

가임신 흰쥐 자궁조직의 착상부위분화에 관한 연구

김성례

이화여자대학교 의과대학 의학과

포유류 배아의 착상기전을 규명할 목적의 일환으로 자궁내막조직의 탈락막 형성과 분화에 미치는 난소 스테로이드 호르몬의 영향과 인위적 자극등의 영향을 조사하였다. 가임신을 유도시킨 흰쥐와 정상임신군의 자궁내막조직을 착상부위와 비착상부위로 분리하여 자궁내막조직의 분화에 지표가 되는 Alkaline phosphatase(ALPase)의 활성을 측정하였다. 가임신군에서 인위적 자극(trauma)을 가한 자궁이 자극을 받지않은(control) 자궁에 비해 progesterone(P)만을, 또는 progesterone과 estradiol(E + P)을 동시 처리받은 실험군에서 ALPase 활성이 유의한 차이($p < 0.01$)로 높게 나타났다. 정상임신군에서는 착상시기인 임신 제 6 일군의 착상부위에서 E처리군과 P처리군의 ALPase활성이 비착상 부위에 비해 유의한 차이($P < 0.05$)로 크게 나타나며, 특히 임신 제 6 일군에서는 착상, 비착상 부위의 P 처리군의 활성이 Intact군보다 유의하게($P < 0.05$) 높아졌다. 정상임신 제 9 일 Intact군의 ALPase활성은 임신 제 3 일, 6일의 Intact군의 활성에 비하여 착상(3, 6일 : $P < 0.01$), 비착상부위 (3일 : $P < 0.05$, 6일 : $P < 0.02$)에서 다같이 유의한 차이로 높아졌다. 본 연구결과에서 배아가 분화, 발생해 감에따라 자궁내막조직 분화도 활발해지고, 착상부위 분화는 착상시기부터 현저해지며, 특히 P호르몬의 영향이 크다는 것과 배아 아닌 인위적 자극으로도 탈락막 형성 유도가 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

KEY WORDS: Pseudopregnancy, Implantation site, Antimesometrium, Mesometrium, Alkaline phosphatase, Decidua, Trauma.

포유동물의 생식과 발생의 조절은 시상하부-뇌하수체-생식소-생식수관을 중심으로 하여 복잡하나 정교하게 조절된 호르몬의 피백임 작용(feedback regulation)에 의한 배외적인 조절과 배아자체에 의해서 조절된다. 이와같이 복잡한 조절작용의 영향하에서 초기 배아 발생과정이 진행되므로 포유류의 생식과 발생현상을 종합적으로 광범위한 기초자료가 없이는 그 조절기작을 규명하는 일은 어려운 과제이다.

포유류난자는 수란관 상부에서 수정을 하여 자궁으로 하강하기까지 대략 4~5일이 소요된다. 이 기간동안 자궁조직은 배아를 착상시킬 탈락막(decidua)을 형성하며, 호르몬의 환경을 갖추기 위하여 대사활동과 분화작용이 활발하게 일어난다. 특히 배아가 자궁내막층에 착상을 하기 위해

식은 배아와 내막층간에 상호 인식이 필수적이며 (Psychoyos, 1967; Finn and Martin, 1969) 이런 인식의 매개는 자궁내 특수성분에 의한 것으로 추정된다(Surani, 1977a, b; Kao and Bullock, 1981). 또한 배아에 공급해 줄 영양분을 생성분비해야 하므로 자궁내막조직의 세포성 성분과 자궁액의 화학적 성분들이 변화한다고 알려졌다(Kao and Bullock, 1981; Komm *et al*, 1985; 1986). 이와같이 배아의 착상, 임신유지 그리고 분만을 위한 환경 여건을 갖추어야 하는 중요한 시기의 작용은 여러 요인에 영향을 받고 있으며 그 중 estrogen과 progesterone과 같은 난소호르몬에 의한 영향이 큰 것으로 생각되고 있다.

초기 임신기간에 착상을 위한 분화작용이 활발한 탈락막에서 알칼리성 phosphatase(alkaline phosphatase; ALPase)의 활성이 증가되며, 동시에 단백질 함정도 증가되므로 ALPase는 탈락막 형성의 index(Finn and McLaren, 1967) 혹은 포

본 연구는 1990년 한국과학재단 연구비와 문교부 기초과학 육성 연구비의 지원에 의해 수행 되었음.

지효소(marker enzyme)라고 하였다(Aitken, 1977). 포유류의 착상조절기작을 규명하려는 본인(Kim, 1986)의 연구의 일환에서 자궁내막조직의 자궁내강 상피 세포층과 기질층에서 ALPase의 활성이 estrogen과 progesterone의 분비양상에 따라 다르며 이 호르몬의 표적세포가 다르다는 것을 알 수 있었다.

탈락막 반응(decidua reaction; DCR)에서 호르몬처리 (Lee and Dukelow, 1972)외에 어떤 요인들이 관여하는지는 명백하게 알려져 있지 않으나 배낭에 의한 자극(Blandau, 1961), 인위적인 trauma에 의한 자극(Loeb, 1908), 전기적 자극(Krehbiel, 1937), 자궁내에 주입된 oil에 의한 자극(Finn and Keen, 1962), 그리고 공기의 자궁내 주사에 의한 자극(Orsini, 1963)등이 자궁에 작용하는 것으로 알려져 있다.

Blandau(1961)는 DCR은 단순히 배낭이 자궁 표피층에 주는 압력에 의하여 유발된다고 지적하였으나 고정된 난자를 가임시킨 흰쥐의 자궁내에 주입하였을 때에는 DCR이 없으나 난자 크기의 agar(Finn, 1971)를 주입하였을 때에는 오히려 탈락막이 유도되므로 그의 설명은 만족하지 못하다. Shelesnyak(1960)은 배낭이 접촉되는 자궁내막조직 기질세포가 분비하는 histamine이 DCR을 유도하는 원인이 된다고 하였으나 이것을 분비시키는 기작은 분명히 밝혀지지 않고 있다. Hetherington (1968)은 배낭의 호흡결과에 의하여 발생한 탄산가스가 자궁내막조직층에 축적된다고 하였으므로 이 예를 들어 McLaren(1970)은 이때의 CO₂가 DCR을 야기시킨 것이라고 설명하고 있다. 그러나 oil에 의하여서도 DCR이 일어난다는 사실을 감안할 때 위의 설명은 충분하지가 않다. 이와같이 착상을 유발하는 과정에서 배낭과 자궁내막조직사이에는 복잡한 기작이 내포된 것으로 생각된다.

한편 생쥐와 흰쥐에서는 로배기배아가 자궁내막조직에 착상할 때 antimesometrium에 착상하는데 어떠한 기작으로 배아가 같은 자궁내막조직층에서 antimesometrium을 인식하고 착상하게 되는지는 알려져 있지 않으며, 그에 관한 연구는 전무한 상태이다.

본인등(1986)은 앞서서 착상조절기작을 규명하

려는 연구에서 자궁내막조직의 estrogen과 progesterone의 표적세포가 다르며, 이들 호르몬이 ALPase활성에 영향을 미치는 시기가 다르다는 것과 estrogen은 착상을 유도하는데 필요한 요인이며, progesterone은 자궁이 착상을 준비하는데 길상적 역할을 하는 것을 관찰하였다. 시기적으로 다양하고 조화있게 분비되는 두 난소호르몬의 영향을 받는 자궁조직에서 착상부위인 antimesometrium과 비착상부위인 mesometrium이 분화되며 인식되는 기작에 관한 연구는 중요하다고 생각된다.

그러므로 본인등은 정상임신군에서 배아 착상된 자궁조직분화가 활발한 임신 제 3일과 착상시기인 임신 제 6일에 자궁각을 antimesometrium과 mesometrium으로 분리하여 착상부위의 분화에 관한 연구를 수행중이며 최근에 ALPase활성의 변화를 관찰, 보고한 바 있다(Kim and Choi, 1990).

본 연구에서는 가임질을 유도한 흰쥐 자궁의 탈락막 형성에 미치는 여러 요인을 분석하고자 로배기 배아 이외의 인위적인 자극을 주고 난소 호르몬(estradiol 혹은/그리고 progesterone)을 처리한 후 자궁내막조직 분화의 index가 되는 ALPase활성의 변화를 관찰하여 정상임신군과 비교, 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

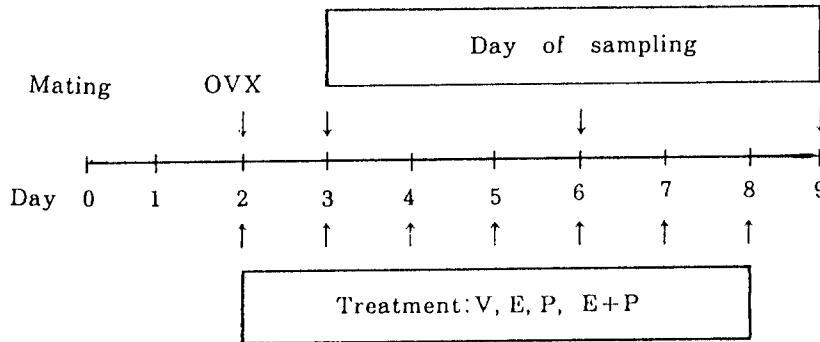
본 실험에서는 생후 3-4개월(250 ± 20 g)된 성숙한 Sprague-Dawley계의 흰쥐 암컷을 실험진행 전에 조명장치(14시간 조명, 10시간 소등)가 되어 있는 곳에서 일정기간 적응시킨 후, 정상발정 주기를 나타내는 것을 사용하였다.

실험군

1. 정상임신군(Pregnant Group)

대조군(Intact) : 발정전기에 생식능력이 있는 수컷과 동성시킨 다음 날 아침 절부에서 정사가 관찰되면 이를 임신 제 1일(Day 1)로 하였으며, 이후 임신 제 3일군(Day 3), 임신 제 6일군(Day

(A) Pregnant Group



(B) Pseudopregnant Group

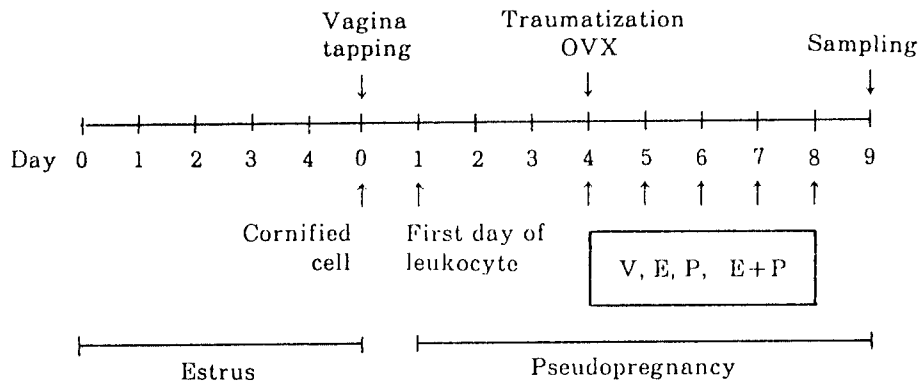


Fig. 1. Experimental scheme. OVX: Ovaryectomy, V: Vehicle (0.1ml sesame oil), E: 17β -Estradiol (1 μ g/0.1 ml sesame oil), P: Progesterone (2 mg/0.1 ml sesame oil), E + P: Estradiol + Progesterone.

6), 임신 제 9 일군 (Day 9)으로 구분하여 Fig. 1 (A)에서와 같이 수행하였다.

처리군: 임신된 흰쥐에서 임신 제 2 일에 난소를 제거하고 호르몬처리는 다음과 같이 표시되었다: ① 용매 (Vehicle) 처리군 (V), ② Estradiol 처리군 (E), ③ Progesterone 처리군 (P) 그리고 ④ Estradiol과 Progesterone 동시처리군 (E + P).

2. 가임신군 (Pseudopregnant Group)

대조군 (Intact): 정상 성주기를 나타내는 암컷 흰쥐를 발정진기에 자궁전부를 tapping (120회/1분)하여 가임신을 유도한 후, 다음날 아침 leuko-

cyte가 관찰되면 이를 가임신 제 1일로 하였다. 계속 leukocyte가 관찰되면 가임신이 유도된 것으로 간주하여 Fig. 1(B)와 같이 가임신 제 4일에 탈락막 형성 (decidua) 유도를 위하여 한쪽 자궁의 수관과 자궁 연결부위에 sesame oil (0.1 ml/개체)을 주입하여 traumatization을 하였다.

처리군: 가임신 제 4일에 양쪽 난소를 제거한 후, 호르몬처리는 정상 임신군과 같이 하였다.

호르몬 처리방법: 난소제거는 Nembutal Sodium Solution (0.1 ml/100 g)을 복강주사하여 마취시킨 후, 배부측 부분절개 수술로 양쪽 난소를 제거하였으며 17β -estradiol (1 μ g/개체)과 progesterone (2 mg/개체)을 각자 혹은 동시에

배 24시간 간격으로 피하주사하였다. 17 β -estradiol과 progesterone은 ethyl alcohol로 용해시킨 후, sesame oil에 녹였다.

알칼리성 phosphatase 활성측정

ALPase활성 측정을 위한 시료는 배 실험군당 5마리의 동물에서 다음과 같은 방법으로 수확하였다. 각 실험군의 흰쥐는 ether로 마취하고 양쪽 자궁을 적출하여 ice-cold saline으로 적셔진 흡착시 위에서 어분의 지방, 혈액을 깨끗이 제거한 후, 각 실험군의 자궁을 정상임신군에서는 착상부위인 antimesometrium과 미착상부위인 mesometrium으로 분리하였으며, 가임실험군에서는 traumatization을 준 한쪽 자궁각과 이와 비교가 되는 다른 쪽 자궁각을 control로 구분하여 분리한 후, 개체당 3 ml의 ice-cold phosphate-buffered saline(PBS)내에서 자궁 내막조직(endometrium)을 수확하였다. 시료채취의 전 과정은 4°C에서 행하였다. 수확한 자궁내막 조직을 2,000 g에서 10분간 원심분리(Minifuge GL, Heraeus christ)하여 침전물을 0.25 M sucrose에 현탁시켜 1.5 ml eppendorf tube에 옮겨 초음파분쇄기(Sonic dismembrator, Fisher Model 300)로 30초간 sonication (output 30%) 한 후 4°C에서 10,000 g로 10분간 원심분리하여(Beckman Model J2-21) 상층액을 사용하였다.

ALPase활성은 Bowers와 McComb(1975)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 조직배의 P-nitrophenol phosphate(P-NPP)가 함유된 반응액과 작용시켜서 유리되는 P-nitrophenol(P-NP)의 흡광도를 측정하여 효소의 활성도로 하였다. 즉, pH 10.33인 반응액(0.89 M 2-Amino-2-ethyl-1-propanol, 300 μ l; 50 mM MgCl₂, 100 μ l; 300 mM P-NPP; 100 μ l)에 조직액 100 μ l를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 37.5% trichloroacetic acid(TCA) 0.3 ml을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 2N NaOH 0.6 ml로 제발색시킨 다음 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, UV-150-02)로 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 standard로는 P-NP(Sigma)를 사용하였다. 한편 단백질 정량은 Bradford(1976)의 방법을 적용하였으며, 이때 standard로는

bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 사용하였다. ALPase활성도는 μ mole P-NP/mg protein/min로 나타내었으며, 각 군에서 측정된 효소활성도의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

결 과

초기 배아 발생기간 중 자궁내막조직의 착상부위의 분화에 관한 기작을 고찰하기 위한 연구의 일환으로 탈락막 형성과 분화에 미치는 나소 호르몬의 영향과 배아 이외의 인위적 자극등의 영향을 종합 관찰해 보고자 가임실험을 유도한 흰쥐와 정상임실험군에서 ALPase 활성을 관찰한 결과는 다음과 같다.

가임신(pseudopregnancy)군에서 ALP활성

가임신 흰쥐에서 탈락막 유발을 위하여 sesame oil을 주입 trauma를 준 자궁과 trauma를 주지 않은 자궁을 대조군으로 하여 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타냈다.

a) 대조군 (non-trauma) : Intact군의 ALPase 활성은 159.8 μ mole이며 용매 처리군에서는 263.9 μ mole, estradiol처리군에서는 244.8 μ mole, progesterone 처리군에서는 302.0 μ mole을 나타내어 각 처리군의 활성도를 Intact군의 활성치와 비교했을때 vehicle처리군에서는 비교치가 165%($P < 0.05$), estradiol 처리군에서는 153%($P < 0.01$), 그리고 progesterone처리군에서는 189%($P < 0.01$)로 각각 처리군에서 유의하게 높아졌다.

b) 탈락막 유도군 (trauma) : Intact군의 ALPase활성은 316.6 μ mole로 탈락막 유도를 하지 않은 대조군에 비하여 유의하게($P < 0.01$) 높은 활성을 나타내나, 용매처리군에서는 231.1 μ mole로 대조군과는 차이가 없으며, estradiol 처리군에서는 194.0 μ mole로 대조군보다 활성이 유의한 차이($P < 0.05$)로 감소하고 있다. 반면 progesterone처리군에서는 626.9 μ mole, 두 호르몬 동시 처리군에서는 540.8 μ mole로 각각 대조군보다 유의하게($P < 0.001$) 높은 활성을 나

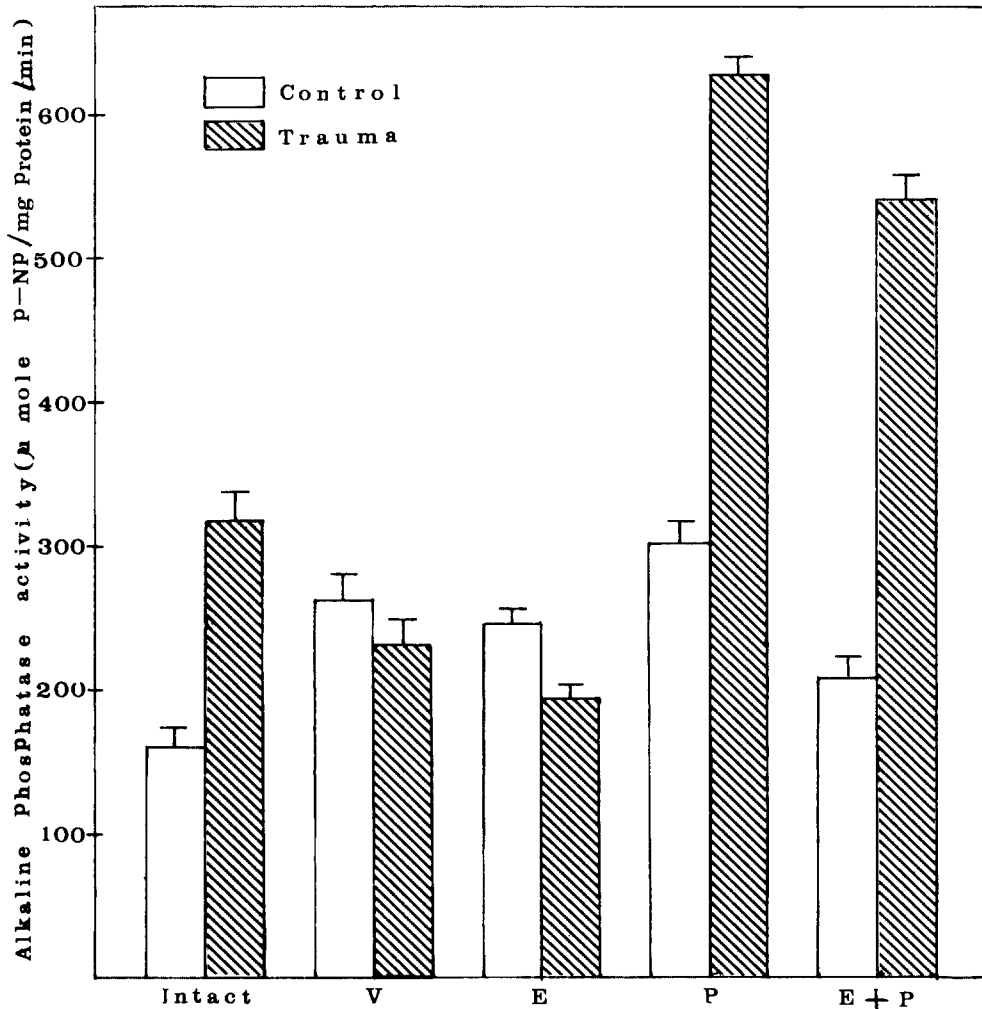


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity in the uterine endometrium of the pseudopregnant rats on Day 9 treated with or without steroid(s). Intact: Ovary intact, without treatment as control, V: Vehicle (0.1 ml sesame oil), E: 17β-Estradiol (1 µg/0.1 ml sesame oil), P: Progesterone (2 mg/0.1 ml sesame oil), Bar indicates the mean value ± standard error.

타낸다.

각 처리군의 활성을 Intact군과 비교하였을 때 용매 처리군에서는 비교치가 73%, estradiol처리군에서는 61%로 감소되고 있으나 progesterone처리군에서는 198% (P < 0.01), 두 호르몬 동시 처리군에서는 171% (P < 0.05)로 되고 있어, 유의한 차이로 증가하였다.

이와같이 태조군과 탈락막 유도군에서 ALPase 활성이 다같이 progesterone 처리군에서 Intact군

보다 유의한 차이로 증가하고 있으며, 특히 탈락막 유도를 위한 인위적 자극을 받은 자궁쪽이 태조군보다 progesterone과 두 호르몬 동시 처리의 영향이 유의한 차이로 크게 나타나고 있다.

정상임신(normal pregnancy)군에서 ALPase 활성

정상임신군의 착상부위 분화에 관한 연구를 하 고자 착상 준비 기간인 임신 제 3 일과, 착상시기

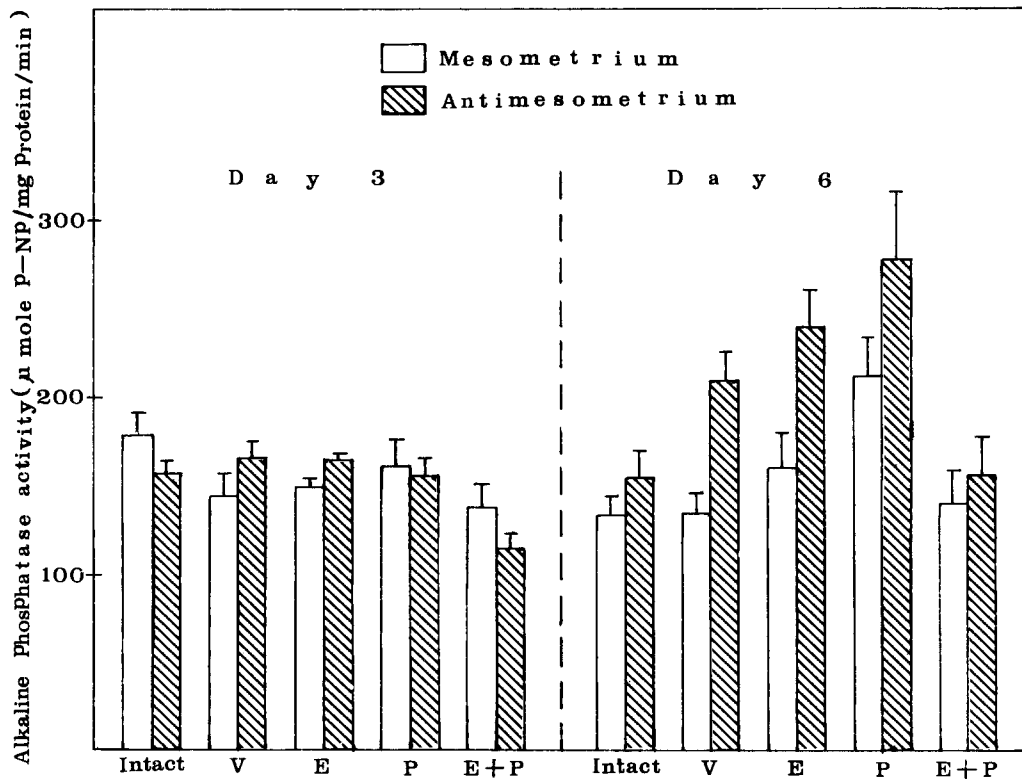


Fig. 3. Alkaline phosphatase activity in the rat uterine endometrium on Day 3 and Day 6. The abbreviations are the same as in Fig. 2.

인 임신 제 6 일, 착상 후 임신 제 9 일에서 자궁조직을 배아가 착상하게 되는 착상부위와 비착상부위로 분리하여 ALPase 활성을 관찰한 것을 Figs. 3과 4, 그리고 Table 1에 나타내었다.

1) 임신 제 3 일군(Fig. 3과 Table 1)

a) 태조군(비착상 부위 : mesometrium) : Intact군에서 ALPase활성은 $177.8 \mu\text{mole}$ 인데 용매처리군에서는 $144.7 \mu\text{mole}$, estradiol 처리군에서는 $149.5 \mu\text{mole}$, progesterone 처리군에서는 $161.5 \mu\text{mole}$ 그리고 두 호르몬 동시처리군(E + P)에서는 $138.4 \mu\text{mole}$ 을 나타내어 Intact군의 활성에 미치지 못하였다.

b) 착상부위(antimesometrium): Intact군의 ALPase활성이 $155.9 \mu\text{mole}$, 난소제거 용매처리군과 estradiol처리군에서는 $165.7 \mu\text{mole}$,

$165.9 \mu\text{mole}$, progesterone 처리군에서는 $156.8 \mu\text{mole}$ 로 처리군의 활성도가 Intact군의 활성도와 차이가 없으며, 두 호르몬 동시 처리군에서는 $115.8 \mu\text{mole}$ 로 비교치가 74%로 감소하고 있다.

2) 임신 제 6 일군(Fig. 3과 Table 1)

a) 태조군(비착상부위) : Intact군의 ALPase활성은 $133.8 \mu\text{mole}$, 용매 처리군에서는 $134.3 \mu\text{mole}$, estradiol처리군에서는 $159.4 \mu\text{mole}$, 두 호르몬 동시 처리군에서는 $140.8 \mu\text{mole}$ 로, Intact군과 비교할 때 유의한 차이가 없었으나, progesterone 처리군에서는 $212.3 \mu\text{mole}$ 의 활성을 나타내어, Intact군과의 비교치가 159%가 되어 유의한 차이($P < 0.05$)로 증가하였다.

b) 착상부위 : Intact군의 ALPase활성은 $155.1 \mu\text{mole}$ 이며, 용매처리군에서는 $210.4 \mu\text{mole}$ 로

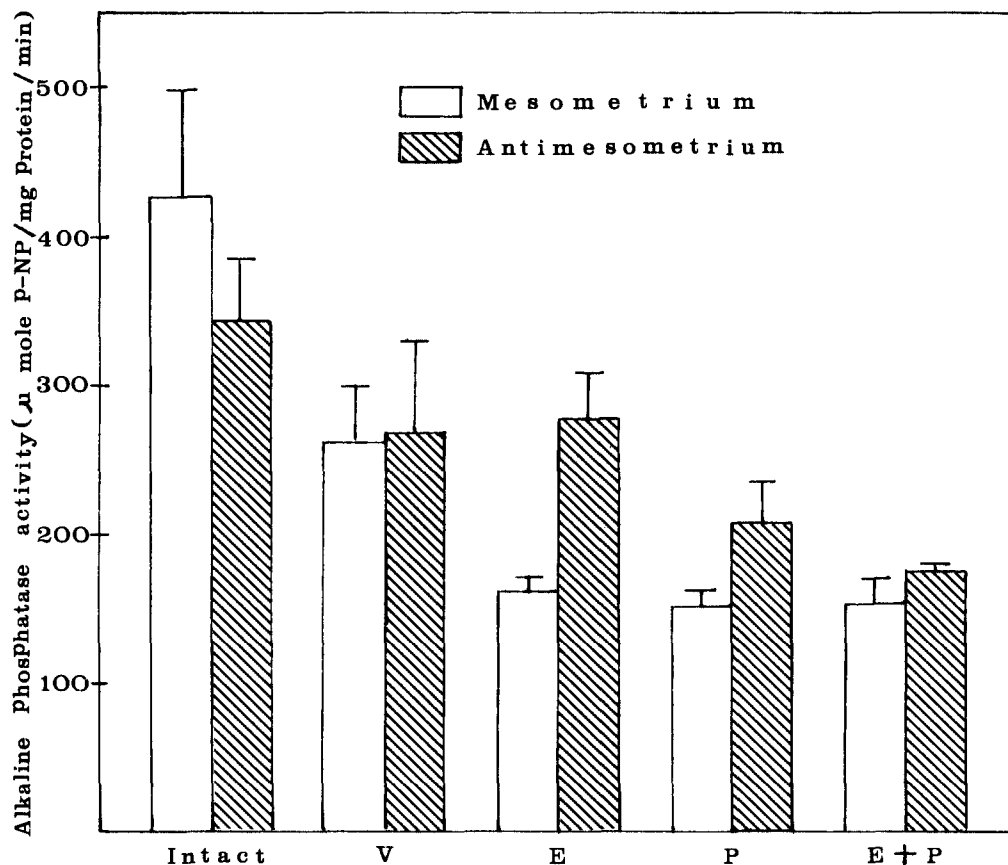


Fig. 4. Alkaline phosphatase activity in the uterine endometrium of the normal pregnant rats on Day 9. The abbreviations are the same as in Fig. 2.

Intact군에 비해 높아졌으나 유의한 차이는 아니다. estradiol처리군에서는 239.2 μmole, progesterone처리군에서는 278.8 μmole을 나타내어, Intact군과의 비교치가 각각 154%, 180%이 되며 유의한 차이(P < 0.05)로 증가하였다.

이처럼 임신 제 3일과 6일군에서 ALPase활성을 보면 임신 제 3일에는 착상부위와 비착상부위 간에 차이가 없으며 각 부위에서 호르몬 처리의 영향도 나타나지 않으나 임신 제 6일군에서는 착상부위의 활성이 비착상부위에 비해 유의하게(P < 0.05) 높은 활성을 나타내며 특히 progesterone처리군에서 영향이 크다. 착상시기인 임신 제 6일군의 착상부위의 분화가 임신 제 3일군보다 활발한 것을 알 수 있었다.

3) 임신 제 9일군(Fig. 4과 Table 1)

a) 비착상부위 : Intact군의 ALPase활성은 426.1 μmole로 높은 활성을 나타내나, 용매처리군에서는 263.0 μmole, estradiol처리군에서는 161.6 μmole, progesterone처리군에서는 152.4 μmole, 두 호르몬 처리군에서도 154.8 μmole로 호르몬 처리군에서 활성이 유의한 차이(P < 0.02)로 낮아지고 있어, Intact군의 활성과 비교하였을 때 각각 62, 38, 36, 36%의 낮은 비교치를 나타낸다.

b) 착상부위 : Intact군의 ALPase활성은 343.2 μmole인데 난소제거 용매 처리군에서는 269.8 μmole의 활성을, estradiol처리군에서는 277.3 μmole, progesterone처리군에서는 206.4 μmole, 두 호르몬 동시 처리군에서도 174.6 μ

Table 1. Alkaline phosphatase activity of the uterus in early pregnant rats.

Day of Pregnancy	uterus horn	Treatment				
		Intact	V	E	P	E + P
3	Antimesometrium	155.9±8.6 ^a (100)	165.7±11.6 (106)	165.9± 3.4 (106)	156.8±10.4 (101)	115.8± 8.8 (74)
	Mesometrium (control)	177.8±13.3 (100)	144.7±13.5 (81)	149.5± 6.3 (84)	161.5±16.3 (91)	138.4±15.1 (78)
6	Antimesometrium	155.1±15.0 (100)	210.4±15.8 (136)	239.2±21.8* (154)	278.8±56.1* (180)	156.3±22.1 (101)
	Mesometrium (control)	133.80±12.5 (100)	134.3±11.5 (100)	159.4±20.3 (119)	212.3±44.7* (159)	140.8±18.9 (105)
9	Antimesometrium	343.2±42.5 (100)	269.8±62.0 (79)	277.3±29.7 (81)	206.4±27.3 (60)	174.58±5.5 (51)
	Mesometrium (control)	426.1±72.7 (100)	263.0±38.9** (62)	161.6±11.0** (38)	152.4±13.0** (36)	154.8±16.8** (36)
9 (Pseudo pregnancy)	Trauma	316.6±20.4 (100)	231.1±19.2 (73)	194.0±9.0 (61)	626.9±12.5*** (198)	540.8±17.2* (171)
	Control	159.8±14.0 (100)	263.9±17.1* (165)	244.8±12.2** (153)	302.0±14.3** (189)	209.1±13.3 (131)

a; Mean ± SE (μ mole P-NP/mg protein/min), n = 5. Numerical numbers in parenthesis indicate the relative value (%) for ALPase activity of intact.

*; Significant vs Intact *; p < 0.05 **; p < 0.01 or 0.02

+: Significant vs Control +; p < 0.05 ++; p < 0.01 +++; p < 0.001

mole을 나타내고 있어 난소제거호르몬처리군의 활성이 Intact군의 활성에 비하여 각각 비교치는 79, 81, 60, 51%을 나타낸다.

이상의 정상 임신 제 3, 6, 9일군의 ALPase 활성을 보면 (Table 1), Intact군의 활성은 임신 제 9일군 비착상부위에서 임신 제 3일(P < 0.05)과 제 6일(P < 0.02)에 비하여 유의하게 증가하며 착상부위에서도 임신 제 3일(P < 0.01)과 제 6일(P < 0.01)에 비하여 유의하게 증가하고 있어 배아가 착상 후 분화할 때 자궁내막층의 대사활동이 가장 활발한 것을 알 수 있다.

그뿐 아니라 estradiol과 progesterone 호르몬 처리군의 활성을 착상부위와 비착상부위 별로 비교

해 보았을 때 착상부위 estradiol처리군에서는 ALPase 활성이 임신 제 3일군보다 6일군에서(P < 0.05), 9일군에서(P < 0.02) 유의한 차이로 증가하고 있으며, progesterone처리군에서도 3일군보다 6일, 9일군에서 활성이 증가하고 있으나 비착상부위에서는 증가현상이 나타나지 않는다. 이러한 현상은 호르몬의 장기간 처리가 탈락막형성에 더 효과적이라는 것을 시사하는 결과이다. 그러나 임신 제 9일처리군(착상, 비착상부위에서 다같이)의 활성을 Intact군과 비교했을 때는 비교치가 3, 6일군에서의 비교치보다 가장 낮아지고 있는데, 이는 제 9일의 Intact군의 활성치가 가장 높음에다가 Fig. 1에서 표시된 것처럼 임신 제 2

일에 난소를 제거하고 가장 장기간 난소가 걸여된 상태에서 호르몬 처리를 한 결과이므로 이런 상태의 호르몬 처리는 Intact군에 미치지 못하는 것으로 시사한다.

고 찰

포유류의 자궁은 발정주기 동안 형태(Smith, 1968; Kim and Kim, 1988)나 기능면(Ham *et al.*, 1979; Kim *et al.*, 1980)에서 주기적으로 변화가 일어나는 동적인 기관이다. 임신이 이루어질 경우 수정된 배아를 받아들여 착상시키고, 새로운 생명체로 발생할 수 있는 환경여건을 갖추기 위하여 자궁조직세포분화가 활발하게 일어난다. 즉 자궁내막조직의 분화는 초기 배아는 발생유도와 깊은 관련이 있으며 특히 배아가 자궁내막조직에 착상하기 위하여 배아와 내막조직간의 상호 인식(Finn and Martin, 1969)이 필수적인데 이런 인식의 메커니즘은 자궁내 단백질 성분에 의한 것(Kao and Bullock, 1981; Surani 1975, 1977 a, b)이라고 알려져 있다. 그 뿐 아니라 자궁내액의 특수단백질 성분들은 현장의 것과 비교해 보았을 때 농농수중(Lawn, 1973)에 의하여 자궁상피세포로부터 내강으로 분비 혹은 흡수된다고 생각된다. 이러한 분비 흡수, 영양물질의 수송과 관련있는 조직, 그리고 분열중에 있는 조직에서 ALPase의 활성이 높게 나타난다. 그뿐 아니라 초기 임신기간에 착상을 위한 분화작용이 활발한 탈락막에서 ALPase활성이 증가되며, 동시에 단백질 합성도 증가 되므로 ALPase는 탈락막 형성의 표지효소라고 하였다(Aitken, 1977).

본인들은 착상조건 기작을 규명하려는 연구의 일환에서 ALPase의 활성도를 발정주기별(Kim *et al.*, 1980; Kim and Kim, 1988)과 초기임신기간 중 자궁조직(Kim, 1986; 1987)에서 관찰했을 때 난소호르몬인 estrogen과 progesterone에 영향을 받으며 이 두호르몬은 자궁조직의 내강상피세포와 기질세포에 미치는 시기와 그 표적세포가 다르다는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험은 수정된 배아가 착상부위를 어떻게 인식하게 되는지, 그리고 착상부위 분화유발요인이 무엇인지 고찰하

고자 흰쥐의 로베기 배아가 같은 자궁각에서도 antimesometrium쪽에 착상하게될 때 자궁조직 분화의 지표가 되는 ALPase활성을 antimesometrium과 mesometrium에서 측정 관찰하였다. 또한 가임신을 유도시킨 흰쥐에 탈락막 형성을 유도하기 위하여 인위적으로 한쪽 자궁에 자극을 주고, 자극을 주지않은 다른 한쪽 자궁을 대조군으로 하여 비교 관찰하였으며, 또한 이의 결과를 정상임신군의 착상부위와 비착상부위의 결과와 다시 비교관찰하였다.

가임신군의 탈락막형성 유발을 위하여 자극(trauma)을 준 자궁에서 자극을 주지않은 대조군(non-trauma)에 비하여 Intact군에서 ALPase활성이 유의한 차이($P < 0.01$)로 증가하고 있으며, progesterone처리군과 두 호르몬 동시처리군에서도 유의한 차이($P < 0.001$)로 증가하고 있다. 이는 탈락막 형성 유발에 trauma가 효과적이라는 것과 특히 progesterone의 영향이 크다는 것, 그리고 탈락막유도에는 소량의 estrogen도 함께 작용한다는 것을 시사하는 결과이다. 한편 가임신군의 trauma를 받은 Intact군의 ALPase활성이 정상임신 제 9일군 착상부위의 Intact군의 활성과 유사할때 이 결과는 가임신유도와 탈락막 형성유도로서 정상임신군과 같은 효과를 나타낸 결과이므로 배아 이외의 인위적 자극으로서 자궁의 탈락막형성 유도가 가능하다는 것을 시사한다.

이러한 결과는 탈락막반응에 호르몬처리와 배양이외에 인위적인 trauma에 의한 자극(Loeb, 1908), 전기적 자극(Krehbiel, 1937), 자궁내에 주입된 oil에 의한 자극(Finn and Keen, 1962), 그리고 공기의 자궁내 주사에 의한 자극(Shelesnyak and Kraicere, 1959; Orsini, 1963)등이 자궁에 작용한다는 결과들과 일치되는 결과이다.

한편 정상임신군의 활성을 착상준비기간인 임신 제 3일과 착상시기인 임신 제 6일, 착상후 배아분화시기인 임신 제 9일에서 ALPase활성을 비교하였을 때 Intact군의 활성을 보면 임신 제 9일의 착상, 비착상부위에서 다같이 임신 제 3, 6일에 비하여 유의하게 높게 나타나는데, 이러한 결과는 배아가 착상하여 분화할 때 필요한 영양분을 생성, 분비해야할 때이므로 대사작용이 가장 활

발해진 것으로 사료된다. 그뿐아니라 estradiol과 progesterone처리군의 활성을 보면 착상부위의 estradiol처리군에서 ALPase활성이 제 3 일군보다 6일군에서, 그리고 9일군에서 유의한 차이로 증가하고 있으며, progesterone처리군에서도 3일군보다 6일, 9일군에서 활성이 증가하고 있으나, 비착상부위에서는 증가현상이 나타나지 않고 있다.

임신 제 9 일의 Intact군의 활성이 가장 높은 것은 이 시기는 배아가 착상한 후 분화, 발생하는 시기이므로 배아에게 공급할 영양분들을 생성, 운반해야 함으로 이 시기의 ALPase활성이 가장 높아진다고 생각된다. 이러한 결과는 ALPase는 영양물질의 수송과 관련있는 조직, 분비작용을 하는 기관, 그리고 분열중에 있는 조직에서 그 활성이 높게 나타난다고 발표한 보고(Davis *et al.*, 1980; Kao and Bullock, 1981)들과 일치하는 결과이며 착상부위의 분화가 난소호르몬의 영향을 받으며 착상시기부터 더욱더 활발해지는 것을 나타낸 결과이다.

그러나 임신 제 9 일의 처리군의 ALPase활성을 Intact군과 비교해 보았을 때 비교치가 임신 제 3 일, 6일군의 경우보다 가장 낮아지고 있다. 이는 제 9 일의 Intact군의 활성이 가장 높을 뿐아니라 Fig. 1에 표시된 것처럼 임신 제 2일에 난소를 제거하고 가장 장기간 호르몬을 처리한 결과이므로 이런 상태의 호르몬처리로서는 Intact군의 자궁조직 활성에는 미치지 못한 것으로 생각된다.

본 실험의 결과를 착상부위와 비착상부위별로 구별, 비교해 보았을 때 임신 제 3 일군에서는 부위별 차이가 없으나 착상시기인 임신 제 6 일군에서는 착상부위에, 특히 progesterone처리군에서 ALPase활성이 높게 나타나는데 이는 착상시기의 착상부위의 분화가 활발해지며, progesterone이 착상부위의 분화에 영향을 크게 미치는 것을 확증해 주는 결과이다. 이러한 결과는 본인등(1983)이 착상준비기간인 임신 제 3 일은 estrogen 농도가 second peak를 이루며, 임신 제 6 일에는 progesterone이 현저하게 높아지는 것을 관찰한 결과와, 임신 제 6 일의 자궁내막 조직에서 ALPase활성이 높아지면서 형태적 관찰에서도 기질세포층에서 탈락막 반응의 특징인 혈관의 permeability

와 blister가 커진 edema현상을 관찰할 수 있었던 본인등(Kim, 1983)의 보고와도 일치한다. 또한 이러한 결과는 McRae와 Heap(1988)은 임신 제 6 일 아침에 자궁액이나 혈액의 흐름, 그리고 혈관의 permeability가 착상부위에서 현저하게 증가한다고 발표한 결과와도 일치한다. 또한 임신 제 6 일군에서는 착상, 비착상부위 모두에서 ALPase활성이 임신 제 3 일군에 비하여 높게 나타나며, 특히 progesterone처리군에서 더욱더 높은데, 이러한 현상은 배란시기에 estrogen surge가 있을 후 임신 제 2일에 난소를 제거하고 호르몬처리를 하였으므로 같은 estradiol호르몬을 처리받은 실험군보다 progesterone을 처리받은 실험군에서 ALPase활성이 더 높게 나타난 결과로 생각된다. 또한 가임신군의 trauma를 받은 쪽에서도 progesterone처리군과 estradiol과 progesterone을 동시에 처리받은 실험군에서 ALPase활성이 크게 나타난다. 이상의 결과들은 Tachi등(1974)이 난소를 제거한 흰쥐 자궁내막조직세포층 기질세포는 estradiol과 progesterone을 동시에 처리하였을 때 분열이 활발해진다고 보고한 결과와 Nelson과 Pfiffner(1930)이 estrogen이 자궁조직을 분화시키는데 progesterone 보다 앞서 작용(Priming)한다는 보고, Marcus와 Shelesnyak(1967)과 Finn과 Martin(1969)이 estrogen을 착상유도 요소라고 한 보고와 Yochim(1975)이 priming estrogen은 착상을 initiation하는데 필요한 요인이며 progesterone은 자궁으로 하여금 착상을 준비하게 하고 임신을 유지하도록 하는데 결정적 역할을 한다고 한 결과들과 일치하는 결과이다.

본 실험을 통하여 본인이 행한 가임신 유도방법, 즉 자궁질부를 자극(Tapping 120회/1분)하여 가임신을 유도한 방법과, 자궁각에 Trauma(oil 주입; 0.1 ml/개체)를 주어 탈락막(Decidua)을 유발시킨 방법이 효과적이라는 것과, 착상 시기에 착상부위 분화에는 progesterone이 더 효과적이라는 확증을 얻었다. 그러나 탈락막 유발요인이 어떤 기전으로 착상부위를 분화시키는지는 앞으로의 연구과제로 남아있다. 그러므로 조직학적, 생리화학적, 그리고 분자생물학적인 다각적인 면에서의 연구가 절실히 요구됨으로 본인등은 이러한 면에 연구를 추진하고 있다.

인용문헌

- Aitken, R. J., 1977. Changes in the protein content of mouse uterine flushings during normal pregnancy and delayed implantation, and after ovariectomy and oestradiol administration. *J. Reprod. Fert.* **50**: 29-36.
- Blandau, R. J., 1961. Biology of Eggs and Implantation. In: Sex and Internal Secretions (Young, Bailliere, Tindall, and Cox., eds), 2nd ed., London, pp. 797-882.
- Bowers, G. N. and R. B. McComb, 1975. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.* **21**: 1988-1994.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Davis, Bernard, D., and Phang-C Tai, 1980. The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature* **283**: 433-438.
- Finn, C. A., 1971. Biology of Decidual Cells. In: Adv. Reprod. Physiol. 5, Bishop, Elck, London, pp. 126.
- Finn, C. A., 1972. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol. Reprod.* **7**: 82-86.
- Finn, C. A. and P. M. Keen, 1962. Studies on deciduomata formation in the rat. *J. Reprod. Fert.* **4**: 215-216.
- Finn, C. A. and L. Martin, 1969. Hormone secretion during early pregnancy in the mouse. *J. Endocrinol.* **45**: 57-65.
- Finn, C. A. and A. McLaren, 1967. A study of the early stages of implantaion in mice. *J. Reprod. Fert.* **13**: 259-267.
- Ham, Y. A., S. R. Kim, Y. S. Hong, and N. E. Sung, 1979. Effect of estrous cycel and preimplantation on hepatic microsomal cytochrome p-450 levels in mice. *Ewha Med. J.* **2**: 201-204.
- Hetherington, C. M., 1968. Induction of deciduomata in the mouse by carbon dioxide. *Nature* **219**: 863-864.
- Kao, L. W. L. and Bullock, 1981. Rates of uteroglobin synthesis by endometrial explants from different days of early pregnancy in the rabbit. *Biol. Reprod.* **25**: 820-824.
- Kim, M. K., S. R. Kim, and W. K. Cho, 1980. Changes in phosphatase activity of the mouse uterus during the estrous cycle. *Korean J. Zool.* **23**: 61-68.
- Kim, S. R., 1983. Ultrastructural and cytochemical studies on the uterine endometrial cells of rat at preimplantation stage. *Ewha Med. J.* **6**: 115-138.
- Kim, S. R., 1986. The effects of ovarian steroid hormones on the alkaline phosphatase activity in the luminal epithelial and stromal cells of early pregnancy rat uterus. *Kor. Res. Inst. Better Living.* **37**: 183-193.
- Kim, S. R., 1987. Studies on the effect of ovarian steroid hormones on the differentiation and metabolism in the rat uterine endometrium. *Korean J. Fertil. Steril.* **14**: 149-158.
- Kim, S. R. and M. K. Kim, 1988. A study of localization of alkaline phosphatase activity in ednometrium of mouse uterus during estrous cycle. *Ewha Med. J.* **11**: 215-223.
- Kim, S. R. and G. J. Choi, 1990. A study on the differentiation of the reproductive organs at early pregnant rats. *Ewha Med. J.* **13**: 127-138.
- Kim, S. R., S. K. Kang, K. J. Rhyu, and W. K. Cho, 1983. Estrogen and progesterone levels in peripheral plasma and the concentration of nuclear estradiol receptor in uterine endometrium at the early pregnant rats. *Ewha Med. J.* **6**: 261-268.
- Komm, B. S., H. S. Keeping, G. Sabogal, and C. R. Lyttle, 1985. Comparison of media proteins from ovariectomized rat uterine following estrogen treatment. *Biol. Reprod.* **33**: 443-450.
- Komm, B. S., D. J. Rusling, and C. R. Lyttle, 1986. Estrogen regulation of protein synthesis in the immature rat uterus: The analysis of proteins released into medium during *in vitro* incubation. *Endocrinology* **118**: 2411-2416.
- Krehbiel, R. H., 1937. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol. Zool.* **10**: 212-233.
- Lawn, A. M., 1973. The Ultrastructure of the Endometrium During the Sexual Cycle. In: Adv. Reprod. Physiol. (6th ed.), London. pp. 61-97.
- Lee, A. E and W. R. Dukelow, 1972. Synthesis of DNA and mitosis in rabbits uterine after oestrogen and progesterone injections, and during early pregnancy. *J. Reprod. Fert.* **31**: 473-476
- Loeb, L., 1908. The production of deciduomata and the relation between the ovaries and the formation of decidua. *J. Amer. Med. Assoc.* **50**: 1987-1991.
- Marcus, S. T. and M. C. Shelesnyak, 1967. Studies on the mechanism of nidation XXV 1. Pro-oestrous oestrogen as a hormonal parameter of nidation. *Endocrinology* **80**: 1038-1042.
- McLaren, A., 1970. Early Embryo-Endometrial Relationships In: Ovo-implantation, Human Gonadotrophins and Prolactin (J. E. Hublnot, F. Leroy, C. Robyn and P. Leleux, eds.), Karger, Basel. Munchen and New York, pp. 18-37.
- McRae, A. C. and R. B. Heap, 1988. Uterine vascular permeability blood flow and extracellular fluid space during implantation in rat. *J. Reprod. Fert.* **82**:

- 617-625.
- Nelson, W. O. and J. J. Pfaffner, 1930. Experimental production of decidualomata in the rat by an extract of the corpus luteum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **27**: 863-866.
- Orsini, M. W., 1963. Induction of decidualomata in hamster and rats by injection of air. *J. Endocrinol.* **28**: 119-121.
- Psychoyos, A., 1967. The Hormonal Interplay Controlling Egg Implantation in the Rat. In: *Adv. Reprod. Physiol.* (2nd ed.), London, Logos-Academic, pp. 257-278.
- Shelesnyak, M. C., 1960. Nidation of the fertilized ovum. *Endeavour* **19**: 81-86.
- Shelesnyak, M. C. and P. E. Kraicer, 1959. La pyrazine est un anti-histaminique capable de provoquer le deciduome uterine par liberation d'histamine dans l'organisme. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris*, **248**: 2126-2128.
- Smith, D. M., 1968. The effect on implantation of treating cultured mouse blastocysts with oestrogen *in vitro* and the uptake of ^3H -oestradiol by blastocysts. *J. Endocrinol.* **41**: 17-29.
- Surani, M. A. H., 1975. Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implication for implantation and embryonic diapause. *J. Reprod. Fert.* **43**: 411-417.
- Surani, M. A. H., 1977a. Qualitative and quantitative examination of the proteins of rat uterine luminal fluid during pro-oestrus and pregnancy and comparison with those of serum. *J. Reprod. Fert.* **50**: 281-287.
- Surani, M. A. H., 1977b. Radiolabeled rat uterine luminal proteins and their regulation by oestradiol and progesterone. *J. Reprod. Fert.* **50**: 289-296.
- Tachi, C., S. Tachi, and H. R. Lindner, 1974. Effects of ovarian hormones upon nucleolar ultrastructure in endometrial stromal cells of the rat. *Biol. Reprod.* **10**: 404-413.
- Yochim, J. M., 1975. Development of the gestational uterus. *Biol. Reprod.* **12**: 106-133.

(Accepted July 30, 1991)

A Study on the Differentiation of the Implantation Sites in the Pseudopregnant Rat Uterus

Sung Rye Kim (College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea)

In an effort to elucidate the mechanism underlying implantation process, the present investigation has been undertaken to determine the effect of ovarian steroids and artificial stimulation (trauma) on the differentiation of uterine endometrium and decidualization for implantation. The activity of alkaline phosphatase (ALPase), known as a marker enzyme was examined in the antimesometrium and mesometrium sites of the normal and pseudopregnant rat uterus. In the pseudopregnant rat uterus, the sensitivity of ALPase activity to trauma in the progesterone (P)-treated and progesterone and estradiol (E + P)-treated groups was significantly ($P < 0.001$) higher than that in nontraumatized control groups.

On Day 6 (implantation stage), in normal pregnant rat uterus, the effects of E and P on the differentiation of antimesometrium were markedly ($P < 0.05$) higher than that of the mesometrium. In particular, both in the mesometrium and antimesometrium on Day 6, ALPase activity was significantly ($P < 0.05$) higher in the P-treated group than in intact group. In intact normal pregnancy, ALPase activities in both tissue of antimesometrium and mesometrium on Day 9, were clearly highest than those on Day 3 and 6.

These results indicate that the differentiation of implantation sites become apparent from the implantation stage. The differentiation of the implantation sites seems to be promoted by progesterone, and the decidualization can be induced by the artificial trauma.