

한우 난포낭종에서 증가되는 섬유소원 유전자 발현

탁현민^{1,2}, 한재희¹, 강다원^{1,*}

¹경상대학교 의학전문대학원 생리학교실, ²진주산업대학교

Fibrinogen mRNA Expression Up-Regulated in Follicular Cyst of Korean Cattle

Hyun-Min Tak^{1,2}, Jaehee Han¹ and Dawon Kang^{1,*}

¹Department of Physiology, Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, Korea

²Animal Resources Technology, College of Life Sciences and Natural Resources, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT

Follicular cystic ovary (FCO) is one of the major causes of reproductive failure in cattle. Genetic alterations affect the function of diverse cells and/or tissues, which could be present in cystic ovaries. A microarray analysis was performed to screen differential gene expressions in follicular cystic follicles of cattle. In this study, we hypothesized that follicular cysts may be induced by changes in ion- and transporter-related gene expression. Microarray data showed that fibrinogen-gamma (FGG) and low density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) were up-regulated, while choline transporter-like protein 4 (SLC44A4), very long-chain acyl-CoA synthetase homolog 2 (SLC27A5), annexin 8 (ANXA8), and aquaporin 4 were down-regulated in follicular cystic follicles. A semi-quantitative RT-PCR was carried out to validate DEGs altered in follicular cystic follicles. Of six DEGs, three DEGs (FGG, SLC44A4, and aquaporin 4) showed a positive correlation between microarray and semi-quantitative PCR data. We focused on FGG, among three DEGs, which was highly up-regulated in follicular cystic follicles. The FGG mRNA was up-regulated by 8.4-fold and by 1.7-fold in the bovine follicular cystic follicles as judged by microarray and RT-PCR analysis, respectively. However, there was no significant changes in the expression level of FGG protein in both follicular cystic follicles and granulosa cells isolated from follicular cystic follicles by Western blot analysis. Although this study does not reveal a positive correlation between the mRNA and protein level, FGG appears to be an important biomarker in the discrimination of follicular cyst from normal ovary.

(Key words : Korean cattle, microarray, follicular cyst, fibrinogen)

서 론

한우의 번식 장애 질환 중 난소낭종은 축산 농가의 경제적 손실을 가져오는 주 요인 중의 하나이다(Choe 등, 2006). 난소 낭종은 난소의 접막에 부종과 염증이 일어나 난포가 형성되며, 10일 이상 직경 25 mm 이상의 배란되지 않은 난포가 존재한다(Lucy 등, 1992). 난소낭종은 난포낭종과 황체낭종으로 분류하며, 각각의 고유한 특징이 존재한다. 난포낭종의 형성 기전은 정확히 알려져 있지 않으나 호르몬의 불균형에 의한 배란 지연으로 설명되고 있다(Hamilton 등, 1995; Peter, 2004).

유전자의 변화는 다양한 세포 및 조직에서 나타나는 기능

들을 변화시킬 수 있으며(Hauptmann 등, 2002; Osterberg 등, 2006), 난포낭종 역시 유전자의 변화를 경험할 수 있을 것이다. 최근 연구에서 소의 난소에 잔류하고 있는 과립층세포와 증식하는 난포 사이에 유전자 변화가 관찰되었다(Lingenfelter 등, 2008).

본 연구에서는 이온 및 수송체 등의 변화가 난포내의 수분 및 이온들의 변화를 초래하여 난포낭종을 유발할 수 있을 것이라는 가설 하에 마이크로어레이 방법을 이용하여 5~10 mm 난포와 25 mm 이상의 난포에서 변화되는 유전자를 비교·분석하였다. 25 mm 이상의 난포는 난포낭종성 난포로 분류하였다. 마이크로어레이를 통하여 비교·분석된 유전자

* 본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 20080101-080-057-001-01-00호)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : dawon@gnu.ac.kr

는 역전사증합 효소 연쇄 반응과 웨스턴 블랏 분석을 통하여 유전자의 mRNA와 단백질 발현을 재확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 배양액

본 연구에 이용된 한우의 난소는 도축장으로부터 회수되어 저온 상태(4℃)에서 실험실로 운반되었다. 난소는 세절 없이 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 신속하게 2배 이상 부피의 RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)에 담가 4℃에서 12시간 이상 보관하였다. 준비된 시료에서 RNAlater를 제거한 후 -80℃로 옮겨 RNA 분석 실험 시까지 보관하였다. 단백질 분석용 난소는 저온 상태의 PBS에 담가 실험실까지 운반하였다. 난포낭종은 도축장에서 회수된 난소의 형태학적 병리학적 소견을 근거하여 구분하였다(Choe 등, 2008).

2. 과립층세포 수집

18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 직경 5~10 mm의 정상 난포와 25 mm 이상의 난포낭종성 난포의 난포액을 각각 흡입 회수하였다. 70 μm filter를 이용하여 난자를 제거하고 10분간 800×g로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. NH₄-Tris 완충제(Sigma, St Louis, MO, USA) 10 ml를 넣고 피펫팅한 후 5분간 800×g로 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법을 3회 반복하여 혈구세포를 파괴 및 제거시켰다(Chae 등, 2009). 분리된 과립층세포는 RNA 및 단백질 분석에 사용되었다.

3. 마이크로어레이 분석

난소로부터 난포 주변 조직을 분리하여 RNA를 추출한 후

cRNA를 합성하고 정제한 후, 표지된 cRNA 10~15 μg을 분절 용액(fragmentation buffer, Affymetrix Inc, CA, USA)으로 35 bp에서 200 bp까지 분절시켰다. 만들어진 cRNA, 분절용액 및 RNA 분해 효소가 없는 물(RNase free water)을 0.2 ml PCR tube에 넣고 94℃에서 35분간 반응을 유도하였다. 분절된 cRNA는 GeneChip[®] Bovine Genome Array Chips(Affymetrix)을 이용하여 제조사의 실험 과정에 따라 실험을 진행하였다. 어레이(array)들은 streptavidin-phycoerythrin complex를 가지고 염색한 후 GeneChip Operating Software(Affymetrix, CA, USA)로 강도를 조정하여 GeneChip scanner 3000(Affymetrix)을 이용하여 스캔하고 발현 패턴을 분석하였다. 마이크로어레이 분석의 전 과정은 서린 바이오에 의뢰하였다(agency of Affymetrix Gene Chip, Seoul, South Korea).

4. 정량적 역전사증합효소증합반응(qRT-PCR)

Total RNA는 TRIzol(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 정상과 난포낭종을 보이는 난소의 난포를 포함한 난포 주변 조직으로부터 추출되었다. 추출된 total RNA는 Superscript preamplification system(Invitrogen)과 oligo(dT)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 합성된 cDNA는 소(bovine)에 특징적으로 작용하는 primer를 이용하여 증폭하였다(Table 1). 증폭산물은 열기서열 분석을 통하여 확인하였다. 각 유전자의 mRNA 발현량은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

5. 웨스턴블랏 분석(Western Blot Analysis)

난포와 과립성 세포에서 섬유소원의 단백 발현을 확인하기 위하여 웨스턴블랏 분석을 실시하였다. 시료를 D-PBS로 씻은

Table 1. Bovine-specific primer sequences used for RT-PCR

Gene symbol	GenBank accession Nos.	Primer sequences (5'~3')	Expected size (bp)
FGG	NM_173911	Sense: CATTGGTGGAGATGCTGGAG Antisense: TTCCATGTGGCCCAAATAA	276
LRP8	NM_001097565	Sense: AGCCCATCCCTGATCTTCAC Antisense: CACGGAGATGGTCTTGTGTC	310
SLC44A4	NM_001083442	Sense: TGTTCTTTGGGAAGCTGCTG Antisense: GGACATGTAGTAGGGCCGGT	268
SLC27A5	NM_001034567	Sense: TCGGCTTCATCAACTATCCG Antisense: CACGTGCTGGTACAGCCTCT	533
ANXA8	NM_174241	Sense: TTGAAGTCGGAGCTGAGTGG Antisense: GAATCCTCTCCAGGTAGCCG	252
Aquaporin 4	NM_181003	Sense: TTCCCTAAAATACATGCAAGA Antisense: TAATTCATGGAAATCAACCAC	491

후 1.5 ml 튜브에 분해 용액(lysis buffer; RIPA buffer, Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)을 넣어 분쇄하였다. 분쇄된 조직들을 4°C에서 30분간 배양한 후 13,000 rpm (16,609×g, Micro 17TR, Hanil, Korea)에서 4°C에서 30분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상층액을 새로운 1.5 ml 튜브로 옮겨 Bradford protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시약을 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질 50 µg을 각 웰에 넣고 8% SDS-PAGE에서 전기영동 하여 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(0.45 µm, Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기영동된 단백질을 옮겨, blocking 용액(5% fat-free milk and 0.05% Tween 20 in TBS), 1차 항체(Anti-fibrinogen γ , Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), 2차 항체(Anti-goat IgG-HRP, Sigma, St Louis, MO, USA)를 차례로 처리한 후 암실에서 enhanced chemiluminescence(ECL Plus kitELPIS, Taejeon, Korea)를 이용하여 섬유소원 단백질을 증폭시킨 후 단백질 존재를 확인하였다. 각 단백질의 발현량은 β -actin의 발현량으로 정량·비교 분석하였다.

6. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처리구간의 유의성을 검정하였고($p < 0.05$), 결과들은 평균±표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 난포낭종에서 변화되는 이온 및 수송체 관련 유전자 선별

이온 및 물의 이동 장애로 25 mm 이상의 큰 낭종성 난포가 발생할 수 있을 것이라는 가설 하에 마이크로어레이 분석을 실시하여 난포낭종성 난포에서 변화되는 유전자들 중 이온 및 수송체와 관련된 유전자를 선별하였다. 두 배 이상 변화되는 유전자(differentially expressed genes; DEG)를 의미 있는 유전자로 간주하여($\log_2^2=1$) 정리하였다. 25 mm 이상의 난포에서 1,852개의 유전자가 확인되었으며, 그 중 934개는 증가하고 918개는 감소하였다. 이온 및 수송체와 관련된 유전자는 증가하는 유전자(934개) 중 85개, 918개의 감소 유전자 중 35개의 유전자가 포함되었다. DEG 중 난포낭종에서 두드러지게 변화되는 유전자 fibrinogen gamma polypeptide(FGG, 8.4배 증가), low density lipoprotein receptor-related protein 8(LRP8, 8.0배 증가), choline transporter-like protein 4(SLC44A4, 4.6배 감소), very long-chain acyl-CoA synthetase homolog 2(SLC27A5, 4.4배 감소), annexin 8(ANXA8, 6배 감소) 및 aquaporin 4(7배 감소)를 선별하였다(Table 2). 정상에 비해 난포낭종 어레이에서 증가(up)/감소(down)하는 이온 및 수송체 관련 유전자는 유전자 존재론(Gene ontology) 정보 분석을 통하여 정

Table 2. Ion- and transport-related genes regulated in follicular cystic follicles

Gene name (Gene symbol)	GenBank accession Nos.	Fold change
Fibrinogen, gamma polypeptide (FGG)	NM_173911	+8.4
Low density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8)	XM_585204; XM_865091; XM_874961	+8.0
Aquaporin 4	NM_181003	-7.0
Annexin A8 (ANXA8)	NM_174241	-6.0
Choline transporter-like protein 4 (SLC44A4)	NM_001083442.1	-4.6
Very long-chain acyl-CoA synthetase-related protein (SLC27A5)	NM_001103273.1	-4.4

리 되었으며(www.godatabase.org), 이들 유전자들의 분자적 기능은 주로 이온과의 결합을 들 수 있다. FGG와 LRP8은 칼슘 이온과의 결합에 관여하고 특히, LRP8은 수용체 활성화에 관여한다. Aquaporin 4는 물 채널로서 수용체 역할을 하며 난포 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. ANXA8은 칼슘 이온 및 인지질 결합에 관여한다. SLC44A4와 SLC27A5는 이온 및 수송체와 관련 있는 유전자로 분류되나 아직 정확한 분자적 기능은 알려져 있지 않다.

2. 난포낭종에서 발현 변화를 보이는 DEG의 검증

난포낭종에서 선별된 대표 DEG 6개를 정량적 역전사중합효소 연쇄 반응으로 mRNA 발현 변화를 검증하였다. 마이크로어레이 분석에서 증가하는 DEG 2개(FGG와 LRP8)와 감소하는 DEG 4개(SLC44A4, SLC27A5, ANXA8 및 aquaporin4)를 정량적 역전사중합효소 연쇄 반응 방법으로 재확인한 결과, 마이크로어레이 결과와 동일하게 FGG는 난포낭종성 난포에서 mRNA 발현이 73.5±13.5% 증가하였고, SLC44A4와 aquaporin은 난포낭종성 난포에서 각각 69.0±10.0%, 36.7±7.6% 감소하였다($n=5$, $p < 0.05$, Fig. 1A와 1B). 가장 큰 변화를 보인 FGG에 대해 추가적인 단백질 발현 및 난포액내 섬유소원의 농도를 측정하였다.

3. 섬유소원의 단백질 발현

먼저 난포액내에 존재하는 섬유소원의 농도를 측정하였다. 5~10 mm의 난포에서 채취된 난포액과 25 mm 이상의 난포에서 채취된 난포액에서 섬유소원의 농도를 측정된 결과, 각각 44.5±1.3 mg/dl와 53.6±7.8 mg/dl를 보였다. 유전자의 발현

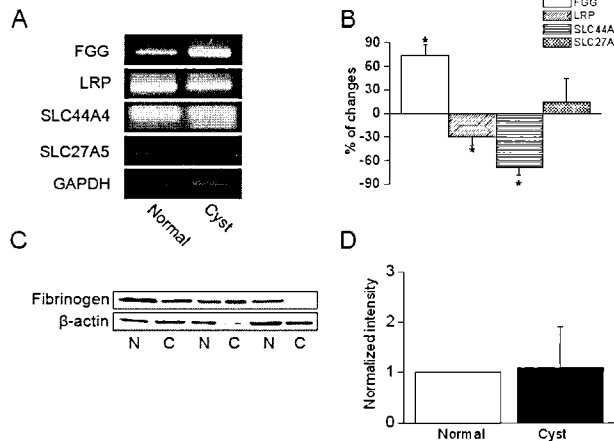


Fig. 1. Expression and validation of fibrinogen in follicular cystic follicles. (A) RT-PCR products for FGG, LRP, SLC44A4, and SLC27A5 from bovine follicles. Their mRNA expression levels were normalized to that of GAPDH. Normal and cyst represent normal follicles and follicular cystic follicles. (B) Expression level of FGG, LRP, SLC44A4, and SLC 27A5 derived from normal and follicular cystic follicles. Each bar represents mean \pm SD of five experiments. The asterisks indicate a significant difference from the control value obtained for normal follicles ($p < 0.05$). (C) Western blot analysis of fibrinogen in bovine follicular cystic follicles. N and C represent normal and follicular cystic follicles. (D) The bar graph shows normalized protein levels of fibrinogen in follicular cystic follicles. The expression levels were normalized to β -actin. Each bar represents mean \pm SD of five experiments.

변화와 동일한 형태로 난포낭종에서 섬유소원의 농도가 유의적으로 높게 나타났다($n=7, p < 0.05$). 이러한 발현 변화를 단백질 수준에서 확인하였다. 섬유소원 단백질 발현은 먼저 난포를 대상으로 실시하였다. Fig. 1C에서 보여주는 바와 같이 정상과 난포낭종성 난포에서 발현되는 섬유소원 단백질은 각 개체마다 동일한 발현 형태가 아닌 다른 발현 형태를 보였다. 어떤 개체에서는 증가를 어떤 개체에서는 감소를 보였다. 각 개체를 합하여 통계 처리한 결과, 난포낭종성 난포에서 섬유소원 단백질의 유의한 발현 증가를 확인할 수 없었다($p > 0.05$, Fig. 1D). 난소의 난포로부터 과립층세포를 분리하여 섬유소원의 발현 여부 및 변화를 재확인하였다. 정상 난포의 과립층세포에서는 섬유소원의 mRNA와 단백질 발현이 관찰되었지만 난포낭종성 난포로부터 회수된 과립층세포에서는 섬유소원의 mRNA 발현이 현저히 낮아 확인이 어려웠다(Fig. 2A). 단백질 발현은 유전자 발현과는 달리 쉽게 확인되었지만 개체마다 차이가 있어 정상에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$, Fig. 2B와 Fig. 2C).

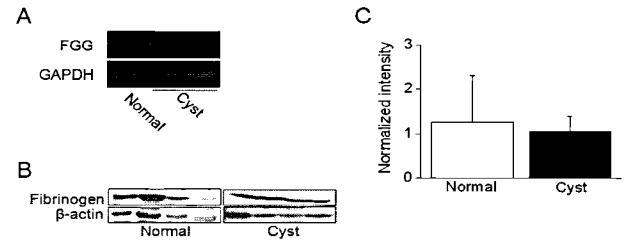


Fig. 2. Expression of fibrinogen in granulosa cells isolated from bovine follicles. (A) RT-PCR products for FGG in granulosa cells isolated from normal and follicular cystic follicles. The mRNA expression level was normalized to that of GAPDH (B) Fibrinogen protein expression in granulosa cells. The expression levels were normalized to β -actin. (C) The bar graph shows normalized protein levels of fibrinogen in granulosa cells isolated from normal and follicular cystic follicles. Each bar represents mean \pm SD of three experiments.

고찰

한우의 난포낭종에서 이온 및 수송체와 연관된 유전자를 조사한 결과 섬유소원이 난포낭종성 난포에서 유의적으로 증가되는 DEG로 확인되었다. 그러나 섬유소원은 유전자 수준에서와는 달리 단백질 수준에서는 유의한 변화를 보이지 않았다. 한우 난포, 과립층세포 및 난포액내에서는 섬유소원의 발현이 확인되었지만 유전자 수준과 단백질 수준에서 발현의 차이가 존재하여 추가적인 분석이 요구된다.

섬유소원은 지혈 반응 동안 생성되는 혈병(blood clot)의 주요 성분 중의 하나인 섬유소의 전구 물질로 칼슘 이온과 결합하는 폴리펩티드(polypeptide)이다. 섬유소원은 지혈 작용에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 감염, 상처 치유, 고형암의 진행과정 및 죽상경화(atherosclerosis)와 같은 생리학적·병태생리학적 상황에도 작용한다. 또한 섬유소원은 임신 유지 및 배발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Iwaki와 Castellino, 2005). 난소에서 섬유소원의 역할은 무엇일까? 섬유소원은 배란 시 파열된 조직의 응고 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Parrott 등, 1993). 난포 및 난포액에서 섬유소원의 존재에 관한 보고는 오래전으로 거슬러 올라가는데(Shalgi 등, 1973), 사람의 난포액 내 섬유소원 농도는 혈액의 약 40%를 차지하며(Shimada 등, 2001) 배란 시 난자가 방출될 수 있도록 난포액의 유동성을 적절하게 유지시켜준다. 난포낭종성 난포, 난포액 및 과립층 세포에서 섬유소원의 유전자 수준 및 농도가 높은 이유는 무엇일까? 난포액에서의 섬유소원의 존재는 과립층세포로부터 분비가 큰 요인이 될 수 있다(Parrott 등, 1993). 과립층세포에서 섬유소원의 높은 분비는 응고 작용을 촉진시킴으로써 세포의 성장을 억제할 수 있을

것으로 생각된다. 그 결과 배란 장애가 나타날 수 있을 것이다. 섬유소원은 칼슘 이온과 결합을 통하여 다양한 세포 기능을 조절할 수 있으므로 섬유소원의 증가는 유리 칼슘 이온의 농도 불균형을 초래하고 그에 따른 결과로 세포의 다양한 기능은 변화를 맞이할 것이다.

섬유소원에서 간과할 수 없는 또 다른 한 가지는 염증과의 관련성이다. 최근 섬유소원은 급성염증과 관련하여 심장혈관 질환의 대표적인 생물표지자로 확인되고 있다(Whiteley 등, 2009). 본 연구에 사용된 난포낭종 시료의 염증 정도는 연구진의 선행 연구에서 확인한 바와 같이 에오타신의 mRNA가 난포낭종에서 유의적으로 증가하였다(Choe 등, 2008). 에오타신은 급성·만성 염증 반응에서 호산구에 특이적으로 작용하는 CC 케모카인으로 염증세포를 표적 부위로 이동시키는 강력한 화학주성물질로 작용하며 섬유화와 관련된 각종 다양한 사이토카인을 분비시킨다(Garcia-Zepeda 등, 1996). 에오타신과 섬유소원 모두는 주로 급성 염증 반응에 작용하는 생물표지자이다. 현재까지 에오타신과 섬유소원의 상관성에 관한 연구 결과는 확인되지 않았다.

본 연구에서 난포낭종성 난포 및 과립층세포에서 섬유소원의 mRNA 수준은 유의적으로 증가하였지만 단백질 발현에 있어서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 하나의 유전자 mRNA가 만드는 단백질의 실제 기능적인 모습은 세포, 조직, 시간, 농도 및 조절자에 따라 다양하게 변할 수 있기 때문에 추가적인 실험 방법을 개발하여 섬유소원이 난포낭종성 난포에서의 어떠한 역할을 할 수 있는지를 정확히 규명해야할 것이다. 섬유소원은 혈액 및 난포액에 존재하는 생물표지자로 작용할 수 있기 때문에 어느 다른 표지자보다 연구의 가치가 있다고 생각한다.

적 요

난포낭종은 소 번식 장애의 주요 원인 중의 하나이며, 다양한 유전자의 변화는 여러 세포와 조직 기능에 영향을 준다. 이러한 유전자 변화는 낭종성 난소에서 나타날 수 있다. 이온 및 수송체와 관련된 유전자 변화가 한우의 난포낭종을 유발할 수 있을 것이라는 가설 하에 난포낭종성 난포에서 발현 변화를 보이는 유전자를 찾기 위하여 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 마이크로어레이 분석 결과, 난포낭종성 난포에서 FGG와 LRP8이 증가하고, SLC44A4, SLC27A5, ANXA8 및 aquaporin 4는 감소하였다. 반정량적 역전사중합효소 연쇄 반응으로 마이크로어레이 분석 결과를 재확인하였다. 6개의 DEG 중 3개의 DEG(FGG, SLC44A4 및 aquaporin 4)는 마이크로어레이 분석 결과와 동일하게 증가와 감소를 보였다. 마이크로어레이와 역전사중합효소 반응에서 동일한 결과를 보이는 3개의 유전자 중 가장 크게 변화를 보인 섬유소원에 중점을 두고 연

구를 수행하였다. 마이크로어레이와 역전사중합효소 연쇄 반응은 난포낭종성 난포에서 섬유소원 유전자 발현을 각각 8.4배와 1.7배 증가시켰다. 그러나 난포 및 과립층세포에서 섬유소원의 단백질 양은 웨스턴 블랏 분석으로 분석한 결과, 정상에 비하여 낭종에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서 섬유소원은 유전자와 단백질 발현에 있어 상관관계는 보이지 않았지만 섬유소원 유전자는 정상 조직으로부터 난포낭종을 구별하는데 있어서 중요한 생물표지자가 될 수 있는 가능성을 제시한다.

참고문헌

- Chae IS, Jang DM, Cheong HT, Yang BK and Park CK. 2009. Changing proteins in granulosa cells during follicular development in pig. *Reprod. Dev. Biol.* 33:183-187.
- Choe CY, Park SY, Kim ES, Moon YJ, Park HJ, Son DS, Cho SR, Kim HJ, Kim JB, Park JY, Hong SG, Han JH and Kang DW. 2008. Identification of inflammation-related genes altered in the cystic ovary and endometritis of Korean cattle. *J. Emb. Trans.* 23:211-216.
- Choe CY, Son DS, Choi GC, Song SH, Choe CY, Choi SH, Kim HJ, Cho SR, Hur CG and Kang DW. 2006. Survey on the incidence of reproductive disorders in Hanwoo. *J. Emb. Trans.* 21:331-338.
- Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P and Luster AD. 1996. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 2:449-456.
- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS and Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.* 53:890-898.
- Hauptmann S, Denkert C, Koch I, Petersen S, Schluns K, Reles A, Dietel M and Petersen I. 2002. Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.* 33:632-641.
- Iwaki T and Castellino FJ. 2005. Maternal fibrinogen is necessary for embryonic development. *Curr Drug Targets* 6:535-539.
- Lingenfelter BM, Dailey RA, Inskeep EK, Vernon MW, Poole DH, Rhinehart JD and Yao J. 2008. Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from persistent follicles in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 104:405-413.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL and Thatcher WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3615-3626.

- Osterberg L, Akesson M, Levan K, Partheen K, Zetterqvist BM, Brannstrom M and Horvath G. 2006. Genetic alterations of serous borderline tumours of the ovary compared to stage I serous ovarian carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 167: 103-108.
- Parrott JA, Whaley PD and Skinner NK. 1993. Extrahepatic expression of fibrinogen by granulosa cells: Potential role in ovulation. *Endocrinology* 133:1645-1649.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39:1-7.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M and Soferman N. 1973. Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier. *Fertil. Steril.* 24:429-434.
- Shimada H, Kasakura S, Shiotani M, Nakamura K, Ikeuchi M, Hoshino T, Komatsu T, Ihara Y, Sohma M, Maeda Y, Matsuura R, Nakamura S, Hine C, Ohkura N, and Kato H. 2001. Hypocoagulable state of human preovulatory ovarian follicular fluid: Role of sulfated proteoglycan and tissue factor pathway inhibitor in the fluid. *Biol. Reprod.* 64: 1739-1745.
- Whiteley W, Jackson C, Lows G, Rumley A, Sandercock P, Wardlaw J, Dennis M and Sudlow C. 2009. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: A prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS. Med.* 6:e1000145.

(접수: 2010. 2. 6 / 심사: 2010. 2. 19 / 채택: 2010. 3. 2)