

# 미성숙 돼지 정소 내에서의 pregnancy-associated plasma protein-A 특성 분석

## Analysis of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in Porcine Neonatal Testis

**이원영**

W. Y. Lee  
국립한국농수산대학  
한우학과<sup>1</sup>  
leewy81@korea.kr

**조광현**

K. H. Cho  
국립한국농수산대학  
낙농학과<sup>2</sup>  
ckh1219@korea.kr

**여준모**

J. M. Yeo  
국립한국농수산대학  
낙농학과<sup>2</sup>  
yeoj@korea.kr

**신용광**

Y. K. Shin  
국립한국농수산대학  
농수산비즈니스학과<sup>3</sup>  
ykshin22@korea.kr

**박진기\***

J. K. Park  
국립한국농수산대학  
양돈학과<sup>4</sup>  
parkjk@korea.kr

### Abstract

The identify of biomarkers in living tissues is useful to understand the characteristics and functions of the cells. Proteins such as protein gene product 9.5, promyelocytic leukemia zinc finger, NANOG, and stage-specific embryonic antigen-1 have been identified as markers for porcine undifferentiated spermatogonia. In this study, the expression of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), a newly discovered porcine spermatogonia marker and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A), a protein regulator of IGFBPs, were characterized in 5-day-old porcine testis. To analyze the function of IGFBPs, RT-PCR was performed. IGFBP 2, 3, 4, and 6 were detected in porcine spermatogonia and PAPP-A was detected in basement regions in 5day old porcine seminiferous tubules. PAPP-A was not expressed in spermatogonia, but it was expressed in Sertoli cells. These results suggest that the expression of PAPP-A protein in Sertoli cells may regulate the development and differentiation of testicular cells through the IGF axis in porcine neonatal testis.

**Key words** : Porcine, Neonatal testis, PAPP-A, IGFBPs, IGF axis

\* 교신저자

1 Department of Beef Science, Korea National College of Agriculture and Fisheries

2 Department of Dairy Science, Korea National College of Agriculture and Fisheries

3 Department of Agriculture and Fisheries Business, Korea National College of Agriculture and Fisheries

4 Department of Swine Science, Korea National College of Agriculture and Fisheries

## I. 서론

생체 조직 내 특정 세포에서 특이적으로 발현하는 단백질 표지인자를 발굴하는 것은 세포의 특성과 기능을 규명하는데 있어서 유용하게 이용된다. 정자 형성과정은 세정관내에 존재하는 줄기세포인 정원줄기세포로부터 생식 가능한 반수체 정자를 생산하는 과정이다 (Aponte *et al.*, 2005). 미성숙 돼지 정소에 존재하는 미분화된 정원세포는 protein gene product 9.5 (PGP9.5) (Luo *et al.*, 2006), promyelocytic leukemia zinc finger, Nanog (Goel *et al.*, 2008), 그리고 stage-specific embryonic antigen-1 (Kim *et al.*, 2013) 등의 생체 표지인자를 발현하고 있다. 최근 우리 그룹은 total RNA sequencing 방법을 이용해 insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) 를 비롯한 다양한 미분화 돼지 정원세포의 표지인자를 밝힌바 있다 (Lee *et al.*, 2016).

Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)는 1974년에 처음 발견된 단백질로 임신 중 placental syncytiotrophoblast에 의하여 생성되고 임신부의 순환계로 분비되어 임신기간 동안 농도가 증가한다 (Lin *et al.*, 1974; Conover, 2012). PAPP-A는 임신 초기 태아의 다운증후군에 의해 감소되며 이를 통해 태아 다운증후군의 표지마커로 이용될 수 있다 (Wald *et al.*, 1999). 또한, PAPP-A는 Insulin growth factor (IGF)의 활성인자로 알려져 있으며, IGF와의 결합인자인 Insulin growth factor-4 (IGFBP-4)를 Insulin growth factor-I receptor (IGF-IR)의 근접한 곳에서 절단하며, 이를 통해 IGF와 IGF-IR의 결합을 활성화 시키는 기능을 가지고 있다 (Oxvig, 2015). IGF가 존재하는 경우, PAPP-A는 IGFBP-4와 IGFBP-5를 유사한 확률로 절단하게 되며, PAPP-A에 의한 IGFBP-4 단백질분해 메카니즘에서 IGFBP-4는 IGF와 결합하여 PAPP-A 기질이 된다 (Laursen *et al.*, 2001).

IGF system은 IGF-I, IGF-II, 각각에 대한 IGF receptor 그리고 6개의 IGFBP family로 구성되어 있다 (Jones and Clemmons, 1995). IGF axis는 3개의 growth factor (IGF-I, IGF-II, insulin)와 상응하는 세포막 수용기인 IGF-1 receptor, IGF-II receptor, insulin receptor로 구성된다 (Benyoucef *et al.*, 2007). IGF-I과 IGF-II는 세포의 성장, 증식과 분화에 관여하며 신체 내에 있는 모든 기관과 기관계에 영향을 준다. 특히, 정소의 적절한 발달과 기능에 주요한 역할을한다 (Griffeth *et al.*, 2014). 생식은 hypothalamic-pituitary-gonadal axis에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으나 local gonadal factor의 활성은 Insulin/IGF family에 의해서 생식활동이 조절된다고 보고되었다 (Griffeth *et al.*, 2014). 또한 생쥐에서 insulin/IGF 신호전달은 성염색체 결정(sex determination)과 정소 내 분화에 결정적인 역할을 한다 (Pitetti *et al.*, 2013).

본 연구에서는 IGF axis를 조절하는 IGFBPs와 PAPP-A의 발현을 5일령 돼지 정소에서 분석함으로써 IGFBPs와 PAPP-A에 의한 돼지 정소의 발달 및 향후 이루어질 정자형성 과정에 대해 논의 하고자 한다. 또한 이러한 논의를 위하여 5일령돼지 정소에서의 IGFBPs의 발현과 PAPP-A, PGP9.5와 GATA4의 발현을 조직 면역염색 분석을 통해 분석하였다.

## II. 연구방법

### 1. 정소 조직 준비

본 실험에 사용된 정소는 경기도 양평 인근 농장에서 사육된 5일령 돼지 (듀록×요크셔×랜드레 이스) 로부터 거세된 정소를 구하여 사용하였다. 거세된 돼지 정소는 1cm×1cm 크기로 절편한 뒤 급속 냉동 후 -70°C에 보관하고 조직 분석을 위

해 Bouin's solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정하였다.

## 2. 유전자 발현 분석

Qiagen RNA extraction kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)을 이용하여 5일령 돼지 정소, 정원세포, 세르톨리세포로부터 RNA를 회수한 후 1µg 총

RNA를 RT-PCR premix kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 cDNA로 합성 하였다. PCR 반응은 95°C 20초, 55°C 20초, 72°C 20초 조건으로 35회 반응 시켰으며, AccuPower PCR PreMix kit (BIONEER, Daejeon, South Korea)을 사용하였다. RT-PCR에 사용한 Primer는 Table 1에 정리하였다.

**Table 1. Primers used for the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of cDNA from porcine spermatogonial stem cells and 5 day old porcine testes**

Gene	Forward Primer	Reverse primer
<i>IGFBP-1</i>	5'-GAGCAGCTCCTGGACAGTTT-3'	5'- AAGTCTGTCCCTGCCTTCT-3'
<i>IGFBP-2</i>	5'-ACCTGTACTCCTTGCACATCC-3'	5'- GATCAGCTTCCCGGTGTTG-3'
<i>IGFBP-3</i>	5'-GCTGAACCACCTCAAGTTCC-3'	5'-ACTTATCCACGCACCAGCAG-3'
<i>IGFBP-4</i>	5'-CTCCTGCCAGAGTGAGCTG-3'	5'-GGAAGCTTCACTCCCGTCTT-3'
<i>IGFBP-5</i>	5'-GCAAGCCAAGATCGAGAGAG-3'	5'-CTGGGTCAGCTTCTTCTGC-3'
<i>IGFBP-6</i>	5'-AAGGAGAGTAAGCCCCAAGC-3'	5'-GGAAGACCTCGGTCTGGAGT-3'
<i>IGFBP-7</i>	5'-TGGAGTTCAAAGGACGGAAC-3'	5'-TCCTTGGGAGTTAGCTGCAT-3'
<i>B2M</i>	5'-TTCACACCGCTCCAGTAG-3'	5'-CCAGATACATAGCAGTTCAGG-3'

## 3. 조직 Hematoxylin & Eosin 염색 분석

Bouin's solution에 의해 24시간 고정된 정소 조직을 70-100% (v/v) 에틸알코올에 처리하여 탈수 시킨 뒤, xylene에 10분간 2회 처리하여 투명화 시켰다. 투명화 된 돼지 정소 조직은 파라핀에 2시간 침투 후 고정하여 5 µm 두께로 microtome (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용해 절편 하였다. 절편 한 돼지 정소 조직은 slide glass 위에서 건조하였다. Slide glass 에 건조된 돼지 정소 조직은 xylene에 10분 처리 후 100% 에서 50% (v/v) 에틸 알코올에 침수 시킨 뒤 hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 에 5분간 처리하고 3회 수세 후 eosin (Sigma-Aldrich)에 1분간 처리하였다. 염색된 조직은 DPX mounting

medium (Fluka, Buchs, Switzerland)을 이용하여 고정한 후 광학 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan) 을 이용하여 분석하였다.

## 4. 조직 면역염색 분석

침수된 조직은 tris-ethylenediamine tetra acetic acid(EDTA) solution에 20분간 끓여서 항원을 복구시켰다. 슬라이드가 실온이 되었을 때 2% Bovine serum albumin (Bovogen Biologicals, Melbourne, Australia), 0.025% Triton-X100을 포함하는 PBS 를 1시간 처리하여 세포막의 투과성을 높이고 비 특이적인 결합이 일어나지 않도록 하였다. 이 후 같은 PBS 용액에 1:50로 희석된 PAPP-A항체 (SC-365226; Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA, USA), 1:500으로 희석된 PGP9.5 항체 (7863-0504; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), 1:50으로 희석된 GATA4 항체(SC-1237;Santa Cruz Biotechnology)를 처리한 후 3회 수세 후 1:1000로 희석된 2차 항체를 사용하였다. 1차 항체는 4°C에서 12시간 반응 시켰으며 2차 항체는 상온에서 1시간 반응 시켰다. 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich)를 상온에서 10분간 처리하여 핵을 염색하였고 형광 현미경(Nikon)을 이용해 단백질 발현을 관찰하였다..

### 5. 통계처리방법

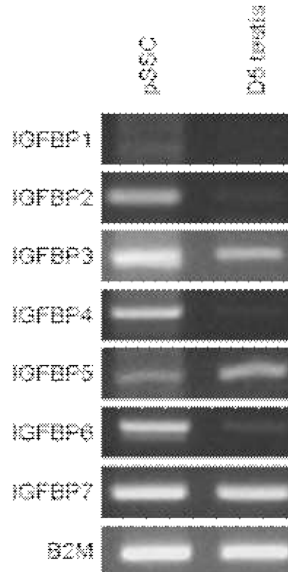
돼지 정원세포와 5일령 돼지 정소에서의 IGFBPs의 발현 차이 분석을 위해 SPSS statistical package version 21.0 의 t-test 분석을 실행하였다. 통계

분석의 유의성 검증은  $P < 0.05$ 로 제한하였다.

## III. 결과

### 1. 돼지 정원세포와 정소에서 IGFBPs 발현 분석

돼지 정원세포와 돼지 정소에서의 IGFBPs의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 IGFBP 2, 3, 4 와 6 의 발현이 5일령 돼지 정소보다 돼지 정원세포에서 높게 발현하였으며, IGFBP1의 발현은 확인되지 않았다. 또한 IGFBP5의 발현은 5일령 돼지 정소보다 정원세포에서 낮게 발현 하였으며 IGFBP7의 발현은 차이가 없었다 (Fig. 1).

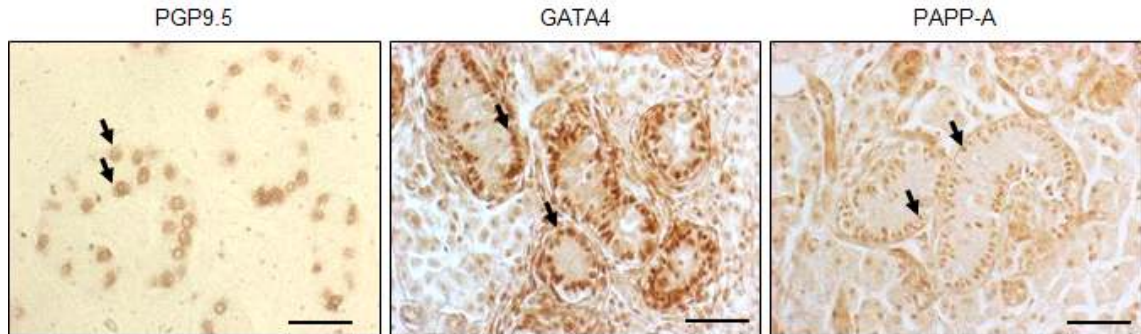


**Fig. 1. RT-PCR analysis of IGFBPs in porcine SSCs and 5day old porcine testes.** IGFBPs, insulin-like growth factor-binding proteins; SSC; spermatogonial stem cell; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

## 2. 5일령 돼지 정소에서 PGP9.5, GATA4와 PAPP-A 의 발현 분석

5일령 돼지 정소에서 PGP9.5, GATA4와 PAPP-A의 발현을 확인하기 위해 조직 면역염색

분석을 수행한 결과 PGP9.5는 정원세포에서 발현하였으며 GATA4는 세르톨리세포에서 발현하였다. 한편 PAPP-A의 발현은 GATA4를 발현하는 세르톨리 세포에서 확인되었다 (Fig. 2).



**Fig. 2. Expression of PGP9.5, GATA4 and PAPP-A in 5day old porcine testis.** Arrows indicates positive cells in 5day old porcine testes. PGP9.5, protein gene product 9.5; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein-A. The scale bars indicate 50 μm.

## 3. 5일령 돼지 정소에서 PGP9.5 와 GATA4의 발현 분석

5일령 돼지 정소에서 PGP9.5 와 GATA4를 발현하는 세포를 동정하기 위해 co-immunohistochemistry 를 수행한 결과 PGP9.5를 발현하는 세포와 GATA4를 발현하는 세포는 모두 세정관 내에 존재 하였으나 두 단백질을 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않았다. PGP9.5를 발현하는 세포는 5일령 돼지 정소에서 세정관의 내강에 위치하고 있었으며 GATA4를 발현하는 세포는 세정관의 기저막 부위에 존재하였다 (Fig. 3).

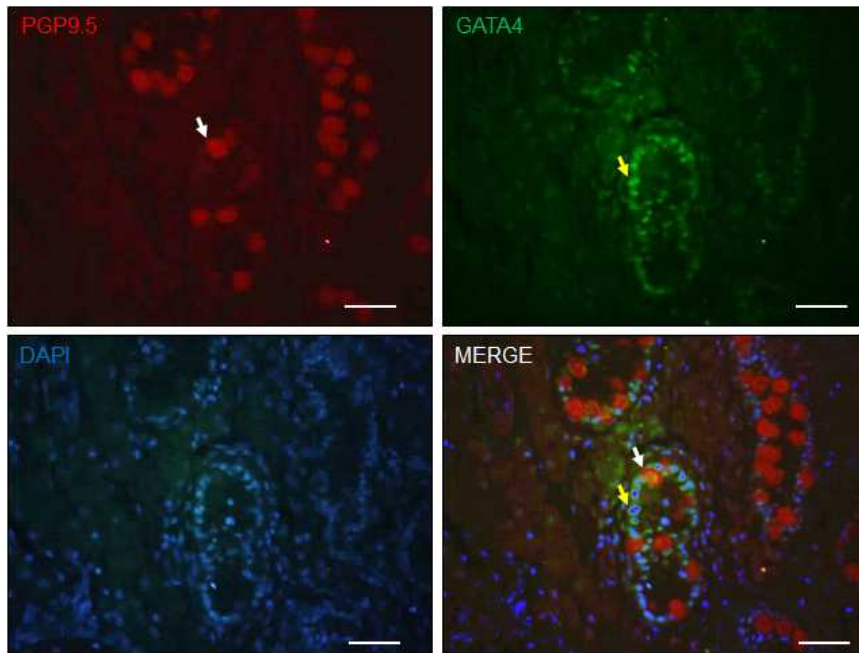
## 4. 5일령 돼지 정소에서 PGP9.5 와 PAPP-A의 발현 분석

5일령 돼지 정소에서 PGP9.5 와 PAPP-A를 발현하는 세포를 동정하기 위해 co-immunohisto-

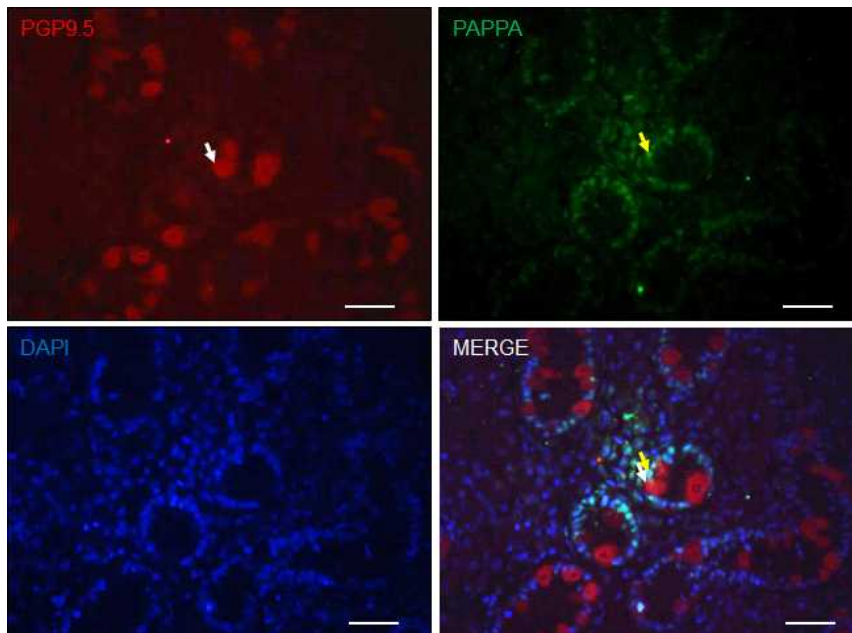
chemistry를 수행한 결과 PGP9.5 와 PAPP-A를 동시에 발현하는 세포는 세정관 내에서 관찰되지 않았다. PGP9.5를 발현하는 세포는 5일령 돼지 정소에서 세정관의 내강에 위치하고 있었으며 PAPP-A를 발현하는 세포는 세정관의 기저막 부위에 존재하였다 (Fig. 4).

## IV. 고찰

본 연구에서 우리는 5일령 돼지 정소 세정관 내에서 IGFbPs, PAPP-A, PGP9.5 와 GATA4 의 발현 양상을 확인하였다. 5일령 돼지 정소에서 결과 IGFbP 2, 3, 4, 6 와 PGP9.5는 정원세포에서 GATA4와 PAPP-A는 세르톨리세포에서 관찰되었다. IGF 신호는 생식기관의 발달과 기능에 있어서 중요한 역할을 한다 (Fu *et al.*, 2001). 정소에서는



**Fig. 3. Co-immunohistochemistry analysis of PGP9.5 with GATA4 in 5day old porcine testes.** White arrow indicates cell expressing PGP9.5 protein. Yellow arrow indicates cells expressing GATA4. PGP9.5, protein gene product 9.5. The scale bars indicate 50  $\mu$ m.



**Fig. 4. Co-immunohistochemistry analysis of PGP9.5 with PAPP-A in 5day old porcine testes.** White arrow indicates cell expressing PGP9.5 protein. Yellow arrow indicates cells expressing PAPP-A. PGP 9.5, protein gene product 9.5; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein-A. The scale bars indicate 50  $\mu$ m.

IGF-I 수용체의 발현이 세르톨리세포, 레이디세포, 정모세포에서 발견된바 있다 (Antich *et al.*, 1995). 또한, 쥐 정소에서는 IGF-I의 발현이 발달 단계에 따라 다르게 발현하나 성체에서는 오직 정모세포에서만 발현하는 것으로 알려져 있다 (Hansson *et al.*, 1989).

IGFBPs는 생체내에서 IGF의 다면발현을 조절해주는 중요한 인자이다 (Cohen, 2006). 본 연구에서는 *IGFBP1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7의 발현을 정원세포와 5일령 돼지 정소에서 비교한 결과 *IGFBP2*, 3, 4, 6의 발현이 정원세포 특이적으로 높게 나타났다 (Fig. 1). 돼지 정소내에서 IGFBP의 기능이 밝혀진 바는 없지만 쥐의 정소 세포에서 *IGFBP1*, 2, 3, 4, 5가 관찰된바 있다 (Lin *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 2003). 또한, *IGFBP1*을 과 발현하는 생쥐에서는 IGF-I 및 IGF-I 수용체의 상호작용에 저해를 가해 정자형성의 변화를 보였으며 (Froment *et al.*, 2004), *IGFBP2*와 *IGFBP3*의 발현이 쥐와 생쥐의 레이디세포에서 각각 관찰되었다 (Wang *et al.*, 1994, Matsui and Takahashi 2001). *IGFBP4*의 발현은 미성숙 돼지 세르톨리세포에서 발견된바 있으며 인간의 정소에서 *IGFBP5*와 *IGFBP6*의 발현이 관찰된바 있다 (Bardi *et al.*, 1999; Zhou and Bondy 1993). 이러한 사실은 IGF 신호가 정소의 발달 및 정자 생성 과정에 중요한 역할을 한다는 사실을 보여주는 사례이며 이 신호의 조절자인 IGFBPs와 PAPP-A의 관련성을 보여준다.

이전 연구에 따르면 미성숙 돼지 정소의 세정관 내에는 세르톨리세포와 정원세포만 존재하며, 정원세포는 세정관의 내강에 존재하고 세르톨리세포는 세정관의 기저막 부위에 존재하며 GATA4 단백질을 발현하였다 (Lee *et al.*, 2016). 본 연구에서는 IGFBPs의 기능을 조절해 주는 인자인 PAPP-A 단백질의 발현이 세르톨리세포 특이적으로 발현하였고 (Fig. 4), 세르톨리세포에서 분비된 PAPP-A에 의해 정원세포내에서 발현하는 IGFBPs의 작용을 조절해 줌으로써 미성숙 돼지 정소에서의 IGF

axis가 조절될 수 있음을 예측할 수 있다. 하지만 미성숙 돼지 정소에서의 IGFBPs의 기전이 확실하게 밝혀지지 않았으므로 이와 관련된 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

## V. 적요

생체 조직 내에서 표지인자의 발견은 해당 세포의 특성과 기능을 이해하는 데 매우 중요하다. 기존에 밝혀진 돼지 정원세포의 표지인자로 PGP9.5, PLZF, NANOG, SSEA1 등의 단백질이 알려져 있다. 본 연구에서는 최근 새로이 발굴된 돼지 정원세포 표지인자인 IGFBPs의 기능을 분석하기 위해 IGFBPs의 발현과 이를 조절하는 단백질인 PAPP-A 단백질의 발현을 5일령 돼지 정소에서 확인하였다. *IGFBP2*, 3, 4, 6의 발현이 돼지 정원세포 특이적으로 높게 나타났으며 PAPP-A의 발현은 세르톨리세포 특이적으로 나타났다. PAPP-A의 발현을 PGP9.5, GATA4 등의 표지인자와 함께 확인해 본 결과 PGP9.5를 발현하는 정원세포에서는 발현하지 않았으며, 세정관 내의 세르톨리세포 특이적으로 발현하였다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 세르톨리세포에서 발현하는 PAPP-A 단백질은 정원세포에서 발현하는 IGFBPs의 조절을 통하여 알려진 바와 같이 IGF axis를 통해 정소내 세포들의 발달 및 분화를 조절할 것으로 판단된다.

## VI. 참고문헌

1. Antich, M., Fabian, E., Sarquella, J., Bassas, L. 1995. Effect of testicular damage induced by cryptorchidism on insulin-like growth factor I receptors in rat Sertoli cells. J Reprod Fertil 104(2): 267-275.

2. Aponte, P. M., van Bragt, M. P. A., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. M. 2005. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*. 113(11-12): 727-742.
3. Bardi, G., Bottazzi, C., Demori, I., Palmero, S. 1999. Thyroid hormone and retinoic acid induce the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 in prepubertal pig sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 141(6): 637-643.
4. Benyoucef, S., Surinya, K. H. Hadaschik, D., Siddle, K. 2007. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J*. 403(3): 603-613.
5. Conover, C. A. 2012. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends Endocrinol Metab*. 23 (5): 242-249.
6. Froment, P., Staub, C., Hembert, S., Pisselet, C. Magistrini, M., Delaleu, B., Seurin, D., Levine, J. E., Johnson, L., Binoux, M., Monget, P. 2004. Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* 145(4): 2080-2091.
7. Fu, Z., Kubo, T., Noguchi, T., Kato, H. 2001. Developmental changes in the mRNA levels of IGF-I and its related genes in the reproductive organs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Growth Horm IGF Res* 11(1): 24-33.
8. Goel, S. Fujihara, M., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. 2008. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reproduction*. 135(6): 785-795.
9. Griffeth, R. J., Bianda, V., Nef S. 2014. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl*. 24(1): 12.
10. Hansson, H. A., Billig, H. Isgaard, J. 1989. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40(6): 1321-1328.
11. Jones, J. I., Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 16(1): 3-34.
12. Kim, Y. H. Kim, B. J., Kim, B. G., Lee, Y. A., Kim, K. J., Chung, H. J. Hwang, S. Woo, J. S. Park, J. K., Schmidt, J. A., Pang, M. G., Ryu B. Y. 2013. Stage-specific embryonic antigen-1 expression by undifferentiated spermatogonia in the prepubertal boar testis. *J Anim Sci*. 91(7): 3143-3154.
13. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., S e, R., Boldt, H. B., Sottrup-Jensen, L. L., Giudice, C., Conover, C. A., Oxvig, C. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett*. 504(1-2): 36-40.
14. Lee, K. H., Lee, W. Y., Kim, J. H., Park, C. K., Do, J. T., Kim, J. H., Choi, Y. S., Kim, N. H., Song, H. 2016. Subculture of Germ Cell-Derived Colonies with GATA4-Positive Sertoli Cells from Neonatal Pig Testes. *Stem Cells Int* 2016:6029271.
15. Lee, W. Y., Do, J. T., Park, C., Kim, J. H.,



- Chung, H. J., Kim, K. W., Gil, C. H., Kim, N. H., Song, H. 2016. Identification of Putative Biomarkers for the Early Stage of Porcine Spermatogonial Stem Cells Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 11(1): e0147298.
16. Lin, T., Wang, D., Nagpal, M. L., Shimasaki, S., Ling, N. 1993. Expression and regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1, -2, -3, and -4 messenger ribonucleic acids in purified rat Leydig cells and their biological effects. *Endocrinology* 132(5): 1898-1904.
  17. Lin, T. M., Galbert, S. P., Kiefer, D. Spellacy, W. N., Gall, S. 1974. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol*. 118(2): 223-236.
  18. Luo, J. Megee, S., Rathi, R., Dobrinski, I. 2006. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Mol Reprod Dev*. 73(12): 1531-1540.
  19. Matsui, H., Takahashi, T. 2001. Mouse testicular Leydig cells express Klk21, a tissue kallikrein that cleaves fibronectin and IGF-binding protein-3. *Endocrinology* 142(11): 4918-4929.
  20. Oxvig, C. 2015. The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. *J Cell Commun Signal*. 9(2): 177-187.
  21. Peters, M. A. Peters, M. A. J. Mol, J. A. van Wolferen, M. E. Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., Teerds, K. J., van Sluijs, F. J. 2003. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 22.
  22. Pitetti, J. L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M. D., Aubry, F., Cederroth, C. R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., Docquier, M., Herrera, P. L., Pralong, F., Germond, M., Guillou, F., Jégou, B., Nef, S. 2013. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol*. 27(5): 814-827.
  23. Wald, N. J., Watt, H. C., Hackshaw, A. K. 1999. Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med*. 341(7): 461-467.
  24. Wang, D., Nagpal, M. L., Lin, T., Shimasaki, S., Ling, N. 1994. Insulin-like growth factor-binding protein-2: the effect of human chorionic gonadotropin on its gene regulation and protein secretion and its biological effects in rat Leydig cells. *Mol Endocrinol* 8(1): 69-76.
  25. Zhou, J., Bondy, C. 1993. Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril* 60(5): 897-904.

논문접수일 : 2020년 3월 19일  
 논문수정일 : 2020년 6월 16일  
 게재확정일 : 2020년 6월 19일