대한산부회지 제44권 제1호 2001
Vol. 44 No. 1 January 2001

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

을지대학교 의과대학 산부인과학교실, 생리학교실*, 아주대학교 대학원 분자과학기술과**,
아주대학교 의과대학 산부인과학교실†, 연세대학교 의과대학 산부인과학교실‡
권혁찬 · 박원일 · 김선영 · 박동욱** · 김미란† · 한성원 · 김대운 · 이호준* ·
홍서유 · 박준영 · 김세광‡ · 조동제‡

=ABSTRACT=

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

Hyuck Chan Kwon, Won Il Park, Sun Young Kim, Dong Wook Park**
Mi Ran Kim†, Sung Won Han, Dae Wun Kim, Ho Joon Lee*
Seo Yoo Hong, Joon Young Park, Sei Kwang Kim‡, Dong Jae Cho‡
Department of Obstetrics and Gynecology, Eulji University School of Medicine, Seoul
*Department of Molecular Science and Technology, Graduate School, Ajou University, Suwon***
Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine, Suwon†
*Department of Physiology, Eulji University School of Medicine, Seoul**
Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea‡

Objective : The aim of this study was to establish three-dimensionally cultured endometrial cell model containing endometrial stromal cell (ESC), endometrial epithelial cell (EEC) and extracellular matrix (ECM) and to compare the morphological and biomolecular expression patterns of this model with mid-luteal endometrium in vivo.

Materials and Methods : The EEC and ESC was obtained from hysterectomy specimen and cultured separately. The EEC was overlayered in Matrigel layer on ESC embedded in collagen. The model had been cultured for 48 h in DMEM medium containing estrogen and progesterone. The ultrastructure was evaluated by electron microscopy. The expression of integrins, cyclooxygenases and matrix metalloproteinases were examined by immunohistochemistry and zymography.

Results : EEC in three-dimensional culture model grew with polarity and tight junction and desmosome between cells were found. The formation of pinopodes was also detected. In three-dimensionally cultured endometrial cell model, the expression of integrin α_1, α_4, β_3, MMP-1, -2, -3 and 9 was detected which was not expressed in monolayer culture of EEC, ESC or ESC embedded in collagen.

Conclusion : The three-dimensionally cultured endometrial cell model possessed the morphological and biomolecular characteristics of in vivo endometrium of implantation period. These characteristics could be achieved by paracrine interactions between ESC and EEC. This model may contribute to the studies of differentiation of endometrium, process of implantation and pathophysiology of implantation-related diseases.

Key words : Three dimensional co-culture, Human endometrial cell, Integrin, MMPs

인간의 자궁 내막 조직은 생리 주기에 따라 다양한 변화를 보인다. 이러한 자궁내막의 변화는 증식기, 분비

접수일 : 2000. 7. 28.
주관책임자 : 조동제
본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (HMP-97-M-1-0006) "

기, 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) 등에 의해 조절된다.[1] 또한 기질세포(stromal cell, ESC)와 상피세포(epithelial cell, EEC)간의 상호 작용이 자궁 내막 조직의 분화에 중요한 영향을 미친다고 보고되고 있다.[2]

최근에는 생리 주기에 따라 자궁내막 상피세포(EEC)와 기질세포(ESC)에서 integrin,[3] Matrix metalloproteinase (MMPs),[4] cyclooxygenase(COX)[5,6]의 발현 양상이 변화되는 것이 보고되었다. 착상기에는 pinopods가 분화[6]되고 integrin α1, α4, β3, αvβ3[3]가 동시에 발현되며 조직의 분화(tissue remodeling)에 관여하는 COX-2[5,6]와 MMP-9[8]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.[9,10] 이러한 상반된 견해는 단층 배양된 자궁내막세포(monolayered endometrial cell in vitro)가 기능적인 분화 특성을 유지하지 못한다는 Hearn 등[11]의 보고와 일치한다. Bentin-Ley 등[12]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 수행하였다. 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.

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