

수정란 착상에 영향을 미치는 자궁내인자에 관한 연구

이 성 수·권 중 국
서울대학교 수의과대학
(1992년 9월 10일 접수)

Studies on intrauterine factors influencing on implantation of embryo

Sung-soo Lee, Jong-kuk Kwun
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Sept 10, 1992)

Abstract : The present study was performed to identify the factors influencing on early pregnancy and embryo implantation in rabbit. Serum, uterine fluid, and uterine tissue were collected on day 0, 3, 5, 7 and 9 of pregnancy.

The intrauterine environment of receptive phase and refractory phase was compared by measuring protein synthetic capacity of endometrium, amino acid composition and concentrations of lipids(phospholipid, cholesterol).

The results obtained were as follows :

1. The concentrations of total protein were significantly increased ($p < 0.01$) on day 5 (7.00 ± 0.55), 7 (6.29 ± 0.65), and 9 (6.34 ± 0.61), compared to those on day 0 ($5.50 \pm 0.12g/100m\ell$) in serum. The concentration of albumin on day 0 was 0.81 ± 0.05 and reached maximum on day 5 ($1.59 \pm 0.07g/100m\ell$) in serum.

The concentrations of total protein were significantly increased ($p < 0.01$) on day 5 (1.56 ± 0.10), 7 (1.99 ± 0.22), compared to those on day 0 ($0.38 \pm 0.02g/100m\ell$) in uterine fluid.

The concentration of albumin on day 5 ($0.78 \pm 0.05g/100m\ell$) was higher than those on the other days in uterine fluid.

2. The incorporation rates of [3H]-leucine into protein were significantly increased ($p < 0.01$) on day 5 (919.6 ± 97.5), 7 (1445.4 ± 95.9) and 9 (450.38 ± 28.71), compared to those on day 0 ($328.2 \pm 38.9cpm/mg$ protein) in endometrium. The incorporation rates in colchicine-treated endometrium on day 5 (1341.9 ± 73.8), 7 ($1729.4 \pm 63.3cpm/mg$ protein) were significantly higher ($p < 0.01$) than those on the other days.

3. The compositions of amino acid were not distinctly changed during early pregnancy in serum. The composition ratios of methionine, lysine were distinctly decreased on day 3, compared to those on day 0 in uterine fluid. Those of glycine, alanine were increased on day 9, compared to those on other days but histidine decreased in uterine fluid.

4. The concentrations of total phospholipid and total cholesterol were significantly decreased ($p < 0.01$) on day 3 (77.9 ± 15.5 , 61.5 ± 21.2), compared to those on day 0 (164.0 ± 33.9 , $167.2 \pm 46.2mg/100m\ell$) in serum.

* 이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

The concentrations of total phospholipid and total cholesterol on day 9 (47.3 ± 13.4 , $37.7 \pm 9.6\text{mg}/100\text{m}\ell$) were significantly higher ($p < 0.01$) than those on the other days in uterine fluid.

5. Total phospholipid/total cholesterol ratios were not significantly changed during early pregnancy in serum. However, total phospholipid/total cholesterol ratios on day 5 (2.00 ± 0.42), 7 (1.11 ± 0.77) and 9 (1.47 ± 0.30) were higher than those on day 3 (0.84 ± 0.41) in uterine fluid.

6. The concentrations of phosphatidylcholine and phosphatidylserine were significantly increased ($p < 0.01$) on the other days, compared to those on day 0 during early pregnancy in serum.

The concentrations of phosphatidylcholine were significantly increased ($p < 0.01$), compared to those on day 0 and those of phosphatidyl-ethanolamine were consistently increased but not significant in early pregnancy in uterine fluid.

Key words : uterine fluid, receptive phase, refractory phase, protein, lipid.

서 론

수정직후부터 착상까지의 초기임신기에 대한 연구들은 마우스, 랫드 그리고 토끼 등의 실험동물에서 광범위하게 수행되었다. Chang¹은 수정란이식 연구를 통해 착상은 초기임신기에 극히 제한된 시간동안 특이한 변화를 겪고 있는 자궁에서 일어남을 알게 되었으며 이 시기를 수용기(receptive phase)라고 하였다.² 이같은 자궁수용기는 휴지기에 있던 blastocyst가 활성화되고 활성화된 blastocyst의 신호를 받은 자궁의 반응능력 변화에 의해서 이루어진다.³ 즉, embryo와 자궁사이의 동기화는 수정란이 착상하는데 필수적이며 이같은 동기화과정은 랫드 호르몬과 스테로이드 호르몬에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다.⁴

착상이 일어날 것이라 기대되었던 시기, 즉 수용기를 넘어서면 자궁이 곧 불용기(refractory phase) 또는 비수용성 상태가 되어 어떤 단계의 이식 수정란도 자궁내에서 살아남을 수 없게된다.^{2,3}

임신초기의 쥐에서 임신 5일째 자궁내 환경의 변화가 일어남을 관찰하였으며 임신 4일째의 난을 채취하여 임신 5일째 자궁에 다시 이식하여 9시간이 지난후에 회수하여 보았을 때 난에 심각한 손상이 관찰되었다.^{5,6} 이와같이 임신 5일 이후, 불용기의 자궁내 환경은 수정란 생존에 대해 매우 부적절하게 변화하며 이들 변화는 호르몬에 의하여 유도되어진다.^{7,8} 수용기와 불용기는 estrogen 분비후 시간에 따라 나타나는데 이러한 estrogen 효과는 약 48시간동안의 progesterone에 의한 자궁내막이 전처치되었을 때만 나타나며 이 전처치는 수용기 전 시기인 중성상태를 이루도록 해준다. 이 시기에 자궁은 blastocyst가 생존하기 위한 조건뿐만 아니라 탈락막 반응을 위한 최적의 감도를 나타내지만 역시 휴지상태이다. 즉 progesterone만으로는 착상이 유도되지지 않

고 estrogen이 중성상태에 있는 자궁에 작용해야만(progesterone 전처치후 36시간까지) 수용기를 유도할 수 있다.³ 수용기가 지나면 자궁내막은 더 이상 탈락막 반응을 나타내지 않으며 자궁내 환경은 착상되지 않은 난의 생존에 부적합하게 된다.^{5,6} 중성 또는 비수용기 상태의 자궁을 유지하려면 progesterone의 지속적 분비를 필요로 하며 48시간이상 progesterone을 차단하면 자궁이 새로운 임신을 수용할 수 있는 상태로 되돌아 간다.^{3,5} 시간적으로 짧은 수용기는 중성과 불용기 사이의 일시적 현상으로서 나타난다.

O'Neill과 Quinn¹⁰은 착상한 동물의 자궁내강액이 휴지기의 수정란을 지닌 동물의 자궁내강액보다 blastocyst의 부착을 유의성있게 증가시키며 지연착상을 보이는 mouse blastocyst의 억제인자는 호르몬에 의해 영향을 받지 않는 비분화된 자궁내강액의 비특이적 억제인자에 의하여 조절된다고 보고하였다. 착상시 estrogen은 자궁 분비물들의 양과 성상을 변화시킴으로써 blastocyst 활성화에 영향을 미치는데¹¹ 여러 종의 동물에서 자궁내막의 분비능력은 능동적이며 분비단백질들의 성상은 혈장과 다르다. 단백질 합성의 양상은 모체의 혈중 스테로이드 호르몬 농도와 밀접한 관계를 맺고 변화하는데 분리정제 되어진 자궁내 분비단백질의 수는 매우 적다. 쥐의 초기임신에 있어 자궁의 단백질 합성능력은 이상성(siphasic)을 나타내어 임신 3일에 증가했다가 임신 4일에 감소하고 다시 임신 5일에 증가한다.¹² 아미노산 농도는 품종과 발육 단계에 따라 다르고 자궁내강액의 농도는 난소호르몬에 의하여 그 조성이 변화되어진다.¹³ 이러한 생식도관내의 각각의 아미노산 농도 보다는 조성율의 변화가 시기에 따른 수정란에 큰 영향을 나타낸다.

자궁의 지질은 estrogen에 의해 생성이 촉진되며¹⁴ 단백질과 RNA의 증가에 이어 증가된다.¹⁵ Montane와 Pe-

rez-Ballester¹⁵는 자궁의 phosphatidyl-choline/phosphatidylethanolamine 비율에 있어 증가가 자궁내막의 유동성을 증가시키며 이러한 막의 생물·물리학적 변화는 blastocyst 착상과 초기수정란 발육과 관련되어 일어날 것이라 하였다. 인지질 대사는 특이적으로 초기 estrogen 작용에 감수성 있게 작용하여 *in vivo*에서 estrogen 처치 6시간후 ethanolamine, choline 그리고 inositol phospholipid가 rat 자궁에서 150%까지 증가하였다.¹⁶ 그리고 난관액중의 콜레스테롤 그리고 인지질이 정자의 수정능 획득과 침체반응에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹⁷

자궁환경의 조성은 수정란과 자궁내막간의 상호작용에 의하여 일어나는 지속적인 선택적인 분비와 재흡수에 의해서 이루어진다.⁶ 지금까지 단백질이 자궁내막과 blastocyst의 동기화, 난의 부착, 착상, 면역학적 방어, 영양 등에 어떠한 역할을 하는지에 관하여 많은 관심을 갖고 연구되었음에도 불구하고 뚜렷한 생리적 작용에 대한 보고들은 거의 없다.¹⁸ 또한 지질도 난관내의 지질의 변화,¹⁷ 자궁조직의 지질변화¹⁵에 대하여 연구보고되고 있으나 자궁내강액의 콜레스테롤과 인지질이 착상을 비롯한 초기임신동안에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 적다.

이에 본 연구에서는 동물의 초기임신시기에 착상과 관련된 수용기와 불용기를 일으키는 인자를 밝혀내고자 토끼의 초기임신 단계에서 혈청, 자궁내강액 및 자궁을 채취하여 자궁의 수용기와 불용기의 자궁내 환경을 알고자 자궁내막의 단백질 합성을, 자궁내강액의 아미노산 조성, 그리고 지질농도(인지질, 콜레스테롤)변화 등을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 성숙된 뉴우질랜드 화이트 토끼(평균 체중 2.5~3.0kg, 한국실험동물연구소)를 21~27°C의 실온에서 사육하면서 자유로이 물과 사료(삼양사)를 급여하였다. 동물은 무작위로 나누어 실험군당 10마리씩 배치하여 실험에 사용하기전 1주일간 순화시켰으며 권등¹⁸의 방법에 의하여 인공수정하여 임신토끼를 실험에 사용하였다. 인공수정을 실시한 날을 임신 0일(Day 0)로 하여 실험군을 Day 0, 3, 5, 7 그리고 9군 등 총 5군으로 나누어 실험에 사용하였다.

실험방법

1. **총단백질 정량 및 알부민 분석 :** 임신초기에 실험군별로 심장체혈을 실시하여 혈청을 분리한후 총단백질 정량 및 알부민 분석시까지 냉동(-70°C)보관하였다. 이후 토끼를 경추타격법으로 희생시킨후 자궁을 적출하여 한쪽 자궁은 멸균 증류수로, 반대쪽 자궁은 생리식염수

(3ml)로 각각 세척하여 자궁내강액을 회수한후 총단백질 정량 및 알부민 분석시까지 냉동 보관하였다. 혈청 및 자궁내강액의 총단백질량은 Lowry법²⁰으로 정량하였으며 알부민량은 Blood Chemical Analyzer(SBA 300)를 이용하여 분석하였다.

2. **자궁에 있어 단백질 합성을 측정 및 단백질 정량 :** 실험군별로 토끼를 경추타격법으로 희생시켜 자궁을 적출한 다음 약 30mg의 자궁절편을 취하여 종으로 절개한 다음 2mm×2mm의 크기로 잘라 4개의 sample을 만들어 Miller와 Moore²¹의 방법에 따라 단백질 합성율을 측정하였다. 두개의 sample은 10⁻⁵M colchicine(Fluka, Buchs, Switzerland)을 포함한 M199 배양액 1ml에 넣고 그리고 다른 두개의 sample은 배양액 1ml에 넣어 37°C, CO₂ incubator에서 2시간 배양시킨후 3μCi [³H] leucine(SA. 53.0 Ci/mmol, Du Pont, USA)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다.

배양이 끝난 자궁근 절편은 0~4°C의 생리식염수로 3회 세척하고 TED 완충액[10mM Tris(pH 7.2 at 25°C), 1.5mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol] 1.5ml을 넣어 빙조안에서 glass homogenizer에 넣어 분당 15초동안 균질화시키는 과정을 4회 반복하였다. 그 균등액 1ml을 scintillation vial에 취하고 10% perchloric acid 용액 1ml씩을 첨가하여 90°C 수조안에서 30분간 가열처리한후 800×g에서 10분간 원심시켰다. 침전물은 다시 5% perchloric acid 용액 1ml씩을 첨가하여 800×g에서 10분간 재원심시켰다. 재원심시켜 얻어진 침전물에 1N NaOH용액 0.5ml씩 첨가한 다음 10시간이상 실온에서 방치한후 200 μl를 취하여 LSC COCKTAIL(Du Pont, USA) 5ml씩을 넣고 vortex mixing한 다음 liquid scintillation counter(Beckman, LS-100C, USA)로 5분간씩 계측하였다. 또한 자궁조직의 단백질 함량은 Lowry법²⁰으로 정량하였다.

3. **아미노산 분석 :** 실험군별로 4°C에 냉장보관되던 혈청과 자궁내강액 1ml와 5-sulphosalicylic acid 50mg씩을 Pyrex tube에 넣고 잘 섞었다. 잘 섞어 4°C에서 1시간 정도 정치시킨 후 원심분리(15분, 3,000rpm)시켰다. 상층액 0.5ml를 취한 후 loading buffer인 sodium citrate buffer(pH 2.2)를 0.5ml를 넣었다. 이 혼합물 1ml용액에서 40 μl를 취하여 Automatic Amino acid analyzer(LKB, Model4150-Alpha, Sweden)로 아미노산 각 분석을 측정하였다.

4. **Total phospholipid와 total cholesterol 정량 :** 실험군별로 분리·냉동보관(-70°C)하였던 혈청과 자궁내강액을 total phospholipid는 인지질시약(RM142-K)(IAT-RCN, Japan)으로, total cholesterol은 cholesterol reagen-

t(CIBA-CONING, USA)를 이용해 Blood Chemical Analyzer(SBA 300)로 분석하였다.

5. TLC를 이용한 phospholipid의 분리: 혈청과 자궁내강액에서 지질을 추출하기 위하여 추출용매인 chloroform : methanol(2 : 1, V : V)²¹을 하나의 액상이 형성될 때까지 가한후 15분이상 정치시킨후 원심분리(800×g)하여 변성단백질을 제거하였다. 이후 0.05M CaCl₂ 1ml를 가하고 vortex mixer로 충분히 혼합하여 유화가 형성되도록 하였다. 30분간 정치하여 두 액상이 생긴후 상층액(chloroform : methanol : water, 3 : 42 : 47)을 제거하였다. 지질을 포함하고 있는 하층액을 methanol : water(1 : 1) 10ml로 세척한후 진공의 증발장치(40~50°C)를 이용하여 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 chloroform : methanol(2 : 1)로 완전히 용해후 박층 크로마토그래피 실시전까지 -20°C에서 보관하였다.

박층판은 Silica Gel 60 F₂₅₄ plates(10×10cm, 250 μm)를 사용하였으며 1차 전개액은 chloroform : methanol : ammonia(65 : 35 : 5)을 사용하여 전개후 460W dryer로 5분간 완전히 건조시킨후 2차 전개하였다. Plate를 90도 돌려 제2차 전개액인 chloroform : methanol : acetone : acetic acid : water(10 : 2 : 4 : 2 : 1)로 전개후 공기중에서 자연건조시켰다. 건조된 박층판을 iodine tank에서 염색하였다.²³ 이때 사용된 phospholipid standard는 각각 10 μg를 전개하였으며 추출지질은 50 μl를 각각 전개하였다.

각각의 phospholipids를 정량하기 위해 phosphate assay²⁴를 실시하여 spectrophotometer를 이용해 830nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 자궁내막의 세포소기관 관찰: 자궁내막을 5% glutaraldehyde(pH 7.0~7.2)에 90분간 4°C에서 전고정한후 자궁내막 크기가 1mm³ 정도 되도록 절편을 만든 다음 1% osmium tetroxide에서 90분간 후고정하였다. 후고정한 후 Sorensen phosphate buffer용액으로 세척후 농도를 달리한 alcohol로 탈수시켰으며 propylene oxide 및 propylene oxide와 epon mixture의 혼합물에서 치환작업을 하고 epoxy resin embedding media에 포매하였다. 포

매한 block을 ultramicrotome(LKB NOVA, Sweden)으로 초박절편하여 300 mesh gride에 mounting하고 2% uranyl acetate로 40분동안 1차 염색하고 lead citrate로 60초간 2차 염색하였다. 준비된 표본은 투과전자현미경(CM12, Philips, Netherland)으로 관찰하였다.

7. 통계학적 분석: 본 실험에서 얻어진 성적은 Tukey's studentized range test를 이용하여 1%수준(단, albumin량 : 5% 수준)에서 유의성을 검정하였다.

결 과

총단백질 및 알부민량: 혈청의 총단백질량은 임신 5일에 7.00±0.55, 임신 7일에 6.29±0.65, 임신 9일에 6.34±0.61로 임신 0일 5.05±0.12(g/100ml)에 비하여 유의성(p<0.01)있게 높았으며 알부민 농도도 임신 0일에 0.81±0.05인 반면에 임신 5일에 1.59±0.07(g/100ml)로 최고치를 보였다. 자궁내강액의 총단백질량은 임신 5일에 1.56±0.10, 임신 7일에 1.99±0.22로 임신 0일 0.38±0.02(g/100ml)에 비하여 유의성(p<0.01)있게 높아 혈청의 경향과 일치하였다. 자궁내강액의 알부민농도는 임신 5일에 0.78±0.05(g/100ml)로 다른 군들에 비하여 유의성(p<0.05)있게 높았다. 그러나 혈청의 총단백질량은 임신 5일에 최고치를 나타낸 반면 자궁내강액에선 임신 7일에 최고치를 나타내었다(Table 1).

자궁에서 [³H]-leucine의 단백질로의 결합율: [³H]-leucine의 단백질로의 결합율은 임신 3일에 385.88±29.95, 임신 5일에 919.63±97.50, 임신 7일에 1445.38±95.86 그리고 임신 9일에 450.38±28.71로 임신 0일 328.16±38.88(cpm/mg protein)에 비하여 유의성(p<0.01)있게 높았으며 특히 임신 5일과 임신 7일에는 다른 군들에 비하여 상당히 높은 결합율을 보여주었다. 반면에 착상이 일어난후 즉, 임신 9일에 급격히 감소함을 보였다. Colchicine을 처치한 자궁조직에서는 임신 0일 490.86±23.05, 임신 3일 522.71±34.13, 임신 9일에 504.43±16.02에 비하여 임신 5일 1341.86±73.77, 임신

Table 1. Total protein and albumin concentrations in serum and uterine fluid(g/100ml) (n=7, Mean±S.D)

Days post coitum	Serum		Uterine fluid	
	total protein	albumin	total protein	albumin*
D 0	5.05±0.12 ^c	0.81±0.05 ^c	0.38±0.02 ^a	0.13±0.02 ^a
D 3	5.54±0.39 ^{bc}	1.32±0.05 ^b	0.44±0.02 ^a	0.16±0.02 ^a
D 5	7.00±0.55 ^a	1.59±0.07 ^a	1.56±0.10 ^b	0.78±0.05 ^b
D 7	6.29±0.65 ^{ab}	1.53±0.05 ^a	1.99±0.22 ^c	0.33±0.05 ^c
D 9	6.34±0.61 ^{ab}	1.59±0.04 ^a	0.58±0.14 ^a	0.21±0.03 ^d

Means with the different letter are significantly different(p<0.01, * p<0.05).

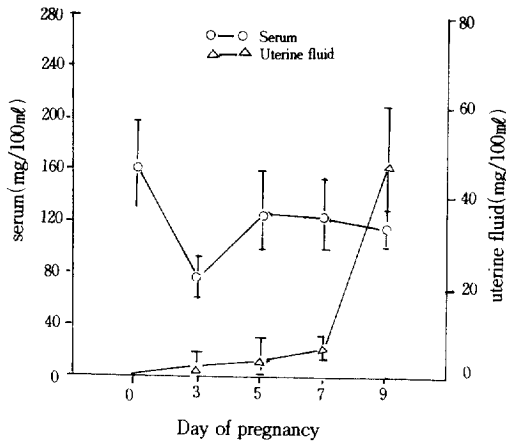


Fig 1. Total phospholipid concentrations in serum and uterine fluid.

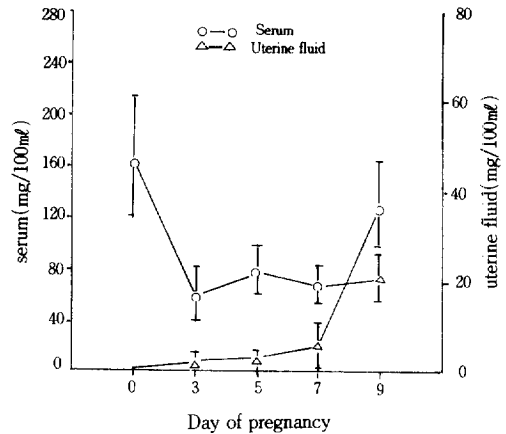


Fig 2. Total cholesterol concentrations in serum and uterine fluid.

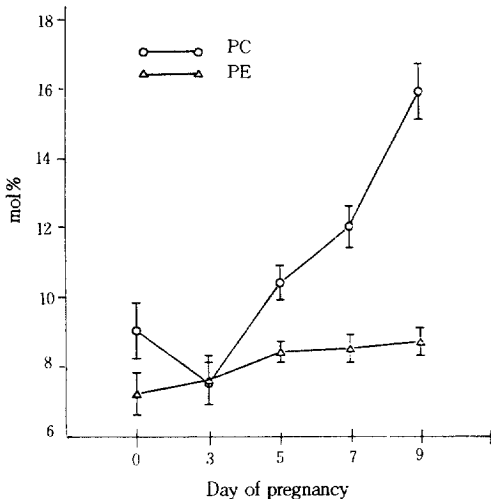


Fig 3. Phosphatidylcholine(PC) and phosphatidylethanolamine(PE) concentrations in uterine fluid.

Table 2. Incorporation rate of [³H]-leucine into protein in the endometrium and colchicine-treated endometrium (cpm/mg protein) (n=7, Mean±S.D.)

Days post coitum	Endometrium	Colchicine-treated endometrium
D 0	328.16±38.88 ^d	490.86±23.05 ^c
D 3	385.88±29.95 ^{cd}	522.71±34.13 ^c
D 5	919.63±97.50 ^b	1341.86±73.77 ^b
D 7	1445.38±95.86 ^a	1729.43±63.25 ^a
D 9	450.38±28.71 ^c	504.43±16.02 ^c

Means with the same letter are not significantly different (p<0.01).

7일에 1729.43±63.25(cpm/mg protein)로 유의성(p<0.01)있게 높게 나타났다(Table 2).

아미노산 조성 변화: 혈청에서는 아미노산의 조성에 있어 임신 경과에 따른 변화가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나 자궁내강액에서는 임신 전에 높은 조성 비율을 보이던 methionine과 lysine이 임신 3일에 급격히 감소하여 일정한 조성비율을 보였다. Glycine과 alanine이 착상 후 즉, 임신 9일에 급격한 증가를 보였으나 histidine은 급격한 감소를 나타내었다. 반면에 proline은 임신 5일부터 점차적인 감소를 보였고 arginine은 착상을 전후로 최고치를 보였다가 급격하게 감소하였다.

총인지질 및 총콜레스테롤량: 혈청의 총인지질량은 임신 3일에 77.9±15.5로 임신 0일에 164.0±33.9 (mg/100ml)에 비해 유의성(p<0.01)있게 감소하였다가 다시 임신 5일에 유의성(p<0.01)있게 증가하여 그후 일정하게 유지되었다. 자궁내강액의 총인지질량은 임신 9일에 47.3±13.4(mg/100ml)로 다른 군들에 비하여 유의성(p<0.01)있는 증가를 보였다(Fig 1).

총콜레스테롤량은 총인지질량과 실험군에 따른 비슷한 변화를 나타내었다. 혈청의 총콜레스테롤량은 임신 0일에 167.2±46.2로 임신 3일 61.5±21.2, 임신 5일 79.9±19.9, 임신 7일 69.0±15.3 그리고 임신 9일에 74.0±17.5(mg/100ml)에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 높았다. 자궁내강액의 총콜레스테롤량은 임신 9일에 37.7±9.6로 임신 0일 1.2±0.4, 임신 3일 2.7±1.5, 임신 5일 3.6±1.7 그리고 임신 7일에 6.5±5.0(mg/100ml)에 비하여 유의성(p<0.01)있게 증가하였다(Fig 2).

총인지질 : 총콜레스테롤 비율: 혈청에서는 총인지질 : 총콜레스테롤 비가 유의성(p<0.01)있는 변화를 나타내지 않았으나 자궁내강액에서는 임신 3일 0.84±0.41으로 임신 0일에 1.90±0.53에 비하여 감소하였으며 착

Table 3. Amino acid(A.A.) composition in serum (% of Total)

AMINO ACID	DAY 0	DAY 3	DAY 5	DAY 7	DAY 9
ASP	2.97	2.32	2.09	4.11	2.78
THR	5.60	8.24	3.41	3.48	6.27
SER	4.75	4.72	3.59	5.66	5.29
GLU	7.36	5.68	5.47	4.39	5.62
PRO	3.54	1.75	3.59	3.61	3.92
GLY	9.86	9.61	7.63	11.62	10.45
ALA	6.33	4.43	4.35	7.53	6.03
VAL	7.14	10.07	7.22	7.03	6.27
MET	5.71	6.24	9.55	6.60	8.72
ILE	4.48	3.81	5.50	5.42	3.94
LEU	6.23	6.16	6.15	7.77	6.59
TYR	8.68	6.36	9.79	5.35	4.44
PHE	3.99	4.01	6.64	4.80	3.01
HIS	5.80	8.24	6.90	5.83	8.11
LYS	6.94	8.96	8.48	9.07	8.76
ARG	10.32	9.39	8.61	7.71	9.79

Values shown are % of total amino acid.

Table 3. Amino acid(A.A.) composition in serum (% of Total)

AMINO ACID	DAY 0	DAY 3	DAY 5	DAY 7	DAY 9
ASP	2.29	5.02	5.60	3.92	3.43
THR	2.14	2.55	3.89	2.53	6.92
SER	2.25	3.14	2.74	2.94	8.07
GLU	7.45	9.64	7.37	6.63	9.26
PRO	5.79	9.24	6.18	3.35	1.93
GLY	3.16	6.88	5.69	5.31	11.75
ALA	2.65	6.83	6.79	3.91	14.17
VAL	5.74	5.92	6.22	4.52	3.29
MET	10.01	6.89	4.28	2.45	3.03
ILE	4.34	4.83	2.96	3.66	3.63
LEU	4.44	5.36	5.71	4.49	4.91
TYR	5.53	4.60	6.30	7.05	6.41
PHE	8.28	10.89	5.02	12.95	7.25
HIS	15.31	5.22	15.67	8.10	6.19
LYS	11.23	8.11	7.21	18.96	7.82
ARG	9.43		8.36		1.91

Values shown are % of total amino acid.

Table 4. Total phospholipid : Total cholesterol ratio in serum and uterine fluid

Days post coitum	Serum	Uterine fluid
D 0	1.35±0.63 ^a	1.90±0.53 ^a
D 3	1.45±0.28 ^a	0.84±0.41 ^b
D 5	1.62±0.09 ^a	2.00±0.42 ^a
D 7	1.67±0.32 ^a	1.11±0.77 ^{ab}
D 9	1.68±0.23 ^a	1.47±0.30 ^{ab}

Means with the same letter are not significantly different(p<0.01).

상기를 전후로 하여 임신 7일에 1.11±0.77 그리고 임신 9일에 1.47±0.30으로 유의성(p<0.01)있게 증가하였다

(Table 3).

인지질 조성 변화 : 혈청에서는 PI, PC, PS가 임신 3일에 임신 0일에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하였고 LPC는 임신 5일에 증가하기 시작하였다(Table 4).

자궁내강액에서는 PC가 임신 5일에 임신 0일에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하기 시작하였고 PE, LPC, LPE 그리고 LPS는 초기임신기동안 지속적인 증가를 나타내지만 유의성(p<0.01)있는 변화는 나타나지 않았다(Table 5).

PC/PE 비율이 수정란이 자궁내막에 부착하기 전인 임신 5일에 급격히 증가되기 시작하였다(Fig 3).

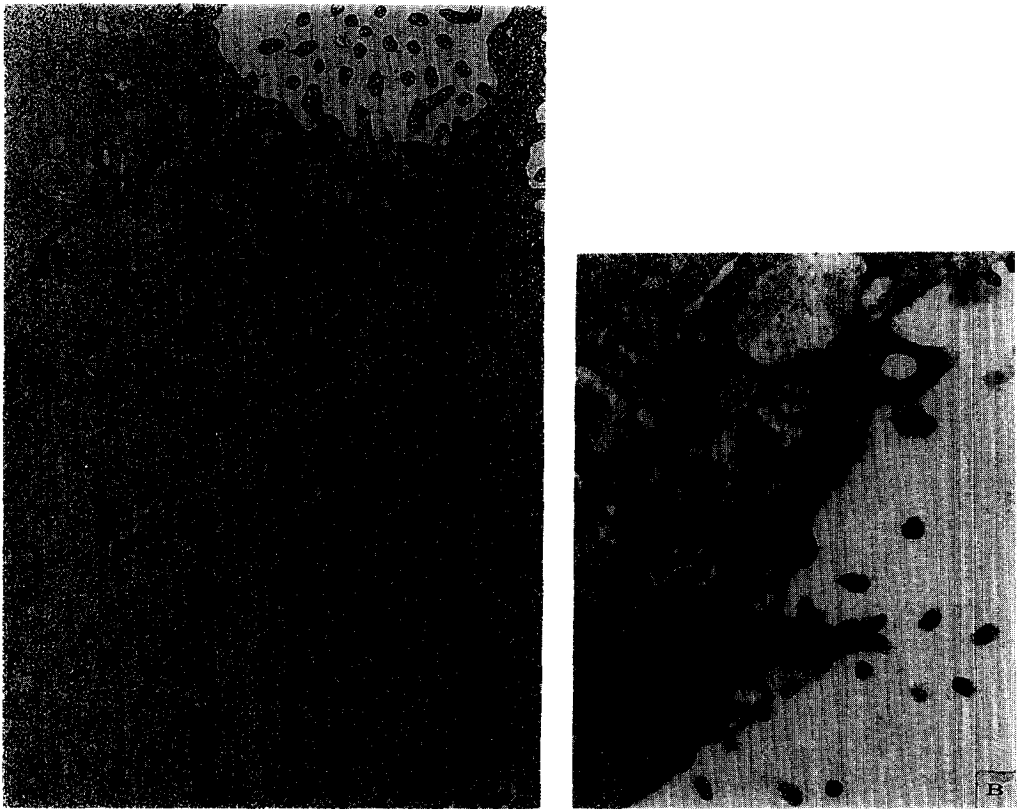


Fig 4. Electron micrographs of glandular cell in endometrium.

- A. Cytoplasm showing the abundant ribosome and hypertrophy of Golgi complex on 5 day of pregnancy(22,000).
 B. Epithelium showing the small thick-walled vesicle opening at the luminal surface on 7 day of pregnancy(44,000).

Table 5. Changes in phospholipid composition in serum (n=7, Mean±S.D.)

Days post coitum	D 0	D 3	D 5	D 7	D 9
P I	1.90±0.18 ^c	2.50±0.28 ^{ab}	2.77±0.21 ^{ab}	2.73±0.26 ^{ab}	2.97±0.26 ^a
P C	7.53±0.81 ^b	8.70±0.58 ^{ab}	8.77±0.54 ^{ab}	9.03±0.62 ^a	9.79±0.81 ^a
P S	31.24±2.33 ^b	36.57±2.88 ^{ab}	39.30±3.36 ^a	42.46±4.31 ^a	41.23±3.75 ^a
P E	4.80±0.64 ^a	4.99±0.69 ^a	4.67±0.29 ^a	4.40±0.44 ^a	4.66±0.41 ^a
LPI	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
LPC	2.20±0.44 ^b	2.23±0.23 ^b	2.54±0.19 ^{ab}	2.74±0.17 ^a	2.74±0.22 ^a
LPS	2.67±0.21 ^a	2.61±0.21 ^a	2.74±0.18 ^a	2.73±0.24 ^a	2.81±0.15 ^a
LPE	2.89±0.36 ^a	2.94±0.44 ^a	2.97±0.20 ^a	3.11±0.29 ^a	2.81±0.15 ^a

Means with the different letter are significantly different(p<0.01).

Values are mol % phospholipid based on phosphate assays.

N.D : Non-detected

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylserine

LPI : lysophosphatidylinositol

LPS : lysophosphatidylserine

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidylethanolamine

LPC : lysophosphatidylcholine

LPE : lysophosphatidylethanolamine

고 찰

포유류는 번식에 있어 종마다 특이한 생리학적, 형태학적 그리고 내분비학적인 다양성을 지니고 있다. 포유류의 번식생리현상의 다양성에도 불구하고 모체와 수정

란과의 동기화는 모든 포유류에서 공통적으로 일어나는 중요한 생리현상이다.⁴

Morgan²⁵은 수정란의 발육과 모체생식기인 자궁내막의 발전단계 사이의 동기화가 초기임신과 착상에 중요하다고 하였다. 임신초기에 있어 수정란은 확장된 blas-

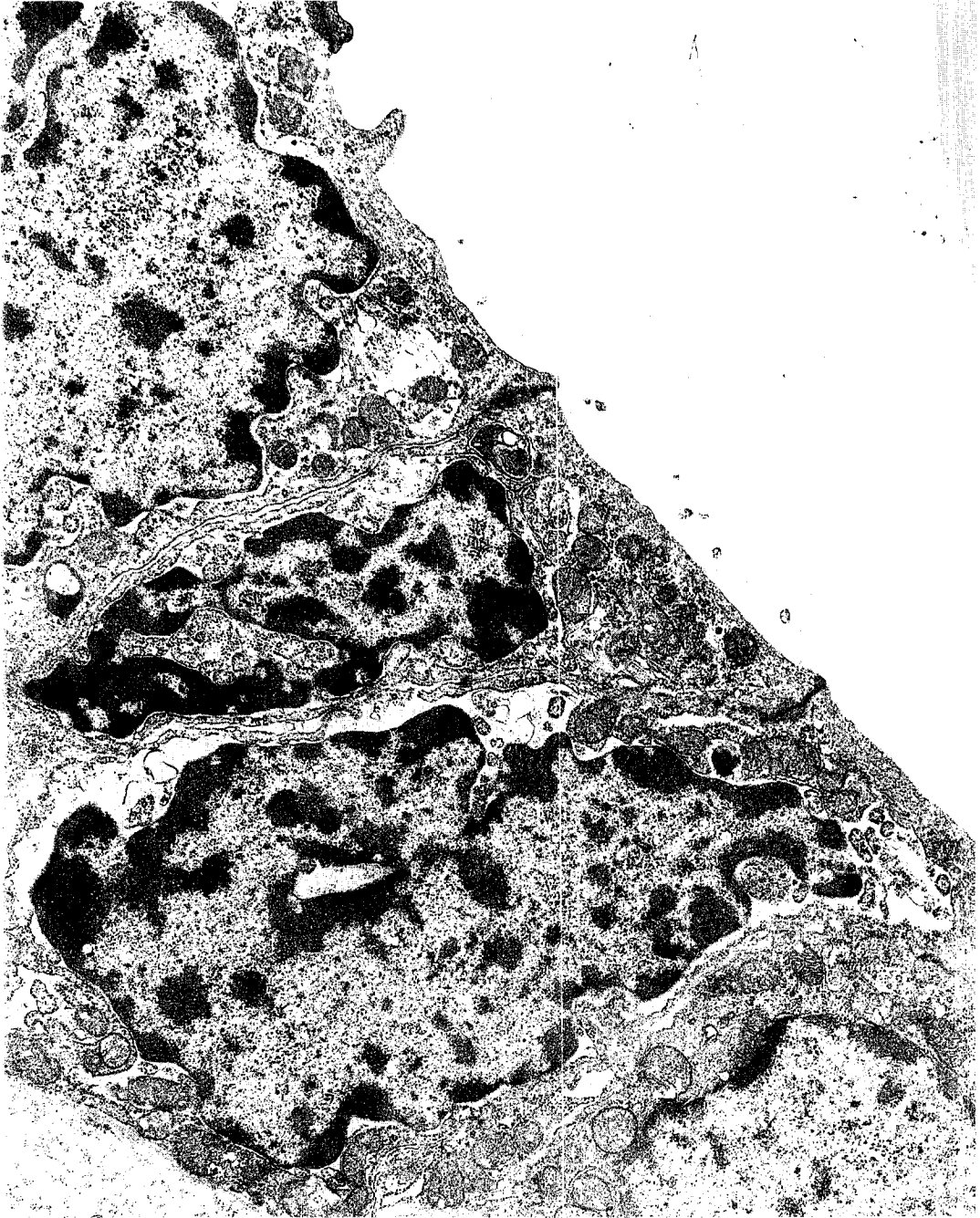


Fig 5. Electron micrographs of epithelium showing the residual junctional complex (jc) following fusion of adjacent cells on 9 day of pregnancy(13,000).

Table 6. Changes in phospholipid composition in uterine fluid

(n=7, Mean ± S.D.)

Days post coitum	D 0	D 3	D 5	D 7	D 9
P I	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P C	9.09 ± 0.50 ^c	7.57 ± 0.52 ^d	10.53 ± 0.66 ^c	12.07 ± 0.99 ^b	15.97 ± 6.00 ^a
P S	0.74 ± 0.11 ^b	1.11 ± 0.21 ^a	0.93 ± 0.16 ^{ab}	1.04 ± 0.15 ^{ab}	1.10 ± 0.21 ^a
P E	7.30 ± 0.38 ^a	7.69 ± 1.25 ^a	8.51 ± 0.76 ^a	8.56 ± 0.58 ^a	8.67 ± 0.56 ^a
LPI	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
LPC	0.67 ± 0.17 ^a	0.73 ± 0.13 ^a	0.79 ± 0.20 ^a	0.79 ± 0.17 ^a	0.81 ± 0.11 ^a
LPS	0.70 ± 0.08 ^b	0.71 ± 0.07 ^b	0.79 ± 0.17 ^b	0.90 ± 0.14 ^{ab}	1.04 ± 0.17 ^a
LPE	0.80 ± 0.14 ^c	1.06 ± 0.23 ^{bc}	1.33 ± 0.14 ^{ab}	1.54 ± 0.19 ^a	1.40 ± 0.12 ^a

Means with the different letter are significantly different (p < 0.01).

Values are mol % phospholipid based on phosphate assays.

N.D : Non-detected

LPI : lysophosphatidylinositol

PE : phosphatidylethanolamine

PI : phosphatidylinositol

LPS : lysophosphatidylserine

LPC : lysophosphatidylcholine

PS : phosphatidylserine

PC : phosphatidylcholine

LPE : lysophosphatidylethanolamine

tocyst 단계에 있어야 하고 자궁내막은 blastocyst의 신호를 받고 호르몬 의존성변화를 나타낼 때 동기화를 이루며 이때 자궁환경은 난에 대해서 수용성을 나타낸다.³ 수용기를 유도하는 호르몬의 시간에 따른 변화에 대해서는 많은 연구가 이루어져 잘 규명되어 있다. Martin과 Finn²⁶은 수용기와 불용기는 estrogen에 의해 조절되며 이 estrogen의 효과는 쥐에 있어 progesterone에 의한 48시간동안의 자궁내막의 전처치가 필요하다고 하였다. 최소한 48시간의 progesterone의 전처치에 의하여 자궁내막이 중성상태를 나타낼 때 estrogen이 작용해야만 수용기를 나타낸다.³ 이와같이 자궁환경이 수용성을 나타낼 때 수정란의 착상이 일어나는데 수용성 자궁은 histamine,²⁷ prostaglandins²⁸ 그리고 leukotriens 등²⁹과 같은 혈관 확장물질에 의해서 모세혈관 투과도의 증가와 탈락막 반응이 일어난다. 수용기는 중성과 불용기 사이의 짧은 시간동안의 현상이며 수용기가 지나면 자궁내막은 더 이상 탈락막 반응을 나타내지 않으며 자궁내 환경은 수정란의 생존에 부적합한 불용기를 나타낸다.^{5,6}

자궁내 분비물의 단백질 조성과 변화는 모체와 수정란의 동기화에 영향을 미치는데 이같은 현상은 지연착상을 보이는 토끼의 자궁내강액의 생화학적, 내분비학적 연구를 통하여 처음 보고되었다.⁴ 자궁내강액의 단백질 조성은 혈액과 자궁내막의 분비생성물에 의해 구성되며 이런 분비단백질중 토끼 자궁의 progesterone의 존성 단백질인 uteroglobin 또는 blastokinin은 스테로이드 호르몬에 의해 합성되고 progesterone의 활동을 지닌 작은 분비 단백질임을 알 수 있었다. Progesterone은 단독으로도 충분히 uteroglobin 분비를 자극할 수 있으나 estrogen은 자궁내막세포에 의한 uteroglobin 분비에 약간의 증가를 유도할 수 있을 뿐이다. Uteroglobin은 자궁내막의 선세포에서 합성되어 골지체로 이동되고 다

시 분비 소포로 이동되어 자궁선 또는 자궁내강으로 분비된다.⁴ 본 실험에서 [³H]leucine의 단백질로의 결합율이 임신 5일에 임신 3일에 비해 유의성 있게 증가하였으며 임신 7일에 최고치를 나타내었다. 그리고 임신 9일에는 임신 7일에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. Colchicine은 10⁻⁶-10⁻⁴M 농도에서 간장, 췌장 그리고 부갑상선 등의 세포에서 microtubule의 dimetric subunit에 결합하여 subunit를 분리시켜 glucagon, insulin, catecholamines 그리고 albumin 등의 분비를 막는다. 이러한 성질을 지닌 colchicine으로 처리한 자궁내막에서도 절대값에서도 차이가 있었으나 그 변화양상은 비슷하였다. 이러한 실험결과는 Reid와 Heald¹²가 쥐자궁의 단백질 합성율이 임신 3일에 증가했다가 임신 4일에 감소하고 다시 임신 5일에 증가하는 이상성(biphasic)을 보인다고 한 보고와는 상이한 점이 있다고 하겠다.

자궁내강액의 총단백질량은 대부분의 포유류에 있어 일반적으로 착상전에 증가하며 가임신 마우스의 임신 2, 3일에 자궁내강액의 단백질량(5.7~6.8 μg/mouse)은 매우 낮았지만 착상이 일어나는 임신 4일에(14 μg/mouse) 유의성 있는 증가를 보였다.³⁰ 이러한 자궁내강액의 총단백질량의 증가는 수분의 감소와 progesterone의 영향에 의한 점도의 증가 때문인 것으로 알려져 있다.⁴ 그리고 가임신 5, 6, 7일에 자궁내강액의 단백질량은(9.2~7.8 μg/mouse) 점차 감소한다.²⁹ 본 연구에서도 임신 7일에 최고치를 나타냈으며 임신 9일에 유의성 있는 감소를 보였다.

난소가 제거된 성숙한 쥐와 마우스 혹은 미성숙한 쥐에서 estrogen은 투여후 몇분안에 전구체의 RNA로의 결합율을 증가시킨다.³¹ Progesterone으로 전처치한 난소가 제거된 쥐는 progesterone 처리후 결합율이 시간에 따라 바뀌는데 48시간까지는 estrogen의 촉진효과가

없다가 이후에 결합율이 급격히 증가한다.³ 수용성 자궁은 actinomycin D에 의해 탈락막 반응에 대한 자궁의 감수성이 억제되며³² 이것은 DNA에 의존하여 RNA 합성이 이루어짐을 의미한다. 반면에 estrogen에 의해 지연착상을 보이는 수정란을 지닌 쥐의 자궁내강액은 blastocyst의 착상을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보아 estrogen은 착상을 억제하는 자궁내 물질의 합성에도 관여하는 것으로 생각되며,³³ 임신 5일째부터의 uteroglobin 감소는 estrogen 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 자궁내강액의 총단백질량이 임신 0일과 임신 3일에 비해 임신 5일과 임신 7일에 유의성있게 높았다. 자궁내강액의 알부민량은 임신 5일에 다른 군에 비하여 유의성있게 높았다. 또한 이때에 자궁내막의 단백질 합성이 증가하는 것을 보아 단백질이 blastocyst의 활성화와 수용기를 유도할 것으로 생각된다.

아미노산 농도는 품종과 발육단계에 따라 다르고 자궁내강액내의 농도는 난소 호르몬에 의하여 변화되어진다.¹³ 이러한 생식도관내의 아미노산 농도에 의해서가 아니라 조성에 변화에 의하여 수정란에 필요로 하는 각각의 아미노산을 알 수 있을 것이다. Alanine은 높은 농도로 존재하지만 초기 수정란의 체외성장에는 커다란 영향을 미치지 못한다. 반면에 histidine, methionine, phenylalanine, threonine 그리고 tyrosine 등은 소량 존재하지만 체외성장에는 반드시 필요하다. Arginine과 lysine은 histone합성과 충분한 성장을 위해 많은 양이 필요하게 된다.¹³ 본 실험에서도 methionine과 lysine이 임신 후에 자궁내강액의 아미노산 조성비율이 급격히 감소하는 것으로 보아 수정란으로 이동하여 수정란의 성장에 관여하는 것 같다. Glycine은 생쥐 수정란에 있어 배반포기에 급격히 감소한다고³⁴ 하였는데 본 실험에서도 자궁내강액의 조성비율이 착상시기에 급격히 증가하는 것을 보아 위의 보고를 뒷받침한다고 하겠다. 착상 후에 threonine과 serine이 증가하는 것으로 보아 이것들은 착상 후 수정란의 성장에 영향을 주지 못하는 것 같으며 proline과 histidine은 감소하는 것을 보아 이와 정반대로 착상 후의 수정란에 영향을 주는 것으로 생각된다.

자궁의 지질함량과 조성은 스테로이드 호르몬의 변화에 따라 변화하는데 progesterone 처치는 자궁의 인지질과 중성 지질량을 높이고 estrogen은 인지질의 양은 높으나 자궁의 총지질량은 감소시킨다. Estrogen에 의해 자궁인지질 생성이 촉진되며 이러한 지질의 증가는 단백질과 RNA증가에 이어 일어난다.¹⁵ 본 실험에서는 총인지질량과 총콜레스테롤량 모두 혈청에서는 임신 3일에 유의성있게 감소하였고 자궁내강액에서는 착상후인

임신 9일에 유의성있는 증가를 나타내어 O'Neill과 Quinn⁶이 쥐에서 자궁내강액의 지질이 blastocyst의 활성화를 억제할 것이라고 추측한 것과 일치하였다.

난관액의 지질량과 조성은 발정주기에 의해 영향을 받으며 난관상피의 분비능은 estrogen의 농도에 따라 변화한다.³⁵ 발정기때 난관내 lysophospholipid의 농도는 최고치에 도달하여 총인지질량의 약 50%가 되며 발정 전기에 높았던 phosphatidylinositol과 lysophosphatidylinositol은 약 20% 수준으로 감소한다.¹⁶ 혈청의 단백질, 콜레스테롤 농도는 난관액에서 보다 4~5배 높으나 인지질 농도는 난관액에서 현저히 높다. 정자에서 acrosome reaction이 일어날 때 Ca^{2+} 이 정자 두부의 원형질막내로 이동하여 phospholipase를 활성화시켜 lysophospholipid, diacylglycerol 그리고 phosphatidic acid를 생성시키며 특히 lysophospholipid가 높은 농도를 나타낸다. *In vitro*에서 배지에 첨가되는 지질의 종류에 따라 정자의 수정능 획득과 침체반응을 촉진 혹은 억제한다.¹⁷

이와같이 반응들은 콜레스테롤량과 인지질량의 비율에 따라 변화하게 되고 특정 인지질이 주로 작용한다. 본 실험에서는 비율이 임신 3일에 다른 실험군에 비해 유의성있게 감소한후 착상전인 5일에 정상으로 되돌아왔다.

Montane Perez-Ballester¹⁵는 자궁의 phosphatidylcholine/phosphatidyl-ethanolamine 비율의 증가는 자궁내막의 유동성을 증가시키며 이것은 착상시기에 자궁내막의 유동성을 증가시켜 수정란이 부착하는데 도움을 줄 것으로 추측하였는데 본 실험에서 자궁내강액의 phosphatidylcholine이 착상전인 임신 5일에 유의성있는 변화를 나타내었고 phosphatidylethanolamine은 뚜렷한 변화를 나타내지 않아 phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine의 비율이 착상전인 임신 5일에 급격히 증가하여 위의 보고와 일치하였다. 자궁의 감수성이 최대일때 자궁내강 상피세포의 prostaglandins의 합성도 최대가 되며 간질조직의 탈락막현상도 시작된다. 토끼의 혈소판과 중호성 백혈구에서의 prostaglandin의 합성은 Ca^{2+} 의 세포내 유입에 의해 활성화된, phospholipase A₂에 의해 phosphatidyl-ethanolamine로부터 직접 분비되거나 phospholipase C, mono-, diacylglycerol에 의해 phosphatidylinositol의 가수분해후에 간접적으로 생성되는 non-esterified arachidonic acid로부터 합성된다.³⁶ 본 실험에서는 자궁내강액의 phosphatidylethanolamine이 유의성은 없었지만 초기임신기동안 지속적인 증가를 보였다. 그러나 phosphatidylinositol은 너무 미량이어서 검출할 수 없었다.

이러한 결과로 보아 인지질과 콜레스테롤이 착상후

임신유지와 불용기를 유도할 것으로 생각되며 각각의 인지질들의 조성변화가 탈락막 반응에 필요한 prostaglandin의 합성과 수정란의 자궁내막 부착에 중요한 작용을 하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보아 단백질이 주로 수용기를 유도할 것으로 생각되며 지질(인지질, 콜레스테롤)이 착상후 임신유지와 불용기를 유도할 것으로 생각된다.

결 론

토끼에서 초기임신 및 수정란 착상에 영향을 주는 인자를 구명하기 위하여 임신 0일, 3일, 5일, 7일 그리고 9일의 혈청과 자궁내강액을 채취하고 자궁을 적출하여 수용기와 불용기를 통한 자궁내 환경의 stage-specific한 변화를 비교 조사한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 혈청의 총단백질량은 임신 5일에 7.00 ± 0.55 , 임신 7일에 6.29 ± 0.65 그리고 임신 9일에 6.34 ± 0.61 로 임신 0일의 5.05 ± 0.12 (g/100ml)에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 높았다. 알부민농도는 임신 0일에 0.81 ± 0.05 를 나타내고 임신 5일에 1.59 ± 0.07 (g/100ml)를 나타내었다. 자궁내강액의 총단백질량은 임신 5일에 1.56 ± 0.10 , 임신 7일에 1.99 ± 0.22 (g/100ml)로 0일 0.38 ± 0.02 (g/100ml)에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 높았으며 알부민농도 또한 임신 5일에 0.78 ± 0.05 (g/100ml)로 다른 군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 높았다.

2. 자궁내막의 [^3H]-leucine uptake는 임신 5일에 919.6 ± 97.5 , 임신 7일에 1445.4 ± 95.9 으로 임신 0일의 328.2 ± 38.9 (cpm/mg protein)에 비해 유의성($p < 0.01$)있게 높았다. 또한 colchicine을 처리한 자궁내막에서도 임신 5일에 1341.9 ± 73.8 , 임신 7일에 1729.4 ± 63.3 (cpm/mg protein)로 다른 군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 높았다.

3. 아미노산의 조성은 임신 초기 혈청에서 뚜렷히 변하지는 않았다. 자궁내강액에서의 methionine, lysine의 조성은 임신 0일에 비하여 임신 0일에 뚜렷히 감소되었다. 자궁내강액에서 glycine, alanine의 조성은 다른 날에 비하여 임신 9일에 증가되었으나 histidine은 감소되었다.

4. 혈청의 총인지질량과 총콜레스테롤량은 임신 3일에 각각 77.9 ± 15.5 , 61.5 ± 21.2 로 임신 0일에 164.0 ± 33.9 , 167.2 ± 46.2 (mg/100ml)에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 감소하였다. 자궁내강액의 총인지질농도와 총콜레스테롤 농도는 임신 9일에 각각 47.3 ± 13.4 , 37.7 ± 9.6 (mg/100ml)로 다른 군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 높았다.

5. 혈청에서의 총인지질/총콜레스테롤 비율은 유의

성있는 변화를 나타내지 않았다. 반면에 자궁내강액에서는 임신 5일에 2.00 ± 0.42 , 임신 7일에 1.11 ± 0.77 , 임신 9일에 1.47 ± 0.30 로 임신 0일에 1.90 ± 0.53 에 비해 유의성($p < 0.01$)있게 높았다.

6. 혈청의 인지질인 phosphatidylcholine, phosphatidylserine 그리고 lysophosphatidylcholine은 임신 0일에 비해 초기임신기동안 유의성($p < 0.01$)있는 증가를 보였다. 임신 0일에 비해 초기임신기동안 자궁내강액에서의 phosphatidylcholine은 유의성($p < 0.01$)있는 증가를 보였으나 phosphatidylethanolamine는 초기임신기동안 지속적인 증가를 보였음에도 불구하고 유의성($p < 0.01$)있는 변화를 나타내지는 않았다.

참 고 문 헌

1. Chang MC. Development and fate of transferred rabbit ova or blastocyst in relation to the ovulation time of recipients. *J Exp Zool* 1950 ; 114 : 197~225.
2. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Annals N Y Acad Sci* 1986 ; 476 : 36~42.
3. Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation. In *handbook of physiology*, Endocrinology. O Greep & E B Astwood Eds 2. 1973 : 187~215.
4. Beier HM. Proteins and steroids in early pregnancy. In : *Early pregnancy factors*, edited Ellendorff F & Koch E, Perinatory Press, New York, 1985.
5. Meyers K. Hormonal requirements for the maintenance of oestradiol-induced inhibition of uterine sensitivity in the ovariectomized rat. *J Endocrinol* 1970 ; 46 : 341~346.
6. O'Neill C, Quinn P. Inhibitory influence of uterine secretions on mouse blastocysts decreases at the time of blastocyst activation. *J Reprod Fert* 1983 ; 68 : 269~274.
7. Deanesly R. The role of the fertilized egg : reactions in the guinea-pig uterus at ovo-implantation and after thread traumatization. *J Reprod Fert* 1967 ; 14 : 243~248.
8. Aldeen KM, Finn CA. The implantation of blastocysts in the Russian Steppe Lemming (*Lagurus lagurus*). *J Exp Zool* 1970 ; 173 : 63~78.
9. Martin L, Finn CA, Carter J. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J Reprod Fert* 1970 ; 21 : 461~469.

10. O'Neill C, Quinn P. Interaction of uterine flushings with mouse blastocysts *in vitro* as assessed by the incorporation of [³H] uridine. *J Reprod Fert* 1981 ; 62 : 257~262.
11. Weitlauf HM. Factors in mouse uterine fluid that inhibits the incorporation of [³H] uridine by blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fert* 1978 ; 52 : 321~325.
12. Reid RJ, Heald PJ. Protein metabolism of the rat uterus during the oestrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy and as affected by an anti-implantation compound, ICI46, 474. *J Reprod Fert* 1971 ; 27 : 73~82.
13. Jaszczak S, Hafez ESE, Moghissi KS & Kurrie DA. Concentration gradients of amino acids between the uterine and blastocoelic fluid in the rabbit. *Fertil Steril* 1972 ; 23 : 405~409.
14. Ray SC, Morin RJ. Lipid composition of the non-gravid and gravid rabbit endometrium. *Proc Soc Exp Biol* 1965 ; 120 : 849~853.
15. Montane JL, Perez-Ballester B. Cyclic changes in phospholipid content and composition in human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Fert* 1985 ; 73 : 317~321.
16. Aizawa Y, Mueller GC. The effect *in vivo* and *in vitro* of estrogens on lipid synthesis. *The J Biol Chem* 1961 ; 236 : 381~386.
17. Killian GJ, Champman DA, Kavanaugh JF, et al. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fert* 1989 ; 6 : 419~426.
18. Roberts RM, Bazer FW. The functions of uterine secretions. *J Reprod Fert* 1988 ; 82 : 875~892.
19. 권종국, 한호재, 이근상 등. 면역유전학적 기법에 의한 수정란 착상인자 구명에 관한 연구. *農試論文集* 1990 ; 33 : 391~403.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 ; 193 : 265~275.
21. Miller BG, Moore NW. Endometrial protein secretion during early pregnancy in entire and ovariectomized ewes. *J Reprod Fert* 1983 ; 68 : 137~144.
22. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957 ; 226 : 497~509.
23. Findlay JBC, Evans WH. *Biological membranes*, IRL Press, 1987 : 103~108.
24. Mitchell KT, Ferrell JR JE, Huestis WH. Separation of phosphoinositides and other phospholipids by two-dimensional thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 1986 ; 158 : 447~453.
25. Morgan GL, Geisert RD, Zavy MT, et al. Development of pig blastocysts in a uterine environment advanced by exogenous oestrogen. *J Reprod Fert* 1987 ; 80 : 125~131.
26. Martin L, Finn CA. Interaction of oestradiol and progestins in the mouse uterus. *J Endocrinol* 1970 ; 43 : 109~115.
27. Dey SK, Villanueva C, Chien SM, et al. The role of histamine in implantation in the rabbit. *J Reprod Fert* 1978 ; 53 : 23~26.
28. Kennedy TG. Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci* 1983 ; 36 : 531~543.
29. Tawfik OW, Dey SK. Further evidence for role leukotrienes as mediators of decidualization in the rat. *Prostaglandins* 1988 ; 35 : 379~387.
30. Aitken RJ. The protein content of mouse uterine flushings during pseudopregnancy. *J Reprod Fert* 1977 ; 50 : 191~192.
31. Miller BG, Emmens CW. The incorporation of tritiated uridine in the genital tract of the oestrogen-treated mouse. *J Endocrinol* 1967 ; 39 : 474~484.
32. Mulholland J, Villet Jr CA. Proteins synthesized by the endometrium during early pregnancy. *J Reprod Fert* 1984 ; 72 : 395~400.
33. Psychoyos A. Hormone control of uterine receptivity for nidation. *J Reprod Fert suppl* 1976 ; 25 : 17~28.
34. Schulltz GA. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive fluids. *Biol Reprod* 1987 ; 36 : 125~129.
35. Fisher B. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert* 1987 ; 79 : 115~123.
36. Smith SK, Kelly RW. Effect of platelet-activating factor on the release of PGF-2 α and PGE-2 by separated cells of human endometrium. *J Reprod Fert* 1988 ; 82 : 271~276.