

## 소 비장 유래 Macrophage의 체외배양에 의한 배양액내 호르몬 변화

최선호<sup>†</sup> · 조상래 · 한만희 · 김현중 · 연성흠 · 손동수 · 김영근

농촌진흥청 축산연구소

### Hormonal Changes in Cultured Medium on *In Vitro* Culture of Bovine Splenic Macrophages

Sun-Ho Choi<sup>†</sup>, Sang-Rae Cho, Man-Hye Han, Hyun-Jong Kim,  
Seong-Heum Yeon, Dong-Soo Son and Young-Keun Kim

National Livestock Research Institute, RDA, Namwon, 590-832, Korea

**ABSTRACT** : This study was performed to investigate the hormonal changes in cultured medium during *in vitro* culture of bovine splenic macrophages. Both pregnant and non-pregnant slaughterhouse spleen were obtained and the macrophages were separated and cultured for 24~120 hrs at 39°C. Progesterone productions of pregnant group were higher than non-pregnant group for 24~96hrs and significantly higher for 120 hrs. The production of estradiol was higher in 24 hrs in pregnant group and no differences post 24 hrs. Insulin-like growth factor- I (IGF-I) production of pregnant was higher than non-pregnant group at all the culture time points. In conclusion, splenic macrophages were able to produce peptides by *in vitro* culture and have important role for the successful pregnancy in bovine.

**Key words** : Bovine splenic, Macrophage, Progesterone, Estradiol, IGF-I.

**요 약** : 본 연구는 임신 및 비임신 비장 유래 macrophage의 체외배양에 의한 배양액내의 호르몬 생산을 조사하여, macrophage의 임신 관련 기전을 구명하기 위하여 실시하였으며, 임신 및 비임신된 도축 암소의 비장을 채취, macrophages를 분리·채취하여 24~120시간 동안 39°C에서 체외배양을 실시하였다. Progesterone의 생산은 24~96시간 동안에는 임신한 것이 비임신에 비하여 생산율이 높았으며, 120시간에는 임신이 비임신에 비하여 유의적으로 높았다. Estradiol은 임신이 24시간에 월등히 생산이 높았으나, 배양시간이 경과함에 따라 약간의 차이는 있었으나, 증감은 없었다. IGF-I은 임신이 배양초기부터 비임신에 비하여 생산율이 높게 나타났다. 이상의 결과로 임신소의 비장 유래 macrophage는 체외배양에 의해 호르몬을 생산할 수 있었으며, 임신 유지에 중요한 작용을 하고 있음을 알 수 있었다.

## 서 론

수정란이식은 가축개량의 중요한 수단임이 입증되어 최근 젖소 수란우에 한우 체외수정란을 이식하는 등 수정란이식이 활발히 이루어지고 있다. 수정란이식의 궁극적인 결과는 임신을 하게 하는 것이나, 소에 있어서 수정란이식이 행하여 온 이후 수태율에 커다란 향상을 이루지는 못하였다. 이의 원인으로는 체내 및 체외수정란에 대한 차이를 많이 해소하였고, 수정란이식 시술자들도 많은 경험을 바탕으로 수정란의 취급과 이식을 하는데 문제점이 없는 것으로 보아, 수란

우의 조건에 따른 수태율의 차이가 있음을 추측할 수 있다. 수태율 향상을 위한 방법으로는 수정란이식 시기에 hCG를 수란우에 주입하는 방법(최 등, 2002), Flunixin Megulmin (Schrick *et al.*, 1998) 등 호르몬을 투여하여 좋은 성적을 보고한 바 있다. 그러나 이러한 방법은 현장에서 여러 번 수란우를 처리하여야 하는 단점을 가지고 있다.

쥐의 과립막세포의 체외배양시 비장유래 macrophage가 progesterin의 생성을 촉진하였고(Yamanouchi *et al.*, 1992) 생쥐에 있어서 내막세포를 이용한 수정란이식에 의해 수태율을 향상시킬 수 있으며 (Nakayama *et al.*, 1995), 내막 기질세포와 내막 lymphocyte는 모체와 태아의 관계를 유지시켜주며, 그에 따라 임신을 이룰 수 있다고 하였다(Bulmer, 1996). 또한 쥐에서 초기 임신시의 splenocyte를 정맥 주사하면 착상을 촉진하며(Takabatake *et al.*, 1997a), 초기임신시 splenocyte가 자

<sup>†</sup>교신저자: 전북 남원시 운봉읍 용산리 산 4-1, 축산연구소 가축유전 자원시험장. (우) 590-832, (전) 063-620-3520, (팩) 063-620-3594, E-mail: sunho@rda.go.kr

궁내막을 조절하여 착상을 촉진한다고 하였다(Takabatake *et al.*, 1997b). 그 밖에 말초혈액의 단핵세포는 임신 및 비임신 사람의 황체세포로부터 progesterone의 생산을 자극하며, 이는 황체의 분화에 있어서 Interleukin-4(IL-4) 혹은 Interleukin-10(IL-10)의 기능이 있음을 증명한다고 하였다(Hashi *et al.*, 1998). 또한 비임신 생쥐의 감상선세포는 자궁내막의 분화를 야기하며, 자궁내 Leukaemia inhibitory factor(LIF)의 발현을 촉진한다고 하였다(Fujita *et al.*, 1998). 이와 같이 비장유래 macrophage를 비롯하여 면역관련 세포 및 cytokine은 비임신 및 임신 내막의 작용을 임신의 상태를 유도하거나, 착상을 촉진한다고 하였다. 따라서 본 연구는 임신 및 비임신 소의 비장유래 macrophage를 체외배양하여 임신관련 호르몬들의 생산을 측정하여, 소의 착상관련 기전을 조사하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 소 비장 및 Macrophage의 채취

임신 및 비임신 도축암소의 비장을 채취하여 4°C 얼음에 채워 실험실로 운반하였고, 비장의 표면을 70% 알코올로 세정한 후 표피를 제거하였다. 표피가 제거된 비장은 Matsuyama *et al.*(1987)의 방법에 의해 실시하였으며, 간략히 방법을 소개하면, 메스가위로 비장을 잘게 절단하였으며, DMEM 용액으로 세정하여 비장조직 내의 macrophage가 유출되도록 가볍게 눌러가며 유출시켰다. 비장 부유액은 100mm 유리살레에 얇게 퍼서 39°C 배양기에서 2시간동안 배양하여 macrophage가 저층으로 가라앉도록 하였다. 2시간 이상 배양된 부유액은 4°C의 buffer A 용액으로 유리살레를 세척하였고, 유리바닥에 부착된 것만을 macrophage로 인정하여, cell scraper로 바닥을 긁어서 macrophage를 수집하였으며, 최종농도가  $1 \times 10^6$  cells/ml가 되게 조정하였다.

### 2. 비장유래 Macrophage의 체외배양

채취 후 최종농도가 조정된 macrophage는 DMEM+10% FBS가 첨가된 배양액으로 39°C CO<sub>2</sub>배양기에서 24, 48, 72, 96, 또는 120시간 동안 체외배양을 실시하여 배양이 완료된 배양액을 채취하여 호르몬 분석에 이용될 때까지 -70°C 냉동고에 보존하였다.

### 3. 배양액의 호르몬 분석 및 통계분석

임신 및 비임신 비장 유래 macrophage의 체외배양된 배양액의 호르몬 분석은 Progesterone(P<sub>4</sub>), Estradiol(E<sub>2</sub>), IGF- I 을

호르몬분석 키트(DSL, USA)를 이용하여 RIA법으로 분석을 실시하였다. 분석이 완료된 결과는 통계 program인 Statview의 ANOVA를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### 1. 비장 유래 Macrophage의 체외배양에 의한 Progesterone의 생산

비장 유래 macrophage의 체외배양에 의한 progesterone의 생산은 그림 1에 나타났다. 비장 유래 macrophage는 체외배양 24시간에서 96시간까지 임신한 것이 비임신한 것보다 약간 생산이 높았으나, 같은 경향을 나타내었고, 체외배양 96시간 이후에 임신한 것이 0.75 ng/ml로 급격히 progesterone의 생산이 유의적으로 증가하였다. 그러나 일반적인 혈중 progesterone의 농도는 임신되지 않은 암소의 수준과 비슷한 경향을 나타내었으며, 임신우의 수준에는 도달하지는 못하였다. Macrophage의 체외배양에 의한 P<sub>4</sub>의 생산은 체내에서의 생산에는 못 미치는 수준이었다.

### 2. 비장 유래 Macrophage의 체외배양에 의한 E<sub>2</sub>의 생산

비장 유래 macrophage의 체외배양에 의한 E<sub>2</sub>의 생산은 그림 2에 나타났다. 임신우의 macrophage는 배양초기인 24시간에서부터 130 ng/ml로 비임신한 것보다 유의적으로 높은 E<sub>2</sub>의 생산을 나타냈으며, 48시간 이후부터는 40 ng/ml를 유지한 형태로 생산에는 변화가 없었다. 비임신의 경우는 10-20

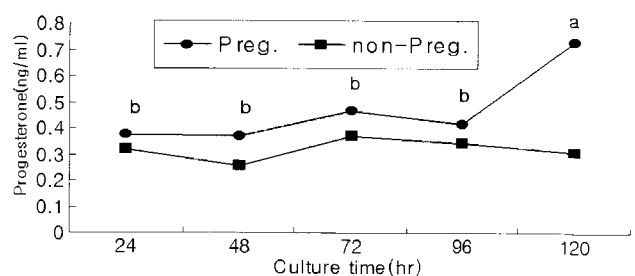


Fig. 1. Progesterone production of bovine splenic macrophages during *in vitro* culture.

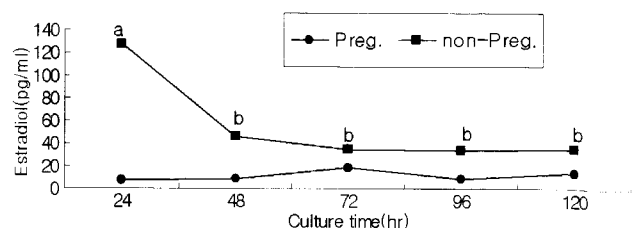


Fig. 2. Estradiol production of bovine splenic macrophages during *in vitro* culture.

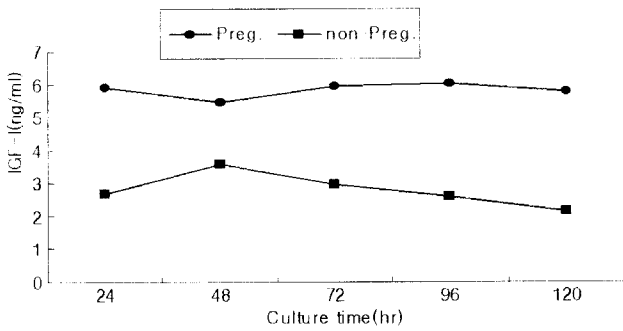


Fig. 3. IGF-1 production of bovine splenic macrophages during *in vitro* culture.

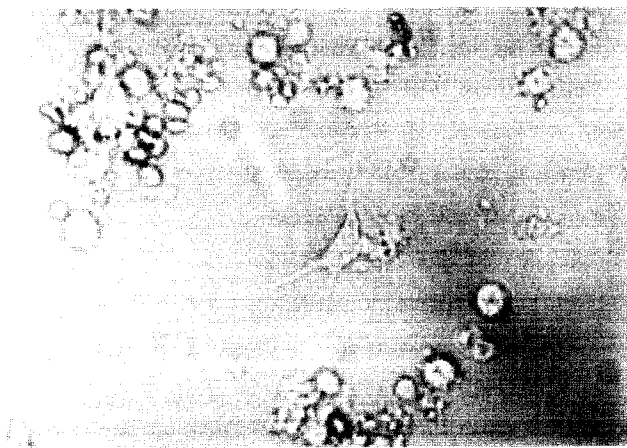


Fig. 4. The shape of bovine splenic macrophage. (×400)

ng/ml를 유지하며, 배양시간에 따른 변화가 거의 나타나지 않았다. Macrophage에 의한 E<sub>2</sub>의 생산은 체외배양시 세포의 성질이 변화하는 것으로 여겨진다.

3. 비장 유래 Macrophage의 체외배양에 의한 IGF-1의 생산

비장 유래 Macrophage의 체외배양에 의한 IGF-1의 생산은 그림 3에 나타났다. 임신우의 macrophage는 6 ng/ml를 생산하여 비임신우의 것보다 2배 이상 높이 생산하였으며, 배양시간이 경과하여도 생산량이나 두 처리간의 차이는 변화하지 않았다. 임신우의 macrophage는 임신우에 있어서 증가하는 경향을 나타내는 것과 같은 경향이였다.

고 찰

소에 있어서 임신우는 난소의 황체 세포가 내분비적인 주요 산물인 progesterone의 생산을 증가함으로써 임신을 유지하고, 그에 따라 태아의 성장을 유도한다. 그 예로서 정상적인 혈장 progesterone 수준의 변화는 황체세포의 조직학적 변화와 함께 하며, 이러한 변화는 황체세포의 기능과 구조의 조

절에 있어서 progesterone이 autocrine 작용을 하고 있음을 시사한다(Duffy *et al.*, 1994). 또한 progesterone을 처리한 소의 황체세포 체외배양에서 황체 분해 의존형의 prostaglandin과 황체 형성 촉진형의 세포의 비율이 증가함으로써 progesterone은 황체세포의 성숙을 매개함을 증명한다고 할 수 있다(Jones *et al.*, 1992; Pate, 1988). Progesterone receptor mRNA의 수준도 사람의 생리주기에 따라 황체의 수명에 맞추어 즉 progesterone 분비와 동조하여 유지된다고 하였다(Duffy & Stouffer, 1995). 난포세포에서 progesterone receptor의 발현은 난포내의 progesterone의 역할이 중요함을 나타낸다고 할 수 있다(Broeck *et al.*, 2002). 이와 같이 progesterone은 난소내의 황체와 난포의 상호작용에 의해 자궁의 progesterone의 분비를 조절하며, 임신시 황체세포의 낮은 발현은 황체세포의 수명에 따르며, receptor의 퇴행에 기인한다. 본 연구에서는 난관 상피세포의 체외배양에서 황체세포 혹은 난포, 자궁상피세포가 임신시에 분비할 것으로 예상되는 progesterone을 비장유래 macrophage의 체외배양으로 확인할 수 있었고, 특히 임신의 것이 비임신의 것보다 더 많은 생산능력이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 임신한 rat의 비장적출시 임신 21일 혈중 progesterone의 농도가 급격히 떨어진다고 한 결과(이 등, 1995)와 유사하게 비장의 macrophage는 임신에 크게 관여하고 있음을 증명한다고 하겠다. 또한 자궁내막 기질세포와 자궁내막의 lymphocyte는 모체와 태아 상호작용에 있어서 모체의 상황을 유지시켜 주며, 임신의 성립에 기여하는 것으로 보고되고 있다(Kearns와 Lala, 1983; Bulmer, 1996). 즉 비장유래 macrophage는 황체세포에 자극을 하여 자궁내막의 상황을 조절할 수 있을 뿐만 아니라, 자궁내막을 직접적으로 자극 등을 통하여 progesterone의 분비를 유도할 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다. 이러한 결과는 생쥐의 비장유래 macrophage는 자궁내막의 분화를 조절하여 수정란의 착상을 촉진한다고 한 결과도 보고된 바 있다(Keiko *et al.*, 1997). 본 실험에서 estradiol의 생산 양상도 체외배양 초기에는 큰 차이를 보이는 듯 하였으나, 배양시간의 경과에 따라 유사한 경향을 보이는 것으로 보아 macrophage에 의한 생산의 특이성을 기대할 수는 없었다. 그러나, 임신과 비임신에서 macrophage는 목표로 하는 기관에 일정한 자극을 할 수 있는 기능을 가지고 있다고 할 수 있겠다.

IGF-1은 대사를 하는 과정에서 생산되고 조절되는 펩타이드 호르몬으로서 인슐린의 작용에 의해 생산 또는 분비의 조절을 지배받게 된다. 또한 IGF-II도 조직의 발달단계에 따라 분비 조절되는 것으로 알려져 있어, IGF들은 수정란의 발달 과정 중 somatic cell에 의해 합성되며, 임신과정 중의 한 요소

로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pushpakumara *et al.*, 2002). 이러한 특성은 rats(Murphy *et al.*, 1987), 돼지(Simmen *et al.*, 1991), 소(Geisert *et al.*, 1991), 양(Stevenson *et al.*, 1994)의 자궁에서 이러한 현상을 관찰할 수 있다고 하였으며, 사람(Giudice *et al.*, 1992), 소(Schmidt *et al.*, 1994; Winger *et al.*, 1997), 양(Stevenson & Wathes, 1996) 등의 난관에서도 IGF의 생산을 확인할 수 있다고 하였다. 다양한 축종과 자성 생식기관에서의 생산은 IGF-I의 경우 돼지 체외수정란의 발달에 효과적으로 영향을 미친다고 하였으나(Kaye *et al.*, 1992), 소에 있어서의 작용에 대하여는 명확하지 않다. 본 시험결과에서 나타난 것과 같이 IGF-I은 임신우의 비장유래 macrophages도 생산함을 알 수 있으며, 다른 체세포만이 IGF-I을 생산하여 임신을 조절하는 것만이 아님을 입증하는 결과라 하겠다. 그러나 macrophage는 난포의 형성, 배란, 황체의 형성 및 퇴화까지 발정주기의 전과정에 작용을 하는 것으로 알려져 있으나, 다양한 종류의 peptide 호르몬과 함께 작용함을 간접적으로 시사한다고 할 수 있다고 하겠다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 비장유래 macrophage는 target 세포를 자극하여 다른 물질을 분비하도록 유도하는 기능뿐만 아니라 스스로 약간의 배양조건에 의해 물질을 생산할 수 있음을 알 수 있으며, 좀 더 정확한 세포 수와 그 밖의 다른 생산물질을 탐색함으로써 임신 관련 연구에 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Broeck W van den, D'haeseleer M, Coryn M, Simoens P (2002) Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reprod Dom Anim* 37:164-170.
- Bulmer JN (1996) Cellular constituents of human endometrium in the menstrual cycle and early pregnancy. In Bronson RA, Alexander NJ, Anderson D *et al.* (eds.), *Reproductive Immunology*. Blackwell Science, Cambridge, pp 212-239.
- Duffy DM, Hess DL, Stouffer RL (1994) Acute administration of a  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor to rhesus monkeys at midluteal phase of the menstrual cycle; evidence for possible autocrine regulation of the primate corpus luteum by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1587-1594.
- Duffy DM, Stouffer RL (1995) Progesterone receptor messenger ribonucleic acid on the primate corpus luteum during the menstrual cycles: Possible regulation by progesterone. *Endocrinology* 136:1869-1876.
- Fujita K, Nakayama T, Takabatake K, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Fujiwara H, Mori T (1998) Administration of thymocytes derived from non-pregnant mice induces an endometrial receptive stage and leukaemia inhibitory factor expression in the uterus. *Human Reprod* 13:2888-2894.
- Geisert RD, Lee CY, Simmen FA, Zavy MT, Fliss AE, Bazer FW, Simmen RC (1991) Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, II and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 45:975-983.
- Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC, Eckert RL (1992) Identification of insulin-like growth factor binding proteins in human oviduct. *Fert Steril* 57:294-301.
- Hashi K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii S, Maeda M (1998) Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Human Reprod* 13:2738-2744.
- Jones LS, Ottobre JS, Pate JL (1992) Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 85:33-39.
- Kaye PL, Bell KL, Beebe FS, Dungleison GF, Gardner HG, Harvey MB (1992) Insulin and insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod Fert Develop* 4:373-386.
- Kearns M, Lala PK (1983) Life history of decidual cells: a review. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 3:78-82.
- Keiko T, Hiroshi F, Yasuo G, Takahiro N, Toshihiro H, Jun F, Michiyuki M, Takahide M (1997) Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Human Reprod* 12:2102-2107.
- Matsuyama S, Ohta M, Takahashi M (1987) The critical period in which splenectomy causes functional disorder of the ovary in adult rats. *Endocrinol Japon* 34:849-855.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987) Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1:445-450.
- Nakayama T, Goto Y, Kanzaki H, Takabatake K, Himeno T, Noda Y, Mori T (1995) The use of intra-endometrial embryo transfer for increasing the pregnancy rate. *Human Reprod*

- 10(7):1833-1836.
- Pate JL (1988) Regulation of prostaglandin synthesis by progesterone in the bovine corpus luteum. *Prostaglandins* 36:303-314.
- Pushpakumara PGM, Robinson RS, Demmer KJ, Mann GE, Sinclair KD, Webb R, Wathes DC (2002) Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrous and during early pregnancy. *Reproduction* 123:859-868.
- Schmidt A, Einspanier R, Amselgruber W, Sinowatz, Schams D (1994) Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the bovine oviduct during oestrous cycle. *Exp Clin Endocr* 102:364-369.
- Schrick FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Wert NE, Wehrman ME (1998) Administration of flunixin meglumine promotes the pregnancy on the frozen-thawed bovine embryo transfer. *J Anim Sci* 76(Suppl):241.
- Simmen RCM, Simmen FA, Hofig A, Farmer SJ, Bazer FW (1991) Hormonal regulation of insulin-like growth factor gene expression in pig uterus. *Endocrinology* 127:2166-2174.
- Stevenson KR, Wathes DC (1996) Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J Reprod Fert* 108:31-40.
- Stevenson KR, Gilmour RS, Wathes DC (1994) Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type I IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 134:1655-1664.
- Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T (1997a) Intravenous administration of splenocytes in early pregnancy changes the implantation window in mice. *Human Reprod* 12:583-585.
- Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T (1997b) Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Human Reprod* 12:2102-2107.
- Winger QA, De los Rios P, Han VK, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ (1997) Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of "embryotrophic" insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod* 56:1415-1423.
- Yamanouchi K, Matsuyama S, Nishihara M, Shiota K, Tachi C, Takahashi M (1992) Splenic macrophages enhance prolactin-induced progesterin secretion from mature rat granulosa cells *in vitro*. *Biol Reprod* 46:1109-1113.
- 이병오, 정원철, 오석두, 성환후, 윤창현 (1996) 비장적출이 임신 Rat의 progesterone 농도에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 19:141-145.
- 최선호, 성환후, 장유민, 최재혁, 임기순, 양병철, 연성흠, 이장희, 류일선, 손동수 (2002) 한우 미경산우에 있어서 인공수정 및 복제수정란 이식시 hCG 투여에 의한 수태율 향상. *한국수정란이식학회지* 17:227-234.