

# GENE EXPRESSION OF *HEME OXYGENASE-1* AND *NITRIC OXIDE SYNTHASE* ON TROPHOBLAST OF PREECLAMPSIA

Song Kwon Choi, MD, Jong Yun Hwang, MD, Jiyeon Lee, MD, Sung Hun Na, MD, Joong Gyu Ha, MD, Hyang Ah Lee, MD, Dong Hun Lee, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Kangwon National University School of Medicine, Chuncheon, Korea

## Objective

The aim of this study was to evaluate the gene expression of *heme oxygenase-1* (HO-1), inducible *nitric oxide synthase* (iNOS) and endothelial *nitric oxide synthase* (eNOS) in placenta of preeclampsia.

## Methods

Placenta were obtained from women with normal pregnancies (n=15) and severe preeclamptic (n=15) after informed consent and under the approval of IRB of Kangwon National University Hospital. The severe preeclampsia was diagnosed as high blood pressure and proteinuria. High blood pressure was defined as systolic blood pressure of >160 mm Hg or diastolic pressure of >110 mm Hg and proteinuria was defined as urine protein of >2 g/24 hr. We investigated mRNA expression of HO-1, iNOS and eNOS in both groups by real time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. The Student's *t*-test was used for statistical analysis with SPSS ver. 12.0.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

There were no significant differences in maternal age ( $P=1.181$ ) and gestational age ( $P=0.30$ ) between the two groups. Fetal birth weight from women with preeclampsia was significantly lower than that from normal pregnant women ( $P=0.002$ ).

We detected differences in mRNA expression of placenta between both groups. Expression of HO-1 was decreased in placenta of preeclamptic pregnancies compared to that from normal. However, expression of iNOS and eNOS was higher in preeclamptic group compared to normal.

## Conclusion

We suggest that preeclampsia is associated with a decreased expression of HO-1 and increased expressions of iNOS and eNOS in placenta.

**Keywords:** Preeclampsia; Cytotrophoblast; *Heme oxygenase-1*

자간전증은 임신 20주 이후에 혈압이 140/90 mm Hg 이상으로 상승하고 24시간 소변에서 300 mg 이상의 단백뇨가 있을 때 진단되는 질환으로 모성 사망률의 중요 원인이다[1]. 자간전증은 모성 이환율뿐만 아니라 자간전증을 치료하기 위해 시행하는 인위적인 조기분만은 신생아 이환율과 사망률을 높이는 중요한 요인 중의 하나이기에 주산의학분야에서 자간전증을 예방하고 치료하기 위한 많은 연구가 있어 왔다.

자간전증의 원인은 여러 가지 요소들이 서로 상호 작용을 하며 발생한다고 보고되지만 아직까지 정확한 단일 원인을 규명하지는 못하였다. 지금까지 가장 널리 받아들여지는 원인은 임신초기에 생리적으로 발생하는 나선동맥의 혈관재형성과정에 장애가 있을 때 자간전증이 발생한다는 것이다.

나선동맥은 임신 이전에는 직경 120  $\mu$ m 이하로 자궁내막에만 존재

Received: 2011. 5.13. Accepted: 2011. 6.13.

Corresponding author: Jong Yun Hwang, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Kangwon National University School of Medicine, 17-1 Hyoja 3-dong, Chuncheon 200-722, Korea

Tel: +82-33-258-2307 Fax: +82-33-257-4636

E-mail: rapidhwang@kangwon.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

한다. 임신 기간에는 많은 양의 모체의 혈류가 태반에 전달될 수 있도록 혈관의 변형이 발생하여 직경이 500–1,000  $\mu\text{m}$ 로 증가한다. 단순히 동맥의 직경의 증가뿐만 아니라 형태학적 변화도 있는데 동맥의 정상구조인 내피세포, 평활근층, 장막층 구조가 세포영양막세포(cytotrophoblast)에 의해서 평활근층이 파괴되고 결합조직으로 대체된다. 이러한 나선동맥 재형성(spiral artery remodeling)은 임신 12–13주 사이에 왕성하게 발생하고 이 과정에 장애가 발생하여 임신 기간 중에도 임신 이전의 나선동맥의 크기, 구조와 조직학적 성격을 지니고 있는 경우에는 자간전증이 발생한다.

나선동맥재형성에 관여하는 중요한 세포는 세포영양막세포이다. 세포영양막세포는 임신초기에는 저산소증에 의해서 증식(proliferation)하고 자궁내의 탈락막을 이동(migration)하여 나선동맥에 도달해서는 분화(differentiation)한 후 나선동맥을 침범하고 나선동맥 재형성을 한다[2].

세포영양막세포가 증식하고 이동하며 증식하는 과정은 많은 혈관형성인자들이 관여한다. 대표적인 혈관형성인자인 산화질소(nitric oxide)는 *nitric oxide synthase* (NOS)에 의해서 L-arginine으로부터 생성된다. 산화질소는 강력한 혈관 확장물질로서 임신 시에 산화질소는 태아-태반 관류에서 혈압을 낮게 유지하는 데 필요하다[3]. 자간전증 환자에서 NOS가 감소하여 산화질소의 생성이 감소할 거라고 예측하였지만[4] 다른 연구에서는 보상기전에 의해서 산화질소는 오히려 증가하고[5] 증가한 산화질소는 활성화되지 않는다고 보고하였다[6].

이러한 보고들은 산화질소의 부족이 자간전증의 원인일 거라고 생각했던 많은 가설들과는 다른 결과여서 산화질소가 자간전증에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구의 필요가 요구된다.

Heme oxygenase (HO)는 헤모를 산화하여 일산화탄소(carbon monoxide), 철과 빌리버딘(biliverdin)을 형성하게 하는 분해 효소로 3가지 아형이 존재한다[7]. 최근 연구에 의하면 HO는 강력한 항염증작용과 항산화 작용이 있으며 혈관의 틀을 유지하고 혈관내피세포의 세포사반응을 억제한다. 또한 혈관신생과 혈관형성에 중요한 역할을 수행한다[8].

HO는 태반형성에도 영향을 주는데 McCaig에 따르면 인간의 태반에서 추출한 세포영양막세포에 HO억제제인 Zn PP-9를 투여했을 때 세포의 이동이 현저히 감소함을 보고하였다. 이러한 결과는 HO가 세포영양막세포의 이동을 촉진하여 태반을 형성하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침하였다[9].

조직에 항시 존재하는 HO-2아형과 달리 저산소증이나 염증에 반응해서 유도되는 HO-1아형은 특히 항산화 작용이 강력하여 임신합병증을 예방하는 데 중요하다는 보고가 있다. HO-1과 태반의 발달을 알아보는 생쥐 실험에서는 HO-1이 부족한 경우 모체의 이완기 혈압이 증가하고 혈장내의 sFt-1이 증가한다고 하였다[10].

이러한 결과들은 HO가 태반형성에 중요한 역할을 수행하는 증거이지만 아직까지 HO-1이 태반에 미치는 영향에 대해서 인간의 태반을 대상으로 한 연구는 없었기에 본 연구에서는 자간전증 태반에서 HO-1, iNOS와 eNOS의 발현을 확인하여 HO-1이 자간전증에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

2008년 10월부터 2009년 8월까지 강원대학교병원 산부인과를 방문하여 산전진찰을 받고 분만한 중증 자간전증 임신부 15명과 정상 혈압을 가진 임신부 15명에서 획득한 태반과 영양막 세포를 대상으로 하였다. 실험 대상군인 중증 자간전증은 안정 시 4시간 간격으로 두 번 측정된 수축기 혈압이 160 mm Hg 이상이거나 이완기혈압이 110 mm Hg 이상인 고혈압과 24시간 소변에서 단백뇨가 2 g 이상인 경우로 정의하였다.

대조군은 본 연구에 동의한 정상 임신부에서 실험군의 임신 주수와 모체의 나이를 고려하여 선정하였고 자간전증군과 정상 대조군에서 임신부가 쌍태아, 당뇨병, 혈관질환과 같은 내과적 질환이 진단된 경우는 제외하였다.

본 연구는 강원대학교병원 임상시험심사위원회의 심사를 받은 후 연구대상군 모두에게 사전에 충분한 설명을 하였고 연구에 대한 동의서를 작성한 경우에 한하여 연구를 진행하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 태반 채취

분만 직후娩출된 태반을 5분 이내에 소독된 마른 수건으로 태반에 부착된 혈관을 제거하였다. 태반을 4°C 이하의 찬 생리 식염수에 세척한 후 소독된 가위로 태반의 모체 쪽 조직을 1×1 cm 크기로 2개를 절단하여 하나의 조직은 포르말린에 고정하고 파라핀 블록을 만들어서 보관하였고 다른 하나의 조직은 실시간 중합효소연쇄반응 실험을 하기 전까지 -70°C 저온 냉동고에 보관하였다.

#### 2) 실시간 중합효소연쇄반응

영하 70°C에 동결해 두었던 조직을 파쇄하여 Trizol 용액을 이용하여 RNA를 추출하고, 추출된 총 RNA의 농도를 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 측정하였으며, 2% 아가로스겔에서 RNA의 상태를 확인하였다. 총 RNA 중 1  $\mu\text{g}$ 을 transcript first strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Primer는 Primer3 software를 사용하여 genomic DNA가 증폭되는 것을 피하기 위해 하나의 intron을 span하는 것으로 고안하였다. Primer sequence는 Table 1과 같다.

실시간 역전사 중합효소연쇄반응은 SYBRgreen I 형광표지자를 이용하여 ABI Prism 7900 HT system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 정량화하였다. 역전사 중합효소연쇄반응의 반응조건은 95°C에서 30초간 denaturation 후 annealing 및 extension을 60°C와 72°C에서 각각 30초간 40 cycle을 시행하였으며, 최종 PCR 산물은 2% 아가로스겔로 확인하였다. 동일 실험을 3회 반복하였으며, GAPDH mRNA 발현을 기준으로 하여 relative standard curve 방법으로 발현량의 상대치를 측정하였다.

### 3) 면역조직화학염색법

면역조직화학염색을 위해서 파라핀 블록을 1  $\mu\text{m}$  두께로 절단하여 60°C에서 파라핀을 녹인 후 건조 오븐에서 15분간 노출하여 슬라이드에 고정시켰다. 면역조직화학염색에 사용한 HO-1 (Abcam Co., Cambridge, UK)은 토끼의 다 클론 항체였다. 실시방법을 간략히 기술해 보면 조직을 탈파라핀화를 시키기 위해서 xylene으로 5분간 3회 노출시킨 후 100%, 90%, 및 75% ethanol에서 각각 3분간 흡수 과정을 거쳤다.

조직 항원의 검출을 민감하게 하기 위해 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 수세하였고, 내인성 과산화 효소의 역제를 위해 내인성 고산화 효소 차단액에 8분간 담가두었다. 이후 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 차단하기 위해서 goat차단 혈청으로 전처치하였고 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 1차 항체로 HO-1을 1:100으로 희석하여 사용하였고 2차 항체는 토끼의 다클론 항체(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. Streptavidin biotinylated peroxidase와 반응시킨 후, diaminobenzidine으로 발색하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 실시하고 염색 정도를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

### 4) 통계학적 분석

통계 분석은 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 실시했다. 실험군과 대조군의 두 개의 집단에서 나오는 연속변수데이터의 비교를 위해 Student *t*-test를 적용하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 임상적 특징

양군 간의 일반적 특징을 비교하여 보면 연구 대조군을 설정할 당시 자간전증군과 산모의 나이 임신주수를 고려하였기 때문에 분만 당시 임신부의 나이와 분만 당시의 임신 주수는 양군에서 통계학적 유의성이 없었다( $33.33 \pm 4.59$  years vs.  $31.40 \pm 2.95$  years,  $P=1.181$ ,  $36.80 \pm 1.79$  weeks vs.  $37.38 \pm 1.14$  weeks,  $P=0.30$ ). 출생 체중은 자간전증군에서 정상군보다 통계학적으로 유의하게 작았다( $2.55 \pm 0.40$  g vs.  $2.97 \pm 0.25$  g,  $P=0.002$ ) (Table 2).

### 2. 실기간 중합효소연쇄반응의 결과

3회 실시한 실기간 중합효소연쇄반응의 결과 HO-1의 경우 정상군에 비해서 자간전증군에서 통계학적으로 유의하게 낮게 발현되었다. iNOS와 eNOS의 경우에는 정상군에 비해서 자간전증군에서 통계학적으로 유의하게 높게 발현되었다(Fig. 1).

### 3. 면역화학조직염색법의 결과

자간전증 임신부의 태반을 대상으로 한 면역조직화학 실험에서 합포 영양막세포와 세포영양막세포는 HO-1 염색이 없었지만 융모의 간질세포에서는 일부 염색되었다(Fig. 2).

## 고 찰

임신 20주 이후에 발생하는 고혈압과 단백뇨를 특징으로 하는 자간전

**Table 1.** Primers sequence for real time polymerase chain reaction

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
HO-1	CACAGGCAGAGAATGCTGAG	GCTTCACATAGCGCTGCA
iNOS	TCATCCGCTATACTGGCTAC	GGATTTCGAAGAGCTCAGGG
eNOS	GCACGAGGAACCTGTGTGAC	TTGTCTTCCACAGGGACGA

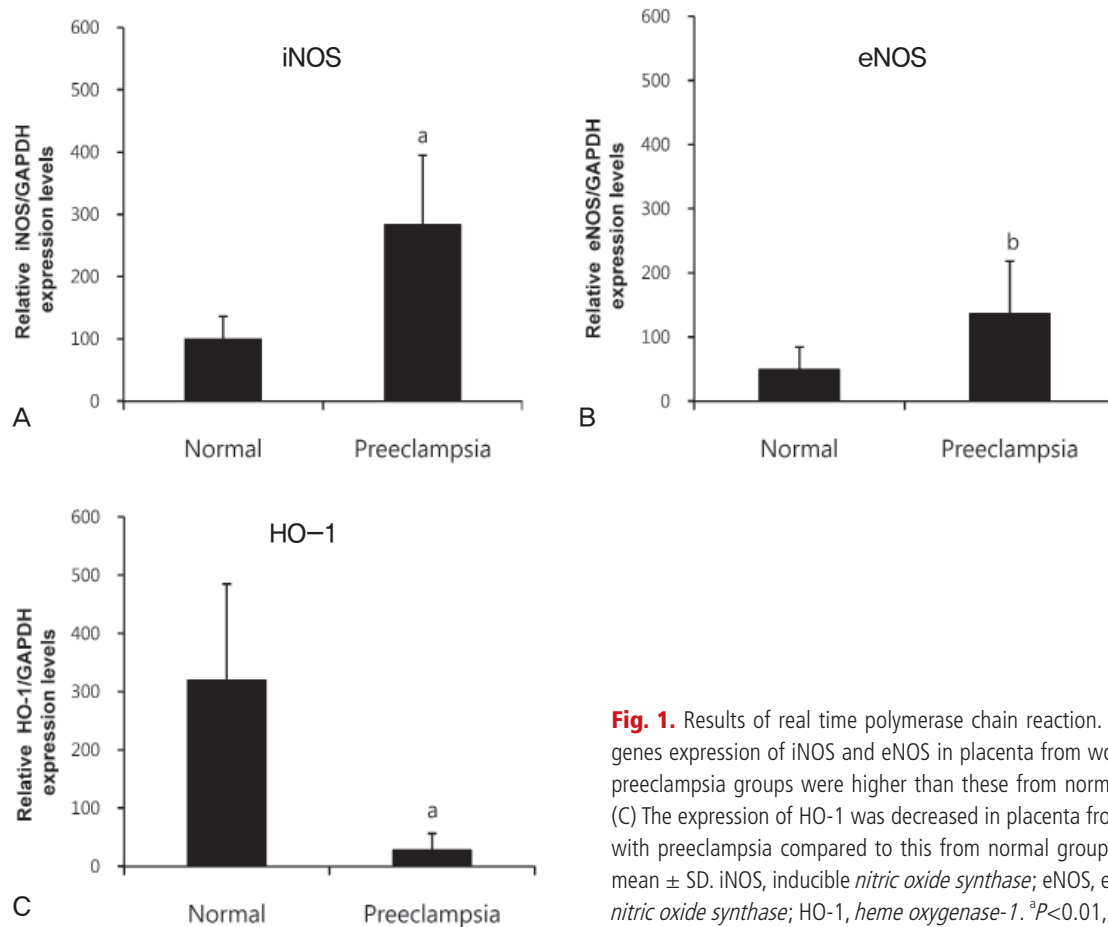
HO-1, *heme oxygenase-1*; iNOS, inducible *nitric oxide synthase*; eNOS, endothelial *nitric oxide synthase*.

**Table 2.** Clinical characteristic in both groups

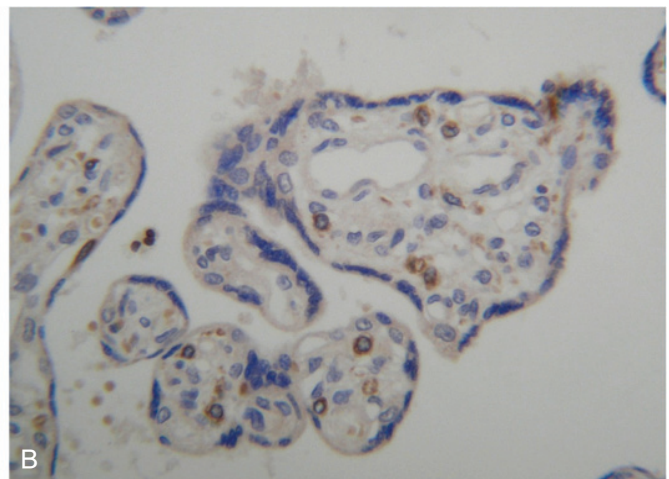
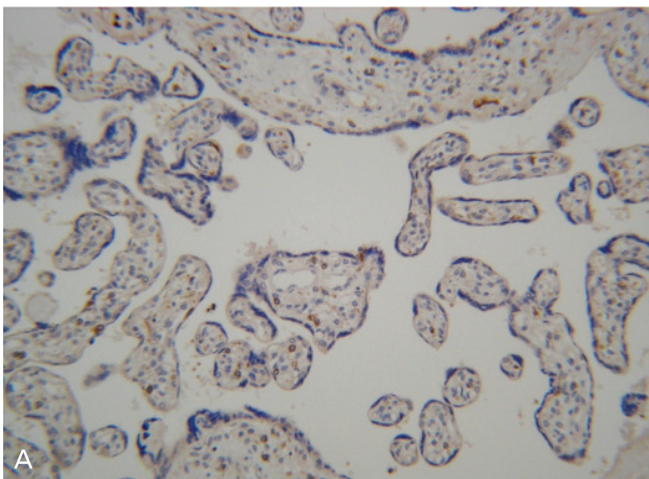
	Normal (n=15)	Preeclampsia (n=15)	P-value
Maternal age (yr)	$31.40 \pm 2.95$	$33.33 \pm 4.59$	1.181
Gestational age at delivery (wk)	$37.38 \pm 1.14$	$36.80 \pm 1.79$	0.30
Fetal birth weight (kg)	$2.97 \pm 0.25$	$2.55 \pm 0.40$	0.002
Systolic blood pressure (mm Hg)	$128.5 \pm 8.1$	$168.2 \pm 4.1$	0.003
Diastolic blood pressure (mm Hg)	$82.3 \pm 1.3$	$118.3 \pm 3.2$	0.005
24 hr urine protein (mg)		2334.5	

Value are shown as mean $\pm$ SD.

Student *t*-test.



**Fig. 1.** Results of real time polymerase chain reaction. (A, B) The genes expression of iNOS and eNOS in placenta from women with preeclampsia groups were higher than these from normal groups. (C) The expression of HO-1 was decreased in placenta from women with preeclampsia compared to this from normal group. Data are mean  $\pm$  SD. iNOS, inducible *nitric oxide synthase*; eNOS, endothelial *nitric oxide synthase*; HO-1, *heme oxygenase-1*. <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ .



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining for *heme oxygenase-1* (HO-1) in placenta of women with preeclampsia. There is no signal of HO-1 in syncytiotrophoblast and cytotrophoblast, however some signal of that is in villous stromal cell (A)  $\times 40$ , (B)  $\times 200$ .

증은 전체 경산모 임신의 3-10%를 차지하는 질환이다[1]. 자간전증은 모성사망률과 신생아 이환율의 주요 원인이기에 많은 연구자들은 자간전증의 원인과 치료를 위해 노력하지만 아직까지 단일화된 원인과 치료

가 제시되고 있지는 않다.

지금까지 알려진 자전증의 원인은 4가지로 제시되고 있다. 가장 많은 연구자들이 주장하고 있는 원인은 초기 태반형성과정에서 세포영양막



세포의 불완전한 침습으로 인한 나선동맥재형성의 실패이다[11]. 두 번째 원인은 태아, 모체, 부채와 태반 간에 면역학적 순응에 장애가 발생한 경우이다. Hayashi 등[12]에 의하면 정상 임신에서는 helper T1 cell과 T2 cell이 균형 있게 존재하여 배아의 착상을 도와야 하는데 자간전증 산모에 있어서는 helper T1 cell이 부족하다는 연구결과를 보고하면서 면역학적 장애를 자간전증의 원인으로 제시하였다[13]. 세 번째 원인은 정상 임신과정에서 발생하는 염증반응이나 심혈관계의 반응에 모체가 적응하지 못할 때 발생한다[12]. 마지막으로 유전학적 소인이 있는 경우에 발생한다[14].

나선동맥은 자궁근층에 있는 요골동맥(radial artery)으로부터 기원하는 동맥으로 자궁내막에만 존재한다. 이 혈관은 호르몬과 혈관수축물질에 의해서 조절되기에 정상 생리기간에는 탈락되어서 생리혈과 같이 몸 밖으로 배출된다. 하지만 임신이 되면 기저 탈락막 아래의 나선동맥은 호르몬과 혈관수축물질에 반응하지 않는 혈관으로 변화되어서 지속적이고 안정적으로 태반에 혈액을 공급한다. 이러한 나선동맥의 재형성에는 세포영양막세포가 중요한 역할을 담당한다[15].

정상적인 세포영양막세포는 수정 6일째에 발생하는 trophoblast로부터 기원하고 태반형성에 중요한 두 가지 역할을 수행한다. 첫 번째는 태반의 용모를 형성하여 분지하면서 태반의 크기를 키우고 용모를 1단계, 2단계, 3단계의 용모로 성숙시킨다. 이러한 과정 중에 용모내부의 혈관이 형성되면서 태반과 태아가 순환되는 시스템이 완성된다. 두 번째는 자궁의 탈락막을 침습하여 자궁내막 기질세포를 용해하고 나선동맥재형성에 관여한다. 정상적인 세포영양막세포의 증식, 분화에 장애가 발생할 때는 자간전증과 같은 임신 합병증이 발생한다[16].

세포영양막세포의 증식과 분화에는 많은 인자들이 관여하고 산화질소도 그중 하나이다. 산화질소는 강력한 혈관확장물질로 임신초기 태반에도 중요한 영향을 끼친다. 산화질소 형성을 억제하면 세포영양막세포의 증식과 분화에 장애가 발생하고 나선동맥재형성이 발생하지 않아 자간전증이 발생한다는 연구가 있다[17]. Myatt 등[18]에 의하면 임신초기에 산화질소 생성을 억제하였더니 thromboxane과 endothelin이 증가하여 평균 혈압이 상승하고, 심박동수가 감소하였으며 임신성 고혈압이 유발되었음이 보고되었다. 2004년 Wang 등[4]의 연구에서도 유사한 결과를 보고하였다. 고혈압이 발병하기 전에는 자간전증 산모에 있어서는 NOS의 발현이 감소하여 산화질소가 감소함을 확인하였고 이후 보상기전에 의하여 NOS와 산화질소가 증가하였음을 보고하였다. 본 연구에서도 기존의 연구와 비슷하게 iNOS, eNOS의 mRNA가 정상군에 비해서 자간전증군의 태반에서 높게 발현되었다.

하지만 최근에는 자간전증에서 발견되는 NOS의 증가와 산화질소의 증가가 보상기전만으로는 설명할 수 없다는 연구결과도 발표되고 있다. Lyall [19]은 자간전증의 세포영양막세포에 발현되는 NOS는 주로 세포조직에 항시 존재하는 eNOS로 염증반응이나 저산소증이 있는 경우 유도되는 iNOS는 거의 없다고 보고하였다. 또 다른 연구에서도 자간전증과 자궁내 태아발육부전을 앓고 있는 산모와 정상산모의 비교 실험에서 세포영양막세포에 있는 NOS의 발현에는 차이가 없다고 보고하였다[20].

이러한 보고는 본 연구의 결과와는 상반된 결과이다. 결과에 차이가 나는 원인을 추정해 보면 먼저 실험 방법의 차이에 기인한다고 여겨진다. Lyall의 실험은 태반조직보다는 태반아래 자궁내막 조직을 대상으로 한 연구이고 본 연구는 태반 자체를 이용한 연구이기에 다른 연구 결과가 나왔을 수 있다. 이를 검증하기 위해서는 다음 실험에서 Lyall과 동일한 방법으로 재현성 실험을 실시하여 자궁에 존재하는 세포영양막세포와 용모에 존재하는 세포영양막세포의 차이를 확인해볼 필요가 있다.

Heme oxygenase는 1968년 Tenhunen 등[21]에 의해서 발견된 분해 효소로 대사산물인 일산화탄소, 철 및 빌리루빈은 항염증 및 항 산화기능을 가지고 있다. HO는 분해효소로 대사산물을 생성하기도 하지만 그 자체적으로도 대뇌 중추계에서 신경물질, 혈관확장작용, 혈소판감소와 항 염증 작용을 수행한다[22].

HO는 크게 3가지 아형이 존재한다. HO-1형은 주로 포유류의 조직에 많고 평상시에는 비장이나 간과 같은 적혈구 생성이 되는 곳에 주로 분포하며 저산소증이나 염증반응에 대응해서 나타나는 유도형 아형이다. HO-2형은 신체에 균등하게 분포되어 있으며 기본적인 헴 대사를 유지하는 역할을 수행하고 대체로 일정하게 몸 안에 존재한다. HO-3형에 대해서는 알려진 바가 없다[23].

HO는 태반에서도 중요한 역할을 수행한다. Yoshiki 등[24]에 따르면 HO-1, HO-2의 단백질 및 mRNA는 정상적인 인간의 태반에서 존재한다. 면역조직화학염색검사에서 HO-1 단백질은 인간 용모성 영양막세포에서 발현되고 HO-2 단백질은 태반 용모의 혈관에 존재하는 평활근세포와 내피세포에서 발현된다.

HO는 임신 기간 동안 태반에서 발현되지만 임신 시기에 따라서 각각 다른 아형이 발현된다. 임신초기에는 HO-2가 세포영양막세포에서 발현되고 임신후기에는 감소하는 데 반해 내피세포에 존재하는 HO-2는 임신후기로 갈수록 증가한다. HO-1은 태반아래 조직에서 세포영양막세포에서 높게 발현된다[7]. HO-1 mRNA는 정상적인 생쥐의 태반의 영양막세포에서 발현되지만 임신 주수가 진행이 될수록 감소한다[25].

태반에서 HO 발현에 장애가 있을 때 임신 합병증을 유발한다. 하지만 어떤 아형이 임신성적에 관여하는지 임신 어느 시기에 임신 합병증을 유발하는지에 대한 연구는 많이 부족하다.

Ihara 등[25]에 의하면 생쥐의 자궁동맥 결찰로 발생하는 급성 저산소증이 있는 경우에는 HO-1의 감소가 더욱 심하여서 HO-1이 저산소증에 관여한다고 주장하였다. 본 연구에서도 이들과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 자간전증의 태반에서는 HO-1의 mRNA의 발현이 정상군에 비해서 낮았고 자간전증의 경우에는 정상군에 비해서 세포영양막세포에서 HO-1이 발현되지 않았다. 하지만 이러한 결과가 초기 나선동맥의 재형성과정의 원인으로 나타나는지 결과로 나타나는지는 분만 후 태반을 이용한 본 실험의 한계로 정확히 규명할 수는 없었다.

이와는 상반되게 HO-2가 임신 합병증에 더 영향이 있다고 보는 연구 결과도 있다. Barber 등[26]의 보고에서는 자간전증 및 자궁 내 태아 성장장애와 같은 자궁태반혈류장애가 있는 자궁조직에서 채취한 혈관 내피세포에서 HO-2의 발현이 감소하였으며 허혈성 태반의 용모에서도 HO-2의 활성도가 감소하였다. 또한 Western blot 검사에서 HO-1이 감소

하였으며 특히 혈관내피세포의 HO-2의 발현 감소는 태반으로 들어가는 혈류량의 감소와 연관이 있다고 주장하였다[26]. Zenciusen 등[27]에 의하면 자연유산이 발생한 조직을 대상으로 한 비교연구에서 세포영양막세포, 혈관내피세포, 합포세포막세포, 탈락막에서도 정상에 비해서 HO-2의 감소함을 보고하였다.

Lash 등[28]에 의하면 경증의 자간전증 환자의 태반과 정상군 간에는 HO-1 단백질의 차이를 보이지 않았는데 본 연구의 결과는 Lash의 결과와는 상반되는 결과인데 이는 자간전증의 대상군의 차이 때문일 것으로 보인다. 즉 Lash는 경증 자간전증을 실험군으로 하였고 본 연구에서는 중증 자간전증을 대상으로 하였기에 동일한 결과가 나오지는 않았을 것이다.

결과적으로 본 연구에서는 자간전증의 환자의 태반에서 iNOS, eNOS의 mRNA발현은 정상에 비해서 증가하였고 HO-1의 mRNA발현은 정상에 비해서 감소하였다. 또 자간전증의 세포영양막 세포에서는 HO-1의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 자간전증의 병태생리에는 iNOS, eNOS뿐만 아니라 HO-1도 관여함을 알려주는 증거이지만 이 결과가 자간전증의 원인인지 결과인지는 본 실험에서는 확인할 수 없었기에 향후 동물 실험을 통해서 초기임신 시 HO-1의 역할을 규명한다면 자간전증의 병태 생리를 이해하는 데 도움이 될 거라 생각된다.

## Acknowledgments

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(KRF-2008-E00163).

## References

1. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002;287:3183-6.
2. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51:970-5.
3. Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000;21:597-602.
4. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:817-24.
5. Benedetto C, Marozio L, Neri I, Giarola M, Volpe A, Facchinetti F. Increased L-citrulline/L-arginine plasma ratio in severe pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;96:395-9.
6. Wallace DH, Leveno KJ, Cunningham FG, Giesecke AH, Shearer VE, Sidawi JE. Randomized comparison of general and regional anesthesia for cesarean delivery in pregnancies complicated by severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995;86:193-9.
7. Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J* 2000;14:208-19.
8. Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:137-67.
9. McCaig D, Lyall F. Inhibitors of heme oxygenase reduce invasion of human primary cytotrophoblast cells in vitro. *Placenta* 2009;30:536-8.
10. Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR, Stevenson DK. Effect of heme oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta* 2009;30:861-8.
11. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Ashe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:669-74.
12. Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T. Elevation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:456-61.
13. Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Yoneyama K, Power GG, Araki T. Relation between adenosine and T-helper 1/T-helper 2 imbalance in women with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2002;99:641-6.
14. Bezerra PC, Leão MD, Queiroz JW, Melo EM, Pereira FV, Nóbrega MH, et al. Family history of hypertension as an important risk factor for the development of severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89:612-7.
15. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during pre-eclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H541-50.
16. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med* 2006;34:447-58.
17. Conrad KP, Vernier KA. Plasma level, urinary excretion, and metabolic production of cGMP during gestation in rats. *Am J Physiol* 1989;257:R847-53.
18. Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J*

- Obstet Gynecol 1992;166:224-30.
19. Lyall F. Development of the utero-placental circulation: the role of carbon monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation. *Microsc Res Tech* 2003;60:402-11.
  20. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy--a review. *Placenta* 2005;26 Suppl A:S31-6.
  21. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-55.
  22. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
  23. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988;2:2557-68.
  24. Yoshiki N, Kubota T, Aso T. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1136-42.
  25. Ihara N, Akagi R, Ejiri K, Kudo T, Furuyama K, Fujita H. Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS Lett* 1998;439:163-7.
  26. Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer JN, Lyall F. Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed: reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction. *FASEB J* 2001;15:1158-68.
  27. Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, et al. Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:66-76.
  28. Lash GE, McLaughlin BE, MacDonald-Goodfellow SK, Smith GN, Brien JF, Marks GS, et al. Relationship between tissue damage and heme oxygenase expression in chorionic villi of term human placenta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H160-7.

## 자간전증 영양막세포에서의 *heme oxygenase-1*, *nitric oxide synthase*의 발현 분석

강원대학교 의학전문대학원 산부인과학교실

최성권, 황종윤, 이지연, 나성훈, 하중규, 이향아, 이동현

### 목적

본 연구는 자간전증 산모의 태반에서 *heme oxygenase-1* (HO-1), inducible *nitric oxide synthase* (iNOS)와 endothelial *nitric oxide synthase* (eNOS)의 발현을 확인하여 HO-1이 자간전증에 미치는 영향을 규명해 보고자 한다.

### 연구방법

2008년 10월부터 2009년 8월까지 강원대학교병원 산부인과를 방문하여 산전진찰을 받고 분만한 중증 자간전증 임신부 15명과 정상 혈압을 가진 임신부 15명에서 획득한 태반을 대상으로 하였다. 임신부가 쌍태아, 당뇨병, 혈관질환과 같은 내과적 질환이 진단된 경우는 제외하였으며 대조군은 실험군과 비교하여 주수와 나이를 보정하여 정하였다. 연구 대상군에서 분만 직후 태반을 절제한 후 1×1 cm 크기로 2개를 절단하여 포르말린 고정과 파라핀 블록을 만들어 보관하였고 나머지는 실시간 중합효소연쇄반응 실험을 하기 전까지 저온 냉동고에 보관하였다. 이후 조직이 모두 모인 상태에서 실험군과 대조군의 영양막 세포에서 HO-1, iNOS와 eNOS의 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 면역조직화학검사는 HO-1을 대상으로 실시하였다. 통계 분석은 SPSS ver. 12.0 프로그램을 이용하였고 실험군과 대조군의 두 개의 집단에서 나오는 연속변수데이터의 비교를 위해 Student *t*-test를 적용하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

### 결과

양군 간의 일반적 특징을 비교하여 보면 분만 당시 임신부의 나이는 양군에서 통계학적 유의성이 없었다( $33.33 \pm 4.59$  years vs.  $31.40 \pm 2.95$  years,  $P=1.181$ ). 분만 당시의 임신주수도 통계학적 유의성이 없었다( $36.80 \pm 1.79$  weeks vs.  $37.38 \pm 1.14$  weeks,  $P=0.30$ ). 출생 체중은 자간전증군에서 정상군보다 통계학적으로 유의하게 작았다( $2.55 \pm 0.40$  g vs.  $2.97 \pm 0.25$  g,  $P=0.002$ ). 실시간 중합효소연쇄반응에서는 자간전증 환자의 태반에서 HO-1의 mRNA 발현은 정상 임신에서의 태반보다 감소하였다. 하지만 자간전증 환자의 태반에서 iNOS와 eNOS의 mRNA는 정상임신에서의 태반보다 증가하였다. 면역조직화학검사에서도 자간전증의 세포영양막세포에서 HO-1의 발현은 관찰되지 않았다.

### 결론

자간전증 환자의 영양막 세포에서 HO-1의 mRNA발현은 정상군보다 낮게 발현되었으며 iNOS, eNOS의 발현은 정상군보다 높게 발현되었다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 임신초기 단계에서 HO-1의 연구가 진행된다면 향후 자간전증의 병태생리를 규명하는 데 도움이 될 거라 생각된다.

**중심단어:** 자간전증, 영양막세포, *Heme oxygenase-1*