

돼지의 발정 주기 동안 자궁조직에서 Plasminogen Activator(PA)와 HSP-90과의 관계

구하나¹ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

Relationship between Plasminogen Activator (PA) and HSP-90 in Uterus Tissue during the Porcine Estrous Cycle

Ha-Na Gu¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The present study was performed to identify the relationship between plasminogen activator (PA) and Heat Shock Protein-90 (HSP-90) in porcine uterus tissues during the estrous cycle. Porcine uterus tissues were obtained from pre-ovulatory (Pre-Ov), post-ovulatory (Post-Ov) and early to mid-luteal (Early-mid L) stages. The protein was extracted from uterus tissue by using M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent. Proteins were refined by RIPA Buffer and quantified by BCA methods. As results, t-PA expression was significantly ($p < 0.05$) higher from pre-ovulatory (Epithelium tissue: 29,067 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 30,797 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) compared to the post-ovulatory stage (Epithelium tissue: 54,357 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 53,270 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and early to mid-luteal stage (Epithelium tissue: 42,380 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 43,139 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). On the other hand, the uPA expression indicated higher from early to mid-luteal stage (Epithelium tissue: 0.02198 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 0.02412 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) than pre-ovulatory stage (Epithelium tissue: 0.01577 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 0.01531 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and post-ovulatory stage (Epithelium tissue: 0.01414 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Myometrium tissue: 0.01429 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). However, expression of u-PA did not differ from each estrous cycle in the epithelium tissue and myometrium tissue ($p < 0.05$). Expression of HSP-90 was differ t-PA and u-PA from pre-ovulatory in Epithelium tissue (25,423 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and early to mid-luteal stage in epithelium tissue (177,922 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and myometrium tissue (26,664 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). These results suggest that HSP-90 and u-PA were related with change of uterus cycle according to the reformation of the tissues in porcine uterus.

(Key words : Porcine estrous cycle, Heat shock protein-90, Tissue-plsminogen activator (t-PA), Urokinase-plsminogen activator (u-PA), Uterus tissue)

서 론

Plasminogen은 섬유소를 분해하는 효소인 plasmin의 전구 물질로서 plasminogen 상태로 존재하며, 세포외액과 plasma에 많이 존재하는 비활성 단백질이다. 한편, 세포 내에 존재하는 plasminogen Activator(PA)가 plasminogen을 활성화 시키며, plasminogen을 plasmin으로 전환시키고 섬유소 분해를 촉진한다. 이러한 PA는 분자량의 의해 70 kDa은 Tissue-Plasminogen Activator(t-PA)로, 31~54 kDa의 Urokinase-Plsminogen Activator(u-PA)로 나눌 수 있으며, 체내에서 생성되는 몇몇의 inhibitors에 의

해 억제된다(Kruithof, 1988). 이밖에 PA는 햄스터의 경우, 난관 조직의 일부 세포막과 난관체액에서의 활성이 보고되었으며(Jimenez Diaz 등, 2000), 사람의 경우 자궁 내막을 포함하여 여성 생식 조직에서 t-PA와 u-PA의 발현과 활성이 나타났다(Casslen와 Astedt, 1983). 또한, 여러 연구 결과를 통해 PA는 세포 이동, 조직 재구성 등의 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Roldan-Olarte 등, 2005). 특히, 동물의 수정 시 정자의 침체막 반응과 수정능력 획득에 관여하며, 그 밖에 정자의 성숙에도 영향을 보이지만, 자궁 내에서 PA의 명확한 메카니즘은 아직 밝혀지지 않았다(Zervos 등, 2005). 일반적으로 세포가 스트레스에 노출될 경우, 세포는 DNA, RNA 등의 수송에 문제가 생

* 본 연구는 2010년 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2010-0021580).

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

기고, 단백질의 합성도 원활하지 못하게 되며, 본래의 역할을 상실하게 된다. 이러한 환경에 노출된 단백질을 스트레스 단백질(stress proteins)이라 부르며, 특히 스트레스에 노출될 때 대량 발현된다. 스트레스는 전형적으로 외부의 온도를 상승시키게 되며, 이를 열충격(heat shock)이라 한다. 열충격에 대한 반응은 1962년 Feruccio Ritoss에 의해서 최초로 발견되었으며, 이후에 열충격과 관련된 단백질을 열충격 단백질(Heat Shock protein)이라 명명하였다. 그러나 열충격 단백질은 살아있는 세포의 항상성을 유지하는 데 필요하며, 특히 스트레스에 의한 질병에 대응하는 중요한 역할을 하여, 분자량에 의해서 여러 가지로 분류할 수 있고 각각 역할이 다르다. 그 가운데 Heat Shock protein-90(HSP-90)은 진핵세포 내에 가장 많이 존재하며, 세포 성장 및 분화, 생존과 관련된 여러 가지 단백질을 안정화 시키고 활성을 조절한다(Csermely 등, 1998). 그 밖에 유전체 정도에서의 HSP-90을 조사한 결과에서 HSP-90과 198개 단백질 사이의 물리적 상호작용이 규명됨으로써, HSP-90이 다양한 세포 내 기능을 조절하고 있음이 밝혀졌다(Prince와 Neckers, 2011).

한편, 자궁은 수정된 난자가 착상하고 성장하는 생식기관으로 다태 동물인 돼지는 쌍각 자궁의 구조를 가지고 있으면서 발정 주기에 따라서 자궁의 형태가 변하게 되며, 이를 난포기, 배란기 및 황체기로 나눌 수 있다. 특히 배란기에서 황체기가 될 때 자궁벽이 허물어지게 되며, 이는 조직의 재구성 및 혈관 신생이 일어나는 특징을 보이게 되며, 이때 PA의 작용이 있을 것으로 추측되며, 동시에 HSP-90의 영향이 있을 것으로 추측된다. 최근 PA는 자궁 조직의 면역화학법을 통하여 혈관에서 많이 발현되는 것으로 보고되었고(Kim 등, 2011), 조직의 재구성은 조직의 파괴와 새로운 세포의 성장이 일어나기 때문에 가능하다. 이때 조직이 파괴되는 환경에 의해서 열충격 단백질이 발현될 것으로 생각되며, 특히 세포의 성장과 관련된 HSP-90이 연관성이 있을 것으로 추측된다. 따라서 본 연구에서는 돼지의 발정 주기에 따라 자궁조직에서 특정 단백질인 PA와 HSP-90의 연관성을 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

자궁조직의 회수와 배양

돼지의 생식 주기별 자궁을 도축장에서 회수한 후 2시간 이내 실험실로 옮겨 HBSS(x1)를 이용해 2회 세척했다. 세척된 돼지의 자궁은 동일한 무게 1 g으로 맞춰 6-well dish에 넣고 D/F(10% FBS, 0.1% Amp 및 1% ABAM) 배양액 5 ml를 넣어서 38°C, 5% CO₂에 12시간 동안 체외에서 배양시켰다(Park 등, 2009). 배양을 마친 조직은 상피 조직과 근육 조직으로 분리하여 -80°C에서 보존되었으며, western blot에 사용되었다.

단백질 정량

실험에 사용된 돼지의 발정 주기 자궁 조직인 난포기, 배란기 및 황체기는 12시간 배양시킨 후 조직을 균질기(Homogenizer)를 이용하여 균질화 하고, M-PER(Mamma-

lian Protein Extraction Reagent) Buffer를 넣고 상온에서 30분 동안 교반시켜 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 4°C, 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 RIPA Buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP, 0.1% SDS)에 20배 희석 후 BCA(Bicinchoninic Acid) Solution A(980 µl, Thermo #23228)와 B(20 µl, Thermo #1859078)를 각 well에 200 µl 분주했다. 그 후 37°C에서 1시간 동안 인큐베이터에서 배양 후 흡광기를 이용하여 단백질을 정량하였다.

전기영동

10% acrylamide gel(H₂O 7.9 ml, 30% acrylamide mix 6.7 ml, 1.5 M Tris(pH 8.8) 5.0 ml, 10% SDS 0.2 ml, 10% ammonium sulfate 0.2 ml, TEMED 0.008 ml)을 Gel 틀에 8 ml를 분주하였다. 5% Stacking gel(H₂O 2.7 ml, 30% acrylamide mix 0.67 ml, 1.0 M Tris 0.5 ml, 10% SDS 0.04 ml, 10% ammonium sulfate 0.04 ml, TEMED 0.008 ml)을 10% acrylamide gel에 2 ml씩 분주하고 Comb를 Gel 위에 놓았다. Stacking gel이 굳으면 comb를 뽑고 각각의 Gel 홈에 정량한 단백질을 20 µl와 marker 15 µl를 loading하고 80 V에서 2시간 동안 전기영동을 실시했다.

Western Blot

전기영동이 끝나갈 때 Polyvinylidene Fluoride(PVDF) membrane을 메탄올에서 교반시켜 주었다. 전기영동을 마친 gel을 PVDF membrane에 2시간 동안 transfer시켰고, 단백질의 이동을 확인하기 위해서 발색제(Ponceau S)에 PVDF membrane을 넣고 밴드의 위치를 확인하였다. PVDF membrane을 5% skim milk에 넣어 실온에서 30분 동안 blocking 과정을 거치고, Tris-Buffered Saline Tween-20(TBST)으로 10분씩 3번 세척을 했다. HSP-90에 primary antibody로 Monoclonal-Rabbit(Cell Signaling, C-45G5)를 5% skim milk에 1:500으로 희석하여 4°C에서 12시간 배양시켰다. 동일한 조건으로 t-PA는 Monoclonal-Mouse(CALBIOCHEM, GF53)를 1:500으로 희석하였고, u-PA는 Goat polyclonal IgG(Santa Cruz Biotechnology, M-20)를 t-PA와 동일한 조건인 1:500으로 희석하여 사용하였다. 각각 12시간 배양을 마친 후 TBST에 10분씩 3번의 세척 단계를 거쳤다. HSP-90, t-PA 및 u-PA에 secondary antibody를 5% skim milk에 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. Goat anti-Rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, C0612)를 1:500으로 희석하였고, t-PA는 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, L2011), u-PA는 Donkey anti-Goat IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, J0711)를 각각 1:200인 동일한 비율로 희석하여 사용하였고, TBST에 10분씩 3번 세척하였다. Control로 primary antibody인 Monoclonal Anti-β-Actin Mouse IgG(Sigma, A5441)를 TBST에 1:100,00으로 희석하여 상온에서 30분 동안 배양하고, 10분씩 3번의 세척 후 secondary antibody는 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, L2011)를 TBST에 1:100,00으로 희석하여 primary antibody와 같은 조건으로 배양하고 TBST로 세척하였다. PVDF membrane에 붙어 있는 단백질의 위치를 확인하기 위해 Enhanced Chemiluminescen-

ce(ECL) solution인 A와 B를 각각 1:1로 혼합하여 PVDF membrane에 분주하여 항체에 대한 반응을 일으킨 후 필름을 PVDF membrane 위에 올려 놓고 적정 시간 동안 노출시켜 밴드를 확인하였다.

통계처리

Western blot를 통해 확인된 밴드의 정량값은 Multi Gauge Program(FUJL photo film Co., Ver. 3.0)를 사용하고, SAS 9.2를 이용하여 최소 유의차검정(Least significant Different test) LSD test는 발정주기별 상피 근육과 자궁 근육을 비교하고, General linear mode, GLM)을 적용하여 전체적으로 비교하였으며 Duncan의 Multiple range test에 의해 유의차($p < 0.05$)를 검정하였다.

결 과

Fig. 1은 돼지의 발정 주기 동안 자궁 상피 조직과 근육 조직에서 t-PA의 발현을 나타내었다. 발정 주기별 난포기(상피 조직: 29,067 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 30,797 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 배란기(상피 조직: 54357 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 53,270 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 및 황체기(상피 조직: 42,380 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 43,139 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)의 상피 조직과 근육 조직에서의 t-PA 발현의 차이는 보이지 않았다. 그러나 발정 주기별로 상피 조직과 근육 조직을 각각 비교하였을 때, 배란기의 상피 조직(54,357 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)과 근육 조직(53,270 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에서 t-PA의 발현이 가장 많이 나타나는 것으로 확인되었으며, 난포기에서는 유의적으로 가장 낮은 t-PA의 발현이 나타났다($p < 0.05$). Fig. 2는 돼지의 발정 주기 동안 자궁 상피 조직과 근육 조직에서 u-PA의 발현을 확인한 것이다. 발정 주기의 난포기(상피 조직: 0.01577 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 0.01531 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 배란기(상피 조직: 0.01414 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 0.01429 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)보다 황체기(상피 조직: 0.02198 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 근육 조직: 0.02412 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에서 u-PA의 발현이 높게 나타났지만, 각 발정 주기에서 상피 조직과 근육 조직 사이에서 u-PA 발현의 유의적인 차이는 인정되지 않았다($p > 0.05$). Fig. 3은 돼지의 발정 주기 동안 자궁 상피 조직과 근육 조직에서 HSP-90의 발현을 나타냈다. 그 결과 t-PA 및 u-PA와는 다르게 HSP-90은 난포기에서는 상

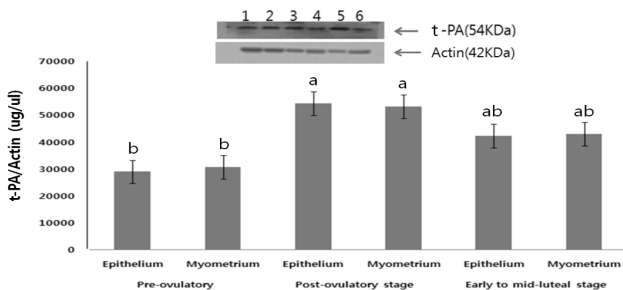


Fig. 1. t-PA expression by epithelium and myometrium during the porcine uterus estrous cycle. 1: Pre-ovulatory stage, epithelium, 2: Pre-ovulatory stage, myometrium, 3: Post-ovulatory stage, epithelium, 4: Post-ovulatory stage, myometrium, 5: Early to mid-luteal stage, Epithelium, 6: Early to mid-luteal stage, myometrium. ^{a,b}: Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment group ($p < 0.05$).

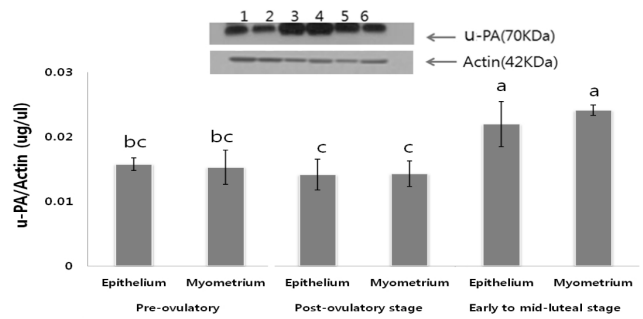


Fig. 2. u-PA expression by epithelium and myometrium during the porcine uterus estrous cycle. 1: Pre-ovulatory stage, epithelium, 2: Pre-ovulatory stage, myometrium, 3: Post-ovulatory stage, epithelium, 4: Post-ovulatory stage, myometrium, 5: Early to mid-luteal stage, Epithelium, 6: Early to mid-luteal stage, myometrium. ^{a~c}: Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment group ($p < 0.05$).

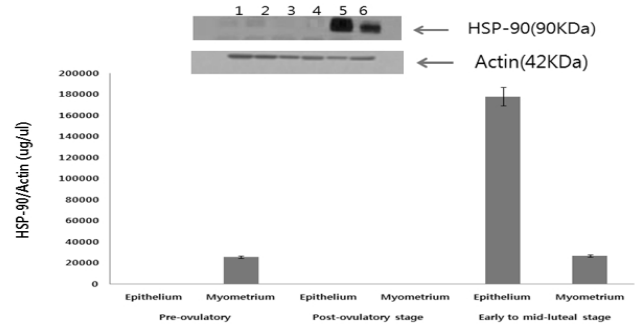


Fig. 3. HSP-90 expression by epithelium and myometrium during the porcine uterus estrous cycle. 1: Pre-ovulatory stage, epithelium, 2: Pre-ovulatory stage, myometrium, 3: Post-ovulatory stage, epithelium, 4: Post-ovulatory stage, myometrium, 5: Early to mid-luteal stage, Epithelium, 6: Early to mid-luteal stage, myometrium. Bar with different superscripts differ no significantly of each other treatment group.

피 조직(25,423 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에서만 발현되고, 황체기는 상피조직(177,922 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 및 근육 조직(26,664 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에서 발현되었다.

고 찰

최근 세포 외적 인자에 의한 HSP-90과 PA 발현에 관한 연구는 이루어졌으나(McCready 등, 2010), 세포 내에 존재하는 HSP-90과 수정 및 착상을 포함한 생리적인 활동에 영향을 미치는 PA가 자궁의 조직 즉, 상피 조직과 근육 조직에서의 연관성을 밝히기 위해 본 연구가 수행되었다. 그 결과, 돼지 발정 주기별 자궁 조직 내에서 HSP-90은 배란기와 난포기 상피 조직을 제외하고 난포기 근육 조직과 황체기의 상피 조직과 근육 조직에서 발현되었고, 특히 황체기 상피 조직에서 그 발현량이 증가되었다. 이는 황체기 자궁이 외부 자극에 의해서 스트레스를 받는 환경에 노출되어 HSP-90 단백질의 발현이 증가된 것으로 추측되었다. 이와 같은 결과는 발정 주기별로

자궁에서 황체기는 자궁의 벽이 허물어지고 새로운 형태의 난포기 자궁을 만들기 위해서 여러 가지 인자가 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이 때 HSP-90은 세포 내에서의 이동 및 분해를 조절하는 기능이 있어(Edlich 등, 2007) 형태학적으로 변화하는 자궁 속 세포의 성장 및 분화에 영향을 미칠 것으로 추측된다. 또한, 상피 조직에서 보다 많은 HSP-90의 발현을 확인할 수 있었는데, 자궁벽이 허물어지는 시점에서 자궁의 가장 안 쪽인 상피 조직이 변화에 더 민감하게 반응하기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것으로 추측된다. 또한, 본 연구에서 돼지의 발정 주기별 자궁 조직을 조직면역화학법을 실시한 결과, 상피 조직에서 많은 PA의 분비가 보고되었다(Kim 등, 2011). 이와 관련시켜, 상피 조직은 근육 조직에 비해 변화에 빠르게 반응하는 것을 알 수 있었고, 이는 자궁 내 상피 조직의 환경에 따라서 자궁의 상태가 변화한다고 생각해 볼 수 있다. PA와의 연관성에서 u-PA는 혈관의 항상성, 염증 및 조직을 복구하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이러한 u-PA가 황체기에서 다른 주기보다 많이 발현되는 것을 보아 HSP-90과 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각된다. 또한, 황체기에서 자궁의 급격한 변화는 HSP-90과 u-PA의 영향을 받을 것으로 보여진다. 그러나 본 연구에서 t-PA는 배란기에서 가장 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. 또 다른 연구에 의하면 PA의 영향으로 난모세포의 운동이 촉진되어 배란기에 영향을 미친다는 보고가 있다(Ebisch 등, 2008). 또한, 마우스 실험을 통해서 PA의 증가가 착상에 영향을 미치는 것이 보고되었고(Finlay 등, 1983), PA의 결핍은 태아의 미성숙을 유도한다는 보고(Bugge 등, 1995)가 있다. 이와 같은 보고는 t-PA와 u-PA의 영향이 미치는 시점이 서로 다르다는 것을 증명하는 결과이며, 더 나아가 배란기에 영향을 미치는 PA가 t-PA인 것을 알 수 있었고, 자궁의 형태학적인 변화뿐만 아니라 착상과 같이 중요한 생리적인 현상에도 관여한다는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 t-PA는 세포의 이동과 조직을 재구성하는 역할을 하며, u-PA와 비슷한 역할하는 듯 보이지만 자궁의 주기에 따라서 각각의 영향이 다르게 작용하는 하는 것을 알 수 있다. 본 연구의 결과를 종합하면 돼지의 발정 주기별 자궁 조직에서 HSP-90과 u-PA는 황체기에서 다른 주기보다 많이 발현되는 것으로 보아 밀접한 연관성이 있는 것으로 나타났으며, t-PA와는 상반되는 결과가 나왔으므로 연관성이 적을 것으로 추측되었다. 이러한 결과는 돼지의 발정 주기 동안 자궁의 변화를 유도하는 인자로서 HSP-90과 u-PA를 들 수 있으며, HSP-90과 u-PA가 서로 자궁 내에서 밀접한 연관성이 있다는 것을 제시한다. 앞으로 자궁 조직에서 HSP-90의 발현을 증명하기 위해서 진행되어야 할 연구로, 황체기 자궁에서 HSP-90의 발현의 유도를 억제했을 때 HSP-70 단백질의 발현이 나타난다면, HSP-90이 황체기에서 영향을 미친다는 것을 증명할 수 있을 것이다. 즉, HSP-90이 억제되면 HSP-70의 발현이 유도됨으로써 세포 보호 기작이 일어난다는 보고가 있다(Waza 등, 2006). 또한, 억제된 HSP-90은 다른 단백질의 발현을 유도하기 때문에 새로운 인자가 자궁내 환경에 미치는 영향을 연구할 수 있다(Park 등, 2007). 따라서 HSP-90과 u-PA의 두 단백질의 상관 관계가 자궁내 미치는 영향의 메커니즘을 밝힐 필요성이 제기되었다.

인용문헌

1. Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL (1995): Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes & Development* 9:794-807.
2. Casslen B, Astedt B (1983): Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium. *Contraception* 28:553-564.
3. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G (1998): The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology Ther* 79:129-168.
4. Ebisch IM, Thomas CM, Wetzels AM, Willemsen WN, Sweep FC, Steegers-Theunissen RP (2008): Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril* 90:2340-2350.
5. Edlich F, Erdmann F, Jarczowski F, Moutty MC, Weiwad M, Fischer G (2007): The Bcl-2 regulator FKBP38-calmodulin-Ca²⁺ is inhibited by Hsp90. *J Biol Chem* 282:15341-15348.
6. Finlay TH, Katz J, Kirsch L, Levitz M, Nathoo SA, Seiler S (1983): Estrogen-stimulated uptake of plasminogen by the mouse uterus. *Endocrinology* 112:856-861.
7. Jimenez Diaz M, Giunta S, Valz-Gianinet J, Pereyra-Alfonso S, Flores V, Miceli D (2000): Proteases with plasminogen activator activity in hamster oviduct. *Mol Reprod Dev* 55:47-54.
8. Kim KH, Lee YS, Gu HN, Yang BK, Cheong HT, Park CK (2011): Changes in plasminogen activity in uterus tissue during the estrous cycle in the pigs. *Reprod Dev Bio* 35:463-468.
9. Kruihof EK (1988): Plasminogen activator inhibitors a review. *Enzyme* 40:113-121.
10. McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG (2010): Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10:294.
11. Park H, Kim YJ, Hahn JS (2007): A novel class of Hsp-90 inhibitors isolated by structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* 17:6345-6349.
12. Park S, Lee YS, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2009): Effect of methyl-beta-cyclodextrin on sperm acrosome reaction and embryo cleavage after *in vitro* fertilization in pig. *Annals of Animal Resources Sciences* 20:6-12.
13. Prince T, Neckers L (2011): A network of its own: the unique interactome of the Hsp90 Cochaperone, Sba1/p23. *Molecular Cell* 43:159-160.
14. Roldan-Olarte M, Jimenez-Diaz M, Miceli DC (2005): Plasminogen detection in oocytes and plasminogen activator activities in the porcine oviduct during the

- estrous cycle. *Zygote* 13:115-123
15. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2006): Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J Mol Med* 84:635-646.
 16. Zervos IA, Tsantarliotou MP, Vatzias G, Goulas P, Kokolis NA, Taitzoglou IA (2005): Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. *Reproduction* 129:707-715.
(접수일자: 2012. 9. 11 / 채택일자: 2012. 9. 18)