

Effect of TGF- β 1 on the Apoptosis of Uterine Epithelial Cells during Implantation in Mouse

양혜영, 김진미, 임정진, 김문규
한양대학교 생명과학과

INTRODUCTION

세포예정사(apoptosis)는 발생과정이나 조직의 재구성과정에서 예정된 세포의 제거를 위해 유전적으로 조절되는 과정으로, 이 과정의 특징은 세포가 수축되고(shrinkage), 세포막이 파괴되거나(blabbing), 균열되고(fragmentation), 염색질이 응축되고, 핵은 붕괴되거나 세포소기관은 손상되지 않으며, 세포가 사멸체(apoptotic body)를 형성하여 식세포작용으로 분해되나, 세포염증반응은 나타나지 않는 현상이다(Wyllie, 1981). 세포예정사는 생식소 형성과정 (Piquette *et al.*, 1994), 생식주기에서의 자궁내막 (Tabibzadeh, 1995), 착상전 배아의 발생과정 (Jurisicova *et al.*, 1995), 배아의 착상과정 (Parr *et al.*, 1987), 그리고 탈락막 형성과정 (Welsh and Enders, 1993)에 관련되어 있다고 보고되었다. 이 중 포배가 자궁내막 조직에 착상하는 과정에서 자궁내막 상피세포에서 세포예정사가 관찰되었다. 이 과정은 autocrine 또는 paracrine하게 조절되며, 수많은 인자들 중 TGF- β 1이 관련되어있을 것이라는 연구가 보고되었다 (Kamijo *et al.*, 1998). 다양한 기능을 가진 TGF- β 1은 특히 상피조직에서 성장을 억제하는 인자로 알려져 있으며, 세포예정사를 유도하는 유전자산물들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 생쥐에서 착상부위의 자궁내막 상피세포에서 일어나는 세포예정사를 조절하는 기작에 대해, 그리고 이 과정을 조절하는 인자 중 하나로 알려진 TGF- β 1에 의해 세포예정사를 유발하는 유전자중 일부인 fas, fas ligand, bax, bcl-x, caspase-2, caspase-3의 발현양상을 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

착상시기의 자궁조직 획득

생후 6-8주된 ICR계 생쥐를 사용하였으며, 임신 4일째, 4.5일째, 5일째, 6일째, 7일째 생쥐에

0.5 % Chicago blue B 용액을 꼬리 정맥에 주사하여 착상부위와 비착상부위로 구분하여 자궁조직을 얻었다. 그리고, 임신 4일째에 생쥐의 질쪽으로 100 μ g/ml의 농도로 희석한 TGF- β 1 neutralizing antibody (R&D Systems, USA)를 직접 자궁강 내에 주입하였다. 임신 7일째에 자궁조직을 얻어 착상부위의 수와 형태를 관찰하였다.

자궁조직 슬라이드 제작

획득한 자궁조직을 4% paraformaldehyde 용액에 고정시킨 후, alcohol 시리즈와 xylene을 거쳐 paraffin에 포매하였다. 박편절단기로 6-7 μ m 두께로 잘라 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 부착하였다.

자궁내막 상피세포의 배양

임신 4일째의 자궁조직을 얻어 0.1% collagenase를 첨가하였고, 10% FBS가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배양액에 진탕하여 상피세포의 수를 계수하여 5×10^5 cells/ml 씩 24시간동안 배양하였다. 실험군들은 상피세포만 배양한 실험군(E), 포배와 자궁내막 상피세포를 공배양한 실험군(EB), 포배를 배양했던 배양액 속에 자궁내막 상피세포를 배양한 실험군(EC)으로 나누었으며, 각각의 실험군에 TGF- β 1 neutralizing antibody을 100 μ g/ml 농도로 처리하였다.

TUNEL 분석방법

세포예정사는 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labelling(TUNEL) 방법을 통해 deadend colorimetric apoptosis detection system (Promega, USA)으로 분석하였다.

Total RNA 추출 및 RT-PCR

자궁내막 상피세포로부터 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 분리하였다. 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)은 kit(Takara, Japan)를 이용하여 42°C에서 1시간동안 실시하였다. 합성된 cDNA는 각각의 primer (Bioneer, Korea)을 이용하여 β -actin, fas, fas ligand, bax, bcl-x, caspase-2, caspase-3의 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 확인하였다. RT-PCR로 얻어진 각 유전자의 mRNA의 상대적인 비율을 densitometric analysis을 이용하여 측정하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

착상시기에 착상부위의 자궁내막 상피세포에서 일어나는 세포예정사를 자궁내막 상피세포의 체외배양과 자궁조직의 형태적인 관찰로 나누어서 진행하였다. TUNEL 방법을 통해 관찰한 결과에서 보면, 자궁조직과 배아가 접하는 부위의 자궁내막 상피세포에서 집중적으로 관찰되었다. 체외배양한 실험군에서는 자궁내막 상피세포와 포배를 공동배양한 경우에 많이 관찰되었다. 즉, 포배에서 분비된 인자에 의해 착상시기의 자궁내막 상피세포의 세포예정사를 유발한다고 추측된다.

그러므로 착상시기에 일어나는 자궁내막 상피세포의 세포예정사를 조절하는 여러 인자들 중 TGF- β 1이 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다. TGF- β 1 neutralizing antibody를 100 μ g/ml로 처리하였을 때, 자궁내막 상피세포에서 일어나는 세포예정사가 나타나지 않았다. 그리고, TGF- β 1은 세포내에서 여러 유전자의 발현을 조절하여 세포예정사를 유발한다는 연구가 되어있다. 세포예정사를 유발하는 유전자 중 일부인 fas, fas ligand, bax, bcl-x, caspase-2, caspase-3의 발현 양상을 연구하였다. 체외배양한 실험군에서는 TGF- β 1 neutralizing antibody를 처리하였을 때 이들 유전자의 발현이 억제되었다. 이는 세포예정사를 유발하는 유전자들이 TGF- β 1과 관련되어 있어 자궁내막 상피세포의 세포예정사를 조절한다는 것을 의미한다. 임신 시기별로 착상시기의 자궁내막 상피세포를 얻어 세포예정사를 유발하는 유전자의 발현을 관찰한 결과, 임신 4.5일째와 5일째 착상부위에서 가장 많이 발현되며, TGF- β 1 neutralizing antibody를 자궁강내에 처

리한 경우, 임신 5일째와 6일째에 이 유전자들의 발현이 억제되었다. 이것은 체외배양한 결과와 비슷하며, TGF- β 1이 세포예정사를 유발하는 유전자들의 발현을 조절하여 착상시기의 세포예정사를 조절한다는 것을 의미한다. 그리고, TGF- β 1 neutralizing antibody를 직접 자궁강 안에 주입한 경우, 약간의 착상 흔적을 관찰할 수 있거나 대조군과 비교하였을 때 적은 수의 착상부위를 관찰하였다.

본 실험 결과들을 종합하여 볼 때, 착상시기에 일어나는 자궁내막 상피세포의 세포예정사를 조절하는 인자들 중 하나인 TGF- β 1은 자궁내막 상피세포에 존재하는 TGF- β receptor에 신호를 전달하여 자궁내막 상피세포 안에 존재하는 세포예정사를 유발하는 유전자를 활성화시키는 것으로 사료된다. 이 과정을 통해 자궁내막 조직에 부착한 포배가 자궁조직 안으로 착상할 수 있도록 공간을 형성하여 착상과정을 도와주는 것으로 사료된다. 이 과정의 조절은 필수적이며, 이 과정에서 TGF- β 1이 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 그러나, 착상과정 중에 일어나는 자궁내막 상피세포의 세포예정사는 일반적인 세포에서 일어나는 세포예정사처럼 복잡한 과정을 거치며, TGF- β 1이외에 다른 요인들과 복합적으로 조절될 것으로 생각된다. 앞으로 이과정을 조절하는 인자들을 확인하고, 이들의 상호조절 기작에 관해 밝히는 연구가 수행되어야 할 것이다.

REFERENCES

- Juriscova A, Varmuza S, and Casper RF (1995) Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. *Hum. Reprod. Update.* 1; 558-566.
- Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, and Ibuki Y (1998) Biochemical evidence for autocrine /paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 4; 990-998.
- Parr EL, Tung HN, and Parr MB (1987) Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.* 36; 211-225.
- Piquette GN, Tilly JL, Prichard LE, Simon C,

- and Polan ML. (1994) Detection of apoptosis in human and rat ovarian follicles. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1; 297-301.
- Tabibzadeh S (1995) Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Hum. Reprod. Update* 1; 303-323.
- Welsh AO and Enders AC (1993) Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol. Reprod.* 49; 38-57.
- Wyllie AH (1981) Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *In:* Bowen ID, Lockshin RA (eds.), *Cell death in biology and pathology*. London: Chapman and Hall. pp. 9-34.