

# Progesterone과 TGF-β1에 의해 탈락막화가 유도된 인간 자궁내막세포의 삼차원 공배양이 2-세포기 생쥐배아의 체외발달에 미치는 영향

부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실<sup>1</sup>, 부산대학교병원 불임클리닉<sup>2</sup>

권욱현<sup>1</sup> · 김희곤<sup>1</sup> · 이동형<sup>1</sup> · 고경래<sup>2</sup> · 이규섭<sup>1\*</sup>

## Effects of 3-dimensional Co-culture of Human Endometrial Cells Decidualized with Progesterone and TGF-β1 on the Development of Mouse 2-cell Embryos In Vitro

Wook-Hyun Kwon<sup>1</sup>, Hwi-Gon Kim<sup>1</sup>, Dong-Hyung Lee<sup>1</sup>, Kyung-Rae Ko<sup>2</sup>, Kyu-Sup Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea,

<sup>2</sup>Infertility Clinic, Pusan National University Hospital, Busan, Korea

**Objective:** This study was carried out to investigate the effects of 3-dimensional co-culture of human endometrial cells decidualized with progesterone and TGF-β1 on the development of 2-cell mouse embryos.

**Methods:** Stromal and epithelial cells isolated from human endometrial tissue were immunostained for cytokeratin and vimentin. Expression of TGF-β1, its receptor-1,-2, integrin-β3 and prolactin in mono or co-culture according to three different hormone conditions was investigated by RT-PCR. Differential staining was used to investigate the number of ICM and trophectoderm of hatched mouse blastocysts in different three conditions.

**Results:** The immunohistochemical study was positive for cytokeratin or vimentin and confirmed that epithelial and stromal cells were isolated from endometrial tissue successfully. In co-culture, TGF-β1, its receptor-1, integrin-β3 and prolactin except TGF-β1-r2 were expressed in progesterone dominant condition. The hatching and attaching rate were higher in the co-culture with decidualized cells ( $p < 0.05$ ). However, we observed that lots of the incomplete hatched blastocysts attached on non-decidualized cells. The ICM number of hatched mouse blastocysts was higher in co-culture with decidualized and non decidualized cells than media only culture ( $p < 0.05$ ). The trophectoderm number of hatched blastocyst was higher in the co-culture with decidualized cells than non-decidualized cells or media only culture ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The administration of progesterone, estrogen and TGF-β could induce decidualization of stromal and epithelial cells isolated from human endometrial tissue using 3-dimensional co-culture, and the decidualization of human endometrial cells could increase the hatching and attaching rate of 2-cell mouse embryos. [Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(1): 49-60.]

**Key Words:** Decidualization, TGF-β1, Co-culture, Progesterone, RT-PCR

임신이 성립되기 위해서는 착상시기 (implantation window)에 배아와 자궁내막의 변화가 동시에 일어나면서 상호 의존적이어야 한다.<sup>1</sup> 포배기배아는 영

양막세포와 자궁내막 기질세포에서 분비되는 투명대 분해효소 (zona lysis)의 작용에 의해 부화된 후 자궁내막 상피세포 (endometrial epithelial cell)에서 분비되는 integrin을 매개체로 자궁내막에 부착되어 착상이 시작된다.<sup>2,3</sup> 이와 동시에 자궁내막세포는 progesterone 의존성인 pinopode가 선관상피세포

주관책임자: 이규섭, 우) 602-739 부산광역시 서구 아미동1가 10, 부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실  
Tel: (051) 240-7287, Fax: (051) 248-2384  
e-mail: kuslee@pusan.ac.kr

(luminal epithelium)표면에 돌출하여 포배기배아의 영양막세포층이 기질세포층으로 침윤할 수 있도록 탈락막화 (decidualization)가 이루어져야 한다.<sup>4,5</sup>

자궁내막 기질세포의 탈락막화란 자궁내막의 증식과 분화과정을 거쳐 배아의 착상과 임신유지를 위해서 기질세포가 모세혈관 주위에서부터 형태와 기능적으로 변화하는 것을 말한다.<sup>6</sup> 현재 progesterone이 자궁내막 기질세포의 탈락막화를 유도하는 물질로 알려져 있으며,<sup>7</sup> 이외에도 cAMP,<sup>8</sup> gonadotropin,<sup>9</sup> PGE<sub>2</sub> 등<sup>10</sup>이 자궁내막 기질세포의 탈락막화를 유도하는 물질로 보고되었다.

Ando 등<sup>11</sup>은 TGF- $\beta$ 의 subtype과 수용체 mRNA가 인간의 탈락막과 용모에서 발견되는 것을 관찰하여 TGF- $\beta$ 가 자궁내막세포의 탈락막화에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였으며, Kim 등<sup>12</sup>과 Park 등<sup>13</sup>도 자궁내막 상피세포와 기질세포의 공배양에서 progesterone이 TGF- $\beta$ 1을 발현시키고 발현된 TGF- $\beta$ 1에 의해 기질세포가 탈락막화 됨을 보고하였다.

Arnold 등<sup>14</sup>은 matrigel에 embedded된 기질세포와 상피세포를 공배양시 상피세포의 증식이 억제되고 기질세포가 상피세포의 분화를 조절할 수 있음을 발표하여 체내와 유사한 환경을 체외에서 만들 수 있음을 제시하였다.

따라서 본 연구에서는 Park 등<sup>13</sup>의 방법을 재현하여 자궁내막조직으로부터 분리한 기질세포와 상피세포를 각각 progesterone과 estrogen 우세환경에서 삼차원 공배양을 한 후 TGF- $\beta$ 1을 첨가하여 탈락막화를 확인하고, 2-세포기 생쥐배아를 탈락막화가 유도된 인간 자궁내막세포와 공배양하여 탈락막화가 포배형성율, 부화율, 포배의 내세포피와 영양막세포수, 부착율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실행되었다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 인간 자궁내막 채취

부산대학교병원 산부인과에 내원한 30세에서 40세 사이의 환자들 중 자궁근종으로 인한 자궁적출

술을 시행한 환자들을 대상으로 하였다. 적출된 자궁내막조직을 환자의 동의와 본원 기관윤리심의위원회의 승인을 받아 실험에 이용하였다. 이들은 모두 생리일을 기준으로 증식기인 여성들이었으며 적출된 자궁의 후저부로부터 자궁내막조직을 획득하였고 최종 조직검사서 자궁내막층에 질환이 있었던 경우는 제외하였다.

## 2. 자궁내막 기질세포와 상피세포의 분리

### 1) 기질세포

채취된 자궁내막은 0.03 mg/ml penicillin-0.02 mg/ml streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture-12 (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배양액에 담아 실험실로 운반하였으며 혈액을 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 이상 세척하였다. DMEM/F-12 배양액 2~3 ml를 배양접시에 부어준 후 세척된 자궁내막조직을 얇게 iris curb scissor로 약 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 세절하였다. 세절된 조직을 tube로 옮긴 후 DMEM/F-12로 pipetting하여 상층액을 제거하는 방법으로 혈액제거를 위해 3회 반복 세척하였다. 상층액을 버린 후 가라앉은 조직에 digestion 용액 [DMEM/F-12 + 5% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT) + 2 mg/ml collagenase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)] 10 ml를 첨가한 후 20분마다 부드럽게 pipetting하면서 37°C incubator에서 2.5시간 배양하였다. 효소작용을 정지시키기 위해 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 배양액을 동량 첨가하여 pipetting 한 후 100 wire sieve (140  $\mu$ m; Falcon, USA)와 400 wire sieve (37  $\mu$ m; Falcon, USA)를 차례로 통과시켜 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 기질세포를 분리하였다. 분리된 기질세포를 DMEM/F-12에 10%-FBS, 1% insulin-transferrin-selenium X supplements (ITS-X; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 52.6  $\mu$ g/ml linoleic acid (Sigma, St Louis, MO, USA), 0.03 mg/ml penicillin, 0.02 mg/ml streptomycin을 첨가하여 60 mm 배양접시에서 배양하였다. 다음날 배양접시 바닥에 가라앉은 적혈구와 부유세포들을 제거하기 위

해 PBS로 3회 세척하고 배양액을 교체한 후 실험에 이용하기 위해 24~48시간 배양하였다.

## 2) 상피세포

100 wire sieve (140  $\mu\text{m}$ )와 400 wire sieve (37  $\mu\text{m}$ )에 걸러진 세포를 각각 50 ml의 DMEM/F-12 배양액으로 세척한 후 sieve를 뒤집어 DMEM/F-12 배양액을 부어 걸러진 세포를 모은 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상피세포를 분리하였다. 분리된 상피세포를 10%FBS, 1%ITS-X supplements, 52.6  $\mu\text{g/ml}$  linoleic acid, 0.03 mg/ml penicillin-0.02 mg/ml streptomycin이 첨가된 DMEM/F-12 배양액으로 60 mm 배양접시에서 24~48시간 배양하여 실험에 이용하였다.

## 3. 자궁내막 기질세포와 상피세포의 삼차원 배양 준비

기질세포가 배양된 배양접시에서 배양액을 제거한 후 PBS로 세척하고 0.05% trypsin/0.05 mM EDTA 용액 5 ml로 5분간 처리하여 배양접시 바닥에서 세포를 분리하고 5 ml의 배양액을 첨가하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여  $3\sim 5 \times 10^6/\text{ml}$  농도로 조정하였다. 4°C에서 보관되었던 matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA)과 준비된 기질세포를 1:1로 혼합하여 well당 400  $\mu\text{l}$ 씩 6 well 배양접시의 inserts에 넣었다. 이후 37°C에서 1시간 배양하여 matrigel이 평평해지면서 gel 상태로 변하여 기질세포가 embedded되게 하였다. 기질세포가 embedded된 filter inserts가 들어있는 well에  $1 \times 10^6/\text{ml}$  상피세포가 현탁된 배양액을 1 ml씩 넣어주어 상피세포가 overlaying되도록 한 후 48시간 배양하여 삼차원 배양을 준비하였다.

## 4. 성호르몬 농도

실험에 사용한 성호르몬의 농도는 progesterone 우세환경을 만들기 위해서 100 nM progesterone (Sigma, St Louis, MO, USA)과 1 nM estrogen (Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가하였으며, estrogen 우세환경을 만들기 위해서 100 nM estrogen과 1 nM pro-

gesterone을 첨가한 배양액으로 단일배양과 공배양에 이용하였다.

## 5. 자궁내막의 면역조직화학염색

상피세포 표지인자인 cytokeratin과 기질세포 표지인자인 vimentin에 대한 면역조직화학염색은 배양접시에서 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 시행하였다.

PBS에 4%로 희석한 paraformaldehyde를 실온에서 10분간 처리한 후 냉동 보관된 100% methanol과 acetone에 각각 10분과 5분씩 처리하여 세포를 고정하였다. 세포막을 연화시키기 위해 0.4% Triton X-100/PBS를 10분간 처리한 후 비특이적 염색을 방지하기 위해 4% BSA (bovine serum albumin; Sigma, St Louis, MO, USA)가 첨가된 PBS에 2% goat serum과 2% horse serum을 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다.

### 1) 기질세포

4% BSA가 첨가된 PBS에 goat serum과 horse serum을 각각 2% 첨가한 후 일차항체인 Vimentin (mouse anti-human monoclonal antibody; DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 1:100으로 희석하여 배양된 기질세포에 넣어준 후 37°C에서 1시간 처리하였다.

일차항체를 처리한 기질세포를 PBS로 3회 세척한 후, 4% BSA가 첨가된 PBS에 goat serum과 horse serum을 각각 2% 첨가한 용액에 이차항체인 FITC conjugated anti-mouse IgG (Zymed Lab. San Francisco, CA, USA)를 1:100으로 희석하여 일차항체가 처리된 기질세포에 넣어 37°C에서 45분간 처리하였고, 이를 PBS로 다시 3회 세척하고 GVA mounting액 (glycerol vinyl aqueous alcohol solution)으로 sample을 봉입한 후 형광현미경 (DM IRB, Leica, Wezlar, Germany)으로 관찰하였다.

### 2) 상피세포

4% BSA가 첨가된 PBS에 goat serum과 horse serum을 각각 2% 첨가한 용액에 일차항체인 cytokeratin 8/18 (mouse anti-human monoclonal antibody; Santa Cruz Bio tech., Santa Cruz, CA, USA)을 1:100으

**Table 1.** PCR primers

Product	Sequence	Product size
TGF-β1	Forward : 5'-CACGTGGAGCTGTACCAGAA-3' Backward: 5'-GTCCAGGCTCCAAATGTAGG-3'	500 bp
TGF-β1-receptor 1	Forward : 5'-ACGGCGTTACAGTGTCTG-3' Backward: 5'-GGTGTGGCAGATATAGACC-3'	358 bp
TGF-β1-receptor 2	Forward : 5'-AGCAACTGCAGCATCACCTC-3' Backward: 5'-TGATGTCTGAGAAGATGTCC-3'	688 bp
Integrin-β3	Forward : 5'-CGCTTCAGCTGATGTGTGTT-3' Backward: 5'-CATCTCCCACCCTAGTCCAA-3'	224 bp
prolactin	Forward : 5'-GCCCCCTTGCCCATCTGTCC-3' Backward: 5'-AGAAGCCGTTTGGTTTGCTCC-3'	386 bp
β-actin	Forward : 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' Backward: 5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'	275 bp

로 희석하여 배양된 상피세포에 넣어준 후 37°C에서 1시간 처리하였다. PBS로 3회 세척한 후 4% BSA가 첨가된 PBS에 goat serum과 horse serum을 각각 2% 첨가한 용액에 이차항체인 FITC conjugated anti-mouse IgG를 1:100으로 희석하여 일차항체가 처리된 상피세포에 넣어 37°C에서 45분간 처리하였고, 이를 PBS로 3회 세척하고 GVA mounting 액으로 sample을 봉입한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

**6. RT-PCR**

분리된 상피세포와 기질세포의 단일배양과 이를 공배양한 세포에 성선호르몬을 처리하여 이들 세포로부터 탈락막화 표지인자의 발현을 알아보기 위해 Park 등<sup>13</sup>의 방법에 따라 TRIzol reagent (Invitrogen life technologies, Groningen, Netherland)를 이용하여 배양한 세포로부터 모든 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 260 nm와 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 이들의 비가 1.9 이상일 경우에만 사용하였다. cDNA의 합성은 M-MLV reverse transcriptase kit (Bioneer corporation, Korea)를 사용하였으며 실험

에 사용한 모든 primer는 primer designing software primer 3 (available at [steve@genome.wi.mit.edu](mailto:steve@genome.wi.mit.edu))을 참고로 하여 제작하였다.

실험에 사용한 primer와 PCR산물의 크기는 다음과 같다 (Table 1). 모든 PCR 과정은 Accupower PCR premix kit (Bioneer, Korea)을 이용하였으며, PCR에 사용한 증폭과정은 94°C에서 3분간 1 cycle, 94°C에서 30초간 35 cycle, 72°C에서 1분간 1 cycle, 그리고 72°C에서 5분간 1 cycle을 시행하였다. 각 PCR은 동일한 조건의 각기 다른 3개의 시료에서 시행하였으며 3회 모두 동일한 결과가 나오는 것만을 결과로 인정하였다.

**7. 기질세포에서의 TGF-β1 수용체의 발현**

체내의 자궁내막 상피세포에서 분비되는 TGF-β1이 기질세포에서 발현되는 TGF-β1 수용체와 결합하여 기질세포의 탈락막화를 유도하게 되는데,<sup>12</sup> 체외에서 배양된 기질세포에서도 TGF-β1 첨가가 수용체 발현을 유도하는지 알아보기 위해 기질세포 단일배양에 성호르몬이 없는 환경, progesterone 우세환경 및 estrogen 우세환경의 세 처리군을 만들

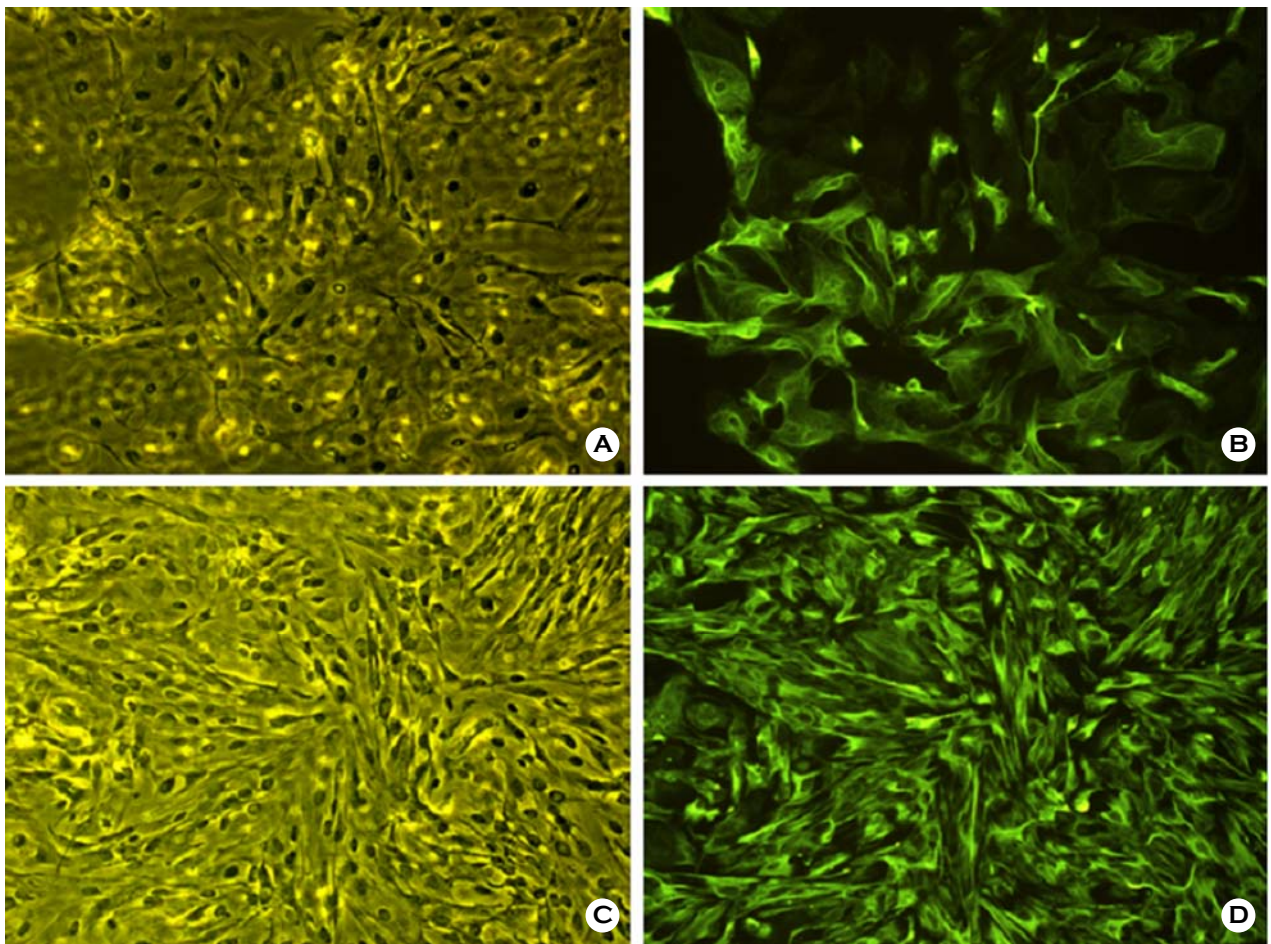
어 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1을 첨가하여 수용체 발현을 알아보았다.

### 8. 2-세포기 생쥐배아 준비와 인간 자궁내막세포와의 공배양

과배란을 유도하기 위해 6~8주령의 C57BL/CBA 계통의 제1세대 잡종 자성 생쥐에게 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; G-4877, Sigma, USA) 5 IU을 복강내 주사하고 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG; CG-10, Sigma, USA) 5 IU를 복강내 주사한 후 옹성 생쥐와 합사하여 교배를 유도하였다. 다음날 질전 (vaginal plug)을 관찰하여 교

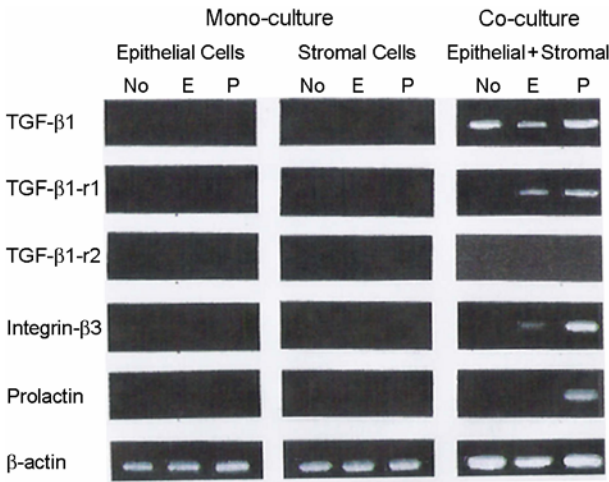
배를 확인하고, hCG 주사 후 48시간째에 경추과열법으로 생쥐를 희생시켜 난관을 적출한 후 PBS로 3회 세척 후 해부현미경하에서 2-세포기 생쥐배아를 채취하였다.

채취된 배아는 배양액에서만 배양한 배양액군을 대조구로 하여, 미리 삼차원 배양으로 탈락막화를 유도한 탈락막군, 탈락막화를 유도하지 않은 비탈락막군의 처리군에서 G1.1 (Vitrolife Inc., Gorthenburg, Sweden)과 G2.2 (Vitrolife Inc., Gorthenburg, Sweden)의 연속배양액을 이용하여 각각 50개씩의 2-세포기 생쥐배아와 72~120시간 공배양하면서 포배기의 발달율, 부화율 및 부착율을 조사하였다.



**Figure 1.** Immunohistochemical staining of endometrial epithelial and stromal cells isolated from human endometrial tissue ( $\times 200$ ). (A) Primary culture of epithelial cells presents whorled morphology. (B) Epithelial cells are cytokeratin-positive. (C) Primary culture of stromal cells shows an individual stellate pattern. (D) Stromal cells are vimentin-positive.





**Figure 2.** Expression of TGF-β1, its receptor 1, 2, integrin-β3 subunit and prolactin mRNA in the mono-culture of endometrial epithelial and stromal cells and co-culture according to three different hormone conditions. No: no hormone condition E: estrogen dominant condition P: progesterone dominant condition

### 9. 생쥐 포배기배아의 형광염색

포배기배아의 형광염색은 Thouas 등<sup>15</sup>의 differential staining법을 변형하여 내세포피와 영양막세포를 염색하였다.

#### 1) 염색액 I

1 ml Ham's F-10 + 1% Triton X 100 (T-9254, Sigma, USA) + 100 µg propidium iodide (PI, P-4170, Sigma, USA)

#### 2) 염색액 II

1 ml EtOH (absolute ethanol, Duksan, Korea) + 25 µg bisbenzimidazole (B-2883, Sigma, USA)

각 처리군에서 부화된 50개의 포배기배아를 염색액 I에서 10초 이내로 노출한 즉시 염색액 II로 옮긴 다음 4°C에서 1.5~2시간 방치하여 염색을 유도하였다. 염색이 완료된 포배를 glycerol로 옮긴 후 염색액을 제거하고 slide glass에 올린 다음 cover glass를 덮고 형광현미경에서 관찰하여 처리군별로 내세포피와 영양막세포수를 각각 조사하였다.

### 10. 통계처리

실험을 통하여 얻은 결과들은 유의성 검사를

위하여 SPSS PC version 10 프로그램을 이용하여 paired t-test를 시행하였으며, p 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 자궁내막조직으로부터 분리된 상피세포와 기질세포의 면역조직화학염색

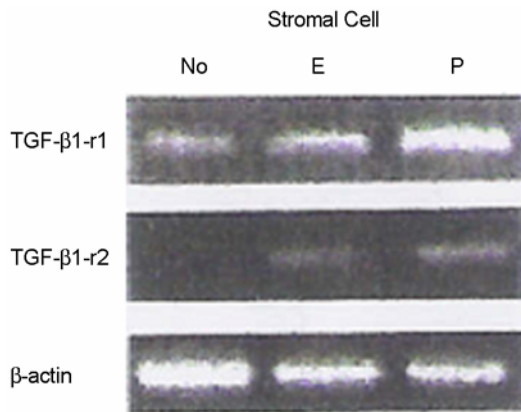
상피세포의 경우 다면체를 가진 과립세포모양을 나타내었으며, cytokeratin에 대해 95% 이상에서 형광을 발하였다. 기질세포의 경우 길쭉한 형태를 가진 섬유아세포 모양을 나타내었으며, vimentin에 대해 95% 이상에서 형광을 발하여 자궁내막조직으로부터 상피세포와 기질세포가 성공적으로 분리되었음을 알 수 있었다 (Figure 1).

### 2. 자궁내막 상피세포와 기질세포의 배양방법 및 성호르몬 환경에 따른 TGF-β1, TGF-β1 수용체 type-1, type-2, integrin-β3 및 prolactin의 mRNA 발현

단일배양에서는 성호르몬 처리와 관계없이 탈락막화 관련 모든 mRNA가 발현되지 않았다. 삼차원 공배양에서 TGF-β1은 성호르몬 처리와 관계없이 발현되었으며, TGF-β1 수용체 type-1은 progesterone 우세환경과 estrogen 우세환경에서 발현되었으나, 성호르몬 무첨가군에서는 발현되지 않았다. TGF-β1 수용체 type-2는 성호르몬에 관계없이 발현되지 않았으며 integrin-β3는 progesterone 우세환경과 estrogen 우세환경에서 발현되었고, prolactin은 progesterone 우세환경에서만 발현되었다. Progesterone 우세환경의 경우 TGF-β1 수용체 type-2를 제외한 모든 탈락막화 관련 인자 mRNA가 발현하였으며, estrogen 우세환경에서는 TGF-β1 수용체 type-2와 prolactin이 발현되지 않았다 (Figure 2).

### 3. 자궁내막 기질세포의 단일배양에 첨가한 TGF-β1이 수용체 발현에 미치는 영향

성호르몬을 첨가하여 배양된 기질세포에 TGF-β1



**Figure 3.** The expression of TGF-β1 receptor-1 (TGF-β1-r1) and -2 (TGF-β1-r2) mRNA by TGF-β1 administration. No: no hormone condition E: estrogen dominant condition P: progesterone dominant condition

을 첨가하여 배양한 결과 estrogen보다 progesterone 우세환경에서 TGF-β1 수용체 type-1과 -2 mRNA가 강하게 발현되는 것을 관찰하였다 (Figure 3).

**4. 인간 자궁내막세포의 탈락막화가 2-세포기 생쥐배아의 체외발달에 미치는 영향**

2-세포기 생쥐배아를 배양액군, 탈락막군 그리고 비탈락막군과 공배양하여 포배기의 발달율을 조사한 결과 각각 92%, 96%, 97%를 나타내어 배발달율에서는 차이가 없었으나, 부화율은 탈락막군이 92%로 배양액군 (58%)과 비탈락막군 (62%)보다 의미있게 높은 부화율을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 자궁내막세포와의 부착율도 탈락막군이 82%로 비탈락막군 (58%)보다 유의하게 높은 부착율을 보여주었다 ( $p < 0.05$ ), (Table 2).

**5. 인간 자궁내막세포의 탈락막화가 부화된 생쥐 포배기의 내세포피와 영양막세포수에 미치는 영향**

배양액군, 비탈락막군 그리고 탈락막군에서 부화된 포배기배아를 differential staining법으로 염색한 후에 세포수를 조사한 결과 내세포피수는 배양액군에서  $13.83 \pm 0.51$ 개, 비탈락막군에서  $17.97 \pm 0.4$ 개 그리고 탈락막군에서  $17.9 \pm 0.52$ 개로 탈락막화에 관계없이 공배양한 포배의 내세포피수가 배

**Table 2.** The effects of co-culture with human decidualized endometrial cell on the development of 2-cell mouse embryos

Treatment	No. of developmental stage (%)			
	2-cell	Blastocyst (%)	Hatched (%)	Attached (%)
control	50	46 (92) <sup>a</sup>	29 (58) <sup>b</sup>	-
non-d-co	50	48 (96) <sup>a</sup>	31 (62) <sup>b</sup>	29 (58) <sup>d</sup>
d-co	50	49 (97) <sup>a</sup>	46 (92) <sup>c</sup>	41 (82) <sup>e</sup>

Different superscripts in the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

control: mouse 2-cells cultured in media only, non-d-co: mouse 2-cells co-cultured with non decidualized endometrial cells, d-co: mouse 2-cells co-cultured with decidualized endometrial cells

**Table 3.** The number of inner cell mass and trophoblast of the hatched mouse blastocysts co-cultured with decidualized or non-decidualized human endometrial cells

Treatment	Cell number (Mean $\pm$ S.E)		
	ICM	TE	Total
control	$13.83 \pm 0.51$ <sup>a</sup>	$49.23 \pm 0.77$ <sup>c</sup>	$63.06 \pm 1.05$
non-d-co	$17.93 \pm 0.4$ <sup>b</sup>	$57.56 \pm 0.67$ <sup>c</sup>	$74.83 \pm 0.77$
d-co	$17.9 \pm 0.52$ <sup>b</sup>	$72.63 \pm 0.86$ <sup>d</sup>	$89.87 \pm 0.6$

Values are Mean  $\pm$  S.E. Different superscript indicates significant difference in each

Column ( $p < 0.05$ ). control: mouse 2-cells cultured in media only, non-d-co: mouse 2-cells co-cultured with non decidualized human endometrial cells, d-co: mouse 2-cells co-cultured with decidualized human endometrial cells ICM: inner cell mass, TE: trophoblast

양액 군보다 유의하게 많았으며 ( $p < 0.05$ ), 영양막세포수는 처리군 별로 각각  $49.23 \pm 0.77$ ,  $57.56 \pm 0.67$ ,  $72.63 \pm 0.86$ 개로 배양액군과 비탈락막군보다 탈락막군에서 영양막세포수가 유의하게 많았다 ( $p < 0.05$ ), (Table 3).

**고 찰**

자궁내막의 탈락막화는 자궁내막의 증식과 분화 과정을 거쳐 배아의 착상과 임신의 유지를 위해 기

질세포에 변화가 일어나며, 임신유무와 관계없이 성호르몬에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다.<sup>6,16</sup>

양질의 배아생성을 위한 공배양이나 자궁내막 수용능력 (uterine receptivity) 향상을 위한 상피세포 기능과 증식의 조절과 같은 단일세포에 대한 연구는 체외에서 잘 확립되어 있으나, 세포간의 상호작용에 대한 체외에서의 연구는 지연되어 왔는데, 그 이유는 체내와 유사한 환경을 제공할 수 있는 적절한 체외 연구 model이 개발되지 않았기 때문이다.<sup>14</sup>

Bentin 등<sup>17</sup>이 보고한 삼차원 공배양의 장점은 첫째 세포의 성장을 조절하는데 관여하는 외적요인을 규명할 수 있고, 둘째 체외에서 체내와 유사한 세포활동을 재현하여 분자수준에서 질병에 관련된 기전을 연구할 수 있는 생리학적 기초를 제공하며, 셋째 세포를 연구하고 분리할 수 있는 환경을 제공할 수 있으며, 넷째 인간의 질병과 관련된 세포와 세포, 세포와 기질 간의 상호작용에 관한 연구가 가능하게 한다는 것이다. Park 등<sup>13</sup>도 인간 자궁내막조직에서 분리한 상피세포와 기질세포를 이용한 삼차원 공배양으로 상피세포를 체내의 분비기와 유사하게 분화시켜 사용할 수 있으며, 상피세포와 기질세포의 단일배양이나 공배양환경을 만들어 줄 수 있고, 외적 상호작용에 수반되는 분자물질을 넣어주거나 빼는 것으로 세포 연구가 가능하다고 보고하였다.

이에 따라 본 연구에서도 자궁내막조직에서 상피세포와 기질세포를 분리하여 Arnold 등<sup>14</sup>과 Park 등<sup>13</sup>의 방법에 따라 기질세포를 matrigel에 embedded한 다음 상피세포를 기질세포에 부착시켜 overlay하는 방법의 삼차원 공배양과 성호르몬 우세 환경에 TGF- $\beta$ 1을 첨가하여 상피세포와 기질세포 간의 상호작용에 대한 조사를 하였다. 상피세포에서 발현되는 TGF- $\beta$ 1은 기질세포에서 발현되는 수용체 type-2와 -1에 차례로 결합한 다음 세포질 단백질인 smad-2와 -3을 인산화 시켜 smad-4와 결합한 형태로 세포핵으로 이동하여 활성화 된다.<sup>18</sup> 활성화된 TGF- $\beta$ 1은 자궁내막세포의 성장과 분화에

관여하여 분비기에 그 양이 증가하여 자궁내막 재생에 관여하는 물질로 알려져 있다.<sup>11</sup> 본 연구에서도 상피세포와 기질세포를 분리한 단일배양과 이를 재조합한 공배양에서 성호르몬 우세환경을 만들어 TGF- $\beta$ 1과 수용체 type-1, -2 mRNA의 발현을 조사하였다. 단일배양에서는 성호르몬의 조건에 관계없이 TGF- $\beta$ 1과 수용체 type-1, -2 mRNA가 모두 발현하지 않았지만 공배양에서는 성호르몬의 조건에 관계없이 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현이 관찰되었다. 이로써 단일세포의 배양에서는 성호르몬을 첨가하여도 체내환경을 조성할 수 없지만, 공배양에서 성호르몬을 첨가하면 체내와 유사하게 기질세포와 상피세포간의 상호작용이 이루어짐을 알 수 있었다. TGF- $\beta$ 1 수용체 type-1 mRNA는 progesterone과 estrogen 우세환경에서는 모두 발현하였으나 TGF- $\beta$ 1 수용체-2 mRNA는 성호르몬 환경에 관계없이 발현되지 않았는데 이는 발현양이 매우 적기 때문인 것으로 생각된다. Integrin은 세포와 기질의 ligand로써 자궁내막세포와 배아에서 발현되지만 소단위인 integrin- $\beta$ 3는 착상기에 자궁내막에서만 발현되어 자궁내막의 탈락막화 표지인자로 알려져 있다.<sup>19</sup> 본 연구에서 integrin- $\beta$ 3의 발현을 조사한 결과 단일배양에서는 integrin- $\beta$ 3 mRNA가 발현되지 않았지만, 공배양의 성호르몬 우세환경에서는 발현되었는데 progesterone 우세환경에서 더 강하게 발현되었다. 이러한 결과 역시 체외에서 공배양한 상피세포와 기질세포에 성호르몬을 첨가하면 두 세포가 상호작용하여 분비기의 자궁내막과 유사하게 작용함을 시사한다. 또한 progesterone 의존성 탈락막화 표지인자인 prolactin의 발현에 대한 조사에서도 단일배양에서는 성호르몬의 조건에 관계없이 발현되지 않았지만, 공배양의 progesterone 우세 환경에서는 prolactin mRNA가 발현되어 체외에서 체내와 유사한 세포간의 상호작용을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 공배양에서 성호르몬 첨가에도 불구하고 TGF- $\beta$ 1 수용체 type-2가 발현되지 않았는데 Kim 등<sup>12</sup>과 Park 등<sup>13</sup>은 상피세포와 기질세



포의 공배양에 progesterone 우세환경을 조성하여 TGF- $\beta$ 1을 첨가할 경우 TGF- $\beta$ 1이 기질세포에 직접 작용하여 수용체 type-2를 발현시켜 탈락막화를 유도할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 기질세포 단일배양에 progesterone 우세환경을 조성하여 TGF- $\beta$ 1을 첨가한 결과 TGF- $\beta$ 1 수용체 type-1과 -2가 발현되는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 분리된 기질세포와 상피세포를 삼차원 공배양으로 재조합하고 progesterone 우세환경을 조성하여 TGF- $\beta$ 1을 첨가할 경우 체외에서 자궁내막세포의 탈락막화를 유도할 수 있다는 것을 말하여 준다.

인간의 체외수정 시술에서 난관상피세포나 자궁내막세포와 난자를 공배양하는 이유는 난자의 성숙을 유도하고 정자의 활동성을 향상시켜 수정율과 배아의 발생율을 높이기 때문이다.<sup>20,21</sup> 또한, 공배양법은 체내와 유사한 환경을 조성하여 배아의 체외발생을 향상시킴으로써 임신율을 향상시키는 방법의 일종이다.<sup>22,23</sup> 그러나 이러한 난자와 체세포의 공배양에 이용된 세포는 단일배양만으로 체내의 환경을 재현했다고 보기는 어렵고, 단지 수정된 난자의 체외배양시 발생하는 'cell block' 현상을 극복하여 체외발생율을 높이는 데에만 국한되었다. 따라서 본 연구에서는 2-세포기 생쥐배아를 배양액만을 이용한 단독배양, 탈락막화가 유도되지 않은 자궁내막세포와의 공배양 (비탈락막군) 그리고 탈락막화를 유도한 자궁내막세포와의 공배양 (탈락막군)을 비교하여 포배기까지의 발달율, 부화율, 부착율을 조사하였다. 포배기까지의 발달율은 단독배양과 공배양에서 차이를 보이지 않았는데 그 이유는 배아의 발달단계별 대사에 적합한 에너지원과 단백질원,<sup>24-28</sup> 배양액에 포함되어 있는 금속이온의 독성을 중화하는 chelator,<sup>29</sup> 난자의 대사과정에서 발생하는 활성 산소 (reactive oxygen species)를 중화시키는 항산화제 (anti-oxidant) 등<sup>30-32</sup>이 첨가된 배양액이 잘 개발되어 있기 때문인 것으로 생각되며, 또한 포배형성에 탈락막화가 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 사료된다. 부화율에서는 자궁내막세포의 탈락막화에 상관없이 공배양이 단독배양보다

의미 있게 높은 부화율을 나타내었는데, 이는 투명대 경화의 차이인 것으로 생각되나 이를 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

2-세포기 생쥐배아를 비탈락막군 및 탈락막군과 공배양하여 부화된 포배의 부착율을 조사한 결과 탈락막군에서 유의하게 높은 부착율을 나타내어 포배기배아의 영양막세포수와 영양막에서 분비되는 싸이토카인의 차이에 기인한 것으로 생각되나,<sup>33-37</sup> 이를 확인하기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 비탈락막군에서 투명대를 완전히 빠져나오지 않은 상태로 부착된 다수의 포배가 관찰되었는데, 이러한 현상이 투명대경화 때문인지 자궁내막세포의 비탈락막화에 의한 영향 때문인지는 알 수 없다.

착상율을 높일 수 있는 양질의 포배기를 구별하는 지표로는 포배기까지의 발달 속도,<sup>38</sup> 내세포피의 크기와 모양,<sup>39</sup> 영양막과 내세포피의 세포수 등<sup>40</sup>이 있으나 연구자마다 많은 이견을 보이고 있다. 본 연구에서는 배양액군과 처리군별로 영양막세포수와 내세포피 세포수를 각각 비교한 결과, 내세포피 수는 배양액군 보다 탈락막군 ( $17.9 \pm 0.52$ )과 비탈락막군 ( $17.93 \pm 0.4$ )의 포배에서 유의하게 많았으며, 영양막세포수는 배양액군과 비탈락막군보다 탈락막군 ( $72.63 \pm 0.86$ )에서 공배양한 포배의 영양막세포수가 유의하게 많은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 자궁내막조직에서 상피세포와 기질세포를 분리한 후 이를 다시 삼차원적으로 공배양하여 성호르몬을 첨가하면 체내와 유사한 환경이 조성되어 탈락막화 표지인자인 prolactin, integrin- $\beta$ 3 등이 발현되어 체외에서도 체내와 유사한 환경을 만들 수 있으며, progesterone 우세환경을 조성하여 TGF- $\beta$ 1을 첨가하면 기질세포에서 수용체가 발현되어 TGF- $\beta$ 1이 활성화됨으로써 인위적으로 탈락막화를 유도할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 자궁내막세포와 2-세포기 생쥐배아와의 공배양에서 자궁내막세포의 탈락막화는 포배형성에는 영향을 미치지 않았으나, 부화율과 세포

수를 유의하게 증가시키는 결과를 얻어 양질의 포배를 발생시키기 위해서는 자궁내막세포의 탈락막화가 이루어져야 함을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 결과는 삼차원 공배양 자체가 생쥐 포배기 배아의 부화율과 부착율을 증가시킨다는 것이 아니며, 이를 확인하기 위해서는 자궁내막조직으로부터 상피세포와 기질세포를 분리하지 않고 단일 세포층을 만들어 탈락막화를 유도한 이차원 공배양과 생쥐배아와의 공배양한 결과와 비교하는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, 삼차원 공배양은 체외에서 체내와 유사한 환경을 만드는데 유용한 방법이 될 수 있으며 체내에서 일어나는 현상을 체외에서 실현하여 관찰할 수 있게 하여 착상부전, 원인불명의 불임 및 세포와 세포간의 상호작용에 대한 연구의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Finn CA. The biology of decidual cells. *Adv Reprod Physiol* 1971; 5: 1-26.
2. Hewitt K, Beer AE, Grinnell E. Disappearance of amnionic sites from the surface of the rat endometrial epithelium at the time of blastocyst implantation. *Biol Reprod* 1979; 21: 691-707.
3. Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, et al. Trophinin and fasin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995; 9: 1199-210.
4. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, et al. Uterine pinopodes as marker of the nidation window in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Human Reprod* 1995; 10: 1208-13.
5. Martel D, Frydman R, Glissant M, Maggioni C, Roche D, Psychoyos A. Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol* 1987; 114: 319-24.
6. Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; 141: 3510-3.
7. Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vivo model for decidualization. *Fertil Steril* 1989; 52: 761-8.
8. Tang B, Guller S, Gurside E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 1993; 133: 2197-203.
9. Tang B, Grupide E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 47: 115-21.
10. Frank GR, Brar AK, Cendars MI, Handwerger S. Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances human endometrial cell differentiation. *Endocrinology* 1994; 134: 258-63.
11. Ando N, Hirahara F, Fukushima J, Kawamoto S, Okuda K, Funabashi T, et al. Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 48-56.
12. Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta 1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signaling in stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 801-8.
13. 박동욱, 최동순, 김미란, 황경주, 조미영, 안성희 등. 인간 자궁내막의 탈락막화 (Decidualization)에 있어서 TGF-β (Transforming Growth Factor-β)의 역할. *대한불임학회지* 2003; 30: 65-75.
14. Arnold JT, Kaufman PG, Seppälä M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth factor in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 2001; 16: 836-45.
15. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified techniques for differential staining of inner cell mass and trophoblast cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Bio Med Online* 2001; 3: 25-9.
16. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122: 262-3.
17. Bentin-Ley U, Pederson B, Lindenberg S, Larsen JF, Hamberger L, Horn T. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 327-32.
18. Rotraud W. The transforming growth factor-beta signaling

- pathway in tumorigenesis. *Current opinion in Oncology* 2001; 13: 70-7.
19. Lessey BA, Castebaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000; 73: 779-87.
  20. Takeuchi K, Maruyama I, Yamamoto S, Oki T, Nagata Y. Isolation and monolayer culture of human fallopian tube epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27: 720-4.
  21. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co-culture. *Fertil Steril* 1992; 58: 569-74.
  22. Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam SS. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989b; 4: 706-13.
  23. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S. Improved fertilization rates of human oocytes in co-culture. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991; 8: 216-21.
  24. Barnett DK, Bavister BD. Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? *Hum Reprod* 1996; 11: 177-83.
  25. Seshagiri PB, Bavister B. Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40: 607-14.
  26. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem J* 1929; 23: 536-45.
  27. Koobs DH. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 1972; 178: 127-33.
  28. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
  29. Caro CM, Trounson A. Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization using a chemically defined culture medium containing no protein. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3: 215-7.
  30. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 125-31.
  31. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 356-60.
  32. Legge M, Sellens MH. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* 1991; 6: 867-71.
  33. Bischof P, Campana A. A model for implantation of human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 262-70.
  34. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, Frances A, Garcia Velasco J, Remohi J, et al. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996; 6: 405-24.
  35. Tamada H, Das SK, Andrews GK, Dey SK. Cell-type-specific expression of transforming growth factor- $\alpha$  in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 1991; 45: 365-72.
  36. Librach CL, Feigenbaum SI, Bass KE. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269: 7125-31.
  37. Lessey BA, Arnold JT, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, et al. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 105-16.
  38. Iwasaki S, Mizuno J, Kobayashi K, Yoshikane Y, Hayashi T. Changes in morphology and cell number of inner cell mass of porcine blastocysts during freezing. *Theriogenology* 1994; 42: 841-8.
  39. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001; 76: 1157-67.
  40. Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 1988; 102: 793-803.

## = 국문초록 =

**목적:** 자궁내막조직에서 분리한 상피세포와 기질세포를 삼차원 공배양을 통한 탈락막화 유도에서 성호르몬과 TGF- $\beta$ 1의 역할을 알아보고 2-세포기 생쥐배아와 탈락막화가 유도된 자궁내막세포와의 공배양을 통하여 포배형성율, 부화율, 포배기배아의 내세포괴와 영양막세포수 및 부착율을 알아보기 위해 시행되었다.

**연구방법:** 인간 자궁내막조직에서 분리된 기질세포와 상피세포의 표지인자인 cytokeatin과 vimentin에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 분리를 확인하였으며, 성호르몬 우세환경 (progesterone, estrogen)에서 분리된 세포를 단일배양 혹은 3차원 공배양을 통하여 RT-PCR법으로 TGF- $\beta$ 1, 수용체-1, -2, integrin- $\beta$ 3, prolactin의 발현을 조사하였다. 배양액군을 대조군으로 하여 2-세포기 생쥐배아와 탈락막화 유도와 유도하지 않은 인간 자궁내막세포와의 공배양을 통하여 포배형성율, 부화율, 부착율과 부화된 포배의 영양막세포와 내세포괴수를 비교하였다.

**결과:** 상피세포 표지인자인 cytokeatin과 기질세포 표지인자인 vimentin을 이용하여 면역조직화학염색을 한 결과 각각 95% 이상에서 양성반응을 나타내어 자궁내막조직으로부터 상피세포와 기질세포가 성공적으로 분리되었음을 확인하였다. 분리된 상피세포와 기질세포를 단일배양에서는 성호르몬의 조건에 관계없이 TGF- $\beta$ 1과 수용체 type-1, type-2, integrin- $\beta$ 3, prolactin mRNA가 발현되지 않았다. 공배양에서는 progesterone 우세환경일 경우 TGF- $\beta$ 1 수용체 type-2를 제외한 모든 mRNA가 발현하였으나 estrogen 우세환경에서는 TGF- $\beta$ 1 수용체 type-2와 prolactin이 발현되지 않았다. 2-세포기 생쥐배아를 배양액군, 비탈락막군 및 탈락막군으로 나누어 공배양하였을 때 포배기 발달율은 차이가 없었으나 부화율 (92%)과 부착율 (82%)은 탈락막군이 유의하게 높았으며 ( $p < 0.05$ ), 비탈락막군의 공배양에서 다수의 영양막세포가 투명대를 완전히 빠져나오지 않은 상태로 부착한 비정상형태를 보였다. 부화된 생쥐 포배기배아의 내세포괴수는 탈락막화에 관계없이 공배양한 포배의 내세포괴수가 유의하게 많았으며 ( $p < 0.05$ ), 영양막세포수는 탈락막군에서 배양액군과 비탈락막군보다 유의하게 많았다 ( $p < 0.05$ ).

**결론:** 자궁내막조직에서 상피세포와 기질세포를 분리하여 다시 삼차원적 공배양을 통하여 progesterone (100 nM), estrogen (1 nM)과 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)을 첨가하면 체외에서 탈락막화를 유도할 수 있으며, 탈락막화를 유도한 자궁내막세포와 2-세포기 생쥐배아를 공배양하였을 때 탈락막화가 부화율, 부착율 및 영양막세포수에 유효한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

**중심단어:** 탈락막화, TGF- $\beta$ 1, 공배양, Progesterone, RT-PCR