

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서
hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α)
발현의 차이

연세대학교 대학원
의 학 과
조 희 영

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서
hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α)

발현의 차이

지도 박 용 원 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과

조 희 영

조희영의 석사 학위논문을
인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006 년 6 월

감사의 글

나의 사랑하는 가족, 친구, 선생님

그리고

그 중에 가장 맑은 영혼의 벗 장원에게

감사를 드립니다

차 례

국문요약.....	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 대상	5
2. 검체 수집.....	6
3. RT-PCR(Reverse transcriptase polymerase chain reaction)	7
가. RNA extraction and cDNA synthesis.....	7
나. RT-PCR	8
4. Immunohistochemistry.....	9
5. 통계 분석	10
III. 결과	11
IV. 고찰	15
V. 결론	21
참고문헌.....	22
영문요약.....	28

그림 차례

Figure 1. RT-PCR of HIF-1 α mRNA in placental membranes (A) and, chorionic plates(B) from normal (control) and chorioamnionitis (case 1,2,3) 12

Figure 2. HIF-1 α mRNA expression by RT-PCR in placental membranes (A) and, chorionic plates (B) from normal (control) and chorioamnionitis (case 1,2,3). Data was shown as the average relative expression of HIF-1 α mRNA to β -actin 12

Figure 3. Immunohistochemical analysis of HIF-1 α in normal placenta (A) and placental membranes of chorioamnionitis (B). Hematoxylin and eosin (H-E)stain of normal placenta (C) and placental membranes of chorioamnionitis (D)13

Figure 4. The difference of HIF-1 α staining measured by immunohistochemical analysis.....14

표 차례

Table 1. Clinical characteristics of patients according to the histologic finding of normal and chorioamnionitis in placentas 11

국문요약

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서

hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α) 발현의 차이

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반을 채취하여 hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α) 발현의 차이를 확인하여 용모 양막염에 있어서의 HIF-1 α 의 역할을 밝히고자 한다.

2005년 1월부터 2005년 12월까지 연세대학교 의과대학 부속 신촌 세브란스 병원 산부인과에 내원하여 제왕절개술을 시행 받은 산모 중 태반의 조직검사상 용모 양막염을 진단받은 산모를 실험군 (n=3)으로, 정상 조직검사 결과를 가진 산모를 대조군 (n=1)으로 하여 RT-PCR 시행을 위한 태반 검체를 수집하였다.

Immunohistochemical staining시행을 위해서 2002년 1월부터 2005년 12월까지 제왕절개술을 받은 산모 중 태반의 조직검사상 용모 양막염을 진단 받은 산모 (n=16)와 정상 조직 검사 결과를 가진 산모 (n=3)의

paraffin-embedded block을 이용하여 슬라이드를 제작하였다. 대조군과 실험군 모두의 태반막 (placental membranes), 융모판 (chorionic plate)시료에 대하여 RT-PCR실험을 수행하였고, immunohistochemical staining은 태반막 (placental membranes)에 대해 시행하였다.

실험 결과 융모 양막염을 가진 산모와 정상 산모의 태반의 태반막과 융모판의 HIF-1 α 에 대한 RT-PCR 시행 결과, 융모 양막염 산모 태반에서 HIF-1 α 유전자의 발현이 증가되어 있었고, 태반막을 가지고 시행한 immunohistochemical staining에서도 융모 양막염 산모의 태반에서 HIF-1 α 의 발현이 정상 산모와 비교해 증가되어 있었다. 본 연구를 통해, 융모 양막염 산모의 태반에서 HIF-1 α 발현이 정상 산모 보다 증가 되어 있음을 알 수 있었고, 이는 융모 양막염 감염에 있어서 HIF-1 α 의 발현기전과 역할을 밝히는 근거가 될 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : 융모 양막염, HIF-1 α , 태반

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서 hypoxic-inducible

factor-1 α (HIF-1 α) 발현의 차이

< 지도교수 박 용 원 >

연세대학교 대학원 의학과

조 회 영

I. 서 론

용모 양막염은 임상적, 조직학적으로 정의되는 산욕기 감염으로 분만 시 합병증이 동반된 진통을 유발하거나 조기 진통을 일으키는 원인으로 여겨지고 있다. 또한 용모 양막염이 임상적 증상을 나타내지 않으면서 조직학적으로 다형핵 백혈구가 태아막에 침윤하는 형태의 용모 양막염이 더 흔하게 일어나는 것으로 알려져 있다.¹ 조직학적 정의에 의하면 용모 양막염의 진단은 임상적 증상 없이 정상 분만 산모의 20%에서, 조기분만 산모에서는 50%까지 발견되고,² 임상적 증상이 있는 용모 양막염은 정상 분만 산모의 1%-2%, 조기분만 산모의 5%-10%에서 일어난다고 보고되어

있다.³

용모 양막염은 산모의 열, 산모 빈맥, 태아 빈맥, 자궁 압통, 악취 나는 양수 등의 임상 증상이 있을 때 진단할 수 있다.³ 진단이 모호하거나 무증상의 용모 양막염이 의심될 경우 양수 천자를 통해 중요 정보를 얻을 수 있으나, 침습적 방법인 양수 천자 자체로 인해 용모 양막염이 생길 수도 있다.²

Duff 등⁵은 용모 양막염을 가진 산모의 75%가 자궁 수축제의 사용에도 불구하고 자궁 수축이 감소하여 분만 시간이 길어질 뿐만 아니라, 분만 진행이 되지 않아 제왕 절개술이 필요한 경우도 34%에 이른다고 보고하였다. 또한 조기 진통을 보이는 산모의 원인을 조사해 본 결과 그 원인이 감염 또는 염증과 연관이 있었고, Grether와 Nelson⁶은 용모 양막염 산모에서 2,500g이하의 몸무게로 태어난 신생아에서 정상 산모에 비해 뇌성마비가 9.3배 증가하였고 낮은 Apgar score, 저혈압 및 신생아 경련이 일어날 수 있다고 하였다.

HIF는 91-94kDa의 β subunit과 120kDa의 α subunit으로 구성된 heterodimeric complex로 이 중 HIF- α 가 산소에 민감한 subunit으로 알려져 있다. HIF는 여러 가지 저산소증에 반응하는 유전자의 활성을 통해 저산소증에 대한 세포 반응과 전신적 반응에 중요 역할을 한다.⁷ 이외에도 HIF-1 α 는 T-cell뿐 아니라 insulin, thrombin 등도 자극 시키는 것으로 알려져 있어 HIF가 저산소증과 무관한 대사 경로도 조절하는 것으로 보고 있다.⁸ 이에 대한 최근 연구 결과를 살펴보면 HIF-1 α mRNA가 T-cell 수용체를 증가시키고 활성화된 T-cell이 대사 방식을 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 방법에서 혐기성 해당작용 (anaerobic glycolysis)으로 변화시켜 산화제에 의해 생길 수 있는 DNA의 손상을 막는다.^{8,9} 또한 HIF-1 α 를 knockout시킨 쥐를 가지고 한 실험에서는 세포의 ATP가 현저한 저하를 보이고 염증 부위로의 골수 세포 (myeloid cell) 이동, 응집, 침입성을 감소시키며 궁극적으로 균에 대한 저항성까지 감소 현상을 보이는 것으로 보아 HIF-1 α 는 산소가

충분한 환경에서도 골수 세포의 에너지 유지를 위해 꼭 필요하고, 세균 감염 시에 골수 세포의 반응을 조절한다고 보고하였다.¹⁰

HIF-1 α 는 β 2-integrin 유전자 발현을 조절하여 감염 부위로 백혈구가 모이도록 유도하고 백혈구의 소멸을 저해하는 등, 염증에 관여하는 중요한 요소로 주목 받고 있다.¹¹ Wagner등¹²에 의하면 *Leishmania amazonensis*에 감염된 쥐의 피하층에 대한 immunohistochemistry (이하 IHC) 결과, HIF-1 α 의 발현이 증가됨을 보였고, Volkhard 등¹³은 *Bartonella henselae*의 감염에 의한 세균성 혈관종증 (bacillary angiomatosis)에서 HIF-1의 활성도를 알아보기 위해 immunofluorescence, western blotting 및 IHC를 이용하여 실험한 결과 *Bartonella henselae*가 HIF-1을 통해 혈관형성에 관여하는 요소의 발현을 야기시킨다는 것을 밝히고 이런 결론은 궁극적으로 세균 감염에서 HIF -1이 중요한 역할을 한다는 증거를 제시하였다.

임상적으로 HIF-1 α 에 대한 중요성이 증가하고 있고 세균 감염에도 관여한다는 증거가 제시됨에 따라 본 연구에서는 산모에서 흔히 발생하는

융모 양막염에서 HIF-1 α 의 발현이 정상군에서와 어떠한 차이가 있는지
알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

2005년 1월부터 2005년 12월까지 연세대학교 의과대학 부속 신촌
세브란스 병원 산부인과에 내원하여 제왕절개술로 분만한 산모 중 태반의
조직학적 검사가 시행된 산모들을 대상으로 하였다. 연구 대상자는 단태아
임신만을 포함하였으며 신생아에게 주요 선천성 기형이 있는 경우는
제외하였다. 임신 주수의 결정은 월경력이 규칙적인 경우 최종 월경일을
기준으로 하였고, 월경력이 불규칙하거나 최종 월경일이 확실하지 않은
경우는 임신 초기의 초음파 소견을 기초로 산정하였다.

태반의 조직학적 검사상 융모 양막염을 진단받은 산모 (n=3)를
실험군으로, 정상 조직검사 결과를 가진 산모 (n=1)를 대조군으로 하여

RT-PCR시행을 위한 태반 검체를 수집하였다. IHC실험을 위하여 2002년 1월부터 2005년 12월까지 제왕절개술을 시행 받은 산모 중 태반의 조직검사상 용모 양막염을 진단 받은 산모 (n=16)와 정상 조직 검사 결과를 가진 산모 (n=3)의 용모판 (chorionic plate), 태반막 (placental membranes)의 paraffin-embedded block을 찾아 슬라이드를 제작하였다. 조직학적 용모 양막염은 분만된 태반에서 다형핵 백혈구 (polymorphonuclear leukocyte)의 침윤이 관찰되었을 때 진단하였으며 조직건본 중 어느 하나에 이런 염증성 병변이 발견되는 경우로 정의하였다. 각각의 실험군과 대조군의 태반에서 얻어진 용모판 (chorionic plate), 태반막 (placental membranes)에 대해 RT-PCR을 시행하였고, IHC는 태반막 (placental membranes)에 대해 시행하였다.

2. 검체 수집

RT-PCR을 위한 검체 수집은 태반 분만 후 즉시 용모판 (chorionic plate), 태반막 (placental membranes)의 조직을 얻어 실험 전까지 -70°C

질소탱크에 냉동 보관하였다. IHC시행을 위해서 이미 제작되어 있는 paraffin-embedded block을 찾아 태반막 (placental membranes)의 슬라이드를 제작하였다.

3. RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)

가. RNA extraction and cDNA synthesis

실험을 위한 검체를 액체 질소에서 막자 사발을 이용하여 분쇄 시킨 후 전체RNA extraction kit (Promega, Madison, Wisc. USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (1 μ g)는 oligo-dT를 primer로 사용하여 역전사 (reverse transcription)를 실시하였다. 즉, 역전사 효소 (reverse transcriptase, Formentas life science)를 이용하여 역전사를 통한 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA) 합성을 시행하는데 이때 반응을 70°C에서 5분간, 37°C에서 60분간, 그리고 70°C에서 10분간 반응시켰다. 합성된 cDNA는 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

나. RT-PCR

RT-PCR 반응을 위해 50mM KCL, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.01% gelatin으로 구성된 PCR buffer와 2.5mM MgCl₂, 2.5mM dNTP, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase와 각각 0.2 μ m의 HIF-1 α 에 대한 특이적인 forward primer 및 reverse primer를 이용하였는데 그 염기 서열은 다음과 같다: Forward primer (F): 5'-CCTGAGCCTAATAGTCCC-3', reverse primer (R): 5'-GGTGGCATTAGCAGTAGG-3'였고, β -actin의 sequence는 (F) 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC-3' (R) 5'-GAAGTCCAG GGCGACGTAGCAC-3'였다.

HIF-1 α 의 PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응 후 70 $^{\circ}$ C에서 30초간, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 35 cycle을 시행하였다. 반응산물은 1.5% agarose gel상에 전기영동을 통하여 분획시킨 후 digital analysis software (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 densitometer (IMAGE READER LAS-1000 lite)를 통해 관찰하였다.

4. Immunohistochemistry (IHC)

IHC 실험 방법은 다음과 같다. paraffin-embedded block을 xylen, alcohol로 파라핀 제거 및 탈수처리하고 peroxidase 차단액을 넣고 10분간 반응시켰다. TBS Tween 용액으로 씻어낸 후 1차 antibody로는 1:400으로 희석한 monoclonal HIF-1 α mouse Ab (Stressgen bioreagents, Victoria, BC, Canada)를 넣고 4°C에서 overnight 반응시켰다. TBS Tween용액으로 다시 씻어낸 후 primary enhancer를 점적하고 20분간 반응시켰다. 다시 TBS Tween용액으로 세척하고 secondary polymer용액으로 30분간 반응시켰다. 다시 TBS Tween용액으로 세척하고 DAB chromogen용액과 substrate를 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. TBS Tween용액을 세척하고 hematoxylin으로 대조염색하고 흐르는 물에 적당히 씻은 다음 표본 제작 후 현미경으로 관찰하였다. 병리의사가 400배의 배수에서 무작위하게 10군데를 세어서 염색 정도를 백분율로 표시하였다. 염색 score를 0-4로 하고, 각각 면역 염색된

세포의 정도가 0% 이면 0점, 1-25%이면 1점, 26-50%이면 2점, 51-75%이면 3점 그리고 76-100%일 때를 4점으로 하였다.

5. 통계 분석

산모의 임상적 특성은 기술적 통계를 이용하여 분석 하였고, IHC 결과 얻어진 시료간 염색 정도 차이의 통계학적인 분석을 위해 SPSS program (Version 12.0 Chicago, IL, USA) 의 Mann-Whitney U test를 사용하였고, p -value가 0.05 미만일 때 통계학적으로 의미 있다고 하였다.

III. 결 과

RT-PCR과 IHC에 사용된 태반 검체 산모의 나이, 재태 연령은 Table 1과 같으며, 각 군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 1. Clinical characteristics of patients according to the histologic finding of normal and Chorioamnionitis in placentas

RT-PCR	Study Group (N=3)	Control Group (N=1)	<i>P</i>
Age (yr)	35.0 ± 8.0	31.0	NS
Gestational age at delivery (wk)	33.0 ± 7.0	39.0	NS
IHC	Study Group (N=16)	Control Group (N=3)	<i>P</i>
Age (yr)	31.0 ± 4.4	29.4	NS
Gestational age at delivery (wk)	33.7 ± 4.5	33.9	NS

Values are presented as mean ± standard deviation

NS : not significant

실험은 정상 태반막과 용모 양막염 환자의 태반막을, 정상 용모판과 용모 양막염 환자의 용모판을 비교하여 진행하였다. 용모 양막염 환자에서 태반막과 용모판에서 모두 정상 산모의 시료에서보다 HIF-1 α 발현이 약간 증가되어 있음을 확인하였다 (Fig. 1).

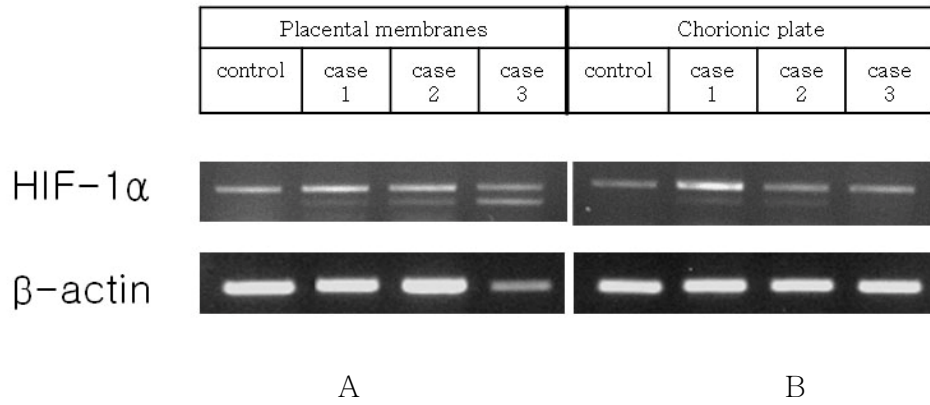


Figure 1. RT-PCR of HIF-1 α mRNA in placental membranes (A) and, chorionic plates (B) from normal (control) and chorioamnionitis (case 1,2,3)

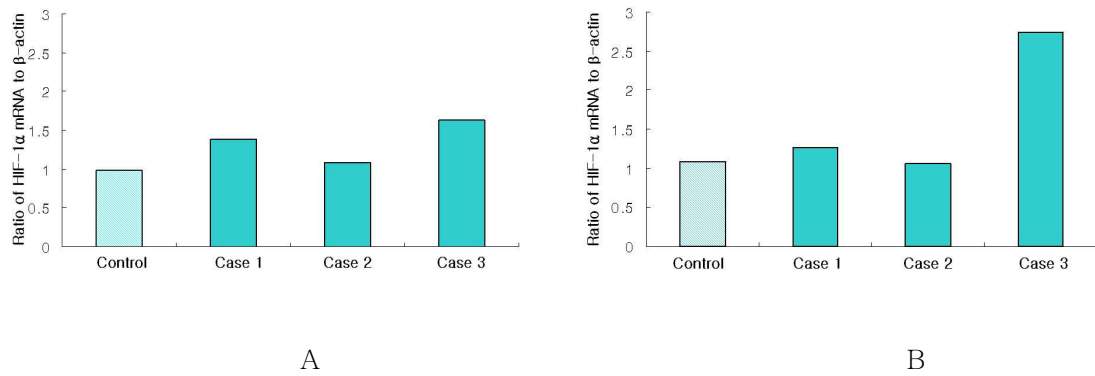


Figure 2. HIF-1 α mRNA expression by RT-PCR in placental membranes (A) and, chorionic plates (B) from normal (control) and chorioamnionitis (case 1,2,3). Data was shown as the average relative expression of HIF-1 α mRNA to β -actin.

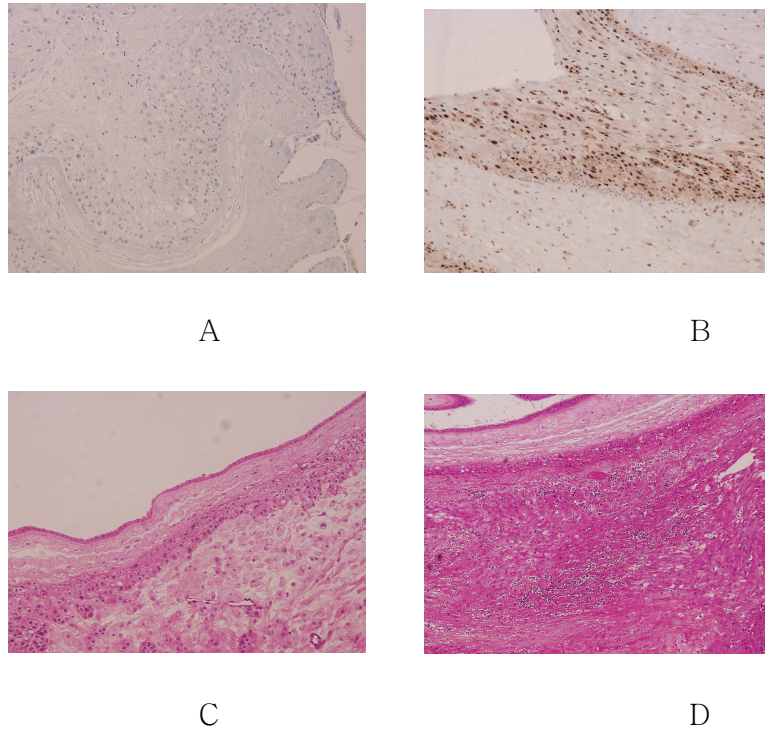


Figure 3. Immunohistochemical analysis of HIF-1 α in normal placenta (A) and placental membranes of chorioamnionitis (B). Hematoxylin and eosin (H-E)stain of normal placenta (C) and placental membranes of chorioamnionitis (D)

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반막에 대해 IHC를 시행해 보았을 때 현미경적으로 용모 양막염 산모의 태반의 양막 (amnion)과 용모막 (chorion) 세포의 핵에 HIF-1 α 항체에 의한 염색 정도가 증가되어 있음을 확인하였다 (Fig.3, A and B). 같은 조직의 슬라이드를 H-E stain해서

살펴보면 정상 산모에서는 염증 세포를 볼 수 없는 반면 용모 양막염 산모의 양막과 용모막에 염증 세포의 침윤이 증가되어 있어 용모 양막염의 정의에 부합하는 것을 알 수 있었다 (Fig.3, C and D).

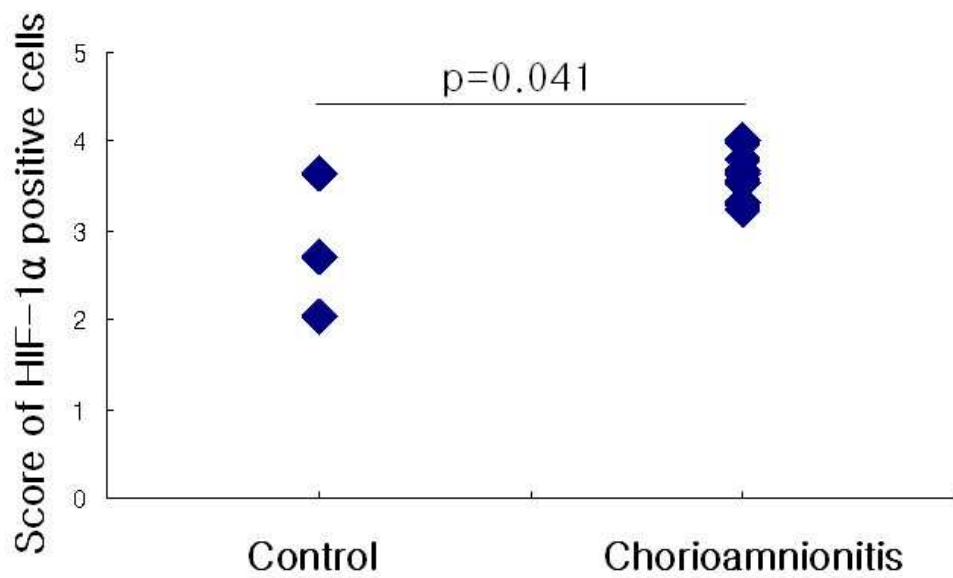


Figure 4. The difference of HIF-1α staining measured by immunohistochemical analysis.

정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서 얻어진 태반막에 대한 immunohistochemical staining을 시행한 결과 두 군 모두에서 brownish color로 염색되어 HIF-1 α 가 발현 되었음을 보았고, 또한 정상 산모와 용모 양막염 산모의 염색정도는 통계학적으로 유의있게 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

IV. 고 찰

세균 감염에 있어서 HIF-1 α 의 발현에 대한 연구는 제한적으로 진행된 상태로 감염 에서 HIF-1 α 의 역할에 대한 신호 전달 경로는 명확하게 밝혀 지지 않았다. 그러므로 산모의 용모 양막염에서 HIF-1 α 발현이 증가되는지를 확인하여 감염에서 중요 역할을 담당할 것으로 생각되는 HIF-1 α 의 역할을 밝히는 근거로 사용될 수 있기를 기대하면서 본 연구를 진행하였다.

HIF-1은 α subunit과 β subunit으로 구성되어 있고 HIF-1 α 가 산소에

민감한 isoform으로 알려져 있고,¹⁴ HIF-1 β 는 이전에 알려진 aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT)로 ARNT는 HIF-1 α 가 산소와 무관하게 안정화할 수 있도록 해준다. HIF-1 α 와 HIF-1 β 는 basic-helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS) protein으로 전사 요소에 속하며 이것은 배아 형성과 여러 생리적 현상들에 있어서 중요 역할을 담당한다. HIF-1 α 의 경우에 이것의 transactivation domain (TAD)은 531-575 (N-terminal TAD)와 786-826 (C-terminal TAD)의 두 지역의 domain에 위치한다. HIF-1 α 의 C-terminal 지역은 저산소 상태에서 중요 역할을 한다고 알려진 것에 반해 N-terminal 지역에 대한 정보는 미미하다.¹⁵ 또한 HIF-1 α 는 산소 농도에 따라 그 자체를 분해하는 domain을 포함하고 있어, 산소가 정상 상태가 되었을 때 HIF-1 α 를 분해하는 역할을 한다.

HIF-1 α 는 저산소 상태에서 신생 혈관 형성 (angiogenesis)와, 당 전달체 1 (glucose transporter 1)을 증진 시키는 vascular endothelial growth factor (VEGF)같은 저산소에 반응하는 유전자 발현에 관여한다. 또한 HIF-1 α 는 nitric oxide synthase의 전사를 활성화시켜 신생 혈관

형성과 혈관 확장을 증강시켜 저산소증에 대해 세포들이 적응할 수 있는 조건 형성에 기여한다.¹⁶⁻¹⁸ HIF-1 α 에 대한 연구는 cervical cancer¹⁹나 hepatocellular carcinoma²⁰ 등에서도 이루어져 암에서 VEGF를 통해 신생 혈관 형성에 관여한다는 사실이 밝혀졌고 특히 초기의 invasive cervical cancer, non-small cell lung cancer, 그리고 oligodendroglioma, oropharyngeal cancer 등에서는 중요한 예후 인자임이 증명 되었다.

최근 HIF-1 α 에 대한 연구는 세균 감염에 대한 면역 반응에서도 이루어져 이것의 활성이 저산소 상태 뿐 아니라 정상 상태의 산소에서도 일어나 NO, granule protease, cathelicidin antimicrobial peptide를 포함한 면역 작용에 직간접으로 작용함이 밝혀졌다. HIF-1 α 는 VEGF와 무관한 기전을 통하여 세균 감염시 골수 세포의 활성화와 축적을 일으키고 HIF-1 α 결핍 상태에서는 granule protease, cathelicidin이 현저히 감소해 생체 외에서 살균 작용 활성이 감소하고 생체 내에서 감염 조절의 실패를 초래하는 것으로 알려졌다.^{21,22} 세균 감염시 HIF-1 α 의 작용에 관여하는 cytokine은 다양하며 그 중에 주로 interleukin (IL)-1 β 과 tumor necrosis

factor (TNF)- α 에 의해 조절되고 nitric oxide (NO) 또한 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway를 통해 활성화시킨다고 알려져 있다. 그 이후 inducible-nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX-2)가 NO와 prostaglandins (PGs)의 급속한 생산을 증가시켜 염증 반응을 증강시킨다. 결론적으로 정상산소 상태에서 HIF-1 α 는 macrophage로부터 분비되는 NO와 TNF- α 에 의해 조절, 안정화되어 해당효소 (glycolytic enzyme)를 증가시켜 중성구의 활성을 일으키고, nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시켜 중성구의 세포 고사를 막고 β_2 integrin을 활성화하여 염증부위로의 부착 및 이동이 용이하게 만든다.²³ 용모 양막염 산모에서도 위와 같은 기전으로 HIF-1 α 가 작용해 염증 반응을 조절하고 면역 활동을 강화시킬 것으로 생각된다. 그러나 HIF-1 α 의 활성을 기시하는 cytokine에 대한 연구는 확립되어 있지 않은 상태로 기존에 정상 태반에 발견되어 있던 HIF-1 α 가 활성화 되어 다른 염증에 관여하는 cytokine을 분비시키는 것인지, 아니면 염증 관련 cytokine들이 먼저 활성화가 된 후 HIF-1 α 에 영향을 주는 것인지는

명확하지 않은 상태이다.

본 연구에서 RT-PCR 실험을 통해 정상 산모에 비해 용모 양막염 산모의 태반에서 HIF-1 α 의 발현이 미미하지만 증가됨을 확인할 수 있었다. 여기에서 주목해야 할 한 가지 사실은 정상 산모의 태반에서도 HIF-1 α 가 발현 된다는 것이다. 사람에서 임신 초기에 자궁 표면은 낮은 산소 상태를 유지하다가 모체의 혈관계와 연결이 되면서 산소가 풍부해지게 된다. 낮은 산소 상태에서 HIF는 초기 태반 형성에 관여하여 해당 작용, 적혈구의 생산, 신생 혈관 형성을 일으키게 된다. 그러므로 정상 산모의 태반에서도 HIF가 발현됨을 알 수 있다.²⁴ 또한 RT-PCR에서 HIF-1 α 가 정상 산모와 비교해 용모 양막염 산모에서 확연한 차이를 보이지 못한 이유 중 하나로 HIF-1 α 의 반감기를 들 수 있다. HIF-1 α 는 세균 감염의 염증 반응 과정에서 일시적으로 생겼다가 사라지는 것으로 알려져 있고 원래의 반감기도 5분 정도이나 저산소 상태나 허혈 상태가 되면 단백질 분해 억제로 늘어난다고 한다.²⁵ 이런 HIF-1 α 가 염증 반응의 어느 과정 중에 생기는 지에 대해서도 아직 밝혀지지 않았고, 실험군들의 세균 감염

시작과 기간에 대한 정확한 정보도 얻을 수가 없기 때문에 어느 단계에서 HIF-1 α 의 생성과 발현이 일어나는지는 명확히 알 수 없었으나 이런 짧은 반감기로 인해 이미 발현된 HIF-1 α 가 작용이 끝난 후 바로 분해되어 의미 있는 차이를 보이지 않았을 수도 있다.

IHC에서는 비특이적인 단백결합을 최대한 배제하기 위해 monoclonal antibody를 사용하였고, 시행 결과 정상 산모와 용모 양막염 산모 태반의 내피세포 핵에서 모두 양성 발색 반응을 확인할 수 있었으며, 현미경적으로 관찰했을 때 용모 양막염 산모에서의 발현이 더 증가되어 있음을 볼 수 있었다. 또한 통계학적 분석에 의하면 정상 산모와 용모 양막염 산모의 염색 정도가 유의한 차이를 보였다.

본 연구의 결과를 통해 용모 양막염 감염에 있어서 HIF-1 α 의 발현기전과 역할을 밝히는 근거가 될 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구는 산모에 있어서 발생할 수 있는 용모 양막염에서 태반 내 HIF-1 α 발현을 확인 및 비교분석 하였다.

1. HIF-1 α mRNA 발현을 정상 산모와 용모 양막염 산모의 태반에서 비교해 보았을 때 태반막과 용모판 모두에서 약간의 HIF-1 α 발현 증가를 확인할 수 있었다.

2. IHC stain시행 결과 정상 산모와 용모 양막염 산모에서 모두 양성 발색 반응을 확인할 수 있었고, 현미경적으로 관찰했을 때 대부분이 내피 세포의 핵에 염색이 되었다. 정상 산모에 비해 용모 양막염 산모에서의 HIF-1 α 발현이 더 증가되어 있었고 그 차이는 통계학적으로도 유의성을 가지고 있었다.

이를 토대로 용모 양막염 감염에 있어서 HIF-1 α 의 발현기전과 역할을 밝히는 근거가 될 것으로 기대한다.

참고문헌

1. van Hoesen KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whittey JE, Distant J, Crawford C, et al. .Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996;16:731-744.
2. Rodney K. Chorioamnionitis and Labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-296.
3. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1317-1326.
4. Greig PC, Ernest JM, Teot L. Low amniotic fluid glucose levels are a specific but not a sensitive marker for subclinical intrauterine infections in patients in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:365-371.
5. Duff P, Sanders R, Gibbs RS. The course of labor in term patients with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:391-395.

6. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 1997;278: 207–211.
7. Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. The role of HIF-1 α in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol* 2005;26:434-439.
8. Richard DE Berra E, Pouyssegur J., Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275:26765–26771.
9. Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett* 1995;372:233–237.
10. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112:645–657.

11. Walmsley,SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al.

The role of HIF-1 α and NF- κ B in hypoxia-induced survival in human and murine neutrophils. *J Exp Med* 2005;201:105–115

12. Arrais-Silva WW, Paffaro VA Jr., Yamada AT, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp Mol Pathol* 2005; 78:49-54

13. Kempf VA, Lebedziejewski M, Alitalo K, Walzlein JH, Eehalt U, Fiebig J et al.

Activation of hypoxia-inducible factor-1 in *Bacillary Angiomatosis*.:evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 2005;111:1054-1062.

14. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1376–1393.

15. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:17771–17778.
16. Lal A., Peters H., St. Croix B., Haroon ZA., Dewhirst MW., Strausberg RL et al. Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1337-1343.
17. Koong AC., Denko NC., Hudson KM., Schindler C., Swiersz L., Koch C, et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 2000;60:883-887.
18. Bachtary B, Schindl M, Potter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2234-2240.

19. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIb cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:513-521
20. Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005;11:1705-1708.
21. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabell G et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*. 2002;416:291-297
22. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001;414:454-457

23. Haddad JJ, Harb HL. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Int Immunopharmacol* 2005;5:461-483

24. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compennolle V, Maltepe E, Adelman DM, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 2005;25:10479-10491.

25. Kramer BW, Kaemmerer U, Kapp M, Herbst D, Marx A, Berg D et al. Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatr Res* 2005;58:607-612

Abstract

**The difference in placental expression of
hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α)
between normal and chorioamnionitis patients**

Hee Young Cho

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yong Won Park)

Chorioamnionitis is associated with neonatal morbidity and mortality. We hypothesized that chorioamnionitis may stress placenta, active proinflammatory gene transcription. This study was to determine whether HIF-1 α is expressed in human placenta and to compare the degree of its expression between the placenta of normal and chorioamnionitis groups. The placentas were obtained from patients with chorioamnionitis and normal pregnant women who delivered by cesarean section at

the Severance Hospital from Jan. 2005 to Dec. 2005. The RT-PCR was performed using placental membranes and chorionic plate of normal and chorioamnionitis groups. And immunohistochemistry with HIF-1 α antibody were performed using placental membranes of normal and chorioamnionitis groups. Immunohistochemistry was analyzed by counting positive endothelial cell in placental membranes. The result of RT-PCR was demonstrated slightly higher expression of HIF-1 α in the placenta of chorioamnionitis group than normal group women but did not reach statistical significance. But, immunohistochemistry was showed that expression of HIF-1 α was increased in the chorioamnionitis group and reached statistical significance.

In conclusion, this study was showed that HIF-1 α was highly expressed in the placenta of chorioamnionitis group than normal group.

Key Words : chorioamnionitis, HIF-1 α , placenta