

생쥐 배아에서 Heparin-Binding Epidermal Growth Factor가 MMP-9과 ATPase γ -subunit 유전자의 발현에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생명과학과¹, 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실²
홍석호^{1,2} · 나희영² · 이지윤² · 김정희² · 김정훈² · 채희동² · 강병문² · 김문규¹

Effects of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor on the Expression of MMP-9 and ATPase γ -subunit mRNA in the Mouse Embryo

Seok Ho Hong^{1,2}, Hee Young Nah², Ji Yun Lee², Jung Hee Kim², Chung Hoon Kim²,
Hee Dong Chae², Byung Moon Kang², Moon Kyoo Kim¹

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University¹; Department of Obstetrics
and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center², Seoul, Korea*

Objectives: The purpose of this study was to evaluate effects of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) on the rate of blastocyst formation and hatching in the mouse embryos and the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and ATPase γ -subunit mRNA.

Methods: Late 2-cell mouse embryos was cultured for 72 hours in HTF medium containing with 1, 10, and 100 ng/ml HB-EGF. The mRNA expression level of MMP-9 and ATPase γ -subunit was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: The rate of hatching was significantly higher ($p < 0.05$) in group containing with 1 ng/ml HB-EGF than other groups. Also, the rate of hatched blastocyst was significantly higher ($p < 0.05$) in 10 ng/ml. The mRNA expression level of MMP-9 mRNA was not shown any difference among groups, but ATPase γ -subunit was higher than other groups.

Conclusions: Taken together these results suggest that HB-EGF has the positive effect to promote the blastocyst formation and hatching process and influences the blastocoel expansion by promoting the ATPase mRNA expression in the mouse embryos.

Key Words: ATPase γ -subunit, Blastocoel, HB-EGF, MMP-9, RT-PCR

착상기간 동안 배아의 정상적인 발생과 배아를 받아들이는 자궁간의 시공간적인 일치성 (synchronization)은 성공적인 착상을 위한 필수적인 요소이다. 이 시기에는 배아와 모체의 자궁간에 신호전달물질에 의한 상호작용이 이루어지며, 이에 관여하는 다양한 신호전달물질의 구조와 기능이 밝혀지고 있다.

그 중 EGF 족에 해당되는 heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF)는 착상과 포배로의 발생에

중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{1,2}

HB-EGF는 insoluble transmembrane과 soluble paracrine 형태로 존재하고 EGF 수용체에 결합하여 세포 내 신호전달 기작에 영향을 미친다. 생쥐의 경우 adheresion이 일어나기 6~7시간 전에 자궁내막의 apposition 부위에서만 발현되며,¹ 가임신시킨 자궁에서는 HB-EGF가 발현하지 않는 것으로 보아 배아 자체에서 자궁의 HB-EGF 발현을 유도하는 물질이 있는 것

본 연구는 2000년도 한양대학교 교내 연구비에 의하여 이루어진 것임.

으로 추측되고 있다. 한편 생쥐의 경우 배양액내에 HB-EGF를 첨가하여 배아를 배양할 경우 포배기 배아의 세포수가 증가하고 부화를 촉진시키는데 반면,¹ 흰쥐와 사람의 경우에는 부화를 촉진시키지만 세포수의 증가는 유도하지 않는다.³⁴ 또한 사람의 경우 생리주기의 proliferative phase에서는 소량의 HB-EGF mRNA가 stroma에서만 국소적으로 발현하다가 mid-secretory를 지나 착상시기에 이르면 다량의 HB-EGF mRNA가 자궁내막세포에서 발현하게 된다.⁵⁶

이러한 결과들로 보아 HB-EGF가 착상기간 동안에 중요한 역할을 하며, 배아의 발생과 부화작용에도 영향을 주는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 HB-EGF가 생쥐의 착상전 초기발생과정 동안에 발생율과 부화율 그리고, 착상과 포배형성 기작에 관여하는 물질로 알려진 MMP-9과 ATPase γ -subunit 유전자의 발현에 미치는 영향을 실험하였다.⁷⁻⁹

연구대상 및 방법

1. 배아의 수획

본 실험에서는 명 14시간, 암 10시간으로 광주기가 조절되고, 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 생쥐 (ICR starin)를 사용하였다. 암컷은 생후 8~10주, 수컷은 10~12주된 것을 사용하였다.

배아를 수획하기 위해 암컷 생쥐의 복강에 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 주사하고 48시간 후에 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 주사하여 과배란을 유도한 뒤, 건강한 수컷과 교미시켰다. 다음날 아침 질전을 통하여 교미 여부를 확인하였고, hCG 주사 후 48시간에 경추과피로 도살하여 복부질개 후 수란관을 적출하였다. 후기 2-세포기 배아를 수획하기 위해 해부현미경하 (SZ-40, Olympus)에서 배양액을 수란관으로 관류 (flushing)하는 방법으로 수획하였다.

2. 배아의 배양

수획한 배아는 배양접시 (60×15 mm, Falcon) 위에 배양액 방울 (50 μ l)을 만들고 그 위에 light mineral oil (Sigma)을 덮어 37°C, 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 (TC-2323, Sheldon) 내에서 배양하였다.

기본배양액으로는 5% SSS (Synthetic serum substitute, Irvine)가 첨가된 HTF를 사용하였으며, 실험군으로는 각각 1, 10, 100 ng/ml 농도로 HB-EGF가 함유된 배양액을 이용하였고, 대조군은 HB-EGF를 함유하지 않은 배양액으로 하여 수획한 후기 2-세포기 배아를 옮긴 후 72시간 동안 배양하였다.

3. 발생정도 관찰 및 할구수 계수

각각의 농도에서 72시간 동안 배양된 배아는 포배강의 형성과 부화정도에 따라 아래와 같이 구분하여 관찰하였다. 포배강이 배아의 절반 이하인 경우 (A), 포배강이 배아의 절반 이상인 경우 (B), 팽창된 포배기 배아 (C), 부화중인 포배기 배아 (D), 부화된 포배기 배아 (E)로 구분하여 관찰하였다.

발생양상 관찰 후 대조군과 실험군의 일부 배아를 대상으로 할구수를 계수하였다. 계수할 배아는 0.1% glutaraldehyde (Sigma)로 24시간 동안 고정된 후 1 μ g/ml bis-benzimide trihydrochloride (Hoechst 33342, Sigma)에 15분 동안 핵을 염색하는 방법으로 형광현미경 (BX-40, Olympus)을 이용하여 계수하였으며, 60개 이하의 할구를 가진 배아는 통계처리시 제외하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응

반응에 사용한 모든 기구는 0.1% diethyl-pyrocabonate (DEPC, Sigma)가 처리된 3차 증류수로 수세, 멸균하여 사용하였다. HB-EGF를 처리한 배양액에서 96시간 동안 배양된 배아를 수획하여 Ca²⁺, Mg²⁺이 없는 phosphate buffered saline (PBS)에 수세한 후 1.5 ml micro centrifuge tube에 옮겼다. 이후 일정량의 TRIzol (Gibco BRL)을 tube에 넣어 -70°C에 보관하였다. Total RNA를 분리한 후 역전사 반응 (reverse transcription)을 수행하였으며, 역전사 반응에는 각각 30개의 배아에서 추출한 total RNA를 가지고 수행하였다.

중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction)은 fidelity가 검증된 시발체를 사용하였으며 (Table 1),^{9,19,20} 기본적인 반응 program은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 과정을 거친 후, 94°C에서 45초간 denaturation, 54°C에서 45초간 annealing, 그리고 72°C에서 45초간 extension을 한 주기로 수행하였으며, 마지막에는 72°C로 10분간 extension 과정을 수행하였다. 반

Table 1. Primers used for RT-PCR and the size of their amplification products

Gene	Primer sequence	Position on cDNA	Fragment size (bp)	Reference
β-actin	5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	24 ~ 45	539	Rappolee et al., 1992
	3' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC	541 ~ 564		
MMP-9	5' AGGCCTCTACAGAGTCTTTG	1581 ~ 1600	824	Mark et al., 1996
	3' CAGTCCAACAAGAAAGGACG	2386 ~ 2405		
ATPase γ-subunit	5' CCCTTCGAGTACGACTATGA	28 ~ 47	134	Jones et al., 1997
	3' TTGACCTGCCTATGTTTCTT	142 ~ 161		

Table 2. Effects of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) on cavity formation and hatching of mouse embryos which were treated at late 2-cell stage

Treatment	No. of embryos	No. (%) of embryos (post hCG 120 hrs)				
		A	B	C	D	E
Control	198	3 (2.5)	25 (12.0)	55 (28.3)	71 (38.1)	21 (10.3)
1 ng/ml	211	2 (1.5)	32 (12.0)	53 (22.9)	85* (45.1)	25 (12.8)
10 ng/ml	210	0 (0.0)	34 (15.0)	62 (28.7)	77 (37.3)	27* (15.1)
100 ng/ml	206	2 (0.7)	38 (17.1)	57 (26.4)	75 (37.0)	20 (12.2)

Degenerated embryos are not shown in this table. Abbreviation: A, Cavity less than half volume; B, Cavity greater than half volume; C, Fully expanded; D, Hatching blastocyst; E, Hatched blastocyst. *: Significantly different from control ($p < 0.05$). Values are obtained from five different experiments.

응이 끝난 생성물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium-bromide (1 μg/ml, Sigma)에 15분간 염색하여 UV light 하에서 결과를 관찰하였다. PCR 반응에서 cDNA의 존재를 확인하고 동량의 RNA로부터의 상대적인 양을 비교하기 위해 β-actin의 발현을 positive control로 사용하였다. 상대적인 ATPase γ-subunit와 MMP-9 mRNA의 발현정도를 측정하기 위해 전기영동한 결과를 densitometer (Quantity One, BIO-RAD)를 통해 측정하였다.

5. 유의성 검증

배아의 발생율과 할구수에 대한 유의성 검증은 Kolmogoror-Smirnov test 및 analysis of variance (ANOVA)로 하였고, 이때 $p < 0.05$ 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 포배형성과 부화에 미치는 HB-EGF의 효과

후기 2-세포기 배아를 수확하여 각각 1, 10, 100 ng/ml 농도로 HB-EGF가 첨가된 배양액을 실험군으로 하였고, 대조군으로는 HB-EGF가 첨가되지 않은 배양액으로 하여 72시간 동안 배양하였다. 포배형성과 부화가 진행되는 형태학적인 구분은 포배강의 형성과 부화정도에 따라 다음과 같이 분류하였다. 포배강이 배아의 절반 이하인 경우 (A), 포배강이 배아의 절반 이상인 경우 (B), 팽창된 포배기 배아 (C), 부화중인 포배기 배아 (D), 부화된 포배기 배아 (E)로 구분하여 관찰하였다. 1 ng/ml로 처리된 군에서 부화중인 포배기 배아의 비율이 45.1%로 대조군의 38.1%에 비해 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$), 10 ng/ml로 처리된 군에서는 부화된 포배기 배아의 비율이 15.1%로 대조군의 10.3%에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나 전체적으로는 실험군과 대조군 사

Table 3. The rate of blastocyst formation and hatching of mouse embryos cultured in medium (HTF) alone and in the presence of 1, 10 and 100 ng/ml HB-EGF

	Post hCG 120 hrs			
	HTF	HTF + HB-EGF (1 ng/ml)	HTF + HB-EGF (10 ng/ml)	HTF + HB-EGF (100 ng/ml)
% Blastocyst	91.0	94.7	94.6	93.7
% Blastocyst hatching	48.3	57.9*	42.3	49.2

Abbreviation: HTF, Human tubal fluid; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor. *: Significantly different from the control ($p < 0.001$). Values are obtained from five different experiments.

Table 4. Cell number of blastocyst cultured in medium alone and in the presence of 1, 10 and 100 ng/ml HB-EGF

Treatment	Mean cell number
Control	82.5±14.6
1 ng/ml	91.7±9.2
10 ng/ml	82.3±10.5
100 ng/ml	89.4±20.9

Cell counts performed at 120 hr post hCG using Hoechst staining. Embryos with <60 cells excluded from calculation of mean cell number.

이에 포배형성과 부화정도에 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

각 대조군과 실험군간의 포배형성율은 유의한 차이를 나타내지 않았고, 부화율에 있어서는 1 ng/ml로 처리된 군에서는 57.9%로 대조군의 48.3%에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 전체적으로 대조군에 비해 실험군에서 포배형성율과 부화율이 증가되는 것으로 보이며, 10 ng/ml 이상의 농도로 HB-EGF가 함유된 배양액에서는 대조군에 비해 뚜렷하게 증가하는 양상을 보이진 않았다 (Table 3).

2. 포배기 배아의 할구수 비교

후기 2-세포기 배아를 72시간 동안 배양한 후 각각의 군에서 할구를 계수할 배아를 선별하였다. 우선 0.1% glutaraldehyde에서 24시간 동안 고정된 후 1 µg/ml bis-benzimide trihydrochloride (Hoechst 33342)에 15분 동안 핵을 염색하는 방법으로 계수하였으며, 이때 60개 이하의 할구를 가진 포배기 배아는 제외하였다.

포배형성과 부화율이 가장 높은 1 ng/ml로 함유된

실험군에서의 할구수가 91.7±9.2로 대조군의 82.5±14.6에 비교하였을 때 가장 높았지만 통계적 유의성은 없었고, 다른 실험군에서는 대조군과 비슷한 할구수를 나타내었다.

3. MMP-9과 ATPase γ -subunit mRNA의 발현에 미치는 HB-EGF의 영향

생쥐의 착상기간 동안에 자궁의 remodeling 효과를 유도하는 MMP-9과 포배강 형성을 유도하여 부화를 촉진시키는 것으로 알려진 ATPase γ -subunit의 발현에 HB-EGF가 어떤 영향을 미치는지 알기 위해 internal control로 사용한 β -actin mRNA의 상대적인 발현량과 비교하였다. MMP-9의 경우 대조군과 비교해 볼 때 실험군간의 농도에 따른 발현량도 거의 유사하였다. ATPase γ -subunit mRNA의 경우에는 대조군과 비교해 볼 때 HB-EGF를 처리한 군에서 대체적으로 많은 양의 전사물이 발현하였으며, 특히 할구수와 부화율이 가장 높았던 1 ng/ml로 처리한 군에서 가장 많은 양의 전사물이 발현되었다.

고 찰

체외에서 배양되는 배아의 발생에 미치는 growth factor와 cytokine의 효과는 Vero cell, 수란관상피세포, 자궁내막세포 등의 공배양실험을 통해 간접적으로 증명되어 왔다.¹⁰⁻¹² 그 대표적인 예로써 Leukemia inhibitory factor (LIF), insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-6 (IL-6) 등이 있으며, 이들은 체외배양시 생쥐와 사람의 초기 배아발생과 포배형성을 촉진시

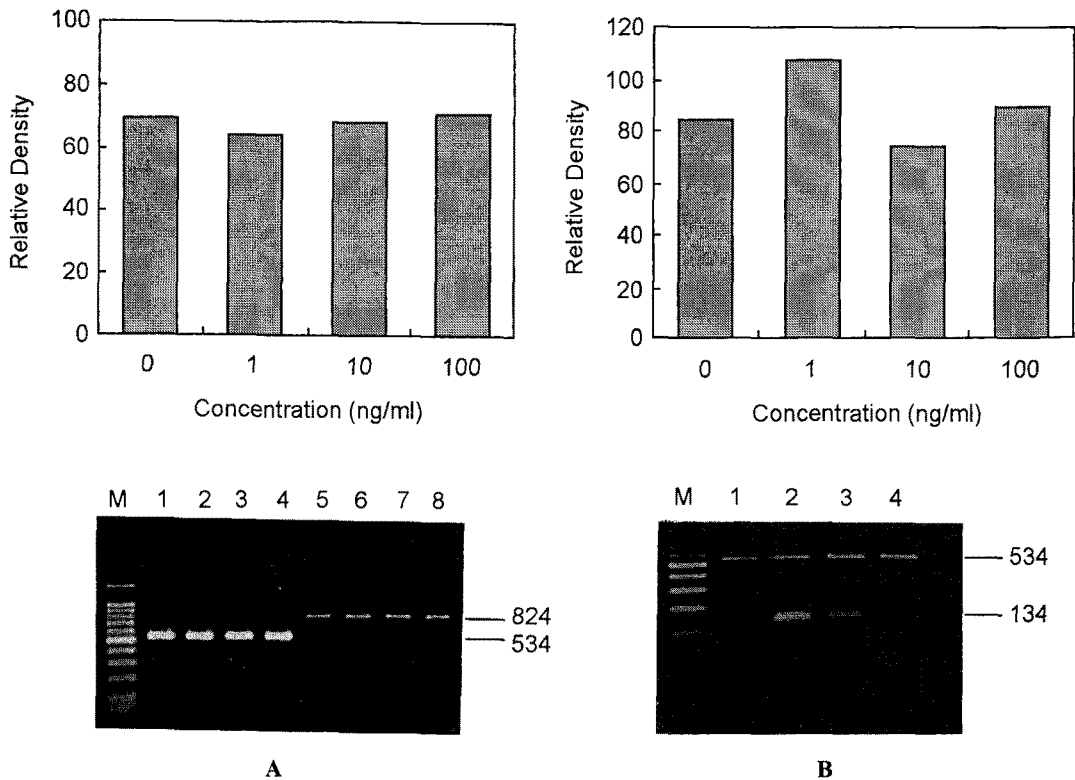


Figure 1. Analysis of MMP-9 (A) and ATPase γ -subunit (B) mRNA expression level in the mouse embryos treated with HB-EGF. M, 100 bp ladder; Lane 1~4, β -actin (539 bp); Lane 5~8, MMP-9 (824 bp); ATPase γ -subunit (134 bp).

킨다는 보고들이 있다.¹³⁻¹⁵

그중 EGF 족에 해당되는 heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) 또한 배아의 발생과 포배형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹² 본 실험에서 각각 1, 10, 100 ng/ml의 농도로 HB-EGF를 배양액에 첨가하여 생쥐의 후기 2-세포기 배아를 72시간 동안 배양한 후 포배형성율과 부화율을 관찰한 결과 포배형성율은 군간의 차이가 없었으나, 부화율은 1 ng/ml로 처리한 실험군에서 유의하게 높게 나타났다 (Table 3). 또한 포배기 배아의 세포수 또한 대조군에 비해 1 ng/ml로 처리한 실험군에서 증가하였지만 (82.5 ± 14.6 vs 91.7 ± 9.2) 유의성은 없었다 (Table 4). 이러한 결과는 농도의존적이 아닌 특정한 농도에서 가장 높은 부화율과 세포수의 증가를 나타냄을 의미하며, 오히려 고농도로 처리한 실험군에서의 부화율과 세포수가 대조군에 비해 비슷하거나 혹은 다소 낮게 나타나는 것은 HB-EGF 수용체의 down-regulation에 의한 desensitization 효과라고 사료

된다.¹⁶

착상시기에 있어서 모체의 자궁과 배아로부터 분비되는 growth factor는 autocrine 또는 paracrine 작용에 의해 착상에 영향을 주는 물질들을 합성, 분비시킨다. 그중 matrix metalloproteinase는 LIF와 EGF에 의해 합성, 분비되어 자궁의 기질을 분해하여 착상에 도움을 주는 역할을 한다고 알려져 있다. 한편 포배강 형성 기작에 있어서도 TGF- α 와 EGF 등의 growth factor가 cAMP의 증가와 sodium의 흡수를 촉진시켜 포배강 형성과 배아의 팽창에 관여한다고 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸ 따라서 배양액에 HB-EGF를 처리하였을 때 배아에서 발현되는 MMP-9과 포배강 형성에 관여하는 것으로 알려진 ATPase γ -subunit mRNA의 발현에 어떠한 영향을 주는지 실험하였다.

각각 1, 10, 100 ng/ml로 처리된 배양액에서 72시간 동안 배양한 후 유전자의 발현정도를 RT-PCR을 통해 관찰한 결과 MMP-9은 대조군과 실험군간의 차이가 거의 없었으나, ATPase γ -subunit의 경우는 1 ng/

ml로 처리된 실험군에서 증가하는 것으로 관찰되었다 (Figure 1). MMP-9의 경우에는 포배를 형성하거나 부화중인 시기에는 모체나 배아 자체로부터 분비되는 growth factor에 의해 크게 영향을 받지 않고, 배아의 부착 또는 침습과정이 이루어지는 동안 모체와의 직접적인 상호작용을 통해 유전자의 활성이 증가되는 것으로 대개 알려져 있다. ATPase γ -subunit는 주로 포배기 배아의 trophoctoderm에서 발현되어 포배강 형성을 촉진시키는 역할을 한다. 실험 결과 1 ng/ml의 농도로 처리된 실험군에서 HB-EGF는 inner cell mass 보다는 trophoctodermal cell의 증가와 더불어 ATPase γ -subunit 유전자의 발현량을 증가시킴으로써 포배강 형성을 촉진시키는 것으로 추측된다.

이상의 결과로 보아 HB-EGF는 생쥐 초기배아의 발생에 있어서 cell differentiation 보다는 proliferation을 촉진시켜 세포수의 증가와 함께 ATPase γ -subunit 유전자의 발현량을 증가시킴으로써 부화율을 높이는 데 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 하지만 다른 growth factor나 cytokine에 비교하면 그다지 발생에 있어서 큰 효과를 나타내지 않는 것으로 사료되며, 착상전 보다는 착상 이후에 더 중요한 역할을 하는 것으로 제안된다.

참 고 문 헌

1. Das SK, Wang X, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Michael K, Andrews GK, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994; 120: 1071-83.
2. Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 1996; 122: 637-45.
3. Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T. The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pre-implantation-embryo development and implantation in the rat. *Life Sci* 1999; 64: 1967-73.
4. Martin KL, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 1998; 13: 1645-52.
5. Birdsall MA, Hopkinson JF, Grant KE. Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 31-4.
6. Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet* 1997; 21: 102-8.
7. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edward DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryo is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development* 1995; 121: 1005-14.
8. Sharkey ME, Adler RR, Nieder GL, Brenner CA. Matrix metalloproteinase expression during mouse peri-implantation development. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 72-80.
9. Jones DH, Davies TC, Kidder GM. Embryonic expression of the putative γ subunit of the sodium pump is required for acquisition of fluid transport capacity during mouse blastocyst development. *J Cell Biol* 1997; 139: 1545-52.
10. Menezo Y, Guerin J, Czyba J. Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayer of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 301-6.
11. Bongso A, Ng S, Ratnam S. Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990; 5: 893-900.
12. Desai N, Goldfarb J. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil Steril* 1991; 61: 760-6.
13. Morishege K, Kurachi H, Amemiya K. Menstrual stage-specific expression of epidermal growth and transforming growth factor-alpha in human oviduct

- epithelium and their role in early embryogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 199-207.
14. Dunlison G, Barlow D, Sargent L. Leukemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos in serum-free medium. *Hum Reprod* 1996; 11: 191-6.
 15. Lighten A, Moore G, Winston R, Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998; 13: 3144-50.
 16. Dardik A, Schultz RM. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF. *Development* 1991; 13: 919-30.
 17. Manejawa F, Kaji E, Schultz RM. Development of activatable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for cyclic AMP in blastocoel formation. *Cell* 1986; 46: 95-103.
 18. Manejawa F, Schultz RM. Blastocoel formation in the mouse preimplantation mouse embryo: stimulation of sodium uptake by cAMP and role of cAMP-dependent protein kinase. *Devel Biol* 1989; 136: 560-3.
 19. Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z. Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes Dev* 1992; 6: 939-52.
 20. Mark ES, Richard RA, Gary LN, Carol AB. Matrix metalloproteinase expression during mouse peri-implantation development. *Development* 1996; 36: 72-80.
-