

## Gonadotropins, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 및 Ouabain이 황체막의 $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

구 본 속 · 김 인 교

(1987년 6월 30일 접수)

= Abstract =

### Effects of Gonadotropins, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ , and Ouabain on the $Ca^{++}$ -ATPase Activity in Luteal Membranes

Bon Sook Koo and Inkyo Kim

*Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine Seoul, Korea*

It has been reported that the luteal function may be regulated by the intracellular  $Ca^{++}$  level which may be adjusted partially by the high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase in luteal cell membranes. Then, one may expect that luteotropic and/or luteolytic agents, such as gonadotropins, prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) and ouabain, affect the intracellular  $Ca^{++}$  level.

In this present study, therefore, we examined the effects of luteinizing hormone (LH, or human chorionic gonadotropin, hCG),  $PGF_{2\alpha}$  and ouabain on the kinetic properties of the high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase in light membrane, heavy membrane, and microsomal fractions from the highly luteinized ovary.

LH (or hCG) increased the affinity and the  $V_{max}$  for  $Ca^{++}$  both in light membrane and heavy membrane.  $PGF_{2\alpha}$  increased the  $V_{max}$  in light membrane and decreased the  $K_m$  in heavy membrane for  $Ca^{++}$  at low concentration ( $5 \mu g/ml$ ). At higher concentration, however,  $PGF_{2\alpha}$  oppositely affected on kinetic properties, that shown at low concentration. Ouabain, a potent inhibitor of  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase, increased the  $K_m$  at high concentration ( $10^{-4} M$ ), however, decreased the  $V_{max}$  for  $Ca^{++}$  in light membrane at low concentration ( $10^{-6} M$ ). Also, ouabain increased the  $K_m$  for  $Ca^{++}$  in heavy membrane without changes in the  $V_{max}$  at both concentrations. It seems that LH and low dose of  $PGF_{2\alpha}$  increase the intracellular  $Ca^{++}$  level and cause in activation of  $Ca^{++}$ -ATPase, however, higher dose of  $PGF_{2\alpha}$  and ouabain inhibit directly  $Ca^{++}$ -ATPase activity and result in increase in intracellular  $Ca^{++}$  level.

According to the above results, we suggest that luteotropic and/or luteolytic agents regulate the luteal progesterone ( $P_4$ ) production through two different pathways; one is cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent and another is  $Ca^{++}$ -dependent. Intracellular  $Ca^{++}$  level regulated by the high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase may affect both pathways in a time-dependent fashion. LH (or hCG) acts on the luteal  $P_4$  production via both pathways. The initial step is  $Ca^{++}$  dependent, and the late step is cAMP dependent.  $PGF_{2\alpha}$  and ouabain increase the intracellular  $Ca^{++}$  concentration so that basal luteal  $P_4$  production is increased and LH-stimulated  $P_4$  production is inhibited by the inhibiting LH-dependent adenylate cyclase activity.

**Key Words:**  $Ca^{++}$ -ATPase activity, luteal membranes.

## 서 론

Ca<sup>++</sup>이외분비 및 내분비세포에서 stimulation-secretion coupling에 중요한 역할을 담당한다고 알려졌다(Douglas et al. 1967; Fleischer et al. 1972; Higuchi et al. 1976). 최근에 황체세포의 steroid 홀몬의 합성과 분비도 Ca<sup>++</sup>에 의해 조절되어 Ca<sup>++</sup>이 황체기능에 중요한 역할을 담당할 것이라는 사실이 보고되었다. 즉 황체세포에서 외부의 Ca<sup>++</sup>을 제거한 경우 황체화홀몬(luteinizing hormone, LH)에 의해 증가되는 progesterone(P<sub>4</sub>)의 합성이 감소되며(Higuchi et al. 1976; Veldhuis & Klase, 1982; Park et al. 미발표논문), 이와는 반대로 Na<sup>+</sup> ionophore인 monensin이나 Ca<sup>++</sup> ionophore인 A23187로 처리하여 세포내 Ca<sup>++</sup> 농도를 높였을 때 황체세포의 P<sub>4</sub> 합성이 억제된다는 보고(Dorflinger et al. 1984; Gore & Behrman, 1984)도 있다. 이와 같이 황체세포에서의 Ca<sup>++</sup>의 역할은 아직 확실하게 규명되지 않고 다만 황체기능과 세포내 Ca<sup>++</sup> 농도가 연관되어 있다고 추측할 뿐이다.

이러한 가설은 최근 황체기능에 영향을 주는 gonadotropins, prostaglandin F<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>) 및 ouabain등이 황체세포내 Ca<sup>++</sup> 농도를 변화시킴으로써 그 기능을 나타낼 것이라는 보고들에 의해 더욱 뒷받침되고 있다. 즉 LH는 Ca<sup>++</sup>이 존재할 때 P<sub>4</sub>의 생산을 더욱 촉진하며(Higuchi et al. 1976; Veldhuis & Klase, 1982), PGF<sub>2α</sub>는 in vitro에서 P<sub>4</sub>의 basal 생산은 증가시키나(Park et al. 미발표논문) LH에 의해 증가되는 P<sub>4</sub> 합성은 감소시키며(Thomas et al. 1978) 이는 Ca<sup>++</sup>의 이동과 연관되어 있다고 한다(Leung, 1985; Leung et al. 1986). Ouabain 역시 in vivo와 in vitro 모두에서 황체세포의 P<sub>4</sub>와 20α-dihydroxyprogesterone(20α-DHP)의 basal 생산은 증가시키나(Kim et al. 1986; Park et al. 미발표논문) LH에 의해 증가되는 P<sub>4</sub>의 합성은 감소시키는데(Gore & Behrman, 1984; Kim et al. 1986) 그 기전은 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated, Mg<sup>++</sup>-dependent adenosine triphosphatase(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase)의 억제로 오는 세포내 Na<sup>+</sup> 농도의 증가가 이차적으로(Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> 교환에 의해) 세포내

Ca<sup>++</sup>농도를 증가시키기 때문일 것이라고 알려졌다(Dorflinger et al. 1984).

이와같이 LH, PGF<sub>2α</sub> 및 ouabain이 황체세포내의 Ca<sup>++</sup>농도를 변화시킨다면 이들 약물 및 홀몬에 의해 황체세포내 Ca<sup>++</sup>농도 조절기구들이 영향을 받을 것이라는 것을 예상할 수 있다. 세포내 Ca<sup>++</sup>농도는 mitochondria나 endoplasmic reticulum(microsome분획)내로의 Ca<sup>++</sup>-stimulated-Mg<sup>++</sup>-dependent adenosine triphosphatase(Ca<sup>++</sup>-ATPase)에 의한 Ca<sup>++</sup> 저장과(Moore & Pastan, 1978) 세포막에 있는 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>교환(Van Breeman et al. 1978; Lee & Clusin, 1987) 및 세포막의 Ca<sup>++</sup>-ATPase에 의한 세포외로의 Ca<sup>++</sup>배출(Verma & Penniston, 1981; Choi et al. 1986) 등에 의해 조절되는데 본 실험에서는 우선 세포내 microsome 분획과 세포막의 Ca<sup>++</sup>-ATPase가 이들 약물 및 홀몬에 의해 어떤 영향을 받는지를 규명하였다.

황체세포막 및 microsome 분획에는 두종류의 Ca<sup>++</sup>-ATPase가 존재하며(Verma & Penniston, 1981; Choi et al. 1986), 그의 속도론적 및 물리화학적 성질이 부분적으로 밝혀짐에 따라 그중 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase가 황체세포내 Ca<sup>++</sup>농도조절에 중요한 역할을 담당할 것이라고 시사된 바 있다(Choi et al. 1986). 그러므로 본 실험에서는 황체화난소(highly luteinized ovary)로부터 light membrane, heavy membrane 및 microsome 분획을 분리하고 각 membrane의 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase의 활성도 및 그의 속도론적변수(kinetic parameters)에 LH, PGF<sub>2α</sub>, ouabain이 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

## 실 험 방 법

### A. 실험동물

생후 22~24일 된 미성숙 암컷쥐(Sprague-Dawley strain)에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma 회사제품) 50 IU를 피하로 주사하고 66시간후 다시 human chorionic gonadotropin(hCG, Profasi®, Serno사 제품) 25 IU를 주사하여, hCG를 주사한 날(Day 0)로부터 4일째 되는 날(Day 4)에 쥐

를 도살하여 대부분이 황체로 구성된 난소를 얻었다 (Bramley & Ryan, 1978). 실험동물은 빛이 조절된 상태(14L : 10D, lights on 0500-1900h)에서 사육하였다.

## B. 실험방법

**1. Light membrane, heavy membrane 및 microsome 분획의 조제 :** 각 membrane 분획은 Bramley & Ryan(1978, 1980a, 1980b)의 방법을 약간 변형한 Choi et al.(1986)의 방법을 이용하여 얻었다. 각 membrane 분획의 단백질량은 Lowry et al.(1951)의 방법으로 측정하였으며 표준단백질로 bovine serum albumin(Sigma 회사제품)을 사용하였다.

**2.  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도의 측정 :** ATPase의 활성도는 adenosine triphosphate(ATP)로부터 유리된 무기인산(Pi)을 Fiske & Subbarow(1925)의 방법으로 측정하여 단위 단백질과 분당 유리되는 무기인산의 양으로 나타내었으며 (nmole Pi/mg protein/min),  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성도는  $Ca^{++}$ 이 있는 조건에서의 활성도에서  $Ca^{++}$ 이 없는 조건하에서 측정된 활성도를 뺀 값으로 계산하였다.

반응액은 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid(EGTA), 10~30  $\mu$ g의 membrane분획, 여러농도의  $CaCl_2$ , 여러농도의 ATP 및 여러농도의 hCG (or LH),  $PGF_{2\alpha}$ , ouabain으로 구성되었다. 반응은 membrane분획을 37°C에서 일정시간 preincubation한 다음 ATP를 첨가함으로써 시작하였으며, 그로부터 30분이 경과한 후 trichloroacetic acid(TCA, 최종농도=7%)를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액내의 유리  $Ca^{++}$ 농도는  $Ca^{++}$ /EGTA 완충용액계를 이용하여 결정하였으며 이때 사용한 true association constant(K)는 Sillen & Martell(1971)이 얻은 값을 사용하였고 그 계산방법 및 apparent dissociation constant(K')는 이미 보고되었다(Choi et al. 1986).

황체세포내의  $Ca^{++}$ 농도는 주로 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase에 의해 조절된다고 하며 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase는 반응액내의 유리  $Ca^{++}$ 농도가 10  $\mu$ M 이하에서 활성화되므로(Verma &

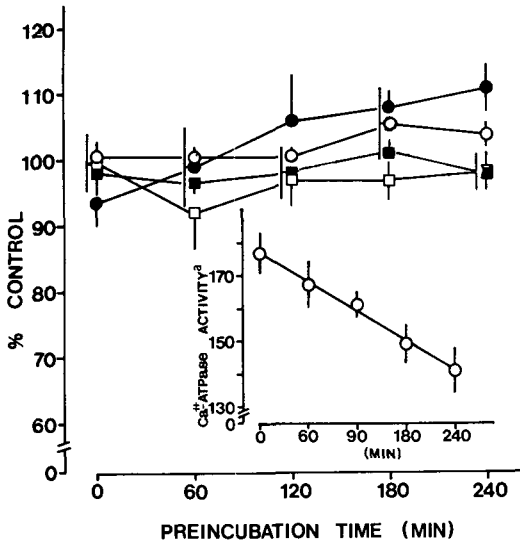
Penniston, 1981; Choi et al. 1986) 본실험에서 사용한 반응액내의 유리  $Ca^{++}$ 농도는  $2 \times 10^{-8}$  M ~  $2 \times 10^{-6}$  M사이이었다. 각 반응액내의 유리  $Ca^{++}$ 농도는 ( $10^{-7}$ M이상)  $Ca^{++}$ -selective electrode를 사용하여 재확인하였으며 이때 사용한  $Ca^{++}$ -selective electrode는 50 mM Tris, pH 7.4가 포함된  $Ca^{++}$ /EGTA완충용액과  $CaCl_2$ 로 표준화하였다.

## 실험성적

### A. Preincubation시간에 따라 LH, hCG, $PGF_{2\alpha}$ 및 ouabain이 황체 microsome분획의 high affinity $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 미치는 영향

분리된 microsome 분획의 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 LH, hCG,  $PGF_{2\alpha}$  및 ouabain이 미치는 영향을 조사하던 중 microsome분획을 약물 및 홀몬으로 전처리하지 않았을 때는  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도가 변하지 않는 것을 관찰하고(Fig. 1, preincubation time이 0분일 때) 이러한 약물 및 홀몬들이 membrane에 효과적으로 작용하기 위해서는 충분한 반응시간이 필요하다고 생각되어 preincubation 시간을 달리하면서  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도 및 이에 미치는 각 약물 및 홀몬의 영향을 조사하였다(Fig. 1).

우선 약물 및 홀몬을 첨가하지 않고 membrane을 preincubation하였을 때는 이 시간이 길어질수록 membrane분획의  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도는 감소하여 240분간 preincubation시에는 원래 활성도의 80%만을 나타내었으며(Fig. 1, insert) 이러한 현상은 약물 및 홀몬의 처리시에도 거의 동일하게 나타났다(그림 생략). Ouabain( $10^{-6}$ M)이나  $PGF_{2\alpha}$ (5  $\mu$ g/ml)은 240분간 전처리하여도 microsome 분획의  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 영향을 주지 않았으나 LH(1 ng/ml)나 hCG(5 IU/ml)로 120~180분간 전처리한 경우에는  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도가 대조군에 비해 증가하였다. 이러한 결과를 토대로 in vitro에서 hCG,  $PGF_{2\alpha}$  및 ouabain이 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 미치는 영향을 조사할 때는 preincubation 시간을 240분으로 고정하였다. 또 LH는 hCG와 황체에 동일한 효과를 나타내며 똑같은 수용체(receptor)에 동일한 affinity로 결합하고(Hichens et al. 1974)



**Fig. 1.** Changes in high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity of microsomal fractions after in vitro treatment of luteinizing hormone (LH, or human chorionic gonadotropin (hCG)), prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) or ouabain. Microsomal fractions from the highly luteinized ovary were preincubated with LH (1 ng/ml, ●), hCG (5 IU/ml, ○),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ■), ouabain ( $10^{-6}\text{M}$ , □) or vehicle (control, insert) for various periods in incubation medium.  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activities were then measured by adding 0.3 mM ATP after preincubation and were expressed as percent of control values at a certain preincubation period. Free  $\text{Ca}^{++}$  concentration in incubation medium was 1  $\mu\text{M}$  in all experiment. Insert illustrated that the time course change in  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity in control experiment during preincubation periods. Each point represents mean  $\pm$  SEM of 4–6 experiments.

이들이  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 활성도에 미치는 영향이 거의 동일하므로 (Fig. 1) 이후의 실험에서는 LH의 효과는 생략하였다.

**B. 각 membrane분획에서  $\text{Ca}^{++}$  농도에 따른 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase의 속도론적변수에 hCG,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  및 ouabain이 미치는 영향**

반응액내의 유리  $\text{Ca}^{++}$  농도를 변화시키며 각 membrane 분획을 hCG,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  및 ouabain으로 in vitro에서 240분간 전처리한 후  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 활성도를 측정하고 이를 Hofstee (1959) 방법으로 도사하여 (Fig. 2)  $\text{Ca}^{++}$ 에 대한 속도론적 변수를 조사하였다 (Table. 1).

우선 각 membrane 분획을 240분간 preincubation 하였을 때 약물 및 홀몬으로 전처리하지 않은 대조군에서는 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase의  $\text{Ca}^{++}$ 에 대한  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 preincubation을 하지 않았을 때에 비하여 모두 약간의 차이를 보였으나 (Choi et al. 1986) 그 양상은 거의 비슷하여  $K_m$ 은 heavy membrane에서 가장 컸고,  $V_{max}$ 는 light membrane에서 가장 컸으며 microsome 분획에서 가장 낮았다 (Table 1, 대조군).

Microsome 분획의 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase는 hCG,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  및 ouabain에 의해 affinity가 감소하였고,  $V_{max}$ 는 대체로 증가된 경향을 나타내었다 (Fig. 2A, Table 1). Light membrane의 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase는 (Fig. 2B, Table 1) 고농도의 ouabain ( $10^{-4}\text{M}$ )에 의해 affinity가 감소되고, hCG에 의해 affinity가 증가하였다. 그러나  $V_{max}$ 는 ouabain에 의해서는 거의 변화하지 않았고  $\text{PGF}_{2\alpha}$ 와 hCG에 의해서는 농도에 따라 상반된 양상을 보였다. 즉  $\text{PGF}_{2\alpha}$ 는 저농도 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서, hCG는 고농도 (100 IU/ml)에서  $V_{max}$ 가 증가되었다. Heavy membrane의 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase는 (Fig. 2C, Table 1) 고농도의 ouabain ( $10^{-4}\text{M}$ ), 저농도의  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 hCG에 의해 affinity는 증가된 반면  $V_{max}$ 는 고농도의 hCG (100 IU/ml)를 제외하고는 다른 약물들에 의해서는 변화를 보이지 않았다.

**C. 각 membrane 분획에서 ATP농도에 따른 high affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase의 속도론적 변수에 hCG,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  및 ouabain이 미치는 영향**

High affinity  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase의 활성도가 포화상태를 나타내는  $\text{Ca}^{++}$ 농도 (1  $\mu\text{M}$ ; Choi et al. 1986)에서 반응액내의 ATP농도를 변화시키며  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase

**Table 1.** Effects of human chorionic gonadotropin (hCG), prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) and ouabain on the kinetic parameters of high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase for free  $Ca^{++}$  in microsomal fractions, light membrane and heavy membrane from the highly luteinized ovary in rats

	Km <sup>a</sup> (nM)			Vmax <sup>a</sup> (nmole Pi mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )		
	M <sup>b</sup>	L <sup>b</sup>	H <sup>b</sup>	M	H	L
Control	7.03	16.16	37.50	171.66	383.90	346.82
hCG (5 IU/ml)	19.76	10.65	25.87	190.71	316.78	353.82
hCG (100 IU/ml)	20.19	10.77	30.11	200.52	451.23	391.94
$PGF_{2\alpha}$ (5 $\mu$ g/ml)	13.67	19.77	24.08	182.90	430.11	324.12
$PGF_{2\alpha}$ (100 $\mu$ g/ml)	14.79	15.60	49.92	174.84	333.14	346.86
Ouabain (10 <sup>-6</sup> M)	21.55	15.16	31.08	196.20	336.51	338.60
Ouabain (10 <sup>-4</sup> M)	19.85	23.41	23.34	190.88	381.07	331.50

a : Kinetic parameters (Km and Vmax) were calculated from the Hofstee plots shown in Fig. 2.

b : M, L and H represents microsomal fractions, light membrane and heavy membrane, respectively.

**Table 2.** Effects of human chorionic gonadotropin (hCG), prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) and ouabain on the kinetic parameters of high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase for ATP in microsomal fractions, light membrane and heavy membrane from the highly luteinized ovary in rats

K <sub>1/2</sub> <sup>a</sup>	( $\mu$ M)			Apparent Vmax <sup>a</sup> (nmole Pi mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )		
	M <sup>b</sup>	L <sup>b</sup>	H <sup>b</sup>	M	L	H
Control	44.27	48.29	15.62	107.61	360.13	523.15
hCG (5 IU/ml)	56.72	34.51	17.25	128.34	374.16	449.15
hCG (100 IU/ml)	54.33	33.51	—	128.82	371.57	—
$PGF_{2\alpha}$ (5 $\mu$ g/ml)	40.84	32.36	15.74	133.98	352.34	469.56
$PGF_{2\alpha}$ (100 $\mu$ g/ml)	39.73	38.41	32.92	127.93	368.45	412.57
Ouabain (10 <sup>-6</sup> M)	34.15	37.25	16.61	105.43	367.41	455.95
Ouabain (10 <sup>-4</sup> M)	37.94	38.53	16.43	124.94	387.16	449.99

a : Apparent Vmax was defined as a maximum  $Ca^{++}$ -ATPase activity in Fig. 3. K<sub>1/2</sub> was defined as the ATP concentration of half maximum activity and calculated from the intercept of x axis on the Hill's plot.

b : M, L and H represents microsomal fractions, light membrane and heavy membrane, respectively.

활성도를 측정된 결과 약물이나 홀몬으로 전처리하지 않은 각 membrane분획 모두에서 ATP농도가 300  $\mu$ M이상일 때 활성도가 억제되는 기질억제(substrate inhibition) 현상이 나타났다(Fig. 3A, B, and C, 대조군). 이러한  $Ca^{++}$ -ATPase의 ATP에 의한 기질억제 현상은 hCG,  $PGF_{2\alpha}$  및 ouabain으로

membrane을 전처리하였을 때 heavy membrane에서 가장 현저하여 100  $\mu$ M이상의 ATP농도에서 나타났다(Fig. 3C) microsome 분획에서 가장 미미하였다(Fig. 3A).

또한 각 membrane 분획에서 대조군의 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase의 ATP에 대한 K<sub>1/2</sub>은 heavy

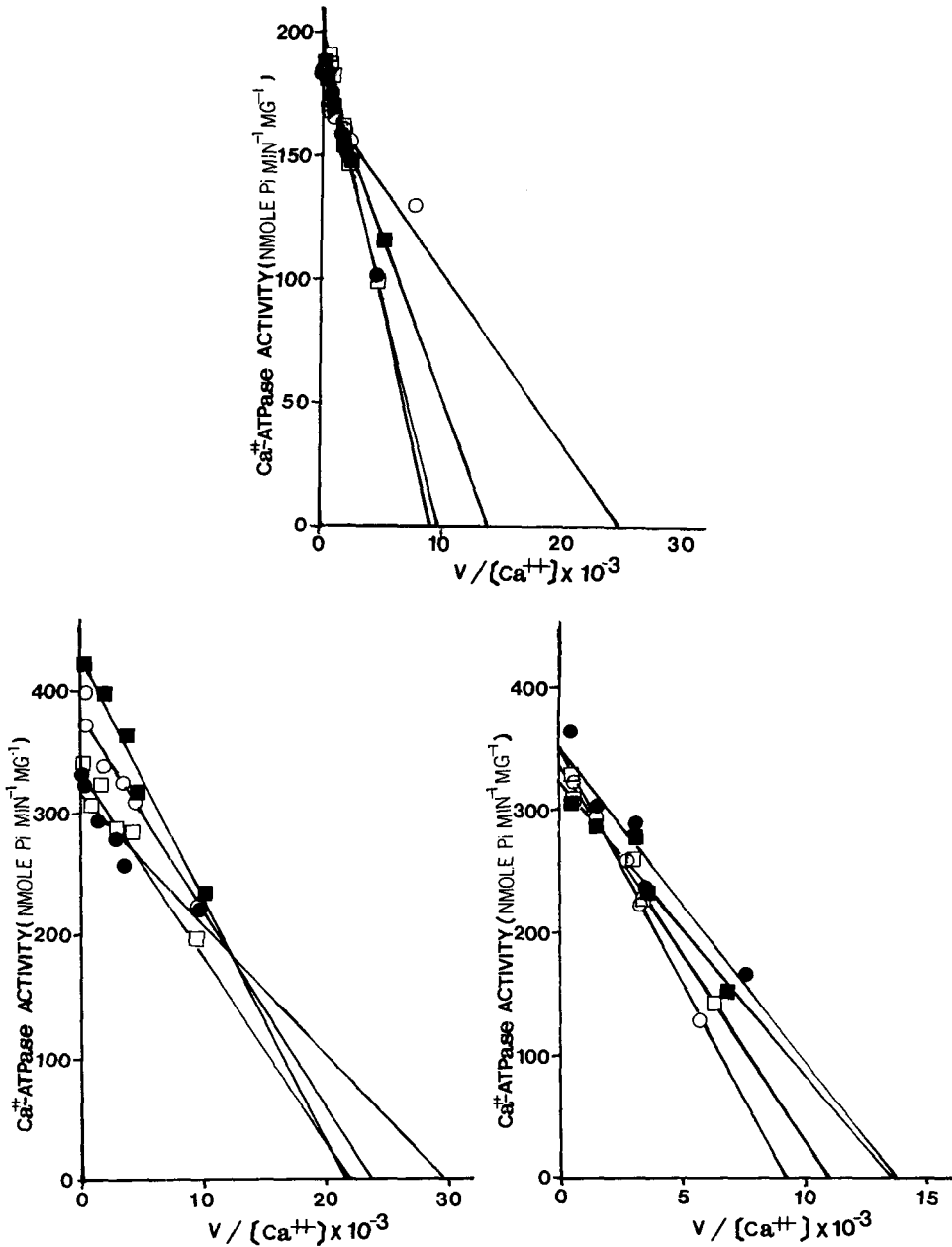


Fig. 2. Hofstee plots of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of microsomal fractions (A), light membrane (B), and heavy membrane (C) as a function of free Ca<sup>2+</sup> concentration in the incubation medium. Each membrane fraction was preincubated with hCG (5 IU/ml, ●), PGF<sub>2α</sub> (5 μg/ml, ■), ouabain (10<sup>-6</sup> M, □) or vehicle (control, ○) for 240 minutes in various free Ca<sup>2+</sup> concentrations (up to 2 × 10<sup>-6</sup> M) and then Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities were measured by adding 0.3 mM ATP. Each point represents mean ± SEM of 3 duplicated experiments.

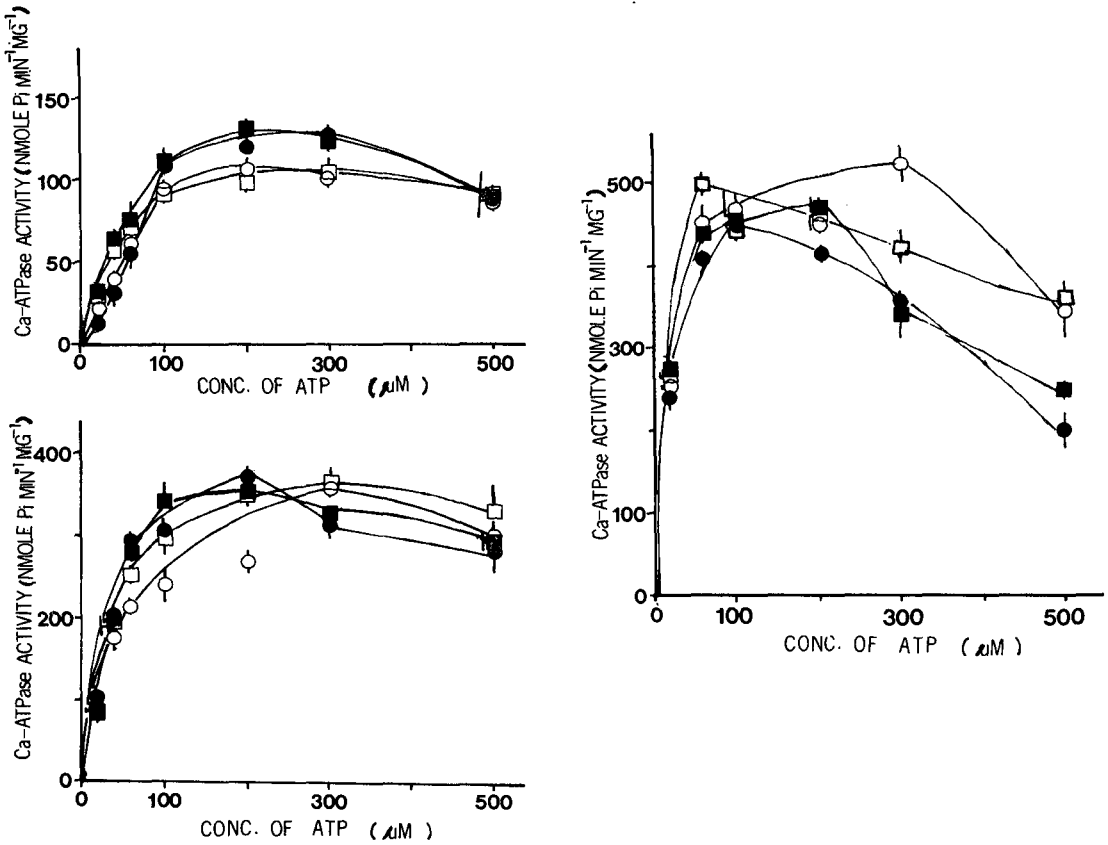


Fig. 3.  $Ca^{++}$ -ATPase activities of microsomal fractions(A), light membrane (B), and heavy membrane (C) as a function of ATP concentration in the incubation medium. Each membrane fraction was preincubated with hCG (5 IU/ml, ●),  $PGF_{2\alpha}$  (5  $\mu$ g/ml, ■), ouabain ( $10^{-6}$  M, □) or vehicle (control, ○) for 240 minutes in 1  $\mu$ M free  $Ca^{++}$  medium and then  $Ca^{++}$ -ATPase activities were measured by adding various concentration of ATP (20  $\mu$ M – 500  $\mu$ M). Each point represents mean  $\pm$  SEM of 3 duplicated experiments.

membrane에서 가장 낮았으며 apparent  $V_{max}$ 는 heavy membrane에서 가장 컸고 microsome 분획에서 가장 낮았다(Table 2). 그러나 이 성적들은 membrane을 preincubation하지 않은 상태에서 얻은 Choi et al.(1986)의 성적과 매우 달라  $K_{1/2}$ 은 전체적으로 preincubation한 후 낮아졌고  $V_{max}$ 도 매우 감소하였다.

Microsome 분획의 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase는 ouabain에 의해  $K_{1/2}$ 의 감소,  $PGF_{2\alpha}$ 에 의해  $V_{max}$ 의 증가, hCG에 의해서는  $K_{1/2}$ 과  $V_{max}$ 가 모두 증가되었다(Fig. 3A, Table 2). Light membrane에서는 각 약물 및 홀몬에 의해  $K_{1/2}$ 은 감소되었으나  $V_{max}$ 는 변

화가 없었고(Fig. 3B, Table 2), heavy membrane에서는  $K_{1/2}$ 이 고농도의  $PGF_{2\alpha}$ (100  $\mu$ g/ml)에서 증가되는 것 이외에는 각 약물 및 홀몬에 의해  $K_{1/2}$ 은 변화없이  $V_{max}$ 는 감소되었다(Fig. 3C, Table 2).

## 고 찰

본 실험은 황체세포에서 steroid합성 및 분비를 조절하는 여러 약물 및 홀몬이 황체세포내의  $Ca^{++}$  농도를 조절하는 것으로 알려진 황체세포막과 microsome 분획의 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase(Verma & Penniston, 1981; Choi et al. 1986)에 미치는

영향을 조사함으로써 세포내  $Ca^{++}$  농도의 변화와 이미 알려진 약물 및 홀몬에 의한 steroid 합성능력을 비교하고자 한 실험이다.

황체세포에서 LH에 의해 증가되는  $P_4$  합성은 세포외부에  $Ca^{++}$ 이 존재하거나(Higuchi et al. 1976),  $Ca^{++}$  ionophore인 A23187로 처치시 더욱 증가하는 것으로 보아(Veldhuis & Klase, 1982)  $P_4$  합성에는 cyclic adenosine triphosphate (cAMP)뿐만 아니라 다른 요소, 즉  $Ca^{++}$ 이 secondary messenger로 관여하리라는 것이 제시되어 왔다. 즉 소의 황체에서 LH에 의한  $P_4$  합성 증가기전은 LH에 의한 inositol 1, 4, 5-triphosphate ( $IP_3$ ) 형성의 증가(Davis, 1986) 및 그에 따른 세포내  $Ca^{++}$ 이동의 증가(Joseph et al. 1984; Hokin, 1985)가 난소에 존재하는  $Ca^{++}$ -dependent protein kinase C를 활성화시키며(Kishimoto et al. 1980; Kuo et al. 1980; Davis & Clark, 1983) 이는 steroid홀몬 합성에 관여하는 단백질을 phosphorylation시킴으로써(Maizels & Jungmann, 1982), 혹은 secretory granule로부터  $P_4$  분비를 촉진시킴으로써(Gemmel et al. 1974; Brunswig et al. 1986) 이루어질 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이와는 반대로 세포내  $Ca^{++}$  농도가 너무 높아지면 basal 및 LH에 의해 증가되는  $P_4$  합성은 억제된다는 보고도 있으며 이는  $Ca^{++}$ 이 adenylate cyclase를 억제하기 때문이라고 한다(Dorflinger et al. 1984; Gore & Behrman, 1984). 그러므로 황체세포에서 LH에 의해 증가되는  $P_4$  합성은 각기 다른 두과정 즉 cAMP-dependent 과정과  $Ca^{++}$ -dependent 과정에 의해 각각 조절되거나 혹은 상호작용으로 조절된다고 말할 수 있다.

LH를 황체세포에 in vitro 혹은 in vivo로 처치하면 15~30분이내에  $P_4$  합성이 증가되고, 60~90분에 최대효과가 나타나는데(Kim & Greewald, 미발표논문) 이는 위에서 설명한대로 세포내  $Ca^{++}$  혹은 cAMP가 증가되어  $P_4$  합성이 증가되기 때문이다. 그러나 in vitro에서 황체세포를 오랜시간 LH에 노출시키면 세포내  $Ca^{++}$  농도증가에 따른 adenylate cyclase 활성도의 감소를 막기 위해 세포내  $Ca^{++}$  농도를 낮게 유지하는 system, 즉 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase가 활성화되어(Fig. 1) steroid합성이 계속 증가된다고 가정할 수 있다. 본 실험결과 240분간 hCG로 membrane을 처치하면 light membrane

과 heavy membrane에서 high affinity  $Ca^{++}$ -ATPase의  $Ca^{++}$ 에 대한 affinity와  $V_{max}$ 가 증가되는 것으로 보아(Table 1) 위에서 가정한대로 hCG는 세포막을 통해  $Ca^{++}$  배출을 촉진시켜 세포내  $Ca^{++}$  농도가 지나치게 증가되는 것을 억제함으로써  $P_4$  합성을 증가시킨다고 생각된다. LH가 초기에 황체세포내  $Ca^{++}$  농도를 증가시킨다는 사실은 hCG로 황체세포를 15~30분간 처치하였을 때 막전위가 탈분극된다는 사실과 매우 밀접하다(Park et al. 미발표 논문), 즉 hCG에 의해 초기에 세포내  $Ca^{++}$  농도가 증가하면 세포내  $Ca^{++}$ 은 세포밖으로 나가고  $Na^+$ 의 유입이 증가되는  $Na^+/Ca^{++}$  교환에 의해 황체세포는 탈분극되었다고 설명할 수 있다. 이러한 탈분극현상은 여러 다른 gland에서 보고된 것과 마찬가지로  $P_4$ 의 분비를 증가시킬 것이다(Douglas et al. 1967; Gemmel et al. 1974).

또한 hCG는 microsome분획의  $Ca^{++}$ -ATPase에서는  $Ca^{++}$ 에 대한 affinity를 감소시켰으나 microsome의  $Ca^{++}$ -ATPase는 light 및 heavy membrane보다 capacity가 매우 적으며(Choi et al. 1986; Table 1), 또 이 분획에서 hCG가  $V_{max}$ 를 증가시켰기 때문에 affinity 감소에 따른 변화가 상쇄되므로 microsome분획의  $Ca^{++}$ -ATPase는 적어도 hCG에 의한 세포내  $Ca^{++}$  농도변화에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

$PGF_{2\alpha}$ 는 in vitro에서 basal  $P_4$  합성은 증가시키나(Thomas et al. 1978; Park et al. 미발표 논문) LH에 의해 증가되는  $P_4$  합성은 감소시키는 것으로 알려졌다(Grinwich et al. 1976; Thomas et al. 1978; Sotrel et al. 1981; Lubosky et al. 1984; Leung, 1985). 본 실험 결과  $PGF_{2\alpha}$ 는 농도에 따라 각 membrane 분획의  $Ca^{++}$ -ATPase의  $Ca^{++}$ 에 대한  $K_m$ 과  $V_{max}$ 에 미치는 영향이 다르게 나타났다(Fig 2, Table 1). 즉 저농도(5  $\mu g/ml$ )의  $PGF_{2\alpha}$ 로 처치시 heavy membrane에서  $V_{max}$ 에 영향없이  $Ca^{++}$ 에 대한 affinity가 증가되었으며, light membrane에서는  $K_m$ 에는 변화없이  $V_{max}$ 가 증가되어 결과적으로  $Ca^{++}$ 을 세포밖으로 배출시킴으로써 세포내  $Ca^{++}$  농도가 낮아질 것이며, 고농도(100  $\mu g/ml$ )의  $PGF_{2\alpha}$ 로 처치시에는 저농도에서와는 반대로 heavy membrane에서  $Ca^{++}$ 에 대한 affinity는 낮아지고 light membrane에서는  $V_{max}$ 가



감소되는 것으로 보아 오히려 세포내  $Ca^{++}$ 농도가 증가될 것으로 생각된다.

즉 저농도의  $PGF_{2\alpha}$ 는 phosphatidyl inositol의 turnover rate를 증가시켜(Leung et al. 1986) 세포내  $Ca^{++}$ 농도를 증가시키며(Joseph et al. 1984; Hokins, 1985) 이에따라 protein kinase C 등이 활성화되어(Davis & Clark, 1983) 황체세포에서 basal  $P_4$ 생성을 증가시킨다고 추측된다. 그러므로 저농도의  $PGF_{2\alpha}$ 에 오래 노출되면 증가된 세포내  $Ca^{++}$ 을 처리하기 위해 황체막에 있는  $Ca^{++}$ -ATPase를 활성화시켜(Table 1) 세포내  $Ca^{++}$ 농도를 낮춘다고 볼 수 있다. 그러나 저농도의  $PGF_{2\alpha}$ 가 세포내  $Ca^{++}$ 농도를 낮게 한다면 hCG 처치와 같이 황체세포가 탈분극되어야 하나 이 농도의  $PGF_{2\alpha}$ 는 막전위에 아무런 영향도 미치지 못하였다(Park et al. 미발표 논문). 이러한 차이는 현재로서는 분명하지 않지만 digitonin으로 처리한 세포에서  $PGF_{2\alpha}$ 의 작용방식이  $Ca^{++}$ -ATPase 억제제와 유사하며(Veldhuis, 1987), in vivo로  $PGF_{2\alpha}$ 를 주사하였을 때 세포막의 유동성이 변화하는(Buhr et al. 1979; Carlson et al. 1984) 것으로 보아 저농도의  $PGF_{2\alpha}$ 는 부분적으로  $Ca^{++}$ -ATPase에 직접 작용하여 활성을 억제하였을 가능성이 있다.

$PGF_{2\alpha}$ 가 황체막  $Ca^{++}$ -ATPase에 직접 작용하리라는 가능성은 고농도의  $PGF_{2\alpha}$  (100  $\mu$ g/ml)로 황체세포를 처리하였을 때 light membrane에서 심한  $V_{max}$ 의 감소와 heavy membrane에서  $Ca^{++}$ 에 대한 affinity와(Table 1) ATP에 대한 affinity 및  $V_{max}$ 의 급격한 감소를 나타내는 것으로도(Table 2) 뒷받침될 수 있다. 이와같이 고농도의  $PGF_{2\alpha}$ 는 직접  $Ca^{++}$ -ATPase에 작용하여  $Ca^{++}$  배출을 억제함으로써 세포내  $Ca^{++}$  농도를 증가시킬 뿐만 아니라  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase활성도를 억제하므로(Kim & Yeoun, 1983)  $Na^+$ / $Ca^{++}$ 교환에 의해 세포내  $Ca^{++}$  농도를 더욱 증가시킬 것이다.

그러면 고농도의  $PGF_{2\alpha}$ 에 의해 황체의  $P_4$ 생성은 증가될 것인가? 위에서 설명한대로  $Ca^{++}$ 이 protein kinase C의 활성을 증가시켜(Davis & Clark, 1983)  $P_4$ 합성을 촉진시킬 수도 있다. 이와는 반대로  $PGF_{2\alpha}$ 는 LH에 의해 증가되는  $P_4$ 생성을 감소시키는 것과 마찬가지로 세포내  $Ca^{++}$  농도의 증가가 adenylate

cyclase 활성을 억제하거나(Dorflinger et al. 1984), 또는  $PGF_{2\alpha}$ 가 직접 adenylate cyclase에 작용하여(Norjavaara & Rosberg, 1986) 그 활성을 억제하여 basal  $P_4$ 생성을 억제할 수도 있다. 그러나 아직 고농도의  $PGF_{2\alpha}$ 가 basal  $P_4$ 생성에 어떠한 영향을 주는지는 보고된 바가 없다. 이상의 결과로부터  $PGF_{2\alpha}$ 가 basal  $P_4$ 합성을 증가시키는 것은 주로  $Ca^{++}$ 을 통해, LH에 의해 증가되는  $P_4$ 생성을 감소시키는 것은 주로 cAMP를 통해 이루어질 것으로 추측된다.

Ouabain은 in vitro에서 basal  $P_4$ 합성은 증가시키거나(Kim et al. 1986; Park et al. 미발표 논문) LH에 의해 증가되는  $P_4$ 합성은 감소시키는 것으로 알려졌다(Gore & Behrman, 1984; Kim et al. 1986). 본 실험결과 ouabain은 고농도( $10^{-4}$ M)와 저농도( $10^{-6}$ M)를 막론하고 특히 light membrane에서  $Ca^{++}$ 에 대한  $V_{max}$ 와 affinity를 감소시킴으로써  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성을 억제하였다(Table 1). 또한 ouabain은 황체에서  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase를 억제하므로(Kim & Yeoun, 1983) 세포내의  $Na^+$ 이 증가하고 이에따라 membrane은 탈분극 될 것이며(Park et al. 미발표 논문) 나아가  $Na^+$ / $Ca^{++}$  교환에 의해 세포내  $Ca^{++}$ 이 증가할 것이다(Dorflinger et al. 1984). 이와같이 세포내  $Ca^{++}$  농도가 증가하였는데도 불구하고  $Ca^{++}$ -ATPase활성이 억제되는 것으로 보아(Table 1) 아마도 ouabain은  $Ca^{++}$ -ATPase에 직접 작용하는 것으로 생각된다. 어떤 경로를 통해서든 ouabain은 세포내  $Ca^{++}$  농도를 증가시키므로써 basal  $P_4$ 합성이 증가되는 것으로 추측된다. 이러한 추측은 ouabain이 뇌하수체에서 growth 홀몬 및 adrenocorticotropin의 분비(Fleischer et al. 1972)와 prolactin의 분비(Scammel & Dannies, 1983)를 증가시키며 이는 또한  $Ca^{++}$ 과 연관되어 있다는 보고에 의해 더욱 뒷받침 될 수 있다.

그러면 ouabain이 LH에 의해 증가되는  $P_4$ 합성을 감소시키는(Gore & Behrman, 1984; Kim et al. 1986) 기전은 무엇인가? 이는 LH에 의한  $P_4$ 합성은  $Ca^{++}$  이외에 주로 cAMP를 통해 이루어지므로 증가된 세포내  $Ca^{++}$ 이 adenylate cyclase를 억제시키기 때문인 것으로(Gore & Behrman, 1984) 생각되며 이는 저농도의  $PGF_{2\alpha}$ 의 작용기전과 유사하다.

그러나 본 실험만으로는 홀몬 및 약물의 작용부위

및 작용기전은 알 수 없고 다만 황체세포에서 LH(or hCG), PGF<sub>2α</sub> 및 ouabain이 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase의 Ca<sup>++</sup>에 대한 속도론적 변수에 영향을 주는 것으로 보아 이들 홀몬이나 약물이 세포내 Ca<sup>++</sup> 농도를 조절함으로써 P<sub>4</sub>합성을 조절할 것이라고 추측할 뿐이다.

### 결 론

황체화란소에서 분리한 light membrane, heavy membrane 및 microsomal분획의 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase의 활성도에 hCG, PGF<sub>2α</sub> 및 ouabain이 미치는 영향을 in vitro로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 각 약물 혹은 홀몬이 microsome 분획의 Ca<sup>++</sup>-ATPase활성도에 미치는 영향은 오랫동안 membrane을 전처리한 경우에만 나타났다.

2) 각 membrane분획을 240분간 preincubation 한 대조군에서 Ca<sup>++</sup>에 대한 Km은 heavy membrane에서 가장 컸으며, V<sub>max</sub>는 light membrane에서 가장 크고 microsome분획에서 가장 낮았다.

3) hCG로 전처리시 light membrane과 heavy membrane의 Ca<sup>++</sup>-ATPase의 Ca<sup>++</sup>에 대한 Km은 감소하였으나, V<sub>max</sub>는 고농도(100 IU/ml)에서 현저히 증가하였다.

4) PGF<sub>2α</sub>는 농도에 따라 각 membrane분획의 Ca<sup>++</sup>-ATPase의 Ca<sup>++</sup>에 대한 Km과 V<sub>max</sub>에 미치는 영향이 다르게 나타났다. 즉 저농도의 (5 μg/ml)의 PGF<sub>2α</sub>는 light membrane에서 V<sub>max</sub>를 현저히 증가시키고 heavy membrane에서는 Km을 증가시켰다.

5) 저농도(10<sup>-6</sup>M)의 ouabain은 light membrane에서 Ca<sup>++</sup>에 대한 V<sub>max</sub>를 감소시키고 microsome에서 Km은 증가시켰다. 그러나 고농도의(10<sup>-4</sup>M) ouabain은 V<sub>max</sub>에 별 영향없이 microsome분획과 heavy membrane에서 Ca<sup>++</sup>에 대한 Km을 증가시켰다.

6) 각 membrane분획을 240분간 preincubation한 대조군에서 ATP에 대한 K<sub>1/2</sub>는 heavy membrane에서 가장 낮았으며 apparent V<sub>max</sub>는 heavy membrane에서 가장 컸고 microsome분획에서 가장 낮았다.

7) 각 membrane분획에서 대조군의 high affinity

Ca<sup>++</sup>-ATPase활성도는 ATP농도가 300 μM 이상일 때 기질억제현상을 나타내었다. 이러한 현상은 hCG, PGF<sub>2α</sub> 및 ouabain으로 전처리하였을 때 heavy membrane에서 가장 현저하여 100 μM이상의 ATP 농도에서 나타났다.

이상의 결과로부터 LH(or hCG)는 초기에는 세포내 Ca<sup>++</sup>농도를 높여 P<sub>4</sub>합성을 증가시키나, 후기에는 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase가 활성화되므로 세포내 Ca<sup>++</sup>농도는 낮아져 cAMP를 통해 P<sub>4</sub>합성을 증가시킬 것으로 추측된다. 그러나 PGF<sub>2α</sub>와 ouabain은 high affinity Ca<sup>++</sup>-ATPase를 직접 억제하여 세포내 Ca<sup>++</sup> 농도를 증가시키므로써 basal P<sub>4</sub>합성을 증가시키며, LH에 의해 증가되는 P<sub>4</sub>합성은 LH-dependent adenylate cyclase 활성도를 억제함으로써 감소시키는 것으로 추측된다.

### REFERENCES

Bramley TA & Ryan RJ (1978). Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. I. Properties and distributions of some marker enzyme activities after subcellular fractions of the superovulated rat ovary. *Endocrinology* 103, 778-795

Bramley TA & Ryan RJ (1980a). Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. VIII. The different properties of rat luteal cell light and heavy membranes cannot be explained by fractionation of inside-out and outside-out plasma membrane vesicles. *Mol Cell Endocrinol* 19, 21-31

Bramley TA & Ryan RJ (1980b). Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. IX. Changes in the specific activities of some plasma membrane marker enzymes in rat ovarian homogenates and purified membrane fractions at various time after priming with PMSG and hCG. *Mol Cell Endocrinol* 19, 33-41

Brunswig B, Mukhopadhyay AM, Budnik LY, Bohnet HG & Leidenberger FA (1986). Phorbol ester stimulated progesterone production by isolated bovine luteal cells. *Endocrinology* 118, 743-749

Buhr MM, Carlson JC & Thompson JE (1979). A new perspective on the mechanism of corpus luteum regression. *Endocrinology* 105, 1330-1335

- Carlson JC, Buhr MM & Riley JCM (1984). Alterations in the cellular membranes of regressing rat corpora lutea. *Endocrinology* 114, 521-526
- Choi GB, Koo BS & Kim I (1986). Partial characterization of physicochemical and kinetic properties of Ca<sup>++</sup>-ATPase system in luteal membranes. *Korean J Physiol* 20, 521-526 (in Korean)
- Davis JS (1986). Phorbol esters activate protein kinase C and inhibit LH receptor-mediate phospholipase C activity in bovine luteal cells. 68th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim CA, p161(Abstract)
- Davis JC & Clark MR (1983). Activation of protein kinase in the bovine corpus luteum by phospholipid and Ca<sup>++</sup>. *Biochem J* 214, 569-574
- Dorflinger LJ, Albert PJ, Williams AT & Behrman, HR (1984). Calcium is an inhibitor of luteinizing hormone-sensitive adenylate cyclase in the luteal cell. *Endocrinology* 114, 1208-1215
- Douglas WW, Kanno T & Sampson SR (1967). Effect of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: An analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol* (London) 188, 107-120
- Fiske CH & Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem* 66, 375-400
- Fleischer N, Zimmerman G, Schindler H & Huchen M (1972). Stimulation of adrenocorticotropin (ACTH) and growth hormone (GH) release by ouabain: Relation to calcium. *Endocrinology* 91, 1436-1441
- Gemmell RT, Stacy BD & Thorburn GD (1974). Proceedings: The ultrastructure of the corpus luteum in relation to the mechanism of progesterone secretion. *J Reprod Fertil* 36, 444-445
- Gore SD & Behrman HR (1984). Alteration of transmembrane sodium and potassium gradients inhibits the action of luteinizing hormone in the luteal cell. *Endocrinology* 114, 2020-2031
- Grinwich DL, Ham EA, Hichens H & Behrman HR (1976). Binding of human chorionic gonadotropin and response of cyclic nucleotides to luteinizing hormone in luteal tissue from rat treated with prostaglandin F<sub>2a</sub>. *Endocrinology* 98, 146-150
- Hichens H, Grinwich DL & Behrman HR (1974). PGF<sub>2a</sub>-induced loss of corpus luteum gonadotropin receptors. *Prostaglandins* 7, 449-458
- Higuchi T, Kaneko A, Abel JH Jr. & Niswender GD (1976). Relationship between membrane potential and progesterone release in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 99, 1023-1032
- Hofstee BHJ (1959). Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. *Nature* (London) 184, 1296-1298
- Hokins LE (1985). Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Ann Rev Biochem* 54, 205-235
- Joseph SK, Thomas AP, Williams RJ, Irvine RF & Williamson JR (1984). myo-Inositol 1,4,5-triphosphate. A second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca<sup>++</sup> in liver. *J Biol Chem* 259, 3077-3081
- Kim I & Yeoun DS (1983). Effect of prostaglandin F<sub>2a</sub> on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in luteal membranes. *Biol Reprod* 29, 48-55
- Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U & Nishizuka Y (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 255, 2273-2276
- Kim SH, Park HS & Kim I (1986). The effect of ouabain on the luteal function in rats. *Yonsei J Med Sci* 19:13-22, (in Korean)
- Kuo JF, Andersson RGG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, Katoh N, Shoji M & Wrenn R.W (1980). Calcium dependent protein kinase: Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin and trifluoperazine. *Proc Natl Acad USA* 77, 7039-7043
- Lee H & Clusin WT (1987). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> exchange in cardiac myocytes. Effect of ouabain on voltage dependence. *Biophys J* 51, 169-176
- Leung PCK (1985). Mechanism of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin action on luteal cells. *Can J Physiol Pharmacol* 63, 249-256
- Leung PCK, Minegishi T, Ma F, Zhou F & Ho-Yuen B (1986). Induction of polyphosphoinositide breakdown in rat corpus luteum by PGF<sub>2a</sub>. *Endocrinology* 119, 12-17

- Lowry OH, Rosbrough ND, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Lubosky JL, Dorflinger LJ, Wright K & Behrman HR (1984). Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  inhibits luteinizing hormone (LH)-induced increase in LH receptor binding to isolated rat luteal cells. *Endocrinology* 115, 2210-2216
- Maizels ET & Jungmann RA (1982).  $Ca^{++}$ -dependent phosphorylation of rat ovary proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 32-37
- Moore L & Pastan I (1978). Energy-dependent calcium uptake by fibroblast microsomes. *Ann NY Acad Sci* 270, 177-194
- Norjavaara E & Rosberg S (1986). Mechanism of action of prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -induced luteolysis: Evidence for a rapid effect on the guanine nucleotide binding regulatory component of adenylate cyclase in rat luteal tissue. *Mol Cell Endocrinol* 48, 97-104
- Scammel JG & Dannies PS (1983). Veratridine and ouabain stimulate calcium-dependent prolactin release. *Endocrinology* 113, 1228-1235
- Sillen LG & Martell AE (1971). Stability constants of metal-ion complexes. *Special publications Nos 17 and 25. The chemical society, Burlington house, London*
- Sotrel G, Helvacioğlu A, Dowers S, Scommegna A & Juletta EJ (1981). Mechanism of luteolysis: Effect of estradiol and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  on corpus luteum luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and cyclic nucleotides in the rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* 139, 134-140
- Thomas JP, Dorflinger LJ & Behrman HR (1978). Mechanism of the rapid antigonadotropic action of prostaglandins in cultured luteal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1344-1346
- Van Breeman C, Aaronson P & Loutzenhizer R (1978). Sodium-calcium interaction in mammalian smooth muscle. *Pharmacol Rev* 30, 167-208
- Veldhuis JD & Klase PA (1982). Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochem J* 202, 381-386
- Veldhuis JD (1987). Mechanism subserving hormone action in the ovary: Role of calcium ions as assessed by steady state calcium exchange in cultured swine granulosa cells. *Endocrinology* 120, 445-449
- Verma AK & Penniston JT (1981). A high affinity  $Ca^{++}$ -stimulated and  $Mg^{++}$ -dependent ATPase in rat corpus luteum plasma membrane fractions. *J Biol Chem* 256, 1269-1275