

## 체외 배양된 자궁내막세포에서의 DOC-1 유전자의 발현 조절

양혜영 · 전용필<sup>†</sup>

성신여자대학교 자연과학대학 기초과학연구소 / 생물학과

### *In Vitro* Regulation of DOC-1 Gene Expression in Uterine Endometrial Cells

Hye Young Yang and Yong-Pil Cheon<sup>†</sup>

*Division of Developmental Biology and Physiology, School of Biological Sciences and Chemistry  
/ Institute of Basic Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea*

**ABSTRACT** : Implantation of blastocyst into the uterine endometrium is established by the existence of histologically and functionally prepared uterine endometrium. Doc-1, an oral cancer suppressor gene, is expressed under the control of steroid hormones and has been suggested as a proliferation regulator of endometrial cells. However, the role is not much clear and in this study we examined the expression modulation of Doc-1 in decidualizing cells *in vitro*. *In vitro* decidualization was performed in endometrial stroma cells using progesterone and estrogen. Until 24 hr after decidual induction the proliferation of stroma cell was significantly increased but decreased after then. On the other hand, most of the cells differentiated into decidual cell after 48 hr of induction. The Doc-1 protein was co-localized in a specific decidual cells and colocalization rate was increased in a parallel manner with the induction time. Based on these results, it is suggested that Doc-1 expression is under the control of both steroid hormones and decidual signals, and Doc-1 protein is involved in suppression of the proliferation of decidualizing cells.

**Key words** : Doc-1, Decidualization, Proliferation, Stroma.

**요약** : 포배의 착상은 구조 및 기능적으로 준비된 자궁내막의 체계적 반응에 의하여 진행되는데, 자궁 내막에서 엄격히 통제된 급격한 세포의 증식과 분화가 진행된다. 구강 상피세포암의 억제자로 알려진 Doc-1이 자궁에서 스테로이드 호르몬에 의하여 발현되며 세포 증식을 조절할 것으로 추정되어 왔으나, 그 정확한 발현 변화에 대한 이해가 불충분하였다. 따라서 본 연구에서는 체외에서 탈락막 반응 모델 확립을 통하여 세포의 증식과 분화 진행과정에서 Doc-1의 발현 조절 기작을 알아보고자 하였다. 생쥐 자궁내막을 이용한 탈락막 반응은 기질세포를 순수하게 분리하여 배양하면서 프로게스테론과 에스트로겐을 함유한 유도 배양액으로 유도하였다. 탈락막 유도 과정에서 배양 24시간까지 세포의 증식이 유의하게 증가하였고 그 후에는 감소하였다. 한편, 탈락막 세포로의 분화는 분화 유도 48시간에 거의 모든 세포에서 진행되었다. 또한 Doc-1 단백질의 발현이 분화 유도 시간과 비례적으로 증가하였고 탈락막 세포에 위치하였다. 이러한 결과를 바탕으로 착상이 진행되는 자궁내막에서 Doc-1의 발현이 스테로이드 호르몬과 탈락막 분화와 연계되어 조절되고, Doc-1 단백질이 탈락막 세포의 세포분열 억제를 유도하는 것을 제안할 수 있다.

## 서론

영장류를 포함한 포유동물에서 포배의 착상은 조직학적으

로 그리고 기능적으로 준비된 자궁 내막조직과의 상호 교통에 의한 결과이다(Cheon et al., 2002; Imakawa et al., 2004; Ledee et al., 2007). 생쥐를 포함한 설치류의 경우 벽-영양배엽(mural trophoderm) 세포가 중자궁(mesometrium)쪽 상피세포와 물리화학적 결합 이후 탈락막 반응을 거치면서 탈락막 구조를 형성하게 된다. 탈락막 반응은 자궁 기질세포의 분화, 혈관 내상피의 증식, 면역세포 활성의 분화, 세포와 세

<sup>†</sup> 교신저자: 서울특별시 성북구 동선동3가 249-1 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과. (우) 136-742, (전) 02-920-7630, (팩) 02-920-2093, E-mail: ypcheon@sungshin.ac.kr

포 관계성의 분화를 수반하는 것으로 알려져 있다(Cheon et al., 2002). 자궁 기질세포는 분화하여 크기가 크고, 배수성을 가진 탈락막 세포로 변형되며, 세포질 안에 글리코겐과 지질을 축적하고, 다수의 라이소좀, 대형의 조면소포체를 갖게 된다. 또한 광범위한 세포간의 접촉, 그리고 간극 연결, 밀착 연결, 데스모솜을 포함하는 연결 복합체 등이 세포간에 관찰된다(Bijovsky et al., 1992; Dey et al., 2004; Mantena et al., 2006; Orlando-Mathur et al., 1996). 이 과정 동안, 세포 내의 공간의 감소가 일어나며, 콜라겐 섬유소의 수 감소와 함께 세포의 기질의 재구성과 같은 다양한 세포의 구성성분들의 변화가 나타난다(Kim & Cheon, 2006; Mulholland et al., 1992). 이러한 일련의 분화과정은 기질세포의 증식과 특정 세포의 이동 등에 의하여 진행된다.

Deleted-in-oral-cancer-1(Doc-1) 단백질은 햄스터에서 처음 암세포억제자(tumor suppressor gene)로 알려진 이후 사람을 포함한 포유동물에서 발현되는 것이 보고되어왔다. 사람의 경우 염색체 12번 q24(12q24)에 위치하며, 구강편평상피암(oral squamous cell carcinoma)과 같은 암세포에서 Doc-1 전사물질의 발현이 감소되는 것으로 알려졌다. 사람과 생쥐에서 Doc-1 cDNAs의 총 길이는 각각 1.6 kb과 1.2 kb이며, 두 종간 유사성은 97%이며, 사람의 경우 115개의 아미노산으로 구성되고, 12.4 kDa의 분자량을 가진다(Todd et al., 1995; Tsuji et al., 1998). 그리고, 이 유전자의 일부 염기서열은 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )에 의해 유도되는 설치류에서의 초기 반응 전사체(TNF  $\alpha$ -induced early-response murine transcript)인 TU-166와 일치하여 TNF  $\alpha$ 에 의하여 발현이 조절되는 것으로 제안되었다(Gordon et al., 1992). 또한 Doc-1의 세포내 발현은 스테로이드 호르몬인 에스트로겐과 프로게스테론에 의해 조절 조절되는 것으로 알려졌다(Cheon & Kim, in press; Lee et al., 2003).

자궁내막 기질세포를 체외에서 배양하면서 특정 분화 유도 조건을 주게 되면 탈락막 세포 특성을 갖는 세포로 분화하여 프로락틴과 같은 탈락막 세포 특이 단백질을 발현한다. 에스트로겐과 프로게스테론은 체외 배양된 생쥐의 자궁내막 세포의 형태적인 변화와 프로락틴 등의 분자 마커가 발현되는 세포로 분화한다(Brar et al., 1997; Kimura et al., 2001; Shimizu et al., 2005; Tang & Gurdip, 1993). 따라서 체외에서의 탈락막 분화 유도는 착상이라는 매우 복잡한 과정을 연구하기에 매우 좋은 모델로 사용되고 있다.

배아의 착상 초기시기 동안, 착상 위치에서 자궁내막 상피 세포는 증식을 중단하고 분화를 시작하는데(Weitlauf, 1994), 이 때 자궁내막에서 Doc-1 mRNA가 위치 특이적으로 발현되어 착상과 관련된 자궁세포의 탈락막 형성과 연관되는 것으로 제안되었다(Cheon, 2002; Lee et al., 2003). 그러나 탈락막 세포와의 관련성은 잘 알려진 바가 없다. 최근에, Doc-1은 cycline-dependent kinase 2(CDK2)에 결합하여 세포분열 조절에 관여하는 것으로 확인되었다(Shintani et al., 2000). 따라서, 본 실험은 자궁내막 세포의 탈락막 현상을 유도하는 체외 배양 시스템을 최적화 시킨 후, 이 시스템을 이용한 탈락막 현상에서 자궁내막 세포의 증식과 탈락막 분화 동안 Doc-1의 발현 조절 기작과 그 특이성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 광주기를 명 14시간, 암 10시간으로 조절하고, 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육한 CD-1 생쥐로서 암컷은 생후 6~8주 된 것을, 수컷은 10주 이상 된 것을 사용하였다. 암컷의 복강에 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma, USA)을 5 iu 주사하고, 48시간 후 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma, USA)을 5 iu 주사한 후 임신을 유도하기 위해서는 같은 종의 수컷과 합사시켰다. 다음날 아침 암컷들의 질전의 유무를 통하여 교미와 수정을 확인하고 이날을 임신 1일(gestation day 1; GD 1)로 정하였다. 임신 4일째 자궁을 적출하고 차가운 PBS에서 지방 및 혈관 등의 부수적 조직을 제거하고 차가운 PBS를 자궁내강으로 흘려보내 포배의 유무를 확인하였다. 그리고 포배가 있던 자궁만을 선택하여 실험에 사용하였다.

### 2. 생쥐의 자궁내막세포의 분리 및 세포배양

임신 4일째에 적출한 암컷 생쥐의 자궁조직을 세로축으로 절개한 다음, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 4°C에서, 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 자궁조직을 1 mm 크기의 조각으로 잘게 나눈 다음, 2 mg/ml collagenase type I(Gibco-BRL, USA), charcoal dextran(Sigma, USA)을 이용하여 스테로이드 호르몬을 제거한 열처리된 소의 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum)(Welgene, Korea)이 10% 함유된 DMEM/F12 배양액을 이용하여 37°C 진탕배양기(shaking incubator)에 1시간

동안 처리하였다. 처리한 후 구멍 크기가 100  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ 인 체 (BD Falcon, BD Biosciences, USA)를 각각 통과시킨 후 얻은 용액을 1,000 rpm에 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 얻은  $1 \times 10^6$  cells/ml 밀도의 자궁기질세포를 10% cFBS DMEM/F12 배양액에서 4-well 세포배양접시(Nunc, USA)에 심어 배양하였다.

### 3. 체외 배양된 자궁내막 세포의 탈락막 현상 유도

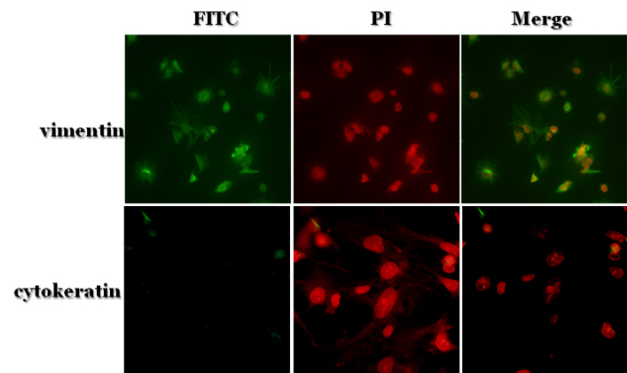
체외에서 탈락막 현상을 유도하기 위해 10 nM  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ )(Sigma, USA)과 1  $\mu\text{M}$  프로게스테론 ( $P_4$ )(Sigma, USA)이 들어 있는 DMEM/F12 배양액에 넣어 자궁내막 세포를 48시간 동안 배양하였다. 대조군은 어떤 호르몬 첨가도 하지 않은 배양액을 사용하였다. 배양 후 1시간, 24시간, 48시간에 각각 배양 중인 자궁내막세포를 회수하여 실험에 사용하였다.

### 4. 배양된 자궁내막세포 특이 항체에 대한 면역세포학적 염색

실험 계획에 따라 체외배양 중인 자궁내막세포를 특정 시간에 PBS로 2~3회 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 4°C에서 30분간 고정하였다. 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS(PBST) 용액으로 5분간 3회 세척하고 5% 혈청을 비특이 반응억제물로 하여 상온에서 30분간 반응을 유도하였다. Doc-1 단백질 특이 토끼 유래 다클론 항체(1:100, abCAM), vimentin 특이 항체(기질세포 특이 단백질, 1:500, abCAM), cytokeratin 특이 항체(상피세포 특이 단백질, 1:500, abCAM), Ki67(증식 세포 특이 단백질, 1:1000, abCAM), 프로락틴 특이 양 유래 다클론 항체(탈락막 특이 마커, 1:500, Santa Cruz)를 처리한 후 4°C에서 12시간 배양한 다음, PBST 용액으로 5분간 3회 세척하였다. Cy<sup>TM</sup>3가 결합된 염소 유래 토끼 Ig 특이 항체 그리고 FITC가 결합된 토끼 유래 염소 Ig 특이 항체를 2차 항체로 각각 1:250으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 항원-항체 결합 반응을 유도하였다. 이후 PBST 용액으로 상온에서 5분간 3회 세척하였다. PBS 용액으로 다시 세척한 후 핵을 hematoxylin이나 propium Iodide(PI)으로 대조염색한 후, 광학 및 형광현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 자궁내막기질의 분리 및 분화 유도



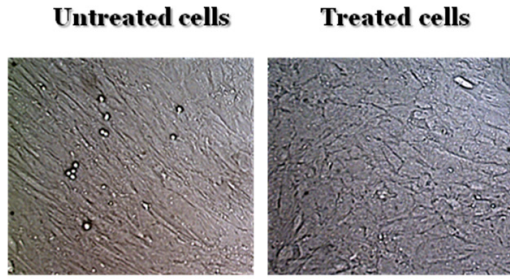
**Fig 1. Immunofluorescent staining of vimentin (for stromal cell) and cytokeratin (for epithelial cell) in cultured endometrial stromal cells.** After adhesion, the cells were fixed and then double stained with FITC-conjugated vimentin (green) or cytokeratin (green) and PI (red), and subjected to immunofluorescence microscopy ( $\times 400$ ). Intense vimentin immunoreactivity was observed in the perinuclear cytoplasm.

생쥐 자궁 내막세포를 체외에서 배양하면서 탈락막 유도를 위하여 상피세포를 제외한 기질세포만을 얻기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바 처럼 순수한 내막 기질세포를 얻었고, 이들 세포를 세포배양접시에 배양하였다. 세포면역화학방법을 이용한 분석에서 자궁 내막 기질세포에서 특이적으로 발현하는 vimentin이 배양된 거의 모든 세포에 표지되었으나, 상피세포 특이 cytokeratin이 표지된 세포는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1).

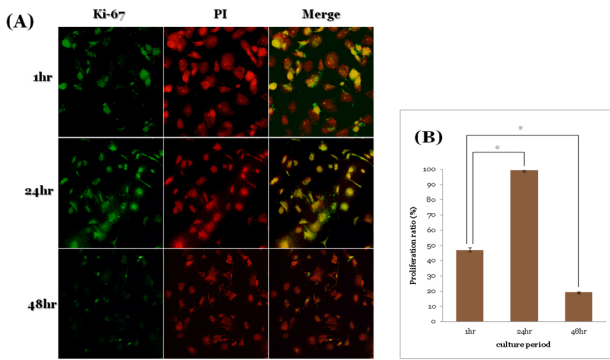
자궁내막 세포의 탈락막 현상을 유도하는 체외 배양 시스템의 최적화 확인을 위하여 자궁내막 기질세포의 형태를 도립위상차현미경을 이용하여 관찰하였다. 호르몬 처리를 하지 않은 자궁내막 기질세포들은 배양기간 동안 섬유아세포의 특징인 방추형의 모습을 지속적으로 유지하였다. 그러나 일정 밀도를 형성한 후 프로게스테론과 에스트로겐을 적절한 농도로 처리하여 탈락막 세포로의 분화를 유도한 자궁내막 기질세포들은 탈락막 세포에서 특이적으로 관찰되는 형태 변화가 관찰되었으며, 이들 세포는 상대적으로 크고 상대적으로 많은 양의 세포질을 가졌다(Fig. 2).

### 2. 탈락막 세포로의 분화 유도 기간 중 기질세포의 증식

세포의 증식은 발생학적 측면에서 분화의 전 단계로 인지될 수 있다. 따라서 탈락막으로의 분화는 실질적으로 세포 증식을 기반으로 하고 있는지를 알아보기 위하여 분화 유도

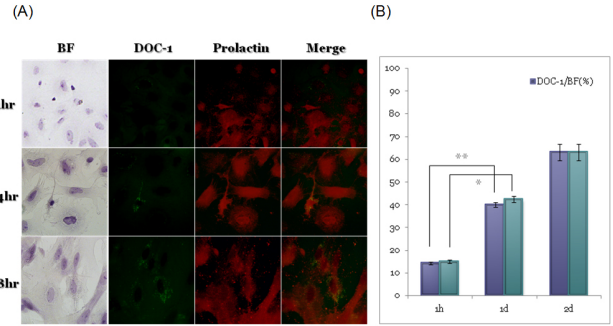


**Fig 2. Changes of morphological characters during *in vitro* decidual induction.** Cells were observed using inverted microscopy after 2 days of culture. To induce the decidualization, 10 nM estrogen and 1µM progesterone were treated. The cells underwent morphological changes typical of decidual cells large polygonal form, while untreated cells retained a fibroblast-like spindle-shaped appearance (×200)



**Fig 3. Proliferation of stroma cells during decidual induction *in vitro*.** A, Immunocytofluorescent staining of proliferation cells (Ki-67) in cultured endometrial stromal cells at 1 hr, 24 hr, and 48 hr, respectively. Double staining for Ki-67 (green) and PI (red). B, the ratio of proliferation cells were measured by immunofluorescent staining of Ki-67 and PI antibody. Data shown are representative of three to five independent experiments. Data were presented as means ±SEM. \*  $P<0.05$ .

이후 기질세포의 증식 정도를 분석하였다. 분화를 유도한 후 1시간, 24시간, 48시간에 배양 유리판을 수확하여 배양 중인 세포를 고정하고 분열하는 세포 특이적 단백질인 Ki-67 특이 항체를 이용하여 면역형광염색을 실시하였다(Fig. 3A). 시간대별 세포분열 양상은 세포 밀도에 의한 억제와는 무관하게 제외배양 24시간까지 유의하게 세포 증식이 진행되었으며, 그 후 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3A, B).



**Fig 4. Decidual induction *in vitro* induced expression of Doc-1 protein and prolactin in stroma cell.** Immunocytochemistry was performed at 1 hr, 24 hr, and 48 hr after decidual induction, respectively. A, Double staining for Doc-1 (green) and prolactin (red). Bright-field are shown in the left column. B, The ratio of DOC-1/Cell No. and DOC-1/Prolactin. Data shown are representative of three to five independent experiments. Data were presented as means ±SEM. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.005$ .

### 3. 분화 유도 기간에 따른 분화 정도와 Doc-1 단백질의 발현

탈락막으로의 분화 유도 과정에 세포 증식을 유발하는 Doc-1 단백질의 분포를 알아보아 그 기능을 추정하고자 하였다. Fig. 4에서 보듯이 24시간 이후 많은 세포가 탈락막 세포로 분화하였으며, 이후 48시간째에는 거의 모든 세포가 탈락막 세포 특이 단백질인 프로락틴을 분비하였다. Doc-1 단백질은 유도 시간이 의존적으로 점진적으로 증가하였다. Doc-1 단백질은 프로락틴이 발현되는 세포중 특정 세포에서 동시에 표지되었다(Fig. 4).

## 논 의

사람을 포함한 영장류에서 자궁내막 세포의 증식과 분화는 포배의 착상과정에 대해 자궁내막의 준비과정 중 가장 중요한 단계로 여겨지고 있으며, 또한 생쥐를 포함한 설치류에서의 자궁내막 세포의 포배에 대한 반응성은 또한 착상에 있어 매우 중요하다. 생쥐의 경우에는 영장류와는 달리 포배와 자궁내막상피와의 세포 수준에서의 반응 이후 탈락막 형성의 주된 과정이 진행된다. 탈락막의 형성은 영양배엽과 탈락막 세포 간의 측분비 조절을 통하여 태반의 형성을 조절하고, 영양배엽이 자궁내막으로 과도하게 침윤하는 것을 억제하기 때

문에 매우 중용한 생물학적 반응이다(Goffin et al., 2003).

탈락막으로의 분화과정은 기질세포의 증식과 이후 관찰되는 분화를 포함한다. 그러나 탈락막 세포의 증식 조절, 상피 또는 기질 세포의 증식 조절에 대한 이해는 매우 미진하다. 본 연구그룹에서는 착상한 배아를 중심으로 암세포 증식 억제자로 알려진 Doc-1이 특이적으로 발현됨을 보고한 바 있고(Cheon, 2002) 이후 여러 연구자들에 의하여 자궁에서의 발현 조절 등에 대한 연구를 통하여 그 기능에 대한 추론이 되어 왔으나(Lee et al., 2003), 사실에 대한 이해가 아직 미진한 상황이다. 따라서 이번 연구에서는 자궁내막 세포의 탈락막 현상을 유도하는 체외 배양 시스템을 최적화 시킨 후, 이 시스템을 이용한 탈락막 현상에서 자궁내막 세포의 증식(proliferation)과 탈락막 분화(decidualization) 동안 Doc-1 단백질의 발현 조절과 발현 특이성을 알아보려 하였다. 탈락막 현상을 유도하는 과정에서 배양시간이 경과할수록 탈락막 특이적으로 발현되는 프로락틴을 발현하는 세포의 비율이 증가하였으며, 외형상으로도 문헌에서 알려진 바와 같이 크기가 커지고, 배수성의 핵을 가지게 되며, 세포간의 공간이 사라지는 모습을 관찰할 수 있었다.

배아의 착상 초기시기 동안, 착상 위치에서 자궁내막 상피 세포는 증식을 중단하고 분화를 시작한다(Weitlauf, 1994). 흥미롭게도 분화 유도후 세포증식이 분화 유도 후 24시간까지 유의하게 증가하였으며, 이후 급격히 감소하였다. 다른 한편 탈락막 세포 특이 단백질인 프로락틴을 합성하는 세포는 분화 유도 시간에 비례적으로 증가하였다. 이러한 결과는 기질 세포의 증식이후 탈락막 세포로 분화한다는 증거가 될 수 있겠다.

Lee 등(2003)은 난소를 제거한 생쥐의 자궁에서 Doc-1 유전자가 에스트로겐 투여 12시간 후에 발현이 유도됨을 밝혔다. 한편, Cheon과 Kim(in press)은 난소를 제거한 생쥐 자궁에서 프로게스테론에 의해서 3시간 내에 발현하고, 다량의 Doc-1 단백질 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 포배가 착상할 수 있는 생리적 조건의 형성이 Doc-1의 발현과 관련되어 있음을 의미하는 것이다.

탈락막 현상 동안 배아의 착상 위치에서는 많은 세포주기 조절인자들이 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히, 세포주기 조절인자는 호르몬 자극 동안 자궁조직에서 중요한 역할을 한다(Geum et al., 1997; Prall et al., 1997; Tong & Pollard, 1999). 사람의 경우, 기간 특이적인 cyclin들(cyclins D1, E,

A, B1)과 CDK들(CDK4, CDK2, CDC2A)은 자궁내막의 증식기 동안 자궁내막 상피세포와 기질세포에서 유도되는 것으로 알려져 있다. 반면에, 분비기 동안 또는 프로게스테론 투여 후 CDKN1B는 자궁내막 상피세포와 기질세포 기저부위에서 유도되어 세포 성장 억제를 일으킨다(Shiozawa et al., 1996). 설치류의 경우, 자궁내막 상피세포의 분열은 에스트로겐에 의해 조절되는 cyclins D1와 E, 그리고 CDK4의 발현에 의해 조절된다고 알려졌다(Geum et al., 1997; Prall et al., 1997; Tong & Pollard, 1999).

특히, Doc-1 유전자의 경우, cycline-dependent kinase 2(CDK2)와 결합하여 생물학적 반응을 하는 것으로 확인되었으며(Shintani et al., 2000), 성장억제자로 작용할 것으로 생각되는데, 우리의 실험결과에서도 탈락막 현상을 유도한 체외배양 시스템에서 세포분열이 왕성하였던 배양후 24시간까지는 탈락막 현상이 유도되었음에도 불구하고 Doc-1 단백질 발현이 아주 약하였다가, 세포분열의 활성도가 떨어지는 배양 48시간대에 많은 수의 Doc-1 단백질 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 탈락막 현상을 유도하지 않은 그룹에서는 전혀 Doc-1 단백질 발현을 관찰할 수 없었다(data not shown). 따라서 Doc-1 유전자의 발현은 탈락막 현상과 관련이 있을 것으로 사료되며, 특히, 분열이 억제되면서 자궁내막 조직의 분화를 조절할 것으로 사료된다.

결론적으로, 탈락막 세포로 분화 유도하는 체외배양 시스템에서 분화가 유도되는 동안에 탈락막 현상과 연관되어 Doc-1 단백질의 발현이 진행되고, 탈락막 현상이 일어나지 않은 경우에는 Doc-1 단백질의 발현이 일어나지 않는 것으로 추정된다. 따라서 임신한 자궁에서 Doc-1의 발현은 스테로이드 호르몬 그리고 탈락막 반응에 의하여 조절되고 탈락막 세포의 증식 억제에 관여하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년 정부지원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술연구재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-331-C00255).

## 인용문헌

Bijovsky AT, Zorn TM, Abrahamsohn PA (1992) Remodel-

- ing of the mouse endometrial stroma during the preimplantation period. *Acta Anat* 144:231-234.
- Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S (1997) Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 6:301-307.
- Cheon YP (2002) Expression of Doc-1 in pregnant uterus of the mouse. *Kor J Fertil Steril* 29:295-302.
- Cheon YP, Kim CH (In press) Progesterone is Primary Regulator of Cdk2ap1 gene Expression and Tissue-specific Expression in the Uterus. *J Endocrinol Invest*
- Cheon YP, Li Q, Xu X, DeMayo FJ, Bagchi I, Bagchi MK (2002) A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Mol Endocrinol* 16:2853-2871.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004) Molecular cues to implantation. *Endocrine Rev* 25:341-373.
- Geum D, SunW, Paik SK, Lee CC, Kim K (1997) Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation *in vivo*: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev* 46:450-458.
- Goffin F, Munaut C, Malassine A, Evain-Brion D, Frankenne F, Fridman V, Dubois M, Uzan S, Merviel P, Foidart JM (2003) Evidence of a limited contribution of fetomaternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens* 62:104-116.
- Gordon HM, Kucera G, Salvo R, Boss JM (1992) Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair, and metabolism in murine fibroblasts. *J Immunol* 148:4021-4027.
- Imakawa K, Chang KT, Christenson RK (2004) Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *J Reprod Dev* 50:155-169.
- Kim H, Cheon YP (2006). Spatio-temporal expression and regulation of dermatopontin in the early pregnant mouse uterus. *Mol Cells* 31:262-268.
- Kimura F, Takakura K, Takebayashi K, Ishikawa H, Kasahara K, Goto S, Noda Y (2001) Messenger ribonucleic acid for the mouse decidual prolactin is present and induced during *in vitro* decidualization of endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol* 15:426-432.
- Ledee N, Dubanchet S, Oger P, Meynant C, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G (2007) Uterine receptivity and cytokines: new concepts and new applications. *Gynecol Obstet Invest* 64:138-143.
- Lee S, Lee SA, Shim CS, Khang IK, Lee K-A, Park Y-M, Kang B-M, Kim KJ (2003) Identification of estrogen-regulated genes in the mouse uterus using a delayed-implantation model. *Mol Reprod Dev* 64:405-413.
- Mantena SR, Kannan A, Cheon YP, Li Q, Jonson PF, Bagchi, IC, Bagchi MK (2006) C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1870-1875.
- Mulholland J, Aplin JD, Ayad S, Hong L, Glasser SR (1992) Loss of collagen type VI from rat endometrial stroma during decidualization. *Biol Reprod* 46:1136-1143.
- Orlando-Mathur CE, Bechberger JF, Godberg GS, Nus CC, Kidder GM, Kennedy TG (1996) Rat endometrial stromal cells express the gap junction genes connexins 26 and 43 and form functional gap junctions during *in vitro* decidualization. *Biol Reprod* 54:905-913.
- Pral OWJ, Sarcevic B, Musgrove EA, Watts CKW, Sutherland RL (1997) Estrogen-induced activation of cdk4 and cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-cdk2. *J Biol Chem* 272:10882-10894.
- Shimizu A, Maruyama T, Tamaki K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y (2005) Impairment of decidualization in SRC-deficient mice. *Biol Reprod* 73:1219-1227.
- Shintani S, Ohyama H, Zhang X, McBride J, Matsuo K, Tsuji T, Hu MG, Hu G, Kohno Y, Lerman M, Todd R, Wong DT (2000) p12(DOC-1) is a novel cyclin-

- dependent kinase 2-associated protein. *Mol Cell Biol* 20:6300-6307.
- Shiozawa T, Li SF, Nakayama K, Nikaido T, Fujii S (1996) Relationship between the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex-steroid receptors/Ki67 in normal human endometrial glands and stroma during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2:745-752.
- Tang B, Gurpide E (1993) Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47:115-121.
- Todd R, McBride J, Tsuji T, Donoff RB, Nagai M, Chou MY, Chiang T, Wong DT (1995) Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *FASEB J* 9:1362-1370.
- Tong W, Pollard JW (1999) Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol* 19:2251-2264.
- Tsuji T, Duh FM, Latif F, Popescu NC, Zimonjic DB, McBride J, Matsuo K, Ohyama H, Todd R, Nagata E, Terakado N, Sasaki A, matsumura T, Lerman MI, Wong DT (1998) Cloning, mapping, expression, function, and mutation analyses of the human ortholog of the hamster putative tumor suppressor gene Doc-1. *J Biol Chem* 273:6704-6709.
- Weitlauf HM (1994) Biology of implantation. In: Knobil E, Neil JD (ed.), *The Physiology of Reproduction*. Raven, New York, pp391-448.
- 
- (received 22 October 2009, received in revised form 26 November 2009, accepted 27 November 2009)