

## 양막 및 제대에서 Endothelin의 조직면역화학

계명대학교 의과대학 산부인과학교실 · 병리학교실\*  
김택훈 · 김종인 · 서영옥 · 박관규\*

=Abstract=

### Immunohistochemistry of the Endothelin in Amnion and Umbilical Cord

Taek Hoon Kim, M.D., Jong In Kim, M.D.,  
Young Wook Suh, M.D., Kwan Gyn Park, M.D.\*  
*Department of Obstetrics & Gynecology, Pathology\*, School of Medicine, Keimyung University*

Endothelin was originally identified as a product of endothelial cells, which had a paracrine action on vascular smooth muscle, but it is now also known to be product of certain types of epithelial cells.

Amnion(n=10) and umbilical cord(n=10) at preterm, term, preeclampsia were subjected to immunohistochemistry with antiserum cross activity with endothelin-1. Our objective was to determine the localization immunoreactive endothelin in umbilical cord and amnion during preterm, term, preeclampsia. Intensity of positive staining was given a score of 0(negative), 1(low), 2(moderate), or 3(strongly positive) for each group within each section.

Comparison of immunohistochemistry with endothelin from different group(preterm, term preeclampsia) were conducted with Kruskal Wallis one way analysis. Comparison of each section at preterm, term, preeclampsia were conducted with Bonferroni-adjusted Mann Whitney test. The intense immunoreactivity was present on amnionic epithelial cells, endothelium of umbilical vein, cord epithelium at each group. No difference were detected between each group.

Key Words : Endothelin, amnion, umbilical cord.

### I. 서 론

1980년 Furchgatt와 Zawadski(Furchgott, 1984)

에 의해 endothelium dependent relaxing factor(s) (EDRF)가 발견된 후로 혈관내피는 혈관평활근 조절 기능에 중요역할을 하는 것으로 알려졌다. 그후 ED-

\*본 연구는 1993년 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

\*본 연구의 요지는 1993년 10월 22일 제 72차 대한산부인과학회에서 발표하였음.

接受口 : 1994. 11. 15.

본 연구의 목적은 자연진통으로 분만한 임신말기 양막 및 제대와 임신중기 양막 및 제대사이에 조직면역화학법에 의한 endothelin 존재의 차이 여부와 전자간증 및 정상임신 사이에 endothelin 존재의 차이가 있는가를 알아보기 위함이다.

## II. 재료 및 방법

임신중기 유산시 제대 및 양막을 10예에서 얻었고, 임신말기 정상분만한 산모 및 전자간증 산모로부터 신생아의 제대 및 양막을 10예에서 얻었다. 채취한 양막 및 제대를 10% 포르마린에 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 2~4  $\mu$ m의 박절편을 만들어 hematoxylin과 eosin 염색을 하여 광학 및 편광 현미경으로 관찰하였고, 제대와 양막에서 endothelin 존재유무 확인을 위해 endothelin에 대한 다크론성항체(Peninsula Lab. Belmont, California)를 1:500으로 희석하여 면역조직화학적 검색을 실시하였다.

포르말린 용액으로 고정되고 파라핀 포매된 제대 및 양막조직을 4  $\mu$ m 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여, 탈파라핀과 함수과정을 거친후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 혼합된 메탄올에 슬라이드를 30분 담구어 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단시키고 0.01 M 인산완충액에서 10분간 세척하였다. 정상 마혈청(normal horse serum, ABC kit)으로 20분간 실온에 방치한 후 마혈청을 제거하고, 일차항체로 다크론성 항체를 사용하여 37°C에서 30분간 부란하였다.

처음에 양막은 혈관조직이 없어 endothelin이 합성되지 않는 조직으로 판단하여 비교조직으로 사용되었으나 연구결과, 평활용모막, 탈락막 또는 자궁근육에서 보다 훨씬 많은 양의 prepro-endothelin 1 mRNA가 측정에서 양막에서 endothelin의 합성이 밝혀졌고, 그후 혈관내피세포외에 다른 조직에서도 endothelin이 합성된다는 사실이 알려졌다(Black et al., 1989; Glad et al., 1991; Kosaka et al., 1989; Maggi et al., 1991; Rosengurt et al., 1990; Sunnergren et al., 1990).

분만기전에서의 endothelin의 역할 및 대사과정에 대한 연구들이 시행되었고, 양막에서 만들어진 endothelin 1은 자궁근육세포내 Ca<sup>++</sup>의 급격한 증가를 초래하는uterotonin의 한가지이며, 양막 및 평활용모막의 세포영양막에 존재하는 enkephalinase라는 효소에 의해 분해된다는 것도 알려졌다(Casey & MacDonald, 1992).

따라서 태아, 양수, 양막, 용모막, 태반, 탈락막 및 자궁근육에서 endothelin의 역할 및 대사에 집중적인 관심하여 연구들이 시도되고 있으며, endothelin은 혈관 평활근에 직접 작용하며, EDRF에 비해 작용기간이 길며, 전신혈압 및 국소혈액 순환에 관여하고 endothelin 합성의 부조화는 고혈압 및 병적혈관 경련의 병인으로 작용한다(Kanoi et al., 1990; Nochy et al., 1989; Redman & Bonnar, 1978). 임신중 고혈압성 질환에서 endothelin 및 EDRF에 대한 연구도 시도되고 있으나, 정확한 원인인자로서의 역할은 규명되지 않고 있으며, 합성, 작용부위, 확실한 반대작용 등은 임신중 고혈압성 질환의 원인인자로서, 또는 치료제로서의 가능성이 집중연구 되리라 생각된다.

Table 1. Scoring system of the immunohistochemistry

Score	Status of staining
0	No staining
1	Weak staining
2	Strong staining
3	Intense staining

Biotinylated anti-rabbit IgG(Vector ABC Kit, USA) 1:200을 사용하여 상온에서 30분간 부란시킨 후 ABC(Avidin Biotin Complex, Vector ABC Kit)

로 30분간 실온에 방치후 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하고 Mayer hematoxylin으로 대비염색을 한후 광학현미경으로 관찰하였다. 면역조직화학 염색정도는 저자들이 정한 0-3으로 배점하여 비교하였는데, 0은 염색이 전혀 안된 경우, 1은 약하게, 3은 아주 강하게 염색된 경우, 2는 1보다는 강하고 3보다는 약한경우로 하였다(Table 1).

판독은 한명의 병리의사가 시행하였으며 양막의 표피세포, 양막의 기질세포, 제대양막세포, Wharton's jelly, 제대정맥내피세포 및 제대동맥내피세포의 염색정도를 비교 분석하였다.

통계처리는 동일조직에서 임신중기, 말기, 전자간증 사이의 비교는 nonparametric method인 Kruskal-Wallis test를 이용하였으며, 각기 관찰조직사이에는 Bonferroni-adjusted Mann-Whitney test를 이용하였으며,  $\alpha < 0.003$ 을 유지 수준으로 하였다.

### III. 결 과

본 연구에 이용한 각 대상군의 임신주수는 임신중기가  $23.0 \pm 2.5$ 주, 정상임신말기를  $39.5 \pm 1.2$ 주 전자간증은  $38.9 \pm 1.2$ 주였다(Table 2).

Table 2. Maternal age and gestational age of the study group

Group	n	Age(years)	Gestational age(weeks)	
		Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Range
Midtrimester	10	$23.3 \pm 5.6$	$23.0 \pm 2.5$	20~27
Normal term	10	$28.7 \pm 5.3$	$39.5 \pm 1.2$	37~41
Preeclampsia	10	$30.0 \pm 4.3$	$38.9 \pm 1.2$	37~40

Endothelin에 대한 면역조직화학 염색을 하지 않고 hematoxylin과 eosin염색만을 한 양막에서 상피세포와 결합조직의 구별이 잘된 현미경 소견을 볼 수 있었다(Fig. 1).

저자들이 설정한 score 2에 해당되는 양막과 용모막의 면역조직화학 현미경소견(Fig. 2, 3)과 Wharton's jelly의 score 1에 해당하는 약한 염색이된 현미경 소견이다(Fig. 4).

저자들이 설정한 scoring system을 이용해 각 대상군의 양막 및 제대의 endothelin에 대한 면역조직

Fig. 1. The amnion shows a single layer of lining epithelium and underlying thin layer of connective tissue(H & E, 100 $\times$ ).

Fig. 2. Immunostaining of endothelin in amniotic membrane. The lining epithelium is strong positive( $\times 100$ ).

Fig. 3. Immunostaining of endothelin in chorion. The lining epithelium is strong positive and the stroma is weak positive(100 $\times$ ).

Fig. 4. Immunostaining of endothelin of Wharton jelly shows weak positive( $\times 200$ ).

화학염색결과는 동인조직간에 Kruskal-Wallis test를 이용한 Chi-square 검정에서 임신중기, 정상임신 말기, 말기전자간증 사이에 endothelin 존재의 차이는 없었다.

본 연구에 이용한 조직들 사이에 endothelin분포의 차이는 대상군 모두에서 제대정맥 내피세포, 양막상피세포 및 제대상피세포에 비슷하게 많이 존재하였고, 그 다음으로 양막기질세포와 제대동맥내피세포에 존재하였고, Wharton's jelly에 가장 적게 존재하였다. 정상임신 말기에서 통계적으로 유의하지는 않으나 제대정맥내피세포에서 양막상피세포보다 endothelin의 존재가 많았다(Table 3).

#### IV. 고 찰

21-amino acid peptides로 된 endothelin는 각기

다른 genes로 coding된 endothelin 1, 2, 3가 있다. Endothelin 1은 태반의 complementary DNA로 부터 처음 clone되었고, 인간 제대혈관 내피세포 및 양막세포로부터 생성되는 것으로 알려졌다(Sunnergren et al., 1990). Endothelin 1을 태반에 관류시킨 결과 태반 혈관의 수축을 초래하였고, 시험관내에서 자궁근육 및 자궁동맥의 수축작용도 알려져, endothelin 1이 인간의 uteroplacental unit의 평활근 수축작용이 있음을 알게 되었다. 이에 따라 분만기전에 endothelin이 작용할 것으로 집중연구가 이루어졌으며, 양막에서 생성된 endothelin 1은 양막과 접해있는 제대혈관의 분지인 용모막 혈관의 외막에 작용하여 혈관수축 및 이완을 조절하며 분만기전에 작용하는 것으로 설명하고 있다(Casey & MacDonald, 1992). 최근에는 endothelin 수용체 두종류가 밝혀졌는데 A형 수용체는 혈관평활근에 존재하고, B형수용체는 평활근을 제외한 다른조직에 존재하는 것으로 알려졌다(Word et al., 1990). 지금까지 양막 및 제대에서 면역조직화학법에 의한 endothelin에 관한 연구에서 양막이 endothelin의 주 생성 장소로 알려져 왔으며, Wharton's jelly에서 endothelin 존재유무에 대해서는 알려져 있지 않았다.

본 연구에서 제대를 둘러싸지 않은 양막상피와 제대를 둘러싼 양막상피세포에서 endothelin분포의 차이는 없었고, 임신중기 및 전자간증 제대 정맥내피세포에서도 비슷하게 분포하였다. 통계적으로는 유의하지는 않으나 정상임신에서 양막상피세포보다 제대정맥내피세포에서 강하게 염색되었는데 이는 endothelin 수용체 차이에 의한 결과의 가능성을 배제할 수 없으며, 따라서 향후 수용체에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

Table 3. Results of immunohistochemistry scoring system

	Amnion epithelium	Amnion stroma	Cord epithelium	Wharton's jelly	UA endo	UV endo
Mid trimester	2.8 $\pm$ 0.4*	2.1 $\pm$ 0.6*	2.9 $\pm$ 0.3*	1.8 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.5**	3.0 $\pm$ 0.0*
Normal term	2.5 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.5**	2.8 $\pm$ 0.4*
Preeclampsia	2.9 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.4*	1.6 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.9**	2.9 $\pm$ 0.3*

\* a<0.003 Compared with Wharton's jelly

\*\* a<0.003 compared with UV endothelium

UV : Umbilical vein

UA : Umbilical artery

Endo : Endothelium

Wharton's jelly는 mucopolysaccharides, collagen fibers, large flat stellate cells, mast cells 등으로 구성되어 제대혈관을 외부충격으로부터 보호하는 것이 주된 기능이다. 저자들이 알기에는 본 연구가 처음으로 Wharton's jelly에서 endothelin의 존재를 밝힌 것으로 Wharton's jelly의 임신생리 및 분만기전에 대한 연구도 필요하리라 사료된다.

저자들이 설정한 scoring system에 의하면 임신 중기, 정상임신말기, 전자간증의 양막 및 제대에서 endothelin 존재의 차이는 없었다. 최근 정상임신부와 전자간증 임신부 정맥혈 및 그들 신생아 제대혈에서 endothelin치를 연구한 보고에서 전자간증에서 endothelin치가 증가해있다는 보고들과 그렇지 않다는 보고도 있으며(Sayuri Otani & Satoshi Usuki, 1991), 자간전증에서 분만진통 유무에 따른 endothelin치의 변화에 관한 연구에서는 분만진통시의 endothelin치가 진통이 없는 경우보다 높다고 보고되고 있으며, 자간전증에서의 MgSO<sub>4</sub>의 사용시, 사용치 않은 경우에서의 endothelin치가 높다고 보고하고 있다(Barbara A. Clark et al., 1992; Dimitrios et al., 1991; Eyal Schiff et al., 1992; Gustaaf A. et al., 1989; James M, et al., 1989; Robertn. Taylor et al., 1990). 아직까지 전자간증 유무와 임신주수에 따른 endothelin의 역할과 생리기전이 밝혀진 단계는 아니라고 판단되며, 향후 임신주수, 분만진통여부, 전자간증의 심한 정도에 따른 변수를 고려한 비교연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

계명대학교 의과대학 산부인과 교실에서 임신중기 유산시, 임신말기 정상분만시 및 전자간증 산모로부터의 제대 및 양막을 각 10예 채취하여 각군간의 조직 면역화학법에 의한 endothelin 존재차이 여부와 전자간증 및 정상 임신사이의 endothelin 존재차이 여부를 측정하여, 면역조직화학 염색 정도는 저자들이 정한 scoring system으로 0-3으로 배점하여, 동일 조직에서 임신중기, 말기, 전자간증 사이의 비교는 nonparametric method인 Kruskal-Wallis검사를, 각기 관찰조직 사이에는 Bonferroni-adjusted Mann Whitney 검사를 이용하여 검정한 결과, 임신중기, 임신말기, 말기 전자간증 사이에는 endothelin

## -References-

- Barbara A. Clark, Lis Halvorson, Benjamin Sachs and Franklin H. Epstein. Plasma endothelin levels in preeclampsia: Elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 962-968.
- Black PN, Ghatel MA, Takahashi K. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. FEBS Lett 1989; 255: 129-132.
- Casey ML, MacDonald PC. The endothelin 1 enkephalinase system of human fetal membranes and chorionic vessels. Abstract presented at 39th annual meeting of society for Gynecological investigation. Sar Antonio, March, 1992.
- Dimitrios J, Mastrogiannis et al. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertension pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 1711-1716.
- Eyal Schiff, Gilad Ben-Baruch, Edna Peleg, Talma Rosenthal, Menachem Alcalay, Michal Devir and Shlomo Mashlach. Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 624-628.
- Findlay JK, Salamonsen LA. Paracrine regulation of implantation and uterine function. In: Seppälä M. ed. Baillière's clinical obstetrics and gynaecology. London: Bailliere Tindall 1991; 5: 117-132.
- Furchgott RF. The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1984; 24: 175.
- Glaud A, Polak JM, Gaitonde V, et al. Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 4: 1044-1049.
- Gustaaf A, Dekker, Arjan A. Kraayenbrink, Gerda G. Zeeman and Gerard J. van Kamp. Increased plasma

- levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia. *European Journal of Obstet & Gynecology and Reproductive Biology* 1991 ; 40 : 215-220.
- James M. Roberts, Robert N. Taylor, Thomas J. Musci, George M. Rodgers, Carl A. Hubel and Margaret K. McLaughlin. Preeclampsia : An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989 ; 161 : 1200-1204.
- Kanai K, Sudo N, Ishibashi M, Yamaji T. Plasma endothelin-1 levels in patients with pregnancy-induced hypertension. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 1486-1487.
- Kosaka T, Suzuki N, Matsumoto H, et al. Synthesis of the vasoconstrictor peptide endothelin in kidney cells COS7. *FEBS Lett* 1989 ; 49 : 42-46.
- Maggi M, Vannelli GB, Peri A, et al. Immunolocalization, binding and biological activity of endothelin in rabbit uterus, effect of ovarian steroids. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : E292-305.
- Nochy D, Brembaut P, Hinglais N, et al. Renal lesions in the hypertensive syndromes of pregnancy : immunomorphological and ultrastructural studies in 114 cases. *Clin Nephrol* 1989 ; 13 : 155-162.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524-526.
- Pollard JW. Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. *J Reprod Fertil* 1990 ; 88 : 721-731.
- Redman CWG, Bonnar J. Plasma urate changes in preeclampsia. *BMJ* 1978 ; 1 : 484.
- Robert N. Taylor, Madhu Varma, Nelson LH, Teng and James M. Roberts. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990 ; 71 : 1675-1677.
- Rosengurt N, Springall DR, Polak JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol* 1990 ; 160 : 5-8.
- Sayuri Otani, Satoshi Usuki. Comparison of endothelin-1 concentrations in normal and complicated pregnancies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1991 ; 71 : 308-312.
- Sunnergren KP, Word RA, Sambrook JF, MacDonald PC, Casey ML. Expression and regulation of endothelin precursor mRNA in avascular human amnion. *Mol Cell Endocrinol* 1990 ; 68 : R7-14.
- Word RA, Kamm KE, Stull JT, Casey ML. Endothelin increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1990 ; 162 : 1103-1108.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 ; 332 : 411-415.