

## 초기 임신기간중 흰 쥐의 자궁조직 분화와

### Cyclic AMP 농도에 관하여

이화여대 의과대학, \*연세대 의과대학, \*\*서울대 자연대 동물학과

김 성 례 · \*유 경 자 · \*\*조 완 규

#### -ABSTRACT-

### Studies on the Cyclic AMP Concentration and Uterine Tissue Differentiation During the Early Pregnancy of Rats

Sung Rye Kim, \*Kyung Za Ryu, \*\*Wan Kyoo Cho

*College of Medicine, Ewha Womans University.*

*\* College of Medicine, Yonsei University.*

*\*\* College of Natural Science, Seoul National University.*

It has been well known that ovarian steroids, estradiol and progesterone play an important role in the endometrial preparation for the implantation process.

The present investigation was undertaken to correlate function of ovarian steroids with cAMP concentrations in uterine tissues of rat during the various stages of the preimplantation period.

Rats ovariectomized on day 2 were treated with estradiol or/and progesterone on day 3 or on day 4 and cAMP concentrations in uterine tissues were determined by competitive protein - binding assay in control - and steroid treated - ovariectomized rats.

The results obtained are as follows;

1. In control rats, cAMP concentrations in uterine tissues were decreased with preimplantation period proceeded whereas cAMP concentrations were increased and showed the highest levels on day 6 in ovariectomized rats.
2. In rats treated with progesterone only or progesterone with estradiol after ovariectomy, cAMP concentrations on day 6 were lower than those of ovariectomized control but higher than those of intact control rats while estradiol only treatment decreased cAMP concentrations on day 3 and day 6, compared with those from intact- and ovariectomized -controls.

It is, therefore, concluded that the concentrations of cAMP in uterine tissues were lower in estrogen-treated rats than in ovariectomized rats, suggesting the involvement of cAMP in the regulation of uterine tissue differentiation.

## 서 론

포유류 자궁은 수정된 배낭을 착상시켜서 이것이 새로운 생명체로 분화해 갈 수 있는 환경여건을 갖추기 위하여 자궁조직세포의 분화가 활발하게 일어나고 있다. 이와같은 자궁내 조직의 변화는 estrogen과 progesterone의 작용에 의해서 유도되고 있음이 알려지고 있다(Finn and Martin, 1972; Cook and Hunter, 1978; Kim and Cho, 1982).

그러나 자궁내막조직은 자궁내강상피세포, 자궁선상피세포, 기질세포등 여러 형태의 세포로 구성되어 있는 복잡한 구조이며, estrogen과 progesterone의 두 호르몬이 주기적으로 분비되고 있으나, 이들 호르몬에 의한 자궁내막조직 분화의 유도 기작을 규명하는 일은 그렇게 쉬운 과제가 아니다.

본인등은 최근 포유류 착상기작을 규명할 목적으로 초기 임신기간중 흰쥐 자궁내막조직 분화(decidualization)에 미치는 난소 호르몬의 영향을 관찰 보고한 바 있다(Kim and Cho, 1981; 1982; 1983a; 1983b).

한편, 세포대사작용에서 second messenger 역할을 한다고 알려진 Cyclic AMP (cAMP)에 관하여 많은 연구가 있다. Fisher와 Gunaga (1975)는 착상된 배아의 발생이 진행되는 동안 배아세포내의 cAMP 농도가 감소된다고 하였으며 Thomas(1972)는 세포내 cAMP 농도가 증가하면 replication rate가 억제 혹은 늦어진다고 보고하는 등 세포분화에 미치는 cAMP의 영향을 발표한 바 있다. Fisher와 Gunaga (1975)는 배양중인 배아에 theophylline을 처리하면 cAMP 농도가 증가하며, theophylline을 제거하면 cAMP 농도가 감소된다고 하였다. 1975년 Cho 등은 이러한 cAMP 농도를 증가시키는 theophylline을 배양중인 oocyte에 처리하면 핵성숙이 억제되면서 세포질내 glycogen 함량이 감소되는 것을 관찰하였으며, theophylline을 제거하면 성숙분열이 회복한다고 보고한 바 있다.

이처럼 세포내 cAMP의 함량이 배아를 성장분화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보아 스테로이드 호르몬에 민감하게 반응을 나타내는 자궁조직세포의 분열과 분화에도 cAMP는 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러므

로 자궁조직분화가 활발한 시기에 cAMP 농도를 측정함으로써, 이것이 스테로이드 호르몬의 작용과 관련하여 자궁조직분화에 미치는 작용기전을 규명할 일련의 연구로 기대하고 본 연구를 행하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에서는 서울대학교 동물사육실에서 사육된 생후 2개월(180 ~ 200 g)된 암컷 흰쥐(Sprague - Dawley)로 일정한 조명장치(14시간 조명, 10시간 소등)아래에서 사육하였으며, 수컷과 교배를 시켜 임신된 흰쥐를 이용하였다.

### 2. 실험군

1) 임신군 : 암컷 흰쥐를 수컷과 동서시킨 다음날 아침, 질부에서 정자가 관찰된 것을 임신제 1일 (Day 1)로 하였다. 본 실험에서는 임신제 1일 (Day 1), 제 3일 (Day 3), 제 6일 (Day 6)이 된 흰쥐를 실험용으로 이용하였다.

2) 난소제거 임신군 : 임신 제 2일에 난소를 제거한 것들을 난소제거군이라 하였다.

3) 난소제거 호르몬 처리군 : 난소를 제거한 임신흰쥐에 실험일정에 따라 호르몬을 주사하였다.

- ① 용매를 주사한 실험군 (V) : 대조군
- ② Estrogen 주사군 (E)
- ③ Progesterone 주사군 (P)
- ④ Estrogen과 progesterone 동시 주사군 (E + P)

### 3. 실험방법

1) 난소제거 : 임신 제 2일에 sodium, thiopental (Abbott)을 복강주사(10 mg)하여 마취시킨 후, 배복측 부분절개 수술로 양쪽 난소를 제거하였다.

2) 난소호르몬 처리 : 난소제거후 17  $\beta$  - estradiol (1mg, Sigma)과 progesterone (2 mg, Sigma)을 각각, 단독 혹은 혼합하여

단일 혹은 매 24 시간 간격으로 3회 피하주사하였다. 이들 호르몬의 용매로는 sesame oil을 이용하였다.

3) 자궁적출 : 임신제 3일군은 난소제거 직후 호르몬을 주사한 뒤 24시간이 지난 임신제 3일에 자궁을 적출하였고, 또한 군은 난소제거 직후 호르몬을 주사한 뒤 48시간 후인 임신제 6일에 자궁을 채취하여 실험에 이용하였다. 각 실험군마다 5마리의 흰쥐를 사용하였다.

흰쥐를 ether로 마취한 뒤 개복하여 양쪽자궁을 적출하여 ice - cold saline으로 적신 흡착지 위에서 자궁주위에 부착된 지방체와 혈액을 제거하고 자궁의 무게를 단후, 실험에 사용할 때 까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 보관하였다.

4) 자궁조직내의 cAMP농도측정: cAMP의 농도는 cAMP assay Kit (Amersham, U.K.)을 사용하여 측정하였다.

자궁편을 0.2 ml의 EDTA solution (4 mM) 내에서 가위로 잘게 자른 뒤 다시 0.3 ml의 EDTA solution을 가하여 Teflon homogenizer로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10초의 간격을 두고 20초간 3번 homogenize하였다. Homogenate에 0.5 ml의 TCA solution(6%)을 가한 후 5초간 vortex mixing하고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서  $1000 \times g$ 로 25분간 원심분리하여 supernatant를 분리하였다. supernatant를 extraction tube에 옮겨 다음과 같이 ether - washing을 하여 cAMP powder를 얻었다.

5 ml의 water - saturated ethyl ether를 더해 2분간 vortex mixing하고 실온에서 30분간 방치하여 ether phase와 water phase를 분리하여 water phase만 취하였다. 다음의 ether washing의 경우에는 ether phase와 water phase를 분리한 뒤  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 freezing시켜 ether phase를 버리고 freezing 상태의 water phase를 바로 24시간 동안 freeze - drying하여 crude cAMP fraction을 얻었다. Fraction은 Tris/ EDTA buffer(50 mM Tris - HCl, 4 mM EDTA PH7.5)에 용해시켜 assay하였다.

Blank cpm을 위해서는 150 ml의 Tris/HCl buffer와 0.9 pmole [ $8\text{-}^3\text{H}$ ] Adenosine 3',5'- cyclic phosphate ( $^3\text{H}$ ) cAMP ;

specific activity ; 27.77 Ci/m mole)을 섞어 incubation하였으며, standard와 unknown sample 각각 50 ml에 위와 같은 농도의 [ $^3\text{H}$ ]cAMP와 100 ml의 binding protein을 넣고 incubation하였다. 이때 각 group은 duplicate로 하여 5초간 vortex mixing한 뒤  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간동안 incubation 하였으며 incubation이 끝난 뒤 charcoal suspension 100 ml를 가하고 1초간 vortex mixing한 뒤  $4^{\circ}\text{C}$ 에서  $1500 \times g$ 로 5분간 원심분리 (Sorvall)하였다. Supernatant 200 ml를 취하여 scintillation cocktail (Triton X - 100, 333.3 ml, toluene 666.6 ml, popop 0.3 g, ppo.7.0 g) 15 ml과 섞어서  $\beta$  - scintillation counter (Packard)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 이때 count efficiency는 60%이었다.

모든 data는 average cpm에서 blank cpm을 뺀 값이며, 이때 standard와 unknown sample의 값을 Cx, standard 중 cAMP가 zero dose인 group의 값을 Co라 할 때 Co/Cx의 값을 standard curve의 세로축에 표시하고 cAMP의 농도를 가로축에 표시하여 직선의 standard graph를 얻었다. 이 standard curve에서 unknown sample의 Co/Cx를 이용하여 cAMP의 농도를 결정하였다 (cAMP pmole/100 mg tissue).

## 결 과 와 논 의

정상 임신군과 임신후 난소제거 호르몬 처리군의 임신초기 (임신제 1일~제 6일)의 자궁조직세포내의 cAMP농도를 측정한 것을 표 1과 그림 1에 표시하였다.

Table 1. The concentration of cyclic AMP (pmole/100 mg tissue) in uterine tissue of the early pregnant rats treated with ovarian steroids.

Day of pregnancy	Control	Ovariectomized	Vehicle	Estradiol - 17 B	Progesterone	Estradiol & Progesterone
Day 1	2.95±1.21					
Day 3	1.75±0.78	1.84±0.82	1.14±0.55	0.97±0.35	1.18±0.34	1.04±0.48
Day 6	1.39±0.20	3.46±1.05	2.91±1.21	0.79±0.32	2.02±0.47	2.06±0.75

The data (Mean ± S.E.) were obtained by experiments with 5 rats in each group for twice replication.

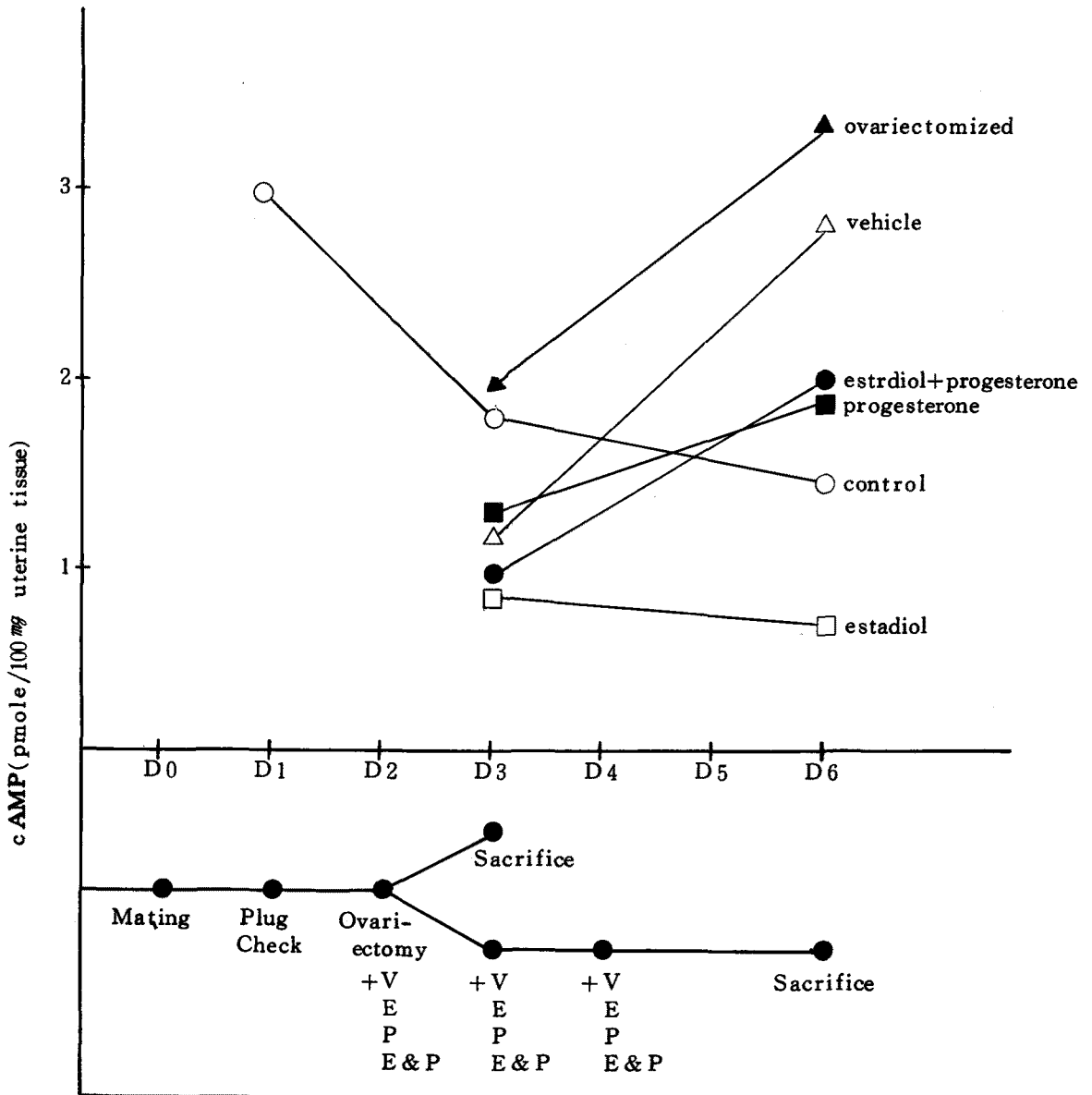


Fig 1. Concentration of cAMP in uterine tissue during early pregnancy.

대조군이 되는 정상임신군에서는 cAMP의 농도가 임신제 1일에 2.95 pmole인데, 제 3일에는 1.75 pmole로, 그리고 제 6일에는 1.39 pmole로 감소되고 있다.

난소제거군에서는 제 3일에는 1.84 pmole에서 제 6일에는 3.46 pmole로 증가하고 있다. 난소제거후 용매만 처리한 실험군의 자궁에서는 cAMP 농도가 제 3일에 1.14 pmole이고 제 6일되면 3.46 pmole로 증가하여서 임신기간 사이에 유의한 차이 ( $p < 0.01$ )을 나타내고 있다. 한편, 난소제거후 progesterone 처리군에서는 제 3일에 1.18 pmole인데 제 6일에는 2.02 pmole로 증가하고 있어 역시 유의한 차이 ( $p < 0.01$ )로 제 6일의 자궁내의 cAMP의 농도가 증가하고 있다. Estradiol과 progesterone을 동시에 처리한 군에서도 제 3일에는 1.04 pmole에서 제 6일에는 2.06 pmole로 역시 유의한 차이 ( $p < 0.025$ )로 cAMP의 농도가 증가하고 있다. 다만 estradiol만을 처리한 실험군만은 임신제 3일에 0.97 pmole, 제 6일에는 0.79 pmole을 보여주고 있어서 오히려 제 6일째의 자궁조직의 cAMP의 농도가 감소하는 경향을 보여주고 있다.

임신제 3일이 된 자궁조직의 cAMP 농도는 estradiol을 주사한 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 감소하고 있다.

또한 임신 제 6일이 되면 자궁조직의 cAMP 농도가 대조군에 있어서 크게 감소하는데 비해 estradiol 처리군만을 제외한 실험군 모두 유의한 차이 ( $p < 0.05$ )로 증가하고 있다.

이처럼 정상임신군에서는 자궁조직의 분화가 진행되면서 cAMP 농도는 감소하고 있다. 난소를 제거하면 분화가 진행되면서 오히려 cAMP 농도는 높아지며, estradiol을 제외한 호르몬 처리군에서는 정상임신군과 난소제거군의 중간 수치를 보여주고 있다.

이상의 결과에서 볼 때 estrogen의 영향아래 분화가 왕성한 자궁조직에서는 cAMP 농도가 감소하고 있으며, estrogen의 공급이 단절되어서 분화가 저지된 자궁조직에서는 증가하고 있어서 마치 난자, 배아 및 여러 형태의 세포가 높은 농도의 cAMP의 영향아래 대사작용이 정제되고 있는 것과 일치하고 있다 할 것이다.

1967년 Finn과 Martin은 임신 제 3일에는 자궁내강 상피세포가 유사분열을 일으키며 그 이후에는 자궁선 상피세포, 그리고 임신 제 4일이 되면 기질층세포가 유사분열을 왕성히 일으키고 있으며, 임신제 4, 5일이 되면 myometrial proliferation이 일어나고, collagen 섬유가 기질세포간격에 늘어난다는 것을 설명하고 있다. 1976년 Tachi와 1978년 Yochim은 임신 제 3일의 자궁조직에 oxidate phosphorylation이 증가하여 ATP의 농도가 증가하며, RNA, 단백질 합성이 증가한다고 하였다. 본인등(1983 a, b)도 임신 제 3일에는 혈중 estradiol 양이 증가하고, 자궁조직에서 phosphatase 활성이 증가하는 것을 관찰하였다. 이처럼 자궁조직이 임신 제 1일에서 제 3, 6일로 분화할수록 cAMP 농도가 감소하는 것을 착상전 배아가 발생 분화해 갈수록 배아세포내의 cAMP 농도가 감소된다고 발표한 Fisher와 Gunaga(1975)의 결과와 일치되는 현상이다.

난소를 제거한 흰쥐의 임신 제 6일군이 정상 임신 제 6일군보다 cAMP 농도가 증가하는 것은 Yochim(1975)이 난소제거 임신 5일이 되면 proliferation이 정지된다고 발표한 결과와 cAMP 농도가 증가되면 세포분열과 대사작용이 억제된다고 한 Zeilig(1972)의 결과와 일치되는 현상이다.

일반적으로 호르몬을 처리한 난소제거 임신 흰쥐의 제 3일이 된 자궁조직에서 cAMP 농도가 대조군에서 보다 감소하는 것은 난소를 제거한 뒤 estrogen을 주사하고 24시간이 되면 자궁내강 상피조직의 세포들에서 유사분열이 증가한다는 Tachi(1974)와 Krueger(1978)의 관찰과 상관이 있다고 볼 수 있다. 즉 임신 제 2일에 난소를 제거하고 estrogen을 주사한 뒤 24시간이 지난 임신 제 3일의 자궁조직세포의 cAMP의 함량이 감소함으로써 조직의 세포분열의 빈도는 증가하는 것이다.

이상의 결과에서 보는 바와 같이 자궁조직에서는 estrogen의 양이 증가하면 유사분열이 왕성하게 일어나는 등 대사작용이 활발하며 그때에는 cAMP 농도가 감소한다는 것을 알 수 있었다.

난소제거후 progesterone 만을, 혹은 pro-

gestrone 과 estradiol 을 함께 처리한 임신제 6 일군에서는 자궁조직의 c AMP 농도가 난소 제거군과 용매처리군보다는 감소하지만 정상임신군보다는 증가하고 있는데 이것은 난소를 제거한 채인 것 보다는 따로 호르몬을 주사받음의 자궁에서 세포분열과 대사작용이 활발히 진행되지만 그 정도가 정상임신군에는 미치지 못하고 있음을 시사해 준다.

난소제거후 estradiol 만을 처리한 실험군에서는 제 3 일째와 제 6 일째의 c AMP 농도에 별 차이가 없이 대조군뿐 아니라 다른 실험군의 어느 것보다도 비교하여 크게 낮은 값을 보여 주고 있다. 한편, estradiol 과 progesterone 을 동시에 주사하면 progesterone 만을 주사한 실험군과 거의 같은 값을 나타내고 있다. Tachi (1974) 는 estrogen 만 주사하면 자궁내강 상피 세포에서만 유사분열이 일어나고, progesterone 과 같이 주사하면 자궁기질층 세포에서도 유사분열을 일으킨다고 한 일이 있다. 본인등(1983) 도 progesterone 주사에 의하여 자궁기질층에 collagen 섬유가 증가하고 decidualization 이 일어나는 것을 관찰한 일이 있다. 위의 두가지 실험의 결과가 일치하고 있기는 하지만, progesterone 을 estrogen 과 동시에 처리할 경우 progesterone 의 작용기능이 estrogen 의 기능을 억제하거나 estrogen 의 작용보다 더 강하여 결국 progesterone 단독주사의 경우와 같은 결과를 보여주는 것이라 할 수 있다. 혹은 Psychoyos(1978) 가 관찰한 바와 같이 난소 호르몬에 대한 반응이 자궁조직의 endometrium 과 myometrium에서 다르게 나타난다고 하는 것과 관계가 있는 것이라 보여진다.

이상의 결과에서 스테로이드 호르몬에 의하여 자궁조직분화가 왕성한 조직에서는 c AMP 농도가 낮아지고 분화가 저지된 조직에서는 높아지며 이와 같은 현상은 세포신진대사에 있어서 c AMP가 중요한 기능을 나타낸다는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

## 요 약

임신직후 자궁조직은 난소 스테로이드 호르몬에 의하여 분화한다. 착상전 여러 단계에 있는 자궁조직내의 c AMP의 함량을 측정함으로써 c AMP와 호르몬과의 관계를 규명할 목

적으로 흰쥐를 재료로 해서 본 실험을 행하였다.

임신제 2 일에 난소를 제거하고 즉시, 제 3, 또는 제 4 일에 estradiol 과 progesterone 을 각각 혹은 동시에 주사한 뒤 대조군인 정상임신군, 난소제거군, 난소제거후 호르몬주사군의 자궁조직에서 c AMP 농도를 competitive protein-binding assay 로 측정하여 이를 각각 비교하였다.

본 연구결과는 다음과 같았다.

정상임신군인 경우 자궁조직이 분화해 갈수록 자궁조직내 c AMP의 농도는 낮아지고 있다.

난소제거군에서는 임신기간이 길수록 자궁조직내의 c AMP 농도가 높아진다.

난소제거후 progesterone 혹은 progesterone 과 estradiol 을 주사한 실험군에서는 임신 제 6 일이 되면 c AMP 농도가 정상임신군과 난소제거군의 중간수치를 보여준다. 한편, estradiol 단독주사인 경우는 임신제 3, 제 6 일의 자궁조직내의 c AMP의 농도는 크게 감소한다.

이처럼 estradiol 의 영향아래 세포분열 등 분화가 왕성한 자궁조직에서는 c AMP 농도가 크게 낮아지지만 자궁조직의 분화가 억제된 상태에서는 c AMP의 농도가 반대로 높아진다. 난자, 배아 또는 여러 형태의 세포에서처럼 c AMP의 농도는 세포의 대사에 크게 영향을 주고 있다는 것을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Cho, W.K., and Y.D. Yoon: *Studies on the effects of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on intracellular contents of glycogen of mouse follicular oocytes in vitro.* Korean J. Zool, 18: 27-40, 1975.
- Cook, B. and R.H.F. Hunter: *Systemic and local hormonal requirements for implantation in domestic animals.* J. Reprod. Fert., 54: 471-482, 1978.
- Finn, C.A. and A. McLaren: *A study of the early stages of implantation in mice.* J. Reprod. Fert., 13: 259-267, 1967.
- Fisher, D.L. and K.P. Gunaga: *Theophylline*







- induced variations in cyclic AMP content of the superovulated preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.*, 12: 471-476, 1975.
- Kim, S.R. and W.K. Cho: On the activity of phosphatase in the endometrium of the rat uterus during early pregnancy. *Korean J. Fertil. Steril.*, 8: 1-11, 1981.
- Kim, S.R., M.K. Kim and W.K. Cho: The effects of ovarian steroid hormones on the phosphatase activity on the rat uterine endometrium at the early pregnancy. *Korean J. Fertil. Steril.*, 9: 55-68, 1982.
- Kim, S.R.: Ultrastructural and cytochemical studies on the uterine endometrial cells of rat at preimplantation stage. *The Ewha Medical Journal*, 6: 115-138, 1983.
- Kim, S.R., S.G. Kang, K.Z. Ryu and W.K. Cho: Estrogen and progesterone levels in peripheral plasma and the concentration of nuclear estradiol receptor in uterine endometrium at the early pregnant rats. *The Ewha Medical Journal* 6: 261-268, 1983.
- Martel, D and A. Psychoyos: Progesterone induced estrogen receptors in the rat uterus. *J. Endocr.* 76: 145-154, 1978.
- Tachi, C., S. Tachi, and H.R. Lindner: Effects of ovarian hormones upon nucleolar ultrastructure in endometrial stromal cells of the rat. *Biol. Reprod.*, 10: 404-413, 1974.
- Tachi, C., S. Tachi, and H.R. Lindner: A morphological approach to the study of ovum implantation in the rat. In: Yoshinaga, K. et al., *Implantation of the ovum*, Cambridge, MA, Harvard. Univ. Press., pp: 43-80, 1976.
- Thomas, D.B., G. Medley and C.A. Lingwood: Growth inhibition of murine tumor cells, *in vitro*, by puromycin, (<sup>6</sup>N) O<sup>2'</sup>-dibutyryl 3'5'-adenosin monophosphate, or adenosine. *J. Cell Biol.*, 57: 397, 1973.
- Yochim, J.M.: Development of the progesterational uterus: metabolic aspects. *Biol Reprod.*, 12: 106-133, 1975.
- Zeilig, C.E., R.A. Johnson, D.L. Freidman and E.W. Sutherland: Cyclic AMP concentrations in synchronized Hela cells. *J. Cell. Biol.*, 55: 590, 1971.