

소의 초기 임신 황체에서 PAPP-A와 20α-HSD의 발현 양상

김대승¹, 김상환¹, 윤종택^{2,3,*}

¹국립한경대학교 생물환경정보통신전문대학원 동물생명공학 전공, ²국립한경대학교 유전공학연구소,

³국립한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명과학전공

Expression of PAPP-A and 20α-HSD in the Bovine Corpus Luteum during Early Pregnancy

Dae-Seung Kim¹, Sang-Hwan Kim¹ and Jong-Taek Yoon^{2,3,*}

¹Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

²Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

³Major in Animal Biotechnology Graduate School of Bio. & Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was performed to the expressions of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20α-HSD) in bovine corpus luteum during early pregnancy. To determine the function of PAPP-A gene during early pregnancy, we collected corpus luteum samples on 30, 60 and 90 days of pregnancy in bovine. The mRNA expression of PAPP-A, 20α-HSD, progesterone-receptor (PR) and insulin-like growth factor binding protein4 (IGFBP4) gene was conducted by Real-time PCR. In parallel with mRNA levels, The protein expressions of PAPP-A and 20α-HSD were detected by immunological analysis. The mRNA expressions 20α-HSD and PAPP-A significantly increased on day 90 in the corpus luteum during pregnancy. The mRNA expression of PR and IGFBP4 in the corpus luteum progressively was enhanced at 30 to 60 day, but decreased on 90 day of pregnancy in the corpus luteum. The expression patterns of these genes, PAPP-A and 20α-HSD were similar pattern in these tissues. In conclusion, PAPP-A and 20α-HSD activity in corpus luteum could be played a role for early pregnancy manifestation.

(Key words : 20α-HSD, bovine, IGFBP4, PAPP-A, pregnancy, progesterone)

서론

Pregnancy-associated plasma protein(PAPP)는 임신 특정 단백질로써 최초 임신부의 혈액에서 확인되어 임신에 관련된 특이적인 유전자로 분류한다(Bischof 등, 1983 ; Bischof 등, 1984). PAPP는 immunologically type에 따라 A, B, C, D로 나누어지게 되고, 그중 type A는 80kDa의 분자량을 가지고 있는 glyco-protein homodimer로써 황체 내에 존재한다. 또한 insulin-like growth factor binding protein4(IGFBP4)를 유리화함으로써 insulin-like growth factor(IGF)의 발생을 조절하고, 세포의 생존과 성장 분화 및 조직의 재구성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Adashi, 1998; Armstrong 등, 1998; Lawrence 등, 1999). 또한 임신 기간 중 주로 혈장에서 검출되며(Lin 등, 1974), 임신 지속에 따라 점차 증가하여 출산 시기에는 최고치를 보이다가 분만 이후 4주차까지 감소하여 소실된다(Sutcliffe 등, 1980; Bischof 등, 1981; McIntyre 등, 1981). 이와 같이 PAPP-A

는 임신기에만 특이적으로 역할을 하고 있는 것으로 알려져 왔으나, 비 임신 여성의 혈장, 불임 남성의 정액, 폐경기 전후의 자궁내막에서도 검출되어 임신기에만 나타나는 특이한 것이 아니라고 밝혀졌다(Duberg 등, 1982; Bischof 등, 1983).

PAPP-A는 임신 및 발정기의 자궁의 환경을 조절하는 기능을 하며(Bischof 등, 1982; Sjoberg 등, 1984; Bischof 등, 1986), 과립막 세포의 분할 및 황체 발달의 촉진에도 역할을 하지만 발정 기간 중에 황체 형성 및 발달에 직접적으로 영향을 주는지에 대해서는 불분명하다(Sjoberg 등, 1986; Bischof 등, 1987; Sinosich와 Saunders, 1987). 임신기간 동안 황체는 progesterone을 분비하여 임신을 유지하는데 20α-HSD는 progesterone 분비를 조절하며 prolactin에 의하여 필요에 따라 조절한다(Pineda 등, 1985; Nakajin 등, 1989). PAPP-A의 발현은 황체의 형성 발달에 따라 연관되어지며, progesterone의 발현에도 깊은 연관성이 있다.

따라서 본 연구는 소의 임신 초기의 황체에서 PAPP-A와 IGFBP4 mRNA 발현 양상을 비교분석하였다. 또한 임신황체

* Correspondence : E-mail : jtyoon@hknu.ac.kr

에서 분비되는 progesterone의 수준을 측정하여 연관성을 확인하였으며, progesterone 분비를 조절하는 20 α -HSD의 유전자와 발현 양상을 비교분석하였다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

본 연구는 임신 30, 60 그리고 90일의 각 3두의 소에서 혈액을 채혈하여 PAPP-A 및 progesterone의 농도를 분석하였으며, 임신 30일, 60일 및 90일 황체와 발정 주기 CH3와 CL3 단계의 황체를 각 3두에서 채취하여 면역학적 분석을 위하여 공시하였다.

2. Real-time PCR

각 시료의 RNA는 trizol reagent(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 추출하고, 1 μ g의 RNA를 1st strand synthesis using oligo (Oligo dT primer, Invitrogen, CA, USA.)를 이용하여 합성하여 cDNA를 제조하였다. 각 실험군에서 1 μ l의 cDNA를 주형으로 하였으며, one step SYBR RT-PCR kit(TaKaRa, Shiga, Japan)를 통하여 Real-time PCR을 3회 이상 반복하여 실험 결과를 분석하였다. 각 유전자의 primer는 Table 1과 같이 조성하였으며, 유전자 증폭의 정량은 geometric 지역의 semi-logamplification plot에 기초한 cycle threshold(Ct)값에 준하여 fold로 환산하여 계산하였다.

3. Western Blot

각 황체 시료는 액체질소에 보관하여 약 20 mg을 PRO-PREP™ (Intron biotechnology, Geyonggi, Korea)를 이용하여 추출하였고, Bradford 방법으로 정량하여 50 μ g을 취한 후 SDS-PAGE를 실시하고, polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 이동시켰다. 1시간 30분 동안 5% skim milk가 포함된 0.03%

tween-20 blocking buffer에 1시간 동안 방치 후 1:5,000으로 희석한 anti-20 α -HSD와 anti-PAPP-A를 4°C에서 20시간 동안 반응시켰다. TBS-T buffer로 수세한 후, HRP conjugated anti-rabbit IgG를 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 2차 항원 항체 반응을 유도하였다. 반응된 membrane은 TBS-T로 수세하고, 2 ml Lumi-light substrate solution를 첨가하여 X-ray film에 10분 가량 노출하여 현상하였다.

4. ELISA Assay

공시 시료의 혈액을 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 혈장을 추출하고, 각각의 시료는 assay buffer에 100배 희석하여 실험에 사용하였다. ELISA 분석은 progesterone 및 PAPP-A 항체로 coating된 96 well에 standard(0 pg/ml, 25 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1,000 pg/ml, 2,000 pg/ml)를 설정하여 첨가하였으며, assay buffer로 희석된 sample을 넣은 후, 200 μ l enzyme conjugate를 첨가하여 실온에서 반응시켰으며, 수세 후 100 μ l substrate solution을 넣어 실온에 15분 동안 반응하였고, stop solution을 50 μ l씩 첨가하여 450 nm 흡광도로 측정하였다.

5. Immunohistochemistry(IHC)

조직 면역학적 분석을 위하여 황체 조직을 70% ethanol로 탈수하였고, paraffin으로 고정하여 slide 제작 후 사용하였다. 각 paraffin slide는 xylene, 100% ethanol, 95% ethanol에 10분 동안 2회 반복하여 탈 파라핀을 유도하였고, 멸균수로 수세한 후 10 mM sodium citrate와 3% hydrogen peroxide 처리 후, 1×PBS로 수세하여 5% horse serum이 포함된 blocking solution으로 1시간 동안 방치하였으며, 1:200으로 희석한 anti-20 α -HSD와 anti-PAPP-A를 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 1×PBS로 수세 후, HRP conjugated anti-rabbit IgG를 1:300으로 희석하여 1시간 동안 2차 항원 항체 반응을 유도하였다. 이후 ABC

Table 1. Details of primers used for real-time PCR

Primer		Sequence
18srRNA	Forward	5'-TCGCGGAAGGATTTAAAGTG-3'
	Reverse	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
PAPP-A	Forward	5'-CGCCCAAACGGTCAAAGACT-3'
	Reverse	5'-GGGAGATTCCTGGTGCAGTA-3'
IGFBP4	Forward	5'-GAGCCCTGGTTATGTTTCCAA-3'
	Reverse	5'-GACCTGGGGAGGAGTAAAGG-3'
PR	Forward	5'-TGGTTTGAGGCAAAAAGGAG-3'
	Reverse	5'-CCCGGGACTGGATAAATGT-3'
20 α -HSD	Forward	5'-GTGAAGAGAGAAGACATATTC-3'
	Reverse	5'-CCACGTTGTATCTGGTAGCGAAGG-3'

detection kit로 실온에서 30분 동안 반응을 유도하였으며, DAB solution으로 발색하여 발현 유무를 확인하였다. 멸균수로 발색을 중지하였고, hematoxylin으로 count-stain을 한 후, 탈수화를 거쳐 permount(Fisher Scientific, NJ, USA)로 고정하여 광학현미경으로 각 200×, 400×로 분석하였다.

6. 통계 처리

Real-time PCR의 실험적 통계학적 분석은 SAS package를 이용하였고, 분석 값은 mean±SD로 나타냈으며, 군 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

1. 소의 임신 초기 혈장에서 PAPP-A 및 Progesterone의 발현 양상

초기 임신 기간의 혈액에서 혈장을 분리하여 ELISA로 PAPP-A 및 progesterone의 농도를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. PAPP-A는 30일에서 60일까지 점차 낮아지다가 90일째에 가장 높게 발현되었으며, progesterone의 경우 임신 30일에서 60일까지 농도는 점차 높아져 60일에서 가장 높은 발현을 하였고, 90일에는 약간 감소하였다.

2. mRNA에서의 각 유전자의 발현 양상 분석

소의 초기 임신인 30, 60, 90일의 황체 조직에서의 PAPP-A, 20α-HSD, PR 및 IGFBP4의 발현 양상을 Real-time PCR로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 임신 30, 60, 90일에서 PAPP-A의 발현 양상을 PR와 비교한 결과, 서로 상반된 결과를 보이고 있었다. 임신 90일 황체에서 PAPP-A와 20α-HSD의 발현 양상은 높게 나타났으며, 60일 때 가장 낮게 발현되었다. IGFBP4의 경우, 임신 60일 때 가장 높고, 90일에는 낮았다. ELISA 분석 결과인 Fig. 1에서 보는 바와 같이 PAPP-A와 progesterone의 발현은 서로 상반된 결과를 보이고 있었다.

3. 임신 황체 조직에서의 PAPP-A와 20α-HSD의 단백질 발현 양상

임신 초기의 황체와 발정기 중 CH3, CL3의 황체에서 PAPP-A와 20α-HSD의 발현 양상을 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 임신 30, 60, 90일의 황체에서 PAPP-A와 20α-HSD는 같은 발현 양상을 보였고, 임신이 지속됨에 따라 그 발현이 점차 증가하는 양상을 나타내었으며, 임신 90일에서 PAPP-A와 20α-HSD 모두 발현이 가장 높게 나타났다. 발정기의 황체에서도 PAPP-A와 20α-HSD의 발현 양상은 서로 같았으며, CH3보다 CL3에서 좀 더 높은 발현이 나타났다. 또한 임신 황체와 그 발현 차이가 뚜렷하게 나타났다.

4. Large Luteal Cell에서의 PAPP-A와 20α-HSD의 발현 양상

각 황체 조직 내의 PAPP-A와 20α-HSD 발현 양상을 조직면역화학적으로 분석한 결과는 Fig. 4 및 5와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 PAPP-A는 황체세포의 세포질에서 발현하는데, 발정기의 황체세포(A)에 비하여 임신기의 황체세포(B)에서 더욱 강하게 발현되었다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 PAPP-A 및 20α-HSD는 임신 30, 60, 90일의 황체에서 발현되었으며, 임신 30일의 황체에서 60일의 황체보다 발현이 높았고, 임신 90일 황체에서 가장 높게 발현하였다. PAPP-A는 발정황체에서 뚜렷한 발현을 확인할 수 없었지만, 20α-HSD의 경우는 CH3단계에서 임신 30일의 발현 양상과 비슷한 경향을 보였다.

고 찰

임신 기간 중에 발현되는 PAPP-A는 사람의 임신을 확인할 수 있는 표지 유전자로 알려져 왔으나, 타 동물종에 있어서는 기능과 역할이 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 소에서 임신 초기의 황체의 형성과 발달에 따른 PAPP-A의 발현 양상을 구명하기 위하여 IGFBP4의 발현 양상을 mRNA에서 비교 분석하였고, 황체의 발육에 따른 progesterone의 수준을 측정하여

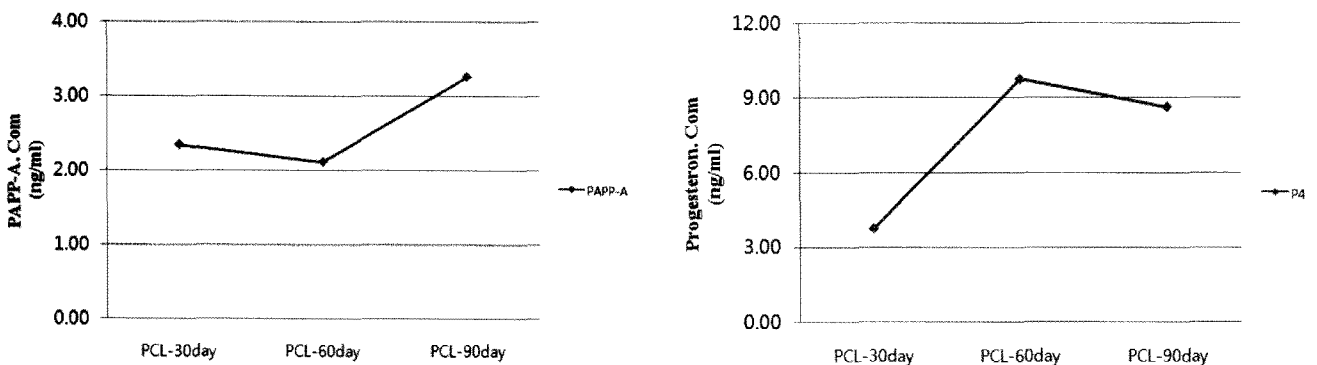


Fig. 1. Expression of progesterone and PAPP-A protein in the bovine corpus luteum during early pregnancy. A: PAPP-A, B: Progesterone (PCL : pregnancy corpus luteum).

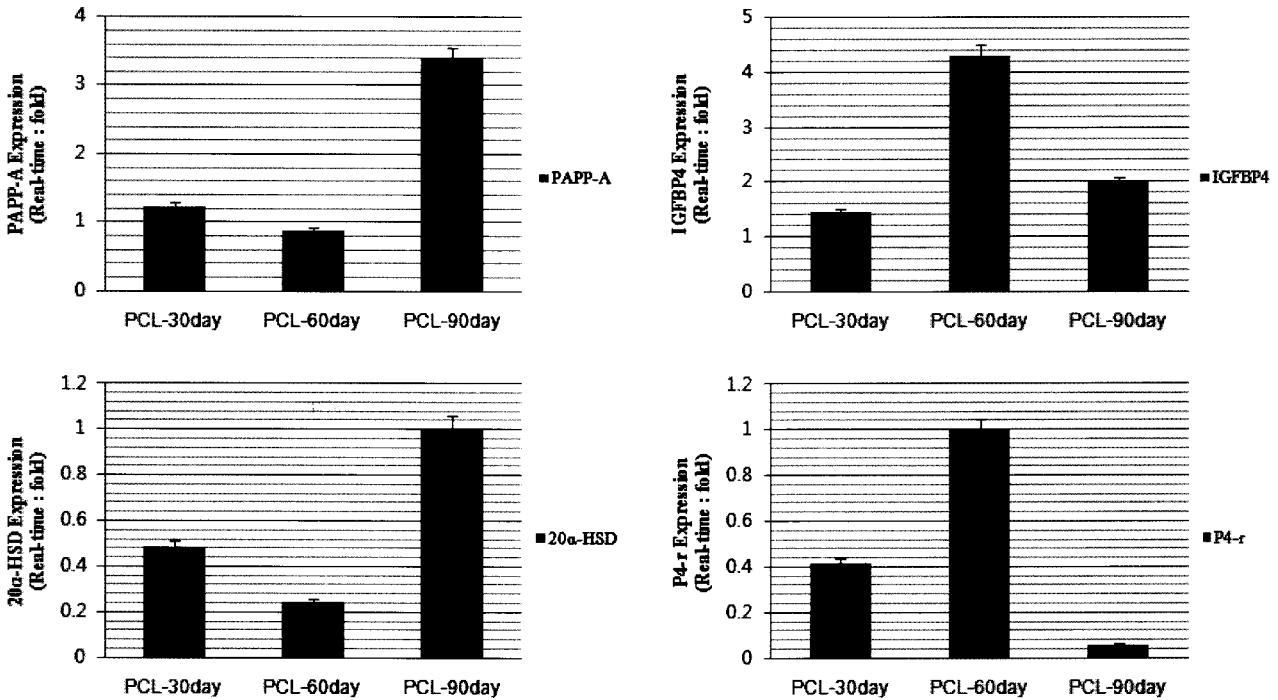


Fig. 2. Expression of PAPP-A, IGFBP4, progesterone receptor and 20α-HSD in bovine corpus luteum during pregnancy. The expression levels were normalized to 18sr. Each bar is the mean ± SD ($p < 0.05$).

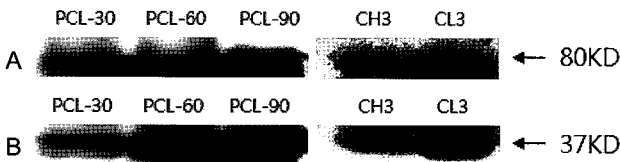


Fig. 3. Expression of PAPP-A and 20α-HSD in bovine corpus luteum during pregnancy and estrus cycle. A: PAPP-A, B: 20α-HSD.

연관성을 확인하였다. 또한 progesterone 분비를 조절하는 20α-HSD의 유전자와 PAPP-A 유전자의 발현 양상을 비교분석하였다.

각 유전자를 분석한 결과, PAPP-A와 20α-HSD 모두 임신 90일의 황체세포에서 높은 발현을 확인할 수 있었으나, 황체에서 형성되는 PR의 발현과는 상반되게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 임신 30일에 높게 발현되던 PAPP-A가 60일에서는 둔화되었다가 다시 90일에 높게 발현되는 것으로 보아 임신기 동안 일정 수준으로 발현되는 것으로 보이지 않았다. 본 결과는 Sinosich와 Saunders(1987)가 보고한 바와 같이 황체세포 발달에 직접적인 영향을 미친다는 결과와는 다소 차이가 있었다. 소의 초기 임신 기간 중의 발현 양상은 Bischof(1981)의 보고와 같이 인간의 임신 유지 기간 중에 발현되는 양상과 같은 결과이었으며, 발정 황체에 비하여 임신 황

체에서 많이 발현되고 있어 임신을 특정 지을 수 있는 지표가 될 수 있을 것이라 사료된다(Lawrence JB 등, 1999; Adashi, 1998). 20α-HSD와 PAPP-A의 발현 양상이 황체의 발달 과정에서 비슷하게 발현되는 것으로 보아 황체세포의 형성과 발육과정에서 상호 연관성이 있을 것으로 사료되었다(Geissler, 1994). 초기 임신 황체 조직의 mRNA에서 PAPP-A는 IGFBP4의 발현과 상반된 발현 양상(Santiago 등, 2005; Canty 등, 2006)을 나타내고 있어 착상 이후 태아 발육의 초기보다 발육이 급격하게 진행되는 시점으로 갈수록 황체의 발육 형성과 자궁의 환경을 유지하기 위한 수단으로 PAPP-A는 적절하게 IGFBP4를 유리화 하는 것으로 사료된다(Perks 등, 1999). 또한 황체의 mRNA와 단백질 발현 양상의 차이는 IGFBP4의 유리화 단계에서 활성화를 위한 단백질 전사 시점의 차이가 있는 것으로 사료된다(Henning 등, 2007). Conover 등(2004)의 보고와 같이 IGFBP4는 황체의 발육이 충실해지는 시기에 높게 발현하고, 이에 따라 IGF를 활성화하기 위하여 PAPP-A의 발현도 높아지는 것을 알 수 있었다. PAPP-A는 황체세포의 재구성에 영향을 미치며, 20α-HSD의 발현도 황체 발달 시기에서부터 황체 재구성에 중요한 역할을 하며, 임신 초기 황체의 형성과 발달에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(Mazerbourg 등, 2001; Santiago 등, 2005; Aad 등, 2006; Henning, 등 2007). PAPP-A의 발현 양상은 progesterone 분비 양상과는 상반되게 나타나며, progesterone이 가장 많이 분비되는 60일에

PAPP-A의 발현이 낮은 것으로 보아 PAPP-A가 progesterone의 발현과 연관성이 있는 것을 알 수 있었다(Connely 등, 2003). 또한 PAPP-A는 follicle stimulating hormone(FSH)과 estradiol (E2)에 의해서 발현이 촉진되지만(Rivera와 Fortune, 2001; Santiago 등, 2005), PAPP-A의 높은 발현은 progesterone의 분비를 억제하는 것으로 보인다. PAPP-A가 IGF의 체계를 확고하게 하여 난포 발달을 촉진시키며, 임신기에서도 황체의 형성

및 발달에 연관성이 있었다(Sudo 등, 2007). 따라서 본 연구결과에서 PAPP-A는 소의 임신 초기 황체의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 소의 임신 초기 황체에서 PAPP-A의 발현에 따라 황체의 형성과 발달에 미치는 영향을 알아보려 하였다. 혈청에서 PAPP-A와 progesterone의 농도를 분석한 결과, PAPP-A는 임신 30일에서 60일로 임신이 지속될수록 PAPP-A의 발현이 점차 낮아졌다가 90일이 되면서 다시 발현이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. Progesterone은 임신 30일에서 60일로 진행됨에 따라 발현이 높아졌으며, 90일에서는 소폭 감소하였다. PAPP-A와 PR의 mRNA 발현 양상은 상반된 경향을 나타내었으며, 20 α -HSD와의 발현 양상은 동일하였다. IGFBP4의 경우 progesterone과 비슷한 발현 양상을 나타내었다. Western blot을 통한 PAPP-A, 20 α -HSD 단백질 발현은 임신 30일에서

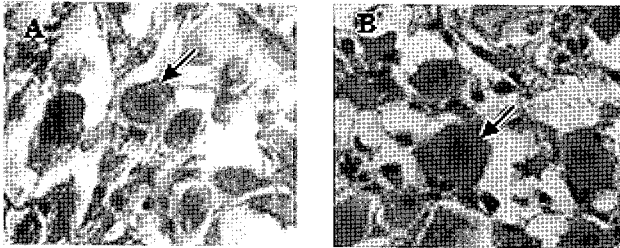
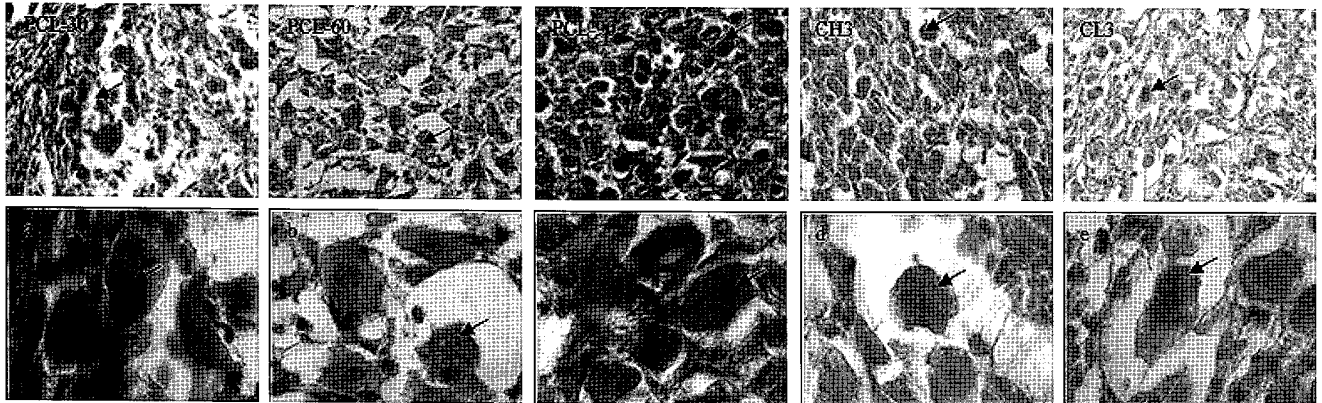


Fig. 4. Immunohistochemistry analysis of PAPP-A in bovine corpus luteum cell. A: Estrus CL3, B: Pregnancy 30 day ($\times 400$).

PAPP-A



20 α -HSD

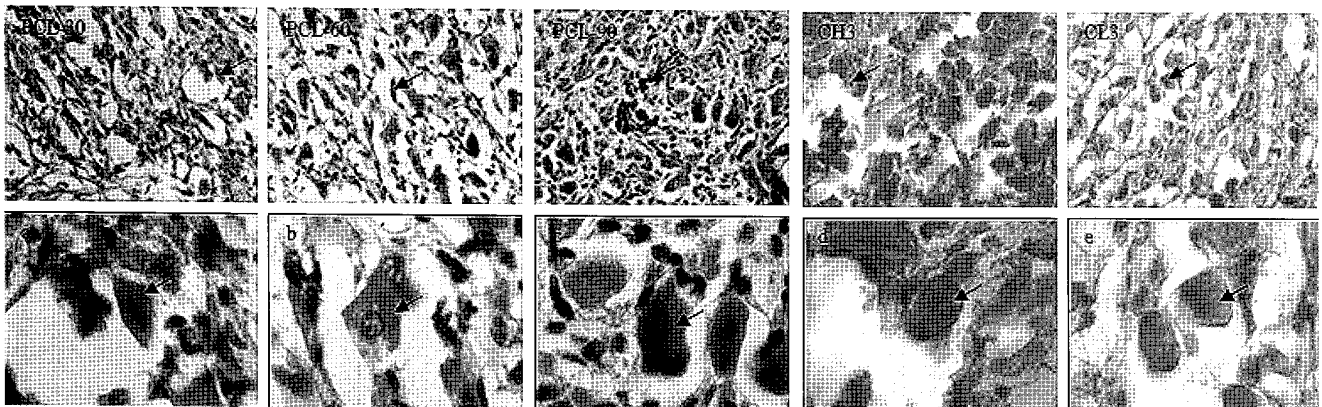


Fig. 5. Immunohistochemistry analysis of PAPP-A and 20 α -HSD in bovine corpus luteum of pregnancy. PCL-30: Pregnancy corpus luteum 30 day, PCL-60: Pregnancy corpus luteum 60 day, PCL-90: Pregnancy corpus luteum 90 day, CH3: Corpus hemorrhagicum 3, CL3: Corpus luteum 3 ($\times 200$), The arrow points were zoomed (a-e: $\times 400$).

90일에 증가되었고, 발정기의 황체에서는 임신기보다는 발현이 낮았다. Immunohistochemistry를 통한 PAPP-A와 20 α -HSD의 발현을 확인한 결과, Real-time PCR 결과와 동일하게 임신 60일보다 30일에서 발현이 좀 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 임신 90일에 가장 높은 발현을 보였다. 또한 발정기황체에서는 큰 차이를 확인할 수 없었으나, western blot 결과와는 다르게 CH3에서 조금 높은 발현을 나타내었다. 본 연구 결과 PAPP-A는 발정기, 그리고 임신기의 20 α -HSD와 동일한 발현을 보이고 progesterone을 효율적으로 조절하며, IGFBP4를 유리화하여 임신 초기 황체의 발달과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aad PY, Voge JL, Santiago CA, Malayer JR and Spicer LJ. 2006. Real-time RT-PCR quantification of pregnancy-associated plasma protein-A mRNA abundance in bovine granulosa and theca cells: Effects of hormones *in vitro*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31:357-372.
- Adashi EY. 1998. The IGF family and folliculogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 39:13-19.
- Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA and Webb R. 1998. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139:2146-154.
- Bischof P, Duberg S, Herrman W and Sizonenko PC. 1981. Pregnancy associated plasma protein-A(PAPP-A) and HCG in early pregnancy. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 88:973.
- Bischof P, Duberg S, Schindler AM, Obradovic D, Weil A, Faigaux R, Hermann W and Sizonenko PC. 1982. Endometrial and plasma concentrations of pregnancy associated plasma protein-A(PAPP-A). *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 89:701.
- Bischof P, Martin-Dupan K, Lauber K, Girard JP, Hermann W and Sizonenko PC. 1983. Human serial plasma contains a protein that shares physiochemical, immunochemical, and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein-A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:359.
- Bischof P, Rapin CH, Weil A and Hermann W. 1982. Is pregnancy-associated plasma protein A a tumor marker? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 143:379.
- Bischof P. 1984. Placental proteins. *Contrib. Gynecol. Obstet.* 12:1-96.
- Bischof P. 1987. Pregnancy proteins. *Ann. Endocrinol.* 48:289-299.
- Bischof P, Hermann WL and Sizonenko PC. 1986. Pulsatile secretion of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in nonpregnant women. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 93:600-605.
- Canty MJ, Boland MP, Evans AC and Crowe MA. 2006. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 93:199-217.
- Conneely OM, Jericevic BM and Lydon JP. 2003. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 8:205-214.
- Conover CA, Chen BK and Resch ZT. 2004. Regulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human osteoblasts. *Bone* 34:297-302.
- Duberg S, Bischof P, Schindler AM, Beguin F, Herrmann W and Sizonenko PG. 1982. Tissue and plasma concentration of pregnancy associated plasma protein-A(PAPP-A): Comparison with other fetoplacental products. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 89:352.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW and Andersson S. 1994. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat. Genet.* 7:34-39.
- Henning BB and Cheryl AC. 2007. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGF-BPs. *Growth Hormone & IGF Research.* 17:10-18.
- Lawrence JB, Bale LK, Haddad TC, Clarkson JT and Conover CA. 1999. Characterization and partial purification of the insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4-specific protease from human fibroblast conditioned media. *Growth Horm. IGF Res.* 9:25-34.
- Lin TM, Halbert SP, Kiefer D and Spellacy WN. 1974. Three pregnancy-associated human plasma proteins: purification, monospecific antisera and immunological identification. *Int. Arch. Allergy* 47:35-53.
- Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN and Gall S. 1974. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 118:223-236.
- Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover CA, Laurendeau I, Vidaud M, Tosser-Klopp G, Zapf J and Monget P. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ova-

- rian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology* 142:5243-5253.
- McIntyre JA, Hsi B, Faulk WP, Klopper A and Thomson R. 1981. Immunological studies of the human placenta functional and morphological analysis of pregnancy-associated plasma protein-A(PAPP-A). *Immunology* 44:577.
- Nakajin S, Kawai Y, Ohno S and Shinoda M. 1989. Purification and characterization of pig adrenal 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid. Biochem.* 33:1181-1189.
- Perks CM, Peters AR and Wathes DC. 1999. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 116:157-165.
- Pineda JA, Salinas ME and Warren JC. 1985. Purification and characterization of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from bull testis. *J. Steroid. Biochem.* 23:1001-1006.
- Rivera GM and Fortune JE. 2001. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol. Reprod.* 65:112-118.
- Santiago CA, Voge JL, Aad PY, Allen DT, Stein DR, Malayer JR and Spicer LJ. 2005. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28:46-53.
- Sinosich MJ and Saunders DM. 1987. Potential role of pregnancy-associated plasma protein-A in human reproduction. *J. Reprod. Immunol.* 10:55-65.
- Sjoberg J, Wahlstrom T and Seppala M. 1984. Pregnancy-associated plasma protein A in the human endometrium is dependent on the effect of progesterone. *Clin. Endocr. Metab.* 58:359-362.
- Sjoberg J, Wahlstrom T, Grudzinskas JG and Sinosich MJ. 1986. Demonstration of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)-like material in the fallopian tube. *Fertil. Steril.* 45:517-521.
- Spicer LJ and Echtenkamp SE. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12:223-245.
- Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M and Miyamoto A. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Molecular and Cellular Endocrinology* 264:197-203.
- Sutcliffe RG, Kukulias-Langlands BM, Coggins JR, Hunter JB and Gore CH. 1980. Studies on human pregnancy-associated plasma protein. *Biochem. J.* 191:799.

(접수: 2011. 2. 24 / 심사: 2011. 2. 25 / 채택: 2011. 3. 4)