 tight junction이 형성되어 있었다. 반면 matrigel과 접하고 있는 상피세포의 아래쪽에는 위쪽과 같은 microvilli들의 형성을 찾아 볼 수 없었고, 몇 개의 돌기만이 돌출되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1, B~D). 3차원적으로 배양된 상피세포는 원주 형태로 전형적인 상피세포 형태를 하고 있었고, 핵과 활성화된 mitochondria들이 아래쪽에 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, E). 또한 과립들이 핵과 세포막 사이에 일렬로 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 과립 주위에 많은 rough endoplasmic reticulum (RER)들이 존재하고 있었다. 한편 배양된 원주형의 상피세포간에는 tight junction 뿐만 아니라 desmosome이 형성되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, F~G). 배양된 자궁내막 세포의 입체적인 형태를 확인하기 위하여 주사전자현미경으로 확인한 결과 그물처럼 형성된 collagen fibril 위에 상피세포들이 부착되어 성장하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2,

A). 또한 배양된 대부분의 상피세포에서 microvilli와 cilia들이 형성되어 있었고, 일부 세포에서는 microvilli가 감소하면서 pinopode 형태의 돌기가 돌출되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 몇몇 세포에서는 microvilli들 사이로 과립 형태의 작은 돌기들이 돌출되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, B~D).

2. 3차원 배양된 자궁내막 세포에서 cytokeratin, integrin 및 COX의 발현 양상

배양된 자궁내막 세포에서 cytokeratin의 발현은 상층의 상피세포에서만 강한 염색 결과를 보였다. 한편 integrin $\alpha 1$ 과 $\beta 3$ 의 발현은 상피세포에서 강한 염색 결과를 나타냈으며, 기질세포에서도 일부 세포에서 염색 결과를 보였다. 반면에 integrin $\alpha 4$ 는 상피세포와 기질세포에서 모두 염색되지 않았다. COX-1과 COX-2에 있어서는 상피세포 및 기질세포 모두에서 강한 염색결과를 보였다 (Fig. 3).

고 찰

생리 주기 중 착상 시기의 자궁내막 세포는 호르몬의 변화에 따른 증식 및 분화 양상을 보이며 (Singer *et al.*, 1998), 이러한 자궁내막의 분화는 또한 자궁내막 상피세포와 기질세포간의 내분비적 상호작용을 필수로 한다 (Klentzeris *et al.*, 1997). 그러므로, 세포 배양을 통한 착상 기전을 연구에 있어서도 호르몬과 기질세포에 의한 자궁내막 상피세포의 분화를 유도하는 것은 필수적이라고 할 수 있다. 먼저 자궁내막 세포를 3차원적으로 배양하면서 세포의 분화를 유지하기 위해서는 우선적으로 자궁내막 조직으로부터 자궁내막 상피세포와 기질세포를 적절히 분리하여야 한다. Osteen 등 (1989)과 Bentin-Ley 등 (1994)에 의한 이들 두 세포의 분리 방법은 먼저 자궁내막 생검 조직을 분해 효소로 처리한 후 단일 세포로 분리된 기질세포와 비교적 큰 덩어리로 남아 있는 상피세포를 필터를 이용 분리하였으나 본 연구에서는 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 일차 배양을 통하여 세포들을 분리하였다. 이러한 분리 방법은 좀더 간단히 각각의 세포에 대한 상호 오염 없이 상피세포와 기질세포를 분리할 수 있는 장점을 가지고 있다.

이들 세포의 분리 여부를 알아보기 위하여 상

피세포에 특이적으로 발현하는 cytokeratin 단일항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 염색 결과 단일 세포층, 즉 상피세포층에서만 강한 염색 결과를 보여 성공적으로 분리 배양되었음을 알 수 있었다. 3차원적으로 배양된 자궁내막 조직이 착상기 자궁내막의 특성을 유지하고 있는지 알아보기 위하여 cyclooxygenase (COX)-1, -2, 및 integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ 에 대한 단일항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 수행하였다. COX는 PGs를 arachidonic acid로부터 합성하는데 관여하는 중요한 효소로 COX-1과 COX-2라는 두 가지 이성체를 가지고 있다 (DeWitt *et al.*, 1995). COX-1은 생체 내 많은 조직에 존재하는 내재성 효소인 반면, COX-2는 내분비적 자극에 의해 유도되는 유도성 효소의 특징을 가지고 있다. 이러한 특징은 동물의 발정 주기에 따른 이들 효소의 자궁내 발현 양상에서 확인되어 왔다. 특히 인간 생리 주기에 있어서 COX-1의 발현은 전 생리 주기에 걸쳐 자궁내강 상피세포에서 발현되는 반면 COX-2는 전기 증식기에서는 비교적 약하게 발현되다가 배란 이후 증기 분비기 즉, 착상 시기에 자궁내강 상피세포와 기질세포에서 특이적으로 강하게 발현되는 것으로 보고되고 있다 (박동욱 등, 1998). 기존에 실험 결과들을 기초로 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포에서 COX-1과 -2의 발현 양상을 조사한 결과 COX-1, -2 모두 기질세포와 상피세포에서 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과로 미루어 보아 3차원으로 배양된 자궁내막 세포들이 착상기 자궁내막 세포의 특성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

세포와 세포 외 기질 (extracellular matrix)과의 접합에 관여하는 수용체 분자인 integrin은 현재까지 다양한 종류가 밝혀져 있다. 자궁내막 조직에 있어서도 여러 종류의 integrin이 존재하는 것으로 알려져 있으며 (Beliard *et al.*, 1997), 자궁내막에서 호르몬 변화에 따른 이들 분자의 발현 양상이 보고되어 왔다 (Lessey *et al.*, 1997). 이 중 $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ subunit이 착상기 자궁내막, 즉 'implantation window'에 특이적으로 동시에 발현하는 것으로 알려져 있다 (Lessey *et al.*, 1994). 이런 결과를 토대로 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포에서 integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 3$ 의 발현 양상을 조사한 결과 integrin $\alpha 1$, $\beta 3$ 는 착상기 자궁내막 조직에서와 같이 강한 발현을 보였으나, integrin $\alpha 4$ 의 경우에는 발현되지 않았다. 이와 같이 3차원 배양된 자궁내막 세포에서 integrin의 발

현이 생체 내 착상기 자궁내막과 완전히 일치하지 않는 것은 paracrine, autocrine, juxtacrine 등을 통한 cytokine의 영향 및 각종 lymphocyte의 영향 (Tabibzadeh *et al.*, 1995)이 배제되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

전자현미경으로 상피세포의 미세구조를 확인한 결과 상피세포 위쪽으로 microvilli들이 형성되어 있고, 세포들간에는 tight junction과 desmosome이 형성되어 기능적으로 단단하게 결합되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. Tight junction은 기능적으로 내강과 조직의 기질층을 물리, 화학적으로 구분하는 상피세포 특이적인 구조로서 3차원 배양시 상피세포 상층부의 배지와 상피세포 하층부가 물리, 화학적으로 구분되어 있음을 알 수 있다. 또한 상피세포간의 결합을 유지시키는 desmosome이 관찰되었는데 이러한 desmosome 구조는 상피세포의 세포질에 존재하는 세포 내 골격구조인 keratin filament와 연결되어 인접 세포간의 연결에 관여한다 (Alberts *et al.*, 1994). 이러한 tight junction와 desmosome의 존재는 3차원적으로 배양된 자궁내막 세포가 2차원 배양과는 다르게 세포 상호간에도 강하게 연결되어 있음을 말해주며, 이러한 특성은 생체 내 조직의 특성과도 잘 일치한다. 또한 배양된 자궁 내막 상피세포에서 microvilli가 사라지면서 나타나는 pinopode의 존재가 관찰할 수 있었으며, 이러한 형태는 생검된 착상기 자궁내막 상피세포의 형태학적 특성과 일치한다 (Martel *et al.*, 1991).

결론적으로 3차원 배양된 자궁내막 세포는 형태학적으로 생체 내 착상기 자궁내막과 거의 유사한 형태를 갖고 있으며, 조직학적으로도 생체 내 조직의 특성을 갖추고 있다. 그러나 성호르몬 이외에 여러 내분비적 영향 요인이 배제되어 있으므로 생체 내 착상기 자궁내막에서 발현되는 integrin들은 완벽히 발현하지 않고 있다. 따라서 각종 내분비적 요인을 3차원 자궁내막 세포 배양 system에 적용하는 것이 필요하며 이러한 인간 착상 기전에 관한 연구는 불임의 원인 규명 및 치료와 체외수정 프로그램에 있어서 임신 성공률의 향상에 필수적이라 할 수 있다.

인 용 문 헌

Albert B, Bray D, Lewis J, et al.: Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., 1994, 3rd

edition, 957-963.

- Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, et al.: Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 1994, 101, 327-332.
- Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM: Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997, 67, 266-272.
- DeWitt D, Smith WL: Yes, but do they still get headaches? *Cell* 1995, 83, 345-348.
- Giudice L: Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil steril* 1994, 61, 1-17.
- Klontzeris LD: The role of endometrium in implantation. *Hum Reprod* 1997, 12 (Suppl 2), 170-175.
- Lessey BA, Damjanovich L, Courifaris C, et al.: Integrin adhesion molecules in the human endometrium. *J Clin Invest* 1992, 90, 188-195.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, et al.: Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil steril* 1994, 62, 497-506.
- Lindenberg S, Lauritsen JG, Nielsen MJ, et al.: Isolation and culture of human endometrial cells. *Fertil steril* 1984, 41, 650-652.
- Martel D, Frydman R, Sarantis, et al.: Scanning electron microscopy of the uterine luminal epithelium as a marker of the implantation window. In: Koji Yoshinaga eds. *Blastocyst implantation*. Adams publishing group, Ltd. 1989, 219-230.
- Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, Gorstein F: Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fertil Steril* 1989, 52, 965-972.
- 박동욱, 양현원, 권혁찬 등: 인간 자궁내막에서 Cyclooxygenase-1과 -2의 주기적 발현 양상. *대한불임학회지* 1998, 25, 25-33.
- Simon C: Potential molecular mechanisms for the contraceptive control of implantation. *Mol Hum Reprod* 1996, 2, 475-480.
- Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, et al.: Paracrine

stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1 α and its dual block by ovarian steroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, 10341-10345.

Singer GAM, Strowitzki T, Rettig I, et al.: Flow cytometric detection and binding studies of human endometrial stromal cell epidermal growth factor receptor in monolayer culture: influence of progesterone. *Mol Hum Reprod* 1998, 4, 577-583.

Tabibzade S, Babaknia A: The signals and molec-

ular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Hum Reprod* 1995, 10, 1579-1602.

Widra EA, Weeraratna A, Stepp MA, Stillman RJ, et al.: Modulation of implantation-associated integrin expression but not uteroglobin by steroid hormones in an endometrial cell line. *Mol Hum Reprod* 1997, 3, 563-568.