

임신중독증 태반에서 세포고사의  
발현

연세대학교 대학원  
의과학사업단  
이 연 혜

# 임신중독증 태반에서 세포고사의 발현

지도 박 용 원 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2000년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 연 혜

이연혜의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

## 감사의 글

이 논문을 완성하기까지 항상 세심한 지도와 관심을 베풀어주신 박용원 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

연구 기간 중 여러모로 지도와 격려를 하여 주신 양우익 교수님, 김영태 교수님께 감사드리며 실험과정에 도움을 주신 송건창 선생님과 권혜경 선생님께도 감사드립니다.

그리고 항상 기도하는 마음으로 저를 지켜봐 주시는 부모님, 물심양면으로 옆에서 도와주시는 시부모님과 가정에서 아내와 엄마로서 부족한 저를 이해해주는 남편과 제성이에게도 감사의 마음을 전합니다.

저 자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
<b>I. 서 론</b> .....	3
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	7
1. 재료 .....	7
2. 연구방법 .....	8
<b>III. 결 과</b> .....	10
1. TUNEL 방법에 의한 DNA fragmentation 의 관찰 .....	10
2. Bcl-2 의 발현 .....	10
3. 임신중독증환자와 대조군의 세포고사 .....	12
4. 임신중독증환자에서 혈류 순환 장애 시의 세포고사 .....	13
5. 임신중독증환자에서 병리조직 검사소견에 따른 세포고사 .....	14
6. 대조군에서 세포고사 .....	15
<b>IV. 고 찰</b> .....	17
<b>VI. 참고 문헌</b> .....	25
Abstract .....	28

## 그림 차례

Fig. 1. Nuclear staining of trophoblasts by TUNEL method .....	11
Fig. 2. Bcl-2 expression in trophoblasts by immunohistochemical staining .....	11

## 표 차례

Table 1. Distribution of PIH patients and control groups according to gestational weeks .....	7
Table 2. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates between PIH patients and control groups .....	13
Table 3. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to Doppler findings in PIH patients .....	14
Table 4. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to pathologic findings in PIH patients .....	15
Table 5. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to maturity of placenta in control patients .....	16

## 국문요약

### 임신중독증 태반에서 세포고사의 발현

세포사멸 과정은 이전부터 알려져 온 전형적인 피사와 세포고사로 나눌 수 있다. 1990년대에 들어서 분자 생물학 분야가 발전됨에 따라 세포고사에 관계된 일부 유전자의 역할이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발해졌고 퇴행성 질환이나 종양의 발생과 치료, 정상조직의 발생과 소멸과정 등에서 세포고사의 역할을 밝히려는 연구가 진행되어 왔다. 산부인과 영역에서도 배란 이후 난포의 퇴행과정, 자궁내막의 월경주기에 따른 생성과 탈락 등에서 세포고사가 일어난다는 연구 결과가 있고 최근 몇 년 사이에는 착상 이후 태반의 성장과 노화, 분만과정에서도 세포고사가 발생한다는 연구보고가 있었다. 비정상적인 태반의 착상과정과 태반의 혈류부전, 태아의 발육 제한 등을 고려할 때 임신중독증 시 정상임신과 구별되는 세포사의 특징을 나타낼 것이라 생각되어 본 연구를 시행하였다.

연구대상은 1995년부터 1998년까지 23 주에서 40 주까지의 중증의 임신중독증 또는 전자간증, 자간증으로 입원하여 분만한 환자 39명과 20주 이후 분만한 환자중 태반의 병적 조직소견을 보이지 않고 태반조직을 확보할 수 있었던 33명을 대상으로 하였고 DNA fragmentation detection kit와 Bcl-2 단일클론 항체를 이용하여 대조군의 태반과 임신중독증 산모의 태반에서의 DNA fragmentation과 Bcl-2 단백질의 발현여부를 비교하였다. 그 결과 첫째, 임신중독증의 산모에서 대조군에 비해 DNA fragmentation의 발현 비율이 더 낮았고 bcl-2 발현은 대조군에서 임신중독증 환자보다 대조군에서 억제되어 나타나 임신중독증 환자에서 세포고사의 경향을 파악하기가 어려웠다. 둘째, 자궁동맥 혈류 파형에서 notch를 보여 순환장애를 의심

했던 경우의 환자 군과 그렇지 않은 경우를 각각 비교해 보았는데 순환장애를 보인 경우에는 DNA fragmentation이 많이 나타났고 Bcl-2의 발현이 적어 세포고사가 촉진되는 경향을 보였다. 셋째, 임신중독증 환자의 병리조직 검사 상에서 합포체성 결절(syncytial knots)과 경색소견을 보였던 경우와 특징적인 소견을 나타내지 않았던 태반조직에서 각각 비교해 보면 병리조직 검사상 임신중독증의 특징적인 소견을 보였던 경우에 DNA fragmentation이 현저하게 감소되어 있었고 Bcl-2의 발현이 증가한 것으로 나타나 세포고사가 억제되는 경향을 보였고 병리조직 검사 상에서 특징적인 소견이 없었던 임신중독증 환자 군에서 세포고사가 증가되는 경향을 보였다. 넷째, 대조군에서 임신 주 수별로 주 수에 맞게 성숙된 태반과 그렇지 않은 태반을 구별해서 관찰하였는데 대조군 태반에서 주 수에 맞게 성숙한 태반과 주 수에 비해 미성숙한 태반의 경우, 특징적인 세포고사의 경향을 보이지 않았고 세포고사에 의한 태반의 성숙과정에 미치는 영향을 찾기 어려웠다.

이상의 결과로 볼 때 본 연구에서 이용한 TUNEL 방법에 의한 DNA fragmentation과 면역조직화학염색에 의한 Bcl-2의 발현을 분석함으로써 임신중독증의 병태 생리에서 태반의 세포고사의 역할을 명확히 밝히기 어려우나 임신중독증의 진행과정에 따라 일시적인 세포고사의 진행이나 억제가 모두 나타날 수 있다는 결과를 얻었고 이에 대해서 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

---

핵심되는 말 : DNA fragmentation, Bcl-2, 세포고사(apoptosis), 임신중독증



## 임신중독증 태반에서 세포고사의 발현

< 지도교수 박 용 원 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

### 이 연 해

## I. 서 론

19세기에 들어서면서 양서류나 곤충의 변태는 자연적으로 일어나는 세포사에 의한다는 주장이 제기되기 시작하였고<sup>1)</sup> 전형적인 괴사와 달리 염증반응이 없이 핵이 위축되는 세포고사의 특징적인 형태조건이 1965년에 Kerr에 의해 관찰, 발표되었다<sup>2)</sup>. 그 이후 전자 현미경을 이용하여 괴사와 구별되는 형태적 특징을 갖는 세포사를 세포고사(apoptosis)라고 부르게 되면서<sup>3)</sup> 비로소 의학계의 관심은 시작되었다. 그리고 1990년대에 들어서 분자 생물학적 기법이 세포고사 연구분야에 본격적으로 도입되면서<sup>4)</sup> 세포고사에 관계된 일부 유전자의 역할이 밝혀지고 퇴행성 질환이나 암의 발생과 치료, 선천성 기형의 발생, 정상조직의 발생과 소멸 등에서 세포고사의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다<sup>5)</sup>.

최근 들어 산부인과 영역에서도 부인암 영역<sup>6)</sup>과 배란과 그 이후의 난포의 퇴행과정, 자궁내막의 월경주기에 따른 생성과 탈락<sup>7)</sup> 등에서 세포고사의 연구가 진행되었고 최근 몇 년 사이에는 착상이후 태반의 성장과 노화, 분만과 관련하여 세포고사에 대한 연구들이 진행되고 있다<sup>8)</sup>.

1995년 Yasuda 등은 임신의 주 수에 따라 태반조직에서 세포고사를 관찰하여, 임신초기의 합포체영양모세포(syncytiotrophoblastic cell)나 임신 말기

의 태반조직에서 세포고사를 관찰할 수 있다고 하였고<sup>9)</sup> Thiet 등은 임신 말기 태반에서 세포고사를 관찰함으로써 태반조직의 발생과 항상성 유지를 위한 세포의 예정사(programmed cell death)가 정상적인 과정이라는 가설을 지지했다<sup>10)</sup>.

임신중독증환자에서의 태반은 육안적으로 볼 때 정상적인 태반에 비해 작고 태변 착색이 되어 있는 경우도 많으며 deciduous hematoma나 급.만성 경색 소견들을 관찰할 수 있다. 현미경적으로는 급성 또는 아급성 경색 소견을 보이고 태반하 출혈의 빈도가 높고 용모허혈의 조직학적인 증거로 함포체성 결절의 증가, 영양막 세포 기저막의 비후, 용모 기질 혈관의 감소가 나타나며 태반 가장자리에서 관찰되는 자궁 나선동맥의 혈관벽에 섬유소양괴사와 대식세포의 축적을 일으키는 급성 죽종증(acute atheromatosis)을 볼 수 있다<sup>11)</sup>. 정상 임신에서는 태반의 혈관에서 생성되는 프로스타글란딘 E군의 작용으로 안지오텐신 II에 의한 혈관수축효과와 고혈압 유발 효과가 감소하게 되는데 임신중독증에서는 혈관확장을 유발하는 프로스타글란딘 E군의 생성이 감소하고 안지오텐신 II에 의한 혈관수축작용의 감수성이 증가하게 되고 레닌의 생성도 증가하여 혈관수축을 일으켜 고혈압을 유발한다. 또 나선동맥벽의 급성 죽종증은 혈류 차단효과로 자궁-태반 관류량(uteroplacental perfusion)이 감소하게되어 태아성장제한과 같은, 임신의 생리적인 변화가 정상적으로 되지 않는 상태에서 과생되는 문제들이 나타난다. 그러므로 이러한 임신중독증의 병태생리 과정 중에서 혈관수축과 혈류감소라는 스트레스는 정상적인 임신의 태반에서와는 다른 양상으로 세포고사를 발생하게 할 것이다.

세포고사는 세포사멸의 형태적인 특성으로 정의하는 것으로 전자 및 광학 현미경으로 세포의 형태적인 변화를 조사하는 것이 가장 확실한 방법이겠으나<sup>12)</sup> 임상 의로서 수용하기 어려워 실험과정상 좀 더 접근하기 쉬운 방

법으로, 조직 표본에서 TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)방법<sup>13)</sup>을 이용하여 세포고사의 중요한 생화학적인 특성중의 하나인 DNA fragmentation을 확인하고 Bcl-2 단일클론항체를 이용하여 세포사멸을 조절하는 단백질 Bcl-2의 표현의 차이를 관찰하여 임신중독증의 태반에서 세포고사 발생과 기전을 알아보고자 하였다.

DNA fragmentation은 세포고사를 일으키는 세포의 중요한 생화학적인 특성 중의 하나로 DNase의 활성화, 특히 caspase-activated DNase(CAD)가 활성화되어 핵으로 이동한 후 DNA를 절단하게 된다. 이 때 chromosome의 nucleosomal structure가 CAD의 작용을 부분적으로 방해하게 되는데 histone과 함께 bead를 형성하는 DNA는 CAD의 작용으로부터 보호되고 bead와 bead 사이의 linker DNA만 선택적으로 절단되어 ladder pattern의 DNA 절단이 유도된다. TUNEL 방법을 이용하면 절단된 DNA의 3'-OH end에 작용하는 DNA polymerase 즉, terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)는 세포고사에 의해 증가된 DNA end에서 DNA 합성을 증가시키고 biotinylated dUTP를 TdT의 기질로 사용하여 DNA를 biotinylation 시킨 후 biotin과 강한 결합력을 지닌 peroxidase와 결합된 avidin과 배양 후 발색제인 DAB을 반응시키면 DAB이 peroxidase와 반응하여 핵이 갈색으로 염색되는데 핵의 염색 정도에 따라 DNA절단 정도 즉 세포고사의 정도를 확인할 수 있다<sup>14)</sup>.

1985년에 발견된 전암유전자인 B cell lymphoma-2(Bcl-2)는 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로 26 KDa의 분자량을 가지며 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치하여 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는것으로 알려졌다<sup>15)</sup>. 산부인과 영역에서는 부인암 발생에 관여하는 oncoproteins 중의 하나로서 Bcl-2와 용모상피암과 포상기태 등의 영양막 세포기원의 종양과 관련하여 태반조직에서 Bcl-2의 발현에 대한

연구가 있었고<sup>16)</sup> 생리주기에 따른 정상 자궁내막에서의 Bcl-2의 발현양상을 관찰한 경우<sup>17)</sup> 등이 있었는데 임신중독증 환자의 태반에서 세포고사와 관련하여 Bcl-2의 발현양상에 대한 연구 보고는 거의 없었다.

본 연구에서는 23주에서 40주까지의 중증의 임신중독증 또는 전자간증, 자간증의 환자와 정상적인 임신부의 태반에서 세포고사의 역할을 분석하고자 하였고 그 방법으로는 TUNEL법과 Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학염색을 사용하였다. 임신중독증의 경우, 비정상적인 태반착상과 자궁에서 태반으로의 혈류 부전과 이차적으로 유발된 태아의 발육제한상태와 특징적인 임신중독증의 병리적 소견을 보이는 태반에서 세포고사의 발현양상을 살펴보고, 정상태반과 임신중독증의 태반에서 세포고사 양상의 차이를 살펴봄으로써 임신중독증의 병태 생리에 대한 이해에 일보 전진을 기대해 보기로 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

1995년부터 1998년까지 연세대학교 의과대학 산부인과학 교실에 내원하여 20주 이후 자간증, 전자간증이나 임신중독증, 중증으로 입원하여 분만환자 중 태반조직을 확보할 수 있었던 환자 39예와 조기파수, 조기진통으로 내원한 23주에서 40주까지의 태반의 병적인 조직소견을 보이지 않은 환자 33예를 대조군으로 하였다(Table 1).

Table 1. Distribution of PIH patients and control groups according to gestational weeks

Gestational weeks	Pregnancy-induced Hypertension	Control group
20 - 24 weeks	1	6
25 - 30 weeks	9	8
31 - 33 weeks	9	5
34 - 37 weeks	12	6
38 - 42 weeks	8	8
Total	39	33

## 2. 연구방법

임신중독증환자의 태반조직은 가능하면 병변이 있는 곳, 즉 합포체성 결절과 경색의 소견을 보이는 부분에서 관찰하였고, 대조군의 경우는 실질 조직이 풍부한 부위에서 조직절편을 얻었다.

세포고사를 확인하기 위해서 임신중독증과 대조군의 태반에서 세포고사에 의한 세포핵의 DNA fragmentation을 직접 관찰하는 TUNEL 방법을 사용하였고 세포고사의 조절과정에 관여하여 세포사멸을 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2 단백질의 표현양상을 관찰하기 위하여 Bcl-2 단백질에 대한 단일클론항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였으며 그 방법은 다음과 같다.

연구 대상 예의 파라핀 블록을 박절하여 슬라이드에 고정시키고 xylene으로 탈파라핀화하고 100%, 95%, 70 % 알코올로 함수시켰다. 면역조직화학 염색은 조직내 감추어진 항원을 노출시키기 위하여 microwave oven을 이용하여 10분 정도 가열한 후 실온에 두었고 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 3% 과산화수소수로 15분간 처리하고 증류수로 수세하였다. TUNEL방법에 의한 DNA fragmentation의 관찰은 Calbiochem사(Cambridge, MA, USA)의 TdT FragEL™ Kit를 사용하였고 준비된 조직을 proteinase K 효소로 20분간 반응시킨 후 세척하였고 내인성 peroxidase를 차단 후 TdT 완충액과 실온에서 30분간 반응시킨 후 TdT 효소와 TdT labeling reaction mix를 떨어뜨려 플라스틱 덮개를 덮고 37 °C에서 1시간 반 동안 반응시켰다. Stop solution으로 효소 반응을 정지시키고 TBS에 담귀 실온에서 잠시 두었다가 blocking solution을 약 10분간 반응시키고 실온에서 30분간 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 사용하여 반응시킨 후 발색제인 diaminobenzidine(DAB) solution을 도포하여 발색시키고

정상세포와 세포고사 세포의 특징과 형태를 구별하여 관찰할 수 있도록 Mayer-Hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

또 Bcl-2 발현은 위의 실험과 유사하게 조직 준비과정을 거친 후 Calbiochem사의 Bcl-2 단일클론항체를 이용하여 슬라이드에 고정된 조직에 항체를 결합시켜 Dako사의 LSAB Kit(Copenhagen, Denmark)와 AEC(acetyl ethyl carbazol)를 사용하여 면역조직화학 염색을 실행 후 정상세포와 세포고사 세포의 특징과 형태를 구별하여 관찰할 수 있도록 대조염색을 하였다. 판독과 관찰은 숙련된 병리 의사 2인에 의하여 시행되었고 TUNEL 염색인 경우는 영양막세포의 핵이 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였고 fibrin tissue등에서 갈색으로 반응을 보인 경우는 가양성으로 음성군에 포함시켰다. Bcl-2단백의 발현은 AEC에 의해 세포질에 미만성으로 혹은 세포막을 따라서 특징적으로 붉게 착색된 경우를 양성으로 판독하였다. TUNEL 방법과 Bcl-2 면역염색 모두 각 염색의 지배율 시야에서 염색이 제대로 된 곳을 골라 400배 시야에서 100개의 세포 중 10%이상인 경우를 양성으로 하였고 양성률 10-33 %를 +1, 34-66%를 2+, 67 % 이상을 3+로 분류하였다.

통계처리는 SAS system의 Fisher's Exact test를 이용하였고 p value가 0.05 미만일 경우에 통계적으로 유의성이 있다고 해석하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. TUNEL 방법에 의한 DNA fragmentation 의 관찰

DNA fragmentation이 발생한 세포의 핵은 갈색으로 발색된 양상을 보였는데 syncytiotrophoblast나 decidual cell, intermediate villi의 세포핵에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. (Fig. 1)

#### 2. Bcl-2 의 발현

Bcl-2의 발현은 AEC에 의해 세포질에 미만성으로 혹은 세포막을 따라서 특징적으로 붉게 착색된 경우를 관찰할 수 있었고 합포체 영양모세포, cytotrophoblast, decidual cell 등의 세포막 혹은 세포질 내에서 양성반응을 보였다. (Fig.2).

#### 3. 임신중독증환자와 대조군의 세포고사

임신중독증환자의 39명중 16 명, 41.0%에서 fragmented DNA가 발현되었고 나머지 23명, 59.0%에서 발현되지 않았는데 양성반응을 보였던 16예 중 약 8 명에서 국소적으로 염색되었고 1 예에서 매우 강하게 양성반응을 보였다. 대조군에서는 33명중 20 명, 60.6%에서 양성하였고 33명중 13 명, 39.4%가 음성으로 나타났다. Bcl-2는 임신중독증환자의 39명중 21 명, 53.8%에서 발현되지 않았고 나머지 18명, 46.2% 에서 Bcl-2가 발현되었다.



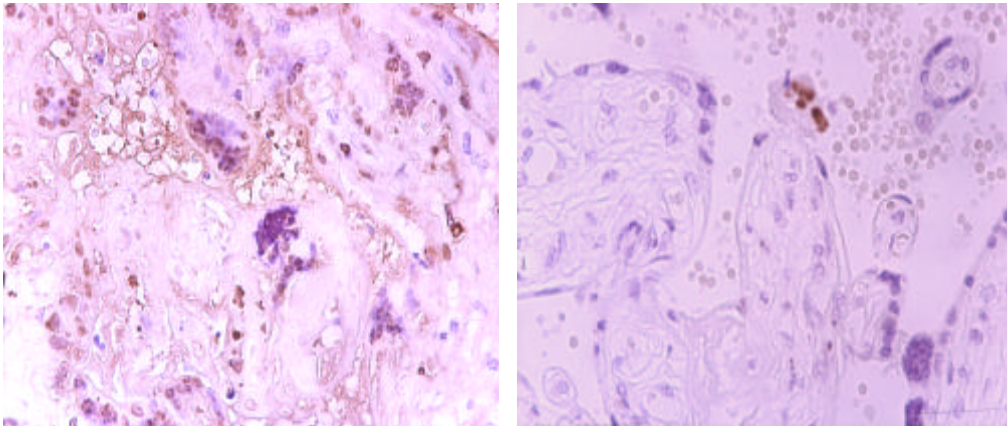


Fig. 1. Nuclear staining of trophoblasts by TUNEL method

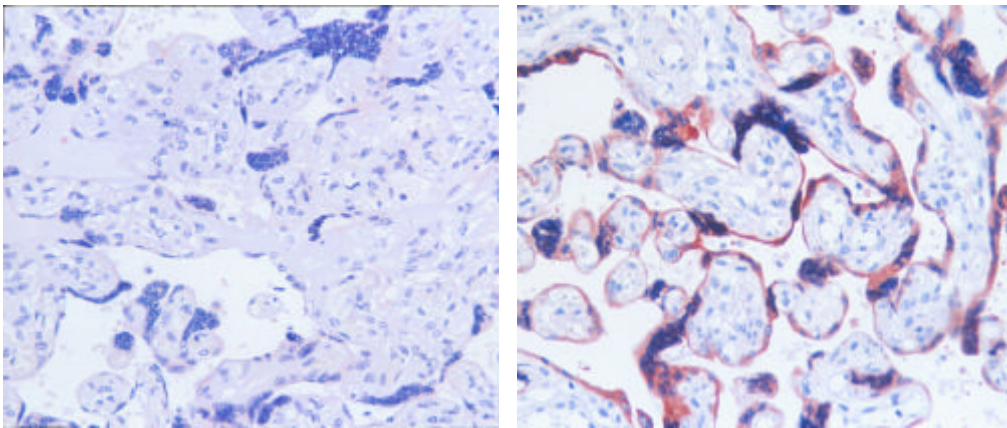


Fig. 2. Bcl-2 expression in trophoblasts by immunohistochemical staining

대조군에서는 33명중 14 명, 42.4 %에서 bcl-2 양성 반응이 나타나지 않았고 33명중 19 명, 57.4%가 양성으로 나타났는데 임신중독증의 산모에서 대조군에 비해 DNA fragmentation의 발현 비율이 더 낮았고 bcl-2 발현이 억제된 경우는 임신중독증 환자 53.8 %, 대조군에서 42.4 %로 나타나 임신중독증 환자에서 대조군에 비해 apoptotic index와 Bcl-2 단백 표현의 통계적으로 의미있는 차이를 발견할 수 없었고 강양성을 보인 경우는 DNA fragment인 경우는 임신중독증에서는 1예, 대조군에서는 3예, Bcl-2 단백 표현의 경우는 임신중독증에서는 4 예, 대조군에서는 2 예로 오히려 세포고사가 증가하고 세포고사 억제 단백질인 Bcl-2의 표현이 감소되는 경향을 보였다. (Table 2).

Table 2. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates between PIH patients and control groups

	DNA fragmentation (cases/%)				Bcl-2 expression (cases/%)			
	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
PIH patient*	23 (59.0)	8 (20.5)	7 (18.0)	1 (2.5)	21 (53.8)	8 (20.5)	6 (15.4)	4 (10.3)
Control groups	13 (39.4)	9 (27.3)	8 (24.2)	3 (9.1)	14 (42.4)	8 (24.2)	9 (27.3)	2 (6.1)

PIH : pregnancy induced hypertension

\* p-value: NS(no significance)

#### 4. 임신중독증환자에서 혈류 순환 장애 시의 세포고사

본 연구의 대상이 되었던 임신중독증환자들은 모두 산전 진찰 시 Doppler 초음파를 시행하였는데 이들은 자궁동맥의 Doppler 파형에서 notch를 보여 순환장애를 의심했던 경우와 notch를 보이지 않은 경우로 분류할 수 있었다. 두 군을 비교해 본 결과, notch가 있는 경우에는 DNA fragmentation가 19명중 10명(52.6%)에서 양성되었고 notch가 없는 경우에는 20명중 6명(30%)이 양성반응을 보여 Doppler 초음파 상에서 자궁동맥에 notch가 나타났을 때 DNA fragmentation이 많이 나타났다. Bcl-2의 발현은 notch가 있는 경우 19명중 7명(36.8%), notch가 없었던 경우 20명중 11명(55%)에서 Bcl-2가 발현되어, 순환장애를 보이지 않은 경우 Bcl-2가 많이 발현되는 경향을 보여 순환장애를 보인 경우에는 DNA fragmentation이 증가하고 Bcl-2 발현이 적어 세포고사가 촉진되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의미하지는 않았다(Table 3).

Table 3. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to Doppler findings in PIH patients

	DNA fragmentation (cases/%)				Bcl-2 expression (cases/%)			
	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
Notch(+) in Doppler*	9	6	3	1	12	3	2	2
Notch(-) in Doppler	14	2	4	0	9	5	4	2
PIH patient	23 (59.0)	8 (20.5)	7 (18.0)	1 (2.5)	21 (53.8)	8 (20.5)	6 (15.4)	4 (10.3)

\* Doppler : Doppler ultrasound

\*\* p-value : NS

## 5. 임신중독증환자에서 병리조직 검사소견에 따른 세포고사

임신중독증 환자의 병리조직 검사 상에서 합포체 결절이나 경색 소견을 보였던 경우와 특징적인 조직소견을 나타내지 않았던 태반조직에서 각각 비교해 보면 합포체 결절의 특징을 보였던 태반에서는 14명중 4명(28.6%)가 DNA fragmentation이 양성이었다는데 주로 국소적인 부분에서 양성반응을 보였고, 경색 소견을 보인 14 명중 4 명은 전반적으로 양성소견을 보였다. 특징적인 소견이 없었던 경우는 11명중 8명(72.7%)에서 양성을 보여 합포체 결절이나 경색의 특징적인 조직 소견을 보인 경우보다 그렇지 않은 경우의 임신중독증 환자군에서 DNA fragmentation이 증가되었다. Bcl-2의 발현은 합포체 결절이 있는 경우 14명중 8명(57.1%)에서 양성이었다고 경색 소견을 보인 경우는 14명중 7예(50%), 병리 조직학적인 특징을 보이지 않은 경우가 11명 중 3예(27.3%)로 가장 낮게 발현되는 양상을 보여 병리조직 검사상 임신중독증의 특징적인 소견을 보였던 경우에 DNA fragmentation이 현저하게 감소되어 있었고 Bcl-2의 발현이 증가한 것으로 나타났으나 통계적인 의의는 없었다(Table 4).

Table 4. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to pathologic findings in PIH patients

	DNA fragmentation (cases/%)				Bcl-2 expression (cases/%)			
	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
Pathology (-)	3	3	5	0	8	0	2	1
Syncytial knots(+) in Pathology	10	3	1	0	6	4	3	1
Infarct in Pathology	10	2	1	1	7	4	1	2
PIH patient	23 (59.0)	8 (20.5)	7 (18.0)	1 (2.5)	21 (53.8)	8 (20.5)	6 (15.4)	4 (10.3)

\*p-value : NS

## 6. 대조군에서 세포고사

대조군에서는 33명의 대조군 태반을 임신 주 수별로 주 수에 맞게 성숙된 태반과 그렇지 않은 태반을 구별해서 실험결과를 살펴 본 결과, 33명중 19명에서 임신주 수에 맞게 성숙된 태반의 특징을 보였는데 그 중 10명, 52.6%에서 DNA fragmentation이 증가되어 있었고 19명 중 12명, 63.2%에서 Bcl-2가 양성으로 표현되었다. 나머지 14명은 분만 당시의 주 수보다 태반이 미성숙한 상태로 나타났는데 14명중 10명, 71.4%에서 DNA fragmentation 양성반응을 보였고 Bcl-2는 14명중 7명 50%에서 발현되어 태반의 성숙에 따른 세포고사와 Bcl-2 단백 표현의 차이점을 발견할 수 없었다(Table 5).

Table 5. Comparison of apoptotic and Bcl-2 expression rates according to maturity of placenta in control patients

	DNA fragmentation (cases/%)				Bcl-2 expression (cases/%)			
	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
Mature placenta	9	7	3	0	7	5	6	1
Immature placenta	4	2	5	3	7	3	3	1
Control groups	13 (39.4)	9 (27.3)	8 (24.2)	3 (9.1)	14 (42.4)	8 (24.2)	9 (27.3)	2 (6.1)

\*p-value :NS

## IV. 고 찰

최근에는 의학분야에서 세포고사의 중요성이 널리 인식되고 활발하게 연구되기 시작했으나 처음 세포고사 현상을 기술한 것은 19세기말 chromatolysis, 즉 핵의 소멸과정이라 불렀던 것으로 난소 난포에서 condensed nuclei와 apoptotic body가 존재하는 것을 그린 Walther Flemming에 의해서였다<sup>18)</sup>. 그 후 약 90년이 지나 1972년 영국에서 Kerr등이 허혈성 간에서 피사와 선명하게 구별되는 세포의 죽음을 발견하여 세포고사 apoptosis라 명명하였다. 그 후 세포고사는 병리적인 조건뿐 만 아니라 정상조직에서도 발생함이 확인되었고 세포고사를 억제하거나 촉진시키는 물질들을 발견함으로써 세포의 죽음이 피동적인 현상이 아니라 경우에 따라서는 능동적으로 조절될 수 있는 현상이라 생각하게 되었다.

세포의 죽음은 기능적인 측면으로 피사와 programed cell death라는 두 가지로 구분할 수 있는데 피사가 유해한 환경에서 세포막 투과성의 변화 때문에 세포의 체계가 무너지는 것이라면 세포의 예정사(programed cell death)는 세포의 항상성(homeostasis)을 조절하기 위하여 사용되는 생리적인 세포사망을 의미한다. 배아 형성시기(embryogenesis)나 변태과정(metamorphosis)중에도 세포고사가 일어나는 것으로 받아들여지고 있고 최근 성인에서 조직의 remodeling이 일어날 때에도 세포고사가 일반적인 과정으로 인식되고 있다. 그러므로 세포예정사는 다른 정상세포의 활동과 마찬가지로 신호전달의 체계와 신호 수용체에 의해 조절될 수 있다. 이러한 정상적인 조절체계가 유전적, 환경적, 병리적인 요인에 의해 무너지는 경우, 심각한 임상적 문제가 발생할 수 있는데 세포고사의 과다촉진은 치매와 파킨슨씨 병과 같은 퇴행성 질환, 허혈성 손상, T 임파구의 세포고사에 의해 면역 결핍을 초래하는 후천성 면역결핍증 등을 유발할 수 있고<sup>19)</sup>

세포고사의 비정상적인 억제는 악성 종양이나 자가면역증, 만성염증반응, 지속적인 바이러스 감염 등을 유발할 수 있다<sup>20</sup>).

여성의 생식기 중 난소와 자궁내막은 거의 일생동안 지속적인 조직의 remodeling이 일어나는 역동적인 조직으로 염증반응이나 조직손상이 없이 퇴화하는 생식세포와 난포, 여성호르몬 분비에 의한 자궁내막의 성장, 분화와 탈락 등은 생리적 현상으로서 세포고사의 대표적인 예이다.

임신시 태반에서도 임신 주 수가 진행됨에 따라 구성세포의 양상이나 세포수의 변화가 일어나므로 임신의 진행에 따라 태반조직에서 세포고사가 발생할 것을 가정할 수 있는데 Yasuda(1995)등은 정상적으로 임신초기의 합포체 영양모세포나 임신 말기의 태반조직에서 세포고사를 관찰하였고 1995년 Thiet는 임신말기의 태반 용모의 핵에서 세포고사에 의한 DNA nuclear breakdown의 양성반응을 보여줌으로써 임신말기의 태반에서의 세포고사가 정상적인 과정이라는 가설을 지지해주는 연구결과를 보고하였다.

임신중독증은 아직 그 병태생리적 기전이 충분히 밝혀진 것은 아니지만 비정상적인 태반의 착상과정과 혈관내피 세포의 민감도 변화 등과 같은 여러 가지 원인에 의해서 태반으로의 혈류 장애가 발생하여 태반 혈류의 저산소 상태, 태아의 발육제한상태 발생 등을 유발한다는 것을 고려할 때 정상임신과 구별되는 세포사의 특징을 나타낼 것이라 생각되었고 임신중독증 태반과 정상태반의 세포고사 발현양상을 관찰함으로써 임신중독증의 병태생리를 이해하는데 도움이 될 것을 기대하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 임신중독증 환자의 태반에서 DNA fragmentation 방법을 이용하여 세포고사의 양상을 조사하였고 세포고사에 직접적인 연관이 있는 Bcl-2 단백질의 표현 양상을 정상 대조군과 비교 분석하였다.

TUNEL 방법으로 DNA fragmentation을 관찰하여 정상적인 태반과 임신중독증 환자의 태반에서 세포고사를 관찰하였는데 TUNEL에 의한 DNA

fragmentation의 in situ 확인은 세포고사를 보증하는 표지로 널리 사용되거나 임신 주 수에 따라 hydropic degeneration이 일어나는 chorionic villi 등에서도 양성으로 표현되는 기술적인 문제가 있어 TUNEL방법만으로 임신중독증 태반에서 세포고사를 논하는 것은 문제가 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 이를 보완하기 위하여 1985년에 전암유전자로 발견되어 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치하고 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 것으로 알려진 Bcl-2의 표현을 면역조직화학염색을 통해 분석함으로써 동일한 연구대상에서 세포고사의 또 다른 측면을 살펴보기로 하였다.

임신중독증의 산모는 41%에서 DNA fragmentation 양성으로 나타나 대조군 60.6 %에 비해 감소되었고 Bcl-2는 임신중독증에서 53.8%. 대조군에서 42.4%가 음성으로 나타났다. Bcl-2 단백질은 세포고사를 억제하는 역할을 하므로 세포고사가 많은 경우 DNA fragmentation은 증가하고 Bcl-2는 억제되는 양상을 보여야 하는데 전체적인 임신중독증환자와 대조군간의 DNA fragmentation과 Bcl-2 단백질의 표현양상은 상반된 결과를 보여 결과 분석이 어려웠다. 그러나 임신중독증 환자에서 산전초음파검사의 notch 유무와 병리조직학적인 소견에 따라 분류하여 살펴보면 특정한 세포고사의 경향을 보여 주었다. Doppler 초음파 상에서 notch를 보여 순환장애를 의심했던 경우와 그렇지 않은 경우를 각각 비교해 보았는데 notch가 있었던 경우에는 52.6%에서 DNA fragmentation이 양성으로 나타났고 notch가 없는 경우는 30%에서 양성반응을 보였으며 Bcl-2의 발현은 각각 36.8%와 55%에서 나타나 순환장애를 보인 경우 세포고사가 촉진되는 경향을 보였다.

임신중독증 환자의 병리조직 검사 상에서 합포체 결절과 경색 소견을 보였던 경우와 특징적인 소견을 나타내지 않았던 태반조직에서 각각 비교



해 보면 병리조직 검사 상에서 특징적인 소견이 없었던 임신중독증 환자군에서 72.7%에서 DNA fragmentation이 증가되어 나타났고 병리학적으로 합포체 결절이나 조직 경색을 보인 경우는 각각 28.6%이었고 Bcl-2의 발현은 합포체 결절이 있는 경우나 경색소견을 보인 경우가 57.1%, 50%이었으며 병리조직상 특징을 보이지 않은 경우에 27.3%로 더 낮게 발현되는 양상을 보여 특징적인 병리 조직소견을 보이지 않은 임신중독증 태반에서 세포고사의 증가 경향을 보였다.

이상의 연구 결과는 DNA fragmentation의 관찰과 Bcl-2의 발현의 분석으로는 임신중독증 태반에서 대조군과 비교하여 세포고사가 증가된다거나 또는 감소한다고 단순하게 설명할 수 없음을 보여주었다.

임신중독증의 태반은 혈류 장애에 의한 저산소 상태로 세포고사가 촉진될 수도 있지만 혈류 장애에 대한 보상작용으로 오히려 합포체 결절과 같은 세포증식을 유발할 수도 있으므로 합포체 결절을 보인 임신중독증 태반에서 DNA fragmentation이 억제되고 bcl-2의 발현이 증가되었던 점으로 볼 때, 임신중독증환자에서 혈류 장애는 보상작용으로 오히려 세포고사가 억제되고 세포증식이 유발될 수도 있음을 보여주고 있다고 할 수 있다.

그러나 Doppler 초음파 상에 순환장애를 보인 경우는 DNA fragmentation이 많이 나타나고 Bcl-2의 발현은 전체 임신중독증 환자에서보다 적었던 점으로 자궁동맥의 혈류 부전은 세포고사를 촉진한다고 할 수 있었다. 그러나 태반의 조직 병리 소견과 함께 고려하면 자궁동맥의 혈류 부전을 보인 19 예의 임신중독증 태반에서 각각의 병리소견을 보면 정상적인 형태가 5예, 경색의 특징을 보인 경우가 8예, 합포체 결절을 보인 6 예의 다양한 소견을 나타내고 있어 Doppler 초음파 상에 순환장애가 있음을 산전에 관찰한 경우에도 분만 당시에는 혈류 장애에 대한 보상반응을 나타내는 경우도 있으므로 임신 전과정에서 세포고사가 촉진된다고 말하기는 어렵다.

처음에는 임신중독증의 태반에서는 여러 가지 기전에 의한 자궁내의 stress가 세포고사를 촉진할 것이라고 가설을 세우고 이를 증명하기 위해 연구를 시작했으나 연구가 진행됨에 따라 오히려 대조군보다 세포고사가 억제되어 마치 stress에 대한 보상작용이 정상적인 태반의 노화과정에서 유발되는 세포고사를 억제하는 방향으로 작용하는 것 같은 결과를 보였다.

태반 조직에서의 임신중독증에 대한 연구는 아니지만 임신중독증과 정상임신에서 모체내의 중성구의 세포고사에 대한 연구<sup>21)</sup>에서 보면 정상임신보다 임신중독증 산모의 중성구의 세포고사가 억제된다고 하였고 세포고사 신호로 알려진 Fas 수용체발현과 임신중독증에 대한 연구<sup>22)</sup>에서 임신중독증 태반에서 유의미하게 Fas 수용체 발현이 감소되었다는 결과는 본 연구의 결과와 유사하며 임신중독증의 병태생리가 매우 복잡하고 아직도 완전히 밝혀지지 않은 상태에서 간단히 세포고사가 억제된다거나 증가된다고 단순한 결론을 내리기가 어렵다. 단지 본 연구에서는 임신중독증에서 DNA fragmentation이나 Bcl-2 발현양상을 관찰함으로써 임신중독증환자에서 세포고사가 억제되는 경향이나 증가되는 양상, 어느 한쪽으로의 결론을 기대했으나 임신중독증의 진행과정에 따라 세포고사가 진행될 수 있고 또 보상기전에 의해 오히려 세포고사가 억제되는 경우도 나타날 수 있다는 결과를 얻었고 이에 대해서 좀 더 연구가 필요하다고 생각되었다.

33명의 대조군 태반을 임신 주 수별로 주 수에 맞게 성숙된 태반과 그렇지 않은 태반을 구별해서 실험한 결과는 임신 주 수에 맞게 성숙된 태반에서는 DNA fragmentation은 52.6%, 미성숙 태반에서는 71.4%에서 양성 반응을 보였고 Bcl-2는 주 수에 맞게 성숙한 태반의 경우 63.2%와 미성숙 태반에서 50%로 임신 주 수에 맞게 성숙된 태반과 미성숙상태의 태반에서 특징적인 세포고사의 경향을 나타내지 않았다. 임신 말기에는 태반의 노화과정과 관련하여 세포고사가 증가한다는 몇몇의 보고가 있었고<sup>23)</sup> 태반의

성장과 노화, 분만시기에 이르러 자궁으로부터 떨어져 나가는 과정 모두가 세포고사와 관련된다고 하였다<sup>24)</sup>. 그래서 본 연구에서는 임신중기부터 말기까지의 각 주 수별로 태반들을 수집하여 병리조직검사를 시행하였고 각 주 수에 맞게 성숙된 정도에 따라 세포고사의 특징적인 경향이 나타날 것을 기대했다. 그러나 이번 연구 결과에서는 대조군에서 태반의 성숙과정에 미치는 세포고사의 영향을 파악하기 어려웠다.

그러므로 본 연구는 아직 초기의 실험적 문제제기 수준에서 이후의 연구방향을 제시하는 것에 의의가 있다고 생각되며 다각적으로 임신중독증환자에서 세포고사의 양상을 살펴보고 정상임신에 비해 임신중독증환자에서 세포고사의 발현양상이 어떻게 다른지 좀 더 많은 환자를 확보하여 여러 경우에서 비교 분석하는 것이 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

임신중독증 태반에서 세포고사의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 임신중독증의 산모에서 대조군에 비해 DNA fragmentation의 발현 비율이 더 낮았고 bcl-2 발현은 대조군에서 임신중독증 환자보다 대조군에서 억제되어 나타나 임신중독증 환자에서 세포고사의 경향을 파악하기가 어려웠다.

둘째, 자궁동맥 혈류 파형에서 notch를 보여 순환장애를 의심했던 경우의 환자 군과 그렇지 않은 경우를 각각 비교해 보았는데 순환장애를 보인 경우(notch가 있는 경우)에는 DNA fragmentation이 많이 나타났고 Bcl-2의 발현이 적어 세포고사가 촉진되는 경향을 보였다.

셋째, 임신중독증 환자의 병리조직 검사 상에서 syncytial knots와 infarct 을 보였던 경우와 특징적인 소견을 나타내지 않았던 태반조직에서 각각 비교해 보면 병리조직 검사상 임신중독증의 특징적인 소견을 보였던 경우에 DNA fragmentation이 현저하게 감소되어 있었고 Bcl-2의 발현이 증가한 것으로 나타나 세포고사가 억제되는 경향을 보였고 병리조직 검사 상에서 특징적인 소견이 없었던 임신중독증 환자 군에서 세포고사가 증가되는 경향을 보였다.

넷째, 대조군에서 임신 주 수별로 주 수에 맞게 성숙된 태반과 그렇지 않은 태반을 구별해서 관찰하였는데 대조군 태반에서 주 수에 맞게 성숙한 태반과 주 수에 비해 미성숙한 태반의 경우, 특징적인 세포고사의 경향을 보이지 않았고 세포고사에 의한 태반의 성숙과정에 미치는 영향을 찾기 어려웠다.

본 연구의 결과로 볼 때 임신중독증의 병태생리가 매우 복잡하고 아직도 완전히 밝혀지지 않은 상태에서 세포고사가 억제되거나 증가된다고 단순한 결론을 내리기가 어렵다. 본 연구에서는 임신중독증에서 DNA fragmentation이나 Bcl-2 발현양상을 관찰함으로써 임신중독증환자에서 세포고사가 억제되는 경향이나 증가되는 양상, 어느 한쪽으로의 결론을 기대했으나 임신중독증의 진행과정에 따라 세포고사가 진행될 수 있고 또 보상 기전에 의해 오히려 세포고사가 억제되는 경우도 나타날 수 있다는 결과를 얻었고 이에 대해서 좀 더 연구가 필요하다고 생각되었다.

## VI. 참고 문헌

1. Menkes B, Deleanu M, Ilies A, COmparative study of some areas of physiologiccal necrosis at the embryo of man. some laboratory-mammalians and fowl. Rev Rou Embryol Cytol 1965;S2:161-171
2. Kerr JFR, A histochemical study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. J pPathol Bacteriol 1965;90: 419-435
3. Kerr JFR, Wyllie AH, Curri AR, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57
4. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis : The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews 1993;14:133
5. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV, Apoptosis; It's significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994: 73(6): 2013-26
6. Sheets E, Yej J, The role of apoptosis in Gynecologic malignancies, Ann Med 1997;29:121-126
7. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneba H, Adouin J, Decroix Y, et al., Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. Am J Pthol 1994;144:1195-1202
8. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sesibar A, Park-Sarge OK, et al., Apoptosis in decidual tissue regression and Reorganization. Endocrinol 1994;135 : 1272-1279
9. Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, kenjo T, Tsutsumi Y, Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. Arch Histol Cytol 1995;58:185-90

10. Thiet MP, Suwanvanichkij V, Kwork C, et al., DNA laddering consistent with programmed cell death is a normal finding in human placentas. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:S272
11. Pratola D, Wilkin P, The Placenta, Umbilical cord, and Amniotic sac. *Pathology in Gynecology and Obstetrics* 1984, 500-503
12. Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of Apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 327-332
13. Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in- situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992.
14. Gold R, Shemied M, Giegerich G, Greitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, et al., Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation technique. *Lab Invest* 1994;71(2): 219-225
15. Vaux DL, Cory S, and Adams J, Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cell. *Nature* 1988;335: 440-442
16. Fulop V, Mok SC, Genest DR, Szigetvari I, Cseh I, Berkowitz RS, c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 Oncoproteins. *J Repro Med* 1998; 43(2) : 101-109
17. Lea RG, Al-Sharekh N, Tulppala M, and Critchly HOD, The immunolocalization of bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies. *Hum Reprod* 1997;12:153-8
18. Cohen JJ, Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today* 1993;14: 126-130
19. Arends MJ, Wyllie AH, Apoptosis: Mechanisms and rules in pathology. *Int rev Experiment Pathol* 1991; 32:223-254

20. Orrenius S. Apoptosis : molecular mechanisms and implications for human disease. *J Intern Med* 1995;237:529-536
21. von Dadelszen P, Watson RWG, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, and Farine D, Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(2):408-414
22. Hsu CD, Gutierrez LS, Meaddough E, Basheera H, and Lu LC, Copel JA, Harirah H, Expression of ligand by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S43
23. Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* 1996;17:387-91
24. Smith SC, MB, ChB, Baker PN, DM, and Symonds EM, Placental apoptosis in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:57-65



## **Abstract**

### **The Apoptosis in placenta of pregnancy-induced hypertension**

**Yeun-Hae Lee**

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Yong-Won Park)

The process of natural cell death can be classified as necrosis or apoptosis. As the molecular biology continues to be developed, several genes and their roles in apoptosis has been identified and attempts have been made to determine that apoptosis is involved in the development and progression of numerous degenerative diseases, growth and treatment of neoplasm, and organogenesis and regression of normal tissues. In the field of obstetrics and gynecology, there are some reports that apoptosis occurs during regression of follicles after ovulation and in the endometrium based on the menstrual cycle. Recently studies have reported that apoptosis was involved in placental aging process after implantation and parturition. Because the pathogenesis of toxemia might be caused by abnormal implantation and uteroplacental insufficiency and intrauterine growth restriction, we hypothesize that apoptosis in toxemia is quite frequently compared to

normal pregnancy.

This study has been carried out with 39 patients who had severely induced hypertension during pregnancy and who eventually delivered from 23 to 40 gestational weeks, in addition to 33 cases who delivered after 20 weeks and had no pathologic findings of placenta. We compared the DNA fragmentation and expression of Bcl-2 protein in the placentas of toxemia and normotensive patients using a DNA fragmentation detection kit and Bcl-2 monoclonal antibodies.

The results showed that first of all, DNA fragmentation in the pregnancy- induced hypertension patients were less than control group and Bcl-2 expression were greater than control group. Second, it showed that more DNA fragmentation and less Bcl-2 expression were observed with the notch of Doppler ultrasound, then we discovered that the apoptosis was accelerated with uteroplacental insufficiency. Third, DNA fragmentation was less than in the group of pregnancy-induced hypertension patients with syncytial knots and infarct and Bcl-2 was more evident in similar groups comparing with no pathologic pregnancy-induced hypertension patients' characteristics. Forth, no significant difference in DNA fragmentation and Bcl-2 expression was observed in the mature placentas as compared with the immature placentas in control group according to gestational weeks.

From the results of this study, we found that it was difficult to clearly determine placental apoptosis in the pathology of pregnancy-induced hypertension, although both progress and restraint of momentary apoptosis might be found according to the process of pregnancy-induced hypertension

with DNA fragmentation and Bcl-2 expression by immunohistochemistry. This means that further studies on this subject is necessary.

---

**Key words** : Apoptosis, DNA fragmentation, Bcl-2, pregnancy-induced hypertension