

돼지 자궁내막 세포의 3차원 배양과 Plasminogen Activator 활성화 분석

차혜진¹, 이상희¹, 정희태², 양부근¹, 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

Analysis of Plasminogen Activators Activity and Three Dimensional (3D) Culture of Endometrial Cells in Pigs

Hye-Jin Cha¹, Sang-Hee Lee¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹Collage of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Collage of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a three dimensional (3D) culture system of endometrial cells and to examine the plasminogen activators (PAs) activity in porcine uterine. The 3D culture system in porcine endometrial cells was composed to mixture 3D gel, stromal cells and epithelial cells. The 3D culture system was used to identify normal structure search as uterine tissue and PAs expression in this study. In results, porcine endometrium epithelial cells forming a top monolayer and endometrium stromal cells developed as fibroblast-like within 3D matrix scaffold. Expression of urokinase-type PA (uPA) and tissue-type PA (tPA) were observed during the 3D culture using immunofluorescence. PA activity in 3D-cultured endometrial cells was no significant difference between the tissue type, but 2D culture system were significantly lower than in 3D-cultured endometrial cells ($P<0.05$). Therefore, basic system and functional aspect of 3D culture could be established with similar system of endometrium tissue. We suggest that this study was assumed applicable as baseline data to investigate mechanism between porcine uterus cells *in vitro*.

(Keywords: pigs, endometrium epithelial cell, endometrium stromal cell, three-dimensional culture, plasminogen activators)

서 론

포유류의 자궁내막은 매우 복잡한 조직 중의 하나로 다른 조직이나 기관과는 달리 발정 주기에 따라 착상과 임신, 생리 과정에 반응하면서 다양한 변화 과정을 겪는다. 또한 직접적으로 배아와 상호작용이 이루어지는 부분으로 자궁내막 상피 세포는 배아의 착상에 대한 정보를 제공하고 있으며, 자궁내막 간질세포는 단독 또는 세포 외 기질과 함께 상피세포의 발달에 영향을 주며, 착상에 주요한 역할을 한다는 보고가 있다(Hilde 등, 2000). 특히 Plasminogen activators(PAs)는 조직 재구성, 혈관 신생 및 세포 이동(Martin과 Arias, 1982; Birgitta 등, 1998; Victoria 등, 1999)과 같은 작용에 영향을 주는데, 이때 PAs는 serine 계열의 단백질 분해효소로써 세포에서 분비되어 Plasminogen을 Plasmin으로 전환시켜 주는 활성화제 역할을 한다(Hart와 Rehemtulla, 1988). PA의 종류로는 성장 도메인으로서의 Urokinase-type PA (uPA)와 세포의 구조적 도메인으로서의 Tissue-type PA (tPA)로 구분된다(Jean 등, 1985; Gething 등, 1988). 이러한 자궁내막 세포의 특성을 연구 수행하기 어려운 *in vivo* 실험은 주로 2차원 배양에서 손쉽게 해결해 왔는데(Choi 등, 2012), 체내에서 3차원적으로 세포 외 기질에 둘러싸여 자라던 세포를 분리하여 2차원적으로 배양하면 증식 면에서는 뛰어난 반면, 본연의 표현형을 잃어버린다는 단점이 있다(Choi 2011). 일반적으로 조직은 여러 종류의 세포가 서로 다른 층으로 형성되어 세포마다 분비인자들의 차이가 있는데, 2차원 배양은 층을 형성할 수 없고 세포 외 기질이 없는 상태이기 때문에, 세포와 세포 혹은 세포와 세포 외 기질 간의 상호작용이 결여되고, 기능적인 분화 특성을 유지하지 못해 정확한 작용 기작을 재현하기 힘들다는 보고가 있다(Hearn 1986). 이와 같이 간소화된 *in vitro* 환경에서 생리학적으로 주요한 세포의 기능을 재현하기 위해서는 세포 간의 층을 이룰 수 있고, 세포 외 기질과 함께 배양하는 3차원 시스템이 필요하다고 할 수 있다.

인으로서의 Tissue-type PA (tPA)로 구분된다(Jean 등, 1985; Gething 등, 1988). 이러한 자궁내막 세포의 특성을 연구 수행하기 어려운 *in vivo* 실험은 주로 2차원 배양에서 손쉽게 해결해 왔는데(Choi 등, 2012), 체내에서 3차원적으로 세포 외 기질에 둘러싸여 자라던 세포를 분리하여 2차원적으로 배양하면 증식 면에서는 뛰어난 반면, 본연의 표현형을 잃어버린다는 단점이 있다(Choi 2011). 일반적으로 조직은 여러 종류의 세포가 서로 다른 층으로 형성되어 세포마다 분비인자들의 차이가 있는데, 2차원 배양은 층을 형성할 수 없고 세포 외 기질이 없는 상태이기 때문에, 세포와 세포 혹은 세포와 세포 외 기질 간의 상호작용이 결여되고, 기능적인 분화 특성을 유지하지 못해 정확한 작용 기작을 재현하기 힘들다는 보고가 있다(Hearn 1986). 이와 같이 간소화된 *in vitro* 환경에서 생리학적으로 주요한 세포의 기능을 재현하기 위해서는 세포 간의 층을 이룰 수 있고, 세포 외 기질과 함께 배양하는 3차원 시스템이 필요하다고 할 수 있다.

* 본 연구는 한국연구재단(2010-0021580)의 지원에 의해 수행되었음.

* Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

따라서 본 연구의 목적은 체내의 자궁내막과 유사한 구조를 만들기 위해 돼지 자궁내막 상피세포와 간질세포를 각각 분리하여 세포 외 기질인 collagen과 함께 3차원적 공동배양 시스템을 확립하고, 돼지 자궁 내에서 다양한 변화를 일으키는 PA의 기능적인 면을 3차원 공동배양 시스템 하에서 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 돼지 자궁내막 2차원 세포 배양

도축장에서 회수한 돼지 자궁은 차가운 상태로 1~1.5시간 이내에 실험실로 운반한 후, 자궁각 외의 불필요한 부분을 제거하여 100 IU/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin 및 0.1%(W/V) BSA가 첨가된 1X Hank's balanced salt solution (HBSS)로 자궁내강을 3회 세척하였다. 그 후 자궁내막의 세포를 채취하기 위해 자궁각을 가위를 이용하여 자궁내막이 보이도록 절단하고, 바늘로 고정시켜 mass로 상피세포 층을 긁어내어 새로운 50 ml 튜브로 옮겼다. 또한 자궁 근층으로부터 자궁내막 조직을 떼어내어 1mm²의 크기로 세절하여 자궁내막 조직으로부터 상피세포와 간질세포를 각각 분리하여 얻기 위해, 상피세포는 10 µl/ml collagenase IV(Sigma, USA)를 처리하고, 간질세포는 10 µl/ml collagenase IV, 100 µl/ml 0.25% trypsin/ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA, Gibco, USA) 및 10 µl/ml hyaluronidase(Sigma, USA)를 처리하여 shaking incubator(38°C, rpm 120)에서 상피세포는 1시간 그리고 간질세포는 2시간 동안 배양하였다. 분리된 세포는 70 µm strainer (SPL, Korea)를 이용하여 조직으로부터 분리되지 않은 것들을 제거한 후 상피세포는 RCF 300 × g, 간질세포는 RCF 500 × g로 5분 동안 원심 분리하였다. 또한 혈액 제거를 위해 Tris-NH₄를 처리하여 10분 동안 실온에서 방치 후 원심 분리해 상층액을 제거하였다. 0.1%(W/V) BSA가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Sigma, USA)으로 현탁액을 만들어 0.4%(W/V) trypan blue로 세포를 염색하고, 세포 수를 측정하였다. 각 상피세포와 간질세포는 DMEM과 Ham's F-12 이 1:1로 혼합된(D/F12, Sigma, USA) 배양액에 10%(V/V) FBS (Gibco, USA), 0.2% amphotericin B(Sigma, USA) 및 0.5%

antibiotic-antimycotic(ABAM, Gibco, USA)을 첨가하여 38°C, 5% CO₂조건 하에서 배양하면서 48시간마다 배양액을 교체하였다.

2. 돼지 자궁내막 세포의 3차원 배양

돼지 자궁내막 세포의 3차원 배양 시스템은 Hai 등(2012)에 의해 보고된 실험방법에서 제시하는 자궁내막의 세포 배양을 기준으로 3차원 matrix의 collagen gel 조성만을 다음과 같이 달리하여 Fig. 1과 같이 배양하였다. 인위적인 세포 외 기질을 만들기 위해 Collagen gel(Cell matrix, type I, Nitta gelatin, Japan), 5X D/F12 medium 및 Buffer(0.05N NaOH, 2.2% NaHCO₃, 200 mM HEPES)를 각각 7:2:1의 비율로 collagen gel solution을 만들었다. 소량의 gel을 dish에 분주해 37°C에서 30분간 굳혀 편평하게 바닥지지대를 만들어주었다. 이전의 2차원 세포 배양법에서 제시한 세포 분리법에 의해 분리 배양된 돼지 자궁내막 간질세포는 0.25% trypsin EDTA를 분주하여 2~3분 정도 배양하여 scraper로 세포를 긁어 새로운 튜브에 모아 원심 분리 후 DMEM으로 세척하였다. 그 후 trypan blue를 이용하여 세포 수를 측정해 5×10⁵ cells/ml의 농도로 간질세포를 collagen solution과 함께 혼합하였다. 그리고 미리 준비한 바닥지지대 위에 분주하여 형성된 3차원 Matrix를 38°C, 5% CO₂ 상태에서 48시간 배양하였다. 간질세포와 마찬가지로 0.25% trypsin EDTA를 처리하여 상피세포를 3×10⁵ cells/ml의 농도로 회수하여 3차원 matrix의 상층부에 10%(V/V) FBS, 0.2% amphotericin 및 0.5% ABAM이 첨가된 D/F12 배양액으로 38°C, 5% CO₂ 조건 하에서 2주일 동안 배양하면서 48시간마다 배양액을 교체하였다.

3. Hematoxylin - Eosin 염색법

자궁내막 조직과 3차원 배양의 단면을 시각적으로 비교하기 위해 H&E 염색법을 이용하였다. 조직은 1×1cm의 크기로 자르고, 3차원 matrix도 같은 크기로 잘라 10, 20 및 30% sucrose가 첨가된 PBS내에 조직이 가라앉을 때까지 순차적으로 담가준 후 회수하여 4% paraformaldehyde에 4°C에서 24시간 동안 재차 담가주었다. 조직과 3차원 matrix는 동결 절편을 위해 Frozen Section compound(Leica microsystem, Germany)로 포

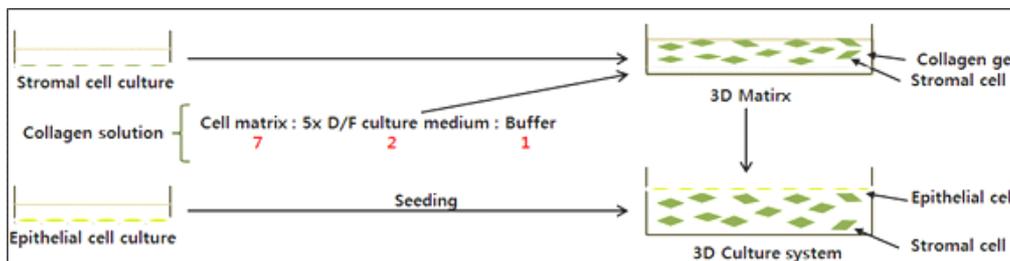


Fig. 1. Diagrammatic scheme for construction of the 3D culture(Hai 등, 2012).

매하여 3~5분 정도 -196℃에 침지시키고, Microtome(Thermo, Austria)을 이용하여 동결 절편하였다. Hematoxylin에 4분 동안 담가놓고 투명해질 때까지 세척한 후 Ethanol과 Xylene으로 수세과정을 거쳐 Eosin에 4분 동안 담가 앞의 수세과정을 거쳐 Dry Oven에서 건조시킨 후 clear mount mounting solution(Gibco, USA)로 봉입하였다.

4. 면역 형광법

3차원 배양에서의 uPA와 tPA의 발현을 자궁내막 조직과 비교하기 위해 면역 형광법을 이용하였으며, 앞서 제시한 전처리와 동일한 방법으로 시료를 준비하였다. 동결 절편하여 slide에 붙인 시료는 하루 정도 Dry Oven에서 건조시킨 뒤, blocking 과정을 위해 3%(W/V) BSA가 첨가된 PBS를 시료 위에 분주하여 1시간 정도 실온에서 처리한 후 Tris Buffered Saline with Tween 20(TBST)용액에 10분간 담가 세척하였다. 한편, uPA와 tPA의 1차 항체는 각각 Goat-anti-uPA와 Goat-anti-tPA(1:500, Santa Cruze Biotechnology, USA)를 처리하여 1시간 동안 배양하였고, 2차 항체로는 Alexa 488이 표지된 donkey-anti-Goat-IgG(1:10,000, Invitrogen, USA)를 처리하여 녹색 형광을 띄는 uPA와 tPA를 확인하고, 붉은 형광을 띄는 Propidium iodide(PI)를 이중 염색하여 건조 과정을 거쳐 clear mount mounting solution로 봉입하였다.

5. PA 활성도 측정

PA 활성도 측정은 이전의 연구(Hart와 Rehemtulla, 1988)를 수정하여 실험에 적용하였다. PA 활성도를 측정하기 위한 처리군은 크게 3가지로 실제 자궁내막 조직, 3차원 배양 그리고 2차원 배양으로 구분하여 실험에 이용하였으며, 그 중에서도 이전의 2차원 세포 배양법에서 제시한 세포 분리법을 이용하여 각각 상피세포, 간질세포, 상피와 간질세포를 혼합한 공동 배양 및 insert chamber(SPL, Korea)를 이용한 공동배양으로 구분하여 총 6가지 처리군을 Fig. 2와 같이 진행하였다. 이와 처리군을 6시간 동안 38℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양한 후, 배양액을 회수하여 PA측정에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 보관해 둔 샘플과 standards는 96well microplate에서 plasminogen working solution(Sigma, USA)과 함께 38℃에서 60분간 추출하였다. 그리고 substrate buffer[0.18 Mm Z-L-LYS-Sbz]

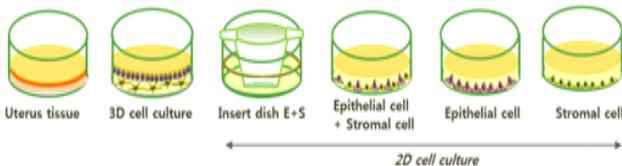


Fig. 2. Different methods culture types(E : Epithelial cell, S : Stromal cell)

hydrochloride, 0.22 Mm 5,5'-ditho-bis(2-nitrobenzoicacid), 0.01% Triton-X100, Sigma, USA]를 첨가하여 38℃에서 60분간 배양 후 자동화된 microplate reader로부터 405 nm의 흡광도에서 PA 활성도를 측정하였다.

6. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 Statistical Analysis System software(SAS 9.2)을 사용하여 General linear mode(GLM) 방법으로 통계 분석하였다. PA 활성도에 유의성이 나타난 그룹에 대해서는 Duncan's multiple range test에 의한 배양 방법별 유의성 검정을 P<0.05 수준에서 실시하였다.

결 과

돼지 자궁내막 상피세포와 간질세포를 2차원 배양 후의 형태학적인 결과는 Fig. 3에 나타났다. 돼지 자궁내막 상피세포(Fig. 3A)는 입방형 모양으로 넓게 퍼져 성장하는 것을 확인할 수 있었으며, 그에 반해 자궁내막 간질세포(Fig. 3B)는 섬유아 세포계열로 길쭉한 모양을 띄며 성장한 것을 확인하였으나, 2차원적인 배양에서는 세포 본연의 입체적인 모습은 관찰할 수 없었다. Fig. 4는 간질세포의 3차원 배양 시 세포 성장 정도를 현미경으로 관찰한 결과로, 배양 일수가 증가할수록 간질세포의 모양이 2차원 배양에서와는 다르게, 여러 갈래로 가지가 뻗어 나가는 것 같은 모습을 띄었고, 크기 또한 점차적으로 커지는 것을 확인하였다. Fig. 5는 3차원 배양 시 하층부 간질세포(Fig. 5A)와 상층부 상피세포(Fig. 5B)를 현미경으로 관찰한 결과로, 하층부의 간질세포는 앞서 나타난 결과와 마찬가지로 여러 갈래의 가지들이 뻗어 입체적으로 여러 층에 걸쳐 성장하는 것을 확인하였다. 반면, 상층부의 상피세포는 단일 층의 모습을 띄어 넓게 퍼져 자라는 것을 확인하였다. 인위적인 세포 외 기질로 사용된 collagen gel 안에서의 자궁내막 간질세포는 2차원 배양에서의 성장 속도와 성장된 크기보다 눈에 띄게 빠르고, 여러 층에 걸쳐 크게 성장하는 것을 확인하였다.

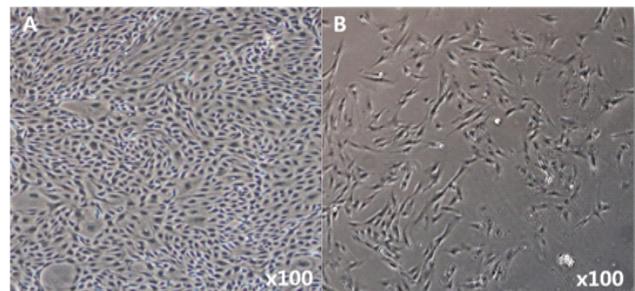


Fig. 3. The morphology of epithelial cells (A) and stromal cells (B) during 2D culture in porcine endometrium.

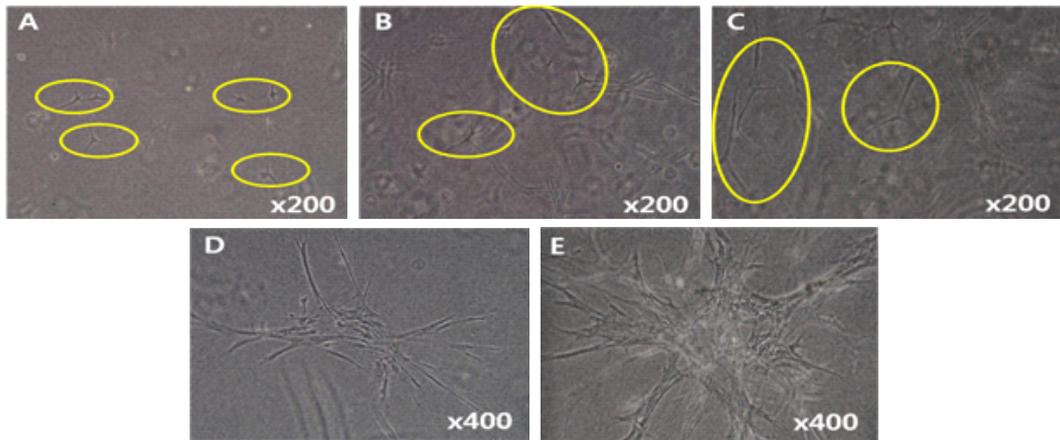


Fig. 4. The morphology of endometrium stromal cells at day 1(A), day 3(B), day 5(C), day 7(D) and day 10(E).

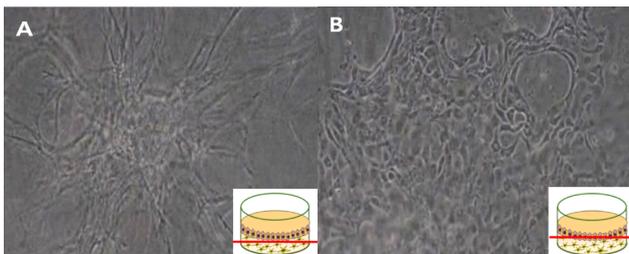


Fig. 5. 3D co-cultures with endometrium stromal cells (A) and endometrial epithelial cells (B).

Fig. 6는 조직과 3차원 배양 후 H&E 염색하여 단면을 관찰한 결과로 Fig. 6A, Fig. 6B 및 Fig. 6C는 실제 돼지 자궁내막 조직의 단면이며, Fig. 6D, Fig. 6E 및 Fig. 6F는 돼지 자궁내

막 세포의 3차원 배양시의 단면을 나타내었다. Fig. 6A에서와 같이 실제 돼지 자궁내막의 구조는 크게 자궁내막 층과 자궁근 층으로 나뉘어 있으며, Fig. 6C에서 보는 것과 같이 자궁내막 표면의 상층부에는 상피세포가 단일 층으로 성장하는 것을 관찰하였고, 자궁내막의 하층부에는 세포 외 기질과 선상 피분비선들과 함께 간질세포가 여러 층에 걸쳐 입체적으로 성장하고 있는 것을 관찰하였다. 이러한 돼지 자궁내막의 구조를 기본 바탕으로 하여 3차원 배양 시스템을 확립한 결과, 3차원 배양의 단면은 Fig. 6D와 같이 2개의 세포가 서로 다른 두 가지의 층을 형성하여 전체적으로 실제 조직과 비슷한 구조를 띄고 있음을 확인하였다. 한편, Fig. 6E에서와 같이 자궁내막 상피세포는 3차원 matrix의 상층부에 단일 층의 형태로 성장하였고, Fig. 6E에서와 같이 자궁내막 간질세포 또한 co-

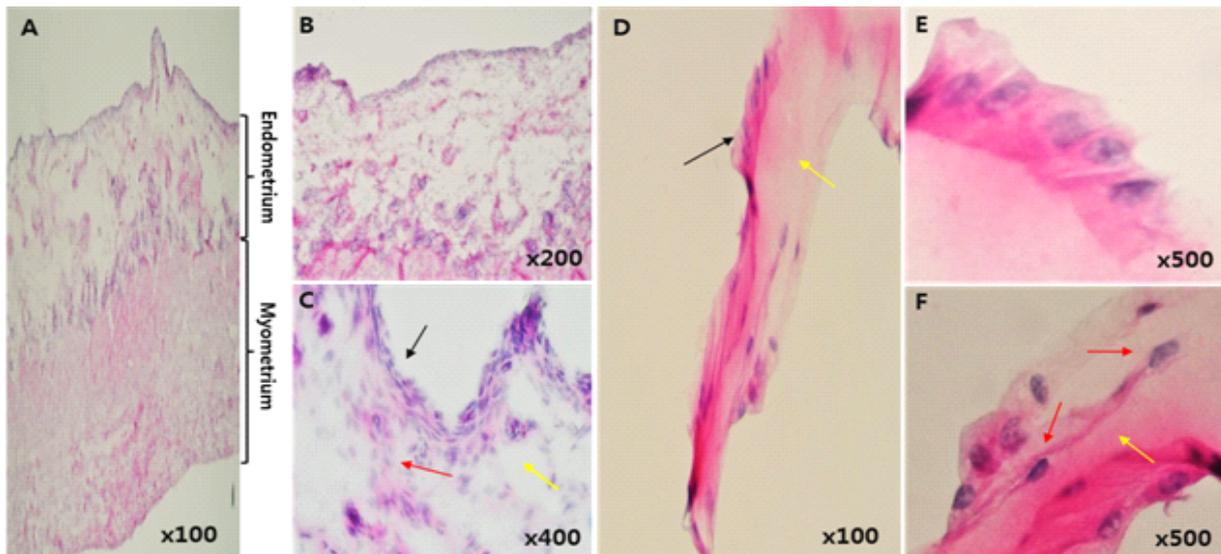


Fig. 6. Staining characteristics and overall structure of the 3D culture system with porcine primary cells. (A)~(C) : Porcine uterus tissue section, (D)~(F) : *In vitro* 3D culture section(Black arrow : Epithelial cell, Red arrow : Stromal cell, Yellow arrow : Extracellular cell matrix).

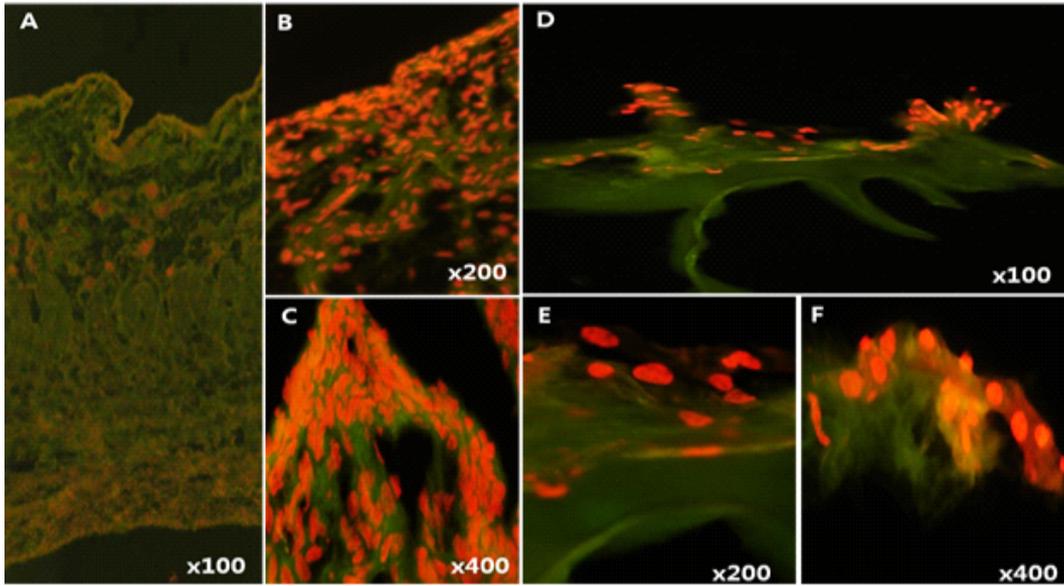


Fig. 7. Comparison of porcine uterus tissue and 3D endometrial cells culture by immuno-fluorescence staining for uPA expression. (A)~(C) : tissue, (D)~(E) : 3D culture, Green color : uPA expressed Alexa 488, Red color : nuclear PI.

llagen gel 내에 위치하여 여러 방향으로 뻗어 성장하는 것을 확인하였다.

Fig. 7과 8에서는 돼지 자궁내막 조직과 3차원 배양에서 후의 조직을 면역 형광법을 이용하여 uPA와 tPA의 발현 양상을 나타내었다. Fig. 7A, Fig. 7B 및 Fig. 7C는 실제 돼지 자궁내막 조직을 나타냈으며, Fig. 7D, Fig. 7E 및 Fig. 7F는 3차원 배양 후의 단면을 형광현미경을 이용하여 나타냈다. 그 결과, Fig. 7A에서 실제 자궁내막 조직은 uPA의 발현 양상이 전체적으로 발현되었으며, 그 중에서 주로 상피세포 부근에서 짙은

녹색 형광을 나타내는 것을 확인하였고, 3차원 배양(Fig. 7D)에서도 전체적으로 uPA의 녹색형광이 짙게 발현되는 것을 확인하였다. Fig 8에서 실제 자궁내막 조직(Fig. 8A)은 tPA의 녹색형광이 전체적으로 발현되었지만, uPA의 형광 발현에 비해서는 약한 것이 관찰되었고, 3차원 배양의 단면(Fig. 8D) 또한 전체적으로 tPA가 녹색 형광을 띄는 것을 확인하였다. 이는 돼지 자궁내막의 세포를 각각 분리 배양하여 새로운 구조와 체계를 확립하여도 실제 돼지 자궁내막 조직과 유사한 기능을 나타낼 수 있음을 확인한 결과라 할 수 있다.

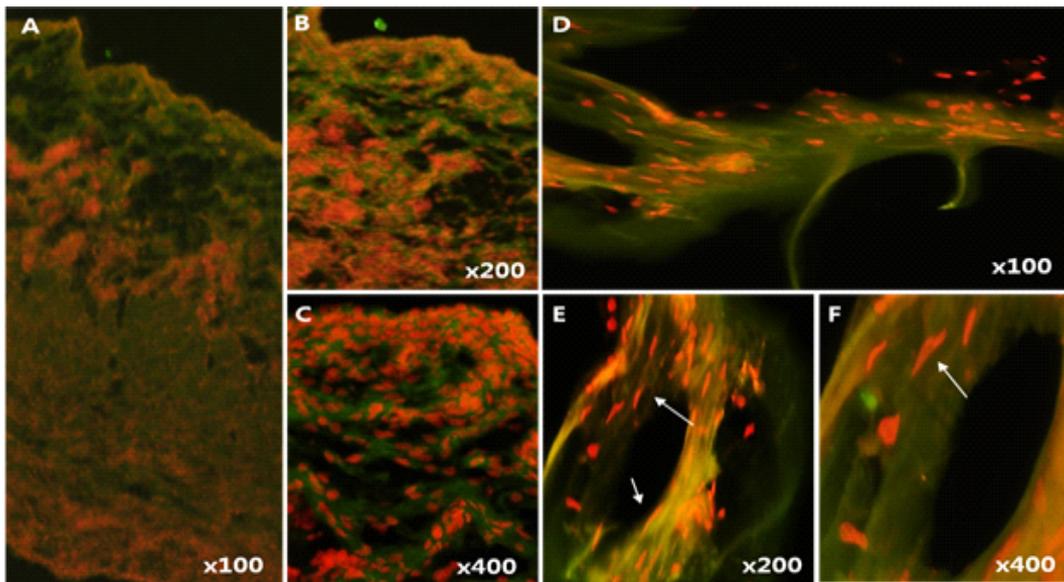


Fig. 8. Comparison of porcine uterus tissue and 3D endometrial cells culture by immuno-fluorescence staining for tPA expression. (A)~(C) : tissue, (D)~(E) : 3D culture, Green color : tPA expressed Alexa 488, Red color : nuclear PI (White arrow : stromal cell).

Fig. 9은 돼지 자궁내막 조직의 서로 다른 배양법에 의한 PA 활성도를 확인한 결과이다. 이들의 PA 활성도는 각 그룹 간에 상대적인 수치를 통계 처리하여 배양 방법별로 비교하였다. 그 결과, 돼지 자궁내막 조직에서 가장 높은 PA 활성 수치를 나타내었으며, 자궁내막 조직과 3차원 배양과 PA 활성도를 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 2차원 배양 방법 중 insert chamber를 이용한 배양법과 공동 배양법에서는 자궁내막 조직과 3차원 배양에 비해 유의적으로 낮은 PA 활성도를 나타내었다($P<0.05$). 이러한 결과로 본 연구에서 확립한 3차원 배양 시스템은 형태학적으로나 기능적으로 실제 자궁내막 조직과 유사한 배양 체계를 확인할 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 간소화된 체외 환경에서 자궁내막 세포 본연의 형태를 잃지 않고 생리학적으로 세포의 중요한 기능을 재현하기 위해 돼지 자궁내막 세포의 3차원 배양 시스템을 확립하고자 하였다. 3차원 세포배양 시스템은 최대한 세포 외 기질을 모방하는 것이 효과적인 반면, 2차원 배양은 층을 형성할 수 없고, 세포 외 기질이 없는 상태이기 때문에, 세포와 세포 혹은 세포와 세포 외 기질 간의 상호작용이 결여되며 (Kwon 등, 2008), 기능적인 분화 특성을 유지하지 못해 정확한 작용 기작을 재현하기 힘들다(Hearn 1986). 세포 외 기질은 세포 사이의 공간을 채우는 고분자의 복잡한 혼합물로 물리적으로 세포를 지지하기 위한 발판을 제공하고, 세포 결합과 이동을 위한 표면을 제공한다. 또한 세포의 분화와 신진 대사 기능을 조절할 수 있는 성장 인자와 화학적 신호의 저장 기관을 제공하는 역할을 하여(Ashkenas 등, 1996; Boudreau 2003; Kalluri 2003; Hay 2005) 구조적인 단백질로써 collagen type I을 실험에 이용해 3차원 배양 시스템의 주된 scaffold로 사용되었다. 그리고 자궁내막 세포를 3차원적으로 배양하면서 세포의 분화를 유지하기 위해서는 우선적으로 자궁내막

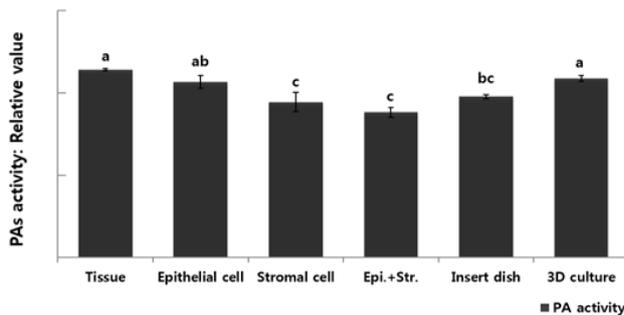


Fig. 9. PA activity by different methods culture types in incubated mediums($P<0.05$).

조직으로부터 자궁내막 상피세포와 간질세포를 분리하여야 한다(Park 등, 1999). 본 연구의 재료 및 방법에서 제시한 바와 같이 2차원 배양을 통해 각각의 세포를 분리하여 세포 외 기질로써 collagen gel을 간질세포와 함께 배양하였고, 조직의 가장 큰 특징 중의 하나인 서로 다른 층을 만들기 위해 자궁내막 상피세포를 상층부에서 배양시켰다. 이들 세포들 간의 분리 여부와 조직과의 유사성을 확인하기 위해 확립된 3차원 배양 시스템을 현미경을 통해 Fig. 4과 5에서와 같이 층에 따라 관찰을 한 결과, 세포 외 기질로써 사용한 collagen gel과 함께 배양된 자궁내막 간질세포가 눈에 띄게 섬유아세포 계열의 모습으로 여러 층에 걸쳐 가지처럼 성장한 것을 확인할 수 있었다.

또한 상층부의 자궁내막 상피세포도 단일 층으로 실제 자궁내막 조직과 같은 형태로 넓게 퍼져 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 자궁내막 층은 직접적으로 배아와 상호작용을 하는 부분으로 자궁내막에서 단층의 상피세포는 배아의 착상에 대한 정보를 제공하고 있으며, 자궁내막 간질세포는 단독 또는 세포 외 기질과 함께 상피세포의 발달에 영향을 주어 착상에 주요한 역할을 한다(Hilde 등, 2000). 따라서 Fig. 3에서 상피세포와 간질세포가 각기 다른 층에서 서로 다른 형태를 띠며 성장 후 같은 자궁내막에 위치하더라도 그 역할이 다른 것으로 설명할 수 있다. 또한 일반 세포배양 dish에서 간질세포를 배양하였을 때보다 3차원 배양에서 간질세포가 성장하는 속도가 매우 빠르게 나타났다. 이는 주변의 세포와 세포 외 기질과 함께 배양되어 상호작용으로 세포의 성장을 빠르게 한 것으로 생각할 수 있다(Inaba 등, 1988). 또한 H&E 염색법을 이용하여 실제 자궁내막 조직과 형태학적인 구조를 비교해 보았을 때, 실제 자궁내막 조직에서 나타난 여러 층의 세포의 구조와 3차원 배양에서의 구조가 유사한 형태로 확립된 것을 볼 수 있었다.

포유류의 자궁내막은 매우 복잡한 조직 중의 하나로 착상과 임신, 생리 과정에 반응하여 자궁내막에 다양한 변화를 겪게 하는 PAs는 선행 연구에서 uPA는 세포 외 기질에서 보다 내피세포, 혈관의 안쪽 부분과 분비선에 많이 존재하며(Kim 등, 2011), 주로 내피세포의 이동에 관여하는 것으로(Sandberg 등, 1998) 알려져 있다. 또한 tPA는 주로 간질세포에서 분비가 되는 것으로 알려져 있으며, PA는 자궁내막에서 섬유소 분해, 세포 이동 및 증식에 관여하며, estrogen과 progesterone을 조절하는 역할도 한다(Liu 1999). 이러한 연구들은 2차원 배양을 통하여 PAs와 자궁 사이에 많은 연관이 있음이 증명되었으나, 3차원 배양을 이용한 연구는 미미한 편이다. 따라서 돼지 자궁내막 3차원 배양 시스템을 확립하여 그 안에서 PA와의 관계를 확인하기 위해 면역 형광법을 이용하여 자궁내막에서의 uPA와 tPA의 발현 위치를 관찰하였다. 본 연구에서 자궁내막 조직과 3차원 배양 시스템에는 PA의 발현이 유

사하게 전체적으로 나타났으며, 자궁내막 조직을 배양했을 때의 PA 활성도와 3차원 배양법에서의 PA 활성도를 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 그에 반해 2차원 배양법과 비교하였을 때는 조직에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 이는 3차원 배양에서의 기능적인 면을 간접적으로 확인하고자 나타낸 결과로, 본 연구에서는 3차원 배양 내의 직접적인 PA 역할에 대한 확인은 이루어지지 않았지만, 간접적으로 조직과 PA의 활성도의 차이가 유의적으로 나타나지 않았기 때문에, 3차원 배양도 조직만큼의 PA 역할이 수행될 것으로 추측된다. 3차원 배양에서 세포의 성장 속도와 크기에 따른 변화가 PA 발현과 관련이 있어 PA의 활성이 높을 시 3차원 배양에서의 세포 외 기질의 기능을 저하시키고 공간을 느슨하게 만들어 세포의 이동과 증식에 도움을 주어 2차원 배양보다 세포의 기능과 성장이 월등하게 뛰어날 것으로 추측된다.

결론적으로, 본 연구에서 확립된 3차원 배양 시스템은 두 가지 세포가 층을 이루고, 세포 외 기질에서 입체적인 모양으로 간질세포가 발달되는 것이 확인되어 3차원 배양의 기본적인 체계와 기능적인 면이 생체 조직과 유사한 체계로 확립된 것으로 생각된다. 더 나아가 돼지 자궁 내 세포 사이의 작용 기작을 *in vitro* 상에서 규명할 수 있는 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

결 론

본 연구는 돼지 자궁내막 세포인 상피세포와 간질세포를 이용하여 콜라겐과 함께 3차원 배양기술을 확립하고, 기능적인 면을 확인하고자 Plasminogen Activators의 활성을 분석하였다. 그 결과, 3차원 배양에서 콜라겐 겔과 간질세포를 혼합한 3차원 기질은 배양 기간이 길어질수록 간질세포의 크기가 커지고, 입체적인 별 모양의 모습이 여러 층으로 나타났으며, 상피세포는 단일 층으로 퍼져서 겔과 결합해 2차원 배양에서의 형태와 같은 모양으로 발달되는 것이 관찰되었다. 한편, 3차원 배양의 단면을 관찰하여 세포의 위치를 H&E 염색하였으나, 조직의 기본적인 층 구조를 확인하기에는 완벽한 조직의 형태가 형성되지 못하였다. 그러나 부분적으로 상피세포가 겔과 결합하여 발달하는 것이 확인되었고, 간질세포도 겔에서 길쭉한 형태의 모습이 부분적으로 발견되었다. 또 다른 연구에서 3차원 배양의 단면을 형광 염색하여 관찰한 결과, 전체적으로 형광이 발현되었으나, 세포들이 조직과 같은 뚜렷한 층의 형태를 형성하지 못하여 어느 위치에서 uPA와 tPA가 많이 발현되는지는 구분하기 어려웠다. 한편, PA 활성도를 분석한 결과, 3차원 배양에서 PA 활성도는 생체 조직과 유의적인 차이가 없었으나, 2차원 배양에서의 PA 활성도는 조직과 3차원 배양에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 따라서 3차원 배양의 기본적인 체계와 기능적인 면이 생체 조직과 유

사한 체계로 확립된 것으로 생각되며, 더 나아가 돼지 자궁 내 세포사이의 작용기작을 *in vitro* 상에서 규명할 수 있는 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 추측된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 plasminogen activator의 활성도 측정에 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ashkenas J, Muschler J and Bissell MJ. 1996. The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla. *Dev. Biol.* 180: 433-444.
- Birgitta O, Eija K, Michael SP, Stefano JM, Karin A, Vijay K, Yuji G, Michael M, Jeltsch MS, Kari A and Ulf E. 1998. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11709-11714.
- Boudreau NJ. 2003. Organized living: from cell surfaces to basement membranes. *Sci. STKE.* 196: 34.
- Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert M and Lund LR. 1995. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor (PAI1) and surface expression of the u-PA receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2776-2784.
- Choi BK. 2011. Thermal gelling polyalanine-ploxamine-polyalanine aqueous solution for chondrocytes 3D culture: Initial concentration effect. *Soft Matter* 7: 456-462.
- Choi CW, Cho WM, Yeon SH, Hwang HS and Song MG. 2012. Comparison between single and co-culture of adipocyte and muscle cell lines in cell morphology and cytosolic substances. *Annals of Animal Resource Sciences* 54: 103-109.
- Gething MJ, Adler B, Boose JA, Gerard RD, Madison EL, McGookey D, Meidell RS, Roman LM and Sambrook J. 1988. Variants of human tissue-type plasminogen activator that lack specific structural domains of the heavy chain. *The EMBO.* 7: 2731-2740.
- Hai W, Federica P, Sandra A, Sebastián ME, Isabel H, Juan MMM, Sirisha M, Silvina B, Sergio O, and José AH. 2012. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like

- culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Mol. Hum. Reprod.* 18: 33-43.
- Hart DA and Rehemtulla A. 1988. Plasminogen activators and their inhibitors: regulators of extracellular proteolysis and cell function. *Comparative Biochem. and Physiol. B* 90: 691-708.
- Hay ED. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 233: 706-720.
- Hearn JP. 1986. The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates. *J. Reprod. Fertil.* 76: 809-19.
- Hilde V, Paul S and Henri L. 2000. Immunohistochemical detection of the estrogen receptors and progesterone receptor in the canine pregnant uterus and placental labyrinth. *The Anatomical Record.* 260: 42-50.
- Inaba T, Wiest WG, Strickler RC and Mori J. 1988. Augmentation of the response of mouse uterine epithelial cells to estradiol by uterine stroma. *Endocrinology* 123: 1253-1258.
- Kalluri R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3: 422-433.
- Kim KH, Lee YS, Gu HN, Yang BK, Cheong HT and Park CK. 2011. Changes in plasminogen activity in uterus tissue during the estrous cycle in the pigs. *Reprod. Dev. Biol.* 35: 463-468.
- Kwon HC, Yang HW, Kim HK, Kim SK and Cho DJ. 2001. Establishment of three dimensional *in vitro* culture system with human endometrial cells: induction of molecular biologic differentiation & characterization by sex steroid hormone. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 44: 65-73.
- Liu Y. 1999. Role of plasminogen activators and inhibitors in reproduction. *Chinese Science Bulletin* 44: 673-685.
- Martin O and Arias F. 1982. Plasminogen activator production by trophoblast cells *in vitro*. Effect of steroid hormones and protein synthesis inhibitors. *J. Obstetrics and Gynecology* 142: 402-409.
- Park DW, Yang HW, Kwon HC, Jang KH, Kim SG, Cho DJ and Oh GS. 1999. 3-Dimensional culture system of endometrial cells for studying the human implantation mechanism. *Korean J. Reprod. Med.* 26: 1-4.
- Sandberg T, Casslen B, Gustavsson B and Benraad TJ. 1998. Human endothelial cell migration is stimulated by urokinase plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor 1 complex released from endometrial stromal cells stimulated with transforming growth factor β 1; possible mechanism for paracrine stimulation of endometrial angiogenesis. *Biol. Reprod.* 59: 759-767.
- Jean DV, Daniel B and Dominique B. 1985. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 100: 86-92.
- Victoria S, Svetlana M, Eleonore K, Thérèse JR, Paul E and Vsevolod AT. 1999. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis dependent mechanisms. *Mol. Cell Biochem.* 195: 199-206.

(접수: 2013. 08. 19/ 심사: 2013. 08. 20/ 채택: 2013. 09. 03)