

## 지렁이 꼬리 재생시 발현되는 피브리노겐 분해효소의 활성과 특성에 관한 연구

탁은식 · 조성진 · 김재영 · 이규석\* · 박순철

(중앙대학교 생명과학과, \*관동대학교 의과대학 해부학교실)

### Expression and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Activity During Earthworm Tail Regeneration

Tak, Eun Sik, Sung Jin Cho, Jae Young Kim, Kyu Seok Lee\* and Soon Cheol Park

(Department of Life Science, Chung-Ang University, \*Department of Anatomy, Kwandong University College of Medicine)

#### ABSTRACT

Fibrinolytic enzyme is thought to be involved in extracellular matrix remodeling during regeneration. We investigated the expression and characterization of fibrinolytic enzyme activity during earthworm tail regeneration. Electrophoretic analysis of fibrinolytic enzymes induced during regeneration revealed that at least seven types of fibrinolytic enzymes were expressed, which had molecular weight of 12, 19, 23, 27, 32, 45 and 58 kDa, respectively. These fibrinolytic enzyme activities were dramatically increased within 1 day after amputation. These activities were maintained by 7 days postamputation, followed by decrease to control level from 14 days after amputation. All types of fibrinolytic enzyme activities were inhibited by treatment of PMSF and aprotinin, and were insensitive to EDTA and exogenous  $Ca^{2+}$ . These results indicate that the fibrinolytic enzymes are serine-proteinase. Other characteristics including specificities for extracellular matrix proteins are under investigation. Based on these results, we are trying to find out the relationship among expression of proteinases, extracellular matrix remodeling, and dedifferentiation, which are believed to be essential processes during regeneration.

**Key words :** Regeneration, Fibrinolytic enzyme activity, Earthworm, Extracellular matrix

#### 서 론

재생은 일종의 성체에서 일어나는 발생과정으로 생각되며, 근래에 배아 발생시 일어나는 발생 프로그램이 어떻게 성체에서 재활성화 되어 성장, 패턴형성 (pattern formation) 및 형태형성 (morphogenesis)을 유발시키는지에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

분화된 상태의 역이행 즉, 탈분화는 재생과정의 가장 특징적인 변화이다. 양서류의 일종인 newt의 수정체 재생에 있어서 홍체에 있는 색소상피세포는 수정체를 제거하였을 때 세포주기에 재진입 (cell cycle re-entry)하여 색소포를 상실하게 되며 수정체세포로 전환분화 (transdifferentiation)하게 된다 (Filoni *et al.* 1991). 이러한 홍체 색소상피세포의 전환분화는 newt에서만 관찰되는 재생과정이지만, 조류나 포유류의 홍체와 망막 색소상피세포들도 *in vitro*에서 phenylthiourea로 멜라닌형성을 저해하고 FGF로 탈분화와 전환

분화를 유도하면 수정체세포로 전환되어 crySTALLIN을 발현할 수 있다. 이러한 사실은 재생을 할 수 있는 동물들이 갖고 있는 세포의 다능성 (plasticity)이 그 동물만이 갖고 있는 고유한 성질이 아니라 국소적 환경 (local environment)의 변화에 기인한 것이라고 생각할 수 있다. 이러한 국소적 환경의 변화는 절단 후, 재생아 형성시 세포외기질의 선택적 분해를 통하여 이루어지며, 이를 위하여 재생아 세포는 외포작용 (exocytosis)을 통해 세포 밖으로 다양한 단백질 분해효소를 분비한다. 이 효소들의 분비는 재생아 세포에 의해 시공간적으로 매우 적절하게 조절되는 것으로 알려지고 있으며, 세포외기질의 재구성 (remodeling)을 유도한다 (Woessner 1991, Kim *et al.* 1997). 세포외기질은 fibronectin, collagen, laminin, tenascin, vitronectin 및 proteoglycan 등 다양한 분자들로 구성되어 있으며, 이들을 분해하는 효소들은 다양한 생리학 및 병리학적인 현상에 관련되어 있다. 이 효소들은 세포의 분화, 성장 및 이동에 연관

되어 있으며, cell apoptosis 및 종양세포전이와도 깊은 연관성을 갖고 있다 (Perez-Tamayo 1978, Tryggvason *et al.* 1987, Emonard and Grimaud 1990). 양서류의 다리 재생기간 동안에 발현되어 세포외기질 재구성에 관여하는 단백질 분해효소는 calcium 의존성 metallopro-teinase 계통의 효소로써, collagenase의 활성을 갖고 있으며, 상지 절단 후 수 시간 이내에 그 활성이 빠르게 증가하는 것으로 나타나서 이 효소의 활성 증가가 탈분화와 재생아 형성 단계에 연관되어 있을 것으로 생각되고 있다 (Yang and Bryant 1994). 즉, 재생세포에 있어서 이러한 효소에 의한 collagen의 감소와 fibronectin 및 tenascin과 같은 단백질의 합성 증가는 재생아 세포의 분열과 이동 등에 영향을 미치고 있는 것으로 추측되고 있다 (Donaldson *et al.* 1991, Onda *et al.* 1991, Nace and Tassava, 1995). 또한 trypsin과 chymotrypsin 유사 효소가 간충세포 (mesenchymal cell)의 탈분화 시기에 그 활성이 크게 증가하는 것으로 보고되었으며 (Hara *et al.* 1992), 양서류 부속지 재생에 있어서도 이러한 종류의 효소 활성도가 사지 절단 후 4일 이내 즉 탈분화시기에 유의성있게 증가하는 것으로 나타났다 (Lee and Kim 1996). 이외에 또 다른 중요 세포외기질 분해효소는 plasmin 계통의 효소이다. Plasmin은 고등동물의 간조직 재생 초기에 그 활성이 급격히 증가되며, fibrinogen 등과 같은 세포외기질의 분해를 통해 세포 내로 유입되는 신호전달물질들을 조절함으로써 재생세포의 성장을 유도하는 것으로 생각되고 있다 (Rixon *et al.* 1976, Kim *et al.* 1997). 또한 plasmin은 발생기간 중 neural crest cell (Agrawal and Brauer 1996) 및 endothelial cell (Odekon *et al.* 1992)의 이동에 관여하며, neural cell adhesion molecule (NCAM)을 효과적으로 분해할 수 있는 것으로 보고된 바 있어서 정상적인 발생과정에서도 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다.

본 연구에 사용된 지렁이는 계통분류학상 하등동물과 고등동물의 중간에 위치하고 있는 환형동물문, 빈모강, 신빈모목에 속하는 동물로써 두 동물군의 특징을 모두 가지고 있는 동물이다. 지렁이는 절단된 몸체를 완전하게 재생하는 동물이며, 재생기작 연구재료로 주로 사용되는 양서류의 urodeles나 axolotls 보다 여러 가지 이점이 있음에도 불구하고 이 동물에 대한 연구는 매우 부진한 상태이다 (Moment 1972, 1974). 지렁이 재생에 관한 연구는 1970년대 말까지 재생마디 수의 개체변이 (Maderson and Salthe 1971), 절단각도와 재생마디 수의 변화 (Gates 1950) 및 재생마디 수의 유전적 조절 (Moment 1974) 등 주로 외형관찰을 통한 매우 기초적인 연구가 간헐적으로 이루어졌을 뿐이다. 최근 연구로는 지렁이 재생시 polyamine의 일종인 putrescine의 농도가 일시적으로 증가한다는 보고가 있으며 (Hamana *et al.* 1995), 재생중인 giant axon의 healing (Krause *et al.* 1994)과 reconnection 기작 (Lyckman and Bittnerm 1992) 및 재생 신경세포의 기원에 관한 연구결과

(Danvolgyi *et al.* 1994)가 보고된 바가 있다. 따라서, 본 연구에서는 재생시기에 유의성있게 발현하는 세포외기질 분해효소의 중요성을 감안하여 전체 지렁이 재생기간 동안 그 발현이 촉진되는 단백질 분해 효소의 양상을 관찰하고 억제제를 이용하여 이 효소의 종류를 밝히고자 하였으며, 이를 바탕으로 지렁이 재생의 특징을 이해하고 그 기작을 이해하는데 도움이 되고자 한다.

## 재료 및 방법

### 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 배양 및 절단

지렁이는 Park 등 (1996)에 의한 방법으로 사육하였다. 낫시 미끼용 지렁이 (*Eisenia andrei*)를 구입하여 환대가 잘 발달된 성숙한 개체만을 선택하였다. 선택된 지렁이는 증류수로 여러 차례 세척한 후 peat moss로 채워진 15×20×7 cm 크기의 플라스틱 용기에 넣어 23±1°C를 유지하며 암소에서 배양하였다. 배양 전에 peat moss는 지렁이 성장에 해로운 선충류의 성장을 최소화하기 위하여 65°C 건조용 전기 오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 사용하였다. 배양시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상 유지하였고, 양분으로는 우분을 매일 peat moss 위에 공급하였다.

실험에 사용된 지렁이는 환대로부터 항문 쪽으로 약 10-15마디를 남기고 뒷부분은 면도칼로 잘라내었다. 환대를 포함한 앞부분 즉, 재생 중인 지렁이는 peat moss로 채워진 glass patri dish 내에서 위와 같은 방법으로 배양하였다.

### Non-reducing SDS-PAGE를 이용한 피브리노겐 분해효소의 zymography

절단 후, 각각 1일, 3일, 7일, 9일, 10일, 11일, 14일, 17일, 21일 및 30일이 경과한 지렁이의 재생부위를 절단하였다. 각 조직은 Glass-Teflon homogenizer (Wheaton)를 사용하여 균질액을 만들었으며, 13,000×g에서 1시간 동안 원심분리 (Jouan MR 18 22)하고 난 후 그 상층액을 채취하였다. 이 균질액 전체 부피의 1/4이 되는 n-butyl alcohol을 첨가하여 5분 간격으로 15초씩 30분간 혼합하였고, 혼합액을 13,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 지방층을 제거한 다음 단백질 침전을 얻기 위하여 5배 (v/v)의 acetone을 첨가하여 -20°C에서 10분간 방치시킨 후 13,000×g에서 5분간 원심분리 하였다. 이 후 상층액을 제거하고 남은 침전물로부터 acetone을 제거한 후 SDS-PAGE를 위한 효소원 (enzyme source)으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4°C 이하의 온도를 유지하며 수행하였다.

위와 같이 준비된 각 실험군의 피브리노겐 분해효소의 시간별 활성을 알아보기 위하여 non-reducing SDS-PAGE를 이용한 zymography를 실시하였다. PAGE는 Ornstein (1964)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. Separating gel

(13.5%, 10×10.5×0.7 cm)에는 ml 당 1 mg의 피브리노젠을 포함하도록 하였고, separating gel과 stacking gel (4%)은 모두 2.6% crosslinker와 SDS를 포함하도록 하였다. 상기 방법으로 준비된 효소원은 0.5% Triton X-100이 포함된 sample buffer (80 mM, pH 6.8 Tris-HCl)에 용해하여 각 well 당 단백질의 농도가 약 5 µg/5 µl씩 되도록 loading하고, 최초 150 V에서 20분간 전기영동한 후 다시 250 V에서 80분간 전기영동하였다. 전기영동 후 SDS를 제거하기 위하여 2.5% triton X-100을 포함하는 50 mM, pH 7.4 Tris-HCl 완충 용액으로 각각 두 번씩 10분 동안 세척한 후 37°C에서 18 시간동안 배양액 (50 mM, pH 7.5 Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 0.02 % NaN<sub>3</sub>) 안에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 피브리노젠 분해효소의 활성도를 관찰하기 위하여 separating gel을 coomassie brilliant blue R-250로 염색하고 탈 염색 후 lysis zone을 관찰하여 각 시간별 피브리노젠 분해효소의 활성을 관찰하였다.

단백질의 정량은 표준 단백질로 bovine serum albumin (Bio-Rad)을 사용하여 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다.

분자량 측정

피브리노젠 분해효소의 분자량을 측정하기 위하여 표준 단백질로는 myosin (250 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa)를 사용하였다. 전기영동 후 이들의 상대적 이동거리 (Rf)를 산출한 후 표준곡선 (standard curve)을 작성하고 피브리노젠 분해효소의 Rf값을 대응시켜 분자량을 산출하였다.

pH의 영향

준비된 효소원을 전기영동하고 separating gel로부터 SDS를 제거한 후 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0과 10.0을 갖는 배양액 안에서 37°C에서 18시간 동안 배양하여 coomassie brilliant blue R-250로 염색하였다. 탈 염색 후 lysis zone을 관찰하여 pH에 의한 영향을 비교 관찰하였다. 이 때, pH 4.0, 5.0은 sodium acetate buffer를 6.0, 7.0은 sodium phosphate buffer를 8.0, 9.0, 10.0은 Tris-HCl buffer를 각각 사용하였다.

피브리노젠 분해효소에 대한 억제제의 효과

효소원을 전기영동한 후 separating gel로부터 SDS를 제거하고 배양액에 일정 농도의 단백질 분해효소에 대한 억제제, 즉 2 mM, 4 mM phenylmethylsulfonyl flouride (PMSF), 40 nM, 80 nM Aprotinin을 넣어준 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 coomassie brilliant blue R-250로 염색하고 탈 염색 후 lysis zone을 관찰하여 억제제의 영향을 관찰하였다. 이 때, 억제인자를 첨가하지 않은 것을 대조군

으로 하여 억제제의 영향을 비교 관찰하였다.

결과 및 고찰

재생 중에 발현되는 피브리노젠 분해효소의 활성

탈분화 과정은 재생아 세포를 형성하기 위한 필수적인 과정이며, 재생기작 연구의 중심적인 연구과제이다. 탈분화 과정은 여러 가지 유전자 특히 발생과정에서만 발현되었던 유전자가 재발현 됨으로써 일어나는 현상이라고 생각된다. 이러한 유전자 중에는 세포주기 조절 유전자, 축 결정 유전자 및 세포외기질 조절유전자 등이 포함된다. 이중 특히, 세포외기질 조절유전자의 발현은 재생시 세포외기질 분자의 조성을 변화시킴으로써 세포 내로 유입되는 신호전달 물질을 변화시켜 세포의 분열, 성장 및 분화에 영향을 미친다 (Singer and Caston 1972, Mescher and Tassava 1975). 양서류의 재생아 세포 형성시 주로 metalloproteinase의 발현이 촉진되며, 이 효소에 의해 collagen의 분해가 급속히 이뤄지는 것으로 보고되었다 (Yang and Bryant 1994). 이러한 세포외 기질 분해효소의 발현 양상은 탈분화와 밀접히 연관되어 있으므로, 본 연구에서는 지렁이 재생 중에 발현되는 단백질 분해효소의 발현 양상을 피브리노젠을 기질로 하여 연구하였다. 절단되지 않은 지렁이를 대조군으로 하여 각각 1일, 3일, 7일, 10일, 11일, 14일, 30일이 경과한 재생조직을 효소원으로 사용하여 non-reducing SDS-PAGE를 실시한 결과 피브리노젠 분해효소의 활성이



Fig. 1. Zymogram of extracellular matrix fibrinolytic enzyme activity induced during earthworm tail regeneration. lane 1: control; lane 2: 1 day; lane 3: 3 days; lane 4: 7 days; lane 5: 10 days; lane 6: 11 days; lane 7: 14 days; lane 8: 30 days postamputation. The fibrinolytic enzyme activity of control was not detectable by the method employed in this experiment. However, within a day, fibrinolytic enzyme activity was dramatically induced. At least 7 fibrinolytic enzymes newly induced were distinguishable. These activities were maintained by 7 days, followed by decrease to control level from 14 days after amputation.

절단 후 24시간 이내에 급속히 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 활성은 약 일주일간 지속하였다가 급격히 감소하여 14일 이후에는 대조군 수준으로 감소하였다(Fig. 1). 따라서 지렁이의 꼬리재생시에 나타나는 피브리노겐 분해효소의 발현은 꼬리재생의 초기 즉 탈분화 과정에 있어서 중요한 역할을 수행한다고 여겨진다.

피브리노겐 분해효소의 특성

세포외기질 분해효소는 그 종류가 매우 다양하며 종류에 따라 그 기능이 상이함으로 지렁이의 꼬리 재생시 발현이 촉진된 피브리노겐 분해효소의 특징을 연구할 필요성이 있다. 지렁이 재생시 발현되는 피브리노겐 분해효소는 모두 7개로 관찰되었으며, 이들의 분자량을 표준 단백질의 상대적 이동거리와 비교하여 산출한 결과 각각 58 kDa, 45 kDa, 32 kDa, 27 kDa, 23 kDa, 19 kDa 및 12 kDa로 측정되었고, 각각의 효소들은 전개된 위치에 따라 FE (Fibrinolytic Enzyme) 1, FE 2, FE 3, FE 4, FE 5, FE 6 그리고 FE 7로 표시하였다(Fig. 2). 그중 23 kDa의 분자량을 갖는 FE 5 피브리노겐 분해효소가 재생 중 유도되는 효과 중 가장 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 피브리노겐 분해효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위하여 영동 후, 각각의 pH가 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 그리고 10.0인 배양액에서 배양한 결과, 모든 pH에서 활성이 나타났지만 pH 7.0과 8.0에서 가장 높은 활성을 나타내

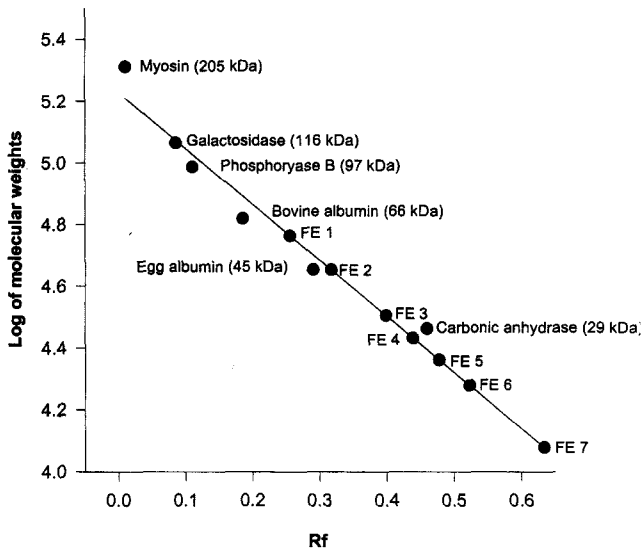


Fig. 2. Molecular weights distribution of fibrinolytic enzymes determined by non-reducing SDS-PAGE. The molecular weights of induced fibrinolytic enzymes were estimated to be 58, 45, 32, 27, 23, 19 and 12 kDa, respectively. Myosin (205 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa) were included as molecular weight makers.

었다(Fig. 3). 피브리노겐 분해효소의 활성에 미치는 몇 가지의 단백질 분해효소 억제제의 영향을 관찰하기 위하여 전기영동을 실시한 후 몇 가지 억제제를 배양액에 첨가하여 배양하였다. 이때 모든 피브리노겐 분해효소는 serine proteinases의 억제제인 PMSF에 민감하게 반응하여 5 mM의 PMSF를 배양액에 첨가하였을 때 모든 효소들의 활성이 완전하게 억제되었다. 또한 일부 serine proteinase의 억제제로 알려진 aprotinin은 PMSF 보다는 약하지만 대부분의 피브리노겐 분해효소를 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다. 또한 양서류의 다리 재생초기에 metalloproteinases (MMPs)의 활성이 크게 증가하는 것으로 보고되었는 바, 일반적으로 MMPs의 활성에 필수적인  $Ca^{2+}$ 을 배양액에서 제거한 후 배양하였을 때 본 연구에서 분리된 지렁이 피브리노겐 분해효소의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 지렁이 꼬리 재생에 있어서는 양서류와는 달리 초기에 serine계 단백질 분해효소가

Table 1. Effects of potent inhibitors on fibrinolytic enzyme during earthworm tail regeneration

Inhibitors	Inhibition
PMSF	+++
5 mM	++
1 mM	++
Aprotinin	
80 nM	+
40 nM	+
$Ca^{2+}$ ion free-medium	-

+++ : strong; ++ : intermediate; + : weak; - : no inhibition.

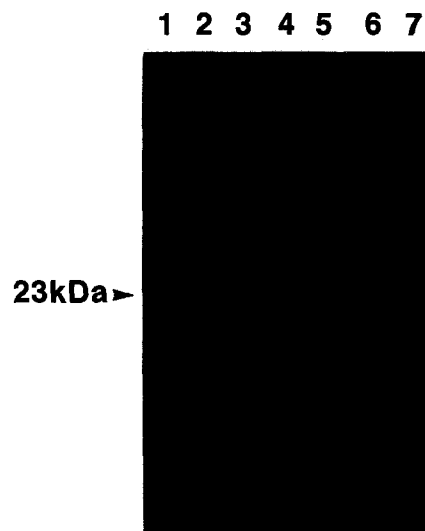


Fig. 3. pH profile of fibrinolytic enzymes. lane 1: pH 4.0; lane 2: pH 5.0; lane 3: pH 6.0; lane 4: pH 7.0; lane 5: pH 8.0; lane 6: pH 9.0; lane 7: pH 10.0. The pH optima of all fibrinolytic enzymes induced were observed at pH 7 to 8.

발현됨을 의미하며, 이 단백질 분해효소가 탈분화와 연관되어 있을 가능성을 시사해 주고 있다. 본 연구에 사용된 단백질 분해효소의 기질인 fibrinogen은 다양한 단백질 분해효소에 의해 분해될 수 있지만 특히 serine계 proteinase인 plasmin에 의해 용이하게 분해되는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.* 1997). Plasmin은 plasminogen-activator (PA)에 의해 비활성형인 plasminogen으로부터 전환되는데 상처부위의 혈병용해 및 혈관형성에 관여하는 효소로 알려져 있다 (Endo *et al.* 1998). 그러므로 본 연구에서 분리된 단백질 분해효소가 plasmin 계통의 효소로써 지렁이 절단 시 생긴 혈병을 용해하고 재생에 필수적인 혈관형성에 연관되어 있을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 지렁이 재생 시 발현된 단백질 분해효소의 보다 정확한 성질을 이해하기 위해서는 보다 다양한 특이적 억제제의 적용이 필요하며 이와 아울러 PA 등 이 효소의 특징을 이해할 수 있는 다른 효소들의 실험적 근거가 뒷받침되어야 할 것이다.

### 적 요

지렁이 꼬리재생 초기에 발현되는 피브리노겐 분해효소의 활성은 세포외기질의 재구성에 연관되어 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 지렁이의 꼬리 재생 중에 발현된 피브리노겐 분해효소의 활성과 특성을 밝히고자 하였다. 지렁이의 꼬리 재생 중에 발현되는 피브리노겐 분해효소는 최소 7개이며 그 분자량은 각각 58, 45, 32, 27, 23, 19 그리고 12 kDa로 측정되었다. 피브리노겐 분해효소의 활성은 절단 후 1일부터 효소의 활성이 나타나서 7일까지 거의 유사한 정도의 활성이 유지되었으며, 7일 이후부터는 이 효소들의 활성이 급격히 감소하여 14일에는 그 활성이 대조군 수준으로 회복되었다. 지렁이 꼬리 재생 중 발현된 모든 피브리노겐 분해효소는 PMSF와 aprotinin를 처리하였을 때 효소들의 활성이 억제되었다. 또한  $Ca^{2+}$ 의 제거는 이 효소의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 지렁이 꼬리재생시 발현되는 피브리노겐 분해효소는 serine계 단백질 분해효소임을 알 수 있었다.

### 인 용 문 헌

Agrawal, M. and P.R. Brauer. 1996. Urokinase-type plasminogen activator regulates cranial neural crest cell migration in vitro. *Dev Dyn.* **207** : 281-290.  
 Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72** : 248-254.  
 Danvolgyi, T., J. Barna, M. Csoknya, I. Lengvari and J. Hamori. 1994. The number of ganglion cells in the intact and regenerated nervous system in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta. Biol. Hung.* **45** : 179-187.

Donaldson, D.J., J.T. Mahan, H. Yang and K.L. Crossin. 1991. Tenascin localization in skin wounds of the adult newt *Notophthalmus viridescens*. *Anat. Rec.* **230** : 451-459.  
 Emonard, H. and J.A. Grimaud. 1990. Matrix metalloproteinases. A Review. *Cell. Mol. Biol.* **36** : 131-153.  
 Endo, A., N. Nagai, T. Urano, H. Ihara, Y. Takada, K. Hashimoto and A. Takada. 1998. Proteolysis of highly polysialylated NCAM by the tissue plasminogen activator-plasmin system in rats. *Neurosci Lett* **246** : 37-40.  
 Filoni, S., C. Albanesi, S. Bernardini and S.M. Cannata. 1991. Lens formation from the cornea following implantation into hindlimbs of larval *Xenopus laevis*: The influence of limb innervation and extent of differentiation. *J. Exp. Biol.* **260** : 220-228.  
 Gates, G.E. 1950. Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida*. **II.** Posterior regeneration. *Biol. Bull.* **98** : 36-45.  
 Hamana, K., H. Hamana and T. Shinozawa. 1995. Alterations in polyamine levels of nematode, earthworm, leech and planarian during regeneration, temperature and osmotic stresses. *Comp. Biochem. Physiol. B* **111** : 91-97.  
 Hara, K., S. Fujiwara and K. Kawamura. 1992. Retinoic acid can induce a secondary axis in developing buds of a colonial ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Dev. Growth. Differ.* **34** : 437-435.  
 Kim, T.H., W.M. Mars, D.B. Stolz, B.E. Petersen and G.K. Michalopoulos. 1997. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology.* **26** : 896-904.  
 Krause, T.L., H.M. Fishman, M.L. Balinger and G.D. Bittner. 1994. Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. *J. Neurosci.* **14** : 6638-6651.  
 Lee, E.H. and W.S. Kim. 1996. Dedifferentiation state specific increase of trypsin- and chymotrypsin-like protease activities during urodele limb regeneration and their enhancement by retinoic acid treatment. *Korean J. Zool.* **39** : 65-74.  
 Lyckman, A.W. and G.D. Bittner. 1992. Axonal conduction and electrical coupling in regenerating earthworm giant axons. *Exp. Neurol.* **117** : 299-306.  
 Maderson, P.F.A. and S.N. Salthe. 1971. Further observation on tail regeneration in *Anolis carolinensis*. *J. Exp. Zool.* **177** : 185-190.  
 Mescher, A.L. and R.A. Tassava. 1975. Denervation effects on DNA replication and mitosis during regeneration of limb regeneration in adult newts. *Dev. Biol.* **44** : 187-197.  
 Moment, G.B. 1972. Recovery and abscopal effects after inhibitory X-irradiation. *J. Exp. Zool.* **181** : 33-39.  
 Moment, G.B. 1974. Variation and its causation in earthworm regeneration. *J. Exp. Zool.* **190** : 297-304.  
 Nace, J.D. and R.A. Tassava. 1995. Examination of fibronectin distribution and its sources in the regenerating newt limb by immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Dev. Dyn.* **202** : 153-164.  
 Odekon, L.E., Y. Sato and D.B. Rifkin. 1992. Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity. *J. Cell. Physiol.* **150** : 258-263.  
 Onda, H., M.L. Poulin, R.A. Tassava and I.M. Chiu. 1991. Characterization of a newt tenascin cDNA and localization of tenascin mRNA during newt limb regeneration by *in situ* hybridization. *Dev. Biol.* **148** : 219-232.  
 Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121** : 321-349.  
 Park, S.C., H.W. Park and T.J. Smith. 1996. Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stages of the

- earthworm, *Eisenia andrei*. *Soil Biol. Biochem.* **28** : 579-582.
- Perez-Tamayo, R. 1978. Pathology of collagen degradation. A Review. *Am J. Pathol.* **92** : 509-566.
- Rixon, R.H., P.R. Walker and J.F. Whitfield. 1976. Fibrinolysis and liver regeneration. *J. Cell Physiol.* **92** : 13-22.
- Singer, M. and J.D. Caston. 1972. Nutritional dependence of macromolecular synthesis in early limb regenerate of newt, *Triturus*. *J. Embry. Exp. Morphol.* **28** : 1-11.
- Tryggvason, K., M. Hoyhtya and T. Salo. 1987. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim. Biophys. Acta.* **907** : 191-217.
- Woessner, J.F. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5** : 2145-2154.
- Yang, E.V. and S.V. Bryant. 1994. Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Dev. Biol.* **166** : 696-703.