Korean Journal of Pediatrics Vol. 50, No. 12, 2007
DOI : 10.3345/kjp.2007.50.12.1194
□ 원저 : 임상 □

부당 경량아 및 전자간증 산모의 신생아 제대혈관내피세포의 endothelin-1 발현 비교

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실

조원경 · 김소영 · 전정식

Quantification of endothelin-1 in human umbilical venous endothelial cell culture supernatants of small for gestational age and preeclampsia neonates

Won Kyoung Cho, M.D., So Young Kim, M.D. and Chung Sik Chun, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Catholic University, Seoul, Korea

Purpose : It was generally accepted now a days that the pathogenesis of preeclampsia, small for gestational age (SGA), intrauterine growth retardation and fetal origin of adult diseases were related with a endothelial cell dysfunction. The purpose of this study was to know the relation of such diseases by assessing the level of endothelin-1.

Methods : SGA babies, newborns of preeclampsia and normal control mother were included in this study. Isolated endothelial cells were centrifugated and mixed with media in 37℃, 5% CO_2 to obtain confluent monolayer of cultured human umbilical venous endothelial cell (HUVEC). Endothelin-1 levels were determined by Endothelin-1 colorimetric (EIA) Kits. We examined the endothelin-1 level in the HUVEC supernatants from SGA baby, and newborns from preeclampsia as well as normal mother. Also, we compared the endothelin-1 level of cultured normal HUVEC incubated with serum from cord blood of SGA, babies of preeclampsia or normal control mother.

Results : The endothelin-1 levels in cultured HUVEC supernatants of three groups showed no significant difference but the endothelin-1 levels of cultured normal HUVEC incubated with serum from preeclampsia mother or SGA mother was significantly higher than those from newborns of control mothers (P<0.05).

Conclusion : These findings suggest that there may be the factor which affect the endothelin-1 level in serum of cord blood from SGA and preeclampsia. **(Korean J Pediatr 2007;50:1194-1199)**

Key Words : Preeclampsia, Small for gestational age, Endothelin-1, Umbilical vein, Endothelial cell

서 론

전자간증의 주된 병태 생리는 산모의 혈관내피세포 손상 또는 기능 이상으로 제시되고 있다[1-4]. 혈관내피세포는 혈관의 긴장도 유지, 혈압, 혈액응고, 면역반응, 지질 전달 등에 중요한 역할을 하며 전자간증 산모는 고혈압, 말초혈관 수축, 단백뇨, 혈액 응고계의 변화 등 주로 혈관내피세포와 관련된 특징적인 임상 소견을 보인다[5-8]. 보고들에 의하면 모든 소아의 약 2.5%가 부당 경량아(small for gestational age, SGA)로 출생하며 그 원인은 유전적 요인 혹은 자궁 내 발육지연 등으로 알려져 있으나 뚜렷한 이유가 있는 경우를 제외하고 대다수에서 그 병인이 확실하지 않다. 최근에는 전자간증의 주요 병인으로 알려져 있는 태반 혈류 저하의 증상이 부당 경량아의 병인과도 어느 정도 연관되어있다는 연구 보고가 있으며 이들 보고자들은 임신 시 자궁, 태반, 태아의 혈관의 정상적인 생리적 적응이 이루어지지 않을 경우 자궁태반 혈류의(uteroplacental circulation) 저항으로 인하여 이러한 증상이 생긴다는 개념을 초기 보고하고 있다[9, 10]. 1993년 Barker 등[11]은 부당 경량아와 자궁 내 발육 지연아로 태어난 신생아를 대상으로 추적 관찰한 결과 이들이 성인이 되어 심혈관 질환, 2형 당뇨병, 고혈압, 비만, 지질 조절장애 등 혈관내피세포의 기능이상과 관련된 질병이 생길 가능성이 정상아

접수 : 2007년 10월 22일, 승인 : 2007년 11월 27일
책임저자 : 김소영, 가톨릭의대 성가병원 소아청소년과
Correspondence : So Young Kim, M.D.
Tel : 032)340-2114 Fax : 032)340-2673
E-mail : sykimped@catholic.ac.kr

에 비하여 높다는 결과를 발표하였다. 이후 'fetal origin of adult disease'의 개념이 대두되었고 부당 경량아의 병인에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다[11-17].

본 연구자들은 혈관내피세포의 기능 장애가 공통적으로 전자간증, 부당 경량아, 자궁 내 발육지연, fetal origin of adult disease 등의 질환들과 관련되어있는 것으로 추론하였다. 이에 전자간증 산모의 신생아, 부당 경량아, 정상아의 제대혈관내피세포에서 발현되는 endothelin-1의 양을 비교하고 또한 이들의 혈청내에 endothelin-1의 발현을 촉진시키는 인자가 있는지를 알아보기 위하여 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

2006년 1월부터 8월까지 가톨릭의대 부속 병원에 입원하여 본 실험에 동의한 만삭 산모 중 전자간증으로 진단 받은 산모의 신생아를 전자간증군(n=7), 부당 경량아로 진단받은 신생아를 부당 경량아군(n=8), 정상 신생아를 정상군(n=12)으로 나누었다. 각 군에서 태어난 신생아 제대와 제대혈을 모아 제대혈 혈청을 -70℃ 이하에 보관하였다. 전자간증의 진단은 6시간 이상 간격으로 2회 측정하여 수축기 혈압 140 mmHg 이상, 확장기 혈압이 90 mmHg 이상이고 단백뇨가 24시간 동안 300 mg 이상 또는 6시간 이상 간격으로 2회 이상 채취뇨가 100 mg/dL 이상인 경우로 하였다. 부당 경량아군은 출생체중이 재태 연령의 평균치를 기준으로 2SD 이하이거나 10 백분위수 이하일 경우로 모체, 태반, 태아에서 자궁 내 발육지연이 야기될만한 진단된 원인이 없는 경우로 하였다. 산모에게 당뇨병이나 그 외 내과적 질병이 있는 경우와 미숙아, 다태아 임신, 알려진 태아기형이 있는 경우는 연구대상에서 제외하였다. 각 실험군에 포함된 모든 산모로부터 연구의 취지와 가검물 채취를 위한 동의를 구하였다.

2. 인체 제대 정맥혈관 내피세포(human umbilical venous endothelial cell, HUVEC)의 분리와 배양

각 군에서 태어난 신생아의 제대를 무균적으로 얻어 분만 후 2시간이내에 실험을 시작하였다. 제대의 양단을 깨끗이 잘라낸 후 한쪽 단면의 정맥에 바늘을 삽입하고 고정하여 제대 내부를 배지(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척하였다. 다른 쪽도 같은 방법으로 고정한 후 0.2% collagenase(Sigma Co., St. Louis, U.S.A.) 20 mL 정도를 주입한 후 양쪽을 결찰하고 37℃ 수조에 15분간 배양시켰다. 이 후 비활성 배양액(endothelial cell growth medium with 10% heat inactivated fetal calf serum) 25 mL로 제대안을 3회 세척하면서 50 mL 시험관으로 인체 제대 정맥혈관 내피세포를 옮겼다. 4℃에서 1,000 rpm으로 3-5분간 원심분리하였다. 배양액 HF-12(Sigma Co., St. Louis, U.S.A.) 5 mL가 들어있는 25 mL 배양용기(pellet)에 세포의 농도가 1×10^6/mL가 되도록 넣고 37℃ 하에서 5% CO_2 배양기에 24시간동안 배양한 후 배양액을 교환하였다. 그 이후는 48시간 간격으로 배양액을 교환하면서 혈관내피세포가 배양용기 바닥에 단층으로 융합될 때까지 관찰하였다.

3. 배양된 각 군의 혈관내피세포 상층액 내 endothelin-1의 측정

배양된 전자간증군, 부당 경량아군, 정상군의 혈관내피세포가 배양용기 바닥에 단층으로 융합되었을 때, 세포와 배양액을 모아 800×g로 15분간 원심 분리하여 상층액을 모아 -20℃에 보관하였다. 제조회사의 안내문에 따라 endothelin-1 colorimetric(EIA) Kits(TiterZyme® Stressgen, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.)를 이용하여 endothelin-1 농도를 측정하였다. 각 군의 상층액(100 μL)과 표준액(standard)을 두 배수로 각 용기(well)에 넣고 가볍게 섞은 후, 비닐로 밀폐하고 4℃에서 하룻밤을 배양하였다. 다음날 용기를 총 7회 세척한 후 100 μL의 표지항체(labeled antibody)를 넣고 밀폐하고 37℃에서 30분간 배양하였다. 이후 용기를 총 9회 세척 한 후 깨끗이 비우고 100 μL 기질을 넣고 실온, 암실에서 30분간 배양 후 stop solution(100 μL)을 첨가하였으며 이후 450 nm(LABSYSTEMS Multiskan MS, Helsinki, Finland)에서 값을 측정하였다. Endothelin-1의 측정값은 인간 재조합 endothelin-1을 이용하여 구한 표준화 곡선을 이용하여 계산하였다. 본 검사 방법의 민감도는 0.14 pg/mL까지 이었으며 모든 검사물들은 각각 3회 측정하여 평균을 구하였다.

4. 제대혈 혈청과 함께 배양된 제대혈관내피세포 상층액 내 endothelin-1의 측정

배양용기(12-well)에 각 well 당 배양된 정상 신생아 HUVEC 세포 5×10^6씩 넣었다. 20% 농도의 전자간증군, 부당 경량아군, 정상군의 제대혈 혈청을 투여하고 대조군에는 배양액만 넣었다. 48시간 배양한 후 세포와 배양액을 모아 800×g로 15분 간 원심 분리하여 상층액을 모아 endothelin-1의 농도를 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

5. 통계분석

실험 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였고 endothelin-1의 측정 결과에서는 전자간증군과 부당 경량아 유무 사이의 상관관계를 알기 위하여 2개의 요인이 있는 분산분석 two-way ANOVA를 이용하였다. 유의수준은 5%로 설정하였으며, 설정된 유의수준을 토대로 SPSS Win 12.0을 통해서 분석을 실시하였다.

Table 1. Characteristics of Study Groups

	Preeclampsia (n=7)	SGA (n=8)	Normal (n=12)	*P*-value
Maternal age (years)	31.4±4.1	30.5±6.4	29.8±4.1	0.69
Birth weight (g)	2,920±320	2,340±210	3,560±460	0.00
Gestational age (wks)	38.4±1.1	38.2±1.2	39.1±2.1	0.19
Median 1′ Apgar score	7.3	7.4	8.0	0.26
Median 5′ Apgar score	8.6	8.8	9.0	0.47

Values are Mean±standard deviation. Abbreviations : Preeclampsia, term baby of preeclampsia; SGA, term baby of small for gestational age; Normal, normal baby

Table 2. Comparison of Endothelin-1 Levels in the Cultured HUVEC Supernatants of Preeclampsia, SGA and Normal Term newborn groups

	Preeclampsia (n=7)	SGA (n=8)	Normal (n=12)
Endothelin-1 level (ng/mL)	176.3 (±12.7)	181.8 (±20.3)	174.0 (±10.2)

Values are Mean±standard deviation. Abbreviations : Preeclampsia, term baby of preeclampsia; SGA, term baby of small for gestational age; Normal, normal baby
P=0.081, by two-way ANOVA test

Table 3. Comparison of Endothelin-1 Levels in the Cultured Normal HUVEC Supernatants Which was Incubated with Serum from Preeclampsia and SGA Groups

	Preeclampsia (n=7)	SGA (n=8)	Normal (n=12)
Endothelin-1 level (ng/mL)	180.82 (±14.8)	175.08 (±15.8)	171.15 (±17.8)

Values are Mean±standard deviation. Abbreviations : Preeclampsia, term baby of preeclampsia; SGA, term baby of small for gestational age; Normal, normal baby
P<0.05 by two-way ANOVA test

결 과

1. 대상군의 임상적 특성

전자간증군과 부당 경량아군, 정상아군 사이에 산모의 나이, 임신주수 및 1분 5분 아프가 점수는 유의한 차이가 없었다. 출생체중은 부당 경량아군에서 유의한차이로 적었다. 고혈압 및 단백뇨는 전자간증 산모군의 모든 예에서 관찰되었고 다른 두 군에서는 고혈압이나 단백뇨가 전혀 없었다(Table 1).

2. Endothelin-1 농도 비교

1) 각 군 간의 비교

전자간증군과 부당 경량아군, 정상군의 제대혈관내피세포를 분리하여 배양한 결과 제대혈관 내피세포에서의 endothelin-1 발현이 전자간증군과 부당 경량아군, 정상군에서 각 각 176.3(±12.7) ng/mL, 181.8(±20.3) ng/mL, 174.0(±10.2) ng/mL으로 각 군간 유의한 차이가 없었다(*P*=0.081)(Fig. 1, Table 2).

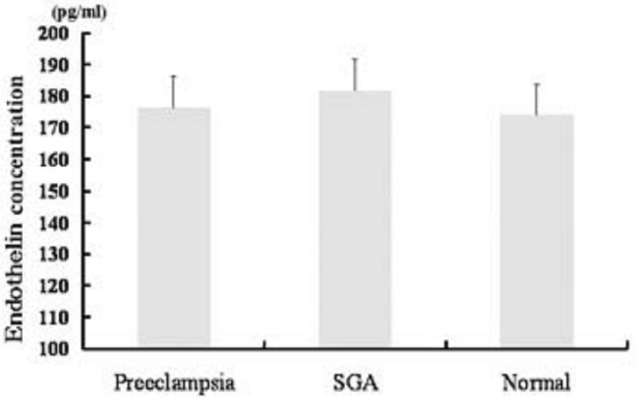

Fig. 1. Comparison of endothelin-1 levels in the cultured HUVEC supernatants of preeclampsia, SGA and normal term newborn groups.

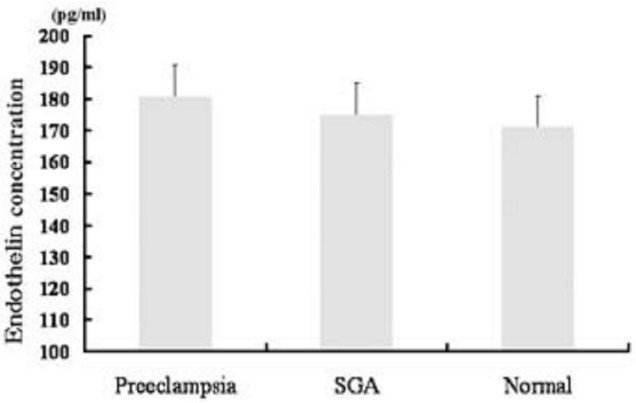

Fig. 2. Comparison of endothelin-1 levels in the cultured normal HUVEC supernatants which was incubated with serum from preeclampsia and SGA group.

2) 각 군의 제대혈 혈청을 정상 혈관내피세포에 부화 시 endothelin-1의 발현정도 비교

전자간증군, 부당 경량아군 및 정상군의 제대혈 혈청에 의하여 부화된 정상군 제대혈관내피세포에서 endothelin-1의 발현정도를 비교한 결과, 전자간증군과 부당 경량아군 혈청이 함께 부화된 경우가 정상군에 비하여 endothelin-1 발현이 180.8(±14.8)

ng/mL, 175.1(±15.8) ng/mL, 171.2(±17.8) ng/mL로 유의하게 증가되었다(P<0.05)(Fig. 2, Table 3).

고 찰

혈관내피세포는 혈관의 강도, 혈압, 혈액응고, 혈관 면역반응 등에 중심역할을 하고 있다. 특히 인체 혈관내피세포는 몇 가지 중요한 혈관수축물질과 이완물질을 생산하고 있으며 이들 물질 중 가장 강력한 혈관수축 작용을 하는 것으로 endothelin이 있다[3, 18]. Endothelin은 21개의 아미노산 서열의 펩타이드 가족(family)으로 endothelin-1, endothelin-2, endothelin-3의 세 종류가 있으며 인체 혈관내피세포에서 가장 많이 분비된다. 그중 ET-1과 ET-2는 강력하면서도 그 작용이 매우 오래 지속되는 혈관수축작용이 특징이다[3, 18]. 이들 endothelin은 두개의 ETA, ETB 수용체에 결합하여 작용을 나타내며 특히 혈관에서는 평활근의 ETA, ETB receptor에 작용하여 혈관 수축작용을 유도한다. 혈관 내피세포의 손상은 endothelin의 분비를 자극하여 분비된 endothelin이 포식세포를 활성화 시켜 순환하는 단핵세포를 강하게 침착시키며 혈관 평활근의 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 야기한다. 그 외에도 기도와 장에서 평활근의 근긴장도 증가, 뼈에서 alkaline phosphatase 활성 증가, 심장근육세포에서 atrial natriuretic peptide(ANP)의 분비 증가, 사구체에서 renin의 분비 저하 등을 야기하여 심혈관계, 신장, 호흡기계, 내분비계에 광범위한 조절기능을 가지며, angiotensin보다 10배 강력한 혈관수축효과를 갖는다[2, 3]. Endothelin의 혈중 농도는 동맥경화와 다양한 종류의 심장병을 비롯하여 근래 들어서는 심부전, 신부전, 폐 고혈압증, 고지혈증, 전이성 전립선암 등 질환과 중요한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

전자간증에서 혈관내피세포의 손상이나 기능이상이 나타나는 기전에 대해서는 오랜 기간의 연구와 보고들에도 불구하고 아직 확실히 밝혀지고 있지 않으나 태반으로의 융모 침습이 잘 이루어지지 않고, 세포 영양막이 산모의 나선상 동맥과 연결될 때 적절한 혈관형으로 변환하지 못하는 등의 이유로 태아 태반관류가 감소하게 되고[1], 이때 관찰되는 태반 허혈과 산모의 타고난 인자가 같이 작용하여 혈관내피세포의 기능이상을 초래하는 것으로 여겨지고 있다. 태반 허혈에 의해 유리된 인자들로는 사이토카인, 혈액응고인자, 지질 과산화물, 태반자체 유리물질, 태반 내에서 활성화된 혈소판이나 호중구, 단핵세포 등이 있으며[19-22] 산모 측 인자로는 동맥경화증 유발의 위험인자이기도한 고혈압, 비만, 당뇨, 인종과 같은 유전적, 환경적 요인을 제시하고 있다[2, 4, 5, 16].

부당 경량아의 원인은 정확히 알려져 있지 않으나 이들 산모의 제대 도플러 초음파상 태반순환에서의 혈관저항이 큰 것으로 보고되고 있으며[9], 부당 경량아 혹은 자궁 내 성장지연 태아에서 전자간증에서 보이는 것과 같은 혈관내피세포의 기능이상이 보고되었다[10]. 최근에는 전자간증의 주요 병인으로 알려져 있는 태반혈류 저하의 증상이 부당 경량아의 병인과도 어느 정도 연관되어있다는 연구 보고가 있으며 이들 보고자들은 임신 시 자궁, 태반, 태아의 혈관이 정상적인 생리적 적응이 이루어지지 않을 경우 자궁태반 혈류의 저항으로 인하여 이러한 증상이 생긴다는 개념을 초기 보고하고 있다. 따라서 태아 혈액 내에도 태반 혈관의 혈행에 영향을 주거나 태반혈관의 혈류역학에 영향을 주어 혈관내피세포의 이상을 초래하는 물질이 있을 것으로 추측되고 있다. 자궁 내 성장 지연이나 부당 경량아로 태어난 신생아를 추적 관찰한 결과 이들이 성인이 되어서 심혈관 질환, 2형 당뇨병, 고혈압, 비만, 지질 조절장애등의 질병이 생길 가능성이 정상아에 비하여 높다는 결과들이 발표된[11-15] 이후 'fetal origins of adult disease'라는 개념이 대두되었다. 혈관내피세포의 기능이상이 태아에게 단기, 장기적으로 영향을 미치고 있다는 이론이다[16, 17].

전자간증 산모의 혈중 endothelin-1 농도가 정상 산모보다 증가되어 있다는 것은 많은 저자들에 의하여 밝혀진 바 있다[2, 3, 18, 23]. 이 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않았으나, 태반-태아 순환 장애로 인한 태반유리 인자와 산모측 인자, 그리고 세포내 변환효소의 활성화에 기인한다고 볼수 있다[23]. 또한 산모 혈중에서보다 제대혈이나 양수 내에서 endothelin-1의 농도가 유의하게 높으며, 태아의 몸무게가 작을수록 제대혈의 endothelin-1농도가 높은 것이 관찰되었다. 태아-태반 혈관계 내에 endothelin-1의 부착부위가 존재한다는 배경에서, endothelin-1은 feto-placental development에 중요한 역할을 하는 것으로 제시되고 있다[3, 23].

부당 경량아의 병태 생리에 endothelin-1이 관련되는지에 대한 연구 보고는 아직 없는 것으로 생각된다. 그러나 혈관내피세포의 기능 이상과 endothelin-1과의 밀접한 관련성으로 보아 자궁 내에서의 태아의 성장에 혈관내피세포의 기능과 이와 관련된 endothelin-1의 활성이 어느 정도 관련이 있을 것으로 추측된다.

본 연구자들은 전자간증, 자궁 내 성장지연아, 부당 경량아, fetal origins of adult disease 등의 질환이 공통적으로 혈관내피세포의 기능 변화와 관련되어 있다는 것에 기인하여 각 질환의 혈관내피세포 관련성을 연구함으로서 이들 질환의 병인을 밝히는데 도움이 되고자 본 연구를 시행하였다.

그 결과 전자간증군과 부당 경량아군의 제대혈관내피세포에서의 endothelin-1 발현은 정상군과 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 태아 제대혈관내피세포가 모체혈청내의 혈관내피세포의 기능이상을 초래하는 인자들에 대하여 독립적이거나 저항할 가능성이 있는 것을 의미한다. 이는 전자간증 산모와 정상 산모의 제왕절개시에 채취한 산모혈액과 제대혈에서의 endothelin-1의 농도가 산모혈액에서는 양군간의 유의한 차이가 있었으나 제대혈에서는 의미 있는 차이가 없었다는 연구결과[15]와 유사한 결과이며 적어도 모체의 전자간증이나 태아의 SGA가 제대혈관내피세포 자체적으로 endothelin-1을 분비시키는 것과 관련되지 않는 것으로 보인다.

반면 ANOVA 분석결과 전자간증군과 부당 경량아군의 제대혈 혈청을 첨가한 정상군 제대혈관내피세포에서 정상아군에서보다 endothelin-1 발현이 유의한 차이로 증가된 것으로 보아 혈관내피세포의 기능이상을 유발하는 인자 혹은 endothelial converting enzyme의 활성도를 높이는 인자가 전자간증군과 SGA군 제대 혈청내에 존재할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

본 연구는 전자간증 산모의 태아나 저출생 체중 태아에서 혈관내피세포 기능의 이상이 일어나는 공통된 병인을 찾는 기초적인 시도로 혈청내의 어떠한 인자들과 endothelin-1의 발현, 그리고 태아에게 미치는 영향에 대하여 보다 확실한 결과를 얻기 위해서는 더욱 많은 자료와 대상을 통한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 본 연구자들은 전자간증, 부당 경량아, 자궁 내 발육지연 등의 질환들이 공통적으로 혈관내피세포의 기능 변화와 어느 정도 관련되어 있을 것으로 추론하였다. 따라서 전자간증 산모의 신생아, 부당 경량아의 제대혈관내피세포를 배양하여 제대의 혈관내피세포에서 발현되는 대표적인 혈관 수축작용 물질인 endothelin-1의 양을 측정한 후 정상 신생아 제대혈관 내피세포의 결과와 비교하여 각 질환에서 태아의 혈관내피세포의 endothelin-1 발현 기능에 어떤 차이가 있는지를 확인하고, 또한 배양된 정상아 제대혈관내피세포에 전자간증 산모의 신생아와 부당 경량아 및 정상아의 제대혈 혈청을 투여하여 발현된 endothelin-1의 양을 비교하여 혈청 내에 endothelin-1의 발현을 촉진시키는 인자가 있는지를 알아보았다.

방 법 : 전자간증으로 진단 받은 산모의 신생아를 전자간증군(n=7), 부당 경량아로 진단받은 신생아를 부당 경량아군(n=8), 정상 신생아를 정상군(n=12)으로 나누었다. 각 그룹에서 태어난 신생아 제대와 제대혈을 모아 제대혈은 그 혈청을 영하 70℃ 이하에 보관하였다.

전자간증군, 부당 경량아군 및 정상군 신생아의 제대 혈관내피세포를 분리하고 배양하였다. 배양된 각각의 제대 혈관내피세포의 상층액에서 endothelin-1 level을 측정하였다. 다음에는 전자간증군, SGA군 및 정상군의 제대혈 혈장과 정상 신생아 제대혈관내피세포를 함께 부양하여 그 상층액에서 endothelin-1 level을 측정하였다.

결 과 : 전자간증군, 부당 경량아군 및 정상군의 제대혈관내피세포를 배양하여 발현된 endothelin-1의 양을 측정한 결과 전자간증군과 SGA군의 제대혈관내피세포의 endothelin-1 발현은 정상군과 유의한 차이가 없었다. 그러나 배양된 정상아 제대혈관내피세포에 전자간증군과 SGA군의 제대혈 혈청을 투여하여 발현된 endothelin-1의 양은 정상군에 비하여 유의하게 증가되었다.

결 론 : 전자간증 신생아나 부당 경량아의 혈관내피세포의 기능이상을 유발하는 인자가 전자간증과 부당경량아 제대 혈청내에 존재할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

References

1) Ryu KH, Choi SD, Kim HH, Lee HS, Lee JH, Kim SY, et al. The Activity of sICAM-1 and sVCAM-1 in plasma of preeclamptic mother and neonatal cord blood. J Korean Soc Neonatol 2004;11:35-43.
2) 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.
3) Wolff K, Nisell H, Carlstrom K, Kublickiene K, Hemsen A, Lunell NO, et al. Endothelin-1 and big endothelin-1 levels in normal term pregnancy and in preeclampsia. Regul Pept 1996;67:211-6.
4) Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. Am J Reprod Immunol 1992;27:101-8.
5) Lee HS, Park SH, Lee WS, Kim SY, Sung IK, Chun CS. the effect of preeclampsia mother's serum and her neonatal cord blood on the activity of soluble adhesion molecules (sICAM-1) and apoptosis in Cultured human umbilical venous endothelial cells (HUVEC). J Korean Soc Neonatol 2004;11:160-9.
6) Brazy JE, Grimm JK, Little VA. Neonatal manifestations of severe maternal hypertension occurring before the thirty-sixth week of pregnancy. J Pediatr 1982;100:265-71.
7) Ananth CV, Peedicayil A, Savitz DA. Effect of hypertensive disease in pregnancy on birth weight, gestational duration, and small for gestational age. Epidemiology 1995;6:391-5.
8) Kim SY. neonatal outcome in the hypertensive disorders of pregnancy. The Korean Journal of Perinatology 2002;13:247-53.
9) Ferrazzi E, Bulfamante G, Mezzopane R, Barbera A, Ghidini A, Pardi G. Uterine Doppler velocimetry and placental hypoxic-ischemic lesion in pregnancies with fetal intrauterine growth restriction. Placenta 1999;20:389-94.
10) Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction. An International Journal of Obstetrics and Gynaecology 2002;109:836-39.
11) Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diaetologia 1993;36:62-7.
12) Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. BMJ 1991;303:1019-22.
13) Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ 1989;298:564-7.
14) Barker DJ, Meade TW, Fall CH, Lee A, Osmond C, Phipps K, et al. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. BMJ 1992;304:148-52.

15) Robinson S, Walton RJ, Clark PM, Barker DJ, Hales CN, Osmond C. The relation of fetal growth to plasma glucose in young men. Diabetologia 1992;35:444-6.
16) Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Semin Reprod Endocrinol 1998;16:5-15.
17) Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1986;1:1077-81.
18) Rust OA, Bofill JA, Zappe D H, Hall JE, Burnett JC, Martin JN. The origin of endothelin-1 in patients with severe preeclampsia. Obstet Gynecol 1997;89:754-7.
19) Yanik FF, Amanvermez R, Yanik A, Celik C, Kokcu A. Pre-eclampsia associated with increased lipid peroxidation and decreased serum vitamin E levels. Int J Gynaecol Obstet 1999;64:27-33.
20) Walsh SW, Wang Y. Secretion of lipid peroxides by the human placenta. Am J Obstet Gynecol 1993;169:1462-6.
21) Hubel CA, McLaughlin MK, Evans RW, Hauth BA, Sims CJ, Roberts JM. Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum. Am J Obstet Gynecol 1996;174:975-82.
22) Wang YP, Walsh SW, Guo JD, Zhang JY. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. Am J Obstet Gynecol. 1991; 165:1695-700.
23) Sudo N, Kamoi K, Ishibashi M, Yamaji T. Plasma endothelin-1 and big endothelin-1 levels in women with preeclampsia. Acta Endocrinol 1993;129:114-20.