

PLCz 유전자의 유전적 다형성(*g.158T>C*)과 두록 동결정액의 운동학적 특성과의 연관성 분석

사수진* · 이미진* · 김기현* · 우제석 · 고준호 · 김영주 · 조은석†

농촌진흥청 국립축산과학원

Association Study Analysis of Phospholipase C Zeta (*PLCz*) Gene Polymorphism (*g.158T>C*) for Duroc Boar Post-Thawed Semen Motility and Kinematic Characteristics

Soo-Jin Sa*, Mi-Jin Lee*, Ki-Hyun Kim*, Jae-Seok Woo, Jun-Ho Ko, Young-Ju Kim and Eun-Seok Cho†

National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT

Cryopreservation of boar semen is continually researched in reproductive technologies and genetic resource banking in breed conservation. For evaluating the boar semen quality, sperm motility (MOT) is an important parameter because the movement of spermatozoa indicates active metabolism, membrane integrity and fertilizing capacity. Various researches have been trying to improve the quality of semen post-thawed in boar. Recently, polymorphism (*g.158T>C*) of phospholipase C zeta (*PLCz*) gene reported to be significant association with MOT. This study was conducted to evaluate the *PLCz* gene as a positional controlling for motility and kinematic characteristics of post-thawed boar semen. To results, The *g.158 T>C* SNP of *PLCz* was significantly associated with frozen semen motility and kinematic characteristics. *g.158 T>C* SNP was high significantly associated with MOT, VCL, VSL and VAP ($p<0.0001$, $p=0.0002$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively). Therefore, we suggest that the intron region of the porcine *PLCz*, may be used as a molecular marker for Duroc boar post-thawed semen quality, although its functional effect was not defined yet. Whether the association is due to the candidate gene or not require further verification. Thus, it will be of interest to continue association studies in the regions surrounding those genes.

(Key words: phospholipase C zeta, boar semen quality, polymorphism)

서 론

양돈산업에 있어 돼지번식의 주요 수단으로 사용되는 인공수정은 전 세계적으로 그 보급률이 매년 증가해오고 있으며, 국내의 돼지인공수정 보급율은 90%에 이르고 있다. 인공수정은 자연교배에 비해 질병의 위험을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라, 유전능력이 우수한 씨수퇘지의 유전자를 효율적으로 전달할 수 있어 개량을 가속화할 수 있는 장점을 가진 매우 유용한 기술이다(Maes *et al.*, 2008). 인공수정용 정액은 크게 두 가지 형태로 구분되어질 수 있는데, 수퇘지로부터 채정한 원정액을 정액회석제와 회석하여 냉장상태로 보관하였다가 사용하

는 액상정액(Fresh liquid semen)과 정액을 동결하여 -196°C 액체질소에 보관하였다가 해동하여 사용하는 동결정액(Frozen semen)이 있다. 그러나 상업용 비육돼지 생산을 위해서는 약 95% 이상이 액상정액을 사용하고 있으며, 돼지 동결정액의 경우는 돈군 개량과 유전자원 보존 등의 목적으로 쓰이고 있으나, 그 사용이 제한적이다. 이러한 이유는 동결정액의 동결과 용해 방법, 동결보존액, 정액의 주입시간, 주입횟수, 주입정자수, 동결정액의 보존형태, 동결정액 보존기간, 개체에 따른 동결성 및 품종간의 차이 등이 동결정액 실용화를 어렵게 하는 요인들로 작용하기 때문이다. 그럼에도 불구하고 액상정액에 비해 반영구적인 보존이 가능한 동결정액은 유전능력이 우수한 씨

This work was supported by Grant No. PJ01094003 from Rural Development Administration, Republic of Korea; and the 2015 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

* These authors contributed equally to this paper.

† Correspondence : segi0486@korea.kr

수태지 유전자원을 장기 보존할 수 있을 뿐 아니라, 씨수태지의 활용도를 높여 개량속도를 높이고, 유전인자(정액) 도입 시 전염성 질병의 전파를 방지할 수 있다는 장점이 부각되면서 많은 관심을 받고 있다.

정액동결 기술은 전염성 질병의 컨트롤, 정액의 장거리 수송 및 유전자원의 장기보존을 가능하게 한 유용한 기술이다 (Johnson *et al.*, 2000). 그러나 정액을 동결보존하는 과정에서 발생하는 저온충격, 삼투압 스트레스 및 동결보호제의 독성 등에 의해 동결-용해 후 정자의 운동성은 40% 수준이며, 일반적으로 돼지 인공수정에 사용되고 있는 액상정액과 비교하면 정액의 품질이 매우 낮게 나타난다 (Johnson *et al.*, 1981). 특히, 돼지의 정자는 타축종에 비해 세포막에 불포화지방산의 함량이 높아 저온충격에 매우 민감하게 반응하며, 이로 인해 돼지 정자는 동결-용해 후 운동성이 큰 폭으로 감소하는 것으로 알려져 있다 (Mazur, 1984).

최근 돼지정액의 동결과 용해방법 등에 많은 발전이 있었음에도 불구하고, 정액 동결-용해 과정 중에 발생하는 정자운동성의 저하와 미토콘드리아의 기능장애 등의 요인들은 돼지 동결정액 산업화를 가로막는 요인으로 작용하고 있다 (Fraser *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2000). 이러한 문제들을 해결하기 위해 최근에는 정자의 유전자 변이에 따라 정자의 내동성을 판별하고, 돼지의 동결정액의 품질을 개선하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 (Gunawan *et al.*, 2012; Kaewmala *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2014).

최근 phospholipase C zeta (PLCz) 유전자의 158번째 염기가 T에서 C로 변이가 일어남에 따라 정자의 품질에 변화가 나타난다는 논문이 보고되었다 (Kaewmala *et al.*, 2012). PLCz는 포유동물의 phospholipase C (PLC)과 arachidonic acid 합성의 필수지방산이며, inflammatory prostaglandins의 전구체로 알려져 있다. 여러 연구에서는 PLCz가 햄스터, 쥐, 사람의 정자 형성과정에서 중요한 역할을 수행한다고 보고하였다 (Frungieri *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2008; Sirianni *et al.*, 2009). 돼지의 경우, PLCz는 SSC5q11-12에 존재하며, 정관의 직경과 고환의 무게에 연관성이 있다고 보고하고 있으며 (Ren *et al.*, 2009), Ca²⁺의 진동에 관여하여 돼지의 수정과정에서도 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되었다 (Kurokawa *et al.*, 2005). 또한 돼지의 고환에서 PLCz mRNA의 발현량이 높은 것으로 보고되었으며 (Yoneda *et al.*, 2006), 돼지 태아의 사산 수에도 연관성이 있다고 보고되었다 (Cassady *et al.*, 2001).

따라서 본 연구에서는 돼지정액의 품질과 관련성인 높을 것이라고 판단되어지는 PLCz 유전자의 158번째의 염기를 확인하여 유전자형을 분석하였고, 본 연구에서 사용된 돼지 동결정액의 운동성 및 운동역학적 형질과 PLCz 유전자의 연관성 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정액 채취

수태지들은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 균등한 먹이 및 취급 조건들에서 사육되었다. 본 연구에서 공시축은 2011년에서 2015년까지 1.5~2년생의 성숙한 수태지를 사용했으며, 정액의 채취는 의빈대를 이용한 수압법을 이용하였다. 본 연구에 사용된 샘플은 정자 운동성과 형태학적으로 정상인 정자의 비율이 80% 이상인 사출정액만을 이용했다. 정액필터를 통해 1차적으로 걸러진 정액을 37°C BTS (Beltsville thawing solution) 와 1:1 비율로 희석하여 신속히 실험실로 운반하였다.

2. 동결정액 제조

정액동결에 앞서 정액샘플들은 24시간 동안 17°C 정액 보관고에서 보관되었다. 동결을 위한 전처리과정으로 액상정액 샘플을 17°C 조건하에서 15분 동안 800 × g로 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후, 진공펌프를 이용하여 상층액을 조심스럽게 제거하여 정자펠렛만을 남겼다. 정자펠렛들은 1차 동결희석제 (LEY; lactose egg-yolk extender, 11% [v/v] β-lactose, 20% [v/v] hen egg yolk)로 재부유하여 최종정액농도 1.5×10⁹ cells/ml로 만들었으며, 그 다음 1.5시간 동안 5°C에서 샘플을 냉각시켰다. 그 뒤에, 동결용 정액샘플은 89.5 ml LEY에 9 ml 글리세롤 및 1.5 ml Orvus Es Paste (OEP, Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA)가 함유되어 있는 2차 희석제를 조심스럽게 첨가하여 5°C에서 정자의 최종농도를 1×10⁹ cells/ml로 만들었다. 정액샘플들은 filling & sealing machine (IMV, L'Aigle, France)으로 0.5 ml 스트로우 (IMV, L'Aigle, France) 내에 포장하였으며, 글리세롤 평형을 위해 1시간 동안 5°C에 보관하였다. 정액동결을 위해 샘플들은 정액동결기 (SY-LAB Gerate GmbH, Austria)를 사용하여 6분 동안 5°C에서 -5°C까지 냉각시키고, 얼림결정 형성 (seeding)을 유도하는 동안에 30초 동안 -5°C에 두었다. 그 다음 40분 동안 -5°C에서 -80°C까지 냉각시켰고, 60분 동안 -80°C에서 -150°C까지 냉각시켜 동결을 마무리하였다. 동결정액 스트로우는 분석을 수행할 때까지 -196°C 액체질소 탱크에 보관되어졌다. 그 후에 동결정액 스트로우들은 20초 동안 38°C의 항온수조에 담가서 용해시켰고, 각 스트로우의 내용물들은 즉시 BTS에 1:4 (v/v) 비율로 부유시킨 후 정자의 운동성을 평가하기 위하여 30분 동안 38°C에 가온시켰다.

3. 정자 운동학적 특성 분석

정자 운동성 (MOT, Motility)은 정자자동분석기 (CASA, Computer-assisted semen analysis system; SAIS SI-100, Medical Supply, Korea)를 사용하여 평가되었다. 정자샘플은 BTS로 희석하여 30×10⁶ cells/ml 농도로 준비하였다. 5 μl의 정자샘플

을 38°C로 가온된 pre-wormed markler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)에 올려놓고 샘플 당 최소 100마리의 정자를 평가하였으며, 분석은 5회 이상 실시하였다. 각 정자 샘플의 전체 운동성(TMS, Total motile spermatozoa, %), 곡선 속도(VCL, Curvilinear velocity, um/s), 직선속(VSL, Straight-line velocity, um/s), 평균이동속도(VAP, Average path velocity), 직진성(LIN, e.g., the ratio between VSL and VCL), ALH(Amplitude of Lateral Head displacement)를 포함하는 운동학적 특성들을 측정했다. 두록 78두 동결정액에 대한 평가결과는 Table 1에 제시하였다.

4. Genomic DNA 분리 및 유전자형 분석

Genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 방법을 약간 변형하여 분리하였다(Promega, Madison, WI, USA). Direct sequencing을 위하여 두록 수태지 78두의 DNA를 이용하여 PCR(Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR은 10 pml의 primer, 0.25 mM dNTP, 10× PCR buffer, 1.25 μ DNA polymerase(Genet Bio, Chungnam, Korea)와 100 ng의 DNA를 포함하여 20 μl의 부피에서 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초, 64°C에서 30초 그리고 72°C에서 45초를 수행하였고, DNA Engine Tetrad® 2 Thermal Cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 총 35번복으로 PCR을 수행하였다. PCR 수행 후 염기서열 분석을 위하여 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.0(Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)와 ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer(Life Technologies Corp.)를 이용하여 염기서열 분석을 하였고, SeqMan program(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 SNP(Sngle nucleotide polymorphism)를

비교하여 유전자형을 결정하였다. 염기서열분석에 이용된 primer는 이전 논문에 나와있는 5'-GGTGTTCAGACCGAAAGG-AA-3' and 5'-AACAGAAAGGACTTCTGATGTGA-3'를 사용하였다(Kaewmala *et al.*, 2011).

5. 통계 분석

연관성분석은 SAS 9.13(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 generalized linear model(GLM)을 이용하였으며, 유전자형의 효과와 경제형질들에 대해 최소 유의차 검정으로 평균간 차이에 대한 유의성을 조사하였다. 통계분석에 이용한 모형은 다음과 같다.

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + P_l + e_{ijkl}$$

y_{ijkl} 는 관측치, μ 전체의 평균, G 유전자형 효과, S_j 성별의 효과, P_l 정액채취기간, e_{ijkl} 임의오차를 나타내며, 유전자형 효과, 성별의 효과, 정액채취기간은 고정효과로 사용되었다. 그리고 유의적 차이는 $P<0.01$ 와 $P<0.05$ 로 표시하였다.

결 과

본 연구에서는 이전에 보고되어 있는 PLCz 유전자의 SNP를 확인하여 유전자형을 분석하고, 두록 78두 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 분석하고자 하였다. PLCz 유전자의 intron 1 지역에서 염기서열 분석을 통하여 SNP를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 이전논문과 동일하게 158번째 염기에서 다형성을 확인할 수 있었다. 두록 78두의 대립유전자와 유전자형의 빈도를 확인한 결과, Table 2와 같이 TT, TC 및 CC 유전자형의 빈도는 각각 0.72, 0.22 그리고 0.06이었다. 그리고 T 대립

Table 1. Means, standard deviation (S.D.), sample size, ranges of traits in semen parameters of Duroc boars

Traits	Mean	SD	Min	Max
MOT (%)	31.58	16.19	3.82	89.37
VCL (um s ⁻¹)	52.89	0.19	33.41	16.17
VSL (um s ⁻¹)	25.98	3.38	14.17	56.72
VAP (um s ⁻¹)	4.43	1.91	20.69	81.74
LIN (VSL/VCL)	26.51	4.16	37.11	77.58
ALH (um)	2.28	0.59	1.14	4.11

Abbreviations: SD, standard deviation; MOT, yielded sperm motility; VCL, curve linear velocity; VSL, straight line velocity; VAP, average path velocity; LIN, linearity; ALH, amplitude of lateral head displacement.

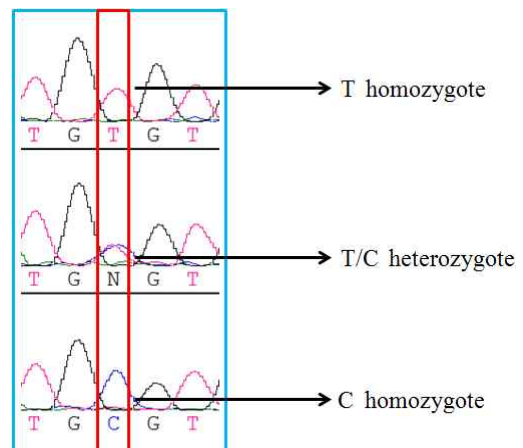


Fig. 1. Sequencing results and polymorphic sites found in the intron 6 region of PLCz gene in Duroc boars.

Table 2. Allele and genotype frequencies of *PLCz* polymorphisms in Duroc boars

SNP position	Genotype frequency (n=78)			Allele frequency	
<i>g.158T>C</i>	TT (n=56, 0.72)	TC (n=17, 0.22)	CC (n=5, 0.06)	T (0.83)	C (0.17)

The number of genotyped animals and genotype frequency are shown in parentheses.

유전자(0.83) C 대립유전자(0.17)보다 빈도가 훨씬 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서 확인한 SNP와 두록 78두 돼지 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 비교한 결과, Table 3과 같이 높은 유의성을 보였다. MOT, VCL, VSL 그리고 VAP ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, 각각)에서 높은 유의성을 보였고, ALH($p = 0.0160$)에서는 낮은 유의성을 확인할 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 *PLCz* 유전자의 SNP와 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 확인하려고 하였고, 그 결과 *PLCz* 유전자의 *g.18 T>C* SNP은 운동성 및 운동학적 특성들의 거의 대부분과 상당한 연관성이 있었고, TT 유전자형을 가진 돼지가 TC 및 CC 유전자형을 가진 돼지보다 대부분의 형질 값들이 더 높았다. 최근 *PLCz*의 SNP들은 인트론과 엑손에서 확인되어졌고, 남성의 불임에 관하여 중대한 영향을 미칠 것으로 보고되어졌다(Heytens *et al.* 2009). *PLCz*는 정자의 침체영역에서 발현이 되며(Kasimanickam *et al.*, 2011), 특이하게 정자요소들의 모든 필수적인 부분들을 가진다(Saunders *et al.*, 2002). 또한, 돼지 정자의 칼슘 이동에 원인이 되는 *PLCz*는 성공적인 수정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Kurokawa *et al.*, 2005). 13개로 알

려진 포유류의 *PLCz*는 구조에 따라 6가지 타입(Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Zeta, and Eta)으로 분류되었으며, *PLCz*가 가장 작았다(Rebecchi and Pentylala, 2000). Daghigh-Kia(2007)는 수소에서 운동성에 관하여 긍정적인 영향을 보였던($p < 0.05$) 인트론6 2749(G>A)의 *PLCz*의 SNP를 보고하였다. 하지만 *PLCz*에서 우리가 확인한 polymorphism은 인트론1 *g.158 A>C*였고, 이러한 유전적 변이가 정자 품질에 어떻게 영향을 미치는지 결론을 내리기 어려웠다. SNP와 관찰된 특성의 연관성은 initial transcription, editing and polyadenylation of the pre-mRNA, translation and decay of the mRNA product를 포함한 mRNA metabolism에 관한 인트론의 영향에 의해 설명될 수도 있다(Le *et al.* 2003). 또한, 유전자 및 조직 특이적 발현 패턴의 발현 수준을 조절하는 인트론들의 역할에 관한 보고서들의 수가 증가하고 있다. 본 연구의 결과는 두록 돼지의 운동성에 관련하여 높은 유의성을 보였다. 하지만 이러한 연구들이 앞으로 품종 특이적인 효과와 다른 집단 크기에서도 연구들이 고려되어야 할 것이다. 결론적으로 이러한 연구는 돼지의 동결정액의 품질을 결정할 수 있는 기초적인 자료로 활용 가능할 것이다.

REFERENCES

Cassady JP, Johnson R, Pomp D, Rohrer G, Van Vleck LD,

Table 3. Associations between SNPs of porcine CD9 and semen parameters

Gene	Traits	Genotype			P-value
		TT (n=56)	TC (n=17)	CC (n=5)	
<i>PLCz</i>	MOT(%)	38.26±1.621 ^a	16.29±2.95 ^b	8.77±5.44 ^b	<.0001**
	VCL(um/s)	55.98±1.500 ^a	47.52±2.73 ^a	36.54±5.03 ^b	0.0002**
	VSL(um/s)	28.52±0.890 ^a	19.27±1.61 ^b	20.38±2.98 ^b	<.0001**
	VAP(um/s)	39.10±1.160 ^a	27.68±2.11 ^b	24.90±3.90 ^b	<.0001**
	LIN(VSL/VCL)	56.75±1.070	52.71±1.95	61.71±3.61	0.0624
	ALH(um)	2.36±0.070 ^a	2.21±0.13 ^a	11.54±6.60 ^b	0.0160*

Abbreviations: MOT, yielded sperm motility; VCL, curve linear velocity; VSL, straight line velocity; VAP, average path velocity; LIN, linearity; ALH, amplitude of lateral head displacement.

¹ Values are expressed as least squares means and standard errors.

^{a,b} Least square means with different superscripts in the same row differ.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

- Spiegel E and Gilson K. 2001. Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *Journal of Animal Science*. 79(3):623-633.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K and Zhu H. 2014. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*. 147(3):321-330.
- Diniz D, Lopes M, Broekhuijse M, Lopes P, Harlizius B, Guimarães S, Duijvesteijn N, Knol E and Silva F. 2014. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. *Animal Reproduction Science*. 151(3):201-207.
- Fraser L and Strzeżek J. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals*. 40(6):530-536.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Parborell F, Albrecht M, Mayerhofer A and Calandra RS. 2006. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F_{2 α} in Syrian hamster Leydig cells: Inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology*. 147(9):4476-4485.
- Gunawan A, Cinar M, Uddin M, Kaewmala K, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C and Schellander K. 2012. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(5):782-790.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon S-Y, Fissore R, Hamer R, Deane C and Ruas M. 2009. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. *Human Reproduction*. 24(10):2417-2428.
- Johnson L, Aalbers J, Willems C and Sybesma W. 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *Journal of Animal Science*. 52(5):1130-1136.
- Johnson L, Weitze K, Fiser P and Maxwell W. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62(1):143-172.
- Kaewmala K, Uddin M, Cinar M, Grobe Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C and Schellander K. 2012. Investigation into association and expression of PLC ζ and COX2 as candidate genes for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 47(2):213-223.
- Kia D and Hossein D. 2007. Identification and SNP detection for preimplantation active genes and their association with embryo development and male fertility in cattle: Universitäts- und Landesbibliothek Bonn.
- Kurokawa M, Sato K-i, Wu H, He C, Malcuit C, Black SJ, Fukami K and Fissore RA. 2005. Functional, biochemical, and chromatographic characterization of the complete [Ca²⁺] i oscillation-inducing activity of porcine sperm. *Developmental Biology*. 285(2):376-392.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M and Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 287(5451):319-321.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A and Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*. 70(8):1337-1345.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 247(3):C125-C142.
- Rebecchi MJ and Pentylala SN. 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews*. 80(4):1291-1335.
- Ren D, Ren J, Xing Y, Guo Y, Wu Y, Yang G, Mao H and Huang L-S. 2009. A genome scan for quantitative trait loci affecting male reproductive traits in a White Duroc \times Chinese Erhualian resource population. *Journal of Animal Science*. 87(1):17-23.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K and Lai FA. 2002. PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129(15):3533-3544.
- Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Zolea F, Carpino A, Rago V, Maggiolini M, Andò S and Pezzi V. 2009. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 284(42):28905-28916.
- Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y and Fujisawa M. 2008. Cisplatin regulates Sertoli cell expression of transferrin and interleukins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 283(1):68-75.
- Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, Terada K, Nakagawa S, Sakamoto A, Hayakawa K, Suzuki K, Ueda J and Watanabe T. 2006. Molecular cloning, testicular postnatal expression,

and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C
ζ. *Reproduction*. 132(3):393-401.

Zeng C, He L, Peng W, Ding L, Tang K, Fang D and Zhang
Y. 2014. Selection of optimal reference genes for quantita-
tive RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation.

Cryobiology. 68(1):113-121.

Received September 10, 2015, Revised September 22, 2015,
Accepted September 22, 2015