

착상전 임신기간 중 흰쥐에 있어서 Cytochrome P-450의 변화

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

함윤애 · 김성례 · 홍영숙 · 성낙응

=Abstract =

Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Levels During Preimplantation in Rats

Y.A. Ham, S.R. Kim, Y.S. Hong, N.E. Sung

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

The levels of hepatic microsomal cytochrome P-450 in preimplantation rats were determined

- 1) The activities of the hepatic microsomal cytochrome P-450 associated with the events leading to implantation were gradually increased in preimplantation rats.
- 2) The level of the hepatic microsomal cytochrome P-450 was peak, 2.65 nmoles/mg protein, on day 4 in normal preimplantation rat.
- 3) The activity of the hepatic microsomal cytochrome P-450 was decreased in ovariectomized rat than the normal rat.
- 4) The hepatic microsomal cytochrome P-450 level in ovariectomized rat was peak, 2.39 nmoles/mg protein, on day 5.
- 5) We observed the fact that the activity of microsomal P-450 was delayed in ovariectomized rat.
- 6) We confirmed the fact that the hepatic microsomal cytochrome P-450 level was affected by steroid hormone.

서 론

사람을 포함한 포유동물의 생식주기(oestrous cycle)는 뇌하수체 호르몬과 생식소 호르몬의 조화있는 분비와 작용에 의한다는 것이 밝혀지고 있다. 1974년 Meglioli¹⁾는 흰쥐에서 자궁내막이 발정전기(proestrus)에 분비되어 발정기(oestrus)까지 계속되며 이 분비현상은

난소에서 분비되는 estrogen에 의한다고 보고하고 있다. 특히 이 난소 호르몬은 배아의 착상, 임신 유지, 그리고 분만을 위한 환경여건을 갖추는데 필요한 호르몬이라는 것이 알려지고 있다²⁾⁻⁹⁾. 1977년 Gidley-Baired¹⁰⁾는 생쥐에서 초기 임신기간 6일 동안 6시간 간격으로 뇌하수체호르몬(LH, FSH)과 progesterone을 측정한 결과 LH는 progesterone 생성과 황체(corpus luteum)의 유지에 관여하고 FSH는 착상(implantation)에 필요

한 estrogen의 생성과 관련이 있다는 것을 제시하였다. 이와 같이 뇌하수체호르몬과 생식소에서 분비되는 호르몬이 성주기와 임신 유지 등에 필요불가결한 요소인 것은 확실하다.

그러나 이들 호르몬의 변화가 성주기와 자궁내 환경, 배아(embryo)에 어떤 영향을 미쳐서 착상을 유도하는지 그 작용기전에 관해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그리하여 이를 밝히기 위한 많은 연구가 진행되어 자궁내벽의 epithelial cell과 stroma cell의 mitosis¹¹⁾ 세포내 미세구조¹²⁾, 자궁분비액¹³⁾ 등에 관한 연구들이 보고되고 있으며, 저자들은 이들 호르몬의 기전을 밝혀 보려는 일환으로 생쥐에 있어서 성주기와 초기 임신기간 동안에 cytochrome P-450의 활성을 관찰 보고¹⁴⁾한 바 있다.

Cytochrome P-450은 hepatic microsomal monooxygenase system의 terminal oxidase로 식이와 영양소, 체내호르몬 변화에 영향을 받으며, 스테로이드 호르몬, 발암물질 또는 지방산 등이 이 효소의 기질로 작용하는 것¹⁵⁾으로 알려져 있으며, 세포막과 결합되어 있고 여러가지 내인적 외인적 물질대사에 관여하는 전자전달체로 작용하는 것¹⁶⁾으로 밝혀지고 있다.

저자들의 실험¹⁴⁾에서 cytochrome P-450은 호르몬 분비가 왕성하여 자궁과 배아의 대사활동이 활발하게 일어나는 시기에 그 활성이 크게 증가하는 것을 관찰하였으며, 또한 뇌하수체호르몬을 처리한 수컷 흰쥐의 testicle에서 cytochrome P-450의 활성이 크게 증가한다는 보고¹⁷⁾ 등으로 미루어 볼 때 cytochrome P-450은 뇌하수체호르몬, 난소호르몬과 밀접한 관계를 갖고 대사활동에 관여하는 것을 알 수 있다. 본 실험에서는 흰쥐를 사용하여 초기 임신준비기간 동안의 간조직내 cytochrome P-450의 활성을 측정하여 membrane bound multicomponent electron transport system과의 관련 여부를 관찰하고 난소를 제거한 흰쥐의 cytochrome P-450의 활성과 비교 관찰하여 임신준비기간 동안의 대사작용에 미치는 이 호르몬들의 기전을 밝히고자 본 실험을 시도하였다.

실험재료 및 실험방법

A. 실험동물 : 일정한 조건에서 사육한 흰쥐(Sprague-Dawley strain)를 사용하였다. 암컷은 생후 1개월 정도에서 분리시켜 두었다가 2개월 이상 성숙되었을 때 체중 160g~200g인 것을 사용하였으며 수컷은 수정능력이 있는 것을 사용하였다.

B. 실험군 : 제 1 실험군은 착상준비기간 동안 cytochrome P-450의 활성을 측정하기 위한 실험군으로 성숙한 암컷을 수정능력이 있는 수컷과 동시시켜 그 다음 날 아침 질전 유무를 조사하여 질전이 있는 암컷은 임신 제 1일(Day 1)로 하고 임신 제 2일에서 임신 제 5일까지 4군으로 나누어 cytochrome P-450의 활성을 측정하였다. 제 2 실험군은 착상준비기간 동안 직접적인 난소호르몬의 영향을 보기 위한 그 첫번째 실험으로 임신 제 2일에 양쪽 난소를 제거한 후 그 결과를 제 1 실험군과 비교하였다. 난소 제거는 ethyl ether 마취하에 양쪽 난소를 임신 제 2일에 배부측 부분절개수술로 제거한 후 임신 제 3일, 제 4일, 제 5일까지의 각 세 실험군에서 간조직을 적출하여 cytochrome P-450의 활성을 측정하였다. Cytochrome P-450의 측정은 5마리를 한 실험군으로 하여 적출한 간조직에서 행하였다. 본 실험에서 임신 제 2일에 난소를 제거한 것은 임신 제 1일은 난자가 수란관 상부에 머물러 있는 시기이므로 이때 난소를 제거할 경우 실험상 부주의로 인한 난자들의 상실을 제거하기 위함이었다.

C. Microsomal fraction 분리 및 cytochrome P-450 측정 : 적출한 간조직을 ice-cold isotonic sucrose로 2회 씻고 0.25 M-sucrose로 25% homogenate를 만들어 원침하여 microsomal fraction을 분리하였다. Cytochrome P-450은 Omura와 Sato 방법¹⁸⁾에 의하였고 microsomal protein은 bovine serum albumin을 표준물질로 Lowry 방법¹⁹⁾에 의해 측정하였다.

실험결과 및 고찰

A. 착상전 임신기간 중 cytochrome P-450의 변화 : 착상전 임신 준비기간 중 측정된 cytochrome P-450을 Table 1에 표시하였다. 임신 제 2일에서 제 5일까지의 cytochrome P-450의 활성을 보면 임신 제 2일은 1.69nmole로써 가장 낮으며 임신 제 3일에는 2.29nmole, 임신 제 4일에는 2.65nmole로 현저한 증가를 보이며 임신 제 5일에는 2.16nmole로 감소하였다.

설치류를 포함한 대부분의 포유동물은 배란 후(임신 제 1일) 수란관 상부에서 수정된 후 성숙분열을 끝내고 난할을 시작하여 수란관에서 3~4일을 지내게 되며 상실배로 발생이 진행되어 자궁에 도달되면 포배기로 되면서 착상을 하게 된다²⁰⁾. 자궁에 도달하기까지는 대개 4~5일이 걸리며 중에 따라 다소의 차이가 있다²¹⁾. 이와 같이 수정된 배아가 착상을 하기까지의 이 기간은 발생단계에 따른 배아 자체의 대사작용에도 변화²²⁾가 있음은 물론 생식수관도 이를 받아들일 준비를 위한 큰 변화가 일어나고 있어 자궁내벽의 변화

Table 1. Microsomal cytochrome P-450 levels during preimplantation stage

	Cytochrome P-450 (nmole/0.1ml mic- rosome)	Cytochrome P-450 (nmole)/ protein(mg)
Pregnant		
Day 2	10.39±1.17	1.69±0.24
Day 3	9.66±0.84	2.29±0.19*
Day 4	10.74±0.97	2.65±0.25**
Day 5	8.36±0.49	2.16±0.27***

* Statically significant (p<0.001) against Day 2
 ** " " (p<0.02) " Day 3
 *** " " (p<0.001) " Day 4

등²⁵⁾⁻²⁵⁾이 관찰되고 있다. 이와 같이 착상준비를 위한 변화가 일어날 때 생쥐를 사용한 Gidley-Baired의 보고¹⁰⁾에 의하면 뇌하수체호르몬 LH는 progesterone 생성과 황체유지에 관련이 있으며 FSH는 착상에 필요한 estrogen의 생성에 영향을 미치며 현저한 내분비의 변화가 일어나고 있다고 한다. 또한 배란된 난자가 수정이 되어 수란관을 통해 자궁에 도달되는 신속한 하강여행은 이때 분비되는 estrogen stimulation 정도에 의존된다²⁶⁾²⁷⁾. 이와 같이 자궁내벽의 분비액 조성은 난소호르몬의 영향을 받으며 자궁조직내의 단백질 합성은 스테로이드호르몬에 의존한다는 보고 등²⁸⁾⁻³⁰⁾으로 이루어질 때 본 실험에서 착상준비기간에 가까울수록 cytochrome P-450의 활성이 증가하는 것은 이러한 내분비적인 변화와 함께 모체와 배아의 대사작용의 변화에 의한다고 생각된다. 본 실험에서 임신 제 1일을 실험대상에서 제외하는 것은 이 시기는 배란 직후이므로 estrogen, progesterone 등이 감소되는 시기³¹⁾⁻³³⁾이고 이미 저자들이 발표한 논문¹⁴⁾에서 발정기간에 해당하는 시기로 cytochrome P-450의 활성이 현저히 감소하는 것을 관찰하였기 때문이다.

B. 난소 제거된 흰쥐에서 임신준비기간의 cytochrome P-450의 활성: 임신 제 2일 오전에 양쪽 난소를 제거한 흰쥐의 cytochrome P-450의 활성을 측정하여 Table 2에 표시하였다. 임신 제 3일의 cytochrome P-450은 1.52 nmole(non-ectomy; 2.29 nmole), 임신 제 4일은 1.64 nmole(non-ectomy; 2.65 nmole) 임신 제 5일은 2.39 nmole(non-ectomy; 2.16 nmole)로 착상시일에 가까워질수록 차츰 증가되고 있다. 이와 같은 양상은 Table 1과 같은 현상이나 그 활성은 Table 1보다 현저히 감소되었고 임신 제 5일에 활성이 높게 나타나는 지연현상을 보이고 있다.

Table 2. Microsomal cytochrome P-450 levels during preimplantation stage after ovariectomy

	Cytochrome P-450 (nmole/0.1ml mic- rosome)	Cytochrome P-450 (nmole)/ protein(mg)
Pregnant		
Day 3	7.55±0.81	1.52±0.18
Day 4	6.09±0.47	1.64*±0.13
Day 5	10.16±1.32	2.39**±0.31

*Statically significant (p<0.05) against Day 3
 ** " " (p<0.001) against Day 4

이처럼 Table 2에서 cytochrome P-450의 활성이 감소하는 현상은 난소가 제거되어 난소에서 분비되는 스테로이드호르몬이 결핍되었기 때문에 Table 1의 실험군보다 그 활성이 현저히 감소되었다고 생각된다. 이와 같은 현상은 cytochrome P-450이 스테로이드호르몬을 기질로 사용한다는 보고¹⁵⁾와 rat testicle에 스테로이드호르몬을 처리하였을 때의 결과¹⁷⁾와 저자들의 먼저 실험¹⁴⁾에서 발정기간에 cytochrome P-450의 활성이 현저히 감소된 것과 일치되는 현상이다. 또한 이 실험군에서 임신 제 5일에 활성이 높게 나타나는 지연현상은 난소가 제거되어 스테로이드호르몬은 분비되지 않지만 자궁에 배아가 도달하게 되면 뇌하수체가 자극되어 LH가 분비되며, 이로 인해 자궁은 착상준비를 하게 되므로 정상 실험군보다 지연되면서 낮은 활성을 나타내고 있다. 이런 현상은 1968년 Moor³⁴⁾가 임신한 정상양에서 착상전 배아를 제거해 주면 다시 정상 성주기로 돌아가는 반면 배아가 자궁에 있어야만 이 배아가 humoral substance를 생성해서 general circulation을 통해 뇌하수체로 하여금 LH를 생성토록 한다는 실험보고와도 일치하는 현상이라고 하겠다.

이상의 결과들로 cytochrome P-450은 배아와 자궁의 활발한 대사작용과 밀접한 관련이 있으며 배아의 이동과 자궁의 준비작용은 난소호르몬의 직접적인 영향을 받는 것을 알 수 있다. 위의 사실들로 미루어 볼 때 난소를 제거한 후 스테로이드호르몬을 처리하면 그 작용이 어느 정도 보상될 수 있을 것으로 생각되어 저자들은 난소 제거한 흰쥐에서 스테로이드호르몬을 처리한 실험을 하고 있으므로 그 결과가 정리되는 대로 곧 발표하고자 한다. 또한 저자들의 1979년에 발표한 결과와 본 실험을 비교 관찰해 볼 때 cytochrome P-450의 활성이 착상시기가 가까워질수록 증가하는 양상은 같지만 생쥐에서는 임신 제 3일에 그 활성이 가장 높게 나

타나는 것은 같은 설치류라도 종에 따라 대사작용이 다르다는 것을 알 수 있다.

결 론

흰쥐를 사용하여 초기 임신기간 중의 간조직내 cytochrome P-450의 활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 정상 흰쥐의 임신 준비기간 중 착상시일에 가까워질수록 cytochrome P-450의 활성이 차츰 증가하였다.
- 2) 정상 흰쥐의 임신 제 4일에 cytochrome P-450의 활성은 2.65 nmoles/mg protein으로 가장 높았다.
- 3) 난소를 제거한 실험군에서는 정상 실험군보다 cytochrome P-450의 활성이 현저히 낮았다.
- 4) 난소를 제거한 실험군에서는 임신 제 5일에 cytochrome P-450의 활성이 2.39 nmoles/mg protein으로 가장 높았다.
- 5) 난소를 제거한 실험군에서는 정상군보다 cytochrome P-450 활성의 지연현상을 관찰했다.
- 6) 스테로이드홀몬이 cytochrome P-450의 활성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

—References—

- 1) G, Meglioli: Oestrogenic sensitivity of rat uterine secretion. *J. Reprod. Fert.* 46, 395—399, 1976.
- 2) Tachi, G., Tachi, S. and Linder, H.R.: Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis, and oestradiol distribution in the rat uterus. *J. Reprod. Fert.* 31, 59—76, 1972.
- 3) Finn C.A. and J.R. Hinchiffe: Histological and histochemical analysis of the formation of implantation in the mouse uterus. *J. Reprod. Fert.* 9, 301—309, 1965.
- 4) Nisson, O.: Correlation of Structure of function of luminal cell surface in the uterine epithelium of mouse and man *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 56, 803—808, 1962.
- 5) Smith, D.M. and J.D. Biggers: The estrogen requirement for implantation and the effect of its does on the implantation (and the effect of its does on the implantation) response in the mouse *J. Endocrin.* 41, 17—29, 1968.
- 6) Aldeen, K.A.M.: The influence of oestrogen and progesterone on the distribution of alkaline phosphatase in the mouse uterine endometrium. *J. Endocrin.* 46, 406, 1970.
- 7) David, A., B.G. Brachett, G.R. Gascia and L. Mastroianni, Jr: Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the fallopian tube. *J. Reprod. Fert.* 19, 285—293, 1969
- 8) Iritan, A., Nishikawa, Y., W.R. Gomes and N.L. Van Demark: Secretion rate and Chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits *J. Anim. Sci.*, 33, 829—838, 1971.
- 9) Lutwak-Mann, C.: The rabbit blastocyst and its environment physiology and biochemical aspects; In the *Biology of the Blastocyst*. Ed. R.J. Blandaw, Univ. of Chicago press, Chicago and London, pp. 243—260, 1971.
- 10) A.A. Gidley-Baird: Plasma progesterone, FSH and LH levels associated with implantation in the mouse. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30, 289—296, 1977.
- 11) Noyes, R.W., Hertig, A.T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fert. Steril.* 1, 3—25, 1950.
- 12) Cavazos, F. and Lucas, F.V.: Giant lysosomes and their associated structure in the normal human endometrium. *Amer. J. Obst. Gynec.* 106, 434—446, 1970.
- 13) Long, J.A. and Evans, H.M.: The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* 6; 1—148, 1922.
- 14) 함윤애, 김성례, 홍영숙, 성낙응: 생쥐에 있어서 성주기와 착상전 임신기간 중 cytochrome P-450의 변화. *이화학대지*, 2, 201—204, 1979.
- 15) C.Heidelberger: Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 79, 1975
- 16) Orrenius, S and Ernster L: Molecular mechanisms of oxygen activation. Osamu Hayaishi, kyoto, Japan, 215—244, 1974.
- 17) Raymond, H. Menard, S.A. Latif, and John L. Purvis: The intratesticular localization of cytochrome P-450 and cytochrome P-450 dependent enzymes in the rat testis. *Endo.* 97, 1587, 1975.
- 18) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-

- binding pigment of liver microsomes. II Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 237, 1964.
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurements with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
 - 20) Cho, Wan Kyoo and Kim, Sung Rye: Studies on effect of the Intrauterine device on the embryonal development and transport in the mouse. *Korean J. of Fertility and Sterility.* 1, 43—48, 1974.
 - 21) A.V.Nalbandov: *Reproductive Physiology of Mammals and Birds.* 3rd edition, W.H. Freeman and Company, 1976.
 - 22) L. Izquierdo and Patricia Marticorena: Alkaline Phosphatase in preimplantation mouse, *Expl. Cell. Res.*, 92, 399—402, 1975.
 - 23) R.M. Das and L. Martin: Uterine DNA synthesis and cell proliferation during early decidualization induced by oil in mice. *J. Reprod. Fert.* 53, 125—128, 1978.
 - 24) S.C. Bell: Synthesis of decidualization-associated protein in tissues of the rat uterus and placenta during pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 56, 255—262, 1979.
 - 25) S.C. Bell: Protein Synthesis during deciduoma morphogenesis in the rat. *Biol. of Reprod.* 20, 811—821, 1979.
 - 26) Heap, R.B.: Some chemical constituents of uterine washings; a method of analysis with results from various species. *J. Endocrin.* 24, 367—378, 1962.
 - 27) R.J. Aitkin: 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, 1977.
 - 28) Surani, M.A.H.: Uterine luminal proteins at the time of implantation in rats. *J. Reprod. Fert.* 48, 141—145, 1976.
 - 29) Surani, M.A.H.: Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. *J. Reprod. Fert.* 43, 411—417, 1975.
 - 30) Surani, M.A.H.: Qualitative and quantitative examination of the proteins of rat uterine luminal fluid during prooestrus and pregnancy and comparison with those of serum. *J. Reprod. Fert.*, 50, 281—287, 1977.
 - 31) Martin, L., Finn, C.A. and Trinder, G.: Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment; an autoradiographic study *J. Endocrin.* 56, 133—144, 1973.
 - 32) Horrel, E., Major, P.W., Kilpatrick, R. and Smith, B.M.: Progestational Steroids during pseudopregnancy in the rabbit. *J. Endocrin.* 55, 89—96, 1972.
 - 33) Somerville, B.W.: Daily variations in plasma levels of progesterone and oestradiol throughout the menstrual cycle. *Amer. J. Obst. Gynee*, 111, 419—426, 1971.
 - 34) Moor, R.M.: Effect of embryo on corpus luteum function. In "VIII Biennial Symposium of Animal Reproduction." *J. of Animal Sci.*, 27, Suppl. 1, 97, 1968.