Hypoxia에 의한 X-linked Inhibitor of Apoptosis 발현이 태반 내 영양막세포의 세포자멸사에 미치는 영향

차의과학대학교 의생명과학과[1], 강남 차 메디컬센터 산부인과[2]

이종성[1] · 전수연[1] · 최종호[1] · 이유진[1] · 차동현[2] · 김기진[1*]

Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta

Jong Sung Lee[1], Su Yeon Jeon[1], Jong Ho Choi[1], Yoo-Jin Lee[1], Dong-Hyun Cha[2], Gi Jin Kim[1*]

[1]Department of Biomedical Science, CHA University School of Medicine,
[2]Department of Obstetrics and Gynecology, Kangnam CHA Medical Center, Seoul, Korea

Objective: Apoptosis plays an important role for the maintenance of the normal pregnancy. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is able to effectively prevent apoptosis and controls trophoblast cells death throughout placental development, but it is still unknown in the function of XIAP in trophoblast cells exposed to hypoxic condition, which is one of the factors causing preeclampsia. Therefore, we conducted to compare XIAP expression in normal and pre-eclamptic placenta tissues and analyzed the function of XIAP in HTR-8/SVneo trophoblast cell line exposed to hypoxic condition.

Methods: The expression of XIAP was analyzed in placental tissues from the following groups of patients (none underwent labor): 1) term normal placenta (n=15); 2) term with pre-eclamptic placeneta (n=15); and 3) pre-term with pre-eclamptic placenta (n=11) using semi-quantitative RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot. In order to evaluate the function of XIAP in HTR-8/SVneo trophoblast cells under hypoxic condition, HIF-1α plasmids, and hypoxic condtion were transfected and treated into HTR-8/SVneo trophoblast cells for 24 hours, respectively.

Results: We observed that XIAP are expressed in the syncytiotrophoblasts and syncytial knot of placental villi. The expression of XIAP was significantly decreased in preeclamptic placenta tissues than in normal placenta tissues without labor ($p<0.05$). Furthermore, we confirmed the XIAP expression in HTR-8/SVneo trophbolast cells exposed to hypoxia was translocated from cytoplasm into nucleus and decreased XIAP by hypoxic condition induced apoptosis in HTR-8/SVneo trophoblast cells through up-regulation of pro-apoptotic proteins.

Conclusion: These results suggest that the expression of XIAP is involved in placental development as well as decreased expression of XIAP by hypoxia is associated with pre-eclampsia through inducing trophoblast cells apoptosis.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(3): 217-229.]

Key Words: X-linked inhibitor of apoptosis, Pre-eclampsia, Apoptosis, Hypoxia, Trophoblast cells

접수일: 2010년 8월 19일, 수정일: 2010년 9월 10일, 게재확정일: 2010년 9월 17일
주관책임자: 김기진, 우) 135-097 서울특별시 강남구 역삼동 606-16, 차의과학대학교 의생명과학부
Tel: (02) 3468-3687, Fax: (02) 538-4102, e-mail: gjkim@cha.ac.kr
*본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제번호 A084923).

태반은 임신 기간 동안 영양외배엽 (trophectoderm)의 분화와 발달 과정을 통해 형성되는 기관으로, 영양막세포, 혈관세포, 면역세포, 간질세포 (stromal cells) 등 다양한 세포들로 구성되어 태아 성장에 필요한 영양 성분, 노폐물, 그리고 산소 공급 등을 모체와 태아간 전달시켜주는 역할을 한다.[1] 복잡한 태반 구조의 대부분은 영양막세포로 구성되어 있으며, 이러한 영양막세포는 형태, 위치, 기능에 따라 크게 융모성 영양막세포 (villous trophoblast)와 비융모성 영양막세포 (extravillous trophoblast)로 구분될 수 있는데, 융모성 영양막세포는 상피세포층 (epithelial layer)을 덮고 있으면서 모체의 혈액과 바로 접촉하여 여러 가지 영양물질, 노폐물, 그리고 산소 및 이산화탄소의 교환을 유도한다. 반면, 비융모성 영양막세포는 자궁내막 상피세포 조직을 침윤하여 모체 간질세포들과 면역세포들간의 상호작용을 통해 임신 유지에 중요한 역할을 한다. 이러한 특징은 영양막세포의 증식, 분화 과정, 그리고 세포자멸사 (apoptosis)에 따라 특징지어질 뿐 아니라 영양막세포의 기능을 조절하는데 중요한 요인이 된다. 특히, 과도한 세포자멸사 또는 부적절한 세포자멸사에 의한 영양막세포의 수와 기능의 저하는 태반 발달 동안 자간전증 (pre-eclampsia) 등과 같은 심각한 산부인과 질환을 유발하고 심지어는 태아의 조산이나 사산과도 직결될 수 있다고 알려져 있다.[2,3]

자간전증은 임신한 여성에게서 나타나는 대표적인 산과 질환으로, 임신 20주 이후 고혈압과 단백뇨, 그리고 부종 등을 수반하는 특징을 보이며, 전 세계적으로 자간전증 산모의 약 10%에서 산모와 신생아의 사망률이 보고될 만큼 산과 질환에서 위험한 질환으로 알려져 있다.[4,5] 미국의 경우 자간전증은 전체 임신의 7~10%의 높은 빈도로 나타나고,[6] 우리나라에서는 전체 임신부의 약 5%가 자간전증으로 진단되지만, 그 원인과 기전은 현재까지 잘 알려져 있지 않고, 다만, 자간전증의 대표적 유발요인으로는 외부 환경적인 요인으로 융모의 저산소 상태 (hypoxic condition)와 태반 혈관내피세포의 기능 이상으로 감소된 혈관류가 알려져 있다. 최근 연구결과에 따르면 임신 기간 중 초기 3개월 동안을 의미하는 임신 초기의 태반조직은 산소농도가 낮은 상태에서 혈관의 증식과 영양막세포의 분화가 활발히 유발되지만 산소농도가 증가하면서 급격히 분화된 영양막세포들인 합포영양막세포 (syncytiotrophoblast)의 변이와 자극을 받아 그 기능에 영향을 미치고, 임신 중반 이후 모체의 자궁내막으로의 영양막세포의 침윤이 활발이 진행되어 확대된 혈관을 통하여 태아와 모체간에 혈류량이 증가되면서 태반조직 내의 산소의 농도가 증가된다. 따라서, 적절한 산소농도의 변화는 영양막세포의 정상적인 분화와 기능의 변화를 유도하게 되는데, 이러한 균형이 깨짐으로 태반의 발달뿐 아니라 자간전증과 같은 산과 질환을 유발할 수 있는 중요한 요소이다.[4]

세포자멸사은 이미 세포 내에 예정된 프로그램으로 세포가 죽는 방식 중 유전자에 의해 제어되는데, 세포의 병적인 죽음인 괴사 (necrosis)와는 구별된다.[6] 이러한 세포자멸사는 생리학적으로 발달 과정, 항상성 유지, 그리고 면역방어에서도 중요한 기능을 한다.[7] 또한, 이러한 세포자멸사는 임신 초기의 자궁 성장의 억제, 태반의 발달, 그리고 자간전증과 같은 산과 질환에도 관여된다고 보고되어 있다.[2,8] 이러한 세포자멸사 조절은 inhibitors of apoptosis (IAP) family에 의한 조절될 수 있는데, IAP family 유전자에서 발현된 단백질은 아미노산 70개 정도로 이루어진 baculoviral IAP repeat (BIR) 단백질들과 상호작용을 통하여 세포자멸사를 억제한다.[9] 이 IAP family 중 X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) 유전자는 세포자멸사에 있어서 가장 유력하고 다양한 조절인자로 알려져 있으며, 미토콘드리아 매개 세포자멸사 경로인 caspase-9과 상호작용하여 세포자멸사 경로의 진행을 막는다고 보고되어 있다.[10,11] XIAP의 발현은 사람 태반 발달에서도 세포자멸사의 조절에 관여한다고 알려져 있으나,[12] 저산소성에 의한 영양막세포에서의 XIAP의 발현과 기능에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 정상 태반조직과 자간전증 산모의 태반조직에 XIAP의 발현 양상의 차이를 분석하고, 임신중독 유발인자인 저산소증에서의 XIAP 발현과 기능을 임신 초기 영양막세포로부터 만들어진 영양막세포주 (HTR-8/SVneo trophoblast cell line) 모델을 이용하여 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 태반조직 수집 및 조직 검사

정상 태반조직 (n=15)은 37~38주 사이의 의학적, 산과적, 그리고 수술에 의한 합병증이 관찰되지 않은 건강한 산모로부터 얻었으며, 자간전증 태반은 산모환자의 수축기 혈압 140 mm Hg 이상, 이완기 혈압 90 mm Hg인 고혈압 증상, 단백뇨 (30.0 mg 이상/24 시간뇨), 그리고 부종 등이 관찰되는 산모들을 대상으로, 임신 중기에 자간전증으로 조기 분만된 태반 (≥24주, n=11)과 임신 말기에 자간전증으로 분만된 태반 (≥37주, n=15) 등을 수집하였다. 태반조직은 태반의 태아 쪽 융모막을 포함하여 태반의 기저막부위까지 포함한 중심부위를 채취하여 태반의 중심부위 (Center, C)와 주변부위 (Peripheral, P)로 구분하고, 헤마톡실린-에오신 (Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색을 위해서 10% formalin (Junsei, Tokyo, Japan) 용액을 이용하여 고정하였다. 고정된 조직들은 파라핀왁스로 포매 후 파라핀 블록을 제작하였다. H&E 염색을 이용한 조직 검사는 통상적인 방법을 이용하여 hematoxyline과 eosin 염색을 이용하여 실시한 후 탈수와 청명 단계를 거쳐 봉입하였다. 사용된 태반은 모든 산모에게서 태반조직 수집 허가 동의서를 받았고, 수집된 태반조직에 관한 연구는 차병원의 IRB로 부터 승인되었다 (승인번호: 2006-12).

2. 영양막세포주 배양

임신 초기 영약막세포주는 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco, Logan, UT, USA)와 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco)가 첨가된 RPMI-1640 배지 (Gibco)에서 37℃ 온도에서 5%의 CO_2가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 세포의 배양 용기 표면의 약 80~90% 수준으로 충분히 자랐을 때 0.05%의 trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 TrypLE Express 용액 (Gibco)으로 2분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 계대 배양을 실시하였다. 또한, 1% 농도로 산소가 공급되는 조건에서 12시간과 24시간 동안 처리한 후 각 세포들을 수확해서 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)과 Western blot을 실시하였다.

3. Total RNA 분리 및 semi-quantitative RT-PCR

영양막세포주와 태반으로부터 얻은 조직은 각각 RNeasy RNA isolation kit (QIAGEN, Hilden, Germany)와 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 특히, 태반의 경우 -80℃에 보관한 태반조직을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 파쇄한 후 TRIzol reagent을 가하고 얼음에서 10분간 반응시킨 후 초음파로 파쇄하였다. 추출한 RNA는 nanodrop spectrophotomer (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하였다. 추출한 1 μg RNA와 50 mM oligo dT, 10 mM dNTP mix (Invitrogen), DEPC-D.W. (Invitrogen) 등을 이용하여 65℃에서 5분간 반응시키고 5X first-strand buffer, 0.1 mM DTT, RNase-out, 그리고 superscript III RT (Invitrogen)를 첨가한 후 50℃에서 1시간, 72℃에서 15분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 XIAP 유전자 특이적 프라이머와 H-Taq polymerase kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 반정량적 PCR (semi-quantitative PCR)을 실시하였다. PCR product는 1.2% agarose gel (Cambrex, Rockland, ME, USA)을 사용하여 전기영동으로 분리시킨 후 0.5 mg/mL ethidium bromide (Promega, Madison, WI, USA)로 염색을 하여 quantity video image analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 DNA 밴드를 시각적으로 확인하였다. 각각 증폭된 DNA의 발현차이를 규명하기 위하여, 각 밴드의

intensity를 Quantity One program (Bio-Rad)를 이용하여 유전자의 발현양을 측정하였고, 정상적인 세포에서 일정하게 발현되는 28s rRNA 유전자을 함께 증폭하여 28s rRNA의 발현을 기준으로 각 그룹별 발현 정도를 정량화하기 위해 반정량적으로 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다. 사용된 XIAP 프라이머 염기서열은 5'-GTG ACT AGA TGT CCA CAA GG-3' (sense), 5'-CTT GAG GAG TGT CTG GTA AG-3' (anti-sense) 그리고, 28s rRNA 프리이머의 염기서열은 5'-TTG AAA ATC CGG GGG AGA G-3' (sense)과 5'-ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG-3' (anti-sense)로 제작하여 이용하였다.

4. 면역염색법을 이용한 XIAP 발현 관찰

파라핀 포매한 태반절편조직은 Xylene (Junsei)으로 탈파라핀 시키고 에탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)을 이용하여 함수 과정을 거친 후 proteinase K (DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 0.05 M Tris-Hcl (pH 7.5)에 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 조직 내 고정액에 의해 변성된 항원의 회복을 유도하였다. PBS 용액으로 세척한 후 normal blocking 용액 (DAKO)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 Anti-XIAP (1:50 희석, R&D system, Minneapolis MN, USA) 항체를 조직에 첨가하여 4℃ 냉장에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 이후에 PBS 용액으로 3차례 수세한 후 메탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)에 3%의 H_2O_2 용액을 만들어 조직 내에 가하여 실온에서 8분간 반응시켜 조직 내 존재하는 내재성 peroxidase를 제거시켰다. 그 후 PBS 용액으로 수세 후 biotin이 표지된 2차 항체 (DAKO)를 실온에서 30분간 반응시키고, 수세 후 streptavidin-HRP (DAKO)를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate-chromogen solution (DAB, VECTOR, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 발색을 하였으며, 발색이 끝난 조직은 수세한 뒤 Mayer's hematoxylin 용액 (DAKO)으로 핵 염색을 실시하였다.

또한, 2×10^4개의 HTR-8SV/neo 영양막세포를 12시간 동안 배양한 후 1% hypoxia 상태로 12시간과 24시간 동안 처리한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 고정하고 PBS로 수세한 후 0.2% Tween-20을 포함하는 PBS 용액으로 5분간 침투화 (permeabilization) 시켰다. PBS 용액으로 세척한 후 normal blocking 용액 (DAKO)으로 실온에서 30분간 동안 반응시키고, Anti-XIAP (1:50 희석, R&D system) 항체를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰으며, Rhodamine-conjugated chicken anti-goat 이차항체 (1:400 희석, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS 용액으로 수세하였다. 그리고 핵 대조 염색을 위하여 PI를 함유한 봉입 용액 (Dako)을 이용하여 봉입한 후 형광현미경 (Axioskop2, Carl Zeiss Microimaging, Germany)을 이용하여 XIAP 발현을 분석하였다.

5. Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

액체질소를 이용하여 급속 냉동으로 얼린 태반조직은 막자 사발에 갈아 분말 상태로 만든 후 단백질 추출 용액으로 용해하고 초음파로 파쇄한 후 1,300 rpm으로 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 또한, 대조군과 hypoxia 조건에서 배양한 영양막세포주는 PBS 용액 (Gibco)으로 세척하고 0.05%의 trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 TrypLE Express 용액 (Gibco)으로 부유시켜 원심분리로 세포를 수집하였다. 수집된 세포에 protein extraction solution (Intron, Seoul, Korea)을 첨가한 후 초음파를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 태반조직과 세포는 4℃의 온도에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 한 후 상층액을 수거하였으며, 단백질의 농도는 BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다.

세포의 핵 단백질과 세포질 단백질의 분리는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Pierce)을 이용하여 분리하였다. 수확된 세포들은 단백효소억제제가 포함된 CER I 버퍼 (CER I buffer)에서 10분간 얼음 위에서 반응한 후 CER II 버퍼 (CER II buffer)를 동량 첨가하여 잘 혼합하여 얼음에서 1분간 반응시켰다. 원심분리 후 상층액

(세포질 분획)을 수거하였고, 핵을 포함하는 불용성 침전물에는 NER 버퍼 (NER buffer)를 첨가하여 얼음에서 40분간 반응 시킨 후 원심분리하여 핵 단백질을 포함하는 단백질층을 회수하였다. 각각 분리된 핵 단백질과 세포질 단백질 분획으로부터 20 μg씩을 Western blot 시에 사용하였다.

Western blot 분석을 위해서 총 40 μg의 단백질은 95℃의 온도에서 5분 동안 반응시킨 후, 12% SDS-PAGE를 통해 전기영동한 후 PVDF membrane (Bio-Rad)으로 단백질을 이동시켰다. PVDF Membrane은 5%의 탈지분유 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 담아 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 anti-XIAP (1:2,000, R&D system)와 apoptosis 관련 항체인 anti-Bak (1:2,000 희석, EPITOMICS, Burlingame, CA, USA), anti-caspase-3 (1:500 희석, Cell Signaling Technology), anti-caspase-9 (1:4,000 희석, R&D systems), anti-Bcl-2 (1:500 희석, Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA), anti-hypoxia-inducible factor (HIF)-1α (1:1,000, Seoul National University, Department of Pharmacology, Seoul, Korea) 그리고, anti-β-actin (1:5,000 희석, Santa Cruz Biotechnology) 등을 첨가하여 4℃ 냉장에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit (1:5,000 희석, Bio-Rad) 또는 mouse (1:10,000 희석, Bio-Rad) 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 후, ECL Advance Western blot detection kit (Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 peroxidase 활성을 밴드로 시각화하여 단백질 발현을 검출하였다.

6. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 분석

Hypoxia 처리 및 정상 상태에서 각각 회수된 5×10^5개의 영약막세포들을 dissociation buffer (Gibco)를 이용하여 분리한 후 2% cold formaldehyde 용액으로 세포를 4℃에서 30분간 고정하였다. 고정된 후 PBS로 수세 후 blocking buffer로 1분간 blocking 한 후 FITC-conjugated XIAP (1:50, BD Biosciences), APC-conjugated CD95 (1:50, BD Biosciences), 그리고 PE-conjugated CD178 (1:50, BD Biosciences) 항체를 이용하여 4℃의 어두운 곳에서 30분간 반응시킨 후 0.2% Tween 20을 포함하는 PBS 용액으로 3회 수세 후 buffer로 1 mL로 부유시킨 후 FACS Vantage flow cytometer (BD Biosciences)으로 분석하였다.

7. Statistical analysis

정상 산모와 자간전증 환자 산모의 태반조직은 RT-PCR 분석에서 Student's unpaired t-test를 이용하여 분석하였고, $p<0.05$를 통계적으로 유의한 (statistical significance) 결과로 판정하였다.

결 과

1. 정상 태반과 자간전증 태반의 형태학적 비교

태반의 기능은 태반 융모의 발달에 따라 차이를 보인다. 따라서, 정상 산모의 태반과 임신 중기 (2^{nd} trimester), 그리고 임신 말기 (3^{rd} trimester)의 자간전증 산모의 태반조직의 융모 발달 및 형태학적 차이를 H&E 염색으로 비교하였다. 정상 태반조직에서는 태반조직을 탯줄의 위치를 기준으로 구분할 수 있는 중앙부와 주변부로 나누어 태반 융모 (placenta villi)와 기저막 (basal plate) 부위의 융모의 상태를 관찰한 결과, 중앙과 주변 부분의 모든 융모의 발달이 정상적으로 잘 발달된 것이 관찰되었다 (Figure 1A, 1B). 반면, 중기 자간전증 태반에서는 말기 자간전증 태반보다 융모의 형태학적 변화들이 관찰되었는데, 특히, syncytiotrophoblast의 융합에 의해 구성된 결절 (knotting)들이 증가된 것이 관찰되었고, 이러한 현상은 정상 산모의 태반보다 자간전증 산모의 태반조직에서 특히 자간전증의 상태가 심한 임신 중기의 자간전증 산모의 태반조직에서 증가하였다 (Figure 1A, 1B).

2. 태반조직 내 XIAP 발현

정상 태반과 자간전증 태반에서의 XIAP 발현을 분석하고자 정상 태반 (n=15), 중기 자간전증 태

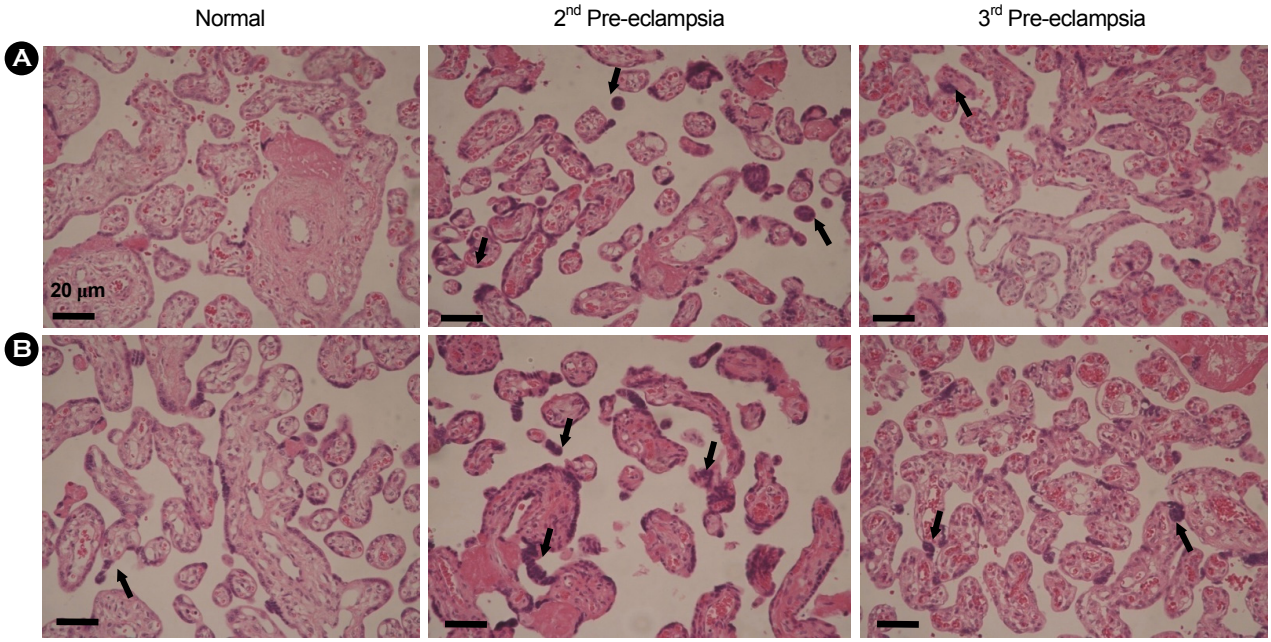

Figure 1. Histological analysis in normal and pre-eclamptic placentas with H&E staining. Histological analysis in placental central part (A) and placenta peripheral part (B) using H&E staining. 2nd PE and 3rd PE indicate pre-eclampsia at second trimester and third trimester, respectively. Arrows indicate syncytiotrophoblast cells knotting (×200; scale bar, 20 μm).

Jong Sung Lee. Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta. Korean J Reprod Med 2010.

반 (n=11), 그리고 말기 자간전증 태반 (n=15)을 이용하여, 태반의 중앙부위에서 태아쪽 융모막을 (chorionic membrane) 포함하여 태반의 산모 쪽 부위인 탈락막까지 조직을 회수하여 28s rRNA 발현양을 기준으로 semi-quantitative RT-PCR 분석을 실시하였다. XIAP의 mRNA 발현은 중앙부위와 주변부위 모두에서 정상 태반조직보다 각 자간전증 태반조직 모두에서 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다 (p<0.05) (Figure 2A). 그러나, 중기와 말기 자간전증 태반간의 XIAP mRNA 발현의 유의성은 나타나지 않았다.

XIAP의 단백질 발현을 정상 태반조직과 자간전증의 태반조직에서 분석한 결과, 자간전증 태반의 경우 중앙부위와 주변부위에서 정상 태반보다 XIAP 발현이 감소됨이 관찰되었다 (Figure 2B). 특히, 임신 중기의 주변부위에서의 XIAP 발현의 현저한 감소가 관찰되었다. 또한, XIAP의 발현 위치를 확인하고자 태반조직을 이용하여 조직면역화학법을 이용하여 분석한 결과, 정상 태반 15개의 샘플 대부분에서 융모의 바깥쪽에 존재하는 syncytiotrophoblast와 knotting에서 XIAP의 발현이 관찰된 반면, 임신 중기 자간전증 태반 11개 샘플의 주변부위에서는 전반적인 XIAP 발현의 감소가 관찰되었나, 임신 말기 자간전증 태반 15개의 샘플에서는 중앙부와 주변부에서 XIAP 발현의 차이가 관찰되지 않았다 (Figure 2C).

3. 정상 및 임신중독증 태반 내에서의 hypoxia와 세포자멸사 유전자의 발현 변화

정상 태반조직과 자간전증 환자의 태반조직 내에서 hypoxia 관련 인자의 발현과 이에 따른 세포자멸사 유전자들의 발현 여부를 분석하고자, 각각의 태반을 중심부위와 주변부위로 각각 채취하여 단백질을 분리한 후 Western blot analysis를 수행하였다. Figure 3의 결과에서와 같이 hypoxia 환경에서 발현이 유발되는 HIF-1α의 발현은 중기 자간전증

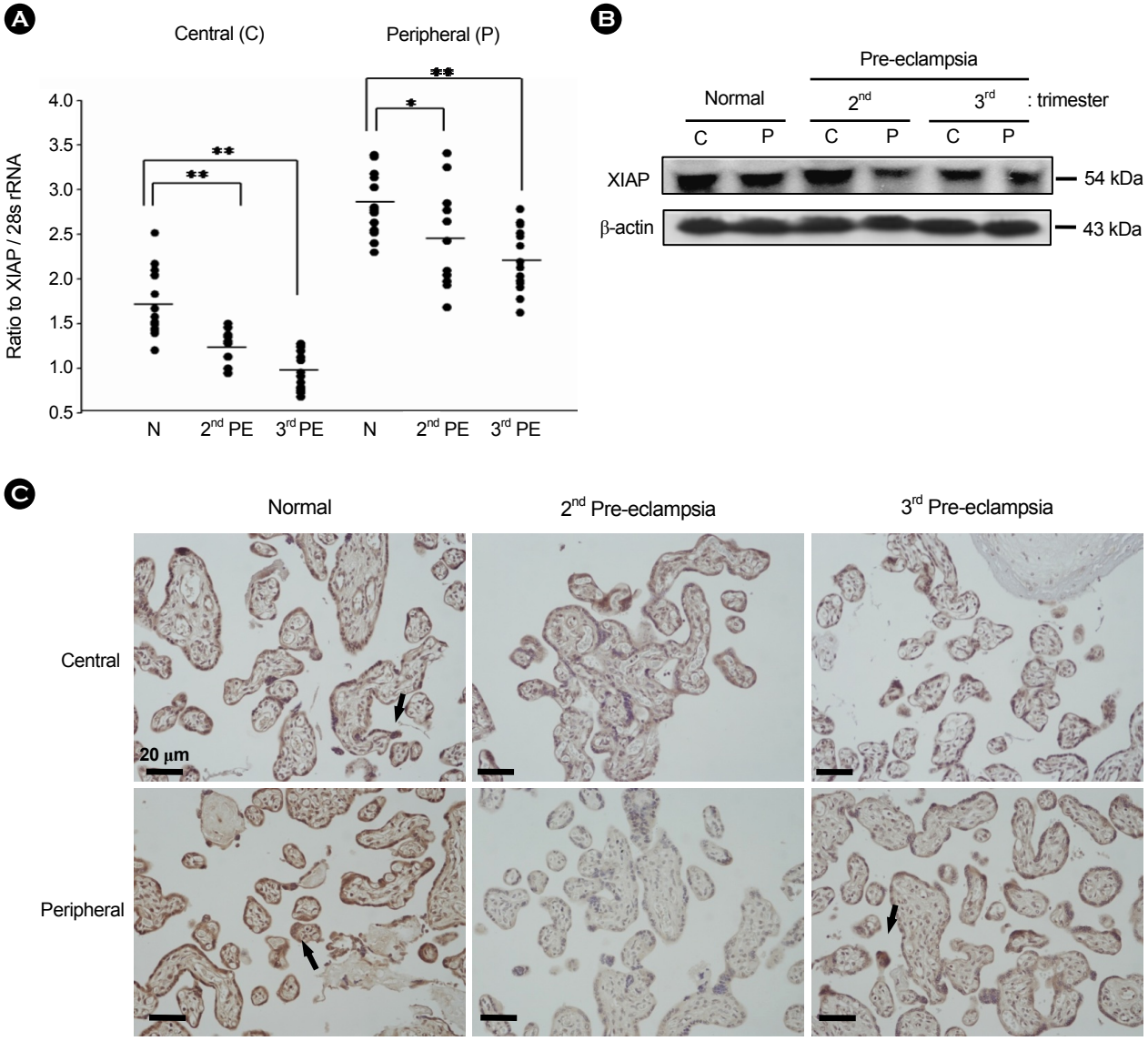

Figure 2. Expression of XIAP in normal and pre-eclamptic placentas. Densitometric analysis of XIAP mRNA expression relative to 28s rRNA expression (A). Data are expressed as mean±SD. Statistical analysis was carried out by unpaired Student's t-test ($^{**}p<0.05$). 2nd PE and 3rd PE indicate pre-eclampsia at second trimester and third trimester, respectively. Central and peripheral mean central part and peripheral part of placenta. Expression of XIAP in normal and pre-eclamptic placentas using anti-XIAP antibody with Western blot. C and P indicate central part and peripheral part of placenta. β-actin was used to internal control. Expression of XIAP on central and peripheral part of placenta by immunohistochemistry (×200; scale bar, 20 μm). Arrows indicate positive for XIAP in syncytiotrophoblast cells knotting.

Jong Sung Lee. Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta. Korean J Reprod Med 2010.

태반에서 중앙부보다 주변부위에서 발현이 증가됨이 관찰되었으나, 말기 자간전증 태반에서는 정상 태반에서의 발현과 큰 차이는 관찰되지 않았다. 또한, anti-apoptotic factor로 알려져 있는 Bcl-2 단백질의 변화는 중기 자간전증 태반의 주변부위에서 감소되는 양상이 관찰되었으며, pro-apoptosis factor로 알려진 caspase-3와 caspase-9의 active 형태의 단백질은 자간전증 태반에서 증가되는 양상이 관찰되

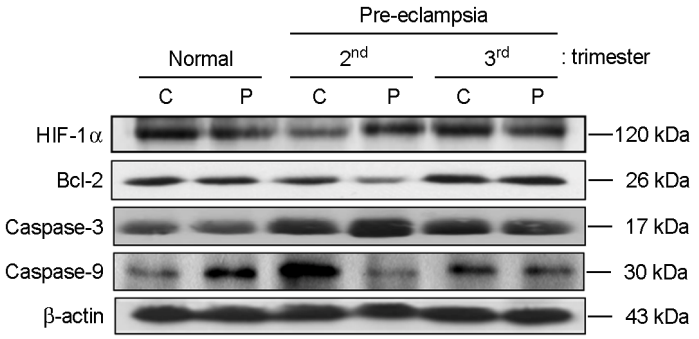

Figure 3. Expression of apoptosis-related proteins in normal and pre-eclamptic placentas. 2nd PE and 3rd PE indicate pre-eclampsia at second trimester and third trimester, respectively. C and P indicate central part and peripheral part of placenta. β-actin was used as an internal control.

Jong Sung Lee. Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta. Korean J Reprod Med 2010.

었다 (Figure 3). 이러한 결과를 통해 정상 태반조직보다 자간전증 산모의 태반에서 세포자멸사 관련 인자들의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

4. Hypoxia에 의한 영양막세포에서의 XIAP 발현 분석

자간전증을 유발하는 요인 중에 하나인 hypoxia로 인해 HIF-1α의 발현이 유발되는데, 이러한 HIF-1α의 발현은 태반조직에서 일부 증가되는 요인이 관찰되었다. 따라서, hypoxia에 의한 영양막세포에서의 XIAP 발현의 관계를 알아보고자, 영양막세포주에 12시간과 24시간 동안 hypoxia를 처리한 후 XIAP 발현 양상을 면역형광염색과 Western blot 방법을 통하여 분석하였다. 정상적인 산소 분압에서의 XIAP 발현은 영양막세포의 세포질에서 발현이 관찰된 반면, hypoxia를 12시간, 24시간 동안 처리한 결과, XIAP 발현은 점차 핵으로 이동되는 것이 관찰되었다 (Figure 4A). 이러한, hypoxia에 의한 XIAP 단백질의 발현 세포질에서 핵으로의 이동은 세포질과 핵 단백질의 분리 후 western blot 방법을 통하여 확인하였다. 특히, 핵으로 이동된 XIAP의 비활성화 상태인 34 kDa이 hypoxia 처리에 따라 증가되는 것이 관찰되었다 (Figure 4B).

5. 영양막세포에서 hypoxia에 의한 XIAP 발현과 apoptosis 관련 단백질의 발현 분석

Hypoxia 상태로 24시간 동안 처리된 영양막세포에서 FACS 분석을 통해 apoptosis를 유발하는 FAS (CD95)와 FAS ligand (CD178)의 발현을 분석한 결과, 정상적인 산소 분압보다 hypoxia 상태에서 FAS의 발현이 증가되는 것이 확인되었다 (Figure 5A). 또한, hypoxia 상태에서 영양막세포에서 XAIP 발현이 감소되면서 세포자멸사를 유발하는 활성화 형태의 caspase-3의 발현이 증가되었다 (Figure 5B).

고 찰

태반 내 영양막세포는 임신 초기에 배아의 착상을 시작으로 임신주기 동안 태아의 발달과 태반을 형성하는 중요한 세포의 일종으로 증식, 분열, 분화, 세포자멸사 등의 다양한 세포생물학적 기전을 통하여 태반의 발달과 기능을 조절하는 역할을 한다.[1,13] 이러한 영양막세포는 그 기능과 특징에 따라 크게 섬유성 합포영양막세포 (villous syncytiotrophoblast)와 세포외영양막세포 (extravillous trophoblast)로 구분이 되는데, 이중 섬유성 합포영양막세포는 일종의 영양막 줄기세포 (trophoblast cellsstem cell)라고도 알려져 있는 세포영양막 (cytotrophoblast)의 세포간 융합 (cell-cell fusion)에 의해 분화 형성되어 이수성 (aneuploidy)의 특징을 갖게 되며, 다양한 호르몬의 합성 및 분비 뿐 아니라 모체와 태아간의 물질 이동 시 유해 물질을 걸러내는 barrier 역할을 하면서, human chorionic gonadotrophin을 분비하여 임신을 유지시키는 역할을 한다.[3,14] 기능을 마친 합포영양막세포는 포합체결절 (syncytiotrophoblast cellsknotting)이라는 단계를 거쳐 태반 내 혈액으로 배출되어 세포자멸사에 의해 제거된다.[3] 그러므로, 영양막세포의 증식과 분화, 그리고 세포자멸사간의

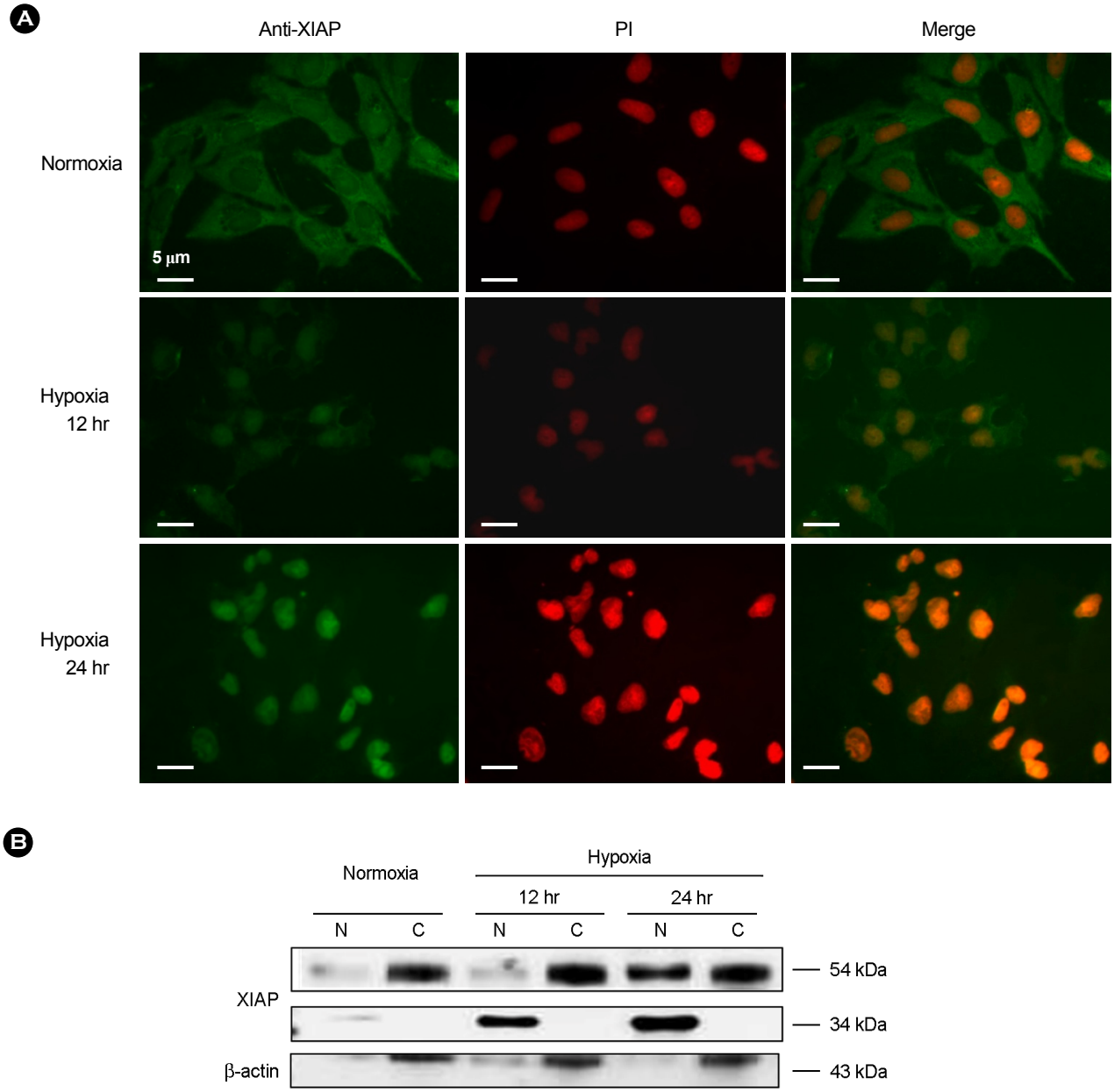

Figure 4. Translocation of XIAP protein expression in HTR-8 SV/Neo trophoblast cell line under hypoxia. Expression of XIAP in HTR-8 SV/Neo trophoblast cells exposed to hypoxia by immunofluorescence (A). Rhodamine-conjugated chicken anti-goat secondary antibody was used to detect the positive cells for anti-XIAP antibody. Nucleus stained by PI staining. Expression of XIAP in HTR-8 SV/Neo cells exposed to hypoxia using Western blot (B). N and C mean nuclear fraction and cytoplasmic fraction of HTR-8 SV/Neo trophoblast cells exposed to hypoxia, respectively. β-actin was used to internal control (Scale bars=5 μm).

Jong Sung Lee. Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta. Korean J Reprod Med 2010.

균형은 영양막세포의 기능 및 태반의 발달에 중요한 요인으로 작용한다.

세포자멸사는 생리학적으로 발달 과정, 항상성 유지, 그리고 면역방어에서 중요한 기능을 하며,[7] 사람의 정상 태반의 발달에 있어서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.[2,8] 세포자멸사는 임신 기간

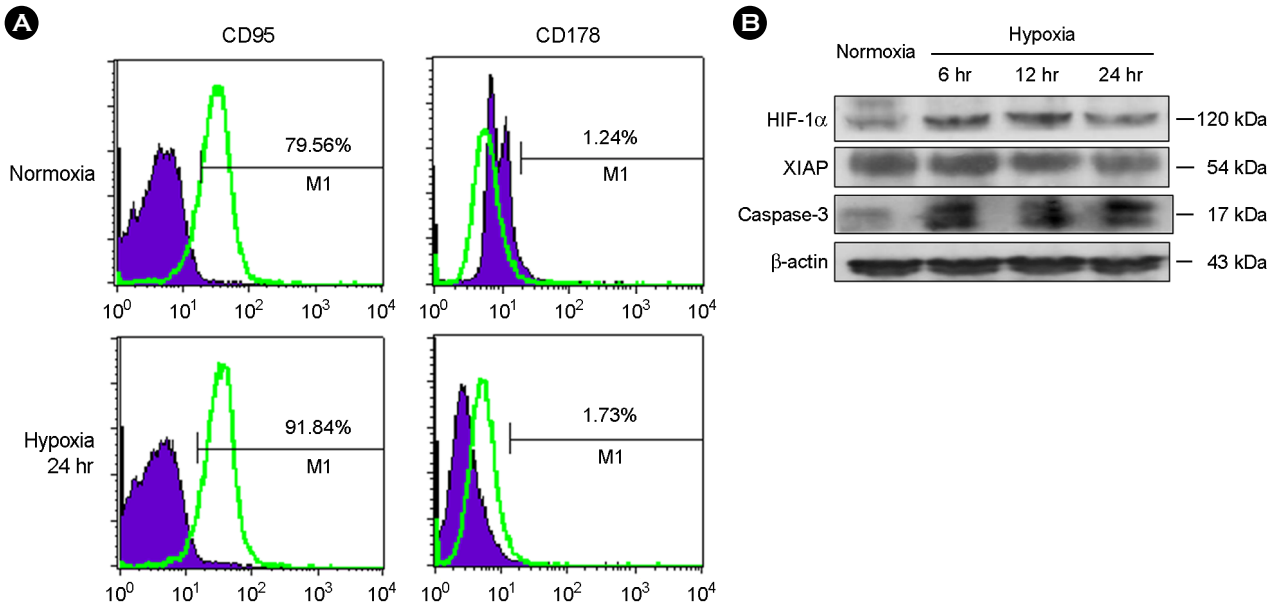

Figure 5. Expression of apoptosis-related proteins in HTR-8 SV/neo trophoblast cell lines by hypoxia. Expression of FAS (CD95) and FAS ligand (CD178) in HTR-8 SV/Neo trophoblast cell line exposed to hypoxia using fluorescence-activated cell sorting analysis (A). The percentages are indicated along with the fluorescence intensities. Caspase-3 and XIAP expression in HTR-8 SV/Neo trophoblast cell line exposed to hypoxia using Western blot analysis (B). β-actin was used as an internal control.

Jong Sung Lee. Effect of Hypoxia-induced XIAP Expression on Apoptosis of Trophoblast Cells in Placenta. Korean J Reprod Med 2010.

전체에 걸쳐 일어나는데, 이는 태반의 영양막세포의 기능 유지와 생존 관련 조절에 매우 중요하다고 알려져 있다.[15] 하지만, 자간전증 산모의 태반에서 일어나는 세포자멸사의 원인 및 메커니즘에 관해서는 연구가 필요한 실정이다.[16] 본 연구결과에서도 정상 태반과 자간전증 산모의 태반조직을 조직학적 분석을 실시한 결과, 정상 태반조직에 비해 자간전증 산모의 태반조직의 합포영양막세포와 포합체결절에서 세포자멸사가 많이 일어났음을 알 수 있었다. 또한, 임신 중기의 자간전증 산모의 태반에서 가장 많은 세포자멸사의 양상을 보였는데, 중심부위보다 주변부위에서 더 많은 세포자멸사의 양상이 관찰되었다. 이는 태반으로 공급되는 혈액이 중심부위에서 말초부위로 전달되기 때문에 상대적으로 산소 공급이 적은 말초부위에서 더 많은 세포자멸사의 양상을 보이는 것이라 생각된다.

임신 기간 동안 자간전증 산모의 태반에서는, 혈류의 저산소 상태가 유발되어 저산소 상태의 자극에 의해 산화적 스트레스를 받아 세포자멸사가 유발되어 허혈성 조직손상이 일어난다고 보고되어 있다.[17] Hypoxia에 의해 유도되는 대표적인 단백질인 HIF-1α은 저산소 상태의 초기 단계에서 HIF-1α의 발현이 증가되어 HIF-1β와 결합함으로써 핵 내로 전이된 후 전사인자로서 작용하여 저산소 상태에서 세포의 항상성을 유지할 수 있는 여러 가지 기능의 하위 단백질들을 만들게 함으로써 세포, 조직 그리고 기관에서의 항상성을 유지하게 하는 기능을 한다고 알려져 있다.[18] HIF-1α의 발현은 자간전증 산모의 태반에서 증가하는 것으로 보고된 바 있는데,[18] 본 연구에서는 큰 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 이유는 HIF-1α의 짧은 반감기와 각 태반조직 간의 pooling 단계 등을 통하여 일부 HIF-1α 단백질의 degradation로 인한 오차에 의한 것으로 생각된다.

저산소 상태 (hypoxia)는 미토콘드리아를 통한 신호전달 체계로 Bak의 발현을 증가시켜 세포자멸

사를 유도한다고 보고된 바가 있다.[2,19,20] Bak의 경우 미토콘드리아에서 cytochrome C를 내보내도록 하여 세포자멸사를 유도하는 물질이므로,[19,20] 본 연구결과에서 그 발현되는 양이 더 증가할 것으로 예측되었지만, Bak의 양을 Western blot 분석한 결과, 정상 태반조직과 자간전증 산모의 태반조직간에 큰 발현 패턴의 차이를 보이지 않았다. 이는 태반의 세포자멸사의 경로로써 Bak 매개의 세포자멸사 경로를 포함한 다른 기전이 관여할 것으로 생각된다. 그리고, 저산소 상태에서는 미토콘드리아 경로 세포자멸사와 관련된 Bcl-2의 발현이 증가하여 미토콘드리아 세포막의 투과성을 감소시켜서 cytochrome C의 방출을 막아 세포의 사멸을 막는다고 보고된 바 있어,[19,21] 정상적인 태반과 자간전증 산모의 태반에서 Bcl-2 발현을 Western blot analysis를 통해 분석해본 결과, 정상적인 태반에 비하여 말기 자간전증 산모의 태반에서 Bcl-2 발현이 더 낮게 나타났다. 그 외에도 합포영양막세포와 포합체결절에서 자간전증 산모에서의 Immortalization-upregulated proteins (IMUP-2)의 발현이 증가되고, 저산소 상태에 노출된 HTR-8/SVneo 영양막세포에서도 IMUP-2가 증가되면서 세포자멸사가 증가됨을 본 연구진에서 보고하였다.[22]

XIAP은 세포자멸사 기전에 관여하는 인자 중 하나로, Apaf1에 붙어서 세포자멸사로 가는 진행을 방해하는 것으로 보고되어 있고, 사람 태반 발달에서도 세포자멸사의 조절에 관여한다고 알려져 있으나, XIAP의 세포자멸사 과정에 의한 조절 메커니즘 및 정확한 기능은 유전학적, 생화학적, 그리고 구조적인 연구는 아직 미흡한 단계이다.[10,12,23] 본 연구에서 정상 태반 및 자간전증, 그리고 저산소성에 의한 XIAP 발현을 분석한 결과, XIAP의 발현이 mRNA 단계에서는 자간전증 산모의 태반에서 XIAP의 발현 감소가 관찰되었고, 이는 태반 중심부위뿐 아니라 말초부위에서도 역시 같은 양상을 나타냈다. 또한, 단백질 수준에서의 XIAP 발현도 정상 태반 대비 자간전증 태반에서 일부 감소되는 경향이 관찰되었으나, 자간전증 태반간의 차이는 관찰되지 않았다. 정상 태반에 비해 자간전증 태반에서 XIAP의 단백질 발현 감소가 관찰되었는데, 특히 주변부위를 비교하면 임신 중기 자간전증 태반에서 가장 적게 발현하였다. mRNA 단계와 단백질 단계의 이러한 차이는 post transcriptional modification이나 환자간의 병 변의 다양성이 원인일 수 있다고 사료되고, 더 정확한 이유를 분석하기 위해서는 단백질의 인산화 과정에 대한 연구 등 조금 더 자세한 연구나 더 많은 환자들을 분석하는 등 조금 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, *in vitro* 상태에서 저산소에 의해 XIAP의 발현이 세포질에서 핵으로 이동되면서 세포자멸사를 억제하는 active XIAP는 감소하고, 핵 내에 inactive 형태의 XIAP가 증가되면서 세포자멸사 기전이 진행되는 것으로 사료되며, XIAP 발현 변화에 따른 영양막세포의 세포자멸사 기전에 대한 연구가 필요할 뿐 아니라 낮은 산소 분압 (hypoxia)과 같은 자간전증 유발 환경에서의 XIAP의 발현 및 기능에 대한 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

또한, XIAP는 caspase의 활성을 억제함으로서 직접적으로 caspase activity를 제한할 수 있고,[24] XIAP의 BIR3에 있는 홈 (groove)과 caspase-9의 N-말단이 붙어서 caspase-9의 caspase cascade 진행으로 인한 세포자멸사의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다.[11] 특히, 일반적인 세포의 생존을 위해서는 XIAP의 발현이 세포질 내에 존재하는 반면, 저산소 상태에 노출된 뇌 손상의 경우 XIAP의 발현이 세포질에서 핵 내로 이동되면서 세포의 사멸이 caspase-3의 활성화가 증가되면서 세포사멸이 증가되는 기전이 보고되었으며,[25] 임신 초기 영양막세포주에서 세포의 증식 및 분화를 조절하면서 세포자살 관련 단계에서 중요한 역할을 하는 phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase B (PIK3/AKT)의 신호전달 체계가 XIAP의 발현을 조절하여 FAS 매개 세포자살을 조절한다고 보고되었다.[26] 본 연구결과에서도, 세포자멸사 관련 단백질로써 잘 알려진 caspase-9의 발현이 자간전증 산모의 태반

에서 정상 태반에 비해 증가하였고, 태반조직 중 중앙부위에서 caspase-9의 발현이 증가되는 양상을 보였다. 또한 임신 중기 자간전증 태반의 조직 중 앙부위에 caspase-9의 발현이 주변부위보다 많이 발현되었다. 이러한, 결과는 caspase-9의 발현 증가에 의해서 정상 태반에 비해 자간전증 산모의 태반에서 세포자멸사가 더 많이 진행함을 의미한다.

결론적으로, XIAP의 발현은 자간전증 태반에서 감소되었으며, XIAP의 저하로 인한 caspase-9의 증가는 자간전증 태반에서의 세포자멸사를 더 많이 유도하였다. 또한, hypoxia에 의해 XIAP 발현이 감소되었으며, XIAP 단백질의 세포질에서 핵으로의 위치 변화는 영양막세포의 세포자멸사에 중요한 역할을 하는 것으로 관찰되었고, 이는 자간전증의 진단에 유용한 마커로써 활용하기 위한 기본적인 자료로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구에서 사용된 HIF-1α 플라스미드와 항체를 제공해주신 박종완교수 (서울의대 약리학 교실)께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Moore KL, Persaud TVN. The developing human: clinically oriented embryology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
2. Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. Apoptosis 2007; 12: 1611-22.
3. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. Am J Obstet Gynecol 2006; 195: 29-39.
4. Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. Taiwan J Obstet Gynecol 2006; 45: 189-200.
5. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. Nat Clin Pract Nephrol 2005; 1: 98-114.
6. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. Obstet Gynecol 2000; 96: 271-6.
7. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol 2001; 2: REVIEWS3009.
8. Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas. Am J Pathol 2003; 163: 413-22.
9. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. Genes Dev 1999; 13: 239-52.
10. Gruslin A, Qiu Q, Tsang BK. X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. Biol Reprod 2001; 64: 1264-72.
11. Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, et al. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. J Cell Biol 2002; 157: 115-24.
12. Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 550-6.
13. Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, Kunze S, Kuhn C, Schulze S, et al. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies. Int J Gynecol Pathol 2006; 25: 354-60.
14. Spitalieri P, Cortese G, Pietropolli A, Filareto A, Dolci S, Klinger FG, et al. Identification of multipotent cytotrophoblast cells from human first trimester chorionic villi. Cloning Stem Cells 2009; 11: 535-56.
15. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. Mol Hum Reprod 2004; 10: 33-41.
16. Lyall F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. Aust N Z J Obstet Gynaecol 2006; 46: 266-73.
17. Park MH, Kim YJ, Ann JJ, Kim JI, Chun SH. Placental superoxide dismutase activity and genetic polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. Korean J Perinatol 2006; 17: 166-72.
18. Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. Placenta 2008; 29: 290-9.

19. Hung TH, Chen SF, Liou JD, Hsu JJ, Li MJ, Yeh YL, et al. Bax, Bak and mitochondrial oxidants are involved in hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in human placenta. Placenta 2008; 29: 565-83.
20. Ratts VS, Tao XJ, Webster CB, Swanson PE, Smith SD, Brownbill P, et al. Expression of BCL-2, BAX and BAK in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. Placenta 2000; 21: 361-6.
21. Hu R, Zhou S, Li X. Altered Bcl-2 and Bax expression is associated with cultured first trimester human cytotrophoblasts apoptosis induced by hypoxia. Life Sci 2006; 79: 351-5.
22. Jeon SY, Lee HJ, Jung HM, Kim JK, Kim GJ. Expression of immortalization-upregulated proteins-2 (IMUP-2) in placenta. Korean J Reprod Med 2009; 36: 163-74.
23. Xia Y, Novak R, Lewis J, Duckett CS, Phillips AC. Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. Mol Cell Biochem 2006; 286: 67-76.
24. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep 2006; 7: 988-94.
25. Russell JC, Whiting H, Szuflita N, Hossain MA. Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain. J Neurochem 2008; 106: 1357-70.
26. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Aldo PB, Romero R, Mor G. AKT controls human first trimester trophoblast cell sensitivity to FAS-mediated apoptosis by regulating XIAP expression. Biol Reprod 2010; 82: 146-52.

= 국문초록 =

목 적: 영양막세포의 과도한 세포자멸사는 태반의 발달뿐 아니라 산과 질환을 유발하는 요인으로 알려져 있다. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)은 임신 기간 동안 영양막세포의 세포자멸사와 관련되어 있다고 알려져 있으나, 자간전증을 유발하는 인자인 저산소성과의 관계에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구의 목적은 XIAP가 정상 태반과 자간전증 산모의 태반에서 발현 양상의 차이를 분석하고, 저산소 상태에 노출된 HTR-8/SVneo 영양막세포주에서의 XIAP 기능을 분석하고자 하였다.

연구방법: XIAP 발현을 분석하고자, 정상 태반 (n=15), 중기 자간전증 태반 (n=11), 그리고 말기 자간전증 태반 (n=15) 조직을 수집하여 RT-PCR, 면역조직화학법, 그리고 Western blot 등을 실시하였다. 저산소성 상태에서 XIAP의 기능을 확인하고자 HTR-8/SVneo 영양막세포주에 1% 산소가 공급되는 hypoxia 상태에 노출시킨 뒤 12시간, 24시간 후에 각 세포자멸사 관련 유전자들의 발현을 fluorescence-activated cell sorting (FACS)와 Western blot 분석 등을 실시하였다.

결 과: XIAP는 태반의 합포영양막세포와 포합체결절에서 발현이 관찰되었으며, 정상 태반보다 자간전증 태반에서의 발현이 현저히 감소됨이 관찰되었다 (p<0.05). 또한, 저산소 상태에 노출된 HTR-8/SVneo 영양막세포주에서 감소된 XIAP 발현은 세포질에서 핵으로의 이동에 따라 세포자멸사를 유발하는 단백질들의 발현이 증가됨이 관찰되었다.

결 론: XIAP의 발현은 태반 발달 및 자간전증 태반에서 XIAP 유전자의 발현은 감소되었으며, XIAP의 저하로 인한 caspase-9의 증가가 자간전증 태반에서의 세포자멸사는 더 많이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 저산소 상태에 의해 XIAP의 발현이 감소되었으며, XIAP 단백질의 세포질에서 핵으로의 위치 변화는 영양막세포의 세포자멸사에 중요한 역할을 하는 것이 관찰되었고, 이는 자간전증의 진단에 유용한 마커로써의 활용되기 위한 기본적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

중심단어: X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis, 자간전증, 세포자멸사, 저산소성, 영양막세포