

흰쥐의 초기 임신기간중 자궁내막조직세포의 미세구조 및 세포화학적 연구*

이화여자대학교 의과대학

金星禮

= ABSTRACT =

Ultrastructural and Cytochemical Studies on the Uterine Endometrial Cells of Rat at Preimplantation Stage

Sung Rye Kim

College of Medicine, Ewha Womans University

The present investigation has been undertaken to understand the mechanism of implantation process, by demonstrating the role of ovarian steroids in the differentiation of uterine endometrium for implantation.

We observed that the phosphatase activities seem to be dependent upon the ovarian steroids ; that is the activity showed higher level in progesterone treated group than in estradiol treated one, and the highest activity was found in the group treated with both estradiol and progesterone.

The differentiation of the uterine endometrial tissue seemed to be closely related to ovarian steroid hormones ; estradiol seemed to effect on the differentiation of the luminal and glandular cell and progesterone on the formation of collagen fiber of the stromal cells, thereby inducing decidualization.

Ovarian steroids might stimulate phosphatase synthesis thereby inducing differentiation of luminal and glandular tissues and then development of the uterine stromal cell for triggering decidualization in pregnant rats.

서 론

포유류의 자궁은 형태적, 기능적 변화가 활발하게 일어나는 동적인 기관이다. 즉 발정주기를 통하여 주기적으로 형태적(Long and Evans, 1922), 기능적(Lobel, et al., 1965)으로 분화하고 퇴화하며, 임신이 이

루어질 경우에는 수정된 배낭을 받아들여 착상시키고 새로운 생명체로 분화해갈 수 있는 환경여건을 갖출기 위하여 자궁조직세포의 분화가 활발하게 일어나고 있다.

포유류의 난자는 수란관 상부에서 수정을 하여 자궁으로 하강하기까지 5~6일이 걸린다. 포유류의 배아 발생은 배아와 그 모체의 생체환경과 상호 긴밀한 관

* 이 논문은 1982년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

련하에 정교하게 조절되며 진척된다. 즉 자궁내막조직의 분화는 초기 배아의 발생유도와 깊은 관련이 있으며, 특히 배아가 자궁내막조직에 착상을 하기 위하여는 배아와 내막조직사이의 인식이 필수적이며 (Psychoyos, 1967; DeFeo, 1967; Finn and Martin, 1972), 이런 인식의 매개는 자궁내 특수성분에 의하는 것 (Squire, et al., 1972; Kao, et al., 1981) 이라고 추정되고 있다. 한편 자궁내의 이와같은 변화는 난소 호르몬에 의해 진척되고 있음이 알려지고 있다 (Yochim and DeFeo, 1963; Cook and Hunter, 1978). 난소 호르몬은 발정주기에 따라, 또는 착상전 임신기간중에 종류와 분비가 다양해지며 이들의 세포내 생리적 작용은 inducer 혹은 repressor로 작용하고 있다는 것이 밝혀지고 있다 (Jacob, and Monod, 1961). 그러나 그 작용기작에 관하여는 밝혀진 바가 거의 없다. 자궁내막조직은 자궁내강 상피세포, 자궁선상피세포, 기질세포등 여러 형태의 세포로 구성되어 있는 복잡한 구조이며 호르몬 역시 estrogen, progesteron의 두 호르몬이 주기적으로 계속 조화있게 분비가 이루어지고 있으므로 호르몬에 의한 자궁내막 조직분화의 유도기작을 규명하는 일은 어려운 과제로 되어 있다. 또한 난소의 주기적 활성변화와 함께 자궁에서는 phosphatase의 활성에도 주기적 변화가 수반되며, 이런 효소의 변화로 말미암아 그 세포의 대사작용에 변화가 일어난다는 것이 보고 (Bronson, et al., 1966) 되었다. 발정주기에 따라 alkaline phosphatase의 활성도는 현저한 변화를 나타내는데 특히 발정전기와 발정기에는 자궁내강 상피세포와 선상피세포에서 그 활성도가 크다. 한편 초기 임신기간에는 착상을 위한 분화작용이 활발하게 일어나고 있는 자궁내막조직 (decidual tissue)에서 활성이 증가하며, 동시에 단백질 합성도 증가하므로 alkaline phosphatase는 decidualization의 index (Finn and MacLaren, 1967), 혹은 착상진행과정에 뚜렷한 관련이 있으므로 이를 marker enzyme (Manning, et al., 1969; Aitken, 1977) 이라고 하였다. 그러나 아직까지 자궁내의 alkaline phosphatase의 기능을 조절하는 기작과 그의 특성에 관한 것은 거의 알려져 있지 않다. 또한 착상전 배낭은 zona pellucida가 용해되어야만 자궁내막조직에 침투해 들어갈 수 있으며 자궁내액에는 이것을 용해하는 요소 (zona-lytic factor)가 존재할 것이라는 실험보고 (Orsini and McLaren, 1967; McLaren, 1970; Mintz, 1971)와 흰쥐의 자궁내막상피조직에 acid hydrolase가 존재한다는 보고 (Christie, 1967; Denker, 1972; Kirchner,

1972) 등이 있다. Mintz (1970)는 zona pellucida를 용해하는 요소가 proteolytic enzyme일 것이라고 하였으며 이것은 implantation initiating factor가 될 것이라고 하였다. 한편 Surani (1975)를 위시해서 여러 학자들은 이 lysis factor가 estrogen dependent라고 밝히고 있다 (Joshi, Yaron and Lindner, 1970; Joshi and Murray, 1974; Joshi and Rosenfeld, 1976) 또한 Smith와 Wilson (1971)은 이것들이 lysosomal enzyme이라고 하였으며, Sloane (1980)은 난소가 제거된 흰쥐의 자궁조직세포의 lysosomal apparatus의 변화가 lysosomal acid hydrolase (acid phosphatase)의 활성변화와 밀접한 관계가 있다고 발표하였다. 본인등 (Kim, 1980; Kim, et al., 1980)도 이미 쥐의 성주기에 따른 자궁내막의 분비 및 흡수와 자궁내막조직의 phosphatase 활성과의 관계, 그리고 난소제거후 난소호르몬의 처리에 따른 자궁내막조직의 phosphatase 활성을 조사한 바 있다. 그러므로 본 연구는 decidualization의 marker enzyme인 alkaline phosphatase와 착상의 initiating factor로 알려진 acid phosphatase의 활성이 난소 적출후 호르몬처리등에 의해 초기 임신기간동안 흰쥐의 자궁조직내에서 어떻게 변하는가를 세포화학적 방법으로 관찰하고 아울러 조직세포의 미세구조를 관찰함으로써 자궁조직의 착상을 위한 분화 (decidualization)를 가늠하고 이로써 포유류의 착상기작을 규명할 것을 목적으로 행하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험은 일정한 조건하에서 사육된 2개월 (체중 $200 \pm 20g$)된 성숙한 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였다.

2. 실험군

1) 정상임신군

성숙한 암컷 흰쥐를 생식능력이 있는 수컷과 동서시킨 다음날 아침, 질부에서 정자가 관찰되면 이를 임신제 1일 (Day 1)로 하였다.

2) 난소제거 임신군

임신한 흰쥐에서 임신제 2일에 난소를 제거하였다.

3) 난소제거 호르몬 처리군

- ① Estrogen 처리군 (E)
- ② Progesterone 처리군 (P)
- ③ 호르몬의 혼합 처리군 (E + P)
- ④ 용매 (vehicle) 를 처리한 실험군 (V)

3. 실험방법

1) 난소제거 : 임신제 2 일에 sodium thiopental (Abbott) 을 복강주사(10mg) 하여 마취시킨후, 배복측 부분 절개수술로 양쪽난소를 제거하였다.

2) 난소호르몬 처리 : 임신제 2 일에 난소제거후 표 1 에 표시된 대로 처리군에 17 β -estradiol (1 μ g/ 개체) 과 progesterone (2mg/ 개체) 을 각각 단독 혹은 혼합하여 단일 혹은 매 24 시간 간격으로 3 회 피하주사 하였다. 17 β -estradiol 과 progesterone 은 ethylalcohol 로 용해 시킨후 sesame oil 에 녹였다. 대조군 에는 용매인 oil 만을 처리하였다.

3) 시료채취 : 매실험군에 5 마리의 동물을 이용하였고 동일한 실험을 3 회 반복하였다. 실험에 쓰일 재료 는 다음과 같이 모았다. 먼저 각 실험군의 흰쥐는 ether 로 마취하고 양쪽자궁을 적출하여 ice-cold saline 으로 적셔진 흡착지 위에서 여분의 지방, 혈액을 제거 한 후 자궁의 무게를 달고, 자궁내액을 flushing out 시킨 다음, 다음목적에 따라 각각 달리 사용하였다.

① 자궁내막조직의 phosphatase 활성측정을 위해서는 자궁을 절개한 후, 개체당 2ml 의 0.01M Tris-Maleate 완충액 (containing 0.02 M MgCl₂, pH7)

내에서 자궁내막조직 (endometrium) 만을 모은후 glass blender (pyrex) 로 homogenate 를 만들고 이를 600 g 에서 10 분간 (4°C) 원심분리 시킨후, 상등액을 0.1 M Tris-Maleate 완충액으로 희석 (1:5) 하여 측정에 사용하였다.

② 각 실험군의 자궁내막조직세포내의 미세구조와 함유물등의 변화를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 자 궁조직을 2% glutaraldehyde 와 132 mM Sucrose 그리고 0.9mM CaCl₂ 를 함유한 75mM cacodylate 완충액 (pH 7.4) 으로 전 고정하였다 (4°C).

4) Phosphatase 의 활성측정 : Davies(1934)는 phosphoric acid esters 를 효과적으로 가수분해 시키는 phosphatase 를 최적 산도에 따라 산성 혹은 알칼리성 phosphatase 로 구분하였다. 그러므로 본 실험에서는 효소들을 각각 pH 가 다른 반응액 (pH 5.9) 에서 반응하도록 하여 산성, 알칼리성 반응액에서 측정되는 활성도를 각각 산성, 알칼리성 phosphatase 의 활성도 로 하였다.

본 실험에 있어서 반응액의 최적 pH 는 Fernley (1971) 와 Hollander (1971) 의 방법을 따랐다. phosphatase 의 활성은 Ernst (1972 a, b) 의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 조직내의 효소를 P-nitrophenol phosphatase (P-NPP) 가 함유된 반응액과 작용시켜 유리되는 P-nitrophenol (P-NP) 의 흡광도를 측정하여 효소의 활성도로 하였다.

자궁조직의 현탁액 1ml 을 각각 pH 가 5, 9 인 반

Table 1. Design of experimental group

Experimental group	Treatment and sacrifice (S)					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
1) Control : Intact			(S)			(S)
Ovariectomy (OVX)	OVX.		(S)			(S)
2) Treated : OVX. +Estradiol (E)	OVX. + E		(S)			
	OVX. + E	E		E	-	(S)
OVX. +Progesterone (P)	OVX. + P		(S)			
	OVX. + P	P		P	-	(S)
OVX. +Estradiol and progesterone (E + P)	OVX. + E & P		(S)			
	OVX. + E & P	E & P		E & P	-	(S)
OVX. + Vehicle (V)	OVX. + V		(S)			
	OVX. + V	V		V	-	(S)

용액 [Tris- Maleate (100mM), P-NPP (50mM), $MgCl_2$ (10mM), KCl (10mM)] 1ml 에 가하여 37 °C 에서 20 분간 반응시켰다. 반응은 최종농도 7.5 % 가 되는 TCA 용액을 섞음으로서 정지 시켰고, 2.5ml 의 Tris (1M) 용액으로 제발색시킨 다음, Spectrophotometer (Baush & Lomb Co. Model No. 20) 로 파장 405 nm 에서 측정하였으며 이때 standard 로는 P- nitrophenal (Sigma) 을 사용하였다. 한편 단백질 정량은 Lowry (1951) 방법을 택하였으며 이때 standard 로는 bovine serum albumin (BSA, Sigma) 을 사용하였다. 각 phosphatase 의 활성도는 $\mu mole / \mu g \text{ protein} / min$ 으로 나타내었다.

5) 자궁조직세포의 미세구조 관찰 : 75mM cacodylate 완충액 (pH 7.4) 내 2 % glutaraldehyde 로 2 시간 전에 고정시킨 자궁조직을 같은 완충액으로 2 번 씻은 후, 같은 완충액내 1 % OsO_4 로 60분간 후 고정하였다 (4 °C). 그리고 2 차 증류수로 2 번 씻은 후 ethanol series (50 %, 70 %, 80 %, 90 %) 로 각각 탈수하고 (4 °C), 그 후부터는 상온에서 ethanol 95 %, 100 % 를 거쳐 ethanol 과 propylene oxide 가 각각 1:1 로 된 혼합액과 100 % propylene oxide 에 60 분씩 탈수한 후 다시 propylene oxide 와 Epon 812 가 1:1 로 된 혼합액에 12 시간 (over night) 침투시키고 그뒤 Epon 812 혼합액에 포매하여 굳혔다.

이 시료들은 ultramicrotome (LKB. Model 1) 으로 1 μm 두께로 잘라 1 % toluidine blue 로 염색하여 광학현미경하에서 관찰부위를 선정하고 그부위를 600 ~ 700 Å 두께의 초박편으로 잘라 구리 grid (300 mesh) 에 얹고, uranyl acetate 와 lead nitrate 로 이중 염색하여 전자현미경 (ARL. Corinth 500) 으로 관찰하였다.

결 과

1. Phosphatase 의 활성도

1) 난소제거 호르몬 처리군

임신제 2일에 난소를 제거하고 두 호르몬을 각각 혹은 동시에 처리한 실험군의 phosphatase 의 활성도를 정상임신군, 난소제거임신군, 용매처리군의 활성도와 비교하기 위한 결과는 표 2에 정상임신군과의 비교치는 그림 1에, 그리고 용매처리군과의 비교치는 그림 2에 표시하였다.

난소제거후 즉시 호르몬을 단일 주사하고 24시간후 관

찰한 실험군은 임신 제 3일 (Day 3) 의 것과, 그리고 3 일간 주사하고 48시간후 관찰한 실험군은 임신 제 6일 (Day 6) 의 것과 비교하였다.

1) 임신제 3일 (Day 3)

산성 반응액에서 나타난 각 실험군의 활성도를 정상 임신군과 비교해 보면 정상 임신군의 활성도가 7.23 $\mu mole$ 인데 비해 난소제거군에서는 4.71 $\mu mole$ 이고 용매 처리군에서는 4.88 $\mu mole$ 이어서, 이 두 실험군은 정상임신군의 활성도를 100으로 보았을 때 비교치는 65 정도 밖에 되지 않는다. Estradiol 처리군에서도 활성도가 4.79 $\mu mole$ 로 비교치가 66 정도가 되나 progesterone 처리군에서는 활성도가 6.07 $\mu mole$ 로 되어서 그 비교치는 84가 되었고, 이 두 호르몬의 동시처리군에서는 활성도가 6.42 $\mu mole$ 로 그 비교치가 89에 이르고 있다 (표 2, 그림 1).

용매처리 대조군의 phosphatase 의 활성도 (4.88 $\mu mole$) 를 기준치 100으로 했을 때 estradiol 처리군 (4.79 $\mu mole$) 에서는 비교치가 98이 되어 이 호르몬의 영향을 볼 수 없었다. Progesterone 처리군 (6.07 $\mu mole$) 에서는 비교치가 124로, 두 호르몬 동시 처리군 (6.42 $\mu mole$) 에서는 비교치가 132로 되어 용매처리 대조군 보다는 활성도가 증가된 것을 관찰할 수 있었다 (표 2, 그림 2).

알칼리성 반응액에서의 정상임신군의 효소 활성도는 1.48 $\mu mole$ 인데, 난소제거군에서는 1.29 $\mu mole$ 이 되어서 그 비교치는 87로 떨어지고 있으나, estradiol 처리군에서는 효소의 활성도가 1.98 $\mu mole$ 로 그 비교치는 134가 되고 progesterone 처리군에서는 2.08 $\mu mole$ 인 141로 뛰어오르고 있다. 그러나 pH 가 다른 반응액과는 달리 이 두 가지 호르몬을 동시에 처리하면 활성도가 0.90 $\mu mole$ 로 낮아지고 따라서 그 비교치도 61에 지나지 않는다 (표 2, 그림 1).

용매처리 대조군의 활성도 (0.59 $\mu mole$) 를 기준치 100으로 했을 때 estradiol 처리군 (1.98 $\mu mole$) 에서는 대조군의 3배를 증가하는 활성을 보이고 있으며 progesterone 처리군 (2.08 $\mu mole$) 에서는 3.5배가 넘는 활성을 보여주고 있다. 두 호르몬 동시처리군 (0.90 $\mu mole$) 에서는 비교치가 153으로 증가하고 있다. 이 처리군을 앞에서 정상임신군과 비교했을 때는 대조군보다 감소 (61) 하고 있었으나 이처럼 용매처리군과 비교했을 때는 1.5배로 증가하고 있다 (표 2, 그림 2).

2) 임신제 6일 (Day 6)

Table 2. The effect of ovarian hormones on the phosphatase activity (Mean $\mu\text{mole}/\mu\text{g protein}/\text{min} \pm \text{S.E.}$) in the uterine endometrium of pregnant rats

Group	Day 3		Day 6	
	pH 5	pH 9	pH 5	pH 9
Intact	7.23 \pm 1.24	1.48 \pm 0.33	4.89 \pm 0.76	1.31 \pm 0.44
Ovariectomized : None	4.71 \pm 0.61	1.29 \pm 0.21	3.69 \pm 0.11	0.67 \pm 0.30
: Vehicle	4.88 \pm 0.98	0.59 \pm 0.13	3.58 \pm 0.52	0.84 \pm 0.18
: 17 β -estradiol	4.79 \pm 0.68	1.98 \pm 0.69	5.06 \pm 0.12	1.29 \pm 0.23
: Progesterone	6.07 \pm 0.45	2.08 \pm 0.68	6.35 \pm 0.52	1.75 \pm 0.21
: 17 β -estradiol and progesterone	6.42 \pm 0.61	0.90 \pm 0.11	8.98 \pm 0.53	1.02 \pm 0.31

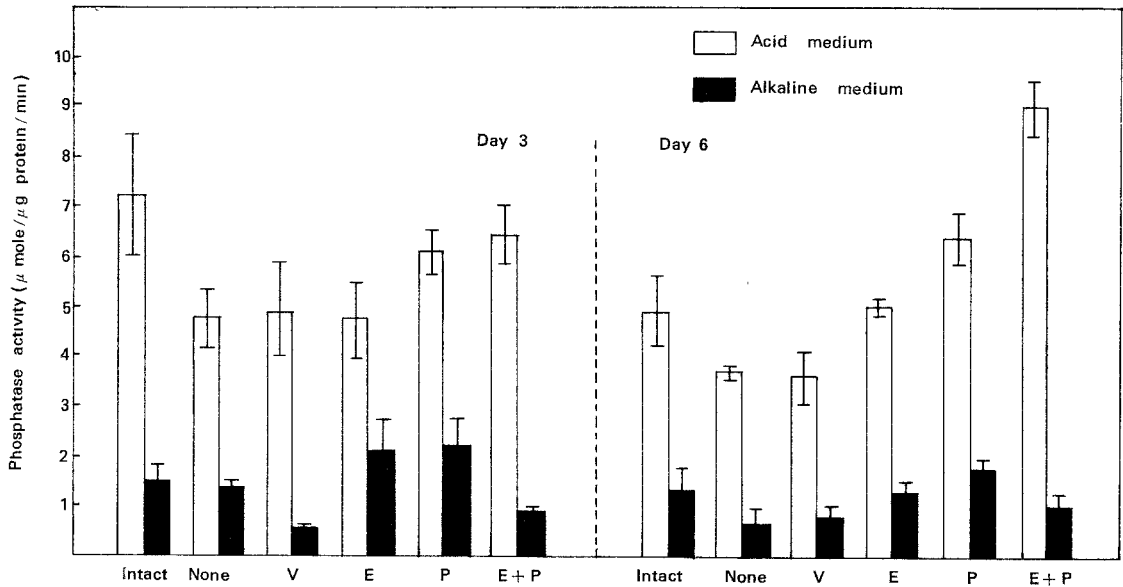


Fig. 1. Histogram showing the effects of ovarian steroids on the phosphatase activity. V: vehicle, E: estradiol, P: progesterone, E+P: estradiol and progesterone

산성반응액에서 나타난 효소의 활성도를 보면 정상 임신군에서 효소의 활성도는 $4.89 \mu\text{mole}$ 인데 난소제거군에서는 $3.69 \mu\text{mole}$ 로 감소하고 있으나 estradiol 처리군에서는 $5.06 \mu\text{mole}$ 로 정상임신군과 같은 정도로 높아지고 있고, progesterone 만을 처리한 실험군에서는 활성도의 값이 $6.35 \mu\text{mole}$ 로 되어 그 비교치는 130으로 높아지고 있다. 한편 두 호르몬을 동시에 처리한 실험군의 활성도는 $8.98 \mu\text{mole}$ 로 그 비교치는 184가 되는데 이 활성도는 같은 반응액의 다

른 모든 실험군보다 유의한 차이 ($P < 0.05$)로 높으며 이로 보아 두 호르몬을 동시에 처리한 경우 그 영향이 가장 크다는 것을 알 수 있다 (표 2, 그림 1).

용매처리 대조군의 활성도 ($3.58 \mu\text{mole}$)와 비교해 보면 estradiol 처리군 ($5.06 \mu\text{mole}$)에서는 비교치가 141이 되며 progesterone 처리군 ($6.35 \mu\text{mole}$)에서는 비교치가 177로 대조군과 유의한 차이 ($P < 0.05$)로 증가하고 있다. 두 호르몬 동시 처리군 ($8.98 \mu\text{mole}$)에서는 비교치가 251로 가장 높으며, 다른 모든 처리

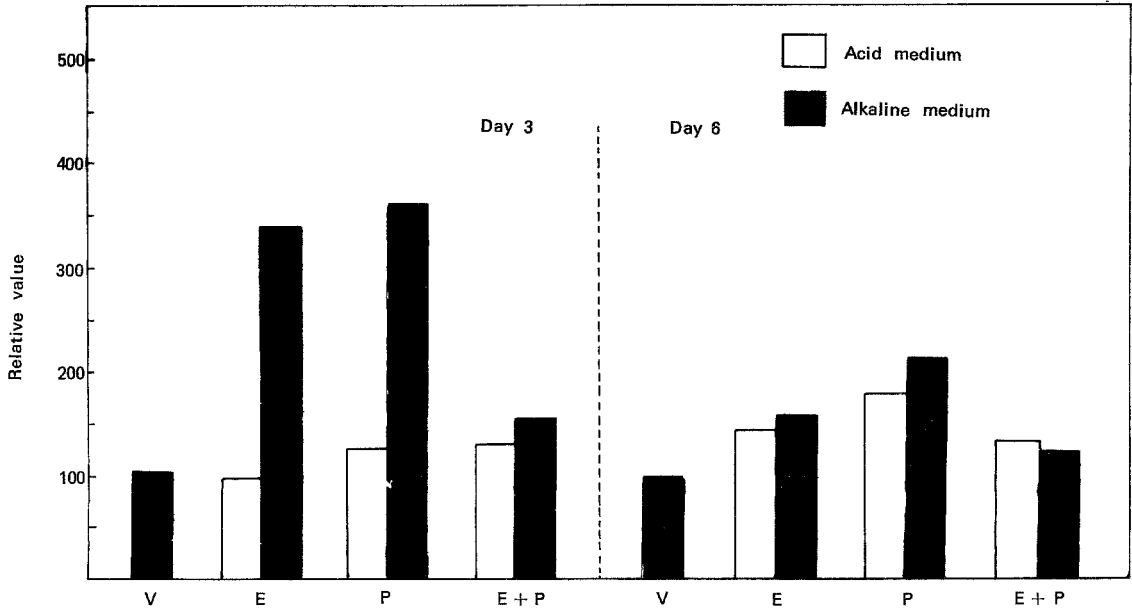


Fig. 2. Relative value of phosphatase activity to the value of ovarectomized, vehicle-treated rats.

군의 활성도 보다 유의한 차이 ($P < 0.05$) 를 나타내고 있다 (표 2, 그림 2).

알칼리성 반응액에서는 정상임신군의 활성도는 $1.31 \mu\text{mole}$ 인데 난소제거군에서는 $0.67 \mu\text{mole}$ 이어서 비교치는 51 정도로 반감되고 있다. 그러나 estradiol 처리군에서는 $1.29 \mu\text{mole}$ 로 정상임신군의 활성도와 거의 같아지고 있으며 progesterone 처리군에서는 활성도가 $1.75 \mu\text{mole}$ 이 되어 비교치는 134로 높아지고 있다. 두 호르몬 동시 처리군에서는 이 반응액에서만 활성도 ($1.02 \mu\text{mole}$) 가 가장 낮아 정상임신군의 활성도에 미치지 못하나 (비교치 78), 난소제거군 (비교치 51) 보다는 높은 활성을 나타낸다 (표 2, 그림 1).

용매처리 대조군 ($0.84 \mu\text{mole}$) 과 비교해 보면 estradiol 처리군 ($1.29 \mu\text{mole}$) 의 비교치는 154가 된다. Progesterone 처리군에서는 비교치가 208로 높아지며, 두 호르몬 처리군에서는 121을 나타낸다. 이 반응액에서는 progesterone 처리군만이 대조군보다 유의한 차이 ($P < 0.05$) 로 활성도가 증가하고 있다 (표 2, 그림 2).

2. 자궁조직세포의 미세구조

자궁조직의 효소 활성의 변화와 아울러 자궁조직세포의 미세구조의 변화등을 관찰함으로써 난소호르몬이 자궁조직의 분화에 미치는 작용기작을 규명해 보고자 자궁내막조직세포를 전자현미경으로 관찰하였다.

1. 정상임신군 (Plate 1; Plate 2; Plate 3)

자궁내막조직에서 특이한 현상은 혈관주변에 분포하는 구형의 백혈구 (leukocyte) 의 출현이다. 이 백혈구의 엽상핵 (lobular nucleus) 주변에는 작은 과립과 heterophagic vacuole 이 다수 있으며 골지체 (Golgi body) 가 발달되어 있다 (Plate 1 ①). 그리고 기질층에는 복채 (spindle) 모양의 섬유성 세포 (fibroblast) 가 많이 관찰되는데 핵주위에는 활성을 띤 미토콘드리아가 분포되어 있고 많은 글리코겐 과립 (glycogen granule) 이 산재하고 있으며, 세포질외연에는 미세섬유 (microfibril) 가 많이 관찰되었다 (Plate 1 ②). 이들 세포간격에는 콜라겐 섬유 (collagen fiber) 가 망상으로 얽혀 있으며 임신 3일의 것보다 임신 6일의 것에서 더 조밀하게 나타남을 관찰할 수 있었다. 특히 임신 6일의 것에서는 세포질 돌기가 뿔려있는 mast 세포가 종종 관찰되었다. 이 mast 세포의 세포질 전역에는 여러종류의 많은 과립이 밀집되어 있었다 (Plate 2 ③, ④).

자궁내막 상피세포층에는 내강쪽으로 향한 융모돌기 (microvilli) 가 임신제 3일에서 보다 제 6일에서 더 발달되었고 임신제 3일에서는 작은 분비과립 (secretory granule) 이 많았으나 임신제 6일의 것에서는 그 수는 줄었으나 cytolysosome, 분비낭의 수는 많이 관찰되었다 (Plate 3 ⑤, ⑥).

2. 난소제거 비처리군 (Plate 4; Plate 5)

이 실험군 3일의 것에서 자궁내강상피(uterine luminal epithelium)는 그 세포질의 첨단부위에 많은 cytolysosome과 분비과립 그리고 글리코겐이 분포되어 있으며, 무과립 소포체(SER)가 많이 발달해 있는데 반해 (Plate 4 ⑦) 이 실험군 6일의 것에서는 그 세포질 첨단 부위에 무과립 소포체는 희소하고 다만 분비과립이 간혹 관찰되었다 (Plate 4 ⑧). 자궁내강쪽으로 돌출한 용모돌기는 수와 크기가 정상군에 비해 감소되어 있었다.

이 실험군의 기질층에는 정상군에 비해 불규칙한 세포질돌기를 낸 섬유성 세포를 볼 수 있는데 인이 없고 핵막은 주름잡힌 불활성형으로 보였다. 또한 이 실험군에서는 정상대조군에서 흔히 보이던 백혈구는 보이지 않았다. 세포간격 물질에 콜라겐 섬유가 적게 분포되어 있었다 (Plate 5 ⑨, ⑩).

3. 용매처리군 (Plate 6)

이 실험군의 선상피세포들 간격에는 물질(blister)이 크게 되어 있으며 첨단부에서 기저막(base membrane)쪽으로 가면서 점점 커진것을 볼 수 있다 (Plate 6 ⑪). 그리고 세포질 돌기가 강소로 돌출되어 있다. 그리고 기질층 백혈구에는 작은 과립과 heterophagic vacuole의 수가 정상 임신군에 비해 현저하게 줄어들고 있었고 섬유성 세포역시 미세섬유가 줄어들고 있었다 (Plate 6 ⑫). 이 처리 6일군에서는 자궁내강상피세포의 기저막 부위에 많은 lysosome이 보이고 있었고 이런 현상은 이 세포의 탈락의 징후를 보이는 것으로 생각된다 (Plate 6 ⑬).

4. 17 β -estradiol 처리군 (Plate 7; Plate 8)

17 β -estradiol 처리 임신 제 3일군에는 자궁선강내강쪽으로 용모돌기가 다수 관찰되며 세포간격에는 작은 물질이 보이며 세포질에는 SER과 많은 분비과립이 관찰되었다 (Plate 7 ⑭). 기질층의 백혈구에는 정상임신군에서 보다 heterophagic vacuole이 적으며, 작은 과립은 거의 볼 수 없었다 (Plate 7 ⑮). 그러나 이 실험 제 6일군에서는 자궁내강상피세포에 발달된 용모돌기가 보이며 세포질에는 RER, 미토콘드리아가 발달되었으며, 분비소낭(secretory vesicle)들이 다수 관찰되었다 (Plate 8 ⑯). 기질층에도 다른 비처리 난소제거군에서 보이지 않던 많은 heterophagic vacuole, cytolysosome, 그리고 작은 과립들을 다수 포함한 백혈구가 다수 보이고 있어 정상 임신군에서 관찰할 수 있었던 양상이 나타나고 있었다 (Plate 8 ⑰).

5. Progesterone 처리군 (Plate 9; Plate 10)

Progesterone 처리 임신제 3일군에서는 17 β -estradiol 처리군에 비해 세포간격에 훨씬 커진 물질을 볼 수 있었다. 그리고 기질층에는 많은 과립을 포함한 백혈

구가 보이고 콜라겐 섬유도 보이고 있었다 (Plate 9 ⑱, ⑲). 임신 제 6일군에서는 혈관 내강쪽으로 돌출된 용모돌기가 임신 제 3일군 보다 발달되어 있었고, 섬유성 세포에는 미세섬유가 관찰되며, 간층세포에는 많은 분비성 과립들과 소낭들이 보이고 있었으며 세포간격에는 콜라겐 섬유도 다수 관찰되었다 (Plate 10 ⑳, ㉑).

6. 17 β -estradiol과 Progesterone 처리군 (Plate 11; Plate 12)

자궁내막상피세포는 이 처리 임신 제 3일군에서는 자궁내강쪽으로 향한 많은 용모돌기가 발달하였다. 이 시기의 다른 처리군과 마찬가지로 상피세포 간격에는 비교적 큰 물질과 lysosome이 있었고, 세포질에는 글리코겐이 흩어져 있었으며, RER과 분비과립도 다수 관찰되었다 (Plate 11 ㉒). 임신 제 6일군에서는 용모돌기가 다른 어떤 실험군에서 보다 수와 크기가 현저하게 발달되었으며 이 내강상피세포 첨단부위에는 크고 작은 많은 분비과립, 소낭들이 있었고, 글리코겐, 미토콘드리아, SER이 많았다 (Plate 12 ㉓).

기질층 세포에는 임신 제 3일군에서는 인이 보이는 활성을 띤 간층성 세포가 다수 관찰되었으며 (Plate 11 ㉔), 임신 제 6일의 것에서는 세포간격은 넓어졌고, 콜라겐 섬유가 다수 관찰되는 등 정상 임신군과 같은 양상을 하고 있었다 (Plate 12 ㉕).

고 찰

대부분의 포유류의 자궁조직은 발정주기와 임신기간 동안 주기적으로 형태적 및 생리적 변화를 한다. 이 변화는 난소호르몬 즉 estrogen과 progesterone의 조화 있는 분비에 의한 것 (Yochim and DeFeo, 1963, Cook and Hunter, 1978)으로 알려져 있다. 그러나 이들 호르몬이 어떻게 자궁의 기능을 조절하는지 그 작용 기작은 아직 확실히 알려지지 않아서 이를 밝히려는 연구가 여러모로 추진되고 있다. Nelson (1930)은 estrogen이 follicular phase에서 다량 분비되며 자궁조직을 분화시키는데 이는 progesterone보다 앞서 작용한다고 하였고 Marcus 등 (1967)과 Finn 등 (1969)은 이 estrogen을 착상유도요소라고 하였다. Luteal phase에는 progesterone이 자궁으로 하여금 착상을 위한 준비를 하도록 자극을 주며 임신을 유지하도록 한다. 또한 이 시기에는 미량으로 분비되는 estrogen도 착상을 유도하는 역할을 한다는 것이 밝혀졌다 (Krehbiel, 1941; Weichert, 1942; Bolch, 1943; Whitten, 1958; Mayer, 1963; Smith and Biggers, 1968). 이상의 보고들로 미루어 볼때 자궁조직은 follicular phase에 estrogen의 작용이 먼저 있을 후 luteal phase에 progesterone과 estrogen에 의하여 stromal cell의 성장과 분화가 일어난다고 생각된다. 그러므로 이러한 호르몬의 주기적 분비와 그 양적균형이 성주기와

착상, 그리고 임신을 조절할 것이라는 추측을 하게 된다. 이와같이 자궁내막조직의 분화가 난소호르몬의 분비조절작용에 의하여 진행될 때, 조직내 alkaline phosphatase (Finn & Hinchliff, 1964; Lobel et al., 1965), carbohydrate 대사와 관련된 효소들 (Christie, 1966) 그리고 핵산대사와 관련된 효소들의 활성화와 신진대사의 변화가 일어난다는 것이 알려지고 있다 (Bronson, et al., 1966; Smith, 1970; Yochim, 1975).

본 연구에서는 난소호르몬중 어떤 호르몬이 어떤 자궁조직의 대사작용과 분화에 관련이 있는지를 규명하기 위하여 자궁조직내의 효소의 활성을 추궁하였다. Smith(1970)는 산성 phosphatase는 탈락막조직을 탈락시키는 데 참여한다고 하였으며, Mintz(1970)는 이 효소가 배낭의 zona pellucida를 용해하고 착상의 initiating factor라고 하였다. 한편 알칼리성 phosphatase는 일반적으로 영양물질의 수송과 관련있는 조직, 분비작용을 하는 기관, 그리고 분열중에 있는 조직에서 그 활성이 높게 나타난다고 하였다 (Fernley, 1971). 본 인등(1980)도 정상발정주기 각 시기의 자궁조직의 phosphatase 활성도는 발정전기와 발정기에 높고, 발정후기에는 낮아지는 것을 관찰하였는데 이 결과들은 산성 phosphatase는 증식기에 합성된다고 한 Smith(1970)의 결과와, estrogen의 분비가 peak일때 산성과 알칼리성 phosphatase가 합성된다고 한 Henzl 등(1972)의 보고와 일치하는 결과들이다. 이로 보아 이 효소들은 estrogen이 가장 다량으로 분비되는 발정전기에서부터 발정기까지 걸쳐 합성되는 것으로 생각된다. 그리고 배란후 두 호르몬 분비량이 최저가 되는 발정후기에는 이 효소들의 활성도가 감소되다가 progesterone이 second peak를 이루는 발정간기에는 다시 그 활성도들이 증가되기 시작한다. 이와같이 난소호르몬 분비량의 변화와 효소활성간의 관련성은 자궁조직의 분화가 이 호르몬들의 영향을 받는다는 것을 의미하는 결과이다. 또한 정상임신 제 3일에서도 phosphatase의 활성도가 최고치를 나타내는데, 이 시기에 혈중 estrogen 농도 역시 최고치를 나타내고 있으므로 (미발표) 임신기간에서도 효소의 활성도는 estrogen의 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. Yochim(1975)에 의하면 임신 제 3일은 마치 발정전기와 같이 DNA, RNA 및 protein 합성등 대사작용이 활발하며, 기질세포에서도 유사분열이 왕성해진다 (Tachi, et al., 1976)는 것으로 보아 호르몬의 영향을 받아서 대사작용이 활발한 시기에 효소들의 활성도가 커지는 것으로 생각된다. 본 실험에서 산성 phosphatase의 활성도가 큰 비율을 차지

하고 있다. 자궁조직은 수정란의 착상을 위한 준비작용으로 DNA, RNA 그리고 protein의 합성이 일어나고 또한 세포분열이 왕성해진다 (O'Malley, 1971). 수정이 되지 않았을 때는 이와같이 착상준비를 위하여 형성되었던 탈락막이 무너져 내리는데 이 세포들을 탈락시키는 작용을 하는 것이 바로 이 시기에 합성되었던 산성 phosphatase인 것으로 생각된다.

Henzl 등(1972)과 Sloane(1980) 등이 산성 phosphatase의 분포도를 전자현미경으로 관찰한 바에 의하면 산성 phosphatase가 증식시기에 decidua 세포의 lysosome 속에 존재하다가 세포가 탈락할 단계에는 세포와 세포의 연결부에 존재한다고 하였다. 본 실험에서도 정상임신 제 3일에는 백혈구 세포질내에 여러형태의 lysosome이 존재하고 용매처리 임신 제 6일에서는 자궁내막 상피세포 기저부에 다수의 lysosome이 관찰되고 있다. 이러한 결과는 혈중 estrogen 양이 최고치(미발표)를 이루며 대사작용이 활발한 발정전기와 임신 제 3일에 산성 phosphatase가 합성되어 퇴화될 세포들의 연결부를 용해시켜 탈락시키는 작용을 하는 것을 암시하는 것으로 생각된다. 또한 Clemetson 등(1977)은 난소를 제거한 흰쥐에 estradiol을 주사하면 Na^+ , K^+ 과 수분이 자궁내강으로 분비되고 progesterone을 처리하면 흡수현상을 관찰할 수 있다고 하였다. 본 인등(1980)도 증식시기에는 자궁내막이 증가되고 발정간기, 후기에는 이 내막이 소실하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 발정기에 알칼리성 phosphatase가 높은 활성을 나타내었는데 이는 이 효소들이 막 투과성과 관련있으며, 그 작용은 호르몬에 의한 영향을 받는다는 것을 제시하는 결과이었다. 한편 정상 임신 제 6일에 산성 phosphatase의 활성도가 감소하는데 그 까닭은 임신 제 5일에 자궁에 도달한 배낭의 zona pellucida를 용해하는 효소인 산성 phosphatase를 자궁내강으로 분비하였기 때문이라고 생각된다. Kraicer(1967)와 Dickman 등(1967)은 임신 제 5일에 자궁에 도달한 배낭은 zona pellucida에 둘러 싸여 있으나 제 6일이 되면 zona pellucida는 용해되고 착상이 시작된다고 하였고, Sloane(1980)은 이 용해효소는 lysosome내에 함유되어 있는 산성 phosphatase라고 말하고 있다. 본 실험에서 전시기를 걸쳐 알칼리성 phosphatase는 산성 phosphatase에 비해 그 활성도가 낮은 것은 앞서 발표(Kim, 1981)한 바와 같이 임신날짜가 지속됨에 따라 약간 증가추세를 보이며 그 활성이 지속되는 결과와 Murdoch(1978)가 한쪽 자궁만을 trauma를 주어 decidua를 유도했을 때 알칼리

성 phosphatase 활성이 trauma 를 주지 않은 다른 한 쪽보다 더 높은 것을 관찰한 결과는 알칼리성 phosphatase 의 활성은 모체의 혈중 호르몬에만 의존하는 것이 아니라는 것을 의미한다. Aitken (1977) 과 Pratt (1977) 는 알칼리성 phosphatase 는 생쥐의 임신 제 4일이 된 자궁에서 단백질합성과 밀접한 관계를 보이며 활성도는 착상부위에서 증가하고 대사산물의 세포막 통과에 중요한 역할을 한다고 보고하고 있으므로 이로부터 이 효소는 배낭의 발생과 임신의 유지에 필요한 영양소를 자궁내강으로 분비하는 작용과 밀접한 관계가 있는 것으로 사려된다. Yochim (1975) 은 임신 제 2일부터 제 5일까지의 자궁에서는 soluble protein 합성이 계속 지속된다고 하였고 Tachi 등 (1976) 은 이 시기에는 유사분열이 증가되며 알칼리성 phosphatase 의 활성이 증가된다고 하였다. 이러한 결과들에 미루어 볼때 초기 임신 전기간에 이 효소의 지속적인 작용이 필요하며 이때문에 본 실험에서는 초기임신 전기간을 통하여 그와같은 지속적인 활성도가 나타난 것이라고 생각된다. 17β -estradiol 처리 제 3일군에서 산성 phosphatase 의 활성도는 정상임신 제 3일군보다 낮으나 알칼리성 phosphatase 의 경우는 이시기의 정상임신군보다 높다. 형태적 관찰에서도 정상임신 제 3일군에서 관찰되었던 기질세포층의 leukocyte 와 fibroblast 는 관찰되지 않았으나 자궁내강 상피세포는 fuzzy coat 로 둘러싸인 용모돌기가 다수 관찰되며 분비과립도 보이고 있다. 한편 계속 3일간 처리하였을 때는 모든 phosphatase 의 활성도가 정상임신 제 6일군과 거의 같아졌고 형태적 관찰에서도 정상임신군과 같은 자궁내강상피세포를 관찰할 수 있었으나 기질층에서는 현저한 decidualization 은 볼 수 없었고 세포간격에는 collagen fiber 와 mast cell 의 수는 적게 관찰되었다. 이러한 결과는 Kirkland 등(1979) 이 미성숙 흰쥐에서 estrogen 처리 24 시간후에는 자궁내강상피세포에서, 그리고 36 시간후에는 기질층세포에서 유사분열이 일어난다고 한 보고와 일치하고 있다. 이 17β -estradiol 처리군은 임신 제 2일에 난소를 제거하고 estrogen 만 주사하였으므로 progesterone 의 영향은 받지 못한 상태이다. 그러므로 estrogen 은 자궁내강상피세포만을 자극하여 상피세포에서 분비작용은 일어나고 있으나 기질층세포분화는 일어나지 못하고 있는 것으로 생각된다. Progesterone 처리군에서는 estrogen 처리군보다 모든 효소의 활성이 더 높아지고 있고 형태적 관찰에서도 기질층에서 DCR 의 특징인 혈관의 perm-

ability 와 blister 가 커진 edema 현상등을 관찰할 수 있었다. 임신 제 1일에 혈중 estrogen 양과 핵내 estrogen receptor 양이 다 높게 나타나고 있으므로 (미 발표) 이 실험군에서는 estregen 의 영향을 이미 받은후 임신 제 2일에 난소를 제거하고 progesterone 을 처리하였으므로 자궁내막기질층에서 DCR 현상을 관찰할 수 있었다고 생각된다. 이러한 결과는 Tachi 등(1970) 이 estrogen 을 처리했을때는 자궁내강상피세포에서, progesterone 과 estrogen 을 처리했을때는 기질층에서 핵이 뚜렷해지고 ^3H -uridin uptake 가 일어난다고 한 결과와 일치된다. 그러므로 17β -estradiol 과 progesterone 을 다 3일간 계속 주사한 경우에는 산성 phosphatase 의 활성이 모든 실험군에 비해 크게 커지고 있으며 형태적 관찰에서 DCR 현상과 분비현상이 다 관찰되고 있다. 그러나 알칼리성 phosphatase 의 활성이 낮은 것은 산성 phosphatase 의 과대증가현상에 따른 상대적 감소현상이라고 생각된다. 그러므로 본 실험의 결과를 종합적으로 고찰해보면 estrogen 은 자궁내막상피세포의 분화를, progesterone 은 기질층세포의 분화를 주로 촉진시키는 것을 관찰하였으므로 자궁조직을 구성하고 있는 각 조직층에 estrogen 과 progesterone 의 표적세포가 다르다는 것을 인식하였다. 또한 이 호르몬이 자궁조직분화에 미치는 시기는 배란시기의 estrogen 의 작용이 먼저 있을 후 progesterone 이 작용을 하며 이때 estrogen 이 함께 작용한다면 더 효과적인 분화, 즉 decidualization 이 일어날 수 있는 결과를 관찰하였다. 본 연구를 통해 산성 phosphatase 의 활성도가 높은 것은 계속 주기적으로 분화하고 퇴화하여야 하는 자궁조직의 특수성때문인 것으로 여겨진다.

결 론

본 연구는 포유류 착상기작을 규명할 목적으로 초기 임신중인 흰쥐의 난소를 적출하고 난소 호르몬을 주사하여 자궁내막조직의 phosphatase 의 활성도와 미세구조를 관찰하였다.

연구 결과는 다음과 같았다.

난소를 제거하고 난소 스테로이드 호르몬을 처리하였을때 phosphatase 의 활성은 난소 스테로이드 호르몬에 영향을 받고 있었다. Phosphatase 의 활성은 17β -estradiol 처리군보다 progesterone 처리군에서 더 높았으며, 두 호르몬의 동시 처리군에서 가장 높았다.

자궁내막조직의 분화는 난소 스테로이드 호르몬과 밀접한 관계를 갖고 있는 것을 관찰하였다. 즉 estradiol은 자궁내강상피세포층을 발달시켰고, progesterone은 기질세포간격물질에 많은 collagen fiber를 출현시킨 것을 관찰하였다. 그러므로 자궁내강, 선강상피세포의 분화는 estradiol에 의해 유도되고, 그다음 progesterone에 의한 자궁내막 기질층에 분화가 있어야 decidualization이 일어나고 계속 유지된다는 것을 확인하였다.

본 연구의 결과로 미루어 보아 임신초기에 난소 스테로이드 호르몬은 자궁내막조직의 phosphatase 합성을 유도하며 phosphatase는 자궁내강상피세포와 선강상피조직을 분화시키며 기질층 세포들을 발달시키므로 decidualization을 궁극적으로 완성시키는 것으로 사려된다.

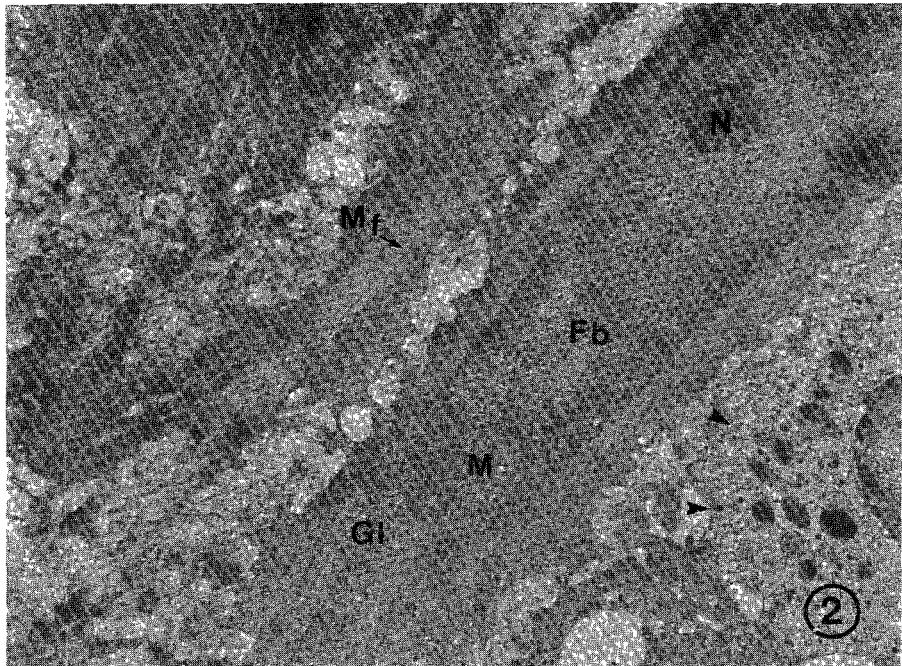
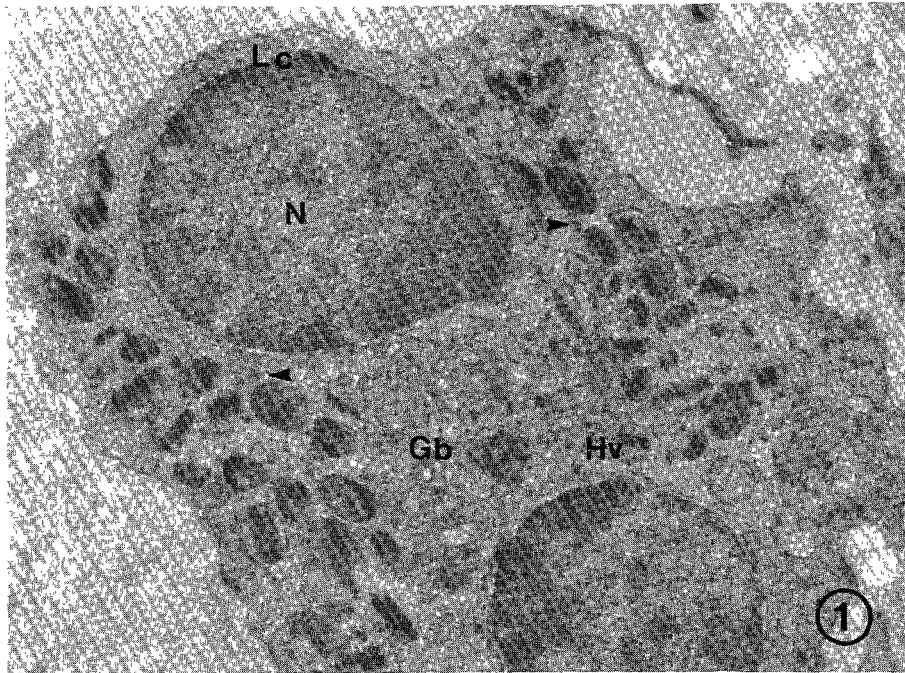
REFERENCES

- 1) Aitken, R.J.: 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.
- 2) Bloch, S Ueber die wirkung der Milchdeusensekretion auf die Nidation bei der Maus. *Schweig, Med. Wschr.*, 73:245-262, 1943.
- 3) Bronson, F.M., C.P Dagg and G.D. Snell: Reproduction. In: "Biology of the Laboratory Mouse" Ed. E.L. Green, 11, p. 187. McGraw-Hill Book Company: New York, 1966.
- 4) Christie, G.A.: Implantation of the rat embryo: glycogen and alkaline phosphatase. *J. Reprod. Fert.*, 12:279-294, 1966.
- 5) Christie, G.A.: Histochemistry of implantation in the rabbit. *Histochemie* 9:13-29, 1967.
- 6) Clemetson, C.A.B., V.L. Verma and S.J. DeCarlo: Secretion and reabsorption of uterine luminal fluid in rats. *J. Reprod. Fert.*, 49:183-187, 1977.
- 7) Cook, B. and R.H.F. Hunter: Systemic and local hormonal requirements for implantation in domestic animals. *J. Reprod. Fert.*, 54:471-482, 1978.
- 8) Davies, D.R.: The phosphatase activity of spleen extract. *Biochem. J.*, 28:529, 1934.
- 9) DeFeo, V.J.: Decidualization. In: *Cellular Biology of the Uterus*. Ed. R.M. Wynn. Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 191-291, 1967.
- 10) Denker, H.W.: Blastocyst protease and implantation, effect of ovariectomy and progesterone substitution in the rabbit, *Acta endocrinol.*, 70:591-602, 1972.
- 11) Dickmann, Z. and V.J. DeFeo: The rat blastocyst during normal pregnancy and during delayed implantation, including an observation on the shedding of the zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 13:3-9, 1967.
- 12) Ernst, S.A.: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. I. Biochemical characterization of a cytochemical medium for ultrastructural localization of ouabain sensitive, potassium phosphatase activity in avian salt gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 20:13-22, 1972a.
- 13) Ernst, S.A.: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. II. Cytochemical localization of ouabain sensitive, potassium-dependent phosphatase activity of the avian salt gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 20:23-38, 1972b.
- 14) Fernley, H.N.: Mammalian alkaline phosphatases. In: *The Enzymes*, Vol. IV, pp. 417-449. Ed. P.D. Boyer. Academic Press, New York, 1971.
- 15) Finn, C.A. and J.R. Hinchliffe: The reaction of the mouse uterus during implantation and deciduoma formation as demonstrated by changes in the distribution of alkaline phosphatase. *J. Reprod. Fert.*, 8:331-338, 1964.
- 16) Finn, C.A. and L. Martin: Hormone secretion during early pregnancy in the mouse. *J. Endocrinol.*, 45:57-65, 1969.
- 17) Finn, C.A. and L. Martin: Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol. Reprod.*, 7:82-86, 1972.
- 18) Finn, C.A. and A. McLaren: A study of the early stages of implantation in mice. *J. Reprod. Fert.*, 13:259-267, 1967.

- 19) Henzl, M.R., R.E. Smith, G. Boost, E.T. Tyler : Lysosomal Concept of Menstrual Bleeding in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34: 860–875, 1972.
- 20) Hollander, V.P.: Acid phosphatases. In : *The Enzymes*, 3rd edn., Vol. IV. pp. 449–498. Ed. P.D. Boyer. Academic Press, New York, 1972.
- 21) Jacob, F. and J. Monod : On the regulation of gene activity. *Cojd Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26: 193–209, 1961.
- 22) Joshi, M.S. and I.M. Murray : Immunological studies of the rat uterine fluid peptidase. *J. Reprod. Fert.*, 37: 361–365, 1974.
- 23) Joshi, M.S. and M.G. Rosenfeld : Hormonal influence on the appearance of uterine specific peptidase in the rat and mouse. In : *Proteides of the Biological Fluids*. Vol. 24. Pergamon. Oxford. pp. 109–112, 1976.
- 24) Joshi, M.S., A. Yaron and H.R. Linder : An endopeptidase in the uterine secretion of the proestrous rat and its relation to sperm decapitating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38 : 52–56, 1970.
- 25) Kao, L.W.L. and D.W. Bullock : Rates of uteroglobin synthesis by endometrial explants from different days of early pregnancy in the rabbit. *Biol. Reprod.* 25: 820–824, 1981.
- 26) Kim, S.R.: The effect of ovarian hormone on the phosphatase activity in the ovariectomized rat uterus. *The Ewha Medical Journal*, 3: 119–125, 1980.
- 27) Kim, M.K., S.R. Kim and W.K. Cho.: Changes in phosphatase activity of the mouse uterus during the estrous cycle. *Korean J. Zool*, Vol. 23, No. 2 : 61–68, 1980.
- 28) Kim, S.R. and W.K. Cho : On the activity of phosphatase in the endometrium of the rat uterus during early pregnancy. *Kor. J. Fertil. Steril.*, 8: 1–11, 1981.
- 29) Kirchner, C.: Uterine protease activity and lysis of the blastocyst covering in the rabbit. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28 : 177–183, 1972.
- 30) Kirkland, J. L., Laurie Lapointe, Eric Justin and Geroge M. Stancel : Effects of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. *Biol. Reprod.*, 21 : 269–271, 1979.
- 31) Krehbiel, R.H.: The effects of theelin on delayed implantation in the pregnant lactating rat. *Anat. Rec.* 81 : 381–392, 1941.
- 32) Kraicer, P.F.: Studies on the mechanism of nidation. XXIV. Isolation and study of intra-uterine ova from the rat : Technique and observations. *Int. J. Fert.*, 12; 320–328, 1967.
- 33) Lobel, B.L., Liliane Tic and M.C. Shelesnyak : Studies on the mechanism of nidation XVII. Histochemical analysis on decidualization in the rat. *Acta endocrinol.*, 50: 452–468, 1965.
- 34) Lobel, B.L., Tic, L. and M.C. Sheleshyak : Studies on the mechanism of nidation. Histochemical analysis of decidualization in the rat. *Acta. endocrinol.* 50 : 517–559. 1965.
- 35) Long, J.A. and H.M. Evans : The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, 6 : 1–148, 1922.
- 36) Lower, O.H., N.J. Rosebrouch, L.A. Farr and R.J. Randall : Protein measurement with the Folin–phenol reagent. *J. Biology Chem.*, 193 : 265–275, 1951.
- 37) Manning, T.P., B.G. Steinetz, and T. Giannina : Decidual alkaline phosphatase activity in the pregnant and pseudopregnant rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 166 : 482–509, 1969.
- 38) Marcus, S.T. and M.C. Shelesnyak : Studies on the mechanism of nidation. XXV 1 pro-oestrous oestrogen as a hormonal parameter of nidation. *Endocrinology*, 80 : 1038 – 1042, 1967.
- 39) Mayer, G : Delayed nidation in rats : a method of exploring the mechanisms of ovo-implantation. In : *Delayed Implantation*. Ed. A.C. Enders, Univ. of Chicago Press. pp. 213–228, 1963.
- 40) McLaren, A.: Early embryo-endometrial relationships. In : *Ovo-implantation, Human Gonadotrophins and Prolactin*, Eds. J.E. Hublnot, F. Leroy. C. Robyn and P. Leleux, Karger. Basel Munchen and New York, pp. 18–37, 1970.

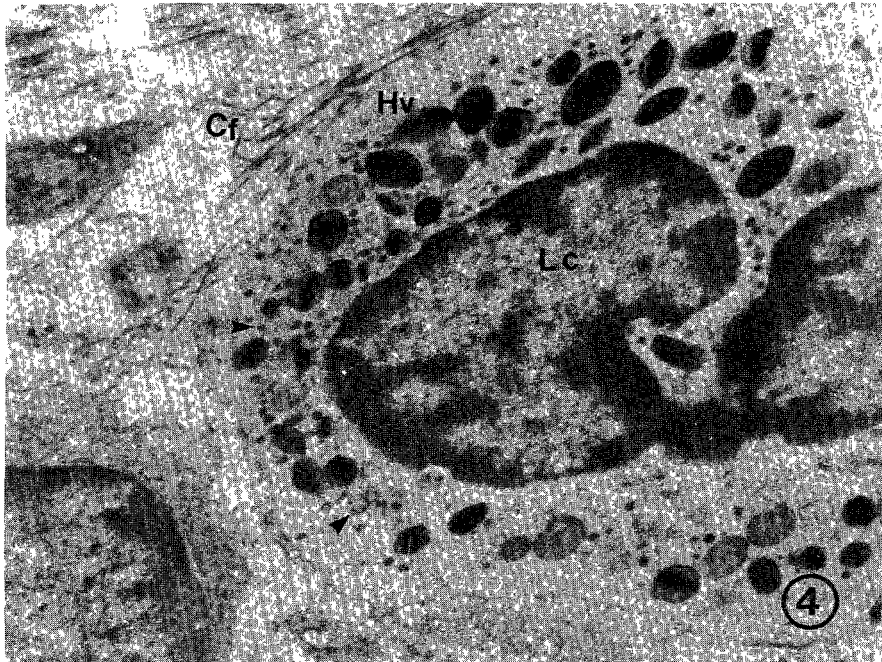
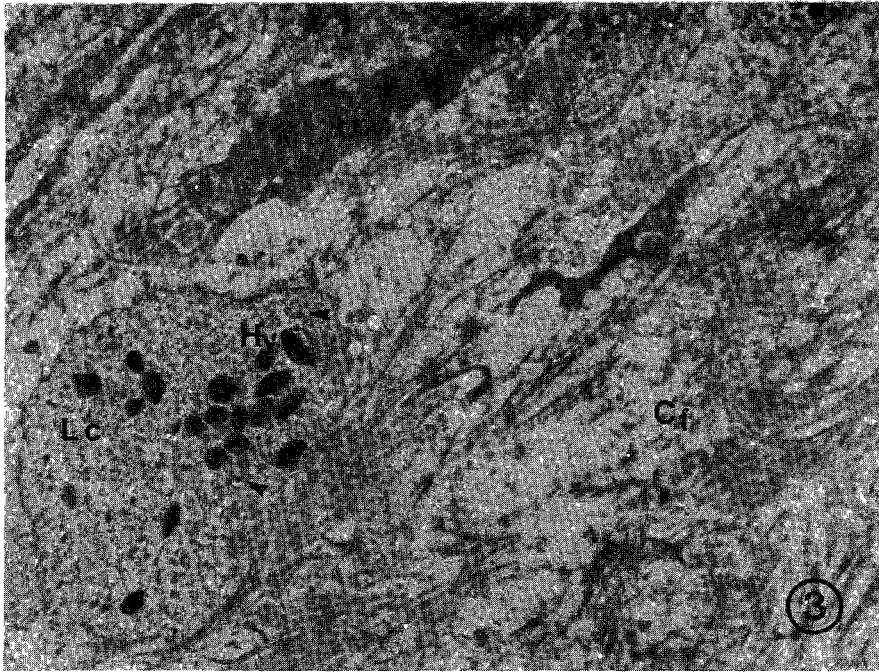
- 41) Mintz, B.: Control of embryo implantation and survival. Schering Symp. Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development. Adv. Biosci., 6 : 317-342, 1970.
- 42) Mintz, B.: Control of embryo implantation and survival. Adv. Biosci., 6 : 317-340, 1971.
- 43) Murdoch, R.N.: Activity and subcellular distribution of mouse uterine alkaline phosphatase during pregnancy and pseudopregnancy. J. Reprod. Fert., 54 : 293-300, 1978.
- 44) Nelson, W.O. and J.J. Pfiffner: Experimental production of deciduomata in the rat by an extract of the corpus luteum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 27 : 863-866, 1930.
- 45) O'Malley, B.W., M.D.: Mechanisms of action of steroid hormones. The New Engl. J. Med., 284 : 370-377, 1971.
- 46) Orsini, M.W. and A. McLaren: Loss of the zona pellucida in mice, and the effect of tubal ligation and ovariectomy. J. Reprod. Fert., 13 : 485-499, 1967.
- 47) Pratt, H.P.M.: Uterine proteins and the activation of embryos from mice during delayed implantation. J. Reprod. Fert., 50 : 1-8, 1977.
- 48) Psychoyos, A.: The hormonal interplay controlling egg implantation in the rat. Adv. Reprod. Physiol. 2. Ed. A. McLaren. Logos-Academic, London, pp. 257-278, 1967.
- 49) Sloane, B.F.: Lysosomal Apparatus in Uterine Muscle: Effects of estrogen and of ovariectomy. Biol. Reprod., 23 : 867-876, 1980.
- 50) Smith, M.S.R.: Histochemical observations on the mouse uterus during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert., 22 : 461-467, 1970.
- 51) Smith, D.M. and J.D. Biggers: The oestrogen requirement for implantation and the effect of its dose on the implantation response in the mouse. J. Endocrinol., 41 (1), 1-9, 1968.
- 52) Smith, A.F. & I.B. Wilson: Histochemical observations on early implantation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morph., 25 : 165-174, 1971.
- 53) Squire, G.D., F.W. Bazer and F.A. Murray : Electrophoretic patterns of porcine uterine secretions during the oestrous cycle. Biol. Reprod., 7 : 321-325, 1972.
- 54) Surani, M.A.H.: Hormonal regulation of proteins for implantation and embryonic diapause. J. Reprod. Fert., 43 : 411-417, 1975.
- 55) Tachi, S., C. Tachi and H.R. Lindner : Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat. J. Reprod. Fert. 21 : 37-56, 1970.
- 56) Tachi, C. and S. Tachi, and H.R. Lindner : A morphological approach to the study of ovum implantation in the rat. In : Implantation of the ovum. Edited by Yoshinaga, K., R. K. Meyer, R.O. Greep. Harvard Univ. Press, 1976.
- 57) Weichert, C.K.: The experimental control of prolonged pregnancy in the lactating rat by means of oestrogen. Anat. Rec. 83 : 1-15, 1942.
- 58) Whitten, W.K.: Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice: role of the pituitary in implantation. J. Endocrinol. 16 : 435-440, 1958.
- 59) Yochim, J.M.: Development of the progesterone uterus: metabolic aspects. Biol. Reprod., 12 : 106-133, 1975.
- 60) Yochim, J.M. and V.J. DeFeo: Hormonal control of the onset magnitude and duration of uterine sensitivity in the rat by steroid hormones of the ovary. Endocrinology, 72 : 317-326, 1963.

Plate 1



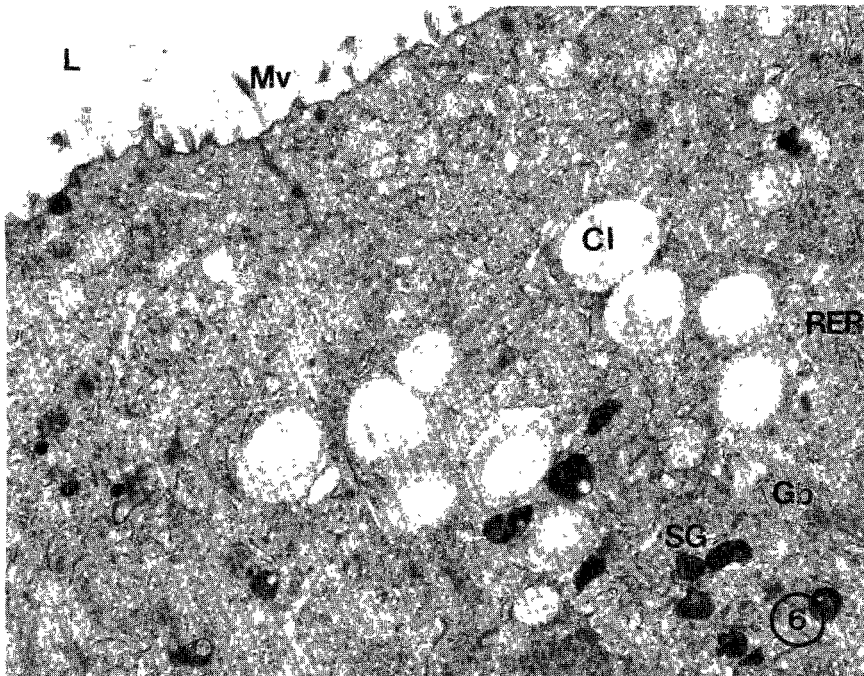
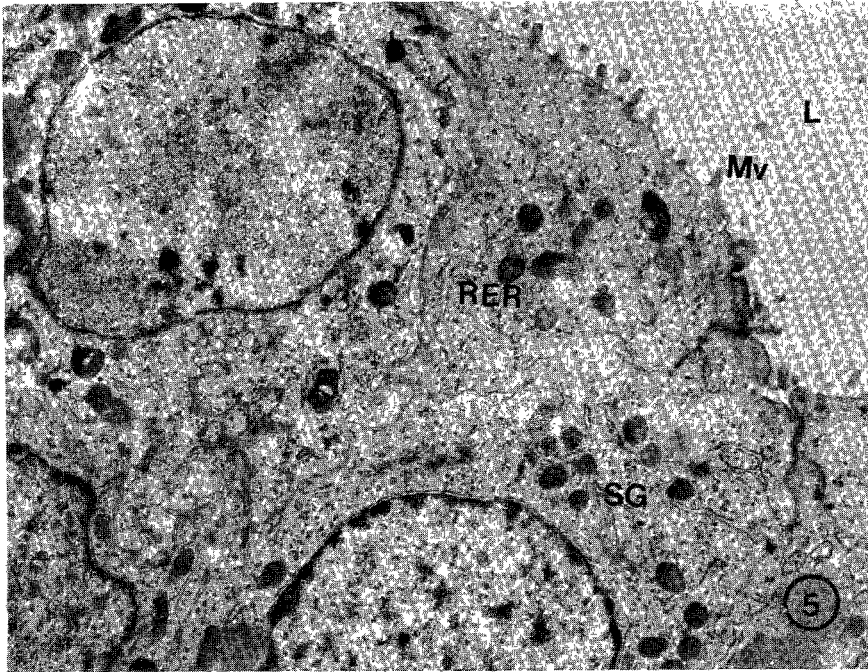
1. Electron micrograph of the round shaped leukocyte (Lc) in the uterine stroma of the normal pregnant day 3, showing lobular nucleus (N), Golgi body (Gb), clouded heterophagic vacuole (Hv) and small granules (arrow head). The surface of leukocyte is irregular and serrated. $\times 10,000$.
2. Electron micrograph of stromal fibroblast in the uterine endometrium of the normal pregnant day 3, showing an elongated nucleus (N), clouded mitochondria (M), scattered glycogen granules (Gl) and microfibril (Mf) in cytoplasm. Fb: fibroblast; arrow head: small granules. $\times 6000$

Plate 2



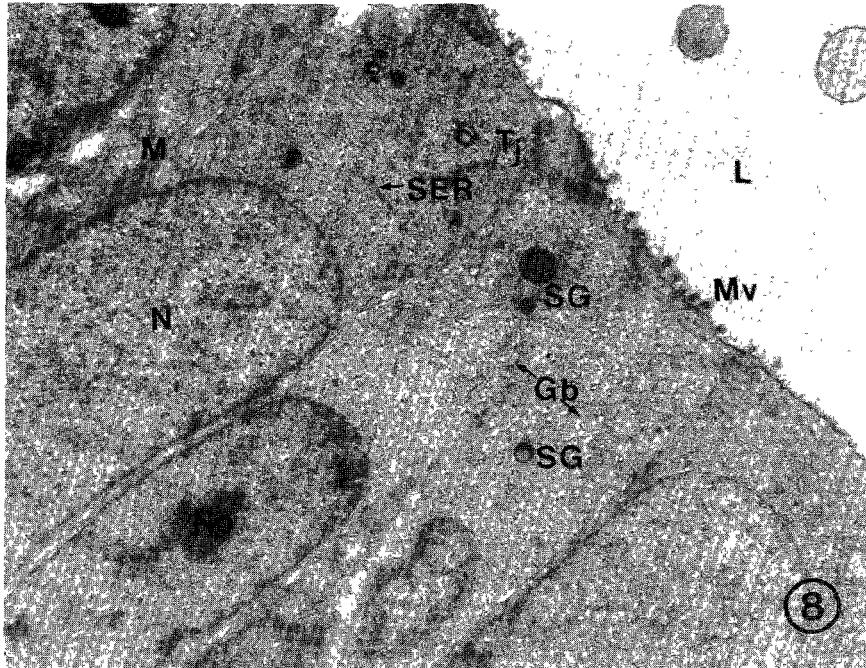
3. Electron micrograph of the intercellular substance of the uterine stroma in the normal pregnant day 6, showing collagen fiber (Cf) in the intercellular substances. Hv: heterophagic vacuole; arrow head: small granule; Lc: leukocyte. $\times 6,000$.
4. Electron micrograph of the leukocyte of the uterine stroma in the normal pregnant day 6, showing lobular nucleus (N), clouded heterophagic vacuole (Hv) and much more small granules (arrow head) in cytoplasm. Cf: collagen fiber. $\times 10,000$.

Plate 3



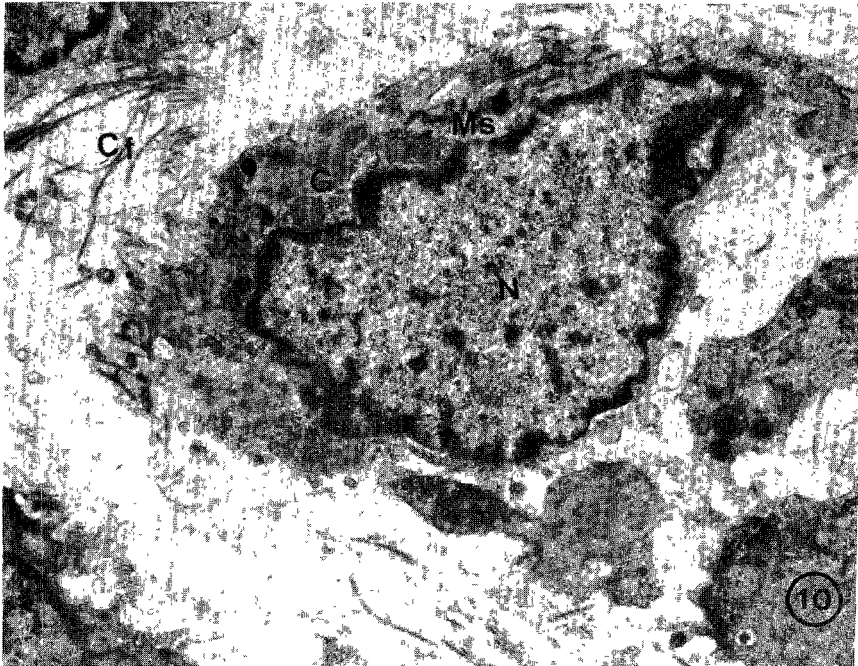
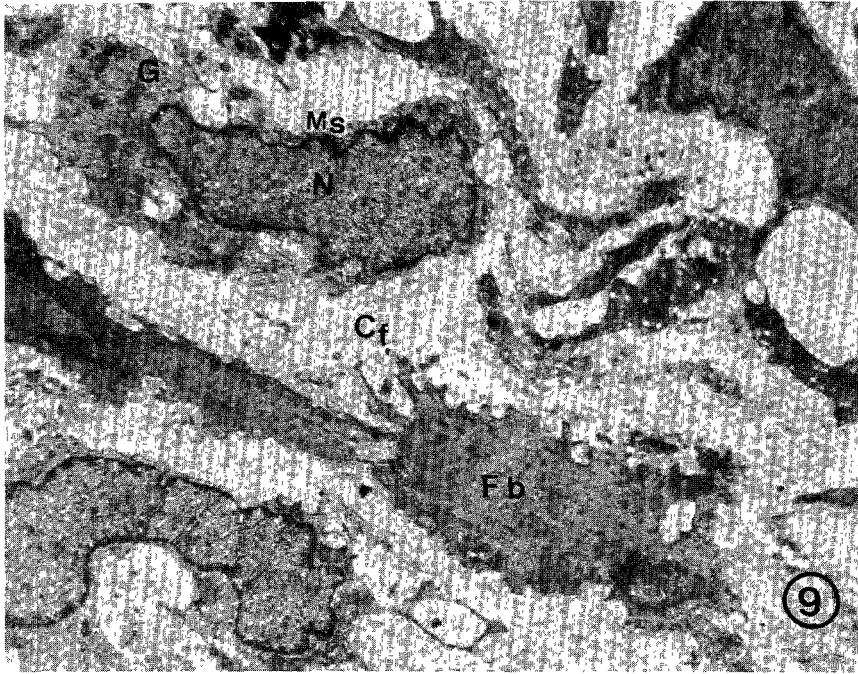
5. Electron micrograph of luminal epithelial cells in the uterine endothelium of the normal pregnant day 3, showing microvilli (Mv), many and small secretory granules (SG), rough endoplasmic reticulum (RER). $\times 3,500$.
6. Electron micrograph of luminal epithelial cells in the uterine endothelium of the normal pregnant day 6, showing microvilli (Mv), many and large cytolysosomes (CI), some secretory granules (SG) and rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi bodies (Gb). $\times 4,000$.

Plate 4



7. Electron micrograph of the uterine luminal epithelial cells in the ovariectomized pregnant day 3, showing microvilli (Mv), some rough endoplasmic reticulum (RER) and scattered little glycogen (GI). CI : cytolysosome. $\times 2,500$.
8. Electron micrograph of the uterine luminal epithelial cells in the ovariectomized pregnant day 6, showing microvilli (Mv), some smooth endoplasmic reticulum (SER), mitochondria (M) Golgi body (Gb), some secretory granules (SG). L : lumen ; Tj : tight junction. $\times 4,000$.

Plate 5



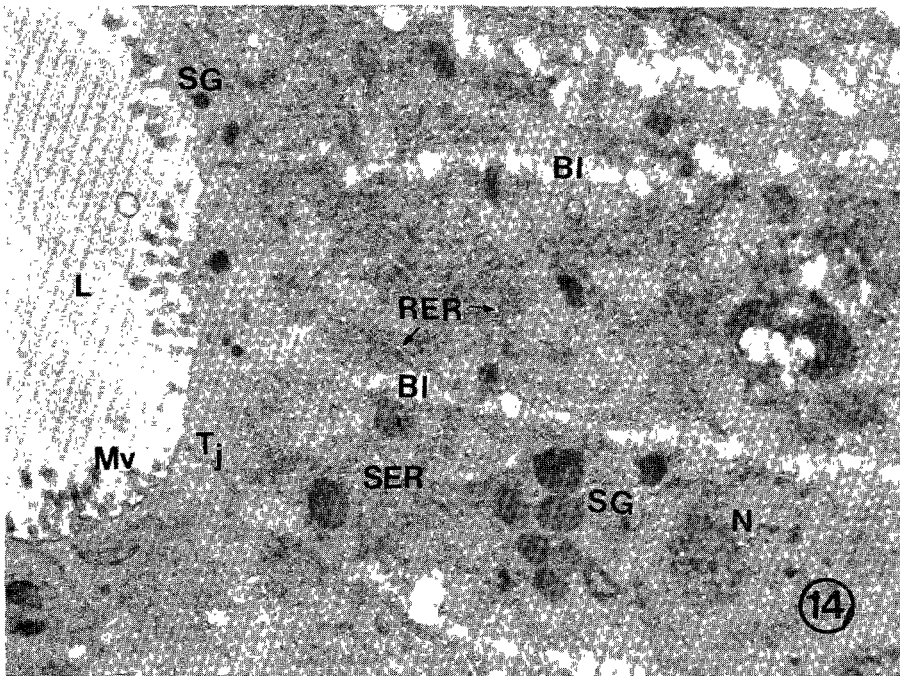
9. Electron micrograph of the mesenchyme cell (Ms) in the ovariectomized pregnant day 3, showing irregular shaped nucleus (N), and several granules (G) and a little collagen fibers (Cf) in intercellular substances. Fb: fibroblast. $\times 4,000$.
10. Electron micrograph of the mesenchyme cell (Ms) in the ovariectomized pregnant day 6, showing irregular shaped nucleus (N), several granules (G) and a little collagen (Cf) in intercellular substances. $\times 4,000$.

Plate 6



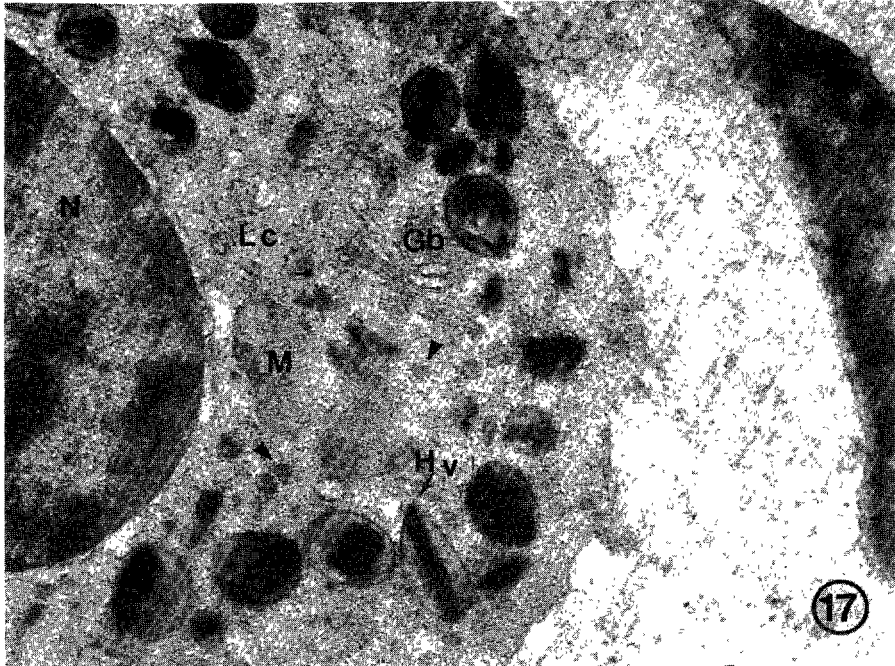
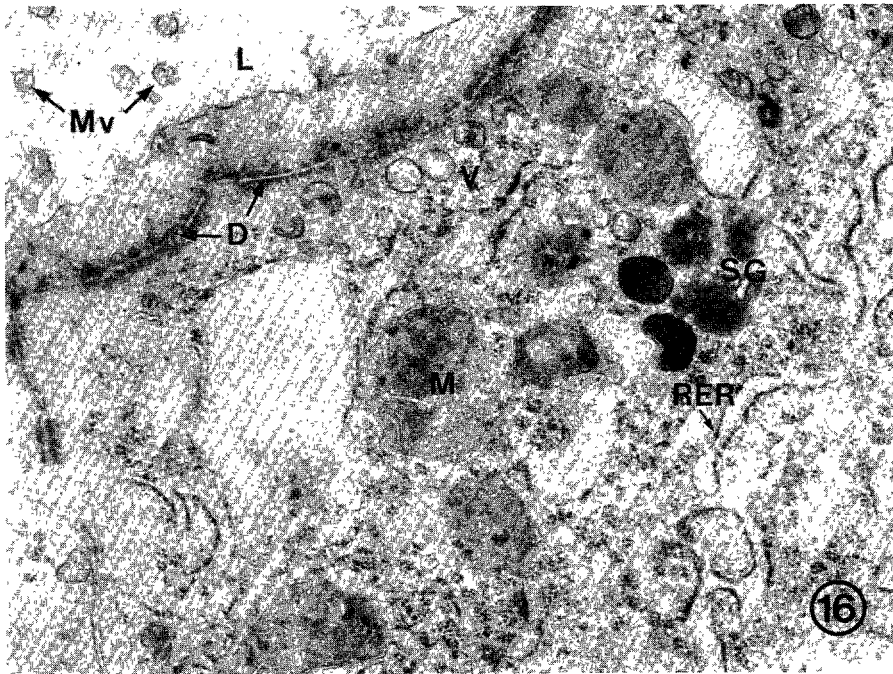
11. Electron micrograph of the glandular epithelium of the ovariectomized day 3, treated with vehicle, showing plasma membrane without microvilli, secretory granules (SG), blister (Bl) in intercellular space. L : Lumen. $\times 24,000$.
12. Electron micrograph of the leukocyte and fibroblast in the ovariectomized day 3 treated with vehicle, showing a lobular nucleus, a little heterophagic vacuoles (Hv) for the former and elongated nucleus (N), little cytoplasm for the later. Cf: collagen fiber; Hv: Heterophagic vacuole. $\times 6,000$.
13. Electron micrograph of the uterine luminal epithelial cells in the ovariectomized pregnant day 6, treated with vehicle, showing lysosome (Ly) on the basal membrane (Bm), secretory granules (SG) and microvilli (Mv). L : lumen; N : nucleus. $\times 4,000$.

Plate 7



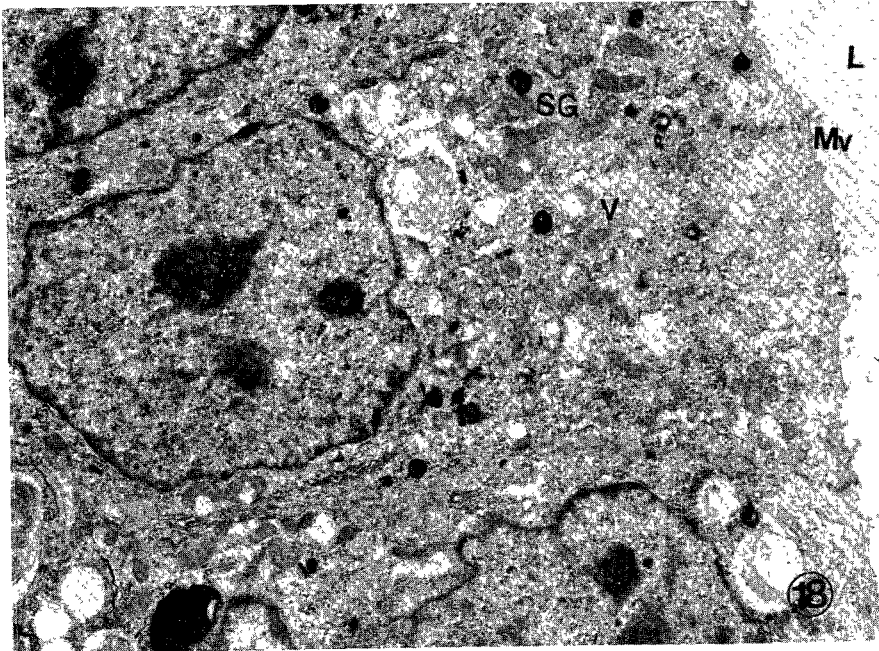
14. Electron micrograph of the uterine luminal epithelium in the ovariectomized pregnant day 3 treated with 17β -estradiol, showing well developed microvilli, rough endoplasmic reticulum (RER), secretory granules (SG), and blisters (BI) of intercellular space between cells. Tj : tight ; L : lumen ; N : nucleus. $\times 6,000$.
15. Electron micrograph of the leukocyte in the ovariectomized pregnant day 3 treated with 17β -estradiol, showing a little heterophagic vacuole (Hv) and no small granules. Cf : collagen fiber ; N : nucleus ; Lc : leukocyte. $\times 4,000$.

Plate 8



16. Electron micrograph of the luminal epithelium in the ovariectomized pregnant day 6 treated with 17 β -estradiol, showing well developed microvilli (Mv), many secretory vesicles (V), and granules (SG) mitochondria (M), and rough endoplasmic reticulum (RER). D : desmosome; L : Lumen. $\times 16,000$.
17. Electron micrograph of the round shaped leukocyte in the ovariectomized pregnant day 6 treated with 17 β -estradiol, showing mitochondria (M) with many cristae, Golgi body (Gb) and growing small granules (arrow head) and heterophagic vacuoles (Hv). N : nucleus. $\times 16,000$.

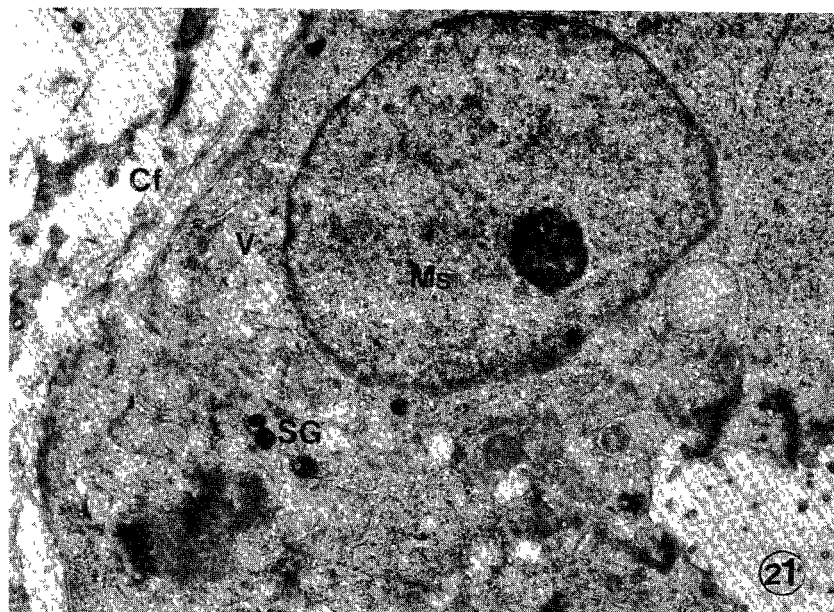
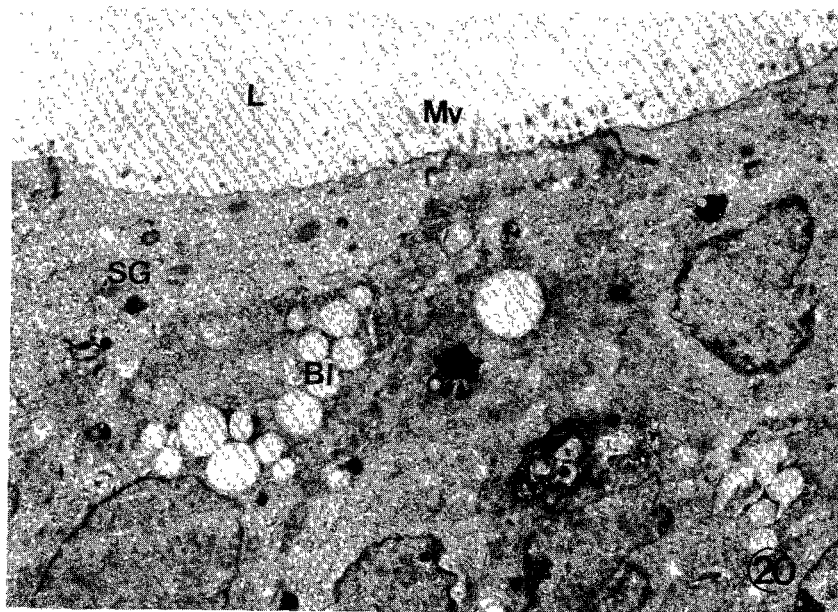
Plate 9



18. Electron micrograph of the luminal epithelial cells in the ovariectomized pregnant day 3 treated with progesterone, showing microvilli (Mv), several large secretory vesicle (V) and some secretory granules (SG). $\times 2,500$.

19. Electron micrograph of stromal cells in the ovariectomized pregnant day 3 treated with progesterone, showing leukocyte with large and small heterophagic vacuoles (Hv), and intercellular substances with collagen fiber (Cf). $\times 6,000$.

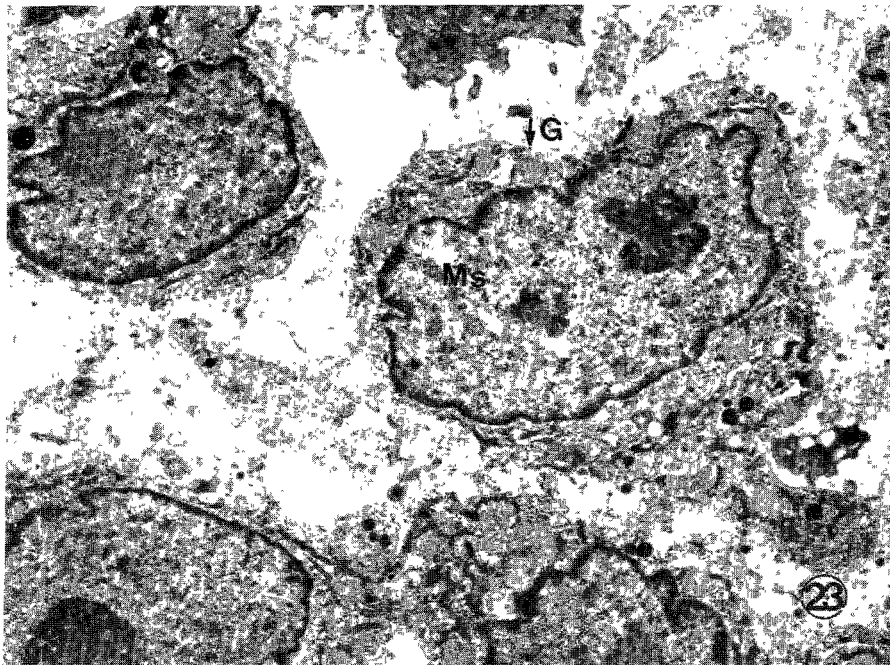
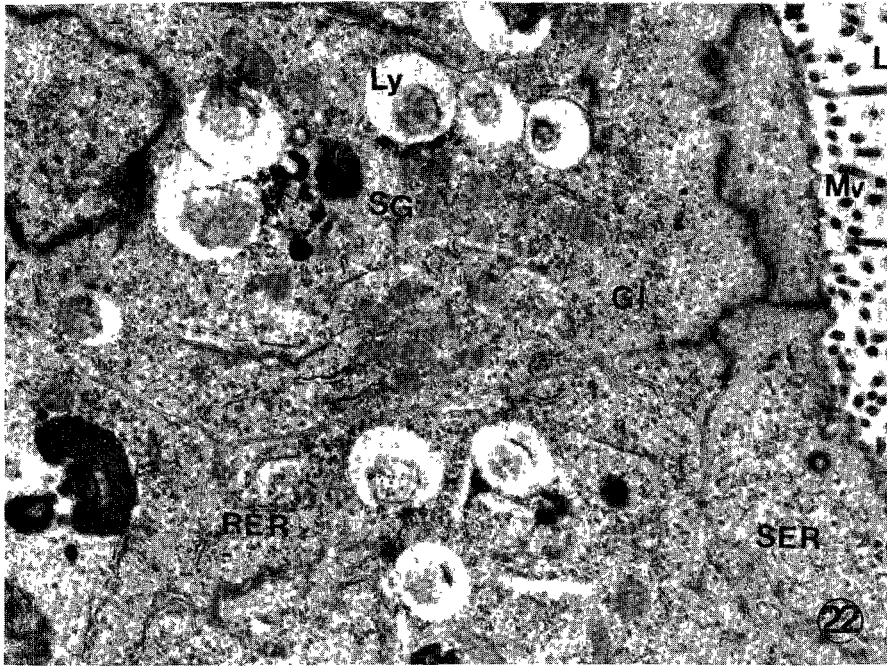
Plate 10



20. Electron micrograph of the luminal epithelial cells in the uterus of the ovariectomized pregnant day 6 treated with progesterone, showing many microvilli (Mv), several large vacuole-like blisters (Bl), and some secretory granules (SG). $\times 2,000$.

21. Electron micrograph of the uterine stromal cells in the ovariectomized pregnant day 6 treated with progesterone, showing many small vesicles (V), some granules (SG) in the mesenchyme cell and collagen fiber (Cf) in intercellular space. $\times 3,000$.

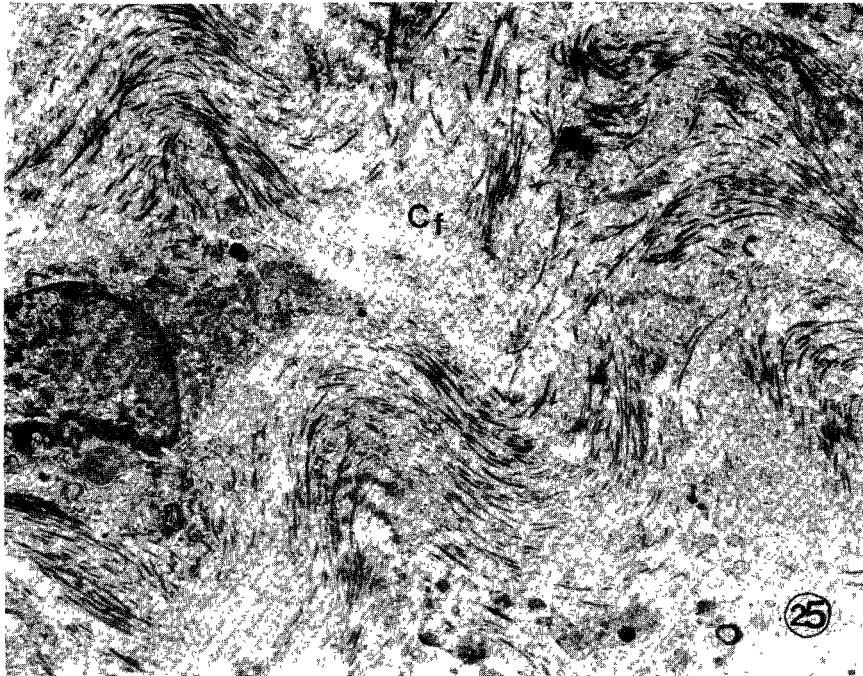
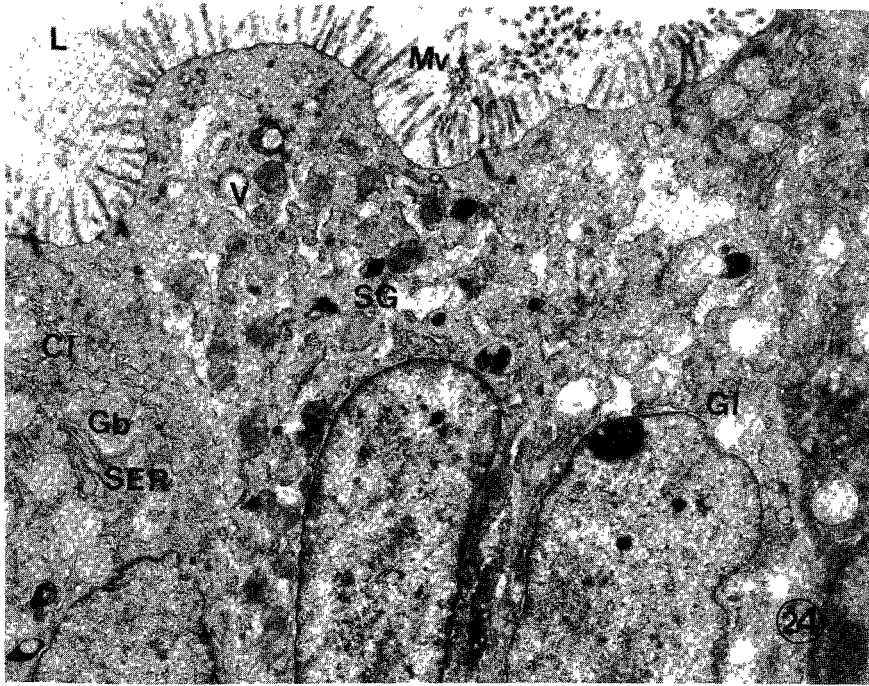
Plate 11



22. Electron micrograph of the luminal epithelium in the ovariectomized pregnant day 3 treated with 17β -estradiol and progesterone, showing many developed microvilli (Mv), lysosomes (Ly), glycogen (Gl), rough (RER) and smooth endoplasmic reticulum (SER), some secretory granules (SG). L: lumen. $\times 4,000$.

23. Electron micrograph of stromal cells in the ovariectomized pregnant day 3 treated with 17β -estradiol and progesterone, showing mesenchyme cells with some granules (G). $\times 2,500$.

Plate 12



24. Electron micrograph of the luminal epithelium in the ovariectomized pregnant day 6 treated with 17β -estradiol and progesterone, showing secretory vesicles (V), granules (SG), well developed microvilli (Mv), and smooth endoplasmic reticulum (SER), clouded glycogen (Gl). $\times 3,000$.

25. Electron micrograph of the uterine stroma in the ovariectomized pregnant day 6 treated with 17β -estradiol and progesterone, showing many collagen fibers in intercellular space. $\times 4,000$.