

정상 산모와 중증 전자간증 산모의 태반에서 Matrix Metalloproteinase (MMP) -2, -9의 발현양상

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

문여정 · 황한성 · 김영한 · 권자영 · 박용원

Differential expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, -9 in normal and severe preeclamptic human placentas

Yeo Jung Moon, M.D., Han-Sung Hwang, M.D., Young-Han Kim, M.D.,
Ja-Young Kwon, M.D., Yong-Won Park, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Yonsei University Health System, Seoul, Korea*

Objective: The aim of the study was to investigate the differential expression of Matrix Metalloproteinase (MMP) -2,-9 in the normal and severe preeclamptic placenta.

Methods: Placentas were obtained from women undergoing cesarean section with normal (n=10) and severe preeclamptic (n=10) pregnancies. Semi-quantitative RT-PCR was done to detect the placental gene expression of MMP-2,-9. Western blot analysis was performed to identify MMP-2,-9 protein expression in each placenta. Immunohistochemical staining were employed to localize MMP-2,-9 in placental tissues.

Results: MMP-2,-9 genes were expressed in both normal and severe preeclamptic placenta. There were lower expressions MMP-2,-9 in severe preeclamptic placentas than in normal. MMP-2,-9 proteins were all present in each placental tissue. The expression for MMP-2,-9 was weaker in severe preeclamptic placenta than in normal. MMP-2,-9 were localized only to the trophoblast, and were also weakly positive in severe preeclamptic placenta compared with normal.

Conclusions: MMP-2,-9 expressions were decreased in severe preeclampsia placenta compared to those from normal placenta. This study suggests that decreased expression of MMP-2,-9 may have a role in the development of severe preeclampsia.

Key Words: MMP-2, MMP-9, Severe preeclampsia, Placenta

서 론

임신 중 고혈압과 단백뇨가 특징인 전자간증은 다양한

기관에 영향을 미쳐 태아에게는 자궁내 태아발육제한, 자궁내 사망, 조산 및 미숙아와 관련된 합병증을 유발하며, 임신부에게 자간증, 신부전, 폐부종, 뇌졸중 및 사망 등으로 이어질 수 있다.¹ 여러 가설들-염증성 질환, 혈관 관련 물질, 태반 허혈, 유전적 요인, 비정상 면역반응 등-이 전자간증의 병태 생리로 제시되고 있으나,^{2,3} 최근에는 많은 연구들이 비정상적인 태반형성 및 태반 허혈 (abnormal

접수일: 2008. 4. 17.
채택일: 2008. 9. 2.
교신저자: 김영한
E-mail: yhkim522@yuhs.ac

placentation and placental vasculature insufficiency)에 기인한 저산소증에 의해 어떤 특정 물질이 분비되어 임신부의 혈관 조직에 작용함으로써 전자간증의 다양한 임상양상이 발생된다는 이론이 주로 받아들여지고 있다.^{4,5}

세포외 기질 분자, 단백 분해 효소 (extracellular matrix molecule, degrading enzyme)는 유착분자와 세포외 기질을 분해하여 영양막의 분화 및 침습을 도움으로써 태반의 형성 과정에서 중요하게 작용하며 대표적인 물질로 matrix metalloproteinase (MMP)가 있으며 이 중 MMP-2와 MMP-9은 세포외 기질의 주된 물질인 IV형 콜라겐과 젤라틴을 분해한다.

MMP-2는 임신 6주 정도부터 분비되며 점차 감소하여 임신 11주에는 임신 6주에 비하여 1/6정도로 감소하며 임신 말기까지 지속적으로 분비되는 반면 MMP-9는 임신 6주에는 측정이 안되다 임신 7주부터 증가하여 임신 11주에는 임신 7주 때의 10배 이상 측정되나 임신 말기로 갈수록 감소한다.⁶ MMP-2는 임신초기부터 말기에 걸쳐 용모외 영양막세포 (extravillous trophoblast)에서 나타나고, MMP-9는 임신 초기 용모 영양막세포 (villous cytotrophoblast)에서 나타난다.⁷

MMP-2, -9은 배란, 임신 초기 배아의 착상 및 발생 과정, 자궁경부숙화, 양막파수 및 태반분리 등의 정상 임신과정뿐만 아니라,⁸⁻¹⁴ 임신성 용모질환, 조기 양막파수 및 조기 진통, 유착 태반, 임신성 당뇨, 전자간증 등의 이상 임신의 병태 생리와 밀접한 관련을 보인다.¹⁵⁻¹⁹

MMP-2, -9의 발현이 적게 이루어져 세포외 기질의 적절한 분해가 이루어지지 않아 초기 태반 형성이 부족하게 되고, 이에 따라서 전자간증이 일어날 것으로 생각된다. 그러나, 실제 발표된 논문들은 전자간증에서 MMP-2, -9의 농도 및 태반 발현을 다르게 보고하고 있다. Galewska 등은 전자간증의 제대혈에서 MMP-2는 감소하고 MMP-9은 증가한다고 보고하였다.¹⁹ Narumiya 등은 정상 산모에 비해 전자간증 산모 혈장 내 MMP-2가 임신 기간 중 높게 유지된다고 보고하였다.²⁰ Huisman 등은 전자간증, 자궁내 태아발육지연 등의 이상 임신과 정상 임신의 임신 초기 태반 내 MMP-2, -9의 발현이 차이가 없다고 보고하였으나,²¹ Merchant 등은 자궁내 태아발육지연 임신에서는 태반 내 MMP-2, -9의 발현이 감소되어 있음을 보고하였

다.²²

이상에서 MMP-2, -9은 임신과정에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있으며, 특히 전자간증의 병태 생리를 이해 하는데 도움을 줄 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 중증 전자간증 (이하 전자간증) 임신부와 정상 임신부에서 태반조직 내의 MMP-2와 MMP-9의 발현 차이를 살펴 보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2005년 6월 1일부터 12월 31일까지 6개월간 본원에서 정기적인 산전진찰 후 분만한 산모를 대상으로 하였다. 실험에 참여한 산모는 총 20명으로 정상 산모 10명과 전자간증 산모 10명을 대상으로 하였다. 참여 산모들은 모두 제왕절개분만을 시행하였고, 그 때 분만된 태반을 대상으로 하였다. 제왕절개술의 적응증으로 정상 산모중 기왕 제왕절개술력 8명, 기왕 자궁근종 절제술력 1명, 둔위 태위 1명이었으며 전자간증 산모중 기왕 제왕절개술력 1명, 태아절박가사 2명, 자간증 전구증상 발현 7명이었다.

임신 주수의 산정은 각 산모의 월경력과 임신 제1삼분기의 태아 초음파 소견을 고려하여 적절하다고 판단되는 지표를 기준으로 삼았다. 중증 전자간증의 정의는 임신 20주가 지나서 고혈압과 단백뇨가 있는 산모로 정의하였고, 6시간 이상 간격을 두고 측정한 혈압이 수축기가 160 mmHg, 이완기가 110 mmHg 이상인 경우를 고혈압으로 하였고, 4시간 이상 간격을 두고 측정한 단백뇨가 dipstick 검사상 적어도 3+ 이상이거나 24시간 소변에서 5,000 mg 이상인 경우로 정의하였다.²³ 그리고 각각의 정의는 적어도 두 번 이상의 연속 검사로 반복 확인하였다.

저출생 체중아가 동반된 전자간증은 실험대상에서 제외하였으며,²⁴ 그 이외 다태임신, 태아의 구조적 및 유전적 이상, 산모의 기왕 고혈압 병력이 있는 경우 및 산모가 기왕에 신장질환, 간질환, 당뇨병, 결체조직 질환 등 내과적, 외과적 질환을 가지고 있는 경우 실험에서 제외하였다. 임신과 관련된 기타의 질병이나 약물 복용의 기왕력이 있거나 조기 분만의 위험 요소를 가지고 있는 산모는 실험에서 제외되었다.

2. 연구방법

1) 검체 수집

각각의 태반조직은 제왕절개분만이 이루어진 후 나온 태반을 대상으로 하였다. 분만 후 15분 이내에 태반 조직을 제대혈관 부위 중 전체 태반의 중앙 부분에서 가로, 세로 각각 1 cm³의 크기로 절제하여 분석 전까지 -70°C의 질소 탱크에 보관하였고, 나머지 태반 조직은 4% formal saline에 담근 후 48시간 이내에 paraffin wax를 처치하여 면역조직화학염색법을 위한 슬라이드를 만들 때까지 보관하였다.

2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

실험을 위한 전체 RNA는 easy-spin total RNA extraction kit (Intron, Biotechnology, Sung Nam, Korea)를 사용하여 태반으로부터 분리하였다. 분리된 RNA는 oligo (dT) primer와 M-MLV reverse transcriptase (Fermentas life science, USA)를 사용하여 역전사 (reverse transcription)를 실시하여 cDNA를 합성하였다. 사용된 primer들은 Table 1에서 보여진 것과 같다. 이때의 상태 (condition)는 5분간 70°C, 60분간 37°C, 10분간 70°C로 하였다. PCR 과정은 35회 (cycles)를 시행하였고, 검체는 94°C에서 1분간 변성 (denature)된 후 다시 1분간 β -actin은 65°C, MMP-2, -9은 55°C에서 각각의 primer에 불림 (annealing) 과정, 이후 30초간 72°C에서 확장 (extension) 과정을 거쳤다. 합성된 cDNA는 -20°C에 사용 전까지 보관하였다. PCR을 통해 얻어진 산물은 1.5% agarose gel상에 전기 영동을 통하여 분획시킨 후 분석하였다.

3) Western blotting

분쇄한 태반 조직 샘플에 lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, Mass., USA)를 넣고 10분 동안 incubation한 후 4°C에서 14,000 rpm으로 원심 분리하여 가라앉힌 후 단백질 extract를 얻었다. 이렇게 얻은 단백질은 환원제를 포함하는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리시켰다. 전기 영동 후 gel을 상온에서 PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes (Millipore, Bedford, MA)에 blotting하였다. 이후 5% non-fat dry milk/TBST로 2시간 동안 상온에서 blocking 하였다. 상온에서 monoclonal antibody인 MMP-2 Ab, MMP-9 Ab (MMP-2, MMP-9: 1:100, Calbiochem, San Diego, CA)와 β -actin (Sigma, MO, USA)을 2시간 동안 처리하고, TBST washing buffer로 10분씩 3번 씻었다. 이후 secondary antibody (anti-rabbit polyclonal IgG, Horseradish peroxidase conjugated anti-goat polyclonal IgG: Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. Anti-mouse monoclonal IgG: Amersham, Buckinghamshire, England)를 노출시켰다. 그 후 ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, England)를 반응시키고, Hyper X-ray film에 30초, 1분, 5분 노출시켜 영상을 얻었다.

4) Densitometer

RT-PCR과 Western blotting을 시행하여 얻은 영상을 densitometer (IMAGE READER LAS-1000 lite, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 사용하여 scanning을 하였고, digital analysis software (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 사용하여 분석하였다.

Table 1. Primer sequence specific to the target genes

Gene	Dir	sequence	Size (bp)
MMP-2	S	5'-AGGACATTGTATTTGATGGC-3'	326
	A	5'-CTTCTTGTTTTGCTCCAGT-3'	
MMP-9	S	5'-AGCTTTTCTTCTCTCTGGG-3'	378
	A	5'-ACTGCAGGATGTCATAGGTC-3'	

S: sense, A: antisense, bp: base pair, Dir: direction.

5) 면역조직화학 염색법 (immunohistochemistry)

10% 중성 포르말린 용액에 고정하고, 파라핀 조직을 4 μm의 두께로 절편 (section)을 만들어 xylene으로 15분간 탈파라핀화하고 10%, 90%, 70%의 알코올을 각 3분씩 거쳐 증류수로 함수 (rehydration)시켰다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수로 10분간 처리한 후 항원의 노출을 위하여 극초단파를 이용하여 30분간 끓이고, 다시 30분간 실온에서 식힌 후 PBS buffer로 10분간 처리하였다. 일차 항체인 MMP-2, -9 항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 각각 1:100으로 희석하여 4°C에서 밤샘 처리한 후 anti goat -IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 20분간 처리하여 비특이적 결합을 억제하였다. 다시 PBS buffer에서 10분간 처리한 후 Streptavidin-HRP (DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 20분간 처리하였다. PBS buffer에 10

분간 처리한 후 DAB chromogen kit (ScyTek, Utah, USA)로 발색한 다음 증류수로 씻어냈다.

6) 통계학적 분석

실험에 참여한 대상 환자들에 대한 비교는 평균과 표준편차를 이용하여 표현하였고, densitometry를 이용한 얻은 결과는 중위수와 최대 및 최소값으로 표현하였다. 두 군 사이의 비교에 사용한 통계법은 Mann-Whitney U test를 사용하였다. P value가 0.05 미만인 경우만을 통계적으로 의미가 있는 것으로 하였다. 통계에 상용된 프로그램은 SPSS로 version 12.0을 사용하였다.

결 과

실험에 참여한 산모들의 특징은 Table 2와 같았고, 산모

Table 2. Clinical characteristics of normal and preeclamptic pregnant women

Variable	Normal group (n=10)	Preeclampsia group (n=10)	P-value [†]
Maternal age (years)	30±2.9	31±3.5	NS
Gestational age at delivery (weeks)	37±1.6	35±2.1	0.01
Birth weight (g)	3,049±409	2,674±423	0.021
Smoker (%)	-	-	NA
Systolic blood pressure (mmHg)	112±9	169±12	0.008
Proteinuria	none	10/10*	

Data: Mean±SD.

*≥ 2+ on dipstick in ten patients.

†Mann-Whitney U test, P<0.05; statistically significant, NS: not significant, NA: not applicable.

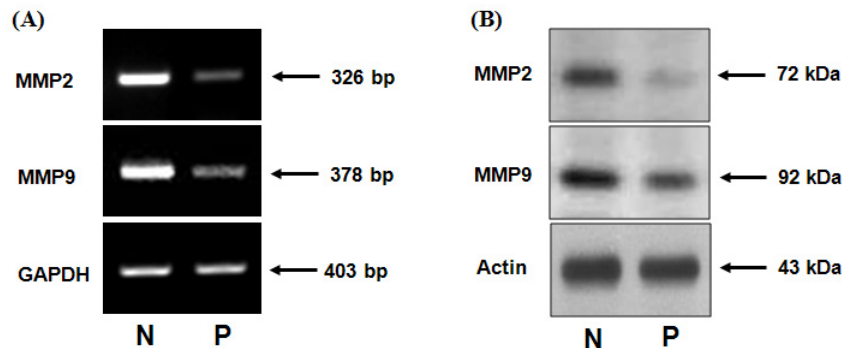


Fig. 1. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP) -2, -9 in human placenta. Differential expressions of MMP-2,-9 were analyzed in normal and preeclamptic placentas by (A) RT-PCR and (B) Western blot. N: normal pregnancy, P: preeclamptic pregnancy.

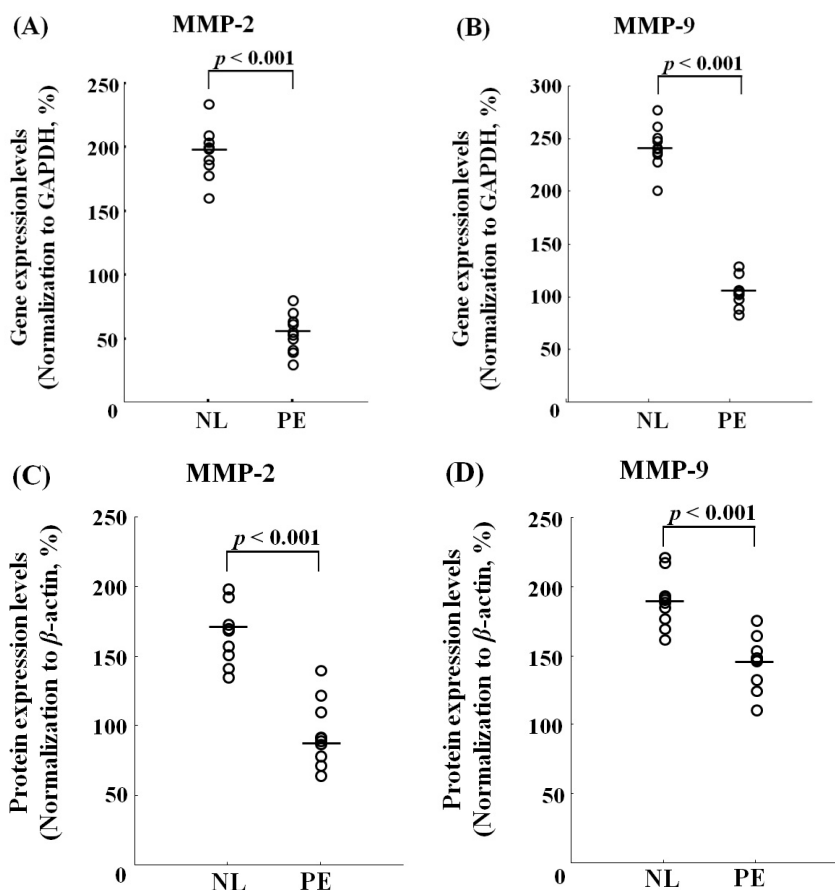


Fig. 2. Densitometric values normalized to GAPDH levels for MMP-2,-9 gene expression, and β -actin levels for MMP-2,-9 protein expression. Gene expressions of MMP-2,-9 were significantly higher in normal pregnancies compared to preeclampsia (A, B). Protein expressions of MMP-2,-9 were significantly higher in normal pregnancies compared to preeclampsia (C, D). $P < 0.001$ by Mann-Whitney U test.

의 나이를 제외한 분만 주수, 출생 체중, 수축기 및 이완기 혈압, 단백뇨 모두 두 군 사이에 유의한 차이를 보였다.

MMP-2,-9에 대한 유전자 발현 차이를 비교하기 위하여 반정량적 RT-PCR을 시행한 결과 두 유전자 모두 전자간증 산모에서 하향조절 (down regulation) 되었다 (Fig. 1A). MMP-2,-9 단백질의 발현 차이를 확인하기 위해 western blotting을 시행한 결과 MMP-2,-9 단백질 모두 전자간증에서 단백질 발현이 감소하여 나타났다 (Fig. 1B).

RT-PCR과 western blot 결과를 바탕으로 densitometry를 시행한 결과 MMP-2,-9의 유전자 및 단백질 발현 모두 전자간증에서 통계학적으로 유의하게 적었다 ($P < 0.001$) (Fig. 2). 중위수 (최대값-최소값)로 표현한 결과 MMP-2 유전자는 정상에서 198.1 (160.2-234.6), 전자간증에서 59.2 (25.3-79.4), MMP-9 유전자는 정상에서 241.3 (199.4-276.3), 전자간증에서 108.2 (80.4-137.9)로 측정되었다. MMP-2 단백질은 정상에서 174.6 (128.3-

199.8), 전자간증에서 86.8 (60.1-141.4), MMP-9 단백질은 정상에서 188.2 (162.3-224.3), 전자간증에서 148.3 (109.9-176.9)로 나타났다.

정상 산모에 비해서 전자간증 산모의 태반에서 감소되어 있는 MMP-2 (Fig. 3)와 MMP-9 (Fig. 4) 단백질에 대한 면역학적 위치 선정 (immunolocalization)을 위하여 면역조직화학 염색을 시행하였다 (Fig. 3, Fig. 4). MMP-2과 MMP-9은 모두 태반내 용모막에서만 발현하였으며, 혈관 내피 세포나 태반 기질 세포 등에서는 발현되지 않았다.

고 찰

전자간증은 아직까지 그 원인이 불확실하며, 많은 병인이 제기되고 있는 질환으로 그 중 하나로 알려져 있는 것은 임신 초기 착상시 태반 영양막 침습의 결함으로 인한 자궁내선동맥의 부적절한 재형성 (remodeling)이다.²⁵

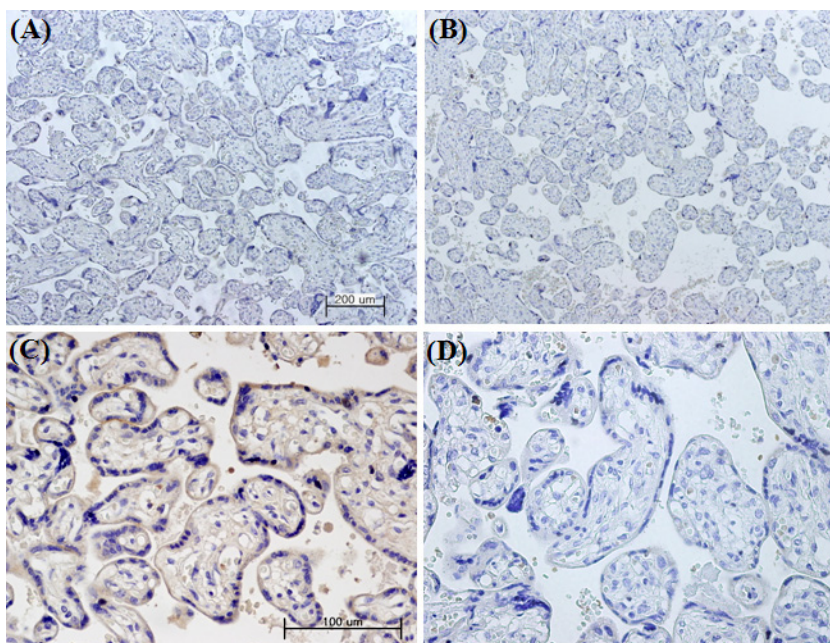


Fig. 3. Immunohistochemical staining of MMP-2 in normal and preeclamptic placentas. MMP-2 was expressed in normal and preeclamptic placental tissues. MMP-2 immunoreactivity was localized only to the trophoblast. Note that the expression of MMP-2 decreased in the preeclamptic placentas compared to the normal. A, C: placentas from normal pregnancies, B, D: placentas from preeclamptic pregnancies. A, B: $\times 100$, C, D: $\times 400$.

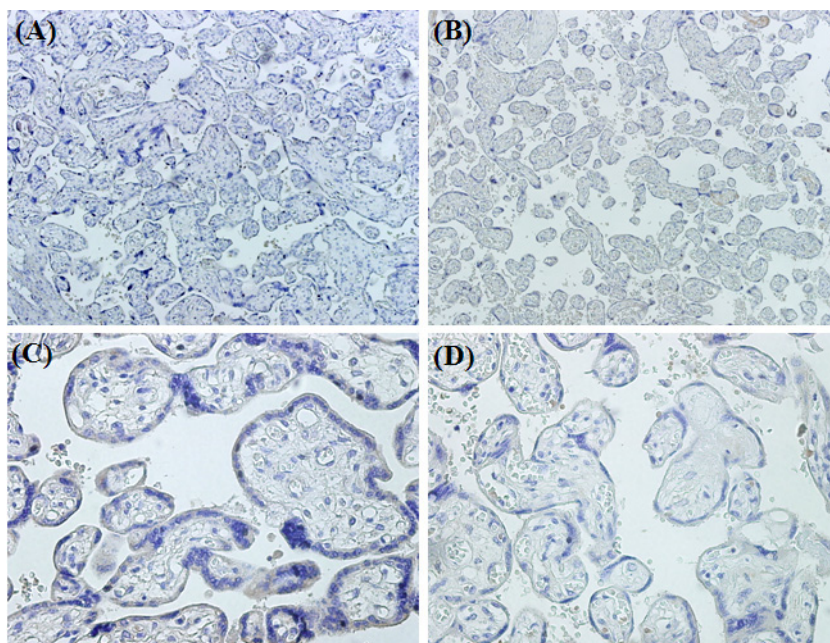


Fig. 4. Immunohistochemical staining of MMP-9 in normal and preeclamptic placentas. MMP-9 was expressed in normal and preeclamptic placental tissues. MMP-9 immunoreactivity was localized only to the trophoblast. Note that the expression of MMP-9 decreased in the preeclamptic placentas compared to the normal. A, C: placentas from normal pregnancies, B, D: placentas from preeclamptic pregnancies. A, B: $\times 100$, C, D: $\times 400$.

정상 임신 초기 바다 탈락막에 있는 나선동맥은 이후 태반에 혈액을 공급하게 되는데, 영양막 세포의 침습이 임신 6주경에 탈락막 내의 나선동맥에서 시작하여 임신 18주경에는 자궁평활근 안쪽 1/3에 위치한 나선동맥까지 확장되는 것이 보통이다. 나선동맥은 영양막 침습에 의하여 본래의 혈관구조가 파괴되고 평활근이나 내피세포가 없는 골격

만 남게 되어 모체혈관운동 신경의 조절을 받지 않아 혈액을 안정적으로 태반에 공급하는 비탄력적인 확장된 관의 형태인 자궁태반혈관으로 변화하게 된다. 전자간중에서는 나선동맥의 약 30~50%가 혈관의 재형성 (remodeling)이 적절하게 이루어지지 않아 자궁태반혈관의 저항이 감소되지 않고 높은 상태로 지속된다. 그 결과 자궁 태반순환이

감소하며 임신이 진행할수록 태반 허혈이 악화되어²⁵ tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α) 등의 사이토카인 (cytokine) 분비를 증가시켜 내피세포 기능부전을 일으키게 된다.²⁶ 영양막 침습 과정 중 유착분자와 세포 외 기질을 분해하여 영양배엽 세포의 분화 및 침습을 도와주는 MMP는 이런 태반 형성 과정에 중요하게 작용하는 물질이다.

MMP는 혈관내피세포, 영양막 등의 여러 세포에서 분비되며 zinc에 의존하여 작용하는 다유전체군 (multi gene family) 단백분해효소로,²⁷ 정상 및 비정상적인 조직의 개조에 관여하며, 이들은 기질 특이성에 따라 크게 4개의 군으로 분류할 수 있다.²⁸ 제1군 Collagenase는 I형, II형, III형 콜라겐을 분해하며 interstitial collagenase (MMP-1), neutrophil collagenase (MMP-8), collagenase 3 (MMP-13)가 이에 속한다. 제2군 Gelatinase는 젤라틴, IV형 콜라겐을 분해하며 gelatinase A (MMP-2), gelatinase B (MMP-9)가 이에 속한다. 제3군 stromelysins는 화이브로넥틴, 라미닌, III형, IV형, V형 콜라겐, 엘라스틴을 분해하며, stromelysin-1 (MMP-3), stromelysin-2 (MMP-10), stromelysin-3 (MMP-11), metalloelastase (MMP-12) 등이 이에 속한다. 제4군 membrane-type MMP는 최근에 밝혀진 것으로 이 중 MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP는 MMP-2 활성화에 관여하는 것으로 추정된다. MMP는 N-terminal 프로펩타이드의 분할 (cleavage)이나 재접합 (reconfiguration) 을 통해 여러 단계로 활성화되며, 전사 (transcription), 분비, 활성화 또는 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) 같은 억제제에 의해 활성도가 조절된다.²⁹ 따라서 MMP의 mRNA 나 protein의 발현이 활성화된 MMP와 비례한다고 단정할 수는 없다.

MMP와 TIMPs의 균형은 태반의 형성에 매우 중요한 역할을 한다.³⁰ 전자간증의 태반조직에서 TIMP-1과 TIMP-2 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있으며,³¹ 본 연구에서는 전자간증의 태반조직에서 MMP-2, -9의 발현이 감소되어 있음을 확인하였다. 이렇게 균형이 깨질 경우 영양막의 침투가 미약하여 태반 형성이 적절치 못하게 될 것이라고 추측할 수 있다. 또한 정상 임신에서 임신 말기까지 MMP-2가 지속적으로 높게 유지되며 본 연구 결과 전자간

증에서 MMP-9보다 MMP-2의 감소가 더 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 전자간증의 병태 생리에 MMP-2가 더 깊게 관여하는 것으로 보인다.

MMP-2는 태반 형성에 관여할 뿐 아니라 혈관의 긴장도를 조절하는 인자 중 강력한 혈관 수축 인자인 big endothelin의 분해를 일으켜 혈관 반응성 즉 혈관 수축을 증가시키며,³² calcitonin gene-related peptide를 분해하여 혈관 이완을 억제시킴으로,³⁴ 전자간증에서 영양막 침습을 통한 나선동맥의 재구성 장애와 혈관 작용인자들에 대한 혈관 반응도 증가 모두에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. Narumiya 등은 전자간증 임신부에서 혈관 신생, 혈관 재구성 및 혈관 투과도의 생리적 조절 인자인 혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF)에 의해 혈중 MMP-2의 생성이 증가된다고 보고하여 이 두 가지 병태생리가 서로 연관되어 있음을 시사하였다.²⁰ MMP-9는 초기 착상 과정에서의 혈관내피세포 증식 및 영양배엽세포의 형태를 변화시키는 데 urokinase plasminogen activator (uPA)와 함께 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,³⁴ Kolben 등은 전자간증 산모의 태반 조직 추출물에서 MMP-9 농도가 정상 산모의 것보다 낮다는 보고를 하였고,³⁵ 감소된 MMP-9로 인해 초기 태반형성이 부족하게 일어나 전자간증을 일으키는 것으로 생각된다고 보고하였다.

본 연구를 통하여 전자간증에서 MMP-2, MMP-9의 발현이 감소되었음을 확인하였으나 어떤 인자들이 무슨 기전으로 MMP의 발현을 조절하는지 명확히 밝혀지지 않았다. 사람의 태반에서 Nitric oxide에 의해 MMP가 활성화되며,³⁶ 쥐에서 Nitric oxide 생성이 억제될 경우 자궁내 MMP-2, -9의 유전자 발현이 억제되고, MMP-9의 활성 또한 억제한다는 연구가 있었다.³⁷ 또 다른 조절 인자로 아데노신 A1수용체가 MMP-2의 분비를 촉진하며,³⁸ 아데노신 A2a 수용체는 MMP-9의 분비를 억제한다는 보고가 있었다.³⁹ 또한 저산소 태에서 다양한 영양막양 세포주의 침습 정도를 비교한 결과 대부분 저산소 상태에서 침습이 억제되는 것으로 보고하였다.⁴⁰ 하지만, 임신과 관련하여 그 조절 기전에 관여하는 물질 및 기전에 대해서는 앞으로 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 전자간증 및 대조군 산모의 태반 조직에서 MMP-2와 MMP-9를 측정하여 병태생리에서의 MMP

의 역할을 알아보았고, 전자간증 산모의 태반에서 정상 산모에 비해 MMP-2와 MMP-9의 발현이 감소하였음을 확인하였다. 이런 결과를 기초로 적절치 못한 태반형성에 의해 나타나는 전자간증의 병태생리기전에 MMP-2와 MMP-

9이 관여하는 것으로 추정할 수 있을 것이다. 추후 태반 내 MMP-2와 MMP-9의 발현을 조절하는 물질에 대한 연구나 저산소 상태에서 발현 차이 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Sibai BM, Anderson GD. Hypertension. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, Anderson GD, editors. *Obstetrics: Normal and problem pregnancies*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1991. p.993-1055.
- Brosens IA. Morphological changes in the uteroplacental bed in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol* 1977; 4: 573-93.
- Brosens I, Dixon HG, Robertson WB. Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynaecol* 1977; 84: 656-63.
- Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2005; 46: 1077-85.
- Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53-6.
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291: 133-48.
- Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 53-64.
- Liu K, Wahlberg P, Ny T. Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology* 1998; 139: 4735-8.
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 1996; 122: 1723-36.
- Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz D, et al. Nitric oxide induces gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) during rat embryo implantation. *Fertil Steril* 2002; 78: 1278-87.
- Cañete Soler R, Gui YH, Linask KK, Muschel RJ. MMP-9 (gelatinase B) mRNA is expressed during mouse neurogenesis and may be associated with vascularization. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; 88: 37-52.
- Chin JR, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* 1997; 124: 1519-30.
- Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 2002; 67: 889-94.
- Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1353-61.
- Okamoto T, Niu R, Yamada S, Osawa M. Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 in gestational trophoblastic diseases. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 392-8.
- Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF 3rd. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1371-6.
- Ke Y, Lu JH, Yang BL, Guo HQ, Ma QY, Zhu H, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, 2 in occurrence of the accrete placenta. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2006; 41: 311-4.
- Pustovrh MC, Jaberbaum A, Capobianco E, White V, López-Costa JJ, González E. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. *Placenta* 2005; 26: 339-48.
- Galewska Z, Bańkowski E, Romanowicz L, Jaworski S. Pre-eclampsia (EPH-gestosis)-induced decrease of MMP-s content in the umbilical cord artery. *Clin Chim Acta* 2003; 335: 109-15.
- Narumiya H, Zhang Y, Fernandez-Patron C, Guilbert LJ, Davidge ST. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20: 185-94.
- Huisman MA, Timmer A, Zeinstra M, Serlier EK, Hanemaaijer R, Goor H, et al. Matrix-metalloproteinase activity in first trimester placental bed biopsies in further complicated and uncomplicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 253-8.
- Merchant SJ, Crocker IP, Baker PN, Tansinda D, Davidge ST, Guilbert LJ. Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 97-103.
- ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77: 67-75.
- Mayhew TM, Wijesekara J, Baker PN, Ong SS. Morphometric Evidence that Villous Development and Fetoplacental Angiogenesis are Compromised by Intrauterine Growth Restriction but not by Pre-eclampsia. *Placenta* 2004; 25: 829-33.
- August P, Lindheimer MD. Pathophysiology of pre-eclampsia. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension : pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.2407-26.

26. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1582-8.
27. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.
28. Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion—a review. *Placenta* 2000; 21 Suppl A: S55-60.
29. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 31-41.
30. Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinase 2 and 9, tissue inhibitors -1, and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000; 66: 1127-37.
31. Pang ZJ, Xing FQ. Expression profile of trophoblast invasion-associated genes in the preeclamptic placenta. *Br J Biomed Sci.* 2003; 60: 97-101.
32. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85: 906-11.
33. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000; 87: 670-6.
34. de Jager CA, Linton EA, Spyropoulou I, Sargent IL, Redman CW. Matrix metalloproteinase-9, placental syncytiotrophoblast and the endothelial dysfunction of preeclampsia. *Placenta* 2003; 24: 84-91.
35. Kolben M, Lopens A, Bläser J, Huber A, Frank M, Wilhelm O, et al. Measuring the concentration of various plasma and placenta extract proteolytic and vascular factors in pregnant patients with HELLP syndrome, pre-eclampsia and highly pathologic Doppler flow values. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 1995; 35 Suppl 1: 126-31.
36. Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, Pesaresi M, Baier M, Micone P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 269-75.
37. Zhang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and their Inhibitors (TIMPs) during Mouse Peri-implantation: Role of Nitric Oxide. *Placenta* 2004; 25: 243-252.
38. Shearer TW, Crosson CE. Adenosine A1 receptor modulation of MMP-2 secretion by trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3016-20.
39. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca2+ pathway. *Circ Res* 2006; 99: 590-7.
40. Lash GE, Hornbuckle J, Brunt A, Kirkley M, Searle RF, Robson SC, et al. Effect of low oxygen concentrations on trophoblast-like cell line invasion. *Placenta* 2007; 28: 390-8.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 정상 태반 및 중증 전자간증 태반에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현 차이를 비교하고자 하였다.

방법: 실험에 사용된 정상 및 중증 전자간증 산모의 태반은 만삭에 제왕절개술을 시행한 산모들을 대상으로 하였다. MMP-2, -9의 유전자 발현 정도는 반정량적 RT-PCR을 통하여 측정되었다. 단백질의 정량화를 위하여 western blot을 시행하였고, 면역학적 위치선정을 위하여 immunohistochemical staining을 시행하였다.

결과: RT-PCR 결과 MMP-2, -9의 유전자는 정상 및 중증 전자간증 태반 모두에서 발현되었고, 중증 전자간증에서 발현이 감소되었다. Western blot을 시행한 결과 중증 전자간증에서 단백질 발현이 감소되었다. 면역조직화학 염색 결과 MMP-2, -9은 모두 태반 내 용모막에서만 발현하였으며, 중증 전자간증 태반에서 발현이 감소하였다.

결론: 중증 전자간증 산모의 태반에서 MMP-2, -9의 발현이 감소되어 있음을 확인하였으며, 본 연구를 통하여 MMP-2, -9이 중증 전자간증의 병인에 관여할 것으로 사료된다.

중심단어: MMP-2, MMP-9, 중증 전자간증, 태반
