

## 자궁 내 배아 착상 환경에 대한 이해

성균관대학교 의과대학 제일병원 제일의학연구소 생식생물학 및 불임연구실

송 행 석

### Lessons from Mouse Models to Understand Uterine Receptivity for Embryo Implantation

Haengseok Song

*Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Cheil Medical Research Institute, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

#### 서 론

세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) 등을 포함한 다양한 보조생식술의 지속적인 발전은 급증하는 불임 부부들의 근본적인 문제들을 대부분 극복하였다. 하지만 체외수정을 통해서 건강한 배아를 생산한 경우에도 모체의 자궁이 배아에게 착상 가능한 환경을 제공하지 못한다면 성공적인 임신 및 출산을 기대할 수가 없다. 평균적으로 체외에서 배양된 건강한 배아의 약 70% 정도가 배아 이식 후 자궁 내에서 착상의 별다른 징후를 보이지 못하고 사멸된다고 보고되고 있다.<sup>1</sup> 하지만 배아 착상에 관한 연구는 착상전 배아 연구보다 더 심각한 윤리적 문제를 야기시킬 수 있기 때문에 매우 미비한 상태이다. 이러한 이유로 지금까지의 배아의 착상 기전 및 착상 환경에 대한 연구는 주로 생쥐 등의 실험 동물을 대상으로 진행되었다. 최근의 분자생물학과 발생학의 발달에 힘입어 형질전환 생쥐나 유전자 결핍 생쥐를 이용한 연구가 가능해짐에 따라, 특정 인자들이 배아의 착상 환경에 미치는 영향에 대한 직접적 증거들이 축적되고 있다. 특히 이러한 연구들을 통해 생쥐와 인간의 자궁 내 배아의 착상 환경에 유사성이 있음이 확인되었다.<sup>2-5</sup> 본 종설은 착상과 관련된 여러 개념들 중, 생쥐 모델을 이용한 자궁의 배아 착상 환경 (window of uterine

receptivity)에 대한 연구들에 초점을 맞추었고, estrogen이 생쥐 및 인간 자궁의 배아 착상 환경에 미치는 영향에 대한 연구 동향을 간략히 정리하였다. 종합적으로 생쥐 모델과 인간 자궁을 이용한 연구 사례들을 통해서 자궁의 배아 착상 환경에 대한 이해를 높이고, 앞으로의 연구 진행 방향을 모색해 보고자 한다.

#### 생쥐 자궁의 배아 착상 환경

생쥐의 경우, 수정란이 증식과 분화를 거쳐 포배기 배아로 성장한 후 4.5일 (vaginal plug를 확인한 아침을 day 1으로 간주), 즉 임신 4일째 자궁 무렵에 착상을 하게 된다. 시간적인 기준으로 이 시점의 전, 후에는 배아가 착상을 할 수 없기 때문에, 포배기 배아가 착상을 할 수 있는 이 시간대를 'Implantation Window' 라고 정의한다. 이러한 자궁의 배아 착상 환경은 전적으로 난소호르몬인 estrogen과 progesterone에 의해서 조절되며, 이러한 개념은 배아 이식 실험의 결과를 토대로 확립되었다. 즉 착상 가능한 포배기 배아를 가임신 날짜가 서로 다른 대리모 (pseudopregnant recipient)에 이식하고, 24시간 후에 이식된 배아가 착상을 하였는지의 여부를 확인하는 실험법을 사용해 왔다.<sup>6,7</sup> 임신 혹은 가임신 1일부터 3일째까지는 prereceptive 상태로, 자궁의 배아 착상 환경이 완벽히 조성되지 않아 배아와의

## 자궁 내 배아 착상 환경에 대한 이해

적절한 상호 정보 교환을 할 수 없다. 4일째는 배아가 착상을 할 수 있는 receptive 상태로, 이 시기에 자궁에 도달한 건강한 포배기 배아들은 자궁과의 복잡한 상호 정보 교환을 통해 착상을 진행한다. 5일 이후에는 이식 후 24시간이 지난 후에도 배아들이 착상을 하지 못하므로 이러한 자궁의 환경을 non-receptive (refractory) 상태로 정의하였다. 자궁 착상 환경은 위의 배아 이식 실험 결과를 토대로 이해되었고, 이를 유지하는데 관여하는 다양한 인자들에 대한 연구가 활발히 진행되었다.

### 자궁 내 배아 착상 환경에 관여하는 주요 인자들

Gene targeting에 의해 특정 인자가 결핍된 생쥐 모델이 개발되기 전에는 주로 자궁의 생리적 변화와 이를 조절하는 호르몬들의 역할에 대한 연구가 수행되었다. 최근 gene targeting에 의해 생산된 knock-out mice (유전자 결핍 생쥐)를 이용함으로써 배아의 착상 환경 조성에 미치는 특정 인자들의 직접적 역할에 대한 연구가 분자 수준에서 가능해졌다. 지금까지 cytokine, growth factor, transcription factor, lipid mediator들을 포함한 다양한 인자들이 자궁의 착상 환경을 조성하는데 관여함이 보고되었다.<sup>8</sup> 대표적인 예로 생체 내에서 다양한 기능을 수행하는 cytokine 중의 하나인 leukaemia inhibitory factor (LIF)가 결핍된 knock-out mice에서 예상치 못했던 배아의 착상 실패 표현형이 보고되었다.<sup>9</sup> 착상에 있어서 LIF의 분자적 역할을 규명하는 다양한 연구들은 모체의 자궁에서 만드는 LIF가 배아의 착상을 조절함을 확인하였다.<sup>10-13</sup> 그러나 LIF에 의해서 매개되는 복잡한 하부 신호전달체계가 어떠한 방식으로 착상을 조절하는지는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그 외에도 LIF와 수용체 gp130를 공유하는 cytokine인 Interleukin 11 (IL-11) 신호전달계도 착상 및 탈락막화 (stromal decidualization)에 관여함이 보고되었다. IL-11의 수용체 중의 하나인 IL-11R $\alpha$ 가 없는 생쥐의 자궁에서는 배아의 착상 및 탈락막화가 정상적으로 일어나지 못하였다.<sup>14</sup> 그 외에도 많은 growth factor와 transcription factor들도 배아의 착상에 매우 중요한 역할을 수행함이 보고되었다.<sup>8</sup>

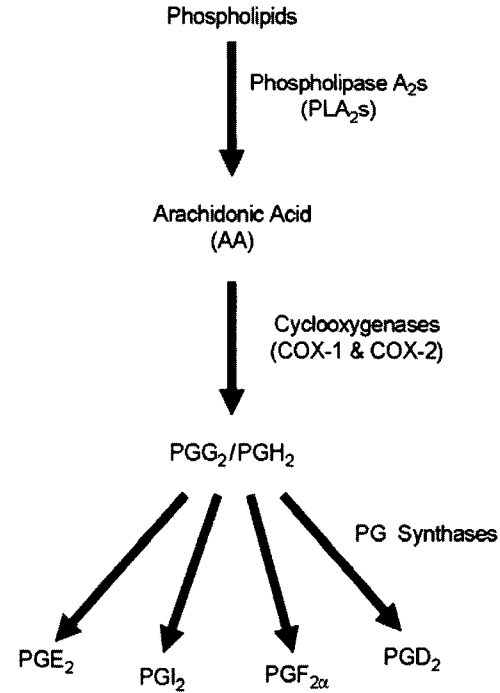


Figure 1. Schematic diagram of prostaglandin biosynthesis pathways.

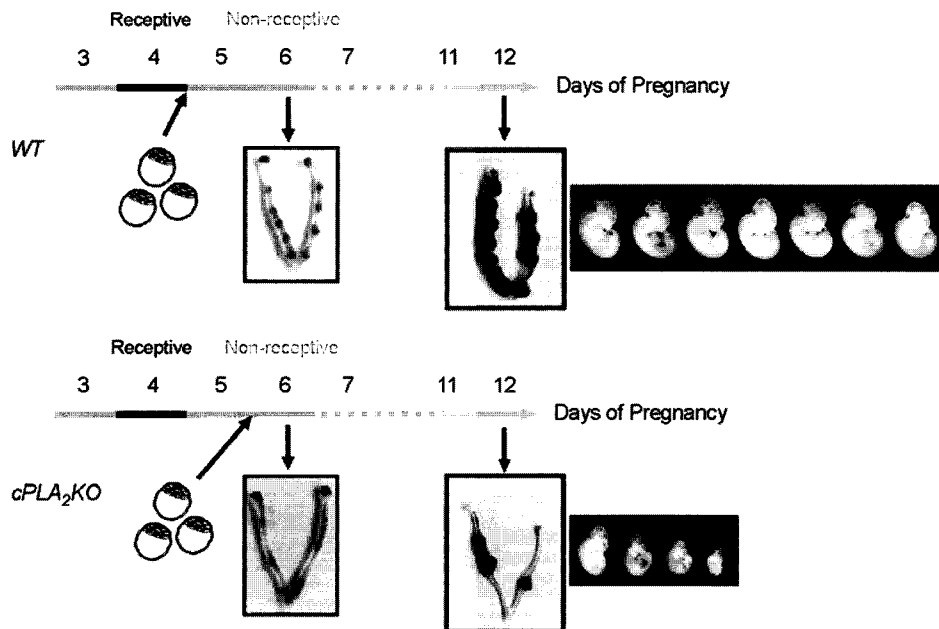
Lipid mediator들 중에서는 prostaglandin (PG)들이 배아 착상에 매우 중요한 역할을 수행함이 다양한 연구들을 통해 검증되었다. PG 합성성 과정에는 여러 단계에 걸쳐 다양한 효소들이 관여하는데 (Figure 1), PG 합성에 필요한 재료인 arachidonic acid (AA)를 공급해 주는 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)들과 AA를 이용하여 각종 PG의 전구체인 PGG<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>를 생산하는 cyclooxygenases (COX-1과 COX-2)이 대표적 효소들이다.<sup>15,16</sup> 생산된 PG 전구체들은 특이적 PG 합성효소 (PG synthase)들에 의해서 각종 PG 생산에 사용된다. PG 합성에 관여하는 다양한 효소들이 결핍된 knock-out mice들에 대한 연구들은 PG이 착상을 포함한 여러 생식 관련 현상들에서 중요한 역할을 수행함을 직접적으로 증명하였다. COX-1 knock-out mice의 경우 수정 및 착상 과정에는 이상이 없으나, 분만 과정에 문제가 발생하며,<sup>17</sup> COX-2 knock-out mice의 경우 배란, 수정, 착상을 포함한 대부분의 임신 초기 과정에 결함이 있는 것으로 보고되었다.<sup>18</sup> 또한 COX-2에 의해서 생산되는 다양한 PG들 중에서 prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)이 막수용체가 아닌

핵수용체, peroxisome proliferator-activator receptor delta (PPAR $\delta$ )를 통해서 착상 과정에 관여함이 밝혀졌다.<sup>19</sup> 이러한 일련의 결과들은 COX-1과 COX-2가 자궁 내에서 서로 다른 PG들을 합성함으로써 특히 착상 과정과 관련해서 서로 다른 역할을 수행하고 있음을 시사한다.

### 유전자 결핍 생쥐 모델들을 이용한 배아 착상 환경에 대한 이해

Cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)는 세포 내에서 COX-1과 COX-2와의 직접적인 기능적 연결이 가능하여 다른 soluble isoform (sPLA<sub>2</sub>)들에 비해서 PG 합성에 기여도가 큰 효소다.<sup>15</sup> 이 효소가 결핍된 생쥐 모델의 sub-infertility에 대한 연구 수행 중, 배아 착상 환경에 대한 새로운 사실이 확인되었다.<sup>3</sup> 정상 생쥐의 경우, 임신 5일째 아침에 배아들은 착상 (생쥐의 착상은 임신 4.5일째에 시작)을 이미 시작한 상태이나, cPLA<sub>2</sub> knock-out mice의 경우, 극히 일부의 배아들만이 착상을 하였다. cPLA<sub>2</sub> knock-out mice에서 나타

나는 sub-infertility가 배아들의 이러한 착상 실패로 인한 것으로 여겨질 수 있으나, 흥미롭게도 암컷 cPLA<sub>2</sub> knock-out mice가 생산한 산자의 수가 임신 5일째 착상된 배아의 수보다 더 많음이 확인되었다.<sup>3,20</sup> 이는 이전의 배아 착상 환경에 대한 개념으로는 설명할 수 없는 현상으로, 'implantation window' 시기에 착상을 하지 못한 배아들이 시간적으로 늦은 착상 (deferred implantation)을 할 수 있음을 암시하였다. cPLA<sub>2</sub> knock-out mice의 자궁은 배아 착상 환경 조성에 필요한 PG들이 부족한 상태이므로 이를 포함한 복합적인 원인 때문에 배아들이 늦게 착상을 하는 것으로 생각된다. 더욱 흥미로운 점은 시간적으로 늦은 착상은 초기에는 별다른 문제들을 유발하지 않지만, 착상 후 배아의 성장 및 발달에는 악영향을 끼친다는 사실이다. 정상 생쥐의 경우 자궁 속의 배아들이 정상적으로 착상과 이후의 발생 과정을 거치게 되는데 반해, cPLA<sub>2</sub> knock-out mice의 경우 늦게 착상을 하는 많은 배아들이 심각한 성장 지연 (growth retardation)을 겪게 되고, 결국 상당수의 배아들이 자궁 내에서 사멸하는 원인 (cPLA<sub>2</sub> knock-



**Figure 2.** Deferred embryo implantation leading to growth retardation and demise in cPLA<sub>2</sub> knock-out mice. Blastocysts can initiate implantation on day 5 of pregnancy in cPLA<sub>2</sub> knock-out mice. Note various spectrum of embryo growth retardation in cPLA<sub>2</sub> KO on day 12 of pregnancy. WT and KO indicate wildtype mice and knock-out mice, respectively.

out mice의 sub-fertility의 주원인)을 제공하였다. 이 연구의 결과는 착상과 관련된 두 가지의 새로운 개념을 정립해 주었다. 첫째, 자궁 착상 환경에 대한 이전의 개념과는 달리 배아의 착상 가능 환경이 더 오래 지속되며, 둘째로 최적의 착상 환경에서 착상되지 못한 배아들은 착상 후 비정상적 성장을 할 확률이 높아진다는 것이다 (Figure 2). 이는 인간에서도 최적의 착상 환경 (optimal uterine receptivity)에서 배아가 착상을 하지 못할 경우 대부분 유산으로 이어진다는 연구 결과와도 일치한다.<sup>2</sup>

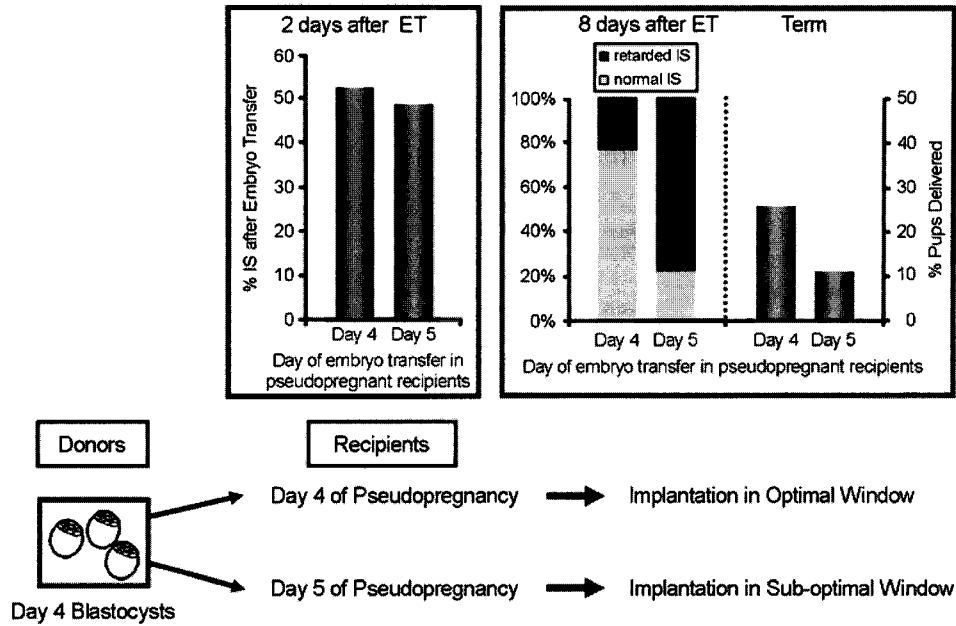
cPLA<sub>2</sub> knockout mice에서 확인된 자궁 착상 환경에 대한 새로운 개념들은 LPA<sub>3</sub>가 결핍된 생쥐 모델의 연구를 통해서 재검증 되었다.<sup>5</sup> LPA<sub>3</sub>는 lysophosphatidic acid (LPA)의 신호전달을 매개하는 G-protein coupled receptor (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>4</sub>) 중의 하나로 LPA-LPA<sub>3</sub> signaling의 자궁 내 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다. LPA<sub>3</sub> knockout mice를 이용하여 자궁 내 LPA-LPA<sub>3</sub> signaling의 역할을 규명하는 연구에서 흥미로운 사실이 확인되었다. 암컷 LPA<sub>3</sub> knockout mice는 정상 생쥐와 비교하여 적은 수의 산자를 생산하는데, 그 원인이 cPLA<sub>2</sub> knockout mice에서 나타난 비정상적인 배아 착상 환경에 기인한 현상들 [1. 시간적으로 늦어진 착상과 그로 인한 착상 후 배아들의 성장 지연 및 자궁 내 사멸. 2. 착상하는 배아들의 비정상적인 붐빔 현상 (crowded embryo spacing)]과 매우 유사함이 보고되었다.<sup>5</sup> 이러한 유사한 표현형이 나타나는 직접적인 원인이 PG의 합성의 중요 효소인 COX-2의 발현량 감소에 있음을 확인하였다. 다시 정리하면, PG의 생합성과 직접적인 관련이 없는 LPA<sub>3</sub> 신호전달계가 착상에 필수적인 PG들의 생산에 관여하는 COX-2의 발현을 조절함으로써, 착상 환경 조성에 관여한다는 새로운 사실이 확인되었다.

### 생쥐 자궁의 배아 착상 환경에 대한 재해석

위에서 살펴 본 유전자 결핍 생쥐 모델에서 나타나는 특이적인 배아 착상 환경은 착상에 중요한 PG 생산이 저하될 때 나타나는 현상이다. 따라서 이를 생쥐 자궁의 착상 환경에 대한 일반적인 개념으로 재정립하기 위해서는 정상 생쥐에서도 유사한 현상

들이 나타나는가를 배아 이식 실험을 통해서 확인할 필요가 있다. 이전의 배아 이식 실험에서는, 가임신 생쥐의 자궁에 배아를 이식하고 (가임신 4일째) 24시간이 경과한 뒤에 착상 여부를 blue dye reaction으로 확인하였다. 그러나 cPLA<sub>2</sub> knockout mice의 연구 결과에 의하면, 최적의 환경 (optimal uterine receptivity: implantation window)으로 이식되지 못한 배아들의 경우, 착상을 하기 위해서는 더 많은 시간을 필요로 한다. 따라서 배아 이식 후 24시간 경과한 뒤 착상의 유무를 검증하기 보다는 48시간 후에 검증하는 배아 이식 실험을 시행하였다.<sup>3</sup> 이 실험에서는 cPLA<sub>2</sub> knockout mice에서 나타났던 현상과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 즉, 착상 과정을 수행하는데 좀 더 많은 시간이 필요하다는 점을 제외하고는 이제까지 non-receptive하다고 여겨져 온 가임신 5일째의 자궁에서도 배아들이 착상을 개시할 수 있었다. 이는 이전의 개념과는 달리 생쥐에서 임신 및 가임신 5일째의 자궁 환경이 non-receptive한 상태라기 보다는 sub-optimal한 상태임을 제시하였다. 또한, 생리적으로 최적의 환경을 제공하지 못하는 자궁에서 배아가 착상을 하기 위해서는 좀 더 많은 시간이 필요함도 시사하였다. 배아 이식 실험을 통해서 얻은 결과를 비교 분석해 보면, 시간적인 늦어짐의 문제를 제외하고는 초기 착상 과정상에서는 별다른 차이가 나타나지 않았다. 하지만 cPLA<sub>2</sub> knockout mice에서와 마찬가지로, 많은 배아들이 착상 후 배아의 발생 과정에 문제들이 발생하며, 궁극적으로 빈번한 자궁 내 배아의 사멸을 초래하였다 (Figure 3). 이는 모체와 배아간의 생리적, 시간적 불일치를 극복하지 못함으로써 생기는 문제로 여겨지며, 위에서 언급한 대로 인간의 착상에서도 유사한 현상이 나타난다는 보고가 있다.<sup>2</sup> 이러한 일련의 연구들은 생쥐와 인간의 착상 환경이 배아의 착상 후 성장에 영향을 미치는 공통점을 갖고 있음을 제시하였고, 생쥐 모델을 이용한 착상 환경 연구가 인간의 배아 착상 환경에 대한 이해를 높이는데 기여할 수 있음을 시사하였다.

미발표된 연구 결과에 따르면, 가임신 5일째와는 달리, 6일째의 자궁 내의 환경에서는 배아가 전혀 착상을 할 수 없는데, 이는 가임신 5일째와 6일째 사이에 나타나는 중요한 생리적 변화에 기인된 것으로



**Figure 3.** Embryo implantation beyond optimal window of uterine receptivity. Bars indicate % implantation sites (IS) or pups delivered at term after embryo transfer (ET). Note significantly higher and lower rates of retarded IS and live pups at term, respectively, in recipients receiving embryos on day 5 of pseudopregnancy.

로 보여진다. 이 기간 동안에 나타나는 가장 중요한 변화 중의 하나는 자궁의 환경을 조절하는 progesterone이 급격히 감소하는 현상이다.<sup>21</sup> Progesterone 양의 급격한 감소가 일어나기 전 (가임신 5일째 아침) 외부에서 이를 보충해 줄 경우, 상당수의 배아들이 가임신 6일째에도 정상적으로 착상을 시작할 수 있음이 확인되었다 (송행석, 미출간 자료). 또한 흥미로운 사실은 자궁이 착상 가능한 환경으로 바뀔 때 나타나는 여러 현상들도 이 시기에 급격한 변화를 겪게 된다는 사실이다. 예를 들면, 착상 가능 시기인 가임신 4일째와 5일째의 경우, 자궁 내에서는 오직 stromal cells만이 증식을 하는데 반해, 가임신 6일째의 자궁에서는 비정상적으로 일부 상피세포에서만 증식이 일어난다. 종합적으로 정리하면, 생쥐에서 배아의 착상이 가능한 기간은 이전에 생각과는 달리 오랜 시간 지속되며, 사람과 생쥐의 경우 모두 sub-optimal한 착상 환경에서의 착상은 이후 배아의 성장 및 생존에 좋지 않은 영향을 미친다.

### 유전자 결핍 생쥐에서 나타나는 유전적 보상 작용

유전자 결핍 생쥐 모델을 이용한 연구들은 배아 착상 환경에 대한 재해석의 기초뿐만 아니라, 예상치 않았던 흥미 있는 결과들도 제공해 주었다. COX-2 knockout mice는 유전적 배경 (genetic background)에 따라 매우 다른 생식 관련 표현형 (phenotype)을 나타내었다. C57BL/6J/129 COX-2 knockout mice에서는 위에서 언급한 것처럼 배란부터 착상 및 탈락막화 과정에 이르는 multiple reproductive failure를 보인다.<sup>18</sup> 그러나 흥미롭게도 잡종 (outbred strain)인 CD1 COX-2 knockout mice의 경우 배란 및 착상을 포함한 여러 생식 관련 현상들에서 cPLA<sub>2</sub> knockout mice 및 LPA<sub>3</sub> knockout mice와 매우 유사한 표현형을 나타내었다. 예를 들면, CD1 COX-2 knockout mice에서 배아의 착상이 비정상적으로 늦어지며 이렇게 늦은 착상을 한 배아들이 착상 이후 발생 과정 중 발달 지연 (growth retardation)을 보이거나 일부는 사멸하는 현상을 나타내었다.<sup>4</sup>

생쥐의 유전적 배경에 따라서 COX-2 knockout mice의 표현형이 다르게 나타나는 원인을 규명하는 연구에서 흥미로운 현상이 확인되었다. '배아의 착상에 매우 중요한 역할을 수행하는 COX-2가 없는 상태에서 배아는 어떻게 착상을 진행할 수 있을까?'에 대한 해답은 COX-2 결핍에 대한 COX-1의 유전적 보상 기전 (genetic compensation mechanism)이 작용함에 있음이 보고되었다.<sup>4</sup> 생쥐의 자궁에서 COX-1과 COX-2의 발현 시기와 부위 및 발현의 유도 과정은 서로 다르다. 즉 COX-1은 자궁이 receptive한 상태인 임신 및 가임신 4일째 아침부터 자궁의 상피세포층에서만 발현되며, COX-2는 착상시 배아의 자극에 의해서 배아 주변의 luminal epithelial cells과 그 바로 아래의 stromal cells에서만 선택적으로 발현이 유도된다.<sup>22</sup> C57BL/6J/129 종과는 달리 CD1 COX-2 knock-out mice에서는 COX-1이 착상을 진행 중인 배아의 자극에 의해서 COX-2가 발현되는 부위에서 비정상적으로 유도된다.<sup>4</sup> 이는 COX-1과 COX-2의 기능적 차이에도 불구하고, COX-2가 없으므로 발생하는 생리적 문제들을 극복하려는 예상 밖의 유전적 보상 기전으로 해석된다. 흥미롭게도, 이와 동일한 현상이 COX-1 knockout mice에서도 보고된 바 있다. COX-1 knockout mice에서 COX-2가 정상 생쥐에서 COX-1이 발현되는 시간과 장소에서 비정상적으로 발현됨이 보고되었다.<sup>23</sup> 이 연구 결과는 COX-1 결핍에 대한 COX-2의 유전적 보상이 COX-1 knock-out mice에서 착상과 관련된 결함이 나타나지 않는 이유를 간접적으로 설명해 주었다.

### Estrogen이 배아 착상 환경에 미치는 영향

자궁의 환경은 주로 난소호르몬인 estrogen과 progesterone에 의해서 조절된다. 배아의 착상 과정도 전적으로 이 두 호르몬에 의해서 조절되지만, 이에 대한 정확한 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 특히 estrogen의 농도가 인간 자궁의 생리적 환경 및 배아 착상 환경에 미치는 영향에 대해서는 여전히 정확한 해석이 내려지지 않은 상태이다. 불임 치료를 위해 다수의 난자를 획득하기 위해서는 과배란을 유도하는데, 이 때 다수의 난포가 성장함

에 따라 정상적인 배란의 경우와 비교할 때 estrogen의 농도가 매우 높아진다. 이러한 비정상적으로 높은 estrogen의 농도가 자궁의 배아 착상 환경에 좋지 않은 영향을 미친다는 연구들이 보고되었지만,<sup>24~26</sup> 일부에서는 이식된 배아의 착상에 별다른 영향을 미치지 않는다는 연구들도 보고되었다.<sup>27</sup>

그러나, 생쥐 모델에서는 estrogen이 자궁의 배아 착상 환경에 미치는 영향에 대한 뚜렷한 경향성이 여러 연구들을 통해서 제시되었다.<sup>28,29</sup> 생쥐에서 estrogen의 농도가 배아 착상 과정에 미치는 영향은 'delayed implantation model'을 이용한 연구에서 잘 설명되었다. 생쥐에서 임신 4일째 아침에 'preimplantation estrogen secretion'이 일어나기 전 난소를 제거하고, 외부에서 progesterone을 지속적으로 공급해 줄 경우, 자궁과 배아 모두 착상에 대해서 중립적인 상태를 유지하게 된다. 이러한 자궁 환경을 'delayed implantation'이라고 한다.<sup>28</sup> 이 자궁 환경에 놓인 포배기 배아를 'dormant blastocyst'라고 하며, 대사적 및 생리적 측면에서 매우 낮은 활성화 상태를 유지하기 때문에 착상을 하지 못한다. 이 실험 모델에 외부에서 estrogen을 제공하면, 배아와 자궁은 정상적 착상을 수행할 수 있는 활성화 상태로 전환이 된다. 이 실험 모델은 착상을 준비하는 배아 및 자궁의 생리적 상태를 실험적으로 조절할 수 있는 장점이 있어, 난소호르몬이 착상에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하기에 용이한 실험 조건을 제공해 준다. 'Delayed implantation'을 유도한 생쥐들에게 다양한 농도의 estrogen을 공급했을 때, 예상과는 달리 매우 낮은 농도 (3 ng)의 estrogen으로도 효과적으로 배아의 착상을 유도할 수 있음이 확인되었다.<sup>28</sup> 이는 외부로부터 체내로 유입되는 다양한 xenoestrogen에 의해서 쉽게 자궁의 착상 환경이 영향을 받을 수 있음을 간접적으로 시사하였다. 더욱 흥미로운 사실은 고농도 (25 ng)의 estrogen에 노출된 자궁은 지금까지의 연구 결과에서처럼 제한된 시간 (약 24시간) 동안만 receptive한 상태를 유지한 후 non-receptive한 환경으로 급격히 변한다. 그에 반해, 저농도의 estrogen에 노출된 자궁의 경우에는 훨씬 오랜 시간 동안 배아가 착상을 시작할 수 있는 receptive한 환경을 유지한다.

최근에는 실험 동물들이 섭취하는 사료에 함유

되어 있는 phytoestrogen (식물성 에스트로젠)의 함량 차이가 배아 착상 환경에 영향을 준다는 사실이 보고되었다.<sup>29</sup> 이 연구에서는 고농도와 저농도의 phytoestrogen을 함유한 서로 다른 사료를 먹는 생쥐들간의 착상을 비교하였다. 고농도의 phytoestrogen이 함유된 사료를 공급받은 생쥐들의 경우, 일반적인 착상 시기보다 더 일찍 착상을 시작하였다 (약 4~6시간 일찍 착상을 시작함). 이는 고농도의 estrogen에 지속적으로 노출된 자궁의 uterine receptivity가 시간적으로 앞당겨졌음을 의미하며, 인간에서 과배란 유도에 의한 높은 estrogen 농도가 자궁의 착상 환경을 시간적으로 앞당긴다는 보고와도 일치한다.<sup>26</sup> 지속적으로 고농도의 phytoestrogen이 함유된 사료를 섭취한 암컷 생쥐의 자궁에서는 estrogen에 의해서 조절되는 다양한 유전자들의 발현 또한 비정상적으로 조절이 됨도 확인되었다. 이는 외부로부터 체내로 유입되는 다양한 xenoestrogen들이 예상보다 더 심각하게 생체 내의 기능에 영향을 미침을 시사한다.

### Microarray를 이용한 자궁 내 배아 착상 환경의 이해

최근 기능성 유전체학이 발전하면서 전체 유전자들의 발현 양상을 동시에 조사·비교할 수 있는 microarray 방법이 생식생물학 분야에서도 많이 사용되고 있다. 특히 복잡한 자궁의 착상 환경을 분자 수준에서 이해하기 위한 다양한 연구들이 수행되었다. 생쥐를 이용한 연구에서는 착상 부위와 비착상 부위간의 유전자 발현의 차이를 조사하여 착상시 배아에 의해서 자궁에서 유도되는 다양한 유전자들을 확인하였다.<sup>30</sup> 최근에는 착상 부위와 비착상 부위의 상피세포층만을 분리하여 microarray에 사용하는 연구들도 진행이 되었다.<sup>31,32</sup> 인간 자궁에 대한 연구에서는 월경주기 (menstrual cycle)의 여러 단계의 생리적 변화에 따른 유전자들의 발현 양상의 차이를 조사하였다.<sup>33-35</sup> 배아의 착상 시기 이전 (LH+ 2~3일)과 배아 착상 시기 (window of implantation: LH+ 7~9일)간의 유전자 발현을 비교하여, 자궁 착상 환경 조성에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 다양한 표지 인자들을 발굴하는 연구들도 진행되었다.<sup>36-38</sup>

또한 과배란 유도와 그에 따른 높은 estrogen 농도가 자궁의 배아 착상 환경에 미치는 영향을 유전자들의 발현 차이로 이해하려는 연구들도 시도되었다.<sup>39,40</sup>

이러한 일련의 microarray를 이용한 연구들은 많은 수의 유전자들이 중요한 표지 인자들임을 제시하였지만, 데이터 분석에 있어서 아직도 해결되어야 할 문제들을 여전히 안고 있다. 생쥐의 경우, 이전의 연구들에서 확인된 착상 중요 인자들 중의 상당수가 착상 부위에서 선택적으로 발현되는 유전자로 분류되지 못하였다. 여성 자궁의 경우, 월경주기 동안에 난소호르몬에 의해서 현저한 변화가 일어남에도 불구하고, 유전자 발현의 차이가 예상외로 적다는 점과, 매우 적은 수의 표지 인자들만이 유사 연구들에서 중복적으로 확인된다는 점이다. 특히 배아 착상 환경이 조성되는 시기의 자궁은 다른 시기들과 비교해서 현저한 차이를 보일 것으로 예상되지만, 유전자 발현 수준에서는 그러한 명확한 차이가 확인되지 않았다. 이는 연구에 사용된 환자들의 자궁의 유전적 및 생리적 환경의 차이뿐만 아니라, 기술적으로 해결할 수 있는 문제들에 의해서 야기된 것으로 여겨진다. 자궁은 여러 종류의 세포들로 구성된 조직으로, 그 중에서 착상 환경 조성 및 착상 초기에 중요한 세포간 접촉을 하는 세포들은 자궁 내부에서 상대적으로 매우 적은 비율을 차지한다. 대부분의 생검 (biopsy)된 환자 조직은 별다른 처리 없이 바로 RNA를 추출하여 microarray 실험에 사용되는데, 이 때 생검된 여성 자궁 시료의 대부분은 착상과 직접적인 관련이 없는 자궁 근육층이 차지한다. 이를 그대로 사용할 경우 상대적으로 적은 세포층에서 나타나는 유전자 발현의 차이를 확인하는데 많은 기술적 어려움이 존재한다. 이러한 실험상의 한계를 극복하기 위해서 최근에는 다양한 세포들로 구성된 조직에서 선택적으로 원하는 세포들만을 순수하게 분리할 수 있는 Laser capture microdissection (LCM) 등이 적용되고 있다. 이 기술을 이용할 경우, 착상에 직접 관여하는 중요 세포층만을 선택적으로 분리하여 비교, 분석할 수 있기 때문에, 이전의 연구와 비교할 때, 현저히 증가된 해상도로 유전자 발현의 차이를 확인할 수 있다. 최근에 국내에서 생쥐를 대상으로 LCM을 이용하여 착상 관련 유전자들의 발현에 대한 연구를 수행하였고, 정확도 면에서 괄

목한 만한 결과를 보여주었다.<sup>41,42</sup> 앞으로 인간 자궁 조직을 이용한 microarray 실험에 LCM 등을 이용하여 특정 세포군을 순수하게 분리할 경우, 이전의 연구들에서 보여 주었던 결과의 다양성에 의한 해석의 어려움을 상당히 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

배아의 착상은 건강한 배아와 이를 받아들이는 자궁간의 긴밀한 상호 정보 교환에 근거하여 이루어지는 매우 복잡한 과정이다. 배아의 착상 기전은 지금까지 윤리적 및 기술적 한계 등의 이유로 많은 부분에 있어서 베일에 싸여져 있다. 최근 생쥐를 이용한 배아의 착상 환경에 대한 이해는 생쥐 모델을 통해 인간 자궁의 착상 기전에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있는 가능성을 제시하였다. 현재까지 알려진 생쥐와 인간간의 자궁 배아 착상 환경의 유사성 뿐만 아니라 차이점에 대한 정확한 이해가 수반된다면, 생쥐 모델을 통해 인간의 착상 과정에 대한 이해를 지속적으로 넓혀 나갈 수 있을 것이다. 자궁의 배아 착상 환경에 대한 이해를 높이기 위해서는 자궁의 변화뿐 아니라 착상 파트너인 포배기 배아에 대한 집중적인 연구가 병행되어야 한다. 지금까지의 착상에 대한 대부분의 연구들은 유전자 변형 생쥐 등을 이용하여 주로 모체의 자궁 환경에 초점을 맞추어 진행되었다. 하지만, 배아 측면에서 착상 기전에 중요한 인자들의 발굴 및 이에 대한 기능적 연구는 매우 미비한 상태이다. 착상전 배아는 체외에서 RNA interference (RNAi) 등의 유전자 발현 변형 기술들을 효과적으로 적용할 수 있다는 큰 장점이 있기 때문에, 이를 활용할 경우 분자 수준에서 착상에 중요한 역할을 수행하는 다수의 인자들의 동정 및 기능 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 배아의 착상 환경 조성 기전에 대한 정확한 이해를 위해서는 이를 체외에서 효율적으로 연구할 수 있는 적합한 체외 배양 모델들이 개발되어야 한다. 체외 배양 모델과 LCM, RNAi, 생물정보학 등의 최신 방법론들이 종합적으로 잘 적용될 때 베일에 가려진 착상 환경 기전에 대한 이해를 높여 나갈 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW, Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 787-92.
2. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Eng J Med* 1999; 340: 1796-9.
3. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, et al. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002; 129: 2879-89.
4. Wang H, Ma WG, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, et al. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup. *J Biol Chem* 2004; 279: 10649-58.
5. Ye X, Hama K, Contos JJA, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, et al. LPA<sub>3</sub>-mediated lysophosphatidic acid signaling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005; 435: 104-8.
6. Paria BC, Huet H, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10159-62.
7. Dey SK. Implantation. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editor. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. New York: Lippincott-Raven; 1996. p.421-34.
8. Wang H, Dey SK. Road map to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 185-99.
9. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-9.
10. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can sub-



- stitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000; 141: 4365-72.
11. Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1147-61.
  12. Sherwin JR, Freeman TC, Stephens RJ, Kimber S, Smith AG, Chambers I, et al. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2185-95.
  13. Song H, Lim H. Evidence for heterodimeric association of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and gp130 in the mouse uterus for LIF signaling during blastocyst implantation. *Reproduction* 2006; 131: 341-9.
  14. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* 1998; 4: 303-8.
  15. Murakami M, Nakatani Y, Kuwata H, Kudo I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A<sub>2</sub>s. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 159-66.
  16. Dey SK, Lim H. Implantation. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. Burlington, MA: Elsevier; 2006. p.147-88.
  17. Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995; 83: 483-92.
  18. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997; 91: 197-208.
  19. Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR $\delta$ . *Genes Dev* 1999; 13: 1561-74.
  20. Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, et al. Reduced fertility and post-schaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Nature* 1997; 390: 622-5.
  21. Wakuda K, Takakura K, Nakanishi K, Kita N, Shi H, Hirose M, et al. Embryo-dependent induction of embryo receptivity in the mouse endometrium. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 315-24.
  22. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996; 16: 107-22.
  23. Reese J, Brown N, Paria BC, Morrow J, Dey SK. COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 150: 23-31.
  24. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990; 53: 870-4.
  25. Frederick JL, Ord T, Kettel LM, Stone SC, Balmaceda JP, Asch RH. Successful pregnancy outcome after cryopreservation of all fresh embryos with subsequent transfer into an unstimulated cycle. *Fertil Steril* 1995; 64: 987-90.
  26. Kolb BA, Najmabadi S, Paulson RJ. Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997; 67: 625-30.
  27. Levi AJ, Drews MR, Bergh PA, Miller BT, Scott RT. Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2001; 76: 670-4.
  28. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the dura-

- tion of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2963-8.
29. Wang H, Tranguch S, Xie H, Hanley G, Das SK, Dey SK. Variation in commercial rodent diets induces disparate molecular and physiological changes in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9960-5.
30. Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsu-moto H, et al. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276: 44137-45.
31. Chen Y, Ni H, Ma XH, Hu SJ, Luan LM, Ren G, et al. Global analysis of differential luminal epithelial gene expression at mouse implantation sites. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 147-61.
32. Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Microarray analysis of uterine epithelial gene expression during the implantation window in the mouse. *Endocrinology* 2006; 147: 4904-16.
33. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; 143: 2119-38.
34. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teriney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 19-33.
35. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097-121.
36. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, et al. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 871-9.
37. Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 253-64.
38. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JJ, Williams S, et al. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20: 2104-17.
39. Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Diaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5742-52.
40. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 195-205.
41. Yoon SJ, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Kim SN, Lee KA. A molecular basis for embryo apposition at the luminal epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 95-104.
42. Hong SH, Nah HY, Lee JY, Gye MC, Kim CH, Kim MK. Analysis of estrogen-regulated genes in mouse uterus using cDNA microarray and laser capture microdissection. *J Endocrinol* 2004; 181: 157-67.