

영양막 세포의 세포 증식력 측정 모델의 확립

심 순 섭

제주대학교 의학전문대학원 산부인과학교실

(Received April 3, 2014; Revised April 10, 2014; Accepted April 17, 2014)

Abstract

Establishment of Assay Model for the Trophoblast Cell-line Proliferation

Soon-Sup Shim

Department of Obstetrics and Gynecology, Jeju National University School of Medicine, Seoul, Korea

Preeclampsia is one of the major causes of pregnancy-related mortality and morbidity. While the pathophysiology is not well examined, it is known that impeded early placental formation may be one etiologic step. The cytotoxic effect of lymphocytes on the trophoblast may be one of immunological explanations. This study was designed to find out the optimal condition of cell concentration and to establish an experimental model of cytotoxic effect of lymphocytes on the trophoblast cell-line proliferation. In various conditions of cell concentration, the interaction between trophoblast cell-line and lymphocytes were measured by CCK-8 kit, which assesses cell proliferation by absorbometry. The optimal condition (trophoblast cell-line: 10^5 cells/mL, lymphocyte: 10^6 cells/mL) was selected for this model. We established a model for assessing the interaction between the trophoblast cell-line and lymphocytes by measuring the cell proliferation. (J Med Life Sci 2014;11(1):1-4)

Key Words : Preeclampsia, Experimental Model, Trophoblast Cell-line, Lymphocytes, Cell Proliferation

서 론

전자간증은 임신중 발생하는 고혈압성 전신 질환으로, 진단은 임신 20주 이후 고혈압과 단백뇨를 확인함으로써 이루어진다. 정상 산모에서는 약 5%에서 발생하며, 만성 고혈압이 있는 산모에서는 25% 정도까지 발생 빈도가 높아진다. 전자간증은 산모와 태아의 상태를 악화시킴으로써 조산을 피치 못하게 하여, 산모와 아기의 사망 및 이환의 주요 원인이 되고 있다¹⁻³⁾.

병인은 아직 뚜렷이 밝혀져 있지 않으나, 전신적으로 일어나는 변화(혈관 수축 및 투과성의 증가 등)를 특징적으로 하며, 이러한 변화를 일으키는 원인 물질이 태반에서 유래하는 것으로 추정되어 왔다. 또한, 전자간증 산모에서는 임신 초기 태반 형성이 저해되어 태반 세포가 산모 자궁 내부를 침윤하는 정도가 적은 소견을 보이며, 이에 따라 자궁-태반혈관도 넓게 변형되지 못하여 혈류 공급이 부족해지는 것이 이 질환을 일으키는 원인으로 지목되어 왔다⁴⁻⁶⁾.

산모의 면역 세포가 태반 세포에 대해 세포독성 작용을 일으

켜서, 태반세포의 생존력 및 침윤 정도가 약해지고 그로 인하여 태반에 저산소증이 유발되어 전자간증이 발생하는 것은 아닐까?

이 연구의 목적은 영양막 세포주를 사용하여 림프구가 이의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 적합한 실험 조건을 찾아 내어 영양막 세포주의 세포 증식력 측정 모델을 확립하는 데에 있다.

대상 및 방법

(1) 영양막 세포주(ATCC CRL-1584)를 배양액(10% MEM; fetal bovine serum; antibiotics)에서 증식시킨다 (37°C, 5% CO₂).

(2) 이차 배양 방법: 배양액을 제거하고 신선한 트립신-EDTA (0.25% trypsin-0.03% EDTA solution)로 행균 후, 세포가 바닥에서 떨어질 때까지 실온에서 기다린다(또는 배양기에 잠깐 둬). 신선한 배양액을 넣어 흡입한 후, 새로운 배양 용기에 넣는다. 다시 상기와 같이 배양한다.

(3) 상기와 같이 트립신-EDTA를 처리하여 떨어진 세포를 배양액에서 행균 후 원침(1200-1500 rpm, 5분)시킨 후, 세포침사의 양에 따라 적당량(~ 6 mL)의 배양액을 넣어 부유시킨다.

(4) 세포수 계수: Cell suspension 15 μ L, Trypan blue 30 μ L, PBS (회색) 15 μ L → hemocytometer로 세포수를 센다. (세포의

Correspondence to : Soon-Sup Shim

Department of Obstetrics and Gynecology, Jeju National University Hospital, Aran 13gil 15, Jeju-si, Jeju Special Self-governing Province, Republic of Korea, 690-767

E-mail : shim212@jejunu.ac.kr

농도: 네 곳을 센 수 $\times 10^4$ cells/mL)

(5) 여러 가지 농도로 희석한 후[조건 A: 10^8 cells/mL, 조건 B: 10^4 cell/mL, 조건 C: 10^6 cells/mL], 96 well plate 한 well 당 100 μ L씩 넣는다.

(6) 24시간을 배양하여(37°C, 5% CO₂) 바닥에 부착하도록 한다.

(7) 각 well에 조건 변화를 일으키는 물질 또는 세포를 첨가하고, 48시간을 더 배양한다.

- 림프구와의 혼합 배양: 영양막 세포주의 농도보다 10배리(조건 A: 10^4 cells/mL, 조건 B: 10^5 cell/mL, 조건 C: 10^6 cells/mL) 첨가하여 혼합 배양한다.

- 세포의 자극: T-cell mitogen으로 PHA(phytohemagglutinin)을 10 μ g/mL 농도로 첨가한다.

- 트립토판 고갈의 억제: 1-MT(1-methyl-DL-tryptophan)을 2 mM 농도로 첨가한다.

(8) CCK-8 용액을 10 μ L씩 추가하고 1-4시간 더 배양기 속에 둔다.

(9) ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 650 nm에서의 흡광도를 기준으로 삼는다.

(10) 조건 A, B, C 가운데, 영양막 세포주의 세포 증식력의 변화를 가장 잘 평가할 수 있는 적당 조건을 선택한다.

결 과

여러 가지 조건 변화에 따른 영양막 세포주의 세포 증식력을 알아보기 위하여, 영양막 세포주와 림프구의 세포 농도 3가지 조건(A, B, C)에서 실험을 해 보았을 때, C 조건에서 영양막 세포주의 증식력 변화를 관찰하기가 가장 용이하였다(Table 1).

1. 세포의 농도 A 조건(영양막 세포주 농도: 10^4 cells/mL, 림프구 농도: 10^4 cells/mL)은 세포증식력을 대표하는 CCK-8 kit의 absorbance 수치가 전반적으로 너무 낮았고, 각 조건(림프구, PHA, 1-MT 추가)에 따른 변화도 뚜렷하지 않았다.

2. 세포의 농도 B 조건(영양막 세포주 농도: 10^4 cells/mL, 림프구 농도: 10^5 cells/mL)은 조건(림프구, PHA, 1-MT 추가)에 따른 변화를 일부 확인할 수는 있었으나, CCK-8 kit의 absorbance 수치는 여전히 낮은 편이었다.

3. 세포의 농도 C 조건(영양막 세포주 농도: 10^4 cells/mL, 림프구 농도: 10^6 cells/mL)은 CCK-8 kit의 absorbance 수치가 적절한 범위로 나오고, 조건(림프구, PHA, 1-MT 추가)에 따른 변화를 확인하기에도 적절하였다.

Table 1. Histopathological differential diagnosis of hemosiderotic dermatofibroma from other variants

Settings		A	B	C
Trophoblast cell-line (TC) concentration (cells/mL)		10^8	10^4	10^6
Lymphocyte concentration (cells/mL)		10^4	10^5	10^6
Trophoblast cell-line (TC)				
Group 1 (n=3)	TC	0.131 \pm 0.010	0.369 \pm 0.023	2.682 \pm 0.112
Group 2 (n=6)	TC + PHA	0.136 \pm 0.002	0.434 \pm 0.050	2.724 \pm 0.138
Group 3 (n=3)	TC + PHA + 1-MT	0.138 \pm 0.002	0.517 \pm 0.049	2.892 \pm 0.067
Trophoblast cell-line (TC) + Lymphocytes (Lym)				
Group 4 (n=3)	TC + Lym	0.129 \pm 0.001	0.417 \pm 0.069	2.616 \pm 0.222
Group 5 (n=6)	TC + Lym + PHA	0.139 \pm 0.016	0.376 \pm 0.059	2.269 \pm 0.280
Group 6 (n=3)	TC + Lym + PHA + 1-MT	0.135 \pm 0.022	0.359 \pm 0.053	1.791 \pm 0.318

PHA: phytohemagglutinin (10 μ g/mL), 1-MT: 1-methyl-DL-tryptophan (2 mM), Lym: lymphocytes.

고 찰

저자는 상기 실험을 통하여, 영양막 세포주의 세포 증식력에 영향을 주는 조건을 평가하기 위한 적합한 실험 모델을 확립할 수 있었다.

전자간증은 산모와 아기의 사망 및 이환의 주요 원인이나, 인간에게 특이적으로 발생하는 질환이어서 동물 실험이 어려워 연구에 어려움이 있었다. 몇 가지 실험실 모델이 고안되어 이용되고 있으며⁷⁻⁹⁾, 본 실험은 영양막 세포주의 세포 증식력에 영향을 주는 인자(특히 림프구)에 대한 연구를 위한 모델로 고안되었다.

인체는 자기(self)가 아닌 조직을 거부하는 면역 작용이 있다. 태반과 태아는 남편의 유전 인자를 절반 가지고 있으므로 산모의 입장에서 자기(self) 조직이 아니다. 융모막 세포는 산모의 혈류와 직접 접촉하고 있어서 거부 반응이 일어나야 하는데, 실제로는 그렇지 않다. 이러한 이중 거부를 회피하는 기전으로 여러 가지 설명이 제시되고 있지만 아직 뚜렷이 밝혀지지는 못하고 있다¹⁰⁾. 주요 설명 중에는, 산모의 태반세포는 MHC 분자로 종류가 매우 단순한 HLA-G만을 발현하고 있어서 타자 인식을 회피한다는 설명이 있다¹¹⁾. 또, 어떤 설명 중에는, 융모막 세포 주변에 트립토판을 고갈시키는 효소를 내어 산모 면역세포의 활동성을 약화시킨다는 설명도 있으며, 1-methyltryptophan으로 이 효소를 억제하는 경우 유산이 발생함을 보인 동물실험도 있다¹²⁾.

본 모델은 상용화된 키트를 사용하여 흡광도를 측정하여 세포 증식력을 평가함으로써, 실험 과정이 복잡하지 않고 정량화하여 수치를 비교할 수 있는 장점이 있다. 반면, 제한점으로는 세포 증식 정도를 평가할 때, 함께 배양된 영양막 세포주와 림프구가 한꺼번에 평가되어서, 각각의 세포에 대한 개별적인 증식력을 분석하기가 어렵다는 점이 있다.

본 실험 결과 수치는 적합한 실험 조건을 선택하기 위하여 제한된 well 수에서만 시행되어, 각각 수치의 의미를 분석하기에는 어려움이 있었으나 주요한 경향은 다음과 같았다. 융모막 세포주의 증식력은 단순히 림프구를 추가하였을 때에는 별다른 변화가 없었으나, T 림프구를 활성화시키는 인자인 PHA와 함께 첨가하였을 때 융모막 세포주의 증식력을 감소시키는 경향이 있었다. 그러나, 이 조건에 1-MT을 추가하였을 때 융모막 세포주가 보호되는 효과를 기대하였으나 이러한 현상은 볼 수 없었다. 그런데, 실험 과정 중에 1-MT이 배양액에 잘 용해되지 않아서 실험에 어려움을 겪었는데, 이것이 기대했던 효과를 내지 못한 원인이었을 가능성도 있는 것으로 생각된다.

저자는 전자간증 연구를 위한 융모막 세포주의 세포 증식력을

평가하기 위한 실험 모델을 확립하였으며, 향후에 여러 가지 조건에서 좀더 많은 수의 실험을 통하여 이 실험 모델의 유용성이 확인되기를 바라며, 이 실험 모델이 전자간증 병인 연구에 있어 유용한 도구가 되기를 기대한다.

감사의 글

본 논문은 2004년도 서울대학교병원 일반연구과제 (09-2004-004) 연구비 지원에 의한 것임.

참고 문헌

- 1) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1):S1-S22.
- 2) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):159-67.
- 3) Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003;102(1):181-92.
- 4) Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93(10):1049-59.
- 5) Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101(8):669-74.
- 6) Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357(9249):53-6.
- 7) Highet AR, Zhang VJ, Heinemann GK, Roberts CT. Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Placenta*;33(7):586-8.
- 8) Newby D, Marks L, Cousins F, Duffie E, Lyall F. Villous explant culture: characterization and evaluation of a model to study trophoblast invasion. *Hypertens Pregnancy* 2005;24(1):75-91.
- 9) Wang H, Pilla F, Anderson S, et al. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Mol Hum Reprod*;18(1):33-43.
- 10) Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol*

Soon-Sup Shim

- 2000;12(6):731-7.
- 11) Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248(4952):220-3.
- 12) Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281(5380):1191-3