흰쥐 자궁 상피와 내막에서 기원한 세포주의 체외배양

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과
서울대학교 자연과학대학 분자생물학과*
강 병문, 이 석원*, 채 희동, 강 은희, 추 형식, 김 정훈, 장 윤석, 남 주현

In Vitro Culture of Nontransformed Cell Lines Derived From Rat Endometrial Epithelium and Stroma

Byung Moon Kang, Suk Won Lee*, Hee Dong Chae,
Eun Hee Kang, Hyung Sik Chu, Chung Hoon Kim,
Yoon Seok Chang, Joo Hyun Nam

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
University of Ulsan, Asan Medical Center, Seoul, Korea
Department of Molecular Biology, College of Natural Science,
*Seoul National University, Seoul, Korea**

= Abstract =

Since the blastocyst is broken and spreads out on a flat plastic culture dish (two dimensional culture) during in vitro development, it has been difficult to study the implantation process. It also has been difficult to analyse the interactions between endometrial epithelial and stromal cells because of the lack of a long-term in vitro model which can stimulate in vivo characteristics, as these cells eventually fail to proliferate or cease to express differentiated functions.

Recently nontransformed cell lines, CUE-P and CUS-V2, derived from rat endometrial epithelium and stroma were reported. In this study, morphology of CUE-P and CUS-V2 was examined and oxytocin gene expression by CUE-P cells was demonstrated by RT-PCR. The CUE-P cells have a cuboidal morphology and CUS-V2 cells resemble fibroblast and exhibit a spindle-like morphology. In RT-PCR, same size of PCR products of oxytocin gene at hypothalamus, uterus and CUE-P cells were demonstrated. These results showed three dimensional culture system could be made by using the new cell lines.

Key Words : Uterus, Epithelium, Stroma, Rat, CUS-V2, CUE-P

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

서 론

장기간의 배아 체외배양이 좋은 동물실험모형이라는 것은 익히 알려진 바이지만 현재까지의 기술로는 많은 제한이 있고 실행하기가 쉽지 않다. 배아의 체외 장기배양(long-term culture)은 사람의 배아를 대상으로 한 연구에서는 초기 포배기까지만 배양을 한 것이 전부이나 동물실험에서는 기관분화를 하여 심장박동과 limb-budding을 보이는 배아단계까지 배양이 진행되고 있으며, 이는 생쥐의 전체 임신기간의 약 절반에 해당하는 기간이다(강병문 등, 1996; Kang et al., 1997). 그러나 현재까지의 모든 체외 장기배양은 배양액이나 배양물질이 함유된 2차원의 배양용기에 시행하였기 때문에 3차원의 조직인 자궁내에서의 배아성장과는 많은 차이가 있다. 기존의 2차원적 배양방법을 이용한 배아의 체외배양에 있어서 대표적인 문제점은 배아가 early egg cylinder(EEC)의 단계에 이르면 중력의 작용으로 인한 자체의 무게에 의해서 형태가 파괴되어 배아부분(embryonic part)은 3차원적으로 자라나 배외막부분(extra-embryonic part)은 파열되어 실험용기의 바닥에서 2차원적으로만 성장한다는 것이다(Chen & Hsu, 1982; Olovsson & Nilsson, 1993).

따라서 3차원적인 배양을 위해서는 상피세포(epithelium), 기저막(basement membrane), 간질(stroma) 등으로 이루어진 자궁내막과 유사한 배양체계가 필요하다. 이러한 배양체계에 대한 연구는 국외에서는 활발하나(Bentin-Ley et al., 1994; Armant & Kameda, 1994; Arsan et al., 1995), 국내에서는 매우 드문 실정이며 강병문 등(1998)이 3차원 배양체계의 완성을 위한 연구의 일환으로 기저막의 일종인 Matrigel을 이용하여 생쥐배아를 3차원적 구조하에서 체외배양을 하고 그 결과를 발표한 바 있다.

한편으로 3차원 배양체계를 위한 연구시 또 다른 문제점이 있는데, 그것은 자궁내막세포가 채취후 체외배양시 계속 증식하지 못하고 죽거나 고유의 특성을 잃어버리고 성질이 다른 세포로 변화하는 경향이 있는 것이다. 이와같이, 자궁내막세포의 체외배양시 생체내에서와 같은 유전적 특성을 계속 유지하지 못하면 정상적인 자궁내막과 같은 기능이 소실되므로 자궁내막 세포 상호간의 작용이나 배아의 착상 연구에 문제가 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 최근에 개발된 자궁내막 상피세포와 간질세포의 세포주를 체외배양하여 생체내에서와 같은 유전적 특성을 유지하는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양조건

흰쥐의 자궁내막 상피세포와 간질세포에서 기원한 CUE-P(Cemal Uterus Epithelial cells-Plasmid transfected; donated from Zingg), CUS-V2(Cemal Uterus Stromal cells-retroViral transfected, clone2; donated from Zingg) 세포주(cell line)를 각각 100 U/mL penicillin(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 50 μg/mL streptomycin(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 그리고 5% FBS(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) 또는 10% FBS가 첨가된 F12/DMEM(GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액에서 37^{0}C 또는 32^{0}C에서 배양하였다.

2. 조직과 세포에서의 total RNA 분리

Total RNA는 변형된 acid guanidium phenol-chloroform 방법(Chomzynski & Sacchi, 1987)에 의해서 얻었다. 조직의 경우, 흰쥐에서 시상하부와 자궁을 떼어낸 후, 바로 tissue tearer를 이용해서 solution D(4 M guanidium thiocyanate; 25 mM sodium citrate, pH 7.0; 0.5% sarcosyl; 0.1 M 2-mercaptoethanol)에서 각 조직을 분쇄하였다. 세포의 경우 배양액을 제거하고 Dulbecco phosphate buffered saline(D-PBS, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 세척한 후 solution D를 넣고 pipetting을 하고 나서 새로운 1.5 mL tube로 옮겨주었다. 그리고 0.1부피의 2 M sodium acetate(pH 4.0), 1부피의 물로 포화된 페놀 그리고 0.2부피의 chloroform-isoamyl alcohol 혼합물(49:1)을 넣고 얼음 위에 15분간 두었다. 4^{0}C, 13000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 수성 층에 존재하는 RNA를 1부피의 isopropanol로 침전시켰다. 침전된 RNA를 4^{0}C, 13000 rpm에서 20분간의 원심분리를 통해서 모은 후, 70% 에탄올로 세척하고, 10 μL의 3차 증류수에 녹였다.

3. 역전사 중합반응(RT-PCR)에 의한 oxytocin mRNA 검출

cDNA의 합성은 total RNA를 역전사의 주형가닥으로 삼아서 무작위적 핵산육합체를 시발체로 이용해서 이루어졌다. 역전사를 시작하기 전에 무작위적 핵산육합체(Boehringer, Mannheim, Germany) 100 pmol을 포함한 RNA 용액을 75^{0}C에서 10분 동안 열을 가해서

RNA의 2차구조를 분리시켰다. 이후 4°C에서 잠깐 원심 분리시킨 후, 이 RNA용액을 몇 분 동안 얼음에 두었다. RNase H⁻-MMLV 역전사효소(Promega, WI, USA) 200 units가 들어간 혼합물(4 μL dNTP [각각 2.5 mM], 0.25 μL RNasin [26 U/ μL, Promega, WI, USA], 4 μL 5x 역전사효소 완충용액[Promega, WI, USA])을 RNA용액에 넣은 후, diethyl pyrocarbonate를 처리한 물을 이용해서 최종 반응 부피를 20 μL가 되게 하였다. cDNA 합성을 위해서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 95°C에서 5분간 머물게 해서 반응을 종료시켰다. 반응 혼합물은 4°C에서 잠깐동안의 원심분리 수행 후에, -20°C에서 보관되었다. PCR 반응은 10x PCR 완충용액(Perkin Elmer Cetus, NJ, USA) 4 μL, dNTP 혼합물 3.2 μL(각각 2.5 mM), 1U Ampli-Taq polymerase(Perkin Elmer Cetus, NJ, USA)가 들어간 혼합물에 역전사한 용액 2 μL를 넣은 후, 3차 증류수를 이용해 총 40 μL가 되게 해서 진행했다. 모든 반응에서 10 pmol의 PCR 시발체를 사용했다. 그리고 이러한 PCR 반응 혼합물에 mineral oil(Sigma, St. Louis, MO, USA) 25 μL를 덮고 나서, PCR cycler(Phamacia LKB, Gene ATAQ controller, NJ, USA)를 이용해서 증폭하였다. PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1.5분, 그리고 마지막 cycle에서는 72°C에서 10분간 수행되었다.

결 과

1. CUS-V2와 CUE-P 세포관찰

흰쥐 자궁 내막세포에서 기원한 세포주인 CUE-P와 CUS-V2의 형태는 Fig. 1과 같다. Fig. 1의 A는 자궁내막 상피세포에 기원한 세포주인 CUE-P이고 Fig. 1의 B는 간질세포에서 기원한 CUS-V2의 형태이다. CUE-P 세포들은 cuboid 형태를 보이는 반면에 CUS-V2 세포들은 fibroblast를 닮은 형태로 spindle-like한 형태를 보였다. 상피세포와 간질세포 모두 10회 이상의 계대배양(passages)에도 고유의 형태를 유지하였다.

2. 역전사 중합반응에 의한 oxytocin mRNA 검출

자궁내막 상피세포에서 기원한 세포주인 CUE-P에서의 oxytocin 유전자의 발현여부를 확인하기 위해서 exons A,B 에 각각 특이적인 시발체들을 이용한 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 2). 양성 대조군으로 흰쥐의 시상하부와 estrus시기의 자궁조직을 이용하였다. 2% 아가로스겔 전기영동 결과, 시상하부 또는 자궁조직의 total RNA을 이용한 RT-PCR 산물과 같은 크기의 PCR 산물을 CUE-P를 이용한 RT-PCR에서도 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

고 찰

자궁내막과 유사한 3차원적인 배양체계의 완성을 위해서는 자궁내막세포의 성공적인 장기 배양과 동시에 세포의 특성을 유지하는 것이 필수적이다. 이에 저자 등은, 최근에 개발된, 흰쥐의 자궁 내막세포에서 기원한 세포주인 CUS-V2와 CUE-P를 이용하여 이들 세포주의 형태학적 측면과 유전학적인 측면을 연구하였다.

CUE-P와 CUS-V2 세포주를 광학 현미경으로 관찰해 보면 CUE-P는 cuboid 형태를 가지며, CUS-V2는 fibroblast와 유사한 형태를 보이고 있음을 알 수 있었다. 이러한 CUE-P와 CUS-V2는 10회 이상의 계대배양 후에도 자궁조직에서 상피와 간질세포를 1차 배양했을 때 관찰할 수 있는 형태와 유사하였다. 이러한 사실로부터 CUE-P와 CUS-V2는 체외배양 후에도 생체조직과 형태학적인 유사성을 유지하고 있음을 알 수 있다.

Oxytocin은 supraoptic and paraventricular nucleus에 위치한 hypothalamic magnocellular neuron에서 주로 합성되어진다고 알려져 왔다(Jirikovsky et al., 1988). 그러나 최근의 연구에 의하면 central nervous system 외에도 흉선(Argiolas et al., 1990), 부신(Ang & Jenkins, 1984), 정소(Nicholson et al., 1984), 난소(Wathes & Swann, 1982) 그리고 수란관 (Schaeffer et al., 1984)에서도 oxytocin이 발견되었으며, 흰쥐의 태반과 자궁에서는 그 유전자의 발현이 확인되었다(Lefebvre et al., 1992).

본 실험에서는 CUE-P 세포주에서 oxytocin 유전자가 전사되어 mRNA를 실제로 형성하는 지를 알아보기 위하여, 흰쥐의 oxytocin 유전자 중, exon A에서 sense primer를 선택하고, exon B에서 antisense primer를 선택하여(Ivell & Richter, 1984) genome상의 유전자가 PCR에 의하여 검출되는 가능성을 배제하였다. 그리고 시상하부와 자궁조직을 양성 대조군으로 이용하여 PCR 산물의 크기를 비교하였다. 이들 양성 대조군 조직과 CUE-P 세포주에서 얻은 total mRNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였고 그 결과 CUE-P을 이용한 RT-PCR에서 시상하부와 자궁조직을 이용한 것과 동일한 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 이는 체외배양 세포주인 CUE-P가 생체 내 자궁조직과 동일한 유전적 특성을 가지고 있음을 알 수 있는 증거이다. 따라서 이 세포주를 이용한 3차원적인 체외배양체계의 연구가 다음 과제가 될 것이고 이를 이용하여 최종적인 목표인 배아의 착상연구를 위한 모형을 완성시킬수 있을 것이다.

결 론

본 연구는 생식에 중요한 역할을 하는 자궁내막의 상피세포와 간질세포의 상호작용을 체외에서 연구하는데 유용하게 이용될 것으로 사료되는 체외배양 세포주인 CUE-P와 CUS-V2의 형태학적이고 유전학적인 특성을 살펴보았다. 결과 이들 체외배양 세포주는 생체내 조직과 형태학적 유사성을 유지하고 있으며, 유전학적으로도 동일한 특성을 지님을 확인할 수 있었다. 그러므로 이들 체외배양 세포주를 이용하면 복잡한 환경하에 놓여있어 연구가 힘들었던 자궁내막 상피세포와 간질세포의 상호관계를 연구하는데 많은 도움이 될 것이며 3차원적 배양체계의 완성을 위한 가장 중요한 여건을 충족시킬 수 있을 것이다.

인용 문헌

Ang VTY, Jenkins JS: Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 58, 681-689.

Argiolas A, Melis MR, Stancampiano R, Mauri A, Gessa GL: Hypothalamic modulation of immunoreactive oxytocin in the rat thymus. *Peptides* 1990, 11, 539-543.

Armant DR, Kameda S: Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue : A model for peri-implantation development. *J Exp Zool* 1994, 269, 146-156.

Arslan A, Almazan G, Hans H, Zingg HH: Characterization and co-culture of novel nontransformed cell lines derived from rat endometrial epithelium and stroma. *In Vitro Cell* 1995, 31, 140-148.

Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Falck-Larsen J, Hamberger L, Hom T: Isolation and culture of human edometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 1994, 201, 327-332.

Chen LT, Hsu YC: Development of mouse embryos in vitro : preimplantation to the limb bud stage. *Science* 1982, 218, 66-68.

Chomzynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 1987, 162, 156-159.

Ivell R, Richter D: Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci* 1984, 81, 2006-2010.

Jirikowsky GF, Caldwell JD, Pedersen CA, Stumpf WE: Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience* 1988, 25, 237-248.

강병문: Growth and degeneration of mouse blastocyst in vitro. **대한산부회지** 1996, 39(1), 121-126.

Kang BM, Kim CH, Chang YS, Mok JE: Effect of population density on the early post-implantation mouse embryo growth in vitro. *J Obstet Gynecol Res* 1997, 23(2), 119-124.

강병문, **전용필**, **김지영**, **장영우**, **채희동**, **김정훈**, **장윤석**, **목정은**, **허주령**: In vitro culture of mouse embryo by Matrigel. **대한산부회지** 1998, 41(3), 880-886.

Lefebvre DL, Giaid A, Zingg HH: Expression of the oxytocin gene in rat placenta. *Endocrinology* 1992, 130, 1185-1192.

Nicholson HD, Swann RW, Burford GD, Wathes DC, Porter DG, Pickering BT: Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regul Pept* 1984, 8, 141-146.

Olovsson M, Nilsson BO: Structural and functional properties of trophoblast cell of mouse egg-cylinders in vitro. *Anatomical Record* 1993, 236, 417-424.

Schaeffer JM, Liu J, Hsueh AJ, Yen SS: Presence of oxytocin and arginine vasopressin in human ovary, oviduct, and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 59, 970-973.

Wathes DC, Swann RW: Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature* 1982, 297, 225-227.

A

B

Fig. 1. Morphology of immortalized uterine cells. A, epithelial cell-derived cell line CUE-P; B, stromal cell-derived cell line CUS-V2. Magnification, x 100

Fig. 2. A, General scheme of RT-PCR. OTA+ and OTB- are corresponding to exon A and B specific primer. B, Primers used at oxytocin RT-PCT. Each primer is 20 oligonucleotides

Fig. 3. Demonstration by RT-PCR of oxytocin gene expression by CUE-P cells. The calculated sizes of the predicted products from PCR reactions are 216bp. Lane 1 is marker; lane 2 is hypothalamus; lane 3 is uterus; lane 4 is CUE-P cells