

## Laser Capture Microdissection을 이용한 유전자 발현 연구 (III)

-생쥐 착상 부위 자궁 내강상피 조직에서 배아 병치 기간 동안 일어나는 유전자 발현에 관한 Microarray 분석<sup>1</sup>-

<sup>2</sup>차병원 여성의학연구소, <sup>3</sup>포천중문 의과대학교 생명과학 전문대학원, <sup>4</sup>디지털 지노믹스

윤세진<sup>2</sup> · 전은현<sup>3</sup> · 박창은<sup>2</sup> · 고정재<sup>2,3</sup>  
최동희<sup>2</sup> · 차광열<sup>2</sup> · 김세년<sup>4</sup> · 이경아<sup>2,3</sup>

### Analysis of the Gene Expression by Laser Capture Microdissection (III)

-Microarray Analysis of the Gene Expression at the Mouse Uterine Luminal Epithelium of the Implantation Sites during Apposition Period<sup>1</sup>-

Se-Jin Yoon<sup>2</sup>, Eun-Hyun Jeon<sup>3</sup>, Chang-Eun Park<sup>2</sup>, Jung-Jae Ko<sup>2,3</sup>,  
Dong-Hee Choi<sup>2</sup>, Kwang-Yul Cha<sup>2</sup>, Se Nyun Kim<sup>4</sup>, Kyung-Ah Lee<sup>2,3</sup>

<sup>2</sup>*Infertility Medical Center, CHA General Hospital, <sup>3</sup>Graduate School of Life Science and Biotechnology, College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, <sup>4</sup>Digital Genomics Inc., Seoul 120-749, Korea*

**Object:** The present study was accomplished to obtain a gene expression profile of the luminal epithelium during embryo apposition in comparison of implantation (IM) and interimplantation (INTER) sites.

**Material and Method:** The mouse uterine luminal epithelium from IM and INTER sites were sampled on day 4.5 (Day of vaginal plug = day 0.5) by Laser Captured Microdissection (LCM). RNA was extracted from LCM captured epithelium, amplified, labeled and hybridized to microarrays. Results from microarray hybridization were analyzed by Significance Analysis of Microarrays (SAM) method. Differential expression of some genes was confirmed by LCM followed by RT-PCR.

**Results:** Comparison of IM and INTER sites by SAM identified 73 genes most highly ranked at IM, while 13 genes at the INTER sites, within the estimated false discovery rate (FDR) of 0.163. Among 73 genes at IM, 20 were EST/unknown function, and the remain 53 were categorized to the structural, cell cycle, gene/protein expression, immune reaction, invasion, metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Of the 24 structural genes, 14 were related especially to extracellular matrix and tissue remodeling. Meanwhile, among 13 genes up-regulated at INTER, 8 genes were EST/unknown function, and the rest 5 were related to metabolism, signal transduction, and gene/protein expression. Among these 58 (53+5) genes with known functions, 13 genes (22.4%) were related with Ca<sup>2+</sup> for their function.

**Conclusions:** Results of the present study suggest that 1) active tissue remodeling is occurring at the IM sites during embryo apposition, 2) the INTER sites are relatively quiescent than IM sites, and 3) the

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼동 606-5, 차병원 여성의학연구소, 포천중문 의과대학교 생명과학 전문대학원. Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 501-8704, e-mail: leeka@nuri.net  
<sup>1</sup>본 연구는 한국학술진흥재단 (KRF-2001-003-F00126) 지원으로 수행되었음.

Ca<sup>2+</sup> may be a crucial for apposition. Search for human homologue of those genes expressed in the mouse luminal epithelium during apposition will help to understand the implantation process and/or implantation failure in humans.

**Key Words:** Mouse, Implantation, Apposition, Laser capture microdissection, Significance analysis of microarrays

착상은 모체의 자궁 내에서 배아의 apposition (병치), adhesion (부착), 그리고 invasion (침윤)과 같은 일련의 과정이 시간적으로나 공간적으로 특별하게 발현하는 인자에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. 배아가 자궁에 도달하기에 앞서 자궁의 stromal cell (기질세포)에서는 체내의 스테로이드 호르몬 조절에 의해 탈락화가 진행된다. 지금까지는 자궁에 배아가 도달한 후에 배아와 자궁내막 사이에 직접적인 연결 없이도 배아 뿐만 아니라 자궁으로부터 나온 지역적인 조절인자가 착상을 위해 배아 주위의 미소환경을 변화시킨다고 알려져 왔다.<sup>1-4</sup> 그러나, 이밖에도 아직까지 알려지지 않은 많은 인자들이 관여하고 있을 것으로 생각된다.<sup>5</sup> 그런 인자들을 확인하는 일은 착상에 대한 메커니즘과 임신 실패의 원인을 이해하는데 필수적이다. 최근에, microarray analysis<sup>5-8</sup> 또는 differential display PCR<sup>9-11</sup>을 사용한 몇몇 실험을 통해서 착상 기간 동안에 자궁에서 증가 또는 감소되는 유전자들의 목록이 보고되었다.

특정한 조직이나 세포에서 분자생물학적 메커니즘에 관한 연구 결과의 신뢰도는 조직 내에 존재하는 세포의 상대적인 양에 의하여 결정적으로 좌우된다고 생각할 때, 다양한 종류의 세포로 혼합되어 있는 조직을 사용하는 연구의 단점은 많은 종류의 세포로부터 혼합된 유전자 생산물을 갖고 연구함으로써, 전체 조직 중에서 적은 양으로 존재하는 세포, 즉 상대적으로 적은 양의 유전자에 대한 분석을 놓치게 된다는 것이다.<sup>6</sup> 이와 같은 문제점을 극복하기 위한 혁신적인 기술 중의 하나가 Laser Capture Microdissection (LCM)이다. LCM은 근래에 개발된 실험 방법으로, 실험자가 직접 현미경 상에서 조직을 관찰하면서 여러 종류의 세포로 구성되어 있는 조직의 절편으로부터 원하는 세포 혹은 조직만을 순수하게 얻을 수 있는 간편하고 빠르며 확실한 기술이다.<sup>12</sup> 유전자 발현 분석에 관한 몇몇 앞선 연구들에서는 자궁 조직을 전체적으로 사용하였기 때문에

그 결과는 특정한 세포가 아닌 자궁 전체의 유전자 발현 양상에 관한 정보만을 주었다.<sup>5,14,22</sup> 자궁은 자궁내막 (endometrium)과 자궁근층 (myometrium)으로 이루어져 있으며 그 중 자궁내막은 내강상피 (luminal epithelium), 땀뻘이 밀집되어 있는 기질 (stroma), 그리고 기저층 (germinal basalis)으로 구성되어 있다.<sup>18</sup> 배아는 자궁내막의 자궁 내강상피와 처음 물리적인 접촉을 하게 되는데, 특히 생쥐에서는 배아가 접촉을 시작하기 바로 전 단계인 병치 시기와 접촉을 시작한 후의 시기를 구분할 수 있기 때문에 착상에 미치는 배아의 영향에 관한 연구가 가능하다. 그러므로 본 연구에서는 LCM을 이용하여 병치 기간 중에 배아의 착상이 일어나는 곳 (implantation site, IM)과 그렇지 않은 곳 (interimplantation site, INTER)의 내강상피를 순수하게 분리하고, Microarrays를 사용하여, 내강상피에서 이 특정 기간 동안 발현하는 유전자를 확인하고 비교 분석하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. Animals

성숙한 ICR 암컷 생쥐를 같은 종의 수컷 생쥐와 합사하여 임신을 유도한 뒤 (Plug check 시기를 임신 0.5일로 하였다) 임신 4.5일 되는 때에 Chicago blue 염색약 (1% in saline; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 정맥주사하여, IM과 INTER 부위를 육안으로 확인하고 각각 분리하였다. 착상이 일어나는 시기에는 혈관 생성이 활발히 이루어지면서 투과성이 증가하기 때문에 Chicago blue 염색약을 주사하면 IM 부위가 가시화된다. 각각 나뉜 부위는 OCT compound에 포매하여 LCM을 위한 시료를 준비하였다.

### 2. Laser Capture Microdissection

급속 냉동시킨 조직을 5 µm 두께로 잘라 슬라이드 위에 얹었다. LCM을 위해서는 상온에서 슬라이드

드 상의 서리를 없애고 30초 동안 70% 에탄올에서 고정시킨 뒤, Mayers hematoxylin으로 염색하고 alcohol series와 xylene으로 탈수시켰다. 위의 과정을 마친 뒤 공기 중에서 말렸고, 건조제가 들어있는 플라스틱 보관함에서 저장하였다. Pixcell II system (Arcturus, Mountain View, CA)으로 LCM을 수행하였으며 그 과정을 간략히 설명하면 LCM transfer film (Cap Sure LCM0201; Arcturus)을 원하는 세포 즉 본 연구에서 필요로 하는 내강상피 위에 얹어 laser pulse를 쏘아 원하는 부분만을 transfer film으로 옮겼다. LCM을 수행한 뒤 바로 total RNA를 추출하였다.

### 3. RNA Isolation and Amplification

PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus)를 사용하여 LCM transfer film에 붙어 있는 sample로부터 total RNA를 얻었다. LCM 샘플은 추출용액 50 µl로 42°C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 70% 에탄올 50 µl을 혼합하여 Purification Column으로 옮겼다. 원심분리 후 Purification Column을 씻어내고 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 RiboAmp RNA Amplification Kit (Arcturus)로 증폭하였다. First round aRNA 증폭에서는 정제된 RNA 10 µl을 Primer A 1 µl과 혼합한 뒤 70°C에서 10분 동안 반응시켰으며, 얼음 위에서 식힌 뒤 Complete 1st Strand Synthesis Mix 9 µl을 첨가하였다. 위의 혼합물을 42°C에서 1시간, 70°C에서 10분 반응시킨 후, 1st Strand Nuclease Mix 2 µl을 첨가하였고 37°C에서 30분, 95°C에서 5분 동안 반응시킨 후 얼음에서 식혔다. Second-strand cDNA 합성을 위해서 Primer B 1 µl을 첨가한 뒤 95°C에서 2분 동안 반응시켰다. 얼음에서 식힌 뒤 Complete 2nd Strand Synthesis Mix 30 µl을 첨가하였다. 위의 혼합물을 25°C 10분, 37°C 30분, 70°C 15분 동안 반응시킨 뒤, DNA Elution Buffer를 첨가해서 DNA Purification Column을 통해 분리한 후 double-stranded cDNA를 얻었다. 이렇게 얻어진 cDNA는 in vitro transcription과 일련의 second-round aRNA 증폭을 위한 것이다. In vitro transcription을 수행하기 위해 샘플을 8 µl로 농축시켰으며 reaction mix를 혼합하여, 42°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 aRNA는 Purification column을 통해 정제하였고 second round를 수행하기 위해 10 µl로 농축하였다. Second round aRNA 증폭은 first

round와 동일하게 수행하였고, in vitro transcription 후에 aRNA의 OD를 측정하였으며, 전기영동으로 증폭시킨 생산물을 확인하였다. 이렇게 모아진 aRNA는 길이가 200~600 bp로 확인되었고 Microarray 실험을 위한 labeling 반응에 사용하였다.

### 4. Microarray Analysis

IM과 INTER 부위로부터 분리하여 증폭된 aRNA를 이용하여 cDNA microarray 분석을 수행하였다. 증폭된 RNA는 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP 존재 하에 random hexamer를 primer로 이용하여 역전사시키면서 Cy3 또는 Cy5로 표지하였다. cDNA microarray는 5,592개의 유전자가 올려져 있는 Mouse 6 K cDNA chip (Digital Genomics, Inc. Seoul, Korea)을 이용하였고, 두 번의 실험이 서로 형광의 표지가 반대가 되도록 4회 반복 실험을 수행하였다. 실험 결과는 국소가중산점도평활 (locally weighted scatterplot smoothing)을 이용하여 형광신호의 강도에 의존적으로 표준화하였다.<sup>14</sup> 두 샘플 사이에 유의하게 발현이 차이가 나는 유전자를 선별하기 위하여 Significance Analysis of Microarrays (SAM)를 이용하였다.<sup>15</sup> 분석 소프트웨어는 Microsoft Excel에서 실행되는 SAM Version 1.10을 이용하였으며, one class 반응 형식으로 분석을 수행하였다. 4회의 반복 실험에서 2회 이상 데이터가 얻어진 경우에만 SAM 입력 데이터로 이용하였으며, 결국 자료는 10개의 최근접이웃의 평균을 이용하여 대체하였다.

### 5. RT-PCR

Microarray 분석을 통해서 얻어진 유전자 발현 결과를 확인하기 위해서 LCM으로 얻은 세포에서 total RNA를 얻어 RT-PCR을 수행하였다. PicoPure RNA isolation kit (Arcturus)를 이용하여 total RNA를 뽑은 뒤, Superscript Preamplification system (Gibco)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 70°C에서 10분 동안 0.5 µg oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer와 반응시킨 뒤, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 mixture를 20 µl에 맞췄다. 이를 42°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 200 U의 역전사 효소를 첨가하여 42°C에서 50분, 70°C에서 15분 동안 역전사 반응시켰다. 이렇게 얻

**Table 1.** Sequences of oligonucleotide primers and their annealing temperature and RT-PCR product sizes

Description of the Gene	Oligonucleotide Sequences	Annealing (°C)	Size (bp)
Procollagen, type 1, $\alpha 1$	5'-GCCAGAACATCACCTATCAC-3' 5'-GAGGGAGTTTACACGAAGC-3'	63	315
Serine/cysteine proteinase inhibitor (HSP 47)	5'-GACATGGAGCCCAGATACTA-3' 5'-CATAACAGTTCTAGGGCAGG-3'	63	356
Proteoglycan, secretory granule	5'-GGGGTAACAGGATTCAAGAG-3' 5'-GATGACTATGGGTCAGGTTC-3'	63	350
Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (SPARC)	5'-TACTGTGAGACCTGAGGACC-3' 5'-CCTGTGAGATCTGACCATTTC-3'	63	480
Follistatin-like	5'-TCTAAGAAGAGGGCACAGAGC-3' 5'-ACACAGGTAAGTACTAGTTGGGC-3'	63	517
Collapsing response mediator protein 1 (CRMP-1)	5'-CACAGAGGGTCAGAGACTCA-3' 5'-CACTAGAAAGATGTGGTCCC-3'	53	290
Calpain 7	5'-GGATGGAGAACCAGAGTACA-3' 5'-CAGCTTCAGTCATTACTCCC-3'	63	383

어진 cDNA는 Table 1에 정리되어 있는 유전자 증폭을 위한 PCR template로 사용되었다. PCR은 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 25 pmol의 양쪽 primer, 2.5 U의 Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI) 2.5 U의 mixture로 최종 부피를 50  $\mu$ l로 맞추어 실행하였다. 유전자 증폭 조건은 94°C에서 1분 denaturation, 각 유전자의 annealing 온도에서 1분 (Table 1), 그리고 72°C에서 1분 extension 하는 반응을 30 cycle을 수행하였다. PCR 이후에 증폭된 산물을 1.5% agarose gel 전기영동 하였으며, Image Analyzer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 분석하였다. 각각의 mRNA 발현을 G3 PDH mRNA의 발현정도로 표준화한 후에 IM과 INTER 부위간의 fold change를 알아보았다. 실험 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였으며, 실험은 최소 3번 반복하였다.

#### 6. Statistical Analysis

RT-PCR 그룹간의 차이점은 one-way analysis of variance (ANOVA)와 log linear model을 사용하여 분석하였으며,  $p < 0.05$ 일 경우 통계학적으로 의미있다고 하였다.

## 결 과

### 1. Microarray Analysis

LCM을 통해 자궁의 IM과 INTER 부위로부터 내강상피를 순수하게 분리할 수 있었다. Figure 1은 임신 4.5일자에 얻은 냉동 조직 절편으로부터 내강상피 세포를 LCM으로 순수하게 분리하는 모습을 보여주고 있다. 이렇게 얻어진 내강상피로부터 total RNA를 얻어 cDNA microarray 분석을 통해 IM과 INTER 부위 사이의 유전자 발현의 차이를 비교하였다. Hybridization을 4번 반복하였고, 이를 통해 얻은 결과는 SAM 방법으로 분석하였다.

Figure 2의 그래프는 SAM program을 실행시켰을 때 얻어지는 결과로서 관찰된 상대적 차이 ( $d(i)$ , 세로축)와 기대되는 상대적 차이 ( $d_E(i)$ , 가로축)의 산점도를 보여주고 있다. 유의하게 발현이 변화한 유전자를 색깔로 표시해서 보여주고 있는 그림으로, 오른쪽 위에 빨강계 표시된 점은 IM 부위에서 발현이 높게 나타나는 유전자를, 왼쪽 아래 녹색으로 표시된 점은 INTER 부위에서 발현이 높게 나타나는 유전자를 나타낸다.

**Table 2.** List of genes related to the structural proteins, cell cycle, gene/protein expression, immune-related, metabolism, oxidative stress and signal transduction, significantly increased at the implantation site (IM)

Description of the Gene	Gene Bank. Accession No.	Score (d)
ECM and ECM-related genes		
Procollagen, type I, alpha 1	AI839149	2.39
Serine/cysteine proteinase inhibitor (hsp 47), member 1	AI326777	1.681
Proteoglycan, secretory granule	AI327055	1.48
Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (SPARC)	AI845741	1.167
Follistatin-like	AI426300	1.134
Procollagen, type III, alpha 1	AI842703	0.893
Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	AI842506	0.734
Procollagen, type IV, alpha 1	AI528741	0.726
Tissue remodeling		
Collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1)	AI326238	1.453
Calpain 7	AI847197	1.017
Homeo box A5 (HoxA5)	AI326778	0.961
Cathepsin K	AW212949	0.956
Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)	AI464548	0.951
Cathepsin C	AI450135	0.797
Structural proteins		
p53 apoptosis effector related to Pmp22	AI854029	1.715
Solute carrier family 20, member 1	AI385598	1.117
Tropomyosin 1, alpha	AI854333	1.023
Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	AI838959	1.008
Beta-spectrin 2, non-erythrocytic	AI840676	0.937
Gelsolin	AI850094	0.811
Solute carrier family 25, member 4	AI851730	0.783
Microtubule-associated protein 1 B	AI848068	0.767
Transmembrane 4 superfamily member 8	AI843741	0.74
Fascin homolog 1 (actin bunding protein)	AI837654	0.736
Cell cycle		
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)	AI853181	1.362
Degenerative spermatocyte homolog	AI852792	1.128
Checkpoint suppressor 1	AI448353	0.949
Cyclin D1	AI894115	0.786

Continue

**Table 2.** List of genes related to the structural proteins, cell cycle, gene/protein expression, immune-related, metabolism, oxidative stress and signal transduction, significantly increased at the implantation site (IM)

Description of the Gene	Gene Bank. Accession No.	Score (d)
<b>Gene/protein expression</b>		
Inhibitor of DNA binding 3	AI839283	1.84
Transcription factor E2a	AI324257	1.003
Acidic nuclear phosphoprotein 32	AI853170	0.855
Mitochondrial ribosomal protein L27	AI844807	0.753
<b>Immune-related</b>		
Leukemia-associated gene	AI850105	1.367
Silica-induced gene 81	AI846739	1.165
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	AI854552	0.977
Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	AI845860	0.961
Tumor rejection antigen gp96	AW411644	0.958
Myxovirus (influenza virus) resistance 2	AI528743	0.772
<b>Metabolism</b>		
Gamma-glutamyl hydrolase	AI846732	1.541
Phosphofructokinase, platelet	AI853802	0.911
Peroxiredoxin 4	AI326091	0.882
Creatine kinase, muscle	AI324268	0.821
Ornithine decarboxylase, structural	AI848698	0.735
Heterogeneous nuclear rionucleoproteins methyltransferase-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	AI846916	0.725
<b>Oxidative stress</b>		
Kelch-like ECH-associated protein 1	AI854035	1.218
Prohibitin	AW321813	0.737
<b>Signal transduction</b>		
Protein kinase C, gamma	AI852515	1.887
Stromal cell derived factor 1, chemokine	AI528734	1.114
Small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14	AI414372	0.979
N-myc downstream regulated 1	AI852317	0.937
3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	AI839589	0.827
Intersectin (SH3 domain protein 1A)	AI427528	0.802
Stromal cell derived factor 2	AI853825	0.737

**Table 3.** List of genes significantly increased at the interimplantation site (INTER)

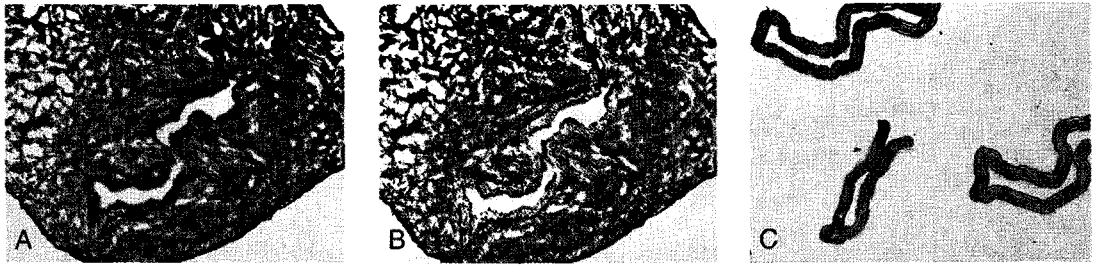
Description of the Gene	Gene Bank. Accession No.	Score (d)
Glutathione S-transferase omega 1	AI853885	-1.129
Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	AI323618	-1.076
Cysteine dioxygenase 1, cytosolic	AI854020	-1.041
Alpha actinin 4	AI327147	-1.010
ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump)	AI841075	-0.960

**Table 4.** Genes having Ca<sup>2+</sup> as a regulator for their functions among genes significantly increased at the implantation as well as interimplantation sites (FDR<16.3%)

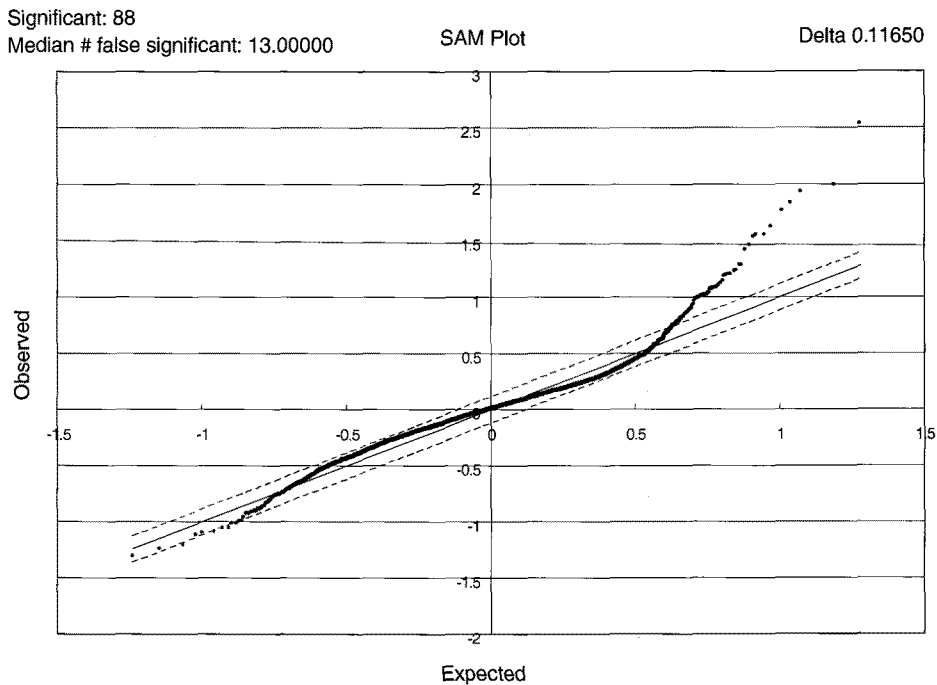
Description of the Gene	Gene Bank. Accession No.	Score (d)	Category
<b>Implantation site</b>			
Protein kinase C, gamma	AI852515	1.887	Signal transduction
Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (SPARC)	AI845741	1.167	ECM
Follistatin-like	AI426300	1.134	ECM
Stromal cell derived factor 1	AI528734	1.114	Signal transduction
Tropomyosin 1, alpha	AI854333	1.023	Structural protein
Calpain 7	AI847197	1.017	Tissue remodeling
Beta-spectrin 2, non-erythrocytic	AI840676	0.937	Actin binding protein
Phosphofructokinase, platelet	AI853802	0.911	Enzyme
3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	AI839589	0.827	Signal transduction
Creatine kinase, muscle	AI324268	0.821	Enzyme
Gelsolin	AI850094	0.811	Actin binding protein
Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	AI842506	0.734	ECM-related
<b>Interimplantation site</b>			
Alpha actinin 4	AI327147	-1.01	Signal transduction

SAM 분석 결과 estimated false discovery rate (FDR) 0.163 안에서 IM에서는 73개의 유전자가, INTER에서는 13개의 유전자가 각각 높게 발현됨을 알 수 있었다. 각 부위에서 다르게 발현한 유전자들을 그들의 생물학적 기능으로 분리한 결과, IM 부위에서의 73개 유전자 가운데 6개는 ESTs였고, 14개는 기능이 알려지지 않은 유전자였다. 기능이 알려진 남은 53개의 유전자 중 일부는 구조관련 단백질 (24, 45.3%)로 구분되었고, 그 나머지는 물질대사 (6, 11.3%), 신

호전달 (7, 13.2%), 면역 반응 (6, 11.3%), 세포주기 (4, 7.5%), 유전자/단백질 발현 (4, 7.5%) 그리고 마지막으로 산화 스트레스 (2, 3.8%)에 관련된 것으로 분류되었다. 구조관련 단백질 24개 중에서 14개는 extracellular matrix (세포외 기질) 및 그 조절, 그리고 조직의 remodeling에 관련된 유전자였다. Table 2에는 53개의 유전자를 기능과 score에 따라서 정리하였다. 한편, INTER 부위에서 up-regulation 되는 13개의 유전자 가운데, 2개는 ESTs였고, 6개는 기능이 알려지



**Figure 1.** Microphotographs depicting the LCM procedure. A. Uterine section before LCM, B. Uterine tissue after LCM of luminal epithelium, and C. Homogeneous luminal epithelium captured on the transfer film.



**Figure 2.** Identification of the genes with significant changes in expression. Graph show the scatter plot of the observed relative difference  $d(i)$  versus the expected relative difference  $d_E(i)$ . The solid line indicates the line for  $d(i)=d_E(i)$ , where the observed relative difference is identical to the expected relative difference. The dotted lines are drawn at a distance  $D=0.117$  from the solid line. The red spots (right upper area) indicate the genes with higher expression at IM site and the green spots (left lower area) indicate the genes with higher expression at INTER site.

지 않은 유전자였다. 나머지 5개는 물질대사 (3)와 유전자/단백질 발현 (1) 및 신호전달에 관련된 유전자였다. Table 3에는 이 5개의 유전자를 score에 따라서 정리하였다.

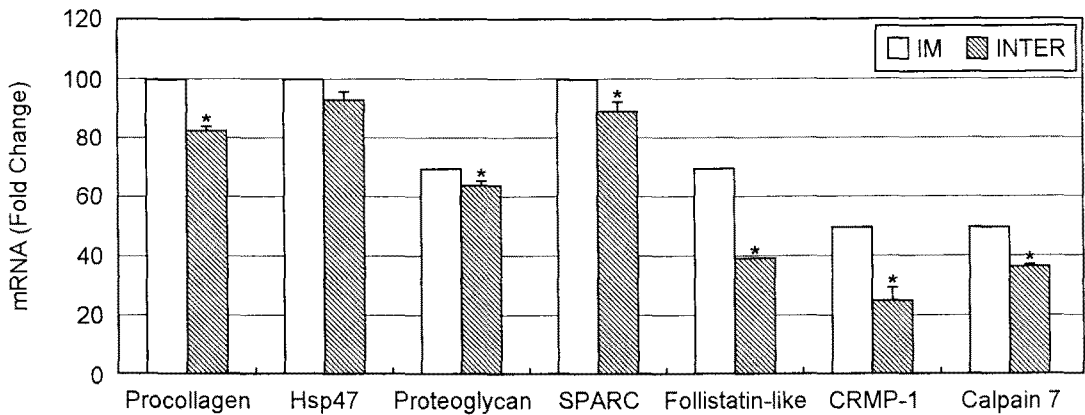
IM과 INTER 부위 양쪽에서 발현된 유전자 중 기능이 알려진 58개의 유전자 가운데, 13개 (22.4%) 유전자는 그 기능과 조절이  $Ca^{2+}$  조절과 연관되어 있었는데, 이는 착상 과정이 정상적으로 일어나기

위해서는, 즉 관련된 유전자들의 정상적인 기능 수행을 위해서는 병치 시기에  $Ca^{2+}$ 이 반드시 필요로 하는 중요한 인자임을 알 수 있다. 조절자로  $Ca^{2+}$ 을 필요로 하는 유전자들의 목록은 Table 4에 요약되어 있다.

## 2. RT-PCR

IM 부위에서 높게 발현되는 유전자 중에서 ECM과 tissue remodeling에 관련된 유전자 7개를 선택하





**Figure 3.** Results of LCM-RT-PCR for 7 genes related to ECM and tissue remodeling. Total RNA was isolated from LCM-captured luminal epithelium of implantation sites (IM) and interimplantation sites (INTER) of day 4.5 pregnant mice. Data were mean±SEM from at least three replicate experiments. Relative amount of each mRNA was normalized with G3PDH mRNA levels first and compared between IM and INTER sites, and expressed as fold change (\*,  $p < 0.05$ ).

여 (SAM score 1.0 이상) 그 발현 양상의 차이를 LCM-RT-PCR 방법으로 확인하였다. 이들 유전자에 대한 primers, annealing 온도, 그리고 생성물의 예상 크기는 Table 1에 정리되어 있다. 이 중 HSP47은 통계적인 의의는 없었으나 DNA Chip 결과와 같은 양상을 보였으며, 나머지 유전자 모두 IM에서 통계적으로 유의하게 높은 발현을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 3).

## 고 찰

본 연구에서는 LCM과 microarray analysis를 사용하여 생쥐 배아가 자궁내막에 병치하는 기간 동안에 배아가 착상하는 부위와 착상하지 않는 부위의 내강상피에서 일어나는 유전자 발현 양상을 알아보았다. 본 연구의 결과는 배아가 자궁내막에 부착하기 이전에, 그러나 배아의 영향 하에서 착상 부위에서 일어나는 변화에 대한 분자생물학적 메커니즘에 대한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

병치 과정을 포함하여, 자궁내막으로 배아가 착상하는 과정에 대한 분자생물학적 메커니즘은 사람을 포함한 다양한 동물에서 충분히 연구되어 있지 않다. 사람의 경우, 윤리적이고 기술적인 어려움으로 인해 배아의 착상에 관련된 메커니즘과 인자에 관한 연구를 in vivo로 수행할 수 없는 것이 가장 큰 문제점이다. 생쥐의 경우, Chicago blue 염색약으로

착상 부위를 표시한 뒤 배아가 착상하지 않는 부위와 착상하는 부위를 분리할 수 있기 때문에 시간적으로 또는 공간적으로 변화하는 인자들에 관하여 연구할 수 있어 실험 동물로서 유용하다. 본 연구에서는 LCM이라는 혁신적인 세포 분리 기술을 적용하여 순수한 내강상피 조직을 얻을 수 있었고, Microarray analysis를 사용함으로써 특정 부위 즉, 자궁 내강상피 조직에서 착상하는 배아와 기질 조직의 영향 하에서ダイナ믹하게 변화하는 유전자 발현 양상을 알아볼 수 있었다.

Microarray hybridization 결과는 microarray 데이터를 분석하기 위해 개발된 Significance Analysis of Microarrays (SAM)이라는 통계학적인 방법을 사용하여 분석하였다.<sup>15</sup> SAM은 통계학적으로 의미있는 발현의 변화를 갖는 유전자를 확인하는 방법이다. 생물학적인 데이터의 분석에 폭넓게 사용되어 왔던 이전의 *t*-test는 microarray 데이터의 분석에는 적절하지 않은데, 그 이유는 *t*-test로는 매우 낮은 *p* 값에서조차 많은 수의 유전자가 우연히 유의하다고 판정되기 때문이다. 즉, *p* 값이 0.01이라고 해도 만 개의 유전자 중 100개의 유전자가 유의하게 결정되기 때문이다. 이런 분석적인 문제점을 피하기 위해 SAM은 유전자 발현의 차이 유의성을 결정하기 위하여 데이터의 순열 (permutation)을 이용하여 false discovery rate, 즉 유의하다고 판정된 유전자가 오류일 가능성을 계산한다.<sup>15</sup>

본 연구 결과 착상 부위에서 높게 발현된 유전자의 대부분이 collagen-related matricellular 구성요소와 같은 구조 단백질, remodeling 중인 다양한 조직에서 높게 발현된다고 알려져 있는 인자들, 그리고 actin 과 관련된 세포골격의 구성요소 등이었다. 자궁내막의 receptivity (수용성)는 내강상피 세포의 세포골격과 세포질 막의 형태학적인 변화와 긴밀하게 관련되어 있다.<sup>4,16</sup> 본 연구에서는 ECM의 네 개의 주된 macromolecules인 collagens, proteoglycans, glycoproteins 그리고 elastins<sup>17</sup> 중에서 elastins을 제외한 다른 그룹의 대부분의 인자들을 찾을 수 있었으며, procollagen types I, III, IV 그리고 이들의 조절인자인 heat shock protein 47 (HSP47)이 관찰되었다. HSP47은 serpin family로부터 유래된 procollagen/collagen-specific chaperone protein으로 잘 알려져 있다.<sup>18,19</sup> 초기의 procollagen polypeptide chains,<sup>20</sup> unhydroxylated non-triple helical chains, 그리고 hydroxylate helical trimers<sup>21</sup> 과의 작용을 포함하는 HSP47에 관련한 기능이 많이 보고되어 있다. 병치 기간 동안 procollagen, proteoglycan, 그리고 HSP47의 양이 많은 것은 착상 부위 내강상피에서 주목할만한 변화가 일어나고 있다는 것을 의미한다.

착상 부위에서 두 개의 glycoproteins 즉 SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine; osteonectin 또는 BM-40라고 불리기도 함)와 follistatin-like protein이 많은 양 발현하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. SPARC는 다양한 종류의 세포에 의해 분비되어지는 calcium binding matricellular glycoprotein 그룹이다.<sup>22</sup> 이들은 세포 주위를 따라 counter-adhesive effect를 나타내며 이로 인해 세포가 등글어진다든지 하는 모양의 변화가 오게 되고 따라서 세포와 기질간 상호작용이 무너지게 된다. 성장한 동물에서 SPARC의 발현은 remodeling 하는 조직으로 제한된다.<sup>4</sup> SPARC는 cations ( $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), growth factors (PDGF, VEGF), ECM 단백질 (collagens, vitronectin), 그리고 그 외 다양한 분자들과 작용한다는 것이 알려져 있다.<sup>23</sup> SPARC의 다른 이름인, BM-40이 matrix metalloproteinases로 인해 나뉘어지게 되면 collagens에 대한 친화력이 증가됨이 보고되었다. Fibril-forming collagens I, III, V 그리고 basement membrane collagen IV에 BM-40가 결합하며 이때 적절한  $Ca^{2+}$  농도가 필

요하다는 것이 보고되어 있어서 이 단백질의  $Ca^{2+}$  결합 분자가 관련되어 있음을 말해준다.<sup>24</sup> SPARC는 세 개의 domain을 갖고 또한 여러 기능을 갖는 단백질이다. 이중 두 번째 domain이 cyteine이 풍부한 follistatin-like (FS) domain이다. 사람의 follistatin과 가장 유사성이 있음직한 단백질인 생쥐 follistatin-like 단백질은 두 개의 FS domain을 포함하고, activin과 BMP-2, 그리고 TGF- $\beta$  family members에 대해 결합하는 단백질로써 작용한다.<sup>25</sup> 병치 기간 중에 SPARC와 follistatin-like 단백질이 높게 발현하는 것은 배아가 착상하는 부위의 자궁내막에서 active tissue remodeling이 일어나는 이 시기에  $Ca^{2+}$ 과 같은 양이 온 또는 성장인자에 의해 세포와 기질간의 상호작용이 조절되리라는 것을 시사한다.

$Ca^{2+}$ 은 여러 세포에서의 세포부착 (cellular adhesion)<sup>26</sup> 특히 착상 과정 중의 세포부착을 조절하기 위한 세포의 신호전달 과정에 필요할 것으로 알려져 있다.<sup>5,7,28</sup> Table 4에서 요약된 바와 같이, 본 연구 결과 얻어진 유전자 중 기능이 알려진 58개 중에서 13개의 유전자가 그들의 기능 조절을 위해  $Ca^{2+}$ 을 필요로 하는 것을 알 수 있었다. 비록 본 연구에서 세포 내로의  $Ca^{2+}$  유입을 측정하지는 않았지만, 배아가 착상 부위에 가까워지는 동안 착상 부위의 상피세포에서 일어나는 변화에  $Ca^{2+}$ 이 매우 중요한 역할을 하리라는 것을 제시할 수 있었다.  $Ca^{2+}$  관련에 대한 실질적인 증거는 체외배양 실험을 통해서 보고된 바 있다.<sup>28,29</sup> Tinel 등은 인간 trophoblast-like JAR 세포와 인간 자궁 상피세포주인 RL95-2 세포의 결합이 일어날 때  $Ca^{2+}$  signaling이 일어난다는 것과 이것이 지속적인 결합에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 증명하고  $Ca^{2+}$  신호의 공간적, 시간적 특이 변화가 배아와 자궁내막 상호작용에 중요한 요소임을 시사하였다.<sup>28</sup> 이들 연구자들은 자궁의 상피에서 일어나는 배아의 착상은 배아의 분화 상태 뿐만 아니라 시간적으로 그리고 공간적으로 적절하게 조절되어지는 여러 가지 인자들과 매우 밀접한 관계를 갖고 있음을 증명하였다.<sup>29</sup>  $Ca^{2+}$ 의 변화에 따라 본 연구에서 찾아낸 여러 유전자들이 어떻게 변화하는지에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

최근 Reese 등은 생쥐의 자궁 조직에서 임신으로 인한 활성이 나타나는 동안에 microarray와 전통적인

통계 분석 방법을 사용하여 착상되지 않은 부분에 비해 배아가 착상된 자궁 조직에서 27개의 유전자가 up-regulation 된다는 것을 보고하였다.<sup>5</sup> 본 연구와 Reese 등의 연구의 차이점은 첫째, 본 연구에서는 Reese 등의 연구에서 발견하지 못했던 일부 특정한 유전자를 관찰했다는 것과 둘째, Reese 등의 그 유전자들이 광범위한 기능을 갖는 경우가 많았다면, 본 연구 결과는 주로 조직의 구조 변화에 관여하는 유전자를 찾았다는 것이다. 이렇게 연구 결과에 차이가 있는 이유 중의 하나는, 전자에서 자궁 조직 전체를 즉, 착상 부위에서는 배아까지 포함하여 사용한 반면, 본 연구에서는 착상 부위와 착상하지 않는 부위에 대해 자궁 내강상피 조직만을 순수 분리하여 사용했다는 점을 들 수 있을 것이다.

Genome wide 연구가 진행되기 이전에는 착상에 대한 기능이 이미 알려진 유전자의 기능을 한가지, 한가지씩 관찰하는 연구가 이루어졌었는데, 이렇게 연구된 것으로는 mucin,  $\alpha$ v family의 integrins, trophinin, CD44, cad-11, 그리고 heparan sulfate 등이 있다.<sup>30</sup> 자궁내막 세포 표면 mucin MUC1은 착상을 물리적으로 저해한다고 알려져 있다.<sup>31</sup> 또한 TGF- $\beta$ 와 LIF 같은 몇몇 growth factors 또는 cytokines 등이 착상을 위한 준비를 위해 자궁내막에서 steroids의 활동의 local mediators로써 역할을 한다는 것이 제시되었다.<sup>32,33</sup> 그러나, 본 연구에서는 위와 같은 인자들은 발견하지 못하였는데, 그 이유로는 일부 특정한 RNAs가 microarray hybridization 이전에 증폭되지 않았거나 혹은 특정한 시간 (임신 4.5일)과 특정한 세포 유형 (내강상피)에서의 이들 유전자에 대해 mRNAs가 매우 낮게 발현을 하거나 혹은 전혀 발현하지 않는 경우로 생각해 볼 수 있다. 또 다른 한 가지 가능성은 단백질과 mRNA의 발현에 차이가 있을 경우를 생각해 볼 수 있겠다. 마지막으로 cad-11과 trophinin 등은 본 연구에서 사용한 6 K cDNA chip에는 없었기 때문에 확인이 불가능한 경우로 생각할 수 있겠다.

이상과 같은 결과로, 본 연구에서는 LCM과 microarray 방법을 이용하여 배아가 착상하지 않는 부위와 비교하여 착상하는 부위의 자궁 내강상피 조직에서 높게 발현하는 유전자의 목록을 얻었고, 착상하는 부위에서는 이미 배아가 부착하기 이전부터

tissue remodeling이 왕성하게 진행되고 있다는 것을 알 수 있었으며, 이 과정이  $Ca^{2+}$ 의 영향 하에서 조절될 것이라는 것을 제시할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 10159-62.
2. Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Cell Dev Biol* 2000; 11: 67-76.
3. Shiotani M, Noda Y, Mori T. Embryo-dependent induction of uterine receptivity assessed by an in vitro model of implantation in mice. *Biol Reprod* 1993; 49: 794-801.
4. Simon C, Martin JC, Galan A, Valbuena D, Pellicer A. Embryonic regulation in implantation. *Seminars Reprod Endocrinol* 1999; 17: 267-74.
5. Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, et al. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276: 44137-45.
6. 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 Human Reprod* 2002; 8: 871-9.
7. 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. *Endocrinol* 2002; 143: 2119-38.
8. Yoshioka K, Matsuda F, Takakura K, Noda Y, Imakawa K, Sakai S. Determination of genes involved in the process of implantation: application of Gene Chip to scan 6500 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 531-8.
9. Nie GY, Hampton AL, Salamonsen LA, Clements

- JA, Findlay JK. Identification of monoclonal non-specific suppressor factor beta (mNSFbeta) as one of the genes differentially expressed at implantation sites compared to interimplantation sites in the mouse uterus. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 351-63.
10. Popovici RM, Kao L-C, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinol* 2000; 141: 3510-3.
  11. Salamonsen LA, Nie G, Findlay JK. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 215-25.
  12. Bonner RF, Emmert BM, Cole K, Pohida T, Chuaiqui R, Goldstein S, et al. Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science* 1997; 278: 1481-3.
  13. Okulicz WC, Ace CI. Progesterone-regulated gene expression in the primate endometrium. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 241-55.
  14. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl Acid Res* 2002; 30: e15.
  15. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 2001; 98: 5116-21.
  16. Murphy CR. The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 567-80.
  17. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5: 3814-23.
  18. Dafforn TR, Della M, Miller AD. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 49310-9.
  19. Hendershot LM, Bulleid NJ. Protein-specific chaperones: the role of hsp47 begins to gel. *Curr Biol* 2000; 10: R912-915.
  20. Sauk JJ, Smith T, Norris K, Ferreira L. Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1 (I) chains of type I procollagen. *J Biol Chem* 1994; 269: 3941-6.
  21. Satoh M, Hirayoshi K, Yokota SI, Hosokawa N, Nagata K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* 1996; 133: 469-83.
  22. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1495-506.
  23. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 2001; 19: 816-27.
  24. Sasakie T, Gohring W, Mann K, Maurer P, Hohenester E, Knauper V, et al. limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* 1997; 272: 9237-43.
  25. Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y, Sugino H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J Biol Chem* 2000; 275: 40788-96.
  26. Evanas J, Malmendal A, Forsen S. Calcium. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2: 293-302.
  27. Das SK, Tan J, Raja S, Halder J, Paria BC, Dey SK. Estrogen targets genes involved in protein processing, calcium homeostasis, and Wnt signaling in the mouse uterus independent of estrogen receptor-alpha and -beta. *J Biol Chem* 2000; 275: 28834-42.
  28. Tinel H, Denker HW, Thie M. Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signaling events during embryo implantation. *Mol Human Reprod* 2000; 6: 1119-30.
  29. Hohn HP, Linke M, Denker HW. Adhesion of trophoblast to uterine epithelium as related to the state of trophoblast differentiation: in vitro studies using cell lines. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 135-45.
  30. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod* 1997; 2: 84-93.

31. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJP. MUC1, glycan and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 153-6.
  32. Sharkey A. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 1998; 3: 52-61.
  33. Stewart CL, Kasper P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-9.
-