

돼지의 배란 전 자궁내막 상피세포 내 Plasminogen Activators의 발현

황보용¹, 이상희¹, 차혜진¹, 송은지¹, 이승태¹, 이은송², 정희태², 양부근¹, 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

Expression of Plasminogen Activators in Uterine Epithelial Cells of Pre-ovulatory Phase in Pigs

Yong HwangBo¹, Sang-Hee Lee¹, Hye-Jin Cha¹, Eun-Ji song¹, Seung-Tae Lee¹, Eun-Song Lee², Hee-Tae Cheong², Boo-KeunYang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The endometrium undergoes a cyclic growth and tissue remodeling as changes of epithelial cells, and plasminogen activators (PAs) are related to endometrium tissue remodeling. This study was to evaluate expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (tPA) in porcine uterine epithelial cells. In results, the uPA and tPA were expressed in uterine tissue, epithelium and secretory glands in porcine endometrial cell. In addition, the uPA and tPA were expressed in cultured epithelial cells, and it were mainly expressed in cytoplasm. In porcine uterine tissue and epithelial cells, uPA activity was higher than activity in tPA. In PAs mRNA expression levels, uPA mRNA level was significantly higher than tPA mRNA level ($P<0.05$). The fluorescence intensity of uPA protein was also higher than fluorescence intensity of tPA protein, and uPA protein expression was significantly higher than in tPA protein expression ($P<0.05$). Therefore, we suggest that a physiological function in porcine uterine epithelial cells should be more influenced by uPA than in tPA during pre-ovulatory phase.

(Key words: porcine uterus, endometrium, epithelial cells, urokinase-type PA, tissue-type PA)

서 론

돼지의 자궁은 암컷의 생식기관으로 쌍각자궁의 형태이며, 두 개의 긴 자궁각을 가지고 있는 것이 특징이다. 자궁은 자궁내막층, 자궁근층 및 자궁외막층으로 나누어진다. 그 중 자궁내막층은 복합적인 조직으로 발정 주기와 착상이 이루어지는 동안 다양한 생리적 변화를 겪게 되며, 이러한 변화는 주기적으로 조직의 성장과 재구성에 관여하고 있다. 자궁내막의 변화에 대한 연구로 쥐의 자궁에 estrogen 처리 시 자궁내막 상피층의 두께가 증가한 연구 결과가 보고(Lai 등, 2000)되었으며, 돼지에서 발정 주기 동안 자궁내막 내의 선상피가 증가한다는 보고가 있다(Stroband 등, 1986).

Plasminogen activation system은 혈관 섬유소 용해 작용(Carmeliet 등, 1994; Bugge 등, 1995; Ploplis 등, 1995; Carmeliet과 Collen, 1996), 혈관 신생 작용(Mignatti와 Rifkin, 1993), 종양 침입과 전이(Andreassen 등, 1997), 수정란 착상(Sappino 등,

1989; Teesalu 등, 1996), 태반 형성(Liu 등, 1998), 배란(Liu 등, 1991), 황체 퇴행(Feng 등, 1993; Liu 등, 1996) 및 분만(Hu 등, 1999) 등 다양한 생리적 기능과 생식 기능에 역할을 하고 있다. Plasminogen activators (PAs)는 비활성 plasminogen을 활성화 plasmin으로 전환시키는 serine계 단백질 분해 효소로서, urokinase-type PA (uPA)와 tissue-type PA (tPA)로 나누어진다(Stepanova 등, 1999). uPA는 53k-Da의 분자량을 가지고 있으며(Gunzler 등, 1982), 주로 세포 이동과 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM) 분해에 작용하는 것으로 보고(Stepanova 등, 1999)되었다. 또한 tPA의 분자량은 70k-Da이며(Pennica 등, 1983), 섬유소에 높은 친화력을 가지고 있어 섬유소 용해에 관련된다는 보고가 있다(Lijnen과 Collen, 1982). PAs에 의해 활성화된 plasmin은 matrix metalloproteinases (MMPs)를 활성화(Reich, 1978) 시켜 직·간접적으로 세포외기질을 분해하고, 이를 통해 세포외기질에 있는 성장 인자의 활성화(Menshikov 등, 2006), 혈관 신생 작용(Olofsson 등, 1998), 세포 이

* 본 연구는 농림수산식품기술평가원(과제번호 312060-05-1-CG000)의 지원에 의해 수행되었음.

* Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

등 등에 관여한다는 보고가 있으며, 이를 통해 조직 재구성에 관여한다(Martin과 Arias, 1982). 이러한 PAs에 대한 연구는 사람의 자궁(Koh 등, 1992; Estelle^À 등, 2003), 쥐의 자궁(Sappino 등, 1989), 소의 자궁(Tanikawa 등, 2009) 등에서 다양한 연구가 이루어지고 있지만, 돼지 자궁에 있어 PAs의 발현에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 돼지 자궁의 재구성에 관여하는 인자로서, 자궁내막 상피세포에서 PAs의 발현을 확인하고, uPA와 tPA의 발현량을 비교하기 위하여 RT-PCR과 면역형광 염색법과 flow cytometry를 이용하여 mRNA와 단백질 수준에서 확인하고, uPA와 tPA의 발현 정도를 비교하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 자궁 상피세포의 수집

도축장으로부터 난포에 황체가 전혀 형성되지 않은 난포기의 돼지 자궁을 1~1.5시간 이내에 실험실로 운반하였고, Hank's balanced salt solution(HBSS)를 이용하여 자궁 외부를 세척한 후 난소와 자궁간막을 제거하고, 자궁각 부분만을 떼어내었다. 그 후 자궁강 내에 HBSS를 관류시켜 세척하고, 자궁각을 세로축으로 절개한 뒤 메스를 이용하여 자궁내막에서 상층층을 긁어내어 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Invitrogen, USA)에 회수한 후 collagenase IV(Worthington, USA)를 66 U/ml의 농도로 처리하여 진탕 배양기에서 배양하였다(1 h, 38°C, 120 rpm). 배양 후 cell strainer(SPL, Korea)를 이용하여 걸러낸 후 원심 분리(5 min, 1,200 rpm)하여 상층액을 제거한 뒤 Tris-NH₄를 이용하여 혈액 성분을 제거하였고, HBSS로 세척하고 10% FBS(Invitrogen, USA), 0.2% amphotericin B와 0.5% Antibiotic-Antimycotic(ABAM, Invitrogen, USA)을 포함한 DMEM과 Ham's F-12가 1:1로 섞인 D/F12(Invitrogen, USA) 배양을 이용해 38°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 48시간마다 배양액을 교체하였다.

2. 면역형광 염색법

돼지 자궁내막 조직을 1 × 1 cm의 크기로 자르고 10%, 20% 및 30% sucrose에 순차적으로 처리 후 4% paraformaldehyde를 이용하여 4°C에서 24시간 동안 처리하였다. 그 후 조직을 Frozen section compound(Leica, USA)로 포매하여 3~5분 정도 -196°C에 침지시키고 Microtome(Leica, USA)을 이용하여 동결 절편하였다. Slide에 붙인 시료를 24시간 동안 건조시킨 뒤 3% BSA(Sigma, USA)가 첨가된 PBS를 시료 위에 분주하여 1시간 정도 실온에서 두었다. 그 후 Tris-Buffered saline and Tween 20(TBST)용액에 10분간 담가 세척한 후 1차 항체로 goat anti-uPA(Santa Cruz Biotechnology, USA)와 goat anti-tPA(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 TBST에 1:500로 희석

한 후 처리하여 1시간 동안 배양하였고, 2차 항체는 1:10,000으로 희석한 Alexa fluor 488 donkey anti goat IgG(Invitrogen, USA)와 Propidium iodide(PI, Sigma, USA)를 이중 염색 후 건조 과정을 거쳐 Clearmount mounting solution(Invitrogen, USA)을 이용하여 봉입하였다. 세포는 5×10⁴ cells/ml의 농도로 cell culture slide(SPL, Korea)에서 7일 동안 배양하였으며, 배양액은 24시간마다 교체하였다. 배양 7일 후 배양액을 제거한 뒤 4% paraformaldehyde를 이용하여 4°C에서 30분 동안 고정해 주었으며, PBS-PVA를 이용하여 2회 세척해 주었다. 핵 염색을 위하여 Bisbenzimidazole(Hoechst33342, Sigma, USA)를 4 µg/ml의 농도로 30분 동안 처리하였고 5% skim milk(DIFCO, USA)로 blocking하였으며 goat anti-uPA(Santa Cruz Biotechnology, USA)와 goat anti-tPA(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:100로 희석하여 4°C에서 1시간 동안 처리하였다. 1차 항체 처리 후 Alexa fluor 488 donkey anti goat IgG(Invitrogen, USA)를 1:200로 희석하여 1시간 동안 반응시키고 항체 용액을 제거한 뒤, Clearmount mounting solution(Invitrogen, USA) 이용하여 봉입하였다.

3. RT-PCR

배양된 자궁 상피세포로부터 RNA를 추출하기 위해 RNAiso plus(TAKARA, Japan)을 사용하였으며, 추출된 RNA는 Maxime RT Premix(Intronbio, Korea)을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 uPA 및 tPA와 GAPDH에 대한 primer(Table 1)를 이용하여 증폭시켰으며, 증폭된 산물은 Ethidium bromide(EtBr, Bioneer, Korea)을 포함한 2% Agarose gel을 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

4. 단백질 분석

배양된 상피세포에 Trypsin-EDTA(Invitrogen, USA)를 처리하여 단일 세포를 채취하여 원심 분리(5 min, 1,200 rpm)한 후 상층액을 제거한 뒤 PBS-PVA로 세척하고, 1.5 ml Micro tube에 옮겨 동일한 조건에서 원심 분리를 실시하였다. 상층액 제거 후 uPA에 대한 1차 항체로 Goat anti-uPA(Santa Cruz

Table 1. Primer conditions of PCR

Gene	Primer sequence	Product size(bp)	Tem. (°C)	Cycles
uPA	F: CCTACAAGTACTTCTC R: GCAAACCAAGGCTGGTTTCTC	460	55	45
tPA	F: AGGAGGCCTCTATGCTGACA R: GGCACACAGCATATTGTTGG	544	60	30
GAPDH	F: TCGGAGTGAACGGATTG R: CCTGGAAGAGATGGTATGG	200	59	30

Biotechnology, USA)를 이용하였고, tPA는 Goat anti-tPA(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 이용하여 TBST에 1:100으로 희석한 후 4℃에서 1시간 동안 배양하였고, 2차 항체로 Alexa fluor 488 donkey anti goat IgG(Invitrogen, USA)를 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 원심 분리하였고 상층액을 제거한 뒤 PBS를 분주하였으며, Flow cytometry(FACs caliber, Bacton Dickinson, USA)를 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

5. 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.2를 이용하여 최소 유의차 검정(Least Significant Different test : LSD test)과 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차($P < 0.05$)를 검정하였다.

결 과

1. 면역형광 염색법

돼지의 자궁조직과 세포에서의 uPA와 tPA의 발현과 발현 위치를 가시적으로 확인하기 위하여 각 PAs에 대한 1차 항체를 사용하여 면역형광 염색법을 실시하였다. 그 결과, 자궁조직에서 uPA와 tPA 모두 발현이 되는 것을 확인하였고, 자궁 내막의 상피층과 분비샘에서도 PAs가 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이차원적으로 배양된 돼지 자궁 상피세포에서도 역시 PAs가 정상적으로 발현되는 것을 확인하였으며, uPA의 녹색 형광이 tPA보다 밝은 것을 가시적으로 확인하였다(Fig. 2). 한편, uPA와 tPA의 발현 위치를 확인하기 위하여 세포의 핵을 Hoechst 33342로 염색한 결과, uPA와 tPA 모두 세포질에서 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3과 4).

2. RT-PCR

이차원 배양된 상피세포에서의 uPA와 tPA의 mRNA 발현을 비교하기 위하여 RT-PCR을 실시하였으며(Fig. 5), GAPDH를

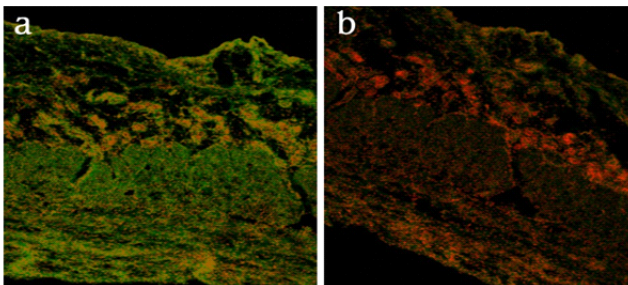


Fig. 1. Immunofluorescence staining for uPA (a) and tPA (b) detection in porcine uterine tissue(Green : uPA (a), tPA (b) : Red: Nuclear).

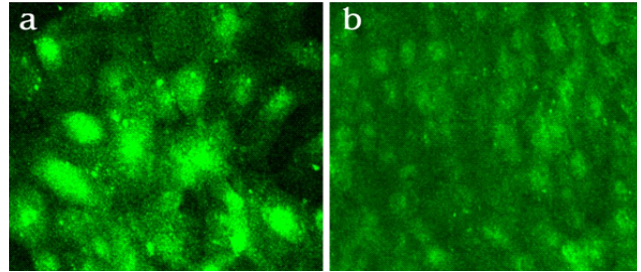


Fig. 2. Immunofluorescence staining for uPA (a) and tPA (b) detection in porcine uterine epithelial cells(Green : uPA, tPA).

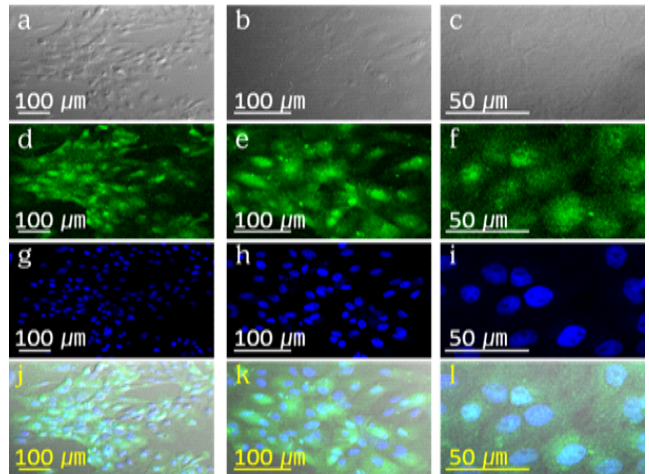


Fig. 3. Fluorescent imaging of uPA expression by confocal laser scanning microscope in porcine uterine epithelial cells(Image : a,b,c : by general microscope, d,e,f,g,h,i : by bright microscope, j,k,l; merge)(Green: uPA; Blue: nuclear).

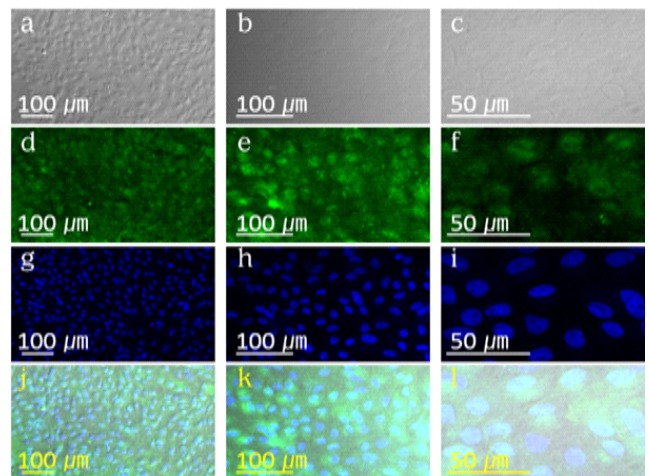


Fig. 4. Fluorescent imaging of tPA expression by confocal laser scanning microscope in porcine uterine epithelial cells(Image : a,b,c : by general microscope, d,e,f,g,h,i : by bright microscope, j,k,l : merge)(Green: tPA; Blue: nuclear).

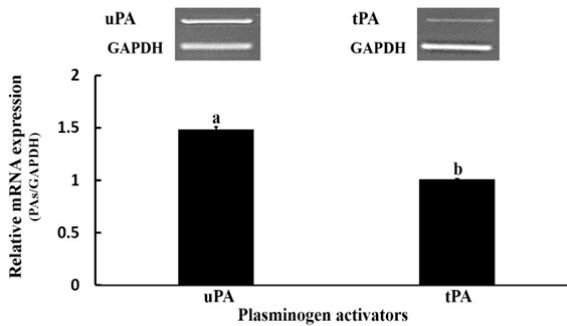


Fig. 5. uPA and tPA mRNA levels in porcine uterine epithelial cells ($P < 0.05$).

이용하여 전체적인 유전자 발현량을 동일시하였다. Gel에 나타난 밴드를 수치화하여 분석한 결과, uPA mRNA의 발현이 tPA mRNA 발현보다 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$).

3. 단백질 분석

상피세포에서의 단백질 발현량을 분석하기 위하여 형광이 표시된 항체를 사용해 flow cytometry를 실시하였다. Fig. 6은 uPA와 tPA에 대한 형광의 세기를 히스토그램으로 표현한 그림으로 uPA의 형광 세기가 tPA보다 높게 나타났다. 한편, Fig. 7은 히스토그램을 수치화하여 분석한 결과로 mRNA에서의 결과와 마찬가지로 uPA 단백질이 tPA 단백질보다 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$).

고찰

PA는 수정란의 착상과 세포외기질의 재구성에 관련된 요소이며 (Irigoyen 등, 1999), 이러한 PAs의 활성화는 여성의 경우 월경의 개시와 자궁 생리학에 중요한 역할을 한다 (Littlefield, 1991; Tabibzadeh, 1996). 또한 다른 연구에서는 자궁내막 상피세포 (Ueyama 등, 2002, Tanikawa 등, 2009)와 기질세포 (Xia 등, 1995) 내에서 uPA의 생산이 탈락막화 동안 혈관 신생 작용, 영양막 침입, 조직 재구성과 연관되어 있다는 것 (Finn, 1986)이 보고되었다.

PAs에 영향을 주는 인자로는 배양된 소 자궁내막 세포에서 interleukin-1 α 가 PA 활성화에 조절자로서 작용한다는 보고가 있었다 (Tanikawa 등, 2009). 사람 자궁내막세포에서 PAs와 Plasminogen Activator Inhibitor-type 1 (PAI-1)의 발현은 스테로이드 호르몬에 의해 조절되며, estradiol (E_2)는 기질세포에서 tPA 발현을 증가시키고, progesterone (P_4)은 상피세포에서 uPA를 억제시킨다는 보고가 있었다 (Mullins 등, 1980; Casslen 등, 1995; Ueyama 등, 2002). 또한 E_2 는 배아의 성장과 착상을 돕기 위해 자궁 내에 FGF7 (Ka 등, 2001)과 같은 다양한 유전자를 발현시킴 (Johnson 등, 2009)으로써 자궁내막의 재구성에

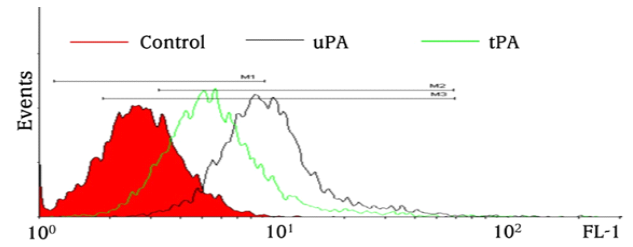


Fig. 6. uPA and tPA protein levels by flow cytometric histogram in porcine uterine epithelial cells (Red bar: control; Black bar: uPA; Green bar: tPA).

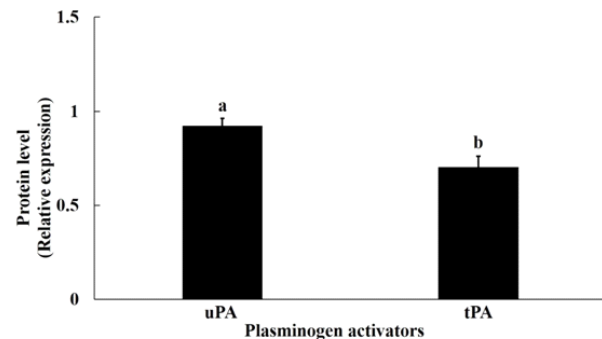


Fig. 7. uPA and tPA protein levels in porcine uterine epithelial cells ($P < 0.05$).

영향을 미치는 것으로 보인다.

본 연구는 돼지 자궁의 변화와 착상에 대한 PAs의 작용기전을 규명하기 위한 실험의 일환으로 자궁내막에 존재하는 세포 중 상피세포에서의 uPA와 tPA의 정상적인 발현 여부와 발현량을 mRNA와 단백질 수준에서 비교하기 위하여 수행되었다. 조직에서의 uPA와 tPA는 모두 발현이 되는 것을 확인하였고, 특히 상피층, 분비샘 및 혈관에서 세포외기질보다 더 많이 발현되는 것을 확인하였으며, 이는 이전에 수행된 연구와 같은 결과를 보였다 (Kim 등, 2011). 이러한 결과는 자궁내막 층의 형태적 변화가 혈관 신생 작용 (Olofsson 등, 1998), 선상피의 증가 (Lai 등, 2000) 등에 의해 일어나기 때문인 것으로 보인다. Fig. 2, 3 및 4를 통하여 이차원적으로 배양된 돼지 자궁 상피세포에서 uPA와 tPA가 정상적으로 세포질 부위에 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, uPA의 녹색형광이 tPA보다 밝게 발현되는 것을 가시적으로 확인할 수 있었다. mRNA와 단백질 수준에서의 분석 결과, uPA의 mRNA와 단백질이 tPA보다 유의적으로 높게 나타났는데 ($P < 0.05$), 이러한 결과는 사람의 자궁내막 세포에서 uPA 분비가 tPA보다 약 37배 높다는 결과 (Ueyama 등, 2002)와 uPA의 발현이 높다는 면에서 같은 경향을 나타냈지만, 돼지 자궁 조직을 이용한 PAs 발현은 tPA가 uPA보다 높게 나타나는 차이를 보였다 (Kim 등, 2011). 이러한 차이는 상피세포 외에도 기질 세포 및 근육 세포 등을

포함하는 조직을 사용한 이전 실험과는 다르게 상피세포만을 분리, 배양 후 분석을 실시했기 때문이라고 생각된다.

본 실험 결과를 요약하면 이차원적으로 배양된 돼지 자궁 상피세포에서 uPA와 tPA가 모두 정상적으로 발현되는 것을 확인하였으며, mRNA와 단백질 수준에서의 발현량을 비교한 결과, 모두 uPA가 유의적으로 높게 나타났음을 확인하였다 ($P < 0.05$). 이는 돼지 자궁의 생리적, 형태적 변화는 혈관 신생 작용(Olofsson 등, 1998), 선상피의 증가(Lai 등, 2000), 자궁내막 상피층의 두께의 증가 등을 포함하고 있고, 이러한 변화는 세포이동과 세포외기질 분해에 작용하는 uPA에 영향을 더 많이 받을 것을 제시한다. 본 연구의 결과는 난포기의 돼지 자궁 세포만을 사용한 실험으로 발정 주기와 착상 동안에 PAs의 작용기전을 규명하기 위해서는 다른 주기의 자궁 세포와 내막층에 존재하는 기질세포에서의 uPA와 tPA의 발현을 비교할 필요가 있을 것으로 생각된다.

결 론

자궁내막층은 주기적으로 상피층의 변화와 같은 조직 재구성 과정과 성장을 겪으며, PAs는 이러한 자궁내막층의 조직 재구성에 연관되어 있다. 따라서 본 연구에서는 돼지 자궁 상피세포에서 uPA와 tPA의 발현을 확인하고, 발현량의 차이를 알아보고자 하였다. uPA와 tPA 모두 자궁 조직과 자궁내막층 내의 분비샘과 상피 층에서 발현이 되는 것을 확인하였다. 또한, 배양된 자궁 상피세포에서 역시 uPA와 tPA가 모두 발현되었고, 주로 세포질에서 발현되는 것을 확인하였으며 자궁 조직과 상피세포에서 uPA 발현이 tPA보다 높았다. 배양된 돼지 자궁 상피세포에서 PAs mRNA의 발현 수준을 분석한 결과, uPA mRNA 발현이 tPA mRNA보다 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 단백질 발현 수준에서, uPA 단백질의 형광 세기가 tPA보다 밝게 나타났으며, uPA 단백질이 tPA 단백질보다 유의적으로 높게 발현되었다 ($P < 0.05$). 본 연구 결과, 돼지 자궁 상피세포에서 일어나는 생리적 기능은 tPA보다 uPA에 의해 영향을 받을 것으로 생각된다. 하지만 추가적으로 자궁내막층에 존재하는 기질 세포에서의 PAs 발현과 상피 세포와 기질 세포 간의 상호작용에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

연구를 수행하는데 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동 연구소에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L and Duffy MJ. 1997.

- The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72: 1-22.
- Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC and Dengen JL. 1995. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Gene. Dev.* 9: 794-807.
- Carmeliet P and Collen D. 1996. Gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation system in mice. *Semin. Thromb. Hemost.* 22: 525-542.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kiechens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De VR, Van DOJJ, Collen D and Mulligan RC. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368: 419-424.
- Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert M and Lund LR. 1995. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2776-2784.
- Estelle JG, Estelle A, Gilabert J, Castello R, Espan F, Falco C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E and Aznar J. 2003. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum. Reprod.* 18: 1516-1522.
- Feng Q, Liu K, Hu ZY, Zou RJ, Yang SC and Liu YX. 1993. Possible involvement of tissue-type plasminogen activator in luteolysis of rhesus monkeys. *Hum. Reprod.* 8: 1640-1644.
- Finn CA. 1986. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol. Rev.* 61: 313-328.
- Gunzler WA, Steffens GJ, Otting F, Kim SM, Frankus E and Flohe L. 1982. The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine: the complete amino acid sequence of the chain. *Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Chem.* 363: 1155-1165.
- Hu ZY, Liu YX, Liu K, Byrne S, Ny T, Feng Q and Ockleford CD. 1999. Expression of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators as well as plasminogen activator inhibitor type-1 and type-2 in human and rhesus monkey placenta. *J. Anat.* 194: 183-195.
- Irigoyen JP, Canoves PM, Montero L, Koziczak M and Nagamine Y. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 104-132.
- Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Spencer TE, Wu G and Bayless KJ. 2009. Conceptus-uterus interactions in pigs: endometrial gene expression in response to estrogens and

- interferons from conceptuses. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 66: 321-332.
- Ka H, Jaeger LA, Johnson GA, Spencer TE and Bazer FW. 2001. Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and functions in trophoblast cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 142: 2303-2310.
- Kim KH, Lee YS, Gu HN, Yang BK, Cheong HT and Park CK. 2011. Changes in plasminogen activity in uterus tissue during the estrous cycle in the pigs. *Reprod. Dev. Biol.* 35: 463-468
- Koh SCL, Wong PC, Yuen R, Chua SE, Ng BL and Ratnam SS. 1992. Concentration of plasminogen activators and inhibitor in the human endometrium at different phases of the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 96: 407-413.
- Lai MD, Lee LR, Cheng KS and Wing LYC. 2000. Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J. Endocrinol.* 166: 87-93.
- Lijnen HR and Collen D. 1982. Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin. Thromb. Hemost.* 8: 2-10.
- Littlefield BA. 1991. Plasminogen activators in endometrial physiology and embryo implantation: a review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 622: 167-175.
- Liu K, Brandstrom A, Liu YX, Ny T and Selstam G. 1996. Coordinated expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 during corpus luteum formation and luteolysis in the adult pseudopregnant rat. *Endocrinology* 137: 2126-2132.
- Liu YX, Hu ZY, Liu K, Byrne S, Zou RJ, Ny T, d'Lacey C and Ockleford CD. 1998. Localisation and distribution of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators and their inhibitors type-1 and type-2 in human and rhesus monkey fetal membranes. *J. Anat.* 194: 183-195.
- Liu YX, Peng XR and Ny T. 1991. Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen-activator-inhibitor type-1 and tissue-type plasminogen activator during gonadotrophin induced ovulation. *Eur. J. Biochem.* 195: 549-555.
- Martin O and Arias F. 1982. Plasminogen activator production by trophoblast cells *in vitro* effect of steroid hormones and protein synthesis inhibitors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142: 402-409.
- Menshikov M, Plekhanova O, Cai H, Chalupsky K, Parfyo-nova Y, Bashtrikov P, Tkachuk V and Berk BC. 2006. Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via Redox-Dependent pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 801-807.
- Mignatti P and Rifkin DB. 1993. Biology and biochemistry of proteinase in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73: 161-195.
- Mullins DE, Bazer FW and Roberts RM. 1980. Secretion of a progesterone-induced inhibitor of plasminogen activator by the porcine uterus. *Cell.* 20: 865-872.
- Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K and Eriksson U. 1998. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11709-11714.
- Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA and Ward CA. 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301: 214-221.
- Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF and Collen D. 1995. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth and health in mice. *Circulation* 1: 2585-2593.
- Reich E. 1978. Activation of plasminogen: a general mechanism for producing localized extracellular proteolysis. In: Berlin RD, Hermann H, Lepow IH, Tanzer JM (eds.). *Molecular Basis of Biological Degradative Processes*. Acad Press, Inc., NY. pp 155-169.
- Sappino AP, Huarte J, Belin D and Vassalli JD. 1989. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J. Cell Biol.* 109: 2471-2479.
- Stepanova V, Mukhina S, Köhler E, Resink TJ, Erne P and Tkachuk VA. 1999. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis-dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 195: 199-206.
- Stroband HWJ, Taverne N, Langenfeld K and Barends PMG. 1986. The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. *Cell Tissue Res.* 246: 81-89.
- Tabibzadeh S. 1996. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodeling. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 77-92.
- Tanikawa M, Kim TS, Okuda K, Ryoo ZY, Park SB, Shin JH,

- Park CK and Lee DS. 2009. Cell-type specificity of interleukins 1 α and 1 β on prostaglandin and plasminogen activator production in bovine endometrial cells. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 32-42.
- Teesalu T, Blasi F and Talarico D. 1996. Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and α_2 MR/LRP genes. *Mech. Develop.* 56: 103-116.
- Ueyama M, Kasatori N, Urayama T, Maemura T, Yao Y, Shiraishi T, Saito S and Kubo H. 2002. Quantitative evaluation of the influence of ovarian steroids on plasminogen activators and inhibitors in human endometrial cells and trophoblasts. *Thromb. Res.* 108: 235-244.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.
-
- (접수: 2013. 08. 16/ 심사: 2013. 08. 19/ 채택: 2013. 09. 03)