Reprod Dev Biol 39(3) : 49-57 (2015)
http://dx.doi.org/10.12749/RDB.2015.39.3.49

ISSN : 1738-2432 (Print)
ISSN : 2288-0151 (Online)

돼지 자궁내막 상피세포와 공동배양된 Collagen Matrix Gel을 이용한 체외수정란 배양체계 확립

이상희[1] · 한혜인[1] · 황보용[1] · 이승형[1] · 정희태[2] · 양부근[1] · 박춘근[1,†]

[1]강원대학교 동물생명과학대학, [2]강원대학교 수의과대학

Establishment of Embryo Culture System using Co-incubated Collagen Matrix Gel with Porcine Endometrial Cells

Sang-Hee Lee[1], Hye-In Han[1], Yong Hwangbo[1], Seunghyung Lee[1], Hee-Tae Cheong[2], Boo-Keun Yang[1] and Choon-Keun Park[1,†]

[1]*College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

[2]*College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

ABSTRACT

In order to achieve successful *in vitro* production of embryo, it is necessary to establish intrauterine environment during *in vitro* culture. Thus, this study was investigated to establish embryo culture system using co-incubated collagen matrix gel (CM) with endometrial epithelial cells (EC). Endometrial epithelial cells were isolated from porcine endometrium at follicular phase, the cells seeded in insert dish for co-incubation with CM-coated culture dish. Then, culture media treated with/without 2.0 IU/ml hCG or 10 ng/ml IL-1β. After incubation for 24 h, the co-incubated insert dishes were removed from CM-coated culture dish before embryo culture. Embryos at 48 h after *in vitro* fertilization (IVF) were cultured on the dish for 120 h with porcine zygote medium. We determined *PTGS-2* expression in the ECs, VEGF protein in co-incubated CM with EC and observed cleavage rate and blastocyst development of embryos at 168 h after IVF. In result, expression of *PTGS-2* was higher at co-incubated EC with hCG and IL-1β groups than EC without hCG and IL-1β. The VEGF protein was detected at co-incubated CM with EC, EC treated with hCG and IL-1β groups higher than CM group. Also, cleavage rate was no significantly difference among all group, however, blastocyst development was significantly higher in co-incubated CM with EC treated with hCG group than un-treated groups ($p<0.05$). Therefore, we suggest that novel embryo culture system using co-incubated collagen matrix gel with endometrial epithelial cells treated with IL-1β is beneficial and useful for enhancing the production of porcine blastocysts *in vitro*.

(Key words : Endometrial epithelial cells, Co-incubation, Collagen matrix gel, *In vitro* fertilization, Pigs)

서 론

체외수정은 체내에서 생산하기 힘든 수정란을 체외에서 생산하는 기술을 말하며, 체내수정란 생산에 비하여 시간과 장소에 대한 제약을 받지 않는 장점 때문에 불임 치료(Cobo 등, 2012)와 같은 치료의 목적으로도 이용할 수 있으며, 생명공학 기법을 이용하여 형질전환 동물을 생산하기 위해 이용된다. 체외수정은 이미 쥐(Tsunoda 등, 2012), 양(Fidanza 등, 2014), 돼지(Tanihara 등, 2013) 및 소(Sugimura 등, 2012) 등 다양한 동물에서 연구가 이루어지고 있지만, pH, 온도, 불안정한 대기 조성, 활성산소의 생성 및 체내 환경과는 다른 다양한 물리 화학적 작용에 의해 체내에서 생산되는 수정란에 비해 생산 효율이 낮은 단점이 있다(Van Loendersloot 등, 2010). 이러한 단점을 보완하기 위하여 체외 수정란 배양에 이용되는 배양액에 항산화제

* This research was supported by Bio-industry Technology Development Program (IPET31060-05-1-CG000), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

† Corresponding author : Phone: +82-33-252-8689, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

및 비타민을 첨가(Gupta 등, 2010; Tareq 등, 2012)하거나, 수정란이 발달하는 체내 환경을 구현하기 위해 난관상피세포와 함께 공동배양하여 수정란 생산 효율을 증진시키는 연구(Bui 등, 2012)가 진행되고 있다. 하지만, 이 역시 체내에서 생산되는 수정란에 비해 효율이 많이 떨어지는 실정이다.

일반적으로 성숙되어 배란된 난자와 정자는 난관 팽대부에서 수정이 이뤄진 다음 24~96시간 후에 자궁으로 이동하며, 이 때의 수정란은 8~16세포기의 형태를 띤다(Hancock, 1961). 배란된 난포에서는 황체가 형성되어 자궁내막 증식(Baker 등, 1998; McNeill 등, 2006) 및 혈관신생작용(Demir 등, 2010)과 같은 자궁의 생리학적 변화에 영향을 미치며, 자궁내막에서는 수정란의 발달, 착상 및 초기 태아의 성장에 필수적인 물질들을 분비한다(Tarraf와 Knight, 1995).

Interleukin-1 beta(IL-1β)는 발정 주기에 따른 자궁 변화에 영향을 미치는 물질 중 하나로, 자궁내막에 존재하는 수용체인 interleukin-1 receptor(IL-1R)와 결합하여 자궁환경을 조절하며, Lutealizing hormone receptor(LHR)와 결합하는 LH는 황체의 형성 및 prostaglandins(PGs) 합성에 관여한다(Burton 등, 2007; Herrler 등, 2003). 또한 LHR를 공유하는 human chorionic gonadotropin(hCG)은 생체 내에서 LH와 같은 역할을 하기 때문에, 발정 및 배란 조절에 이용된다(Ziecik 등, 2007). 이러한 물질들은 돼지의 발정주기 중 황체가 자라나는 시기에 많이 발현되어 자궁의 구조를 변화시키기 때문에, 수정란의 착상과 임신에 있어 필수적인 물질로 알려져 있다(Fadhillah 등, 2014; Sugino, 2014).

세포 외 기질(Extracellular matrix; ECM) 물질 중 하나인 collagen type I matrix gel(CM)은 돼지 힘줄로부터 유래되었으며, 높은 강도를 가지고 있다. 또한 높은 생체적합성 및 생물분해성에 의해 조직공학 분야에서 많이 이용되고 있다(Jugdutt, 2003; Koláčná 등, 2007). 실제로 CM은 세포의 3차원 배양 연구에도 많이 이용되며(Khan 등, 2013), 이러한 특징을 이용하여 자궁세포 단일배양 및 자궁세포 공동배양으로 인한 세포 분비물질 연구(Tanaka 등, 2003), ECM과 자궁세포 사이의 세포 기작에 대한 연구(차혜진 등, 2013) 및 다른 종류의 세포를 공동배양하여 분화를 조절하는 물질로써 이용(Watt와 Huck, 2013)되지만, 수정란 배양에 적용한 연구는 미미한 실정이다.

ECM은 성장인자를 함유할 수 있는 물질(Park 등, 1993)로 잘 알려져 있다. 성장인자 중 하나인 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 혈관신생이 활발히 일어나는 황체기 시기의 자궁에서 많이 분비(Ferrara와 Davis-Smyth, 1997; Risau, 1997)되며, 초기 수정란 발달에 좋은 영향을 미친다는 보고가 있다(Biswas 등, 2011). 또한 ECM 종류 중 하나인 collagen type I은 VEGF와 결합할 수 있다는 특징을 갖고 있다(Gao 등, 2011).

우리의 이전 연구에서는 CM안에 돼지 자궁내막 간질세포를 3차원으로 배양한 후, 그 위에 자궁내막 상피세포를 배양하여 자궁내막의 환경을 구현하여 수정란을 배양하였지만, 자궁내막 세포들의 성장을 위해 CM 안에 첨가된 fetal bovine serum(FBS)과 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12(D/F12)가 자궁내막세포들을 성장시키기에는 적합한 요소들이었지만, 수정란 발달에는 좋지 않은 영향을 미쳤다(이상희 등, 2014).

이전 연구에서 3차원 공동배양된 자궁내막 상피 및 간질세포들의 배양액 조건이 돼지 수정란 배양환경과 다르다는 문제점을 해결하기 위하여, ECM 중 하나인 CM을 자궁내막 상피세포와 공동 배양하여 세포 배양액을 회수한 후, 돼지 자궁내막에서 분비되는 성장물질들과 결합된 CM만을 이용하여 체외 수정란이 발달할 수 있는 환경에서 공동배양을 통해 앞선 연구에서의 문제점을 해결할 수 있을 것이라 생각된다. 따라서 본 연구의 목적은 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM을 이용하여 돼지 체외 수정란 생산 시스템을 확립하는데 있다.

재료 및 방법

자궁내막세포의 분리 및 배양

돼지자궁은 인근 도축장에서 채취하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였고, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)를 이용하여 자궁 외부와 내부를 세척하였다. 그 후 자궁각 부분을 절개하여 상피층을 긁어 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Invitrogen, Eugene, OR, USA)에 회수하였다. 회수된 샘플에서 세포를 분리하기 위하여 collagenase Ⅳ(Worthington, USA)를 66U/ml의 농도로 첨가하여 1시간 동안 진탕 배양 후 70 μm cell strainer (SPL, Korea)를 이용하여 세포를 걸러낸 뒤 1,200 rpm에서 4분동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 혈액성분을 제거하기 위하여 Tris-NH_4를 첨가 후, HBSS로 세척하고 DMEM과 Ham's F-12가 1:1로 섞인 D/F12(Invitrogen) 배양액에 10% fetal bovine serum(FBS; Invitrogen), 0.2% amphotericin B(Sigma, St. Luois, MO, USA) 및 0.5% Antibiotic-Antimycotic(ABAM; Invitrogen)을 첨가하여 39℃, 5% CO_2 조건에서 세포를 배양하였다.

실험설계

실험 1

hCG 및 IL-1β가 함유된 세포 배양액으로 돼지 자궁내막 상피세포와 Collagen type I matrix gel(CM; Cellmatrix Type I-A, Nitta Gelatin Inc., Japan)를 48시간 동안 공동 배양한 후, hCG와 IL-1β의 첨가에 따른 자궁내막 상피세포에서의 *PTGS-2* mRNA의 발현양상과 CM에 존재하는 VEGF 단백질을 분석하여, hCG와 IL-1β의 영향을 받은 돼지 자궁내막 상피세포와 공동배양 된 CM의 특성을 분석하였다.

실험 2

실험 1에서 hCG 및 IL-1β가 함유된 세포 배양액으로 공동 배양된 돼지 자궁내막 상피세포와 CM에서 자궁내막 상피세포만을 제거한 뒤, 체외 수정 후 48시간이 지난 수정란을 CM 위에서 수정란 전용 배양액을 이용하여 144시간 동안 배양하여, 수정란의 체외 발달률 및 배반포 형성률을 관찰하였다.

체외수정란 생산

도축장으로부터 채취한 난소에서 2~6mm 직경의 난포로부터 18-gauge 주사기를 이용하여 미성숙 난자를 채취하였다. 미성숙 난자는 Tissue Culture Medium-199(TCM-199, Invitrogen)에 10% porcine follicle fluid(pFF), 5 μg/ml LH, 0.5 μg/ml FSH, 10 IU/ml hCG 및 0.01 μg/ml EGF를 포함한 배양액을 이용하여 22시간 동안 성숙 배양하였다. TCM-199에 10% pFF와 0.01 μg/ml EGF를 첨가한 배양액을 이용해 22시간 동안 배양하였으며, 모든 배양은 39℃, 5% CO_2 환경에서 진행되었다.

44시간 동안 성숙배양 마친 후 modified tris buffer medium(mTBM; NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 7.5 mM, Glucose 11 mM, Pyruvic acid 5 mM, L-cysteine 0.57 mM, Tris 20 mM, Penicillin G 20 mM, Streptomycin sulfate 3.4 mM)에 0.1% hyaluronidase가 첨가된 배양액을 이용하여 확장된 난구세포를 제거하여, 2 mg/ml BSA(Sigma, USA)가 포함된 mTBM 배양액 성숙된 난자를 옮겼다. 체외 수정에 사용된 정액은 음경 수압법을 이용하여 채취하여 실험실로 운반 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 정장액을 제거하고 Modena B (glucose 30.0 g/l, EDTA 2.25 g/l, sodium citrate 2.50 g/l, sodium bicarbonate 1.00 g/l, tris 5.00 g/l, citric acid 2.50 g/l, cysteine 0.05 g/l, gentamicin sulfate 0.30 g/l)를 이용하여 1,500rpm, 5분 조건으로 2회 세척하였다. 세척된 정자는 4 mg/ml caffeine와 4 mg/ml BSA(Sigma)가 첨가된 mTBM 배양액에 정자를 희석하였으며, 최종적으로 3.0×10^5개/ml의 정자를 난자와 체외 수정에 이용하였다. 체외수정 6시간 후 수정된 난자의 난구세포와 정자를 제거한 후 3 mg/ml BSA가 첨가된 Porcine Zygote Medium-3 (PZM-3; NaCl 108 mM, KCl 10.00 mM, KH_2PO_4 0.35 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.40 mM, $NaHCO_3$ 25.07 mM, Glutamine 1 mM, Ca-$(lactate)_2 \cdot 5H_2O$ 2 mM, Hypotaurine 5 mM, Gentamicin sulfate 0.05 mg/ml, Basal Medium Eagle Amino Acid, MEM)에 3 mg/ml BSA(Sigma) 첨가된 배양액으로 48시간 동안 배양한 수정란 만을 실험에 이용하였다.

Conditioned collagen matrix 제작

모든 실험은 24 well dish(SPL, Koera)에서 진행되었으며, ECM 중 하나인 collagen type I matrix gel(Nitta Gelatin Inc.)를 이용하여 자궁내막 상피세포에서 분비되는 물질들을 결합하기 위한 도구로 사용하였다. 액체상태의 CM을 0.05 N NaOH, 2.2% $NaHCO_3$, 200 mM HEPES를 혼합한 buffer와 4:1로 혼합하여 배양 용기 바닥에 200 μl 분주하였으며, 39℃ 환경에서 20분간 배양하여 굳혔다.

체외수정란 배양

자궁내막 상피세포를 Membrane pore size 0.4 μm이며, diameter가 6.5 mm인 insert dish(SPL)에 5.0×10^5개/ml로 분주하여 D/F12에 10%의 FBS를 첨가한 배양액으로 39℃, 5% CO_2 환경에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고, 위의 배양액으로 2회 세척한 뒤 CM에 자궁내막 상피세포가 들어있는 insert dish를 옮긴 뒤 배양액에 2.0 IU/ml hCG 및 10 ng/ml IL-1β를 첨가하여 39℃, 5% CO_2 환경에서 48시간 공동 배양하였다. 이후 돼지 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM만을 체외수정 배양에 사용하기 위하여 insert dish와 배양액을 제거한 후, 수정란 전용 배양액인 PZM-3로 3회 이상 세척하였다. 그 후 paraffin oil을 덮어주어 39℃, 5% CO_2 환경에서 3시간 동안 평형한 후, 체외 수정 후 48시간 때의 수정란을 옮겨주었다. 이 후 144시간 동안 배양하였으며, 수정 후 192시간 때의 수정란의 분할률과 배반포 형성률을 현미경하에서 관찰하였다.

Quantitative RT-PCR

Insert dish 안에서 2.0 IU/ml hCG 및 10 ng/ml IL-1β의 첨가된 배양액을 이용하여 배양된 돼지 자궁내막 상피세포를 회수하여 trizol법을 이용하여 RNA를 추출하였다. 회수된 세포에 RNAiso plus(TAKARA, Japan)를 첨가하여 50분 동안 교반한 뒤, chloroform을 첨가하여 5분 동안 교반한 후 4℃, 12,000 rpm 조건 하에 5분 동안 원심분리 후 RNA 층만을 분리하였다. Isopropyl alcohol을 첨가 후 교반한 뒤 4℃, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 제거한 후 건조하였다. RNA의 농도를 측정하기 위해 DEPC-DW와 혼합한 뒤 Nano drop 200 (Thermo, USA)을 이용하여 농도를 측정하였다. Reverse transcription kit를 이용하여, mRNA는 cDNA로 합성하였으며, Table 1에 제시한 *PTGS-2*와 β-actin의 primer의 조건을 참고하여 유전자를 증폭한 후 Ethidium bromide (EtBr; Bioneer, Korea)을 포함한 2% Agarose gel을 사용하여 전기영동한 뒤, UV로 발현되는 유전자를 측정하였다. 유전자 band는 imageJ 프로그램을 이용하여 수치화한 후 β-actin를 이용하여 일반화 시킨 뒤 처리구간 변화되는 양을 비교하였다.

Western blotting

자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM에 결합된 VEGF 단백질을 측정하기 위해 western blotting 기법을 이용하

Table 1. Primer conditions of PCR

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Tem.(℃)	Cycles
PTGS-2	F: TCGACCAGAGCAGAGAGATGAGAT R: ACCATAGAGCGCTTCTAACTCTGC	134	60	40
β-actin	F: AAATGGGCACGTTGTGGGTG R: AGGCCAACCGGGAGAAGATG	159	60	40

였다. 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM을 회수하기 위하여, 배양 용기 내에 붙어있는 CM은 PBS로 3회 이상 세척한 후 CM만을 피펫을 이용하여 수집하였다. 배양 용기 밑에 붙어 있는 200 μl의 CM에 M-PER buffer(Thermo, USA)를 첨가하고 초음파 분쇄법을 이용해 파쇄한 뒤 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액만을 이용하였다. 이후 12% SDS-PAGE를 이용하여 80V 15분, 140V에서 50분 동안 전기영동한 뒤, Polyvinylidene fluoride membrane (PVDF)을 이용하여 150V에서 60분 동안 transfer 과정을 거쳤다. 이후 5% skim milk가 함유된 Tris-buffered saline/ Tween-20(TBST)로 1시간 동안 blocking 과정을 실시한 뒤 TBST로 15분간 3회 세척한 후 5% skim milk가 함유된 TBST에 1:500으로 희석된 rabbit-anti-vascular endothelial growth factor D IgG(VEGF-D; sc-25784, Santa cruz biotechnology, USA)를 이용하여 4℃에서 overnight 한 후 15분간 3회 세척하였다. 이 후 1:2,000으로 희석된 Goat-anti-Rabbit IgG-HRP(sc-2030)을 이용하여 2시간 동안 반응시킨 다음 TBST로 15분간 3회 세척하였다. 이후 WEST SAVE Kit를 이용하여 발광시킨 뒤 chemidoc을 이용하여 단백질 발현을 관찰한 후 imageJ를 이용하여 수치화 하였으며, 처리구간 발현되는 양을 비교하기 위해 rabbit-anti-β-actin IgG(NB600-503, Novus Biologicals, 1:500)와 Goat-anti-Rabbit IgG-HRP(1:2,000)를 이용하여 β-actin 측정한 뒤 일반화 시킨 뒤 처리구간 변화되는 단백질 양을 비교하였다. CM 내 정상적으로 VEGF가 결합되는 것을 확인하기 위해, 돼지 자궁내막 상피세포와 조직에서 VEGF의 발현 유무를 측정하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.3을 이용하여 최소 유의차 검정과 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 $p<0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

결 과

자궁내막 상피세포에서 황체기 시기 발현되는 유전물질 발현 확인

Fig. 2는 hCG와 IL-1β가 돼지 자궁내막 상피세포 *PTGS-2*의 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다. 대조

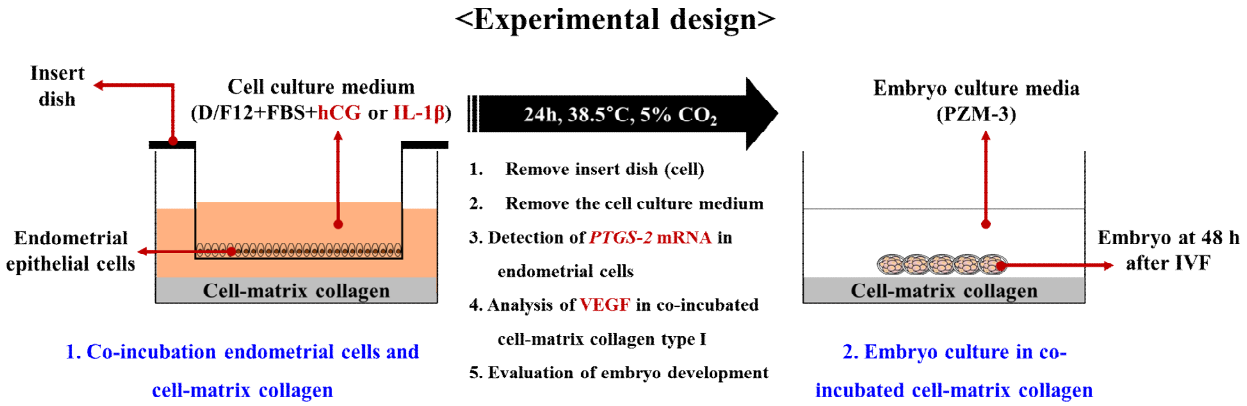

Fig. 1. Experimental design.

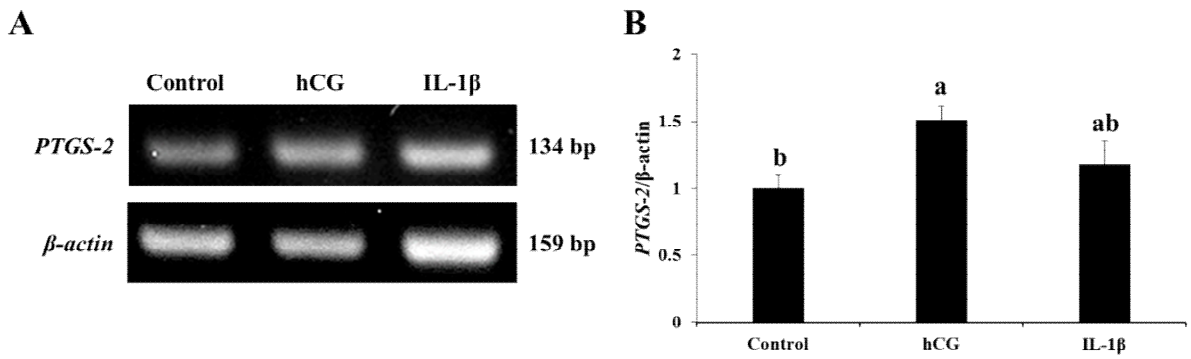

Fig. 2. Expression of *PTGS-2* mRNA in endometrial epithelial cells treated with hCG and IL-1β (A) and relative expression (B), Endometrial cells (Control) were exposed 2.0 IU/ml hCG (EC+hCG) and 10 ng/ml IL-1β (EC+IL-1β) for 24 hours. n=3, [a,b] Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

구에 비하여 처리구에서 *PTGS-2* 발현량이 증가한 것을 확인하였으며(Fig. 1A), 수치화한 결과, hCG 처리구에서 다른 처리구에 비하여 유의적으로 증가하였다. 따라서 hCG와 IL-1β는 자궁내막 상피세포의 *PTGS-2* mRNA를 증가시키는 것을 확인하였다.

자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM에 결합된 VEGF 단백질 확인

돼지 자궁내막 상피세포(EC)와 공동배양된 CM에 결합된 VEGF 단백질을 western blotting 기법을 이용하여 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 자궁내막 상피세포와 공동배양되지 않은 처리구(CM)에서는 VEGF가 결합되지 않아 발현되지 않는 것을 확인하였으며, 자궁내막 상피세포와 함께 공동배양된 CM에서는 VEGF가 정상적으로 결합하여 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 CM에 결합된 VEGF 단백질은 자궁내막 상피세포(cells)와 조직(ET)에서 발현되는 VEGF와 같은 단백질로 확인되었기 때문에, 자궁내막 상피세포 및 조직의 VEGF는 CM과 결합되는 것을 확인하였다. hCG와 IL-1β 처리된 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM에서의 VEGF 단백질이 결합되는 양을 비교해 본 결과, hCG와 IL-1β를 처리한 그룹에서 증가하는 경향을 보였지만, 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

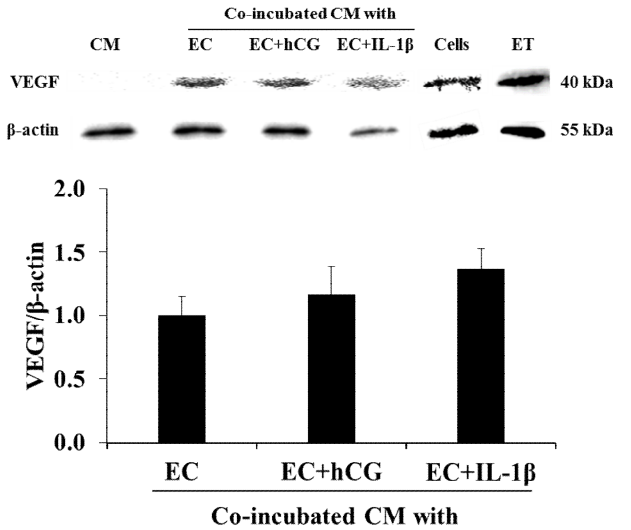

Fig. 3. Expression of VEGF in co-incubated cell-matrix collagen type I (CM) with porcine endometrial epithelial cells (EC), CMs were co-incubated with or without EC treated with hCG and IL-1 β; positive controls were used porcine endometrial epithelial cells (Cells) and endometrium tissue (ET).

체외수정 능력 검증

hCG와 IL-1β가 처리한 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM을 이용하여 수정 후 48시간 때의 체외 수정란 발달을 검증한 결과를 Table 2에 나타내었다. 또한 자궁내막 상피세포와 공동 배양되지 않은 CM 위에서 배양된 수정란의 발달률에 대한 결과를 CM으로 나타내어 대조구로 이용하였으며, hCG와 IL-1β를 처리하지 않은 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM을 이용하여 처리구의 결과는 EC로 나타내어 처리구에 대한 능력을 검증하였다. 그 결과, 수정 후 196시간 후의 체외 수정란 분할률의 차이는 처리구간 유의적인 차이가 없었으나, CM과 EC처리구에 비하여, hCG와 IL-1β를 첨가한 처리구(EC+hCG 및 EC+IL-1β) 배반포 형성률이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 CM처리구에 비해, EC+IL-1β 처리구에서 배반포 형성률이 유의적으로 증가하였다(p<0.05).

고 찰

생체내의 변화를 알아보기 위해(세포의 활발한 증식으로 인한-제거) 세포의 확보가 용이한 2차원 세포 배양 시스템을 구현하여 세포 기작을 연구하는 방법을 많이 사용한다. 하지만 이러한 방법은 *in vivo* 상태에서의 세포의

Table 2. *In vitro* development of porcine oocyte at 168 h after *in vitro* fertilization (IVF) using co-incubated collagen matrix gel with endometrial epithelial cells

Treatment		No. of oocytes in IVF	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)	
				≧2 cell	Blastocytes[1]
CM		190	171 (90.3±3.5)	157 (82.6±2.9)	14 (8.2±0.6)[b]
Co-incubated CM with	EC	199	164 (82.4±3.6)	149 (74.9±2.9)	13 (7.9±0.4)[b]
	EC+hCG	193	158 (83.3±3.5)	144 (74.6±2.1)	14 (9.0±0.6)[ab]
	EC+IL-1β	207	177 (84.6±1.6)	157 (75.8±1.7)	18 (11.2±1.6)[a]

[1] Percentage of total number of oocytes used for IVF, [a,b] Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05), *in vitro* fertilized oocytes were cultured on collagen type I matrix gel (CM), co-incubated CM with endometrial cells (EC) exposed 2.0 IU/ml hCG (EC+hCG) and 10 ng/ml IL-1β (EC+IL-1β). n=4.

기능과 구조적인 형태를 잃어버린다는 단점이 있기 때문에 3차원 배양시스템을 이용하는 방법을 사용하고 있다(Ip와 Darcy, 1996). 이러한 3차원 배양을 구현하기 위해 많이 사용되는 CM은 자궁내막 상피세포의 형태학적인 특성(Ghosh와 Sengupta, 1995)과 재구성에 관한 연구(Wang 등, 2010), 돼지에서 자궁세포 단일배양 및 자궁세포 공동배양으로 인한 세포 분비물질을 이용한 세포외 기질과 자궁세포 사이의 기작에 대한 연구(Cha 등, 2013) 및 3차원 배양된 자궁세포들을 이용한 체외수정 효율 개선방법 및 자궁과 수정란과의 세포신호 상호규명(Lee 등, 2014)의 연구에서 이용되었다. 이전 연구에서 CM 내부에 자궁내막세포들을 배양한 후 그 위에서 체외 수정란 발달에 관련된 실험을 실시하였을 때, 돼지의 자궁내막세포 및 체외 수정란이 성장하는 배양액 조성이 다르기 때문에 수정란 발달 효율이 저조한 것을 확인하였다(Lee 등, 2014). 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 실험에서는 돼지 자궁내막 상피세포에서 분비되는 물질만을 함유한 CM을 제조하기 위하여 insert dish에 자궁내막 상피세포를 부착시킨 뒤 CM과 공동 배양하는 방식으로 실험을 진행하였다. 따라서 본 연구에서는 hCG와 IL-1β를 inset dish안에서 배양되는 자궁내막 상피세포에 처리함으로써 발정주기 중 수정란의 성장, 발달 및 착상이 이루어지는 황체기 자궁내막에서 분비되는 물질이 CM에 결합되도록 자궁내막 상피세포와 CM의 공동배양 시스템을 확립하였고, CM을 자궁내막 상피세포에서 분비되는 물질들을 결합하는 도구로써 체외 수정에 이용한 결과 자궁내막 상피세포에서는 *PTGS-2* mRNA 발현이 변화하였으며, 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM에서는 자궁내막 상피세포와 조직에서 발현되는 VEGF 단백질 발현을 확인하였다. 이는 호르몬과 cytokine 첨가에 따른 자궁내막 상피세포에서 조절되는 분비 인자들이 CM에 정상적으로 결합되었다고 판단되고, 이러한 결과가 체외 수정란 배반포 발달률에 영향을 미쳤다고 판단된다.

포유동물의 발정주기에 따라 난포 및 난자의 성숙과 자궁내막이 두꺼워지는 난포기와 배란 후 난소에서의 황체형성과 퇴행, 자궁내막 분비선의 증가 및 배반포가 착상을 하는 시기인 황체기로 분류한다. 이러한 자궁내막의 생리학적 및 형태학적 변화는 다양한 호르몬, cytokine, 단백질 및 다른 여러 가지 요인에 의하여 일어난다(Gray 등, 2001; Hempstock 등, 2004; Roberts와 Bazer, 1988). 이 중 hCG와 IL-1β는 수정란의 착상과 임신을 위한 자궁생리를 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다(Fadhillah 등, 2014; Sugino, 2014). 포유동물에서 LH와 구조적, 기능적으로 유사한 hCG는 황체기 시기를 유도하기 위한 *in vitro* 연구(Balazi 등, 2012; Bołzan 등, 2013; Zhang 등, 2011)와 과배란을 유도하기 위한 *in vivo* 실험에 많이 이용된다(MISUMI 등, 2014; Tomás 등, 2013; Wongkaweewit 등, 2012). IL-1β는 면역반응에 관여하는 cytokine 물질 중 하나로써 포유동물의 영양외배엽의 재구성, 태아와 모체 사이의 임신 인지 및 성공적인 착상을 위한 자궁내막의 생리학적 변화에 관여한다(Geisert 등, 2012). 이러한 인자들은 자궁에 작용해 PGs 합성에 관여하여 자궁생리를 조절하는 것으로 알려져 있으며(Burton 등, 2007; Herrler 등, 2003), PG-endoperoxide synthase 2(PTGS-2)는 arachidonic acid를 PGs 전환시켜주는 역할을 하고, 착상 및 면역반응에 관여한다는 보고가 있다(Choi 등, 2014). 본 연구에서는 돼지 자궁내막 상피세포에 hCG와 IL-1β를 첨가하였을 때, *PTGS-2* mRNA가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 LH가 자궁내막의 PTGS-2를 증가시킨다는 연구결과(Rao 등, 2005)와 IL-1β가 PTGS-2를 증가시켜 PG의 증가시킨다는 연구결과(Choi 등, 2014)와 일치한다. 따라서 hCG와 IL-1β는 자궁내막 상피세포의 *PTGS-2*를 증가시킴으로써 수정란의 발달이 이루어지는 황체기 시기 자궁내막에서 분비되는 물질을 조절하였다고 판단된다.

수정란의 발달과 착상을 준비하기 위하여 자궁내막은 다양한 생리학적 및 형태학적인 변화가 일어나며, 이 중 혈관신생작용과 혈관재구성은 자궁내막의 발달과 증식에 있어 필수적인 현상이기 때문에, 이를 조절하는 VEGF는 발정주기 자궁내막 환경과 밀접한 관련이 있다(Ferrara와 Davis-Smyth, 1997; Risau, 1997). 배란 후 자궁내막은 황체에서 분비되는 progesterone에 의해 자궁선, 혈관 및 두께가 증가하며, 자궁 내 환경을 조절하기 때문에 성공적인 수정란의 발달과 착상을 위해 배란 이후 황체의 조절을 받는 자궁내막의 혈관 발달은 매우 중요하다(Gaengel과 Betsholtz, 2013; Lähteenvuo와 Rosenzweig, 2012; Shibuya, 2013). hCG와 LHR를 함께 공유하는 LH는 자궁내막세포의 VEGF를 증가(Kaczmarek 등, 2010)시킨다는 보고가 있으며, 자궁내막에서의 IL-1β와 VEGF는 서로 깊은 관련이 있다고 알려져 있다(Tayade 등, 2006). VEGF는 혈관신생 작용뿐만 아니라, 수정란 발달에 영향을 미치기 때문에 VEGF를 이용한 수정란 생산효율을 증진시키기 위해 많은 연구가 진행되었다(Biswas 등, 2011; Dumont 등, 1995; Luo 등, 2002).

실제로 VEGF는 농도 의존적에 따라 ECM과 결합하는 능력이 달라지며, VEGF와 결합된 ECM은 세포의 성장을 증진시킨다는 보고가 있다(Poltorak 등, 1997). 또한 VEGF를 구성하는 아미노산 숫자에 따라 ECM과 결합하는 능력이 변화(Park 등, 1993)하기 때문에 VEGF가 결합된 ECM을 이용한 연구가 이루어져 있으며, 이러한 기술을 세포에 적용하여 성장능력을 조절하는 연구 또한 이루어지고 있다(Gao 등, 2011). 또한 생체 내에서 혈관 신생작용이 활발하게 일어나는 조직인 심장의 ECM 중 85%가 collagen type I으로 이루어져 있기 때문에, collagen type I에 결합효율이 높은 재조합 VEGF를 생산(Zhang 등, 2009)하는 연구도 이루어져 있으며, collagen type I을 주성분으로 한 patch에 VEGF를 결합시켜 손상된 심장을 치료하는 조직공학적인 연구 또한 활발하게 진행되고 있는 실정이다(Gao 등, 2011). 따라서 본 연구에서 이용된 collagen type I cell matrix 자궁내막 상피세포에서 분비되는 VEGF를 결합할 수 있는 도구로 판단되어 실험에 이용하였다. 실제로 본 연구결과에서 역시 자궁내막 상피세포와 공동배양된 CM에서 자궁내막 상피세포와 조직에서 분비되는 VEGF가 결합된 것을 단백질 발현을 통해 확인하였으며, 이러한 CM을 이용하여 체외수정을 하였을 때 체외수정의 배반포 형성률이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 앞서 언급한 VEGF가 collagen type I의 결합 성질과 수정란의 발달을 증가시켰다는 결과와 일치하고, 황체기 시기

의 자궁내막환경을 조절하기 위해 사용된 인자들에 의해 자궁내막 상피세포에서 분비된 VEGF가 결합된 CM이 돼지 체외 수정란 생산 효율을 증진시켰다고 판단된다. 하지만 돼지 자궁내막 상피세포에서 PTGS-2의 유전자와 VEGF의 상호작용에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았기 때문에 이해 대한 연구가 필요하다고 생각한다. 또한 VEGF 이외에 자궁내막 상피세포에서 분비되는 다른 인자들이 CM에 결합할 수도 있기 때문에, 이에 대한 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

따라서 자궁생리를 조절하는 인자인 hCG와 IL-1β는 배양된 돼지 자궁내막 상피세포에 작용하여 분비되는 물질들을 함유할 수 있는 물질을 체외 수정란의 배양에 이용한다면, 생산효율을 증진시킬 수 있을 것이라 판단된다. 또한 이러한 연구는 체외에서 재현해내기 힘든 체내환경을 이용하여 수정란 발달과 이에 대한 세포간의 상호작용을 연구하는데, 큰 도움이 될 것이라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 지원에 의해 수행되었으며, 연구를 수행하는데 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Baker VL, Draper M, Paul S, Allerheiligen S, Glant M, Shifren J, Jaffe RB (1998): Reproductive endocrine and endometrial effects of raloxifene hydrochloride, a selective estrogen receptor modulator, in women with regular menstrual cycles. J Clin Endocrinol Metab 83:6-13.
2. Balazi A, Sirotkin AV, Chrenek P (2012): Activators of protein kinase A and oxytocin affect rabbit reproduction. Cent Eur J Biol 7:973-979.
3. Biswas D, Jung E, Jeung E, Hyun S (2011): Effects of vascular endothelial growth factor on porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. Theriogenology 75: 256-267.
4. Bołzan E, Andronowska A, Bodek G, Morawska-Pucińska E, Krawczyński K, Dąbrowski A, Zięcik A (2013): The novel effect of hCG administration on luteal function maintenance during the estrous cycle/ pregnancy and early embryo development in the pig. Pol J Vet Sci 16:323-332.
5. Bui X, Nguyen T, Nguyen V, Kikuchi K, Nagai T, Nguyen T, Nguyen T, Nguyen T, Nguyen V, Nguyen T (2012): Effects of co-culture with fibroblasts and oviduct cells on *in vitro* production of porcine embryos. Reprod Fertil Dev 25:219-220.
6. Burton G, Jauniaux E, Charnock-Jones D (2007): Human early placental development: Potential roles of the endometrial glands. Placenta 28:S64-S69.
7. Cha H, Lee S, Cheong H, Yang B, Park C (2013): Analysis of plasminogen activators activity and three dimensional (3D) culture of endometrial cells in pigs. J Emb Trans 28:273-280.
8. Choi YC, Seo HS, Yoo IY, Han JH, Jang HJ, Kim MK, Ka HK (2014): Maternal-conceptus interactions: Mediators regulating the implantation process in pigs. Reprod Dev Biol 38:9-19.
9. Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, Remohí J (2012): Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing *in vitro* fertilization cycles. Fertil Steril 97:74-78.
10. Demir R, Yaba A, Huppertz B (2010): Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. Acta histochemica 112:203-214.
11. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML (1995): Vascularization of the mouse embryo: A study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. Dev Dyn 203:80-92.
12. Fadhillah, Yoshioka S, Nishimura R, Okuda K (2014a): Hypoxia promotes progesterone synthesis during luteinization in bovine granulosa cells. J Reprod Dev 60: 194-201.
13. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 18:4-25.
14. Fidanza A, Toschi P, Zacchini F, Czernik M, Palmieri C, Scapolo P, Modlinski JA, Loi P, Ptak GE (2014): Impaired placental vasculogenesis compromises the growth of sheep embryos developed *in vitro*. Biol Reprod 21:1-7.
15. Gaengel K, Betsholtz C (2013): Endocytosis regulates VEGF signalling during angiogenesis. Nat Cell Biol 15:233-235.
16. Gao J, Liu J, Gao Y, Wang C, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Miao Q, Dai J (2011): A myocardial patch made of collagen membranes loaded with collagen-binding human vascular endothelial growth factor accelerates healing of the injured rabbit heart. Tissue Eng Part A 17:2739-2747.
17. Geisert R, Fazleabas A, Lucy M, Mathew D (2012): Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: Role of interleukin 1β. Cell Tissue Res 349:825-838.
18. Ghosh D, Sengupta J (1995): Physiology: Morphological characteristics of human endometrial epithelial cells cultured on rat-tail collagen matrix. Hum Reprod 10:785-790.

19. Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE (2001): Developmental biology of uterine glands. Biol Reprod 65:1311-1323.
20. Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT (2010): Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. Fertil Steril 93:2602-2607.
21. Hancock J (1961): Fertilization in the pig. J Reprod Fertil 2:307-331.
22. Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ (2004): Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: A morphological and immunohistochemical study. Reprod Biol Endocrinol 2:1-14.
23. Herrler A, von Rango U, Beier HM (2003): Embryo-maternal signalling: How the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. Reproductive Biomedicine Online 6:244-256.
24. Ip MM, Darcy KM (1996): Three-dimensional mammary primary culture model systems. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1:91-110.
25. Jugdutt BI (2003): Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix when is enough enough? Circulation 108:1395-1403.
26. Kaczmarek M, Blitek A, Schams D, Ziecik A (2010): Effect of luteinizing hormone and tumour necrosis factor-alpha on VEGF secretion by cultured porcine endometrial stromal cells. Reprod Domest Anim 45: 481-486.
27. Khan SZ, Kokubu E, Matsuzaka K, Inoue T (2013): Behaviour of rat-cultured dental pulp cells in three-dimensional collagen type-1 gel *in vitro* and *in vivo*. Aust Endod J 39:137-145.
28. Koláčná L, Bakešová J, Varga F, Košťáková E, Plánka L, Nečas A, Lukáš D, Amler E, Pelouch V (2007): Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. Physiol Res 56: 51-60.
29. Lähteenvuo J, Rosenzweig A (2012): Effects of aging on angiogenesis. Circ Res 110:1252-1264.
30. Lee SH, Hwangbo Y, Cha HJ, Kim SJ, Kim MK, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2014): Effect of three dimensional culture of porcine endometrial cells on their plasminogen activity and pre-implantation embryo development after co-culture. J Emb Trans 29:207-219.
31. Luo H, Kimura K, Aoki M, Hirako M (2002): Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. J Vet Med Sci 64:967-971.
32. McNeill R, Sreenan J, Diskin M, Cairns M, Fitzpatrick R, Smith T, Morris D (2006): Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. Reprod Fertil Dev 18:573-583.
33. Misumi K, Irayama Y, Suzuki M, Nakai M, Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K (2014): Production of middle white piglets after transfer of embryos produced *in vitro*. J Reprod Dev 60:246-249.
34. Park JE, Keller G-A, Ferrara N (1993): The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell 4:1317-1326.
35. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G (1997): VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. J Biol Chem 272: 7151-7158.
36. Rao C, Lei Z, Lin D (2005): Dependence of uterine cyclooxygenase2 expression on luteinizing hormone signaling deletion and reinsertion of LH receptors suggest that uterine COX2 expression is dependent on LH signaling. Biol Reprod 73:256-260.
37. Risau W (1997): Mechanisms of angiogenesis. Nature 386:671-674.
38. Roberts R, Bazer F (1988): The functions of uterine secretions. J Reprod Fertil 82:875-892.
39. Shibuya M (2013): Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. J Biochem 153:13-19.
40. Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y (2012): Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. PLoS One 7:e36627.
41. Sugino N (2014): Molecular mechanisms of luteinization. Obstet Gynecol Sci 57:93-101.
42. Tanaka R, Saito T, Ashihara K, Nishimura M, Mizumoto H, Kudo R (2003): Three-dimensional coculture of endometrial cancer cells and fibroblasts in human placenta derived collagen sponges and expression matrix metalloproteinases in these cells. Gynecol Oncol 90:297-304.
43. Tanihara F, Nakai M, Kaneko H, Noguchi J, Otoi T, Kikuchi K (2013): Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during *in vitro* fertilization in pigs. J Reprod Dev 59:385-392.
44. Tareq K, Akter QS, Khandoker MY, Tsujii H (2012): Selenium and vitamin E improve the *in vitro* maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. J Reprod Dev 58:621-628.
45. Tarraf C, Knight J (1995): Effect of uterine space and fetal sex on conceptus development and *in vitro* release of progesterone and estrone from regions of the porcine placenta throughout gestation. Domest

Anim Endocrinol 12:63-71.
46. Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA (2006): Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. J Immunol 176:148-156.
47. Tomás C, Blanch E, Cebrián B, Mocé E (2013): *In vivo* fertilising ability of frozen-thawed boar sperm treated with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to cryopreservation. Anim Reprod Sci 140:77-82.
48. Tsunoda S, Kawano N, Miyado K, Kimura N, Fujii J (2012): Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during *in vitro* fertilization. Biol Reprod 87:121-126.
49. Van Loendersloot L, Van Wely M, Limpens J, Bossuyt P, Repping S, Van Der Veen F (2010): Predictive factors in *in vitro* fertilization (IVF) a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update 16: 577-589.
50. Wang H-B, Lü S-H, Lin Q-X, Feng L-X, Li D-X, Duan C-M, Li Y-l, Wang C-Y (2010): Reconstruction of endometrium *in vitro* via rabbit uterine endometrial cells expanded by sex steroid. Fertil Steril 93:2385-2395.
51. Watt FM, Huck WT (2013): Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. Nat Rev Mol Cell Biol 14:467-473.
52. Wongkaweewit K, Prommachart P, Raksasub R, Buranaamnuay K, Techakumphu M, De Rensis F, Tummaruk P (2012): Effect of the administration of GnRH or hCG on time of ovulation and the onset of estrus-to-ovulation interval in sows in Thailand. Trop Anim Health Prod 44:467-470.
53. Zhang J, Ding L, Zhao Y, Sun W, Chen B, Lin H, Wang X, Zhang L, Xu B, Dai J (2009): Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. Circulation 119:1776-1784.
54. Zhang Z, Yu D, Yin D, Wang Z (2011): Activation of PI3K/mTOR signaling pathway contributes to induction of vascular endothelial growth factor by hCG in bovine developing luteal cells. Anim Reprod Sci 125:42-48.
55. Ziecik AJ, Kaczmarek MM, Blitek A, Kowalczyk AE, Li X, Rahman NA (2007): Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. Mol Cell Endocrinol 269:51-60.

(Received: July 29 2015/ Accepted: August 17 2015)