

흰쥐 태반형성시의 Heat Shock Protein 27 분포에 대한 면역조직화학적 연구

최병태 · 강호성¹ · 김한도¹ · 조운복

부산대학교 사범대학 생물교육과, ¹자연과학대학 분자생물학과

임신 10일부터 20일까지 흰쥐 태반형성과정에서 heat shock protein 27(HSP27) 분포를 면역조직화학적으로 조사하였다. 임신 10일 태반에 자궁간막 탈락막세포, 영양막세포 및 거대영양막세포가 관찰되었다. 이후 탈락막세포수는 감소하고 영양막세포는 증가하는데 특히 임신 14일에 현저하며 영양막은 해면영양막과 미로영양막으로 구분되었다. 거대영양막세포수의 변화는 현저하지 않았다. 자궁간막 탈락막에서 HSP27은 임신 10일 및 12일에 탈락막세포의 세포질 또는 핵에 반응이 나타나고 특히 핵에 반응하는 세포수가 많았으며 임신 14일 이후 탈락막 세포수 감소와 함께 반응이 나타나지 않았다. 거대영양막세포는 임신 10일부터 일부 세포의 세포질 또는 핵에 반응이 관찰되나 임신 18일부터는 반응이 나타나지 않았다. 영양막의 HSP27은 임신 10 및 12일에 일부 세포에서만 세포질 또는 핵에 반응이 관찰되나, 임신 14일부터 반응세포수 증가와 함께 대부분 핵에 반응을 나타내고 반응 정도는 임신 16일 및 18일에 가장 현저하였으며, 미로영양막에서 반응세포수가 더 많았다.

KEY WORDS: Heat Shock Protein 27, Placenta, Rat

Heat shock protein(HSP)은 크게 HSP90 (84~94 kDa), HSP70(68~75 kDa) 및 small HSPs(20~30 kDa)의 3개군으로 구별하며, 이들 HSP는 단백질의 3차구조 형성과정을 조절하는 molecular chaperone으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Tomasovic, 1989; Jäättelä and Wissing, 1992; Wilkinson and Pollard, 1993).

HSP27은 heat shock, heavy metal 등의 스트레스에 의해서 그 합성이 증가할 뿐만 아니라, MCF-7 cell line이나 estrogen, progesterone같은 성호르몬의 표적세포 세포질에서 관찰된다 (Adams *et al.*, 1983; Ciocca *et al.*, 1983a, b, 1985, 1989; McGuire *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1989; Fugua *et al.*, 1989). HSP27의 기능과 관련된 연구는 열내성(Faucher *et al.*, 1993), 종양의 예후표지(Têtu *et al.*, 1992), actin 중합의 저

해(Miron *et al.*, 1991; Lavoie, *et al.*, 1993a, b) 및 molecular chaperone(Jakob *et al.*, 1993) 등이 있으며 특히 성장 및 분화 유도인자 등의 자극에 반응하여 인산화되며, 정상온도 조건에서 특정 발생시기에 발현되는 것으로 보아, 세포성장 및 분화에 관계한다고 하나 명확한 기능은 아직 밝혀져 있지 않다(Faucher *et al.*, 1993; Lavoie *et al.*, 1993a, b).

설치류의 태반은 주머니포배(blastocyst)의 착상에 따라 자궁내막에서 형성되며 특징적인 탈락막반응(decidual response)을 일으켜 임신초기에는 자궁간막 탈락막이 발달되나 임신후기에는 탈락막세포의 퇴행성 변화와 죽음으로 탈락막이 축소되고 대신 영양막이 증식, 발달하여 태반의 대부분을 차지한다(Velardo *et al.*, 1953; Larkin, 1971; Welsh and Enders, 1985; Iguchi *et al.*, 1993; Enders and Welsh, 1993). 임신중 태반은 세포증식, 분화 및 죽음

등 일련의 변화가 뚜렷하며 특히 탈락막과 영양막세포는 estrogen이나 progesterone같은 성호르몬의 영향을 받는다(Ciocca *et al.*, 1986; McGuire *et al.*, 1986; Iguchi *et al.*, 1993).

태반에서의 HSP27에 대한 연구는 사람의 태반형성과정 중 특정 임신기에 국한되거나 성호르몬의 전탈락막 및 탈락막형성에 대한 영향 및 연관성을 밝히는 연구밖에 없다(Ciocca *et al.*, 1983a, 1985, 1986; Edwards *et al.*, 1989). 따라서 본 연구에서는 일련의 태반형성과정에서 변화가 심한 탈락막 및 영양막에서 HSP27의 기능을 규명하기 위하여 그 분포를 면역조직화학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물은 14~16주된 임신경험이 없는 Sprague-Dawley계의 암컷 흰쥐로 수컷과 합사시킨 후 질액도말표본에서 각화상피세포사이에 정자가 발견된 날을 임신 0일로 계산하여 임신 10일, 12일, 14일, 16일, 18일 및 20일째 되는 태반을 사용하였다. 각 임신기의 태반을 Bouin 용액에 4°C 6시간 고정 후 70% alcohol에 여러번 세척하고 탈수과정을 거쳐 5-6 μ m의 파라핀 연속절편을 만들었다.

HSP27 분포의 검색은 조직절편에서 상범으로 파라핀을 제거한 후 0.25% methanolic hydrogen peroxide를 30분간 처리하여 조직내에 있을 peroxidase를 산화시킨 후 phosphate buffered saline(PBS: 0.01 M, pH 7.4)으로 세척하고 이어 단백질에 의한 비특이 면역반응을 막기 위하여 3.3% goat

normal serum으로 실온에서 30분간 처리한 후 peroxidase-antiperoxidase(PAP, Sternberger, 1979)법을 시행하였다.

1차항체로 조직학적으로 HSP27을 인지하는 것으로 알려진 monoclonal antibody G3.1 (BioGenex)을 1:50으로 희석하여 4°C의 습실에서 24시간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 이어 2차 항체로서 horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 1:200으로 희석하여 실온에서 60분간 처리시키고 PBS로 세척하였다. 이어서 정색과정인 효소 화학반응을 시행하기 위하여 기질용액 즉 Tris buffer(0.05 M, pH 7.6)에 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 및 0.003% H₂O₂가 혼합된 용액에 처리하여 항혈청에 면역반응을 일으킨 세포를 진한 갈색으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 약하게 대조염색하였다. 비특이적 반응에 대한 대조군으로는 동일 조직의 염색과정에서 일차항체, 2차항체 그리고 두 항체 모두를 각각 생략하여 염색한 후 서로 비교하여 그 반응정도를 판정하였다.

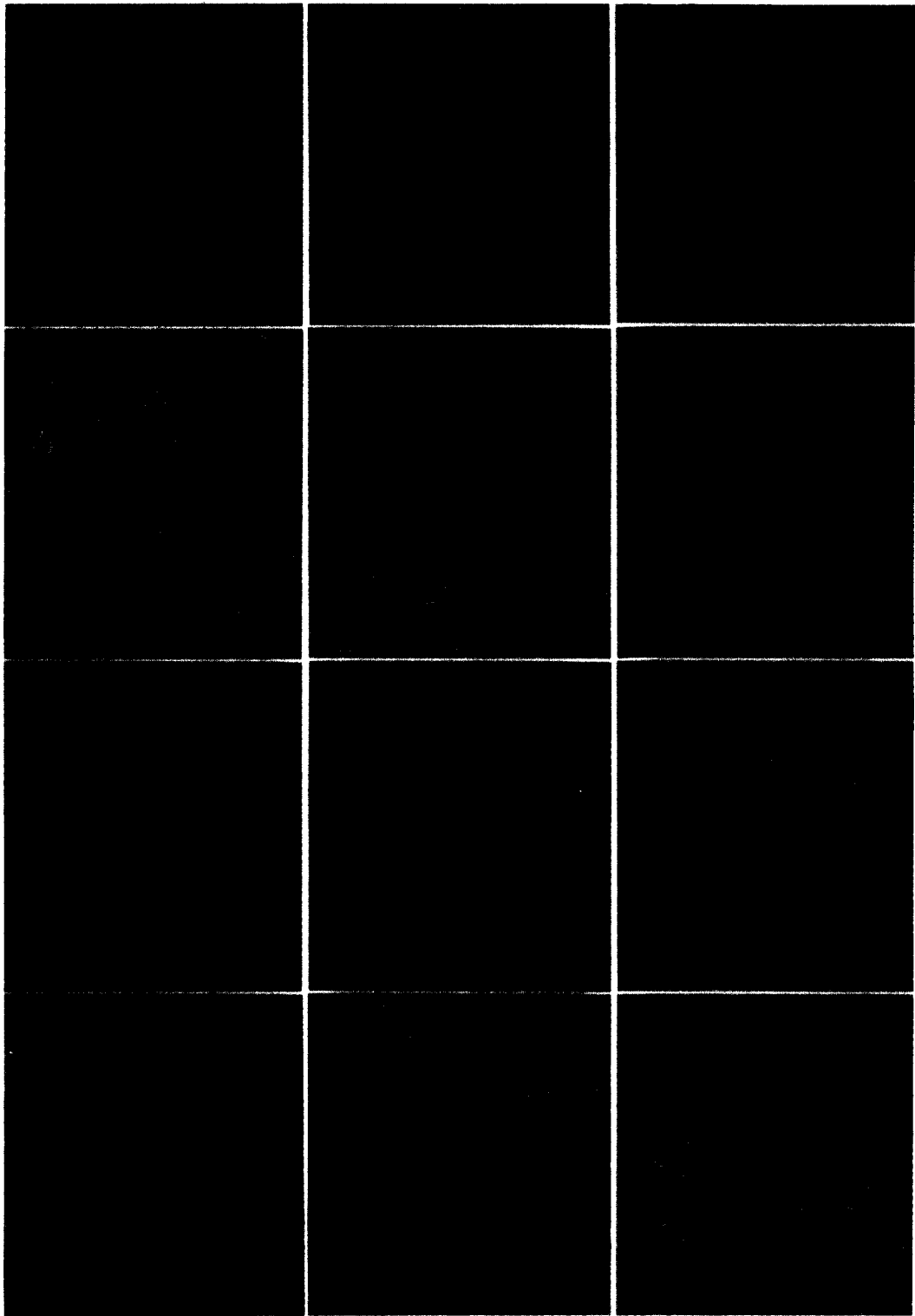
결과

임신 10일째에 자궁내막 중 많은 탈락막세포로 구성된 자궁간막 탈락막(mesometrial decidua)에 영양막(trophoblast)이 정착되어 혈용모막(hemochorion)의 태반을 형성하고 있었으며 탈락막과 영양막 사이에 거대영양막세포(trophoblast giant cell)가 관찰되었다. 임신 12일부터 자궁간막 탈락막세포수가 감소하며 특히 임신 14일에 현저하였다. 영양막세포의 수는 증가하는데 임신 14일부터 영양막이 미로영양막

Fig. 1. HSP27 immunoreactive staining of mesometrial decidua. Positive staining is observed in the cytoplasm or nucleus of decidual cells on 12th day of gestation (A, $\times 400$; B and C, $\times 1,000$).

Fig. 2. HSP27 immunoreactive staining of trophoblast giant cells on 12th day (A), 16th day (B) and 18th day (C) of gestation. $\times 1,000$. Note positive staining in the cytoplasm on 12th and 16th day and the lack of staining on 18th day of gestation.

Fig. 3. HSP27 immunoreactive staining of trophoblastic cells. In the labyrinth cells, positive staining is observed mainly within the nucleus on 14th day (A, $\times 1,000$) and more intense staining is seen on 16th day of gestation (B, $\times 100$; C and D, $\times 1,000$). In the spongiotrophoblast cells, positive staining is observed in the cytoplasm or within nucleus on 16th day (E, $\times 400$) and 18th day (F, $\times 400$) of gestation.



(labyrinthine zone)과 해면영양막(spongy zone, spongiotrophoblast)으로 구분되고 태반의 대부분을 차지하였으며 탈락막세포는 그 주변부에 한정되어 나타났다. 거대영양막세포수는 임신기 동안 현저한 변화를 나타내지 않았다.

태반내 HSP27에 대한 면역조직화학적 반응을 보면, 비특이적 반응을 보기 위한 대조군은 태반 형성과정의 모든 세포에서 반응을 보이지 않았으나 자궁간막 탈락막세포에서는 임신 10일 및 12일에 세포질 또는 핵에 반응이 나타나며 핵에 반응하는 세포수가 더 많았으나(Fig. 1A~C) 탈락막이 위축됨에 따라 반응이 나타나지 않았다. 거대영양막세포에서는 임신 10일부터 일부 세포의 세포질 및 핵내에서 반응을 나타내다가 임신 후기로 갈수록 반응정도가 떨어지며 임신 18일부터는 반응을 나타내지 않았다(Fig. 2A~C). 영양막세포에서는 임신 10일 및 12일에는 소수 세포의 세포질 또는 핵에서 반응을 나타내나 현저하지 않았다. 임신 14일부터 영양막세포 증가와 함께 반응세포수도 증가하며 반응세포 중 대부분이 미로영양막세포와 해면영양막세포의 핵에 반응을 보이고 그 분포로 보아 해면영양막보다 미로영양막에서 더 많이 관찰되는데 주로 모체성혈액과 접한 용모외측에 위치하고 있었다. 반응정도는 임신 16일 및 18일이 가장 현저하였고(Fig. 3A~F) 임신 20일에는 다소 약하였다.

고찰

HSP27은 다른 HSP와 마찬가지로 heat shock과 같은 다양한 스트레스에 의해 유도합성되는 단백질이지만, estrogen이나 progesterone과 같은 성호르몬의 표적세포에서도 널리 관찰되는 단백질이다(Ciocca *et al.*, 1983a, b, 1985, 1986, 1989; Edwards *et al.*, 1980, 1981; Fugua *et al.*, 1989). 28 kDa 및 24 kDa 단백질은 HSP27과 유사한 아미노산 서열을 가지며, estrogen 및 protein kinase C에 의해 인산화되는 점으로 보아 HSP27인 것으로 알려져 있다(Fugua *et al.*, 1989; Ciocca *et*

al., 1989; Faucher *et al.*, 1993).

28 kDa 단백질이 임신기의 자궁경부외막과 내막에서 강한 반응을 나타내는 것으로 보아 이 단백질을 estrogen 표적기관 또는 표적세포의 표지라고 하였고(Ciocca *et al.*, 1986), 임신 중 전탈락막(predecidua)과 탈락막에도 반응을 보이는 것으로 보아 탈락막이 estrogen 및 progesterone의 호르몬에 의해 조절된다고 하였다(Ciocca *et al.*, 1983a, 1985; Edwards *et al.*, 1989). 24 kDa 단백질은 estrogen 표적기관 및 estrogen 또는 progesterone 수용체가 있는 세포의 세포질에서 인지되고 estradiol 처리 후에 증가하는 것으로 보아(Adams *et al.*, 1980; Ciocca *et al.*, 1983a, b, 1985, 1989; Edwards *et al.*, 1980, 1981, 1989), 자궁내막에서 성호르몬 변화의 표지로서 이 단백질이 나타난다고 하였다(McGuire *et al.*, 1986). 최근 HSP27의 일종인 25 kDa HSP가 정상 흰쥐 뇌하수체 전엽의 생식선자극세포 및 갑상선자극세포와 소화관 및 기관 등의 평활근에 반응을 나타내나 골격근과 심근에서는 각 근섬유마다 차이가 있어 상이한 반응을 나타낸다고 하였다(Wilkinson and Pollard, 1993). 또한 HSP27은 여러 자극에 의해 인산화되며 종양세포에서 이 단백질이 관찰되는 것으로 보아 종양분화 및 예후표지로 보고되고 있다(McGuire *et al.*, 1986; Ciocca *et al.*, 1989; Têtu *et al.*, 1992; Lavoie *et al.*, 1993a, b).

설치류의 자궁에서 탈락막 형성과정은 특이적이며 배의 영양에 관여하고 영양막세포의 자궁내 침입의 방어적 기능 및 prostaglandin 생성에 관여한다(Massman, 1979; Ciocca *et al.*, 1983a). 영양막세포는 임신 전반기에 epidermal growth factor나 transforming growth factor 등의 자극에 의해 증식하며, anti-estrogen receptor에 대한 면역조직반응이 탈락막에서 강하게 나타나는 반면 영양막과 거대영양막세포에서 약하게 반응한다(Iguchi *et al.*, 1993). 임신이 진행됨에 따라 탈락막은 임신초기에 점차 비후되나, 임신 중기 및 후기에 영양막 세포들이 증가하면서 퇴행성변화를 일으켜 축소되고 탈락

막의 24 kDa 단백질반응도 임신초기에는 현저하나 임신후기에는 탈락막의 쇠퇴와 함께 반응이 감소하는 것으로 보아 24 kDa 단백질을 탈락막 세포전이에 관여하는 표지라고 하였다(Ciocca *et al.*, 1986).

본 실험에서 흰쥐 태반형성 중 HSP27에 대한 면역조직화학적 반응을 조사한 결과, HSP27은 estrogen의 표적기관인 태반의 여러 세포에서 반응을 나타내며, 특히 선행 연구(Ciocca *et al.*, 1986; McGuire *et al.*, 1986; Iguchi *et al.*, 1993)와 같이 탈락막에서도 반응이 나타났다. 또한 영양막의 증가에 따라 일부 영양막 세포에서 강한 반응을 나타내는데, 이는 모측 탈락막에서만 반응하고 영양막에서는 반응이 없다는 Ciocca 등(1983a)의 보고와는 상이하나 영양막과 거대영양막세포가 anti-estrogen receptor와 약하게 반응한다는 Iguchi 등(1993)의 보고와는 일치하고 있다.

HSP27은 자궁간막 탈락막세포, 거대영양막세포 및 영양막세포의 세포질 또는 핵에 반응하나 그 반응세포수로 보아 탈락막과 영양막세포에서 가장 현저하며 임신기에 따라 차이가 있으나 세포의 세포질보다 핵에서의 반응이 많았다. HSP27의 핵내 분포에 대한 이유는 세포의 기능과 밀접한 관계가 있어 heat shock이나 growth factor 등 여러 자극에 의해 비인산화형에서 인산화형으로 되어 세포질에서 핵내 또는 핵주변으로 이동하며(Lavoie *et al.*, 1993a, b; Faucher *et al.*, 1993). 비인산화형은 세포증식에 관계하나 인산화형은 세포성장억제와 관련이 있는 것으로 보고되어 있으나(Faucher *et al.*, 1993) 아직 불명확한 점이 많다.

선행 연구로 보아 본 실험의 HSP27에 대한 반응이 탈락막 및 영양막세포의 핵에서 반응을 나타내는 것은 다음과 같이 추론할 수 있다. 탈락막의 경우 임신 10 및 12일에, 영양막의 경우 임신 16일 및 18일에 핵내 반응이 현저함을 보아, 비록 본 실험에서는 인산화형을 관찰하지 않았으나 태반형성에 관여하는 성호르몬 및 growth factor가 관여한 여러 자극에 의해 HSP27이 인산화되어 핵으로 이동한 것으로 사

료된다. 이는 생쥐 태반의 전체 용적은 임신 6일부터 18일까지 지속적으로 증가하나, 이중 탈락막세포는 임신 6일부터 10일까지 증가하다가 그 후 감소하며 미로영양막세포는 임신 6일부터 14일까지 증가한 후 감소한다는 보고(Iguchi *et al.*, 1993)로 보아 본 실험의 탈락막 및 영양막세포의 핵내 반응은 HSP27의 인산화형태가 세포성장을 저해한다는 가설(Faucher *et al.*, 1993)과 일치하는 것으로 볼 수 있으나 이에 대한 연구는 더 이루어져야 할 것으로 사료된다. 그리고 본 실험의 결과와 아울러 임신전기의 변화도 함께 조사함으로써 태반형성과정에서 나타나는 세포증식, 분화 및 죽음에서의 HSP27의 기능 구명에 접근해야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Adams, D.J., D.P. Edwards, and W.L. McGuire, 1980. Estrogen regulation of specific messenger RNA's in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**: 1354-1361.
- Adams, D.J., H. Hajj, K.G. Bitar, D.P. Edwards, and W.L. McGuire, 1983. Purification of an estrogen-regulated breast cancer protein by monoclonal antibody affinity chromatography. *Endocrinology* **113**: 415-417.
- Ciocca, D.R., D.J. Adams, D.P. Edwards, R.J. Bjercke, and W.L. McGuire, 1983a. Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissue and cells. *Cancer Res.* **43**: 1204-1210.
- Ciocca, D.R., L.A. Puy, D.P. Edwards, D.J. Adams, and W.L. McGuire, 1985. The presence of an estrogen-regulated protein detected by monoclonal antibody in abnormal human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**: 137-143.
- Ciocca, D.R., L.A. Puy, and G.L. Castro, 1986. Localization of an estrogen-responsive protein in the human cervix during menstrual cycle, pregnancy, and menopause and in abnormal cervical epithelia without atypia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **155**: 1090-1096.
- Ciocca, D.R., L.A. Puy, and L.C. Fasoli, 1989. Study of estrogen receptor, progesterone receptor, and the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in patients with carcinomas of the endometrium and cervix. *Cancer Res.* **49**: 4298-4304.
- Ciocca, D.R., R.H. Asch, D.J. Adams, and W.L.

- McGuire, 1983b. Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**: 496-499.
- Edwards, D.P., D.J. Adams, N. Savage, and W.L. McGuire, 1980. Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**: 804-812.
- Edwards, D.P., D.J. Adams, and W.L. McGuire, 1981. Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in a human breast cancer cell line (MCF-7). *Breast Cancer Res. Treat.* **1**: 209-223.
- Edwards, D.P., D.J. Adams, and W.L. McGuire, 1989. Specific protein synthesis regulated by estrogen in human breast cancer. *J. Steroid. Biochem.* **15**: 247-259.
- Enders, A.C. and A.O. Welsh, 1993. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *J. Exp. Zool.* **266**: 578-587.
- Faucher, C., J. Capdevielle, I. Canal, P. Ferrara, H. Mazarguil, W.L. McGuire, and J.M. Darbon, 1993. The 28-kDa protein whose phosphorylation is induced by protein kinase C activators in MCF-7 cells belongs to the family of low molecular mass heat shock proteins and is the estrogen-regulated 24-kDa protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 15168-15173.
- Fugua, S.A.W., M. Blum-Salingeros, and W.L. McGuire, 1989. Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock. *Cancer Res.* **49**: 4126-4129.
- Iguchi, T., N. Tani, T. Sato, N. Fukatsu, and Y. Ohta, 1993. Developmental changes in mouse placental cells from several stages of pregnancy in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* **48**: 188-196.
- Jakob, U., M. Gaestel, K. Engel, and J. Buchner, 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-1520.
- Jäättelä, M. and D. Wissing, 1992. Emerging role of heat shock protein in biology and medicine. *Ann. Med.* **24**: 249-258.
- Larkin, L.H., 1971. Electron microscopy of granule release in metrial gland cells of the pregnant rat. *Anat. Rec.* **172**: 109-126.
- Lavoie, J.N., E. Hickey, L.A. Weber, and J. Landry, 1993a. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**: 24210-24214.
- Lavoie, J.N., G. Gingras-Bereton, R.M. Tanguay, and J. Landry, 1993b. Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J. Biol. Chem.* **268**: 3420-3429.
- Massman, H.W., 1979. Comparative morphology of the endometrium In: The endometrium (Kimball, F.A., ed). Spectrum Publications, New York, pp. 1-23.
- McGuire, W.L., L.G. Dressler, G.W. Sledge Jr, I. Ramzy, and D.R. Ciocca, 1986. An estrogen-regulated protein in normal and malignant endometrium. *J. Steroid Biochem.* **24**: 155-159.
- Miron, T., K. Vancompernelle, J. Vandekerhove, M. Wilchek, and B. Geiger, 1991. A 25-kDa inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell. Biol.* **114**: 255-261.
- Sternberger, L.A., 1979. Immunocytochemistry, John Wiley & Sons, New York, pp. 104-169.
- Tomasovic, S.P., 1989. Functional aspects of the mammalian heat-stress protein response. *Life Chem. Rep.* **7**: 33-63.
- Têtu, B., B. Lacasse, H.L. Bouchard, R. Lagace, J. Huot, and J. Landry, 1992. Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: A clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* **52**: 2325-2328.
- Velardo, J.T., A.B. Dawson, A.G. Olsen, and F.L. Hisaw, 1953. Sequence of histological changes in the uterus and vagina of the rat during prolongation of pseudopregnancy associated with the presence of deciduomata. *Am. J. Anat.* **93**: 273-305.
- Welsh A. and A.C. Enders, 1985. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am. J. Anat.* **172**: 1-29.
- Wilkinson, J.M., and I. Pollard, 1993. Immunohistochemical localization of the 25 kDa heat shock protein in unstressed rats: Possible functional implications. *Anat. Rec.* **237**: 453-457.

(Accepted February 18, 1995)

**Immunohistochemical Localization of the Heat Shock Protein 27 during Placenta
Formation in the Rat**

Byung Tae Choi, Ho Sung Kang¹, Han Do Kim¹ and Un Bock Jo (Department of Biology
Education, ¹Department of Molecular Biology, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea)

HSP27 of rat placentae from 10th to 20th day of gestation was examined using immunohistochemical method. The placenta consisted of mesometrial decidual cells, trophoblastic cells and trophoblast giant cells. With the progress of gestation, the trophoblastic cells increased in number against a decrease of decidual cells, thus the placentae from 14th day of gestation were composed mainly of trophoblastic cells showing a clear distinction between labyrinthine and spongy zone and peripheral decidual cells. In the trophoblast giant cells, no significant changes in number was found. HSP27 immunoreactive staining of the mesometrial decidua was seen in the cytoplasm or nucleus of decidual cells on 10th day of gestation and more nuclear staining was detected. From 14th day of gestation, these cells showed a lack reaction with degenerating decidua. A few trophoblast giant cells revealed a weak reaction in the cytoplasm or nucleus from 10th day and an absent reaction was observed from 18th day of gestation. In the trophoblastic cells, occasional immunostaining cells were seen on 10th and 12th day of gestation in the cytoplasm or nucleus, however, nuclear staining cells increased in number from 14th day and most intensive staining showed on 16th and 18th day of gestation. The cells showing positive staining were observed more abundantly in the labyrinthine zone.