생식주기에 따른 자성 생쥐의 생식기관의 Matrix Metalloproteinase의 단백질 발현

김문영 ·이기원 ·김해권 ·김문규[1] ·조동제[2]

서울여자대학교 자연대 생물학과, 한양대학교 자연대 생물학과[1],
연세대학교 의과대학 산부인과학교실[2]

Protein Expression of Matrix Metalloproteinases of Mouse Reproductive Organs During Estrous Cycle

Moonyoung Kim, Kiwon Lee, Haekwon Kim, Moon Kyoo Kim[1] and Dong Jae Cho[2]

Laboratory of Developmental Biology, Seoul Women's University,
Department of Biology, Hanyang University[1],
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,
Younsei University,[2]

8 Figures

Send proofs to : 김 해 권
서울시 노원구 공릉동
서울여자대학교 생물학과 발생학연구실
우편번호 139-774

Abstract

Protein expression patterns of matrix metalloproteinases(MMPs) were examined in mouse reproductive organs during estrous cycle. Estrous cycle was classified into diestrus, proestrus, estrus or metestus and MMP expression was analyzed by zymography using gelatin as a substrate. Uterine fluid(UF) obtained both at diestrus and proestrus exhibited 4 major MMPs including 106kDa, 64kDa, 62kDa and 59kDa gelatinases. However, in UF at estrus, the gelatinolytic activity of 64kDa MMP disappeared and that of 106kDa and 62kDa MMPs dramatically decreased. At metestrus, 64kDa MMP activity reappeared and 106kDa and 62kDa MMP exhibited increased activities such that the band intensity of 106kDa was comparable to that in UF at diestrus. Gelatinolytic activity of 59kDa MMP was not changed throughout the cycle. Both ovarian and oviductal tissue homogenate revealed 4 MMPs which corresponded to the 4 MMPs of UF. However, unlike UF MMPs, gelatinolytic activity of these MMPs did not show distinct changes throughout the cycle. Either an inhibitor of MMP, 1,10-phenanthroline, or a metal chelator, EDTA, abolished the appearance of the above MMP activities in gelatinated gel whereas a serine proteinase inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride failed to inhibit the appearance of MMP activities, proving that gelatinolytic activity of the above reproductive tissues were due to the enzymatic activity of MMP. When gelatinolytic activity of mouse serum was examined, it revealed 5 MMPs(131kDa, 106kDa, 89kDa, 64kDa and 62kDa bands) and one gelatinase(84kDa) band.

From these results, it is concluded that the protein expression of MMPs of mouse reproductive organs, particularly uterus, is temporally regulated during estrous cycle and uterine 106kDa, 64kDa and 62kDa MMPs are suggested to play an important role in cyclic tissue remodeling of mouse uterus.

본 연구는 1997년도 보건의료기술 연구개발사업의 지원(HMP-97-M-1-0006)**과 1996년도 교육부 기초과학육성연구비**(BSRI-96-4437)**의 보조로 이루어졌음**.

서 론

성숙한 포유류 암컷의 난소 내 난포는 난자(oocyte)와 난포세포(granulosa cell) 및 난포액으로 이루어져 있으며 각각의 난포는 기저막(basement membrane)을 경계로 하여 thecal cell 등이 포함된 결합조직으로 둘러싸여 있다. 그러나 난포와 결합조직간의 3차원적 구조는 호르몬에 의해 조절되는 생식주기에 따라 변화를 일으킨다. 즉 FSH 및 LH 호르몬의 자극을 받은 난포 내 난자의 배란 시에 기저막(basement membrane)을 포함한 결합조직의 일부가 용해되어 그 틈으로 난자와 일부 난포세포가 배란되고 또한 배란 후의 난포는 난포액으로 채워져 있던 공간이 사라지고 대신에 난포세포들이 치밀한 형태로 재배열한 구조인 황체가 되었다가 결국에는 난포세포의 섬유화에 따른 백체 구조로 탈바꿈하게 된다(Greenwald & Roy, 1994). 한편 수란관과 자궁은 내부공간을 구성하는 한 층의 내막상피세포가 기저막을 경계로 하여 다층의 결합조직인 stroma 층과 연접해 있는데 자궁의 내막 및 결합조직은 생식주기와 임신에 따라 스테로이드 호르몬에 의해 탈락과 재생, 분화를 반복하는 등 현저한 구조변화를 일으키며 이는 사람의 경우 매우 잘 알려져 있다(Tabibzadeh, 1996). 또한 수란관의 내막상피세포도 생식주기 및 임신기간에 따라 세포의 종류와 형태에서 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다(Murray, 1996: Shirley & Reeder, 1996).

생체 내 대부분의 결합조직은 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 혈관, 림프관, fibroblast, macrophage 등으로 구성되어 있으며 이 중 ECM은 결합조직의 종류에 따라 다양한 형태의 collagen, elastin과 같은 섬유성 단백질과 fibronectin, laminin과 같은 당단백질 그리고 proteoglycan 등으로 이루어져 있다. ECM은 결합조직의 주요 구성물로써 기관과 세포의 3차원적 구조를 결정할 뿐만 아니라 생체내의 각종 growth factor들의 신호전달에도 관여함으로써 세포의 증식, 분화, 자연세포사(apoptosis) 등 여러 대사과정에서 중요한 역할을 한다(Adams & Watt, 1993; Hay, 1993).

한편 ECM은 주로 matrix metalloproteinase(MMP), plasmin 및 polymorphonuclear leukocyte serine proteinase 등에 의해 분해되며 때로는 phagocytic reaction에 의해서도 분해된다(Birkedal-Hansen *et al*., 1993). 이 중 MMP에는 현재까지 13종의 분비성 MMP와 4종의 membrane-type MMP(MT-MMP)가 있는 것으로 알려져 있는데 이들은 기본적으로 pre, pro, catalytic, hinge, haemopexin 등의 domain으로 이루어지며 종류에

따라 furin, fibronectin-like, collagen-like, transmembrane domain 등이 결합되어 있는, 서로간의 구조가 매우 유사한 family이다. 분비성 MMP는 기질 특이성에 따라 matrilysin, collagenase, metalloelastase, stromelysin 그리고 gelatinase 등으로 구분되나 대부분이 하나 이상의 다양한 물질을 기질로 삼는다. MMP는 세포내에서 불활성의 proenzyme이나 zymogen 형태로 합성되지만 세포 밖으로 분비된 후 스스로 혹은 조직내의 trypsin이나 plasmin과 같은 효소에 의해서 active form이 된다. 또한 중성 pH에서 아연과 칼슘이온에 의해 활성을 나타내고 체내에서는 여러 종류의 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase) 등에 의해 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다. 또한 체외에서는 organomercurial 등에 의해서도 active form으로 전환되며 EDTA 등의 2가 이온 chelator에 의해 활성이 억제된다(Stricklin *et al*., 1983; Emonard & Grimaud, 1990).

MMP는 사람을 비롯한 여러 포유동물의 다양한 조직세포에서 발견이 되며 근래에는 자궁, 난소, 유선 등 생식과 관련한 조직세포를 대상으로 하여 이들 조직세포의 발생, 분화, 자연사(apoptosis) 등과 관련된 생리학적 기능 연구에 많은 관심이 기울여지고 있다(Hulboy *et al*., 1997). 그러나 포유동물의 생식과 관련한 MMP 연구의 대부분은 각각의 조직세포에서의 MMP 유전자 발현 양상을 조사한 것들로써 이들 유전자들이 궁극적으로 단백질 효소의 형태로 발현이 되는 지의 여부는 거의 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 포유동물 생식기관의 생식주기에 따른 remodeling과 관련한 MMP의 생리적 기능을 알아보기 위하여 gelatin을 기질로 하는 zymography방법과 생쥐의 자궁내액과 난소 및 수란관 조직추출액을 재료로 하여 생쥐의 생식주기에 따른 생식기관에서의 MMP 단백질의 발현 양상을 조사하였다.

재 료 및 방 법

생쥐의 생식주기

본 실험에 사용한 실험동물은 서울대학교 실험동물 사육실에서 사육된 ICR 계통의 암컷 생쥐로 생후 8주 이상 된 생식 능력이 있는 것들을 사용하였다. 생쥐의 생식주기는 vaginal smear방법을 이용해 Rugh(1990)의 방법에 따라 diestrus, proestrus, estrus, metestrus 4시기로 구분하였다(Fig. 1).

생쥐의 자궁내액과 난소 및 수란관의 조직추출액의 준비

생후 8주 이상 된 생쥐 암컷의 발정주기를 vaginal smear로 확인한 후 경추파열로 도살하고 자궁, 난소 및 수란관을 각각 꺼내어 Ca^{2+}-free phosphate buffered saline(PBS, Gibco)으로 깨끗이 씻었다. 그런 후 자궁내액은 다음과 같이 준비하였다. 먼저 멸균된 여과지로 자궁조직의 혈액을 제거하고 생쥐 한 마리 당 25㎕의 PBS를 첨가하여 플라스틱 배양접시(# 3002, Falcon)에 drop을 만든 후 forcep으로 자궁을 짜서 자궁내액과 내벽상피세포가 흘러나오게 했다. 이때 흘러나온 내용물들을 10,000g에서 30분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 이를 자궁내액으로 사용하였다. 난소 및 수란관의 조직추출액은 조직 한 개당 12.5㎕의 PBS를 첨가해 homogenization을 한 후 10,000g에서 30분 원심분리하고 이로부터 상등액을 취하여 사용하였다.

MMP 효소의 Zymography

Matrix metalloproteinase의 발현 양상은 gelatin을 기질로 하는 zymography(Herron *et al.*, 1986) 방법으로 조사하였다. 먼저 자궁내액 혹은 조직추출액을 전기영동용 sample buffer(10% SDS, 4% sucrose, 0.25M Tris-HCl, (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue)와 1:1로 섞은 후 10㎕의 sample을 Laemmli의 방법에 따라 9%의 polyacrylamide 농도로 전기영동을 시행하였다. 이때 resolving gel에는 0.1%의 gelatin을 첨가해 사용

하였다. 단백질의 전개는 10cm X 8cm의 소형 전기영동기구(Hoefer mini gel, USA)로 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 2.5% Triton X-100가 들어있는detergent solution으로 30분간 두 차례 세척하였다. 그런 후, 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3으로 구성된 substrate buffer를 처리하고 37 ℃에서 24시간동안 활성화시켰다. 활성화가 끝난 gel은 염색액(0.5% Coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, 30% isopropyl alcohol)으로 30분 동안 염색한 후 상온에서 증류수로 5시간 이상 탈색시켰다. 이때 gel에 나타나는 투명한 부분을 MMP 효소의 활성이 나타난 부분으로 간주하였다. 대조군으로는 collagenase를 사용하였다.

MMP 효소의 inhibitor의 처리

MMP의 inhibitor로는 1,10-phenanthroline(Brannstrom *et al*., 1988)과 2가 이온 chelator인 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 사용하였고(Bischof *et al*., 1991) 이들은 각각 dimethyl sulfoxide(DMSO) 혹은 증류수에 녹여 50mM stock solution을 만들어 4 ℃에 보관하였다. Substrate buffer에 첨가할 때에는 최종 농도가 5mM이 되도록 하였다.

Serine proteinase inhibitor인 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)는 DMSO에 녹여 500mM stock solution을 만들어 4℃에 보관하였고, 사용시에는 최종농도가 5mM이 되도록 substrate buffer에 첨가하였다.

단백질 정량

시료 내 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 bicinchoninic acid(BCA)를 이용한 protein assay reagent(Pierce, USA)로 측정하였다(Smith *et al.*, 1985).

실험기구 및 시약의 준비

본 실험에 사용된 시약들은 특별히 언급한 경우 이외에는 Sigma(USA)**에서 구입한 것을 사용하였다. 실험에 사용된 기구들은** 150℃**에서** 15Ibs**로** 15**분간 고압 멸균하여 사용하였다.**

결 과

1. 생식주기에 따른 생쥐 자궁내액의 gelatinase의 발현 양상

생식주기에 따른 생쥐 자궁조직 MMP의 발현양상을 알아보기 위해 각 주기에 따른 자궁내액 시료의 MMP 효소의 활성 여부를 gelatin을 기질로 하는 zymography 방법으로 조사하였다. 대조군으로는 0.05μg의 collagenase를 사용하였으며 전기영동을 위한 각 시료의 단백질 양은 주기에 관계없이 28μg으로 동일하게 했다.

Zymography 결과 diestrus 시기 및 proestrus 시기의 자궁내액 시료에서는 106kDa, 64kDa, 62kDa, 59kDa 등의 분자량을 갖는 4개의 주요 gelatinase band가 나타났고 이 중 62kDa gelatinase가 다른 gelatinase에 비해 상대적으로 가장 높은 gelatinase 활성을 나타내었다. 그러나 estrus 시기의 자궁내액에서는 106kDa gelatinase와 62kDa gelatinase의 활성이 현저히 감소하였고 64kDa gelatinase의 활성은 거의 나타나지 않았다. 59kDa gelatinase의 활성은 변화가 없었다. metestrus 시기의 자궁내액에서는 106kDa gelatinase의 활성이 diestrus 시기와 유사하게 나타났고 64kDa gelatinase와 62kDa gelatinase의 활성도 diestrus 시기보다는 약하지만 상당히 있는 것으로 나타났다. 59kDa gelatinase의 활성은 생식주기에 상관없이 항상 일정하게 나타났다(Fig. 2).

2. 생식주기에 따른 생쥐 난소와 수란관 조직추출액의 gelatinase의 발현 양상

각 주기별로 난소 조직추출액으로부터 시료를 채취하여 각 단백질의 양을 13.5μg으로 동일하게 한 후 zymography를 시행하였다. 그 결과 난소 조직추출액에서도 자궁내액과 유사하게 106kDa, 64kDa, 62kDa 및 59kDa 등 4종류의 gelatinase 활성을 갖는 단백질들이 나타났으며 이 중 62kDa 단백질이 가장 높은 gelatinase 활성을 나타내었다. 그러나 생식주기에 따른 각각의 gelatinase 단백질들의 활성변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

또한 각 주기에 따른 난소 조직추출액 시료의 총 단백질 양을 7μg으로 동일하게 한 후 zymography를 시행한 결과 자궁내액이나 난소의 경우와 유사하게 106kDa, 64kDa, 62kDa 및 59kDa의 4종류의 gelatinase 활성을 갖는 단백질들이 관찰되었다. 이들 중 62kDa gelatinase 단백질이 비교적 높은 활성을 나타내었고 59kDa는 매우

약한 활성을 나타내었다. 이들 gelatinase들의 활성은 생식주기에 상관없이 거의 변화가 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4).

3. 생쥐 생식기관의 gelatinase와 혈청 gelatinase의 비교

생쥐의 생식기관에서 얻은 시료 단백질내의 MMP와 혈청내의 MMP와의 유사성을 알아보기 위하여 생쥐의 혈청을 채취하여 zymography로 분석하였다(Fig. 5). 그 결과 혈청 내에는 생식기관의 조직에서 발견된 gelatinase들과 분자량이 유사한 106kDa, 64kDa, 62kDa 등 3개의 gelatinase 단백질들이 발견되었으며 또한 이들의 상대적인 활성도 생식기관과 유사하게 62kDa 단백질이 가장 높은 gelatinase 활성을 나타내었다. 이외에도 혈청에서는 131kDa, 89kDa, 84kDa의 3개의 또다른 단백질들이 gelatinase 활성을 나타내었으며, 이들 중에서는 84kDa gelatinase 단백질이 가장 높은 활성을 나타내었다.

4. 1,10-phenanthroline, EDTA, PMSF의 처리가 gelatinase의 활성에 미치는 영향

생쥐의 각 조직에서 gelatinase 활성을 나타낸 단백질들이 MMP인지의 여부를 알아보기 위하여 MMP의 specific inhibitor로 잘 알려진 1,10-phenanthroline을 substrate buffer에 처리한 후 zymography를 시행한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 자궁내액, 난소 조직추출액, 수란관 조직추출액 등 생식기관 조직의 모든 gelatinase들의 활성이 억제되었다. 그러나 혈청의 경우 대부분의 gelatinase 들의 활성이 phenanthroline에 의해서 억제되었으나 84kDa gelatinase 단백질은 여전히 강한 활성을 나타내었다. 또한 metal chelator인 EDTA를 substrate buffer에 처리한 경우에도 1,10-phenanthroline을 처리한 경우와 마찬가지로 혈청의 84kDa 단백질을 제외한 모든 gelatinase들의 활성이 나타나지 않았다(Fig. 7). 그러나 serine proteinase의 inhibitor인 PMSF를 처리한 결과 모든 gelatinase들의 활성은 거의 영향을 받지 않고 여전히 관찰되었다(Fig. 8).

고 찰

본 연구의 결과 생쥐의 자궁내액, 난소 조직 및 수란관 조직에는 106kDa, 64kDa, 62kDa, 59kDa 등의 분자량을 갖는 4종류의 MMP가 공통적으로 발견되었다. 이들 중 62kDa의 MMP가 다른 MMP에 비해 상대적으로 높은 활성을 나타내었으며, 특히 자궁내액의 경우 106kDa, 64kDa 및 62kDa MMP는 diestrus시기에 강한 활성을 나타내었으나 estrus 및 metestrus 시기에는 그 활성이 현저히 감소하였다. 이런 결과로 미루어 생쥐 자궁조직의 MMP는 생식주기에 따른 조직 세포의 분해와 직접적인 관련이 있는 것으로 여겨지며 특히 106kDa와 64kDa, 그리고 62kDa MMP가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

일반적으로 gelatinase 활성을 나타내는 효소는 종류가 매우 많으며 대부분의 단백질 가수분해 효소들은 gelatinase 활성을 나타낸다. 그러나 본 연구의 gelatin zymography 실험 결과 나타난 gelatinase들의 활성은 혈청의 84kDa gelatinase를 제외하고는 MMP 효소의 gelatinase 활성에 의한 것으로 사료된다. 이러한 사실은 MMP의 억제제인 1,10-phenanthroline(Brannstrom *et al*., 1988)이나 metal chelator인 EDTA의 처리에 의해 gelatinase 활성이 억제되고, 대신에 serine proteinase 억제제인 PMSF를 처리한 경우에는 gelatinase 활성이 전혀 영향을 받지 않는 것(Seltzer *et al*., 1977; Curry *et al*., 1992)으로 보아 알 수 있다. 또한 생쥐 생식기관 조직의 MMP를 혈액내의 MMP와 비교 조사한 결과 혈액 내에서는 131kDa, 106kDa, 89kDa, 84kDa, 64kDa, 62kDa등 6종류의 MMP가 나타나는데 비해 자궁내액, 난소 및 수란관 조직추출액에서는 106kDa, 64kDa, 62kDa 등 3종류의 MMP가 혈청의 MMP와 유사한 것으로 나타났고 대신 혈청에서는 나타나지 않는 59kDa MMP가 생식기관 조직에서 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보 때 생쥐의 생식기관 조직에서 발현되는 MMP들은 모두가 각각의 조직세포에서 발현된 것으로 여겨지나 일부 MMP가 혈액으로부터 선택적으로 유입되었을 가능성도 있다.

생식주기에 따른 포유류 자궁의 MMP의 mRNA 발현 양상을 조사한 결과에 의하면, proliferative phase에는 MMP-2, -7, -11 등이, secretory phase에는 MMP-2가 그리고 menstrual phase일 때는 MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -11 등이 발현된다(Osteen *et al*., 1994; Rodgers *et al*., 1994; Jeziorska *et al*., 1996). 이 중 MMP-2는 생식주기에 상관없이 항상 일정하게 발현되는데 생쥐를 재료로 한 본 실험에서 자궁내액의 59kDa

MMP도 항상 일정하게 발현되는 것으로 미루어 59kDa MMP는 생쥐의 MMP-2 즉 gelatinase A인 것으로 여겨진다. MMP-2는 latent form의 분자량이 72kDa이지만 zymography를 시행할 경우 sodium dodecyl sulfate(SDS)에 의해 활성화되어 분자량이 66 ~ 58kDa으로 나타나게 된다(Martelli *et al*., 1993). 106kDa, 64kDa 및 62kDa는 estrus 시기에 활성이 현저히 감소되고 diestrus 시기에 가장 높은 활성을 나타내는 등 사람의 MMP-9와 유사한 점으로 미루어 생쥐의 MMP-9의 latent form 및 active form일 가능성이 높다. 흰쥐의 MMP-9는 zymogram에서 latent form이 97kDa로 그리고 active form이 63 ~ 62kDa로 나타난다(Tsang *et al*., 1995). 일반적으로 proliferative phase 혹은 proestrus 시기는 자궁 내막세포들의 부피가 증가하고 세포 수가 늘어나며 세포 사이에 extracellular matrix가 축적되는 시기이므로(Farrar & Carson, 1992) 조직세포의 proteolytic degradation을 위한 MMP의 발현을 필요로 하지 않는다. 이같은 양상은 secretory phase 때에도 마찬가지이다. 그러나 menstrual phase 혹은 diestrus 시기의 자궁 내막세포들은 스테로이드 호르몬의 농도 저하로 인해 조직세포의 탈락현상이 나타나는데 이를 위해서는 세포간의 3차원적인 구조를 지지해주는 ECM 성분의 분해가 반드시 요구된다. 이와 관련하여 포유류 자궁조직의 stromal cell의 MMP-7은 progesterone에 의해서 발현이 억제되는데 이는 progesterone에 의해 TGF-β의 합성이 증가하고 이에 의해 MMP-7의 발현이 억제되기 때문이다(Bruner *et al*., 1995). 이외에도 progesterone은 체외배양된 stromal cell의 TIMP-1(Mann *et al*., 1991)의 mRNA 농도를 감소시키는 것이 보고된 바 있다.

한편 배란전의 흰쥐의 난소 조직추출액에서는 MMP-2로 추정되는 72kDa gelatinase를 포함하여 4개의 gelatinase 단백질이 나타나며 이들의 활성은 배란이 가까워질수록 증가한다(Curry *et al*., 1992). 또한 체외에서 배양된 소의 황체세포는 MMP-2와 MMP-9를 합성 분비하는데 이들의 분비 양상은 LH의 영향을 받지 않는다(Tsang *et al*., 1995). 본 연구의 결과 생쥐의 난소에서도 106kDa, 64kDa, 62kDa 및 59kDa의 4 MMP가 발견이 되었는데 전술한 바와 같이 이들은 MMP-2와 MMP-9인 것으로 추정된다. 특히 이들은 생식주기와 상관없이 일정한 활성을 나타내었는데 이러한 양상은 흰쥐와 소의 황체세포에서 보고된 바와 거의 일치한다. 이같은 결과들로 미루어 볼 때 포유류 난소의 전반적인 MMP의 활성은 생식주기에 상관없이 항상 일정하게 유지되는 것으로 보인다. 그럼에도 불구하고 생화학적인 측정결과에 의하면 포유류 난소의 전체 MMP의 활성은 preovulatory 시기에 증가하는 것으로 알려져 있

다(Puistola *et al*., 1986; Curry *et al*., 1992). 따라서 이는 배란이 예정된 난포에서 국부적으로 specific MMP, 예를 들어 collagenase 등의 활성이 선택적으로 증가함(Murdoch & McCormic, 1992; Tadakuma *et al*., 1993)에 따른 것으로 이때의 MMP는 난포벽의 일부분에서 proteolysis를 일으켜 stigma를 형성함으로써 이 부위에서 난자가 배란되도록 하는 것으로 여겨진다. 이같은 가설은 흰쥐에 MMP의 억제제를 투여하면 배란이 억제되는 사실(Brannstrom *et al*., 1988; Butler *et al*., 1991)로 뒷받침된다.

한편 생쥐를 재료로 한 본 연구의 결과, 처음으로 수란관에서도 MMP 단백질들이 발현되는 것이 관찰되었다. 이들 수란관 MMP는 diestrus 시기의 자궁이나 난소의 MMP와 같은 종류로서 활성도 난소와 마찬가지로 생식주기에 상관없이 항상 일정하게 나타났다. 자궁이나 난소와는 달리 수란관은 상대적으로 생식주기에 따른 현저한 구조적 변화를 일으키지 않으며 구조변화가 현저한 난소에서도 MMP는 국부적으로 발현 양상이 조절된다는 점으로 미루어 볼 때, 수란관의 MMP도 국부적인 구조적 변화(Murray, 1996; Shirley & Reeder, 1996)와 관련될 가능성이 있으며 이는 앞으로 연구되어야 할 과제이다.

결론적으로 자궁내액에는 106kDa, 64kDa 62kDa, 59kDa 등의 분자량을 지닌 gelatinase 활성을 나타내는 MMP가 존재하고 이들은 생식주기에 따라 활성에 변화를 나타내었다. 즉 diestrus 및 proestrus 시기에는 강한 활성을 나타내나 estrus 및 metestrus 시기에는 약한 활성을 보였다. 이로 미루어 생쥐의 자궁내액의 MMP는 생식주기에 따른 자궁조직의 remodeling 에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 난소 및 수란관 조직추출액에서도 자궁내액과 마찬가지로 gelatinase 활성을 나타내는 4종류의 MMP가 존재하나 생식주기에 따른 변화는 없었다.

결 론

생식주기동안의 자성 생쥐 생식기관에서 나타나는 matrix metalloproteinase(MMP)의 단백질 발현 양상을 조사하였다. 생식주기는 diestrus, proestrus, estrus, metestrus로 나누었고 자성 생쥐로부터 자궁내액, 난소 조직추출액, 수란관 조직추출액을 얻어 실험에 사용하였다. MMP 단백질의 발현 양상은 gelatin을 기질로 하는 zymography를 이용한 방법으로 분석하였다.

diestrus와 proestrus 시기의 자궁내액에서는 106kDa, 64kDa, 62kDa 및 59kDa MMP 등 4종류의 MMP가 나타나는 반면 estrus 시기에는 106kDa와 62kDa MMP의 활성이 현저히 감소하였고 64kDa의 활성은 전혀 나타나지 않았다. 그러나 metestrus 시기에는 106kDa MMP의 활성이 diestrus 시기와 유사한 정도로 높게 나타났으며 64kDa과 62kDa MMP의 활성도 diestrus 시기보다는 낮으나 상당히 나타났다. 59kDa MMP의 활성은 생식주기와 상관없이 일정한 활성을 나타내었다. 난소 조직추출액에서도 diestrus 시기의 자궁내액과 같은 4종류의 MMP가 나타나나 난소 조직추출액의 MMP의 활성은 생식주기에 따른 현저한 변화를 나타나지 않았다. 또한 수란관 조직추출액에서도 난소와 마찬가지로 4종류의 MMP가 관찰이 되었으며 이들 MMP는 생식주기에 따른 변화를 보여주지 않았다. 한편 혈청에서는 131kDa, 106kDa, 89kDa, 84kDa, 64kDa, 62kDa등의 gelatinase 활성이 나타났는데 이 중 84kDa는 MMP가 아닌 것으로 판명되었다. Zymography 결과 나타난 gelatinase들이 MMP인지를 알아보기 위해서 MMP inhibitor인 1,10-phenanthroline과 metal chelator인 EDTA를 처리해 본 결과 단백질들의 gelatinase 활성이 억제되었으나 serine proteinase의 inhibitor인 phenylmethylsulfonyl fluoride에 의해서는 gelatinase 활성이 억제되지 않았다..

위 결과로 미루어 생쥐 각 생식기관의 MMP는 생식 활동과 관련하여 중요한 역할을 수행하는 것으로 여겨지며 특히 자궁의 경우 106kDa, 64kDa 그리고 62kDa MMP는 생식주기에 따른 자궁조직세포의 분해와 직접적으로 관련이 있는 것으로 여겨진다.

인 용 문 헌

Adams JC, Watt FM : Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993, 117, 1183-1198.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JA : Matrix metalloproteinases : a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 1993, 4, 197-250.

Bischof P, Friedli E, Martelli M, Campana A : Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: Effects of cell adhesion and immunoprecipitation. *Amer J Obstet Gynecol* 1991, 165, 1791-1801.

Brannstrom M., Woessner JF Jr., Koos RD, Sear CHJ, Lemaire WJ : Inhibitors of mammalian tissue collagenase and metalloproteinase suppress ovulation in the perfused rat ovary. *Endocrinology* 1988, 122, 1715-1721.

Bruner KL, Rogers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM, Osteen KG : Transforming growth factor β mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 7362-7366.

Butler TA, Zhu C, Mueller RA : Inhibition of ovulation in the perfused rat ovary by the synthetic collagenase inhibitor SC44463. *Biol Reprod* 1991, 44, 1183-1188.

Curry TE Jr., Mann JS, Huang MH, Keeble SC : Gelatinase and proteoglycanase activity during the periovulatory period in the rat. *Biol Reprod* 1992, 46, 256-264.

Emonard H, Grimaud JA : Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* 1990, 36, 131-153.

Farrar JD, Carson DD : Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 1992, 46, 1095-1108.

Greenwald GS, Roy SK : Follicular development and its control, In: *The Physiology of*

Reproduction (Knobil, E., J.D. Neil, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Market, and D.W. Pfaff, eds.). Raven Press, New York, 1994, Vol.1, pp. 629-724.

Hay ED : Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1993, 5, 1029-1035.

Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z : Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 1986, 261, 2814-2818.

Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM : Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997, 3, 27-45.

Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE : Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fert* 1996, 107, 43-51.

Mann JS, Kindy MS, Edwards DR, Curry Jr TE : Hormonal regulation of matrix metalloproteinase inhibitors in rat granulosa cells and ovaries. *Endocrinology* 1991, 128, 1825-1832.

Martelli M, Campana A, Bischof P : Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. *J Reprod Fert* 1993, 98, 67-76.

Murdoch WJ, McCormic RJ : Enhanced degradation of collagen within apical vs. basal wall of ovulatory ovine follicle. *Am J Physiol* 1992, 263, 221-225.

Murray MK : Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fert* 1996, 106, 173-183.

Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM : Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 10129-10133.

Puistola U, Salo T, Martikainen H, Ronnberg L : Type IV collagenolytic activity in human preovulatory follicular fluid. *Fertil Steril* 1986, 45, 578-580.

Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG : Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994, 94, 946-953.

Rugh R : Reproductive systems of adult mice. In: *The Mouse ; Its reproduction and development.* London: Oxford University Press. 1990, 30-42

Seltzer JL, Jeffery JJ, Eisen AZ : Evidence for mammalian collagenases as zinc ion metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977, 485, 179-188.

Shirley B, Reeder RL : Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* 1996, 276, 164-173.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Malia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Funjimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, 150, 76-85.

Stricklin GP, Jefferey JJ, Roswit WT, Eisen AZ : Human skin fibroblast collagenase : mechani는 of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry* 1983, 22, 61-68.

Tabibzadeh S : The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996, 2, 77-92.

Tadakuma H, Okamura H, Kitaoka M,Iyama K, Usuku G : Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase-1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. *J Reprod Fert* 1993, 98, 503-508.

Tsang PCW, Poff JP, Boulton EP, Condon WA : Four-day-old bovine corpus luteum : progesterone production and matrix metalloproteinase activity *in vitro. Biol Reprod* 1995, 53, 1160-168.

Figure Legends

Fig. 1. Photomicrographs of smeared mouse vaginal cells. A, cells consisting of only leukocytes(an arrow) indicating the donor animal being at diestrus stage ; B, cells consisting of many leukocytes and some elongated epithelial cells indicating proestrus stage; C, large cornified epithelial cells(an arrowhead) indicating estrus ; D, cells consisting of approximately equal numbers of leukocytes and large folded epithelial cells indicating metestrus.

Fig. 2. Gelatinolytic activities of mouse uterine fluid(UF) obtained at each estrus stage. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05㎍) ; 3, UF at diestrus ; 4, UF at proestrus ; 5, UF at estrus ; 6, UF at metestrus. Total 28.0 ㎍ of each UF protein sample was loaded into each lane. Molecular markers(kDa) are shown on the left and gelatinase bands are indicated by molecular weights(kDa) on the right.

Fig. 3. Gelatinolytic activities of mouse ovarian tissue homogenate obtained at each estrus stage. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05㎍) ; 3, Ovarian tissues at diestrus ; 4, Ovarian tissues at proestrus ; 5, Ovarian tissues at estrus ; 6, Ovarian tissues at metestrus. Total 13.5㎍ of each ovarian tissue protein was loaded into each lane.

Fig. 4. Gelatinolytic activities of mouse oviductal tissue homogenate obtained at each estrus stage. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05㎍) ; 3, Oviductal tissue sample at diestrus ; 4, Oviductal tissue sample at proestrus ; 5, Oviductal tissue sample at estrus ; 6, Oviductal tissue sample at metestrus. Total 7.0㎍ of each oviductal protein sample was loaded into each lane.

Fig. 5. Gelatinolytic activities of mouse uterine fluid, ovarian tissue homogenate,

oviductal tissue homogenate and serum at diestrus. Lane 1, high range MW marker ; 2, diestrus uterine fluid(28.0μg) ; 3, diestrus ovarian tissue homogenate(13.5μg) ; 4, diestrus oviductal tissue homogenate(7.0μg) ; 5, diestrus serum(125.0μg).

Fig. 6. Effect of 1, 10-phenanthroline on gelatinolytic activities of uterine fluid, ovarian tissue homogenate, oviductal tissue homogenate and serum at diestrus. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05μg) ; 3, diestrus uterine fluid(28.0μg) ; 4, diestrus ovarian tissue homogenate(13.5μg) ; 5, diestrus oviductal tissue homogenate(7.0μg) ; 6, diestrus serum(125.0μg).

Fig. 7. Effect of EDTA on gelatinolytic activities of uterine fluid, ovarian tissue homogenate, oviductal tissue homogenate and serum at diestrus. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05μg) ; 3, diestrus uterine fluid(28.0μg) ; 4, diestrus ovarian tissue homogenate(13.5μg) ; 5, diestrus oviductal tissue homogenate(7.0μg) ; 6, diestrus serum(125.0μg).

Fig. 8. Effect of PMSF on gelatinolytic activities of uterine fluid, ovarian tissue homogenate, oviductal tissue homogenate and serum at diestrus. Lane 1, high range MW marker ; 2, collagenase(0.05μg) ; 3, diestrus uterine fluid(28.0μg) ; 4, diestrus ovarian tissue homogenate(13.5 μg) ; 5, diestrus oviductal tissue homogenate(7.0μg) ; 6, diestrus serum(125.0μg).