

저산소증 상태에서 정상임신과 임신중독증 환자의 태반 조직 내 endothelin-1 (ET-1) 발현의 비교

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 여성생명과학연구소*

박용원*·권자영·김영한·김유리·임재학·강명화*

Comparison of placental endothelin-1 (ET-1) expression under hypoxic condition between normal versus preeclamptic pregnancy

Yong-Won Park, M.D.*, Ja-Young Kwon, M.D., Young-Han Kim, M.D., Yuri Kim, M.D., Jae-Hak Lim, M.D., Muong-Hwa Kang, M.S.*

Department of Obstetrics and Gynecology, *Institute of Women's Life Science,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: To evaluate endothelin-1 (ET-1) expression in the villous explants from normal and preeclamptic (PE) placentae under hypoxic condition.

Methods: Villous explants from normal (n=5) and PE (n=4) placentae were obtained. To obtain hypoxic culture condition, villous explants were cultured in hypoxic chamber or treated with deferoxamine (DFO). ET-1 mRNA expressions in villous explants were evaluated by RT-PCR following 0, 24, and 48 h of culture in hypoxic chamber, and 0, 2, 4, 6 h following DFO treatment. ET-1 protein levels in media were measured by enzyme immunoassay.

Results: After 24 and 48 hours of incubation of villous explants from normal and PE placentae in hypoxic chamber, ET-1 mRNA and protein levels were increased in both groups, however, ET-1 production seemed to be more exaggerated in the villous explants from PE placentae. During 6 h of DFO exposure, ET-1 mRNA level was increased in the villous explants from PE placenta comparing to those from normal placentae ($p<0.05$). Interestingly, the increase of ET-1 mRNA expression in the villous explants from PE placentae was more exaggerated than those from normal placentae. Concordantly, increments of protein level between 0 to 2 h and 2 to 4 h were significantly higher in villous explants from PE placentae ($p<0.05$).

Conclusion: ET-1 mRNA and protein were increased in villous explants from PE placentae compared to those from normal placentae under hypoxic condition. Furthermore, villous explants from PE placentae showed upregulated ET-1 expression upon hypoxic stimulation. This enhanced sensitivity to hypoxia may contribute to ET-1 overexpression in PE placenta *in vivo* and it needs further investigation for clarification.

Key Words: Preeclampsia, Endothelin-1, Hypoxia

서 론

임신 중 고혈압과 단백뇨로 특징 지워지는 임신 중독 증은 다양한 기관에 영향을 미쳐 태아에게는 자궁내 발육 제한, 자궁내 사망, 조산 및 미숙아와 관련된 합병증

접수일 : 2006. 5. 16.
교신저자 : 권자영
E-mail: jaykwon@yumc.yonsei.ac.kr

* 이 논문은 2005년 교수연구비 지원에 의해 이뤄진 것임.

을 유발하며 임신부에게는 자간증, 신부전, 폐부종, 뇌졸중 및 사망으로 이어질 수 있다.¹ 무수한 요인들-염증성 질환, 혈관 관련 물질, 태반허혈, 유전적 요인, 비정상 면역반응 등-이 임신중독증의 발생과 관련될 것이라고 추측되고 있지만 아직까지는 ‘가설의 질환’으로만 남아 있다.^{2,3} 하지만 많은 연구들이 비정상적인 태반형성 및 태반 허혈 (abnormal placentation and placental vasculature insufficiency)에 기인한 저산소증에 의해 어떤 특정 물질이 분비되어 임신부의 혈관조직에 작용함으로써 혈관내피세포의 이상을 초래하여 궁극적으로 임신 중독증의 임상증상이 나타날 것이라는 가설에 초점을 맞추고 있다.⁴⁻⁶ 즉, 혈관의 혈관 긴장도 (vascular tone) 조절 기능 상실은 고혈압으로, 신사구체 혈관 투과성의 증가는 단백뇨로, 혈관내피세포의 손상으로 온혈관수축과 허혈은 간손상으로, 혈관내피세포의 응고인자 발현 이상은 응고장애로 나타나는 것으로 추측되고 있다.⁵⁻⁷

임신중독증에서 혈관내피세포의 기능이상에 관여할 만한 물질들로 tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-6, IL-1 α , IL-1 β , Fas ligand, oxidized lipid products, neurokinin B, agonistic autoantibodies for angiotensin receptor-1, endothelin-1 (ET-1), soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) 등이 알려져 있는데,⁸⁻¹⁶ 이 중 ET-1은 혈관내피세포에서 생성되어 맨 안쪽 평활 근육세포 (intimal smooth muscle cell)에 존재하는 ET_A 수용체에 작용함으로써 강력한 혈관 수축을 일으키는 물질로 알려져 있다.¹⁷ Ihara 등¹⁸의 보고에 따르면 정상산모의 혈중 ET-1은 임신 기간동안 비임신 여성과 비슷한 농도로 유지되었을 뿐 아니라 만성 고혈압을 동반한 임신부가 임신 기간중 혈압이 잘 조절되는 경우에는 혈중 ET-1 농도의 증가를 보이지 않았다. 반면 임신중독증 임부에서는 혈중 ET-1이 정상 임부에 비해 높았다. 또한 Nova 등¹⁹은 임신중독증 환자에서 혈중 ET-1농도가 정상 임부에 비해 증가되어 있었고 특히 HELLP 증후군이 동반되어 있는 경우 ET-1 농도가 더욱 높았다고 보고하여 임신중독증의 병태생리학적 기전에 ET-1이 관

여할 가능성을 제시하였다.

ET-1이 혈관내피세포 뿐 아니라 양막세포, 자궁내막세포, 태반섬유아세포를 비롯하여 영양세포 (trophoblast)에서도 합성되는 것이 확인되면서 임신중독증 시 증가되는 ET-1이 태반영양세포에서 기원했을 가능성이 대두되었고,²⁰⁻²³ 최근 보고된 Napolitano 등²⁴의 임신중독증 산모의 태반영양막세포에서 정상 산모의 것에 비해 ET-1 mRNA의 발현이 증가되어 있다는 연구결과는 이를 뒷받침해 주었다. 따라서 본 연구에서는 explant villous culture model을 이용하여 저산소증 상태에서의 정상 임신과 임신중독증 산모의 태반조직 내의 ET-1 발현을 비교하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 환자 및 정상 대조군의 선택

본원에서 분만 한 산모 중 임신 20주 이후 수축기 혈압이 140 mmHg 이상 또는 이완기 혈압이 90 mmHg 이상이면서 300 mg/24 hrs 또는 random urine sample에서 30 mg 이상의 단백뇨를 동반하는 경우 임신중독증으로 진단하였고 이 환자를 질환군 (n=4)으로 분류하였다. 정상군으로는 임신 중 혈압상승이나 단백뇨의 증가가 없었던 산모로 하였다 (n=5). 다태임신, 태반관련질환 및 기타 내과적 질환이 합병된 경우 실험에서 제외시켰다. 본 연구에 포함된 산모들 모두 임상정보 및 태반 사용에 대해 동의하였다.

2. 태반수집 및 응모편 배양

본 연구에는 자연분만을 통해 얻어진 태반을 사용하였고, 모든 응모절편 준비 및 배양은 태반만출 1시간 이내에 이루어졌다. 응모절편은 Benyo 등²⁵의 방법을 이용하였다. 간단히 요약하자면 태반에서 태반엽을 임의로 잘라낸 다음 무균 식염수에 행구어 혈액을 제거한 후 blunt dissection을 통해 탈락막과 큰 혈관들을 제거하였다. 그 후에 응모 조직을 5-10 mg 조직으로 조각낸

후 무균 식염수에 담가두었다. 용모조직 900 mg을 10% fetal bovine serum과 항생제가 첨가된 M199 media를 담은 6-well plate의 각각의 well에 놓고 표준 조직 배양 상태인 5% CO₂ balance room air (nonhypoxic condition 21% O₂)에서 4시간 정도 두어 안정화시킨 후에 실험을 진행하였다.

3. Hypoxia의 처리

저산소 환경을 만들기 위해 저산소 배양기와 화학제를 이용하였다. Normoxia 배양 조건을 위해서 용모절편은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, hypoxia 배양 조건을 위해 37°C, <1% O₂-5% CO₂-balanced nitrogen anaerobic system (ThermoForma, USA)에서 배양하였다. Chemical hypoxia를 위해서는 100 µM deferoxamine (Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

4. Semiquantitative PCR

Hypoxic culture 또는 DFO를 처리하였던 용모절편으로 부터 RNA extraction kit (Promega, Madison, Wisc., USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (2 µg)는 oligo dT를 primer로 해서 역전사 (reverse transcription)를 실시하였다. Reverse transcription을 통한 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA) 합성은 역전사 효소 (reverse transcriptase, Fomentas life sciences)를 이용했으며 이때는 70°C 10 min, 37°C 60 min, 70°C 10 min을 사용했다. 합성된 cDNA는 사용 전까지 -20°C에 보관되었다.

PCR (polymerase chain reaction)은 BIO-RAD my cycler를 이용하여 수행되었다. 준비된 RT-PCR 생산물에 각각의 primer HIF-1 α , ET-1 그리고 housekeeping gene인 β -actin을 대조군 (control)으

로 사용하였다. 이들의 primer sequence는 다음과 같았다.

HIF-1 α (F) 5'-CCTGAGCCTAATAGTCCC-3' (R)
5'-GGTGGCATTAGCAGTAGG-3' **ET-1** (F)
5'-CCAAGGAGCTCCAGAAACAG-3' (R)
5'-GATGTCCAGGTGGCAGAAAGT-3' **β -actin** (F)
5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC-3' (R)
5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC-3'

이들의 실험 상태는 94°C 5 min, 94°C 30 s, 60°C 30 s (HIF-1 α), 62°C 30 s (ET-1), 65°C 30 s (β -actin), 72°C 30 s, 72°C 7 min으로 시행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 통하여 분획시킨 후 분석하였다. RNA양의 정량화를 위해 laser densitometer와 analysis software (IMAGE READER LAS-1000 lite, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다.

5. 배양액내 ET-1 측정

ET-1 측정은, 미국 R&D System사에서 구입한 효소면역법 (enzyme immunoassay)의 원리를 이용한 human Endothelin-1 Immunoassay kit를 사용하였다. 요약하자면 ET-1 항체가 붙어 있는 면역판의 well에 결합체용액과 배양액을 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 다음 6회 세척완충용액으로 세척하였다. 그 후 기질 용액을 넣어 30분간 실온에서 반응시킨 뒤 정지용액을 넣은 다음 면역판 판독기를 이용하여 파장 620 nm에서의 흡광도를 측정하였다. ET-1의 측정 민감도는 1.0 pg/mL이었다.

6. 통계학적 처리

통계처리는 윈도우용 SPSS 12.0을 이용하여 Mann-Whitney U test로 통계처리하였으며 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

박용원 외 5인. 저산소증 상태에서 정상임신과 임신중독증 환자의 태반 조직 내 endothelin-1 (ET-1)의 발현 비교

Table 1. Clinical characteristics in normal and preeclamptic women

	Control (n=5)	Preeclampsia (n=4)	p*
Age (yr)	30.0±3.8	32.6±4.2	NS
Gestational age (days)	260.2±16.0	250.2±12.4	NS
BP (mmHg)			
Systolic	117.8±8.3	177.0±10.1	0.02
Diastolic	73.3±7.0	97.2±11.2	NS
Interval between diagnosis and delivery (days)*	NA	12.4±8.7	NA
Birthweight (g)	3134.4±428.1	2380.0±862.4	0.03
SGA (n, (%))	0 (0.0)	2 (40.0)	NA

*analyzed by Mann-Whitney U test

NS: Not significant

NA: Not applicable

결 과

질환군과 정상군의 특성은 Table 1과 같았고 수축기 혈압과 출생체중을 제외하고는 두 군 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다.

각 군의 용모절편을 저산소 배양기에서 48시간까지 배양한 후 용모절편내 HIF-1 α 와 ET-1 유전자 발현 변화를 살펴보았다. HIF-1 α mRNA는 질환군에서 첫 24시간 동안 빠르게 증가되었다가 이후 감소하는 양상을 보인 반면 정상군에서는 48시간까지 점진적인 증가를 보였다 (Fig. 1A, 1B). 시간대 별 ET-1 유전자 발현은 두 군 모두에서 시간에 따른 증가 소견을 보였으며, 정상군과 질환군에서 0, 24, 48시간째 ET-1 단백질 농도는 각각 1.6±1.1 vs. 4.7±2.2 pg/mL, 2.0±1.2 vs. 18.9±3.4 pg/mL, 4.4±1.3 vs. 25.6±4.6 pg/mL로 정상군에 비해 질환군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 1C, 1D).

다음으로는 질환군의 용모절편 내 저산소증에 대한 ET-1의 민감한 발현증가가 독립적인 것인지 아니면 용모절편 내 HIF-1 α 상승과 관련된 증가인지를 알아보기 위하여 각 군의 용모절편 내 ET-1과 HIF-1 α 발현 변화

를 DFO 투여 후 시간대 별로 관찰하였다. 기초 실험상 DFO 100 μ M 투여 후 HIF-1 α mRNA 농도 변화가 첫 5시간 내에 뚜렷한 상승을 보였다가 이후 감소하는 양상을 보여, 용모절편을 이용한 DFO 실험 조건은 DFO 농도는 100 μ M으로 노출시간은 6시간까지로 하였다 (Fig. 2).

각 군의 용모절편을 DFO에 노출시킨 후 2, 4, 6시간째 HIF-1 α 와 ET-1 mRNA의 발현을 측정하였다 (Fig. 3A). HIF-1 α mRNA 발현은 질환군에서 더 높은 양상이었으나 증가 기울기는 두 군에서 유사하였다 (Fig. 3B). 한편 ET-1 mRNA 발현은 질환군에서 더 높았으며, DFO 투여 후 4시간까지 급격하게 증가하는 양상을 보였던 반면 정상군에서는 느리고 점진적인 증가를 보였다 (Fig. 3C). 정상군과 질환군의 DFO 투여 2, 4, 6시간째 ET-1 단백질 농도는 각각 2.0±0.6 vs. 4.2±1.5 pg/mL, 4.1±2.4 vs. 17.6±2.5 pg/mL, 6.7±3.3 vs. 20.4±4.8 pg/mL로 질환군에서 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$) (Fig. 3D), DFO 투여 후 2시간까지, 2에서 4시간까지의 ET-1 단백질의 증가폭이 질환군에서 유의하게 높음을 알 수 있었다 (0.8±1.2 vs. 2.7±1.4 pg/mL, 2.4±1.1 vs. 13.4±2.8 pg/mL, $p < 0.05$).

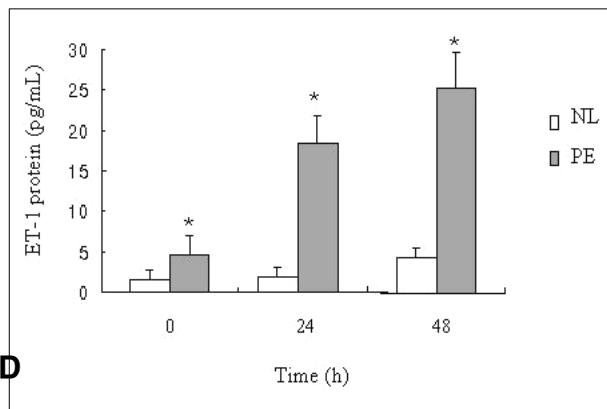
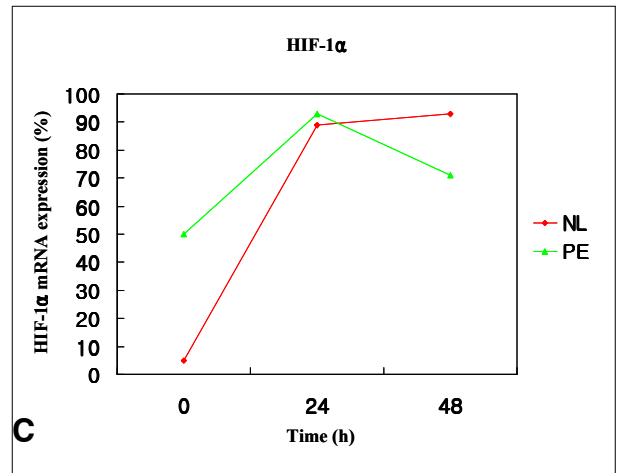
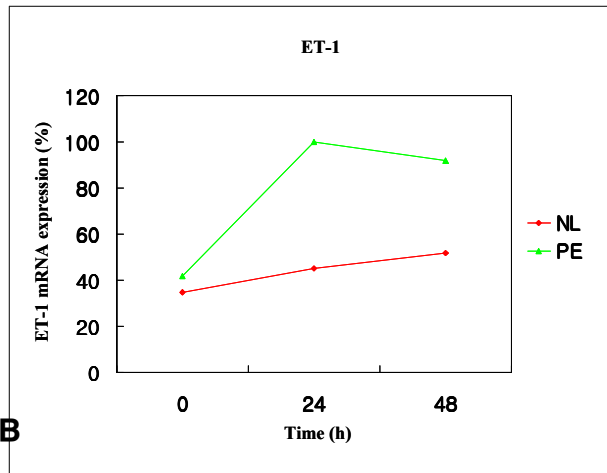
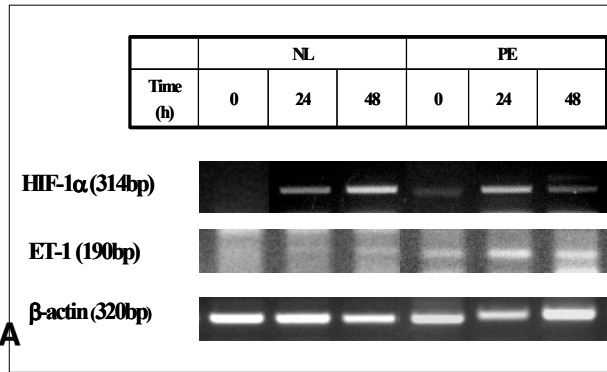


Fig. 1. Changes in HIF-1 α and ET-1 mRNA (A, B, C) and protein (D) levels in villous explants from placentae of normal and preeclamptic pregnancies cultured in hypoxic chamber ($O_2 < 1\%$) for 24 and 48 h.

* $p < 0.05$ by Mann-Whitney U analysis;
 Bar graph expressed as mean \pm SD;
 NL: normal, PE: preeclampsia

박용원 외 5인. 저산소증 상태에서 정상임신과 임신중독증 환자의 태반 조직 내 endothelin-1 (ET-1)의 발현 비교

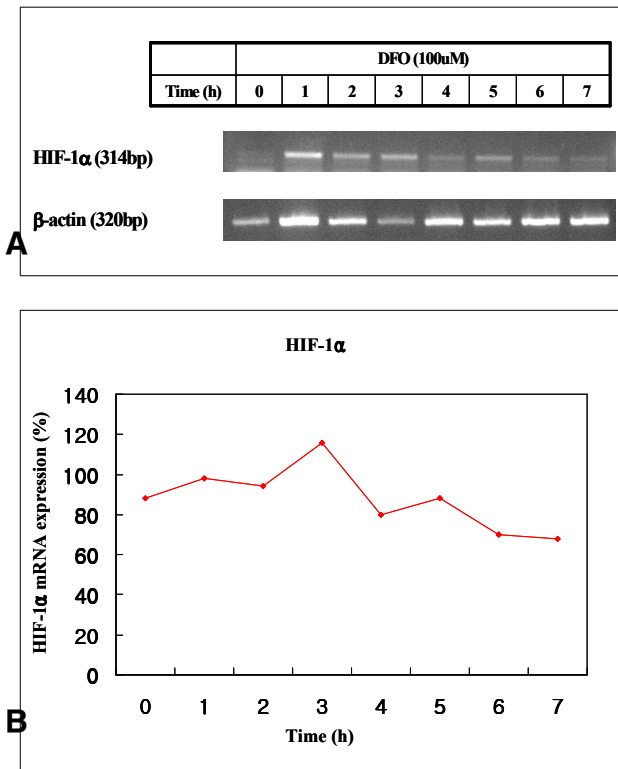


Fig. 2. Change of HIF-1 α mRNA level according to DFO exposure time in villous explant from normal placenta (A). HIF-1 α expression was increased the most during first 5 h and decreased then on. Graphical summary of the data for HIF-1 α (B).
DFO: deferoxamine

고찰

ET-1은 혈관내피세포에서 분비되는 물질 중 가장 강력한 혈관수축 물질로 angiotensin II보다 10배 정도 더 강력한 것으로 알려져 있다.¹⁷ 따라서 혈압 관련 질환 발생에 ET-1이 관여할 것이라는 가설에 초점을 맞춘 연구들이 많다. 폐고혈압 (pulmonary hypertension)에서는 정상에서보다 폐고혈압 환자의 폐조직에서 ET-1의 발현이 훨씬 더 높았으며 질병의 경중은 혈중 ET-1 농도와 상관관계를 보였다.²⁶⁻²⁸ 만성고혈압 (chronic hypertension)에서 정상 혈압을 갖는 군에 비해 혈중 ET-1 농도가 높았으며 ET-1에 의한 혈관반응이 항진되어 있다는 보고가 많이 있다.²⁹ Ohno 등³⁰은 고혈압

쥐 모델에서 ET 길항제를 투여하여 혈압을 10% 정도 감소시킬 수 있었다고 하여 내인성 ET-1이 혈압을 증가시키는 데 관여할 것이라는 근거를 제시하였고, Sedek 등³¹은 ET-1을 투여하여 고혈압을 유발한 쥐 모델에서 산화억제제를 투여하였을 때 신장기능의 악화를 예방하거나 호전시킬 수 있었다고 하여 ET-1에 의한 고혈압에 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 관여할 가능성을 보고하였다.

많은 연구들에서 ET-1이 혈관에 악영향을 미칠 것이라는 근거를 제시하고 있다.^{32,33} Amiri 등³³은 혈관내피세포에 ET-1을 과발현시킨 쥐를 이용한 실험에서 혈중 ET-1의 상승과 함께 저항성 혈관의 비후성 변화 및 혈관내피세포의 손상이 관찰되었으며 산화성 물질의 증가 및 nitric oxide에 의한 혈관이완 작용이 억제됨을 보고하였다. 또한 Dong 등³⁴은 ET-1이 혈관내피세포에서 NADPH oxidase의 활성화를 통해 산화성 스트레스를 유발한다고 보고하였다. 즉, ET-1은 여러 가지 기전을 통해 직접적으로 혈관손상을 초래할 수 있음을 알 수 있다.

ET-1은 혈관에 대한 작용 외에도 염증반응에 관여한다는 보고가 있다. Molero 등³⁵은 동물실험에서 ET-1이 심근과 백혈구에서 염증관련단백인 cyclooxygenase-2와 조직인자 (tissue factor)의 발현을 증가시켰다고 하였다. 또한 다른 학자들은 ET-1이 백혈구와 혈관내피세포에서 점착분자 (adhesion molecule)의 발현을 증가시킴으로써 interleukin-6의 분비를 증가시킨다고 보고하기도 하였다.³⁶⁻³⁸

ET-1은 체내 수분조절에도 관여할 것으로 알려져 있다. Wong 등³⁹은 ET 수용체 길항제인 bosentan을 이용한 동물실험에서 ET-1이 신장의 안쪽 수질 수집관 (inner medullary collecting duct)의 arginin vasopressin V2의 발현을 증가시킴으로써 나트륨 배설 촉진 및 이뇨장애를 초래할 가능성을 제시하였다. 또한 Lo 등⁴⁰은 뇌허혈시 별아교세포에서 분비되는 ET-1에 의해 junctional protein이 감소되어 혈뇌장벽 (blood-brain barrier)의 손상이 초래됨으로써 뇌수종과 뇌손상이 발생한다고 하였고 ET-1 수용체 길항제를

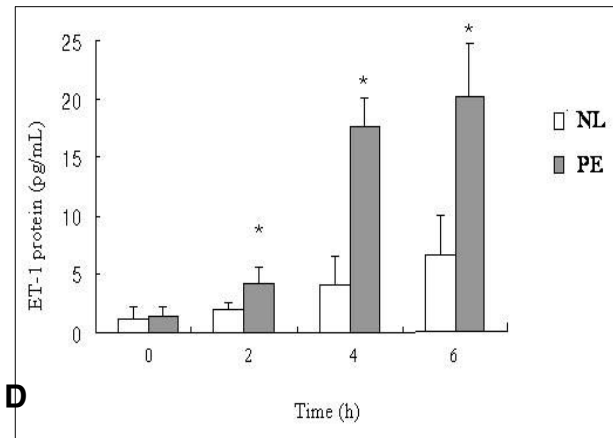
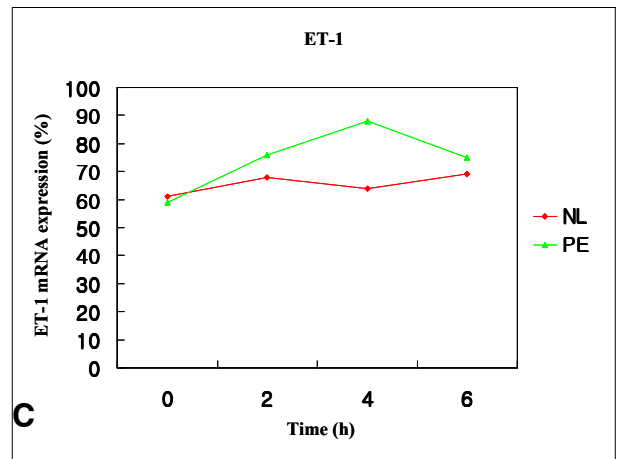
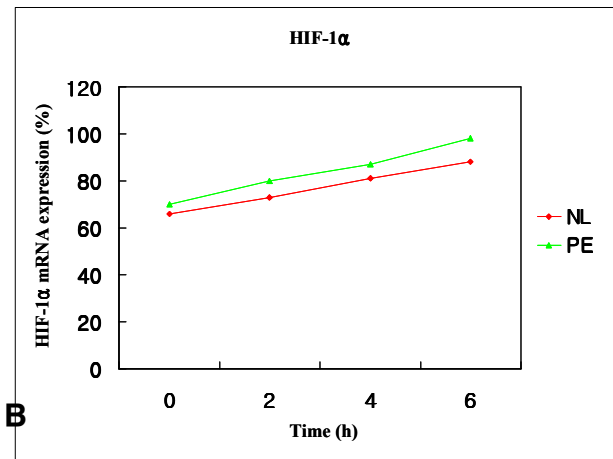
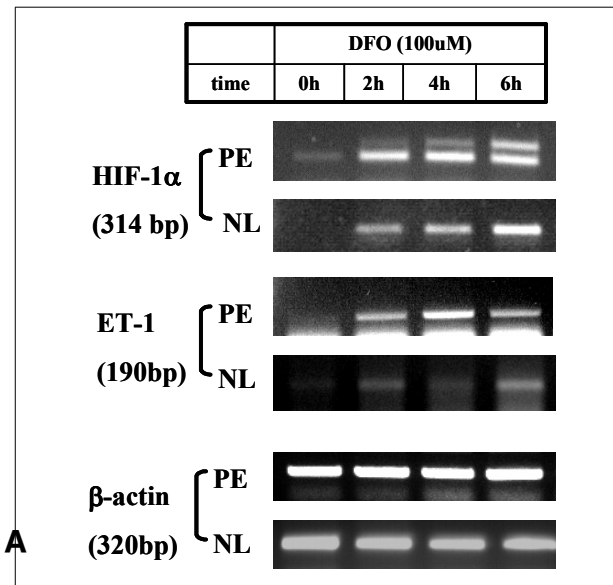


Fig. 3. Changes in HIF-1 α and ET-1 mRNA (A, B, C) and protein (D) levels in villous explants from placentae of normal and preeclamptic pregnancies exposed to DFO. Graphical summary of the mRNA expression of HIF-1 α (B) and ET-1 (C) demonstrates more sensitive increase in ET-1 expression level in villous explants from preeclamptic placenta. * p <0.05 by Mann-Whitney U analysis; Bar graph expressed as mean \pm SD; DFO: deferoxamine, NL: normal, PE: preeclampsia

박용원 외 5인. 저산소증 상태에서 정상임신과 임신중독증 환자의 태반 조직 내 endothelin-1 (ET-1)의 발현 비교

투여하여 뇌손상의 호전을 가져왔다는 연구결과를 발표하였다. 이는 허혈성 뇌손상에 ET-1이 관여할 것이라는 기존의 가설들을 뒷받침해 주는 것이었다.^{41,42}

즉, 혈중 또는 조직 내에 증가된 ET-1은 여러 기전을 통해 전신적인 혈관 저항성을 증가시키거나, 혈관 손상, 염증 유도 및 수분 저류 및 부종 (water retention and edema)을 초래할 수 있다는 것인데 이러한 변화는 임신중독증에서도 매우 특징적이라고 할 수 있다.

임신중독증에서 정상에 비해 ET-1이 증가되어 있어 ET-1이 임신중독증의 병태생리학적 기전에 중요한 역할을 할 것이라고 생각되고 있다.^{18,19,43} 정상 산모에 비해 임신 중독증 환자에서 혈중 ET-1 농도가 증가되어 있으며,^{18,19} 임신한 양에서 ET-1을 투여한 후 동맥혈압이 증가하고, 자궁태반혈류가 감소되었으며 단백뇨가 발생하였는데 이 모든 증상은 임신 중독증에서 특징적인 것이다.⁴⁴ 또한 고혈압과 자궁태반혈류의 감소를 동반한 임신 쥐에서는 ET 수용체 길항제를 투여하여 혈압의 감소를 가져왔으며,⁴⁵ 만성적으로 자궁태반혈류가 감소되었던 임신중독증 산모의 혈청에 노출된 혈관내피세포의 경우 ET-1 분비가 증가되었다는 보고가 있다.⁴⁶ Margarit 등⁴⁷은 임신 17주에 얻은 양수내 ET-1을 측정 한 결과 추후 임신중독증이 발생한 환자에서 ET-1이 더 증가되어 있음을 보고하면서 임신중독증에서 증가되는 ET-1에 의한 혈관내피세포의 손상이 이르면 임신 이삼분기 초부터 시작될 가능성과 더불어 ET-1이 임신중독증의 발생을 예측할 수 있는 인자로 사용될 수 있을 것이라 하였다.

최근 ET-1이 혈관내피세포 뿐 아니라 태반, 특히 영양세포 (trophoblast)에서도 합성됨이 보고되었는데,²⁴ 이는 허혈 상태의 태반에서 분비되는 ET-1이 임신중독증에서의 혈중 ET-1 증가에 기여할 가능성을 시사하고 있다. 이미 많은 연구들에서 허혈 태반에서 염증 반응성 cytokine, sFlt-1, agonistic autoantibodies for angiotensin receptor-1과 같은 물질의 분비가 증가되어 전신적인 혈관내피세포의 활성화 및 손상을 유발할 것이라는 가설을 뒷받침해 주고 있는데 ET-1 또한 이와 유사할 것이라 생각된다.^{48,49} McMahon 등⁵⁰은 ET-1의

발현이 임신중독증 산모의 태반에서 더 증가되었음을, Napolitano 등²⁴의 연구에 따르면 정상임신과 임신중독증 산모의 태반에서 분리 배양된 영양세포에서의 ET-1의 발현을 비교한 결과 임신 중독증에서 유의하게 증가되었음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 저산소증 상태에서 정상 태반과 임신중독증 태반에서 분리한 용모절편 내 ET-1의 발현을 조사한 결과 두 군 모두에서 ET-1의 발현이 저산소증 상태에 노출된 시간에 따라 증가됨을 알 수 있었고, 특히 임신중독증 환자의 용모절편에서 ET-1의 발현이 더 증가됨을 확인하였다. 배양액 내 ET-1 단백질 농도 또한 유전자 발현과 유사한 양상을 보였다. 흥미로웠던 점은 시간에 따른 ET-1의 발현 증가가 임신중독증 환자의 용모절편에서 더 과장되어 일어나는 양상을 보였다는 것이다. 두 군간 DFO 처리 후 배양액 내 ET-1 단백질 농도의 증가의 폭을 비교한 결과 역시 임신중독증에서 유의하게 높았다.

저산소증은 ET-1 분비 증가와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 저산소증 상태에서 증가된 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)이 ET-1 promoter에 존재하는 inverted HIF-1 binding site과 결합하여 ET-1 합성이 증가되는 것이 그 기전이다.⁵¹ 저산소증을 특징으로 하는 질환, 특히 심근허혈시 ET-1 발현의 증가는 조직 내 증가된 HIF-1에 의한 것이라는 견해가 많다.^{52,53} 자궁태반허혈을 특징으로 하는 임신중독증에서도 태반 내 HIF 발현이 정상산모에 비해 선택적으로 증가되었다는 보고가 있다.⁵⁴ 따라서 저산소 상태에서 임신중독증 산모의 태반 내 ET-1이 정상 산모에 비해 과장된 증가를 과장된 HIF 발현과 연관지어 생각해 볼 수 있겠다. 그러나 저산소증 시 정상태반과 임신중독증 태반에서 HIF-1 α 의 증가 정도를 비교한 연구는 아직까지 없으며, 본 연구에서도 두 질환군의 태반 조직을 저산소 환경에 노출시킨 후 HIF-1 α 의 증가형태를 비교한 결과 두 군 사이에 큰 차이를 보이지 않아 과장된 ET-1 발현 증가는 HIF-1 α 이외에도 어떤 다른 기전이 관여할 것이라 생각된다.

예를 들자면, 임신중독증 시 태반 허혈로 인해 ROS

가 증가되는데,⁵⁵ 산화성 stress는 ET-1 precursor mRNA 발현을 유도한다고 알려져 있다. 또한 heme oxygenase-2 (HO-2)는 저산소증 상태에서 발현이 증가되어 ROS의 발생을 억제함으로써 ET-1 mRNA 발현을 감소시킨다. 그런데 임신중독증에서는 정상에 비해 태반 내 HO-2의 발현이 감소되어 있다고 알려져 있다.^{55,56} 따라서 저산소증 상태에서 정상 태반에 비해 임신중독증 태반 내에서 ROS가 과형성되거나 HO-2 발현 저하로 인해 ET-1 억제기능이 상실됨으로써 ET-1이 과발현되었을 가능성이 있겠다. 하지만 본 연구에서는 ROS나 HO-2의 발현을 고려하지는 못하였다.

결론적으로 본 연구를 통해 저자들은 저산소 상태에서 ET-1 mRNA의 발현 및 단백 생산은 정상에 비해 임신중독증 산모의 용모절편에서 더 증가되었을 뿐 아니라 임신중독증의 태반에서 분리한 용모 절편이 저산소증에 더 민감하게 반응하여 ET-1의 증가가 더 과장되어 일어남을 처음으로 보고하였다. 이러한 비정상적인 반응은 임신중독증 산모의 태반 내 ET-1의 과발현과도 연관이 있을 것으로 생각되나 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Sibai BM, Anderson GD. Hypertension. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, eds. *Obstetrics. Normal and problem pregnancies*, 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone; 1991, pp99-1055.
- Brosens IA. Morphological changes in the utero-placental 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; 367: 53-6.
- Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 5-15.
- Page EW. The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1939; 37: 291-3.
- Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semi Perinatol* 2000; 24: 24-8.
- Savidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511-7.
- Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Clemens JD, et al. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999; 282: 356-62.
- Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52: 2682-9.
- Clark BA, Halvorson L, Sachs B, Epstein FH. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 962-8.
- Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2505-12.
- Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 102-11.
- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, et al. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 2000; 405: 797-800.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649-58.
- Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1171-6.
- Ihara Y, Sagawa N, Hasegawa M, Okagaki A, Li XM, Inamori K, et al. Concentrations of endothelin-1 in maternal and umbilical cord blood at various stages of pregnancy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 4433-5.
- Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 724-7.
- Germain AM, MacDonald PC, Casey ML. Endothelin receptor mRNAs in human fetal membranes, chorionic vessels, and decidua parietalis. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 132: 161-8.
- Ferre Françoise. Endothelin: its possible role during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 59: 1-4.
- Fant ME, Nanu L. Human placental endothelin: expression of endothelin-1 mRNA by human placental fibroblasts in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 109: 119-23.
- Robert B, Malassine A, Bourgeois A, Mignot TM, Cronier L, Ferre F, et al. Expression of endothelin precursor genes in human trophoblast in culture. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 490-6.
- Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger mRNA and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. 2000; 85: 2318-23.
- Benyo DF, Smarason A, Redman CWG, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2505-12.

26. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, et al. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 1997; 3: 196-200.
27. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
28. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85: 504-9.
29. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; Feb: Epub ahead of print.
30. Ohno A, Naruse M, Kato S, Hosaka M, Naruse K, Demura H, et al. Endothelin-specific antibodies decrease blood pressure and increase glomerular filtration rate and renal plasma flow in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1992; 10: 781-5.
31. Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, et al. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 806-10.
32. Nohria A, Garrett, Johnson W, Kinlay S, Ganz P, Creager MA. Endothelin-1 and vascular tone in subjects with atherogenic risk factors. *Hypertension* 2003; 42: 43-8.
33. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 2233-40.
34. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 23-33.
35. Molero L, Farre J, Garcia-Mendez A, Mateos-Caceres PJ, Martin CC, Millas I, et al. Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: role of glycoprotein IIB/IIIA receptors. *Cardiovas Res* 2003; 57: 109-18.
36. López-Farré A, Riesco A, Espinosa G, Digiuni E, Cemadas MR, Alvarez V, et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993; 88: 1166-71.
37. McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 1993; 156: 31-4.
38. McMillen MA, Huribal M, Cunningham ME, Kumar R, Sumpio BE. Endothelin-1 increases intracellular calcium in human monocytes and causes production of interleukin-6. *Crit. Care Med* 1995; 23: 34-40.
39. Wong NL, Sonntag M, Tsui JK. Attenuation of renal vasopressin V2 receptor upregulation by bosentan, an ETA/ETB receptor antagonist. *Metabol* 2003; 52: 1141-6.
40. Lo A, Chen A, Hung V, Yaw L, Fung M, Ho M, et al. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 998-1011.
41. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain permeability. *J Anat* 2002; 200: 629-38.
42. Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* 2002; 9: 113-24.
43. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hyperten* 2001; 14: 178-85.
44. Greenberg FG, Baker RS, Yang D, Clark KE. Effects of continuous infusion of endothelin-1 in pregnant sheep. *Hypertension* 2000; 30: 1585-90.
45. Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001; 37: 485-9.
46. Roberts L, Babbette B, LaMarca D, Fournier L, Bain J, Cockrell K, Granger JP. Enhanced endothelin synthesis by endothelial cells exposed to sera from pregnant rats with decreased uterine perfusion. *Hypertension* 2006; 47: 615-8.
47. Margarit L, Griffiths A, Tsapanos V, Decavalas G, Gumenos D. Second trimester amniotic fluid endothelin concentration: a possible predictor for pre-eclampsia. *J Obstet Gynecol* 2005; 25: 18-9.
48. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103: 945-52.
49. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immun* 1997; 37: 240-9.
50. McMahon LP, Redman CW, Firth JD. Expression of the three endothelin genes and plasma levels of endothelin in pre-eclamptic and normal gestations. *Clin Sci* 1993; 85: 417-24.
51. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 12845-53.
52. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990; 344: 114.
53. Tonnessen T, Giaid A, Saleh D, Naess PA, Yanagisawa M, Christensen G. Increased *in vivo* expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res* 1995; 76: 767-72.
54. Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001: hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies—a review. *Placenta* 2002; 23: 47-57.
55. Zencussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, et al. Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 66-76.
56. Lyall F, Myatt L. The role of the placenta in pre-eclampsia—a workshop report. *Placenta* 2002; 16: 142-5.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 explant villous culture model을 이용하여 저산소증 상태에서의 정상 임신과 임신중독증 산모의 태반조직 내의 ET-1 발현을 비교하고자 하였다.

연구 방법: 정상 산모 (n=5)와 임신중독증 산모 (n=4)로부터 얻은 태반으로부터 용모절편을 저산소 배양기에서 배양하거나 배양액에 deferoxamine (DFO)을 처리하였다. 용모절편 내 ET-1 mRNA 발현은 저산소 배양기에서 배양한 경우 0, 24, 48 시간째, DFO를 사용한 경우 약물 투여 0, 2, 4, 6시간째 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 배양액 내 ET-1 단백질 농도 측정은 enzyme immunoassay 방법을 이용하였다.

결과: 저산소 배양기에서 배양된 용모절편의 경우 두 군 모두에서 용모절편내 ET-1 유전자 발현과 배양액 내 ET-1 단백질이 증가되었는데 ($p<0.05$), 증가 정도가 정상 산모에 비해 임신중독증 산모에서 더 큰 양상을 보였다. DFO로 처리하였을 때 ET-1 mRNA 발현은 두 군 모두에서 시간에 따라 증가되었다. DFO 투여 2, 4, 6시간째의 배양액 내 ET-1 단백질 농도는 질환군에서 유의하게 높았으며 ($p<0.05$), DFO 투여 후 2시간까지, 2시간에서 4시간까지의 ET-1 단백질의 증가의 폭이 질환군에서 유의하게 높았다. ($p<0.05$).

결론: 저산소 상태에서 ET-1 mRNA의 발현 및 단백질 생산은 정상에 비해 임신 중독증 산모의 용모절편에서 더 증가되었을 뿐 아니라 저산소증에 대한 ET-1의 생산이 항진되어 있어, 이러한 항진성이 임신중독증 태반 내 ET-1 과발현에 기여할 가능성이 있을 것으로 보이며 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심단어: 임신중독증, Endothelin-1, 저산소증
