고신대학교 의과대학 학술지 제23권 제2호
Kosin Medical Journal
Vol. 23. No. 2, pp. 9~15, 2008

Tetracyclines와 단백질분해효소 억제제에 의한 Human 92-kD type IV Collagenase (Gelatinase B)의 활성도 억제

이대희

고신대학교 의과대학 약리학교실

Inhibition of Human 92-kD type IV Collagenase (Gelatinase B) Activity by Tetracyclines and Proteinase Inhibitors

Dae-Heui Lee

Department of Pharmacology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : Human 92-kD type IV collagenase(gelatinase B), a family of matrix metalloproteinases(MMP), is involved in the remodeling of connective tissue as well as in disease states associated with acute and chronic inflammation or tumoral metastatic processes.

Methods : To investigate the pharmacological and enzymatic characteristics of human neutrophil type IV collagenase, the enzyme was extracted from human neutrophils and purified by a combination of Ultrogel AcA 54 gel filtration and Bio-Rex 70 ion exchange chromatographies.

Results : The Purified enzyme showed a single band of molecular weight: 92-kD on the sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis(SDS-PAGE). Human neutrophil type IV collagenase degraded gelatin at the specific cleavage site, but did not affect intact type I collagen. Human 92-kD type IV collagenase was activated by aminophenylmercuric acetate and molecular conformation was changed at the disulfide bond finger site.

Conclusion : Human 92-kD type IV collagenase was inhibited by tetracycline, de-dimethylaminotetracycline and pepstatin A, an inhibitor of aspartic proteinase,
E-64, an inhibitor of cysteine proteinase and leupeptin, an inhibitor of cystein and serine proteinase had no inhibitory effect on human 92-kD type IV collagenase activity.

Key words : KEY WORDS: Gelatinase B, Ultrogel AcA 54, Bio-Rex 70, Pepstatin A, Tetracycline.

서 론

사람의 성장, 상처의 치유, 종양 세포의 침습 그리고 다양한 질병과 동반되는 세포외기질의 분해와 재구성에 matrix metalloproteinases (MMPs)라고 하는 일군의 효소가 관여한다.[1] 이들의 효소 특이성은 각각 다르지만 이 효소들은 집합적으로 기질을 구성하는 대분자들을 분해하는 능력이 있다. 또한 MMPs는 그들의 분자량이 다르지만 모두 cystein-switch와 zinc-binding 영역을 가지고 있다.[2-6] 그들은 전효소 형태로 분비되어 세포외에서 활성화 과정을 거치며[6] tissue inhibitors MMPs에 의하여 억제된다.[7]

사람의 MMP들은 그들의 기질 특이성에 따른 유사성과 polypeptide chain의 구성에 따라 크게 4개의 범주로 구분되며 interstitial collagenase, gelatinase 또는 type IV collagenase, stromelysin과 putative metalloproteinase(PUMP) 등이 그 예이다.[8]

첫번째 범주에 속하는 효소들로서는 fibroblast type[9,10]과 neutrophil type의 interstitial collagenases로서 type I, II, III collagens를 가수분해 한다.

두번째 범주에 속하는 효소들로서는 gelatinase 또는 type IV collagenase로서 섬유아세포와 종양세포들[11,12]에

교신저자 : 이 대 희
주소 : 602-702 부산시 서구 암남동 34번지
고신대학교 복음병원 약리학교실
TEL : 051-990-6493, FAX : 051-241-5458
E-mail : dhlee@ns.kosinmed.or.kr

의 해서 생산되는 72-kD type IV collagenase가 있고 중성구,[13] 대식세포[14]와 일부 형질 전환 세포들[15,16]에 의해서 생산되는 독특한 92-kD type IV collagenase가 있다.

세번째 범주에 속하는 것으로서 섬유아세포는 proteoglycans, type IV, IX collagens, laminin, fibronectin 그리고 다른 기질들을 분해하는 stromelysin이라는 효소를 생산한다.[16]

끝으로 putative metalloproteinase(matrilysin)는 proteoglycans, fibronectin, laminin, gelatin 그리고 다른 기질들을 분해한다.[17]

사람의 matrix metalloproteinases들 중 92-kD type IV collagenase는 interstitial collagenase가 동정되는 곳에서는 빈번히 발견되었고[18,19] interstitial collagen을 분해하는데 있어서 interstitial collagenase와 상승적으로 작용한다는 것이 밝혀졌다.[20] 특히 배아기의 기관의 정상적인 발달 중에는 92-kD type IV collagenase는 기저막의 분해가 주된 역할이 아니라 interstitial collagenase에 의해 발생되는 변성된 collagen조각(gelatin)들의 제거를 위한 gelatinase로서의 역할이 더 중요하다는 것이다.[21]

원래는 gelatins에 대한 강력한 가수분해 작용 때문에 명명된 gelatinases는 오히려 기저막에서 발견되는 type IV collagen을 분해하는 이 효소의 독특한 능력 때문에 연구자들에게 더욱 주목받게 되었다. 또한 이 기저막은 통과해서 이동하려는 세포들에게는 장벽으로 작용하게 되므로 연구자들은 gelatinases가 종양의 침습, 전이 그리고 혈관신생을 용이하게 한다고 보고하였다.[22-24]

72-kDa gelatinase는 증식중인 피부의 섬유아세포, H-ras가 형질전환된 기관지 상피세포(H-ras transformed bronchial epithelial cells) 그리고 SV-40가 형질전환된 폐의 섬유아세포(SV40- transformed lung fibroblasts)가 분비한다. 그리고 SV-40가 형질전환된 폐의 섬유아세포가 분비하는 92-kDa gelatinase는 72-kDa gelatinase보다 54개의 proline이 풍부한 영역(54-residue proline-rich domaine)을 가지고 있다.

macrophage, U937 단구성 백혈병세포(U937 monocytic leukemia cells), HT1080 섬유육종세포(HT1080 fibrosarcoma cells) 그리고 배양한 사람의 각질세포(human keratinocytes는 모두 92-kDa gelatinase를 분비한다.

결합 조직에서 전체적인 통합성의 상실은 류마티스양관절염, 골관절염 등의 많은 질병과정에서 나타난다.[25,26] 이런 질병들이 선진국에서 많은 발병율을 나타내지만 이때 발생하는 조직 손상을 예방할 수 있는 치료법은 없다. 여러 증거들은 결합조직 내의 metalloproteinase의 활성이 적당히 조절되지 못해서 이러한 조직손상이 유발되며 결과적으로 이러한 효소를 억제하는 것이 조직손상을 예방하는 치료적 개입의 목적이 되고있다.[27]

본 연구에서는 human 92-kD type IV collagenase에 대해 tetracycline, de-dimethylaminotetracycline 및 proteinase inhibitor들에 의한 효소 활성도 억제 실험을 함으로서 이 효소의 약리학적 특성의 일부를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Ultrogel AcA 54는 LKB사(Uppsala, Sweden), Bio-Rex 70은 BioRad사(Hercules, Calif. USA), sodium acetate, aminophenylmercuric acetate(APMA), bovine serum albumine, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), ethylene glycol-bis(β-amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), tetracycline, Brij 35, n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide(SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide(SAPNA), Tris base그리고 calcium chloride는 Sigma사(St. Louis, Mo. USA), HMW and LMW electrophoresis calibration kits는 Pharmacia사(Brussels, Belgium), SDS-PAGE용 시약은 BioRad사 제품을 사용하였고 그외 모든 시약은 특급을 사용하였다. 그리고 투석용 막(Spectrapor dialysis membane)은 Spectramedical사(Houston, Tx. USA) 제품을 초 여과막(PM 10 concentration membrane)은 Amicon사(Beverly, MA. USA) 제품을 사용하였다. 혈액은 고신 의료원 혈액 은행에 저장된 전혈을 사용하였다.

2. 방법

1) Human 92-kD type IV collagenase의 분리

human 92-kD type IV collagenase는 Lee[28] 등이 기술한 방법을 따랐으며 요약하면 다음과 같다.

a. Leukocyte extract

전혈을 22℃에서 200 g 속도로 30분간 원심 분리하여 백혈구층을 얻었다. 여기서 분리된 백혈구를 1.5 M NaCl과 50 mM CaCl2및 50 mM Tris-HCl을 포함하고 pH 7.3으로 조절된 용액 내에서 세포 분쇄기(Polytron ; Kinematica CH-6010, Kriens-Luzern, Brikmann사)를 이용하여 최대 속도에서 15 초 동안 3 회 분쇄한 후, 30,000

g 속도로 60 분간 원심 침전시켜서 상층액을 취하여 백혈구 추출물로 사용하였다.

b. Ultrogel AcA 54 gel filtration column chromatography

백혈구 추출물을 Tris-HCl 용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2 , 0.1% Brij 35, pH 7.3)으로 평형된 2.5 x 100 cm 길이의 Ultrogel AcA 54 column을 사용하여 chromatography를 시행하였다. 이때 실험 온도는 4℃로 유지하였다. 유속은 8 ml/15 min.이었고 8 ml을 1 분획으로 하였으며 각 분획에 gelatin을 넣어 37℃에서 4 시간 동안 incubation시켜서 gelatin을 분해시킨 후 반응 산물을 SDS-PAGE를 하여 젤라틴 분해능이 있는 분획을 확인하였으며, 젤라틴 분해능이 있는 분획만 모아서 같은 부피의 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl2, 0.1% Brij 35)으로 1:1로 희석시킨후 다음 정제 과정에 사용하였다.

c. Bio-Rex 70 ion exchange chromatography

Bio-Rex 70 이온 교환 수지로 충진된 column(3.0 x 27 cm)을 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl2 , 0.1% Brij 35)으로 평형시킨 다음 Ultrogel AcA 54 column chromatography에서 분리한 시료를 column에 통과시켜 수지에 부착시킨 다음 부착되지 않은 단백질이 완전히 column을 빠져 나간 후 sodium acetate 농도를 0.05 M에서 0.7 M까지 선형 농도 구배(linear gradient)로 chromatography를 시행하였다. 유속은 7 ml/5 min으로 하였으며 한 시험관당 7 ml씩 모은 각각의 분획에 대한 gelatinolytic activity를 SDS-PAGE로 확인해서 효소 활성도를 나타내는 분획들을 모아서 PM 10 membrane으로 농축시킨 후 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM CaCl2 , 0.1% Brij 35) 내에서 하룻밤 동안 투석시킨 후 다음 실험에 사용될 때까지 -20℃에 보관 하였다.

2) Gel electrophoresis

SDS-PAGE는 Laemmli[29]의 방법으로 시행하였으며 대부분의 실험에서 10% running gel과 4% stacking gel을 사용하였다. SDS-PAGE 후의 gel은 Coommassie 염색 용액(0.1% Coommassie brilliant blue R-250, 25% methanol, 10% acetic acid) 내에서 23℃에서 하룻밤 동안 염색시킨 후 탈색 용액(25% methanol, 10% acetic acid)에서 탈색시켜 band를 확인하였다.

3) 효소 활성화및 활성도 억제 시험

2.5 ㎍의 human 92-kD type IV collagenase에 aminophenylmercuric acetate(APMA)의 최종 농도가 3 mM이 되도록 넣은 후 37 ℃에서 1 시간 동안 방치하여 활성화시킨다.

이 활성화된 효소에 최종`농도가 2mM되도록 tetracycline, de-dimethylaminotetracycline(tetracycline의 'A' ring의 C4 위치에서 dimethylamino 기가 제거된것), N-acetyl-L-cysteine, E-64(trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino (4-guanidino) -butane), leupeptin (acetyl-leu- leu-arg-al), pepstatin A (isovaleryl-val-val-sta- ala-sta)을 각각 넣고 37℃에서 30 분간 정치시킨 다음 gelatin과 17시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 SDS-PAGE로 기질의 분해 정도와 반응 산물을 control과 비교해서 효소 활성도를 평가하였다.

결 과

1. human 92-kD type IV collagenase의 분자량 측정

정제한 효소를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 1의 lane 2에서와 같이 92-kD의 단일 band를 확인할 수 있었으며 이로서 분자량 92,000의 비활성 상태의 human 92-kD type IV collagenase가 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있었다. lane G는 73.8 ㎍ 의 변성시킨 type I collagen으로서 분자량 124,000과 112,000의 두 band를 확인할 수 있었다.

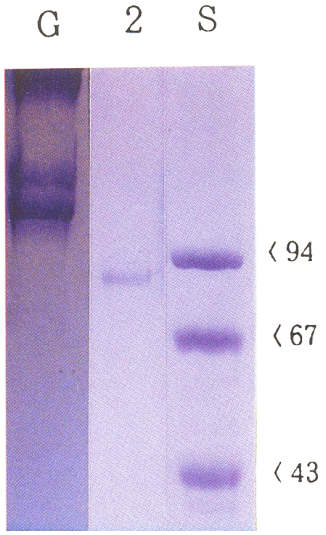

Fig. 1 SDS-PAGE of purified enzyme. Lane G: denatured type I collagen (α1, α2 chains of collagen molecule); lane 2: 200 ㎍ of purified enzyme ; Lane S: standard molecular markers (Pharmacia, LMW), 94 kD, 67 kD, 43 kD.

2. APMA에 의해 활성화된 human 92-kD type IV collagenase의 분자 구조의 변화

정제된 human 92-kD type IV collagenase를 1.1 ㎎/㎖과 7.6 ㎎/㎖ 농도로 농축하였으며 불활성 상태의 7.6 ㎎/㎖ 농도의 human 92-kD type IV collagenase에 APMA를 넣어 최종 농도가 2 mM되도록 하여 37℃에서 2 시간 동안 활성화시켜 human 92-kD type IV collagenase의 분자 구조 를 Raman spectroscopy로 검사한 결과는 Fig. 2.와 같다.

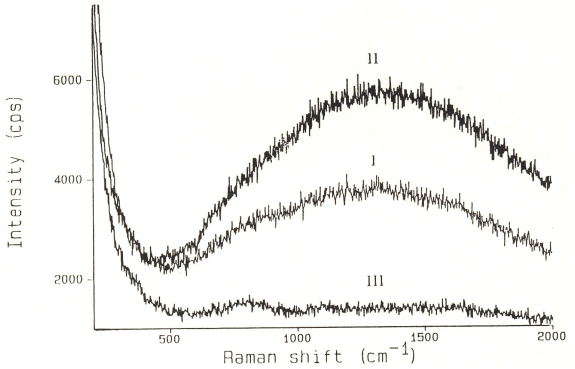

Fig. 2 Molecular conformational change of activated human 92-kD type IV collagenase by APMA. I: 22 ㎍ of latent human 92-kD type IV collagenase, II: 152 ㎍ of latent human 92-kD type IV collagenase, III : 152 ㎍ of activated human 92-kD type IV collagenase by APMA.

농도가 1.1 ㎎/㎖ 인 I과 , 농도가 7.6 ㎎/㎖인 II의 불활성 상태의 human 92-kD type IV collagenase는 파수 1,330 cm-1에서 각각 4, 000과 6,000 cps의 강도를 보이는데 비해서 III의 농도가 7.6 ㎎/㎖이고 APMA로 활성화시킨 후의 human 92-kD type IV collagenase는 파수 1,330 cm-1에서 강도가 1,500 cps로 감소되었고 파수 800 cm-1에서 새로운 peak가 형성되었음을 알 수 있다. 이로서 활성 상태의 human 92-kD type IV collagenase는 불활성 상태의 human 92-kD type IV collagenase에 비해 현저히 다르게 분자 구조가 변화되었음을 확인할 수 있었다.

3. 효소 활성화 및 활성도 억제 효과

1) Tetracycline, de-dimethylaminotetracycline, NAC에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성도 억제 Fig. 3의 lane 2에서 보는 바와 같이 정제한 효소를 denatured type I collagen(gelatin)과 반응시킨 반응 산물을 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량 124,000, 112,000의 gelatin이 분해되어 분자량 94,000, 92, 000, 67,000, 60,000, 43,000, 40,000, 30,000의 분해 산물이 나타났으며 lane 2의 조건에 최종 농도가 2 mM이 되도록 tetracycline을 넣은 lane 3에서는 분자량 94,000, 67,000, 60,000, 43,000의 분해 산물만 보였고 lane 2의 조건에 최종 농도가 2 mM이 되도록 de-dimethylaminotetracycline을 넣은 lane 4에는 분자량 92,000, 67, 000, 60,000, 43,000, 30,000의 분해 산물만 보였다. lane 2의 조건에 최종 농도가 2 mM이 되도록 NAC를 넣은 lane 5에서는 분자량 94,000, 92,000, 67,000, 60,000, 43,000, 40,000, 30,000의 분해 산물이 나타났다. 따라서 각각의 lane을 lane 2와 비교하여 보면 lane 3, 4의 효소 활성이 현저히 억제되었음을 알 수 있었으며 lane 5에서는 효소 활성의 억제가 없었음을 알 수 있었다.

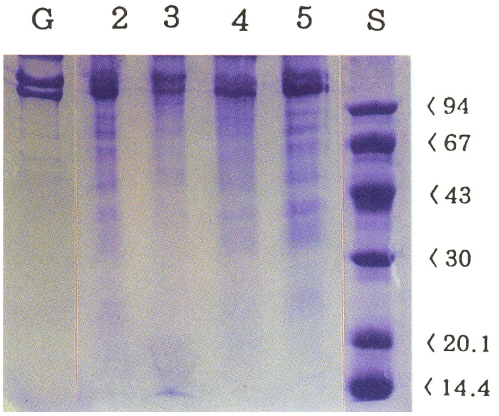

Fig. 3 Inhibition of 92-kD type IV collagenase by tetracycline, de-dimethylaminotetracycline and NAC. Lane G: 16.5 ㎍ of denatured type I collagen, lane 2~5: 16.5 ㎍ of denatured type I collagen (α1, α2 chains of collagen molecule) were incubated with 2.5 ㎍ of purified enzyme in the presence of 2 mM tetracycline(lane 3), 2 mM de-dimethylaminotetracycline (lane 4) and 2 mM N-acetyl-L- cysteine(lane 5) respectively, for 17 h at 37℃. Reaction products were separated on 10% polyacrylamide gel. Molecular mass makers (Pharmacia, LMW) were run on a separate tract of the same gel and are indicated by the arrow (94kD, 67 kD, 43 kD, 30 kD, 20.1 kD and 14.4 kD).

2) pepstatin A, E-64, leupeptin에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성도 억제

Fig. 4의 lane 2에서 보는 바와 같이 정제한 효소를 denatured type I collagen(gelatin)과 반응시킨 반응 산물을 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량 124,000, 112,000의 gelatin이 분해되어 분자량 94,000, 92, 000, 67,000, 60,000, 43,000, 40,000, 30,000의 분해 산물이 나타났으며 lane 2의 조건에 최종 농도가 2 mM이 되도록 pepstatin A를 넣은 lane 3에서는 분자량 94,000, 92,000, 67,000, 60,000의 분해 산물만 보였고 lane 2의 조건에 최종 농도

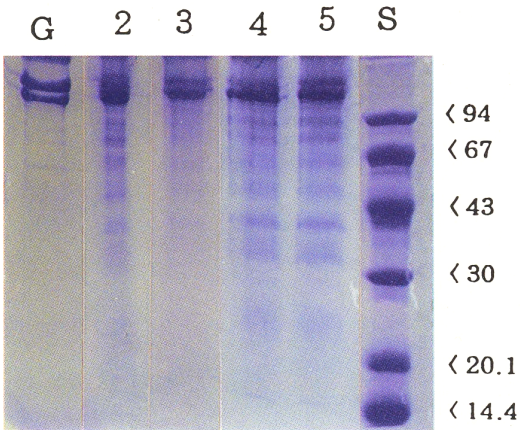

Fig. 4 Inhibition of 92-kD type IV collagenase by pepstatin A, E-64, and leupeptin.
Lane G:16.5 ㎍ of denatured type I collagen, lane 2~5: 16.5 ㎍ of denatured type I collagen (α1, α2 chains of collagen molecule) were incubated with 2.5 ㎍ of purified enzyme in the presence of 2 mM pepstatin A(lane 3), 2 mM E-64(lane 4) and 2 mM leupeptin(lane 5) respectively, for 17 h at 37℃. Reaction products were separated on 10% polyacrylamide gel. Molecular mass makers (Pharmacia, LMW) were run on a separate tract of the same gel and are indicated by the arrow(94kD, 67 kD, 43 kD, 30 kD, 20.1 kD and 14.4 kD).

가 2 mM이 되도록 E-64를 넣은 lane 4와 lane 2의 조건에 최종 농도가 2 mM이 되도록 leupeptin을 넣은 lane 5에서는 분자량 94,000, 92,000, 67,000, 60,000, 43,000, 40,000, 30,000의 분해 산물이 나타났다. 따라서 각각의 lane을 lane 2와 비교하여 보면 lane 3의 효소 활성이 현저히 억제되었음을 알 수 있었으며 lane 4와 5에서는 효소 활성의 억제가 없었음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 human 92-kD type IV collagenase의 활성도 억제 물질에 대한 성질을 보다 심도있게 규명하기 위하여 임상 치료 약물 농도에 가까운 2 mM 농도에서 tetracycline, de-dimethylaminotetracycline, N-acetyl-L-cysteine(NAC), E-64, leupeptin 그리고 pepstatin A에 의해 92-kD type IV collagenase의 활성이 억제되는 정도를 비교해 보았다. 먼저 tetracycline과 de-dimethylaminotetracycline에 의해서는 92-kD type IV collagenase의 활성이 거의 동등한 정도로 억제되었으며 이것은 1989년 Zucker[30] 등이 보고한 tetracycline과 de-dimethylaminotetracycline에 의한 소세포 폐암 세포의 human 72-kD type IV collagenase(gelatinase A)의 억제 연구에서 보고된 결과와 비교해 볼만하다. De-dimethylaminotetracycline[31,32]은 인체에서 이 약제의 반복 사용에 따른 항균제 내성의 증가를 피할 수 있으므로 염증의 진행에 있어서 조직의 파괴를 예방할 수 있는 치료제로서 사용될 수 있을 것이며 장차 이러한 임상적 시도를 위해서 de-dimethylaminotetracycline에 대한 보다 광범위한 특성 연구가 있어야 하겠다. 1995년 Albini[33] 등은 Boyden-chamber assay와 nude mouse를 사용한 in vivo 실험에서 N-acetyl-L-cysteine(NAC)이 악성 종양세포의 전이와 관련된 특성 즉 세포 이동, 침습 그리고 gelatinase 생산 등에 현저한 억제 작용을 가지며 이는 N-acetyl-L-cysteine(NAC)에 있는 sulfhydryl 기에 의한 type IV collagenase의 활성 억제가 악성 종양의 진행을 억제하는 주된 기전인 것 같다고 밝히고 있으나 본 실험에 의한 결과는 이들의 보고와는 다르게 92-kD type IV collagenase의 활성 억제에 영향을 미치지 못했다. 이는 이들이 발표한 논문에서 밝히고 있듯이 혈류에서 순환하던 종양 세포가 혈관 밖으로 빠져 나올 때 종양 세포에서 방출되는 superoxide anion이 기저막의 파괴에 중요한 역할을 하고 N-acetyl-L-cysteine(NAC)에 있는 sulfhydryl 기가 이들 발생기 산소의 효과적인 억제제로 작용함으로서 악성 종양 세포의 작용을 억제할 수 있다고 생각되며 Boyden-chamber assay를 사용한 저자들의 보고에서도 사람의 흑색종에서 기원한 세포인 A2058 melanoma에서는 침습활성이 억제되었으나 Lewis lung tumors 세포를 사용한 실험에서는 NAC가 영향을 미치지 못한다고 보고한 바[33]와 본 실험결과가 일치하는 것으로 보아서는 NAC가 type IV collagenase의 활성을 직접적으로 억제하는 proteinase inhibitor로서 작용하는 것은 아니라고 생각된다. 92-kD type IV collagenase의 또 다른 proteinase 특성을 알아 보기 위하여 cysteine proteinase 억제제인 E-64, cysteine과 serine proteinase 억제제인 leupeptin에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성 억제 정도를 측정해보았으나 이 약제들에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성 억제 효과는 관찰되지 않았다. 끝으로 aspartic proteinase 억제제인 pepstatin A를 pepsin, cathepsin D, renin의 활성을 억제하기에 충분한 농도인 2 mM 농도에서 92-kD type IV collagenase의 활성 억제 정도를 측정한 결과 pepstatin A에 의한 이 효소의 활성 억제가 현저한 것으로 밝혀졌는데 이는 92-kD type IV collagenase의 활성 부위에 carboxyl 기에 의한 단백질 가

수 분해 활성이 있을 수 있다는 가능성을 시사하고 있으며 장차 이에 대한 보다 철저한 규명을 해 볼 필요가 있다.

결 론

1. Tetracycline의 치료적 약물 농도인 2 mM 농도에서 tetracycline, de-dimethylaminotetracycline, N-acetyl-L-cysteine, E-64, leupeptin 그리고 pepstatin A에 의한 92-kD type IV collagenase의 활성 억제 시험을 한 결과 tetracycline, de-dimethylaminotetracycline, 그리고 pepstatin A에 의해 효소 활성이 억제되었는데, 이중 tetracycline에 의한 활성 억제가 가장 강력했다.

2. 2 mM 농도의 pepstatin A에 의해서 92-kD type IV collagenase의 활성이 현저히 억제되는 것으로 보아 92-kD type IV collagenase의 단백질 가수 분해 작용 기전에는 간접적으로 aspartic proteinase 활성과 상관성이 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

1) Van Wart HE, Mookhtiar KA : Biological Response Modifiers for Tissue Repair (Grotendorst, G., Hjelmeland, L. M., Gills, and J. P., eds), Portfolio, Woodlands, TX, 1990, 23-35
2) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI :H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J Biol Chem 263: 6579-6587, 1988
3) Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA, Goldberg GI : Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84(19): 6725-6729, 1987
4) Saus J, Quinones S, Otani Y, Nagase H, Harris ED, Kurkinen M : The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. Identity with stromelysin. J Biol Chem 263: 6742-6745, 1988
5) Whitham SE, Murphy G, Angel P, Rahmsdorf HJ, Smith BJ, Lyons A, Harris TJ, Reynolds JJ, Herrlich P, Docherty AJ : Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. Biochem J 240: 913-916, 1986
6) Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL : Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem 265: 11421-11424, 1990
7) Devarajan P, Mookhtiar K, Van Wart H, Berliner N : Structure and expression of the cDNA encoding human neutrophil collagenase. Blood 77: 2731-2738, 1991
8) Netzel-Arnett S, Sang Q, Moore WGI, Navre M,Birkedal-Hansen H and Van-Wart HE:Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and pump (matrilysin). Biochemistry 32: 6427-6432, 1993
9) Collier IE, Smith J, Kronberg A, Bauer EA, Wilhem SM, Eizen AZ and Goldberg GI : The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. J Biol Chem 263(22): 10711-10713, 1988
10) Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberg A, Bauer EA, Grant GA and Eisen AZ : Human fibroblast collagenase: complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. J Biol Chem 261(14) : 6600-6605, 1986
11) Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens DG and Mainardi CL : Human neutrophil collagenase: a distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem 265(20) : 11421-11424, 1990
12) Salo T, Lyons G, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H and Larjava H : Transforming growth factor-β1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. J Biol Chem 266(18) : 11436-11441, 1991
13) Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH and Mainardi CL : Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. J Biol Chem 260(4) : 2493-2500, 1985
14) Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH : Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophage. J Clin Invest 80 : 1644-1650, 1987
15) Bernhard EJ, Muschel RJ and Hughes EN : Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. Cancer Res 50 : 3872-3877, 1990
16) Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA and Goldberg GI : Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 6725-6729, 1987
17) Murphy G, Cockett MI, Ward RV and Docherty AJP : Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. Biochem J 277 : 277-279, 1991
18) Harris ED and Krane SM : An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. Biochim Biophys Acta 258 : 566-576,1972
19) Sopata I and Dancewicz AM : Presence of gelatin-specific proteinase and its latent form in human leukocytes. Biochim Biophys Acta 370 : 510-523, 1974
20) Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U and Baggiolini M : Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leukocytes. Biochem J 203 : 209-221, 1982

21) Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I and Tryggvason K : High expression of 92-kD type IV collagenase (Gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. J Cell Biol 124(6): 1091-1102, 1994
22) Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD and Stetler-Stevenson WG : Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. J Natl Cancer Inst 83: 775-779, 1991
23) Moll UM, Youngleib GL, Rosinski KB and Quigley JP : Tumor promoter- stimulated Mr 92,000 gelatinase by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. Cancer Res 50:6162-6170,1990
24) Bernhard EJ, Muschel RJ and Hughes EN : Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. Cancer Res 50: 3872-3877, 1990
25) Ehrich MG, Armstrong AL, Treadwell BV and Mankin HJ : Degradative enzyme system in cartilage. Clin Orthop 213 : 62-68, 1986
26) Ehrlich MG : Degradative enzyme system in osteoarthritic cartilage. J Orthop Res 3(2) : 170-184, 1985
27) Docherty AJP and Murphy G : The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. Ann Rheu Dis 49: 469-479, 1990
28) Lee DH and Kang K : Purification and characterization of human 92-kD type IV collagenase(Gelatinase B). Exp Mol Med 28(4): 161-165, 1996
29) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685, 1970
30) Zucker S, Wieman J, Lysik RM, Imhof B, Nagase H, Ramamurthy N, Liotta LA and Golub LM : Gelatin-degrading type IV collagenase isolated from human small cell lung cancer. Invasion Metastasis 9: 167-181, 1989
31) Bae S, Kim W, Kim K, Chang M and Kang K : Human neutrophil cathepsin G: in vivo synthesis of anti-HNCG antibody, inhibition of the activity of HNCGs and mechanism of inhibitions. Korean J of Pharmacology 27(2) : 145-153, 1991
32) Kim WM and Kang K : Inhibition of human neutrophil elastase by tetracyclines and mechanism of inhibition. Korean J of Pharmacology 29(1) : 131-137, 1993
33) Albini AD, Agostini F, Giunciuglio D, Paglieri I, Balansky R and De Flora S : Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcystine. Int J Cancer 61 : 121-129, 1995