

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 子宮蛻膜組織形成中蛋白激酶 C 之角色探討

The investigation of the role of protein kinase C in the development of uterine decidual tissue

計劃編號：NSC 89-2320-B-040-047

執行期限：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

主持人：劉哲育 執行機構及單位名稱：中山醫學院生化所

### 中文摘要：

目前我們對於子宮蛻膜形成了解非常有限，因此研究子宮蛻膜形成的機制是一件有意義的工作。子宮蛻膜形成過程中有兩種作用，即轉化作用 (transformation) 和增殖作用 (proliferation)。轉化作用是子宮基質細胞 (stromal cell) 經由荷爾蒙 (如 Estrogen 和 Progesterone) 刺激誘發轉化形成蛻膜細胞 (decidual cell) (2)，此過程與 cAMP 有關 (3)。至於增殖作用的報告則較少，最近我們研究結果顯示增殖作用可能與蛋白激酶 C (Protein Kinase C; PKC) 異構體表現有關 (4, 5)。在假懷孕與真懷孕的蛻膜組織形成過程中，PKC $\alpha$  有降低調節 (down-regulation) 和活化 (activation) 現象，而 PKC $\zeta$  和 PKC $\delta$  表現增加。本實驗我們發現基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase-2; MMP-2) 的表現與 PKC 的表現有所關聯，在假懷孕第二天到第五天以及真懷孕第七天到第九天 MMP-2 表現有顯著的增加，若以 PKC 活化劑 (TPA) 處理離

體培養的蛻膜組織和蛻膜細胞，則 MMP-2 的表現會增加，而此增加的表現可以被 PKC 抑制劑 (H7) 所抑制。從這些發現讓我們了解在蛻膜形成過程中 PKC 可能涉及調節 Matrix metalloproteases (MMPs) 的表現，也引發一些連想，例如在子宮蛻膜形成中何種因素導致 PKC 異構體表現、何種 PKC 異構體導致 MMPs 的表現和其機制又如何等問題，值得我們繼續研究。

關鍵詞：蛋白激酶 C、蛻膜形成、基質金屬蛋白酶

### 英文摘要：

Since the comprehension of the decidualization is limited, it is an important work from now to investigating the mechanism of the decidualization. The decidualization is proceeded by two phases of conversion, transformation and proliferation. The process of the transformation is the uterine stromal cells transformed to the decidual cells by some adequate hormonal stimulation, such as estrogen and progesterone (2). In this process the

production of cAMP is correlated with (3). Otherwise, the growth of the decidual cells by some other factors is designed as proliferation. However, the mechanism is unclear. Recent results of our study had found that the activation of PKC $\alpha$  and overexpression of PKC $\zeta$  and PKC $\delta$  were present in decidual tissue during pseudopregnancy and pregnancy (4,5). In this study, the increased expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were also present in decidual tissue during pseudopregnancy and pregnancy. The expressions of MMP-2 were correlated with the expressions of PKC isoforms. In decidual organotypic culture and cell culture, the expressions of MMP-2 were enhanced by treatment with PKC activator (TPA), and the enhanced expressions were inhibited by PKC inhibitor (H7). Thus, these findings indicate that PKC may be involved in the regulation of the expression of MMP-2 during decidualization, and allow us to think some question, such as which factor the expression of PKC isoforms are stimulated by, which PKC isoforms the expression of MMPs are stimulated by and how the mechanism are. All are worth continuing investigation.

**Keywords:** Protein kinase C, Decidualization, Matrix metalloproteinase

**緣由與目的：**

胚胎著床對於懷孕與否是一項非常重要的步驟，任何影響該步驟的因素都可能造成懷孕失敗。在臨床實驗

報告顯示，人工受孕失敗的原因主要是胚胎著床失敗(1)。而著床失敗一直是人工受孕技術失敗的主因，因為儘管取卵率、受精率和胚胎分裂率都可突破 90%，但是著床成功的機會對每個胚胎而言卻只有 15-20%。目前對於這個問題，有些可以利用荷爾蒙或胚胎助孵化術解決，有些在醫學上仍是盲點。所以解決的方法可能需要從其它方面著手，例如研究子宮蛻膜組織形成之機制相關問題。子宮蛻膜組織是子宮內膜的基底細胞經由荷爾蒙(如 estrogen 和 progesterone)刺激誘發轉化形成(2)，它被認為在胚胎著床過程中扮演非常重要的角色，如調控胚胎侵入作用(6)、提供胚胎生長的溫床，供應胚胎營養(7)、分泌內分泌素(8)和保護胚胎免於母體的免疫排斥作用(9)等。因為子宮內膜的接受度與子宮蛻膜組織形成好壞有關，故有良好的胚胎和足夠的荷爾蒙，才有健全良好的子宮蛻膜組織，胚胎才能順利著床發育，因此探討子宮蛻膜組織形成的機制有助於解決著床失敗的問題。

在我們的知識領域裡，子宮蛻膜形成過程中有兩種作用，即轉化作用(transformation)和增殖作用(proliferation)。轉化作用是子宮基質細胞經由胚胎著床作用和外力刺激活化使攝副腺素(prostaglandin)和組織氨(histamine)釋放，再經由血中助孕素(progesterone; P)和女性素(estradiol; E)的催化，使基質細胞轉化形成蛻膜細胞，即為轉化作用。轉化作用一般

認為與 cAMP 有關：如攝副腺素或組織氨在 E 和 P 存在下會誘發產生 cAMP 增加，然後蛻膜細胞轉化形成(3)；利用 Foscilin 直接產生 cAMP 增加也會誘發蛻膜細胞形成(10)，所以轉化作用可能透過 cAMP 的路徑。至於增殖作用的報告則較少，我們的初步研究發現可能與 PKC 有關 (11, 12)。

PKC 是一種鈣離子和磷脂依賴之蛋白激酶，在細胞內扮演訊息傳遞的角色。一種已知的細胞內傳遞訊息物質 diacylglycerol (DAG)，即是增強鈣離子和磷脂活化 PKC (13-15)。當細胞受到外在刺激 (external stimuli) 時，諸如生長因子 (growth factor)、荷爾蒙 (hormone) 和神經傳遞物質 (neurotransmitter)，DAG 由 phosphatidylinositol 分解形成，PKC 即被活化，並進行細胞內訊息傳遞的工作 (16)。此外 PKC 亦能誘發許多細胞反應，包括細胞增殖 (cell proliferation)、分化 (differentiation)、基因表現 (gene expression) 和腫瘤促進形成作用 (tumor promotion) (17)。

目前所知 PKC 12 種異構體(  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$  and  $\nu$  ) (18-21)，在功能上和分佈上有其特殊性 (22-25)。如近期的研究報告顯示某些 PKC 異構體可能與組織再生 (tissue regeneration) 有關：部份肝臟切除後肝細胞再生

時，細胞內 PKC 呈現重新分配的現象，PKC 從細胞質的部份轉移到細胞膜的部份(26,27)，細胞核內 PKC 含量減少，而 PKC  $\epsilon$  則增加 (28)；在 carbon tetrachloride 誘發肝臟再生時，PKC  $\epsilon$  呈現增加 (29)；在 Folic Acid 誘發腎臟再生時，則 PKC  $\epsilon$  呈現減少，但是 PKC  $\alpha$  和 PKC  $\beta$  不變 (30)。另外尚有報告顯示初級反應基因 ( primary response gene) 如 c-fos、c-myc、TIS1、TIS8 和 TIS11 的活化也與肝臟和腎臟兩者之再生有關 (31-34)。

最近我們的研究發現假懷孕與真懷孕的蛻膜組織形成過程中 PKC 異構體表現也有不同業，PKC $\alpha$  有降低調節 (down-regulation) 和活化 (activation) 現象，而 PKC $\zeta$  和 PKC $\delta$  的表現都增加，但是出現的時期不同，PKC $\zeta$  的表現主要在蛻膜組織細胞增殖階段，PKC $\delta$  的表現主要在蛻膜組織細胞消退階段 (4,5)，故結果顯示 PKC 異構體表現可能與蛻膜組織形成和消退有關。

MMPs 也被認為參與子宮蛻膜之形成。當蛻膜細胞形成中，細胞與細胞間間質纖維需要重新改造，尤其是子宮內層的 collagen，需要被 MMPs 分解重新組合，以利胚胎侵入著床和基質細胞轉化生長成蛻膜細胞。在胚胎著床時，胚胎細胞和其週圍滋養層細胞會分泌出 MMP-9 (92

kDa) (35, 36), 促進胚胎轉移和侵入, 而蛻膜細胞會分泌 tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs) 對抗 MMP-9 的作用 (37, 38), 以減少其它組織受損。在基質細胞轉化生長成蛻膜細胞時, 該細胞不會分泌 MMP-9, 但分泌 MMP-2 (72 kDa), 以分解細胞周圍的膠質纖維 (collagen), 促使蛻膜組織形成 (39, 40), 而且 Qin (41) 也發現子宮蛻膜細胞分泌 MMPs 受到子宮蛻膜分泌的賀爾蒙 (relaxin) 所調控。Spencer (42) 更發現在子宮蛻膜形成過程中, MMPs 的表現與雌性素受器的含量有關。而賀爾蒙與雌性素受器的含量是主導子宮蛻膜形成重要的因素, 因此 MMPs 的表現應與子宮蛻膜形成有關。然而這些賀爾蒙是否透過 PKC 路徑導致 MMPs 的表現, 卻未有報告指出。因此本實驗計畫想深入了解 PKC 在子宮蛻膜形成中所扮演的角色, 故將利用組織塊狀培養方式和細胞培養方式研究子宮蛻膜形成中可否經由 PKC 路徑導致 MMPs 的表現。

## 材料與方法：

### 一．動物飼養與處理

#### (一) 動物飼養

購自國科會動物中心之 Sprague-Dawley 雌鼠置於人工照明【晝夜輪迴 12 小時亮, 12 小時暗(亮的週期為 0500 1700)】, 溫控  $22 \pm 2$  之環境中 採自由進食方式

至少二週以上。藉每日檢查其陰道塗抹液可判斷出動物是否具規律的動情週期。

#### (二)假孕誘導(子宮頸刺激法)

挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌鼠, 於動情期當天上午以玻棒插入陰道內, 在一分鐘內給予 200 次刺激子宮頸 (Cervical Stimulation), 刺激當天為假懷孕期第 0 天。在假懷孕期第 4 天, 利用乙醚麻醉雌鼠, 剖開其腹腔並將子宮拉出。以特製長針頭僅輕刮其兩側子宮壁, 然後縫合消毒。手術完畢後, 縫合並消毒再放回籠中繼續飼養。於假懷孕第 72 小時, 將雌鼠斷頭犧牲並將其子宮取下, 待進一步實驗。

#### (三)懷孕誘導(交配法)

挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌鼠, 於動情前期當天下午 (17:00-18:00) 置一性活潑雄鼠配對進行交配, 成功與否藉由雌鼠陰道口塗抹液觀察精子之存在做為依據。

二 組織塊狀培養 (organotypic culture): 所有操作在無菌操作檯內操作

將子宮蛻膜組織取下組織切成約 4x4 mm 大小的切塊, 使用 culture well (12 well 或 24 well), 每個 well 加入 2 ml 的 DMEM 培養液, 再將切好的組織切塊放入 well 中, 每個 well 都放入三小塊組織, 在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱 (incubator) 反應 1 小時

( 培養液不含任何藥物 )後，將培養液吸出丟棄，接著加入含有 TPA 或各種 PKC 抑制劑的 DMEM 培養液 1 ml，一起反應 24 小時後，收集培養液並儲存在 - 70°C 冰櫃。然後組織稱重再儲存於 - 70°C 冰櫃。

### 三 Gelatin 分解酵素電泳拓撲分析 ( gelatin-zymography protease assay )

取 10  $\mu$ l 的培養液 (1ml/50mg 蛻膜塊狀組織) 進行 gelatin-zymography 分析。電泳是以 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 進行，電壓設定為 150 伏特共進行 2.5 小時，接著將電泳板膠內酵素 renature ( 藉由 2.5% Triton X-100 溶液在室溫下震盪洗滌 30 分鐘兩次 )。接著加入 200 ml 反應緩衝液( reaction buffer : 40 mM Tris-HCl pH 8.0 , 10 mM CaCl<sub>2</sub> , 0.01% NaN<sub>3</sub> )在 37°C 培養箱中反應 16 個小時。反應完後，電泳板膠( gel )以 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 染色液染色 30 分鐘，最後用退色液退色觀察。

### 四 Zymography 的定量分析 ( quantitative analysis )

利用 AlphaImager 2000 密度分析儀定量分析 92 kd ( proMMP-9 )、72 kd ( proMMP-2 ) 及 62 kd ( active MMP-2 ) 的表現差異 ( 直接分析電泳膠片 )。

### 結果與討論：

我們發現 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的表現有不同，在假懷孕第二天到第五天以及真懷孕第七天到第九天有顯著的增加，而這些結果正好都與 PKC 異構體表現的時期相同 (4, 5)。因此我們連想 PKC 活化劑 (TPA)可能對於 MMP-2 表現的影響，結果 TPA 處理離體培養的蛻膜組織，MMP-2 和活化態的 MMP-2 的表現都增加，而此增加的表現可以被 PKC 抑制劑 (H7) 所抑制。從這些發現可以了解 PKC 可能涉及蛻膜形成過程中 Matrix metalloproteases (MMPs) 表現的調節。

當大鼠蛻膜細胞處理助孕素時可以抑制金屬蛋白水解酵素-2 的表現，但如果再加入 TPA 則金屬蛋白水解酵素-2 會被誘發表現增加。相同的情況也在人類子宮基質細胞培養得到，當人類子宮基質細胞處理助孕素時可以抑制金屬蛋白水解酵素-2 的表現，同時不管是位於細胞質或細胞膜上的蛋白激酵素 C  $\alpha$ 也都下降，甚至細胞質或細胞膜上的金屬蛋白水解酵素-2 也會因為助孕素的加入而下降，但如果再加入 TPA 則剩餘的蛋白激酵素 C  $\alpha$ 會因活化而完全消失。在女性月經週期時會有許多荷爾蒙的表現，其中包括助孕素，因此可能藉由助孕素的分泌誘發子宮基質細胞轉化成蛻膜細胞，並藉由減少蛋白激酵素 C  $\alpha$ 表現，來調控蛻膜中的金屬蛋白水解酵素-2 分泌，而這其中又可能涉及到抑制 membrane type matrix

metalloproteinase-1 (MT-MMP1) 表現有關，但機制尚未明瞭，需要再進一步確認。我們認為在蛻膜細胞形成的過程中，助孕素會將子宮基質細胞轉化成蛻膜細胞，而此時的蛋白激酶素 C 則因為可能會影響轉化而受到抑制，一旦當蛻膜細胞形成之後，自己本身會分泌荷爾蒙來誘發本身的蛋白激酶素 C  $\alpha$  活化，來促進金屬蛋白水解酶素-2 表現，以增進蛻膜細胞本身增殖，但此論點仍需要更進一步求證。

#### 計劃成果自評：

Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的表現有不同，在假懷孕第二天到第五天以及真懷孕第七天到第九天有顯著的增加，而這些結果正好都與 PKC 異構體表現的時期相同，且可能受到 PKC $\alpha$  的調控，此結果是我們首先發現。將對子宮蛻膜形成的機制有不同的了解，也對胚胎著床提供新的方向。

#### 參考文獻：

1. 游士弘、金玉堂、簡利婷、溫慧勤和王鈴琪 (1997) 人工生殖之醫學與法律(上)。當代醫學雜誌 24(7): 89-94.
2. Tang, B., Guller, S. and Gurside, E. (1994) Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization [Review]. Annals of the New York Academy of Sciences 734: 19-25.
3. Bark AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, and Handwerger S. (1997) Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP.

- Endocrine, 6(3): 301-307.
4. Liu, J.Y., Shyu, J.C., Chang, C.L., Tsai, C.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, L.Y., and Hsieh, Y.S. (1998) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pseudopregnant rats. Life sci., 63: 721-730.
5. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Liu, H.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, L.Y., and Liu, J.Y. (1999) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pregnant rats. Life sci., 64: 2367-2373.
6. Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B., Brosens, I. (1980) Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta, 1:3.
7. Kearns, M., Lala, P.K. (1983) Life history of decidual cells: a review. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 3: 78.
8. Maslar, I.A., Kaplan, B.M., Luciano, A.A., Riddick, D.H. (1980) Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 78.
9. Golander, A., Zakuth, V., Shechter, Y., Spirer, Z. (1988) Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by a soluble factor secretion by explants of human decidua. Eur. J. Immunol., 11: 849.
10. Yee GM, and Kennedy TG. (1991) Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mediating the

- effect of prostaglandin E2 on decidualization in vitro. *Biol. Reprod.*, 45(1): 163-171.
11. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Cheng, C.K., and Liu, J.Y. (1997) Change in protein kinase C activity on day 5 decidualization in pseudopregnant rat. *Chinese Journal of Physiology*, 40(2): 107-112.
  12. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, M.T., Cheng, M.H. and Liu, J.Y. (1997) Localization of protein kinase C isoforms during the decidualization in pseudopregnant rats. *Chinese Journal of Physiology*, 40 (4): 243-247.
  13. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308: 693-698.
  14. Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 159-193.
  15. Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y. A., and Bell, R.M. (1986) Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1184-1188.
  16. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45: 515-528.
  17. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.
  18. Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1992) Isolation and characterization of the subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 1149-1153.
  19. Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., Negro-Vilar, A. and Hannun, Y.A. (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.*, 117: 121-133.
  20. Selbie, L.A., Schmitz-Peiffer, A., Sheng, Y. and Biden, T.J. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC  $\delta$ , and atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 24296-24302.
  21. Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994) Protein kinase C- $\alpha$  a question of specificity. *Trends. Biochem. Sci.*, 19: 73-77.
  22. Huang, K.P., Huang, F.L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. (1988) Biochemical characterization of rat brain protein Kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 263: 14839-14845.
  23. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, W., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudomw, M. and Yoshida, T. (1988) Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.*, 263:

- 4523-3426.
24. Hocevar, B.A. and Fields, A.P. (1991) Selective translocation of  $\beta$ -II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 266: 28-33.
  25. Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E. and Stabel, S. (1992) Protein C group B members PKC- $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  and PKC-L( $\eta$ ). Comparison of properties of recombinant proteins in vitro and in vivo. *Biochem. J.*, 283: 781-787.
  26. Okamoto, Y., Nishimura, K., Nakayama, M., Nakagawa, M. and Nakano, H. (1988) Protein kinase C in the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 1144-1149.
  27. Rush, J.S., Klein, J., Fanti, P., Bhat, N.R. and Waechter, C.J. (1992) Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in lymphocytes B in the presence of Brij-58. *Anal. Biochem.*, 207: 304-310.
  28. Alessenko, A., Khan, W.A., Wetsel, W.C. and Hannun, Y.A. (1992) Selective changes in protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182(3): 1333-9.
  29. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Sato, N. and Kamada, T. (1989) Heterogeneous activation of protein kinase during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.*, 254: 59-65.
  30. Dong, L., Stevens, J.L., Fabbro, D. and Jaken, S. (1993) Regulation of protein kinase C isozymes in kidney regeneration. *Cancer Res.*, 53: 4542-4549.
  31. Kondo, T., Inui, H., Konishi, F. and Inagami, T. (1992) Phospholipase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 23609-23616.
  32. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrates-src homology domains and signal transduction. *FASEB J.*, 6: 3283-3289.
  33. Towley, B. D., Chadwick, L.J., Grantham, J.J. and Calvet, J. P. (1989) Sequentially protooncogene expression in regenerating kidney following acute renal injury. *J. Biol. Chem.*, 264: 8389-8393.
  34. Kujubu, D.A., Norman, J.T., Herschman, H.R. and Fine, L.G. (1991) Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: evidence for different growth initiation processes. *Am. J. Physiol.*, 260: F823-F827.
  35. Brenner, C.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A., and Werb, Z. (1989) Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian



- development. *Genes Dev.*, 3: 848-859.
36. Behrendtsen, O., Alexander, C.M., and Werb, Z. (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development (Cambridge)*, 14: 447-456.
37. Waterhouse, P., Denhardt, D.T., and Khoka, R. (1993) Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol. Reprod. Dev.*, 35: 219-226.
38. Reponen, P., Leivo, I., Sahlberg, C., Apte, S.S., Olsen, B.R., Thesleff, I., and Tryggvason, K. (1995) 92kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Dev. Dyn.*, 202: 388-396.
39. Alexander, C.M., Hansell, E.J., Behrendtsen, O., Flannery, M.L., Kishnani, N.S., Hawkes, S.P., and Werb, Z. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development (Cambridge)*, 122: 1723-1736.
40. Qin, X., Garibay-Tupas, J., Chua, P.K., Cachola, L., and Bryant-Greenwood, G.D. (1997) An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol. Reprod.*, 56: 800-811.
41. Spencer, f., Chi, L., and Zhu, M.X. (1998) Time-dependent relationship between the estrogen receptors and the matrix metalloproteinases following deciduoma induction in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 120: 283-288.
42. Jun, C.D., Oh, C.D., Kwak, H.J., Pae, H.O., Yoo, J.C., Choi, B.M., Chun, J.S., Park, R.K., and Chung, H.T. (1999) Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *Immunology*, 162(6):3395-3401.