

정상임신과 자간전증군에서의 태반내 용모조직 내의 내피성 일산화질소 합성효소의 발현 양상

계명대학교 의과대학 산부인과학교실,* 의학유전연구소**
김종인·** 윤성도· 김덕만·

=Abstract=

Immunohistochemical Expression of Placental Nitric Oxide Synthase in Preeclampsia and Normal Pregnancy

Jong In Kim, M.D., ** Sung Do Yoon, M.D., Duk Man Kim, M.D., *

Department of Obstetrics and Gynecology, * Institute for Medical Genetics, **
Keimyung University, School of Medicine

Objective: Our purpose was to compare the expression of endothelial nitric oxide synthase in the placenta and umbilical cord of preeclamptic placenta with that of the normotensive placenta.

Method: We compared placental endothelial nitric oxide synthase expression in preeclamptic ($n=5$) with in normal ($n=5$) pregnancies. Frozen sections of umbilical cords, chorionic plate vessels, and terminal villi were immunostained with a monoclonal endothelial nitric oxide synthase antibody.

Results: The age revealed no difference between control (28.1 ± 4.2 years), and study group (26.1 ± 4.7 years). The gestational age was statistically different between control (38.9 ± 1.7 weeks) and study group (34.9 ± 3.5 weeks). The neonatal body weight and placental weight were also statistically different between control (3060 ± 528 g) and study group (2160 ± 417 g).

No difference in endothelial nitric oxide synthase immunostaining in the endothelium of the umbilical vessels and stem villous vessels was found between preeclamptic and normotensive pregnancies. In contrast, in the preeclamptic placental endothelial nitric oxide synthase immunostaining was seen in the terminal villous vessels.

In the syncytiotrophoblast endothelial nitric oxide synthase immunostaining appeared primary basal in location and diffuse in distribution in the preeclamptic placentas but primary apical in the normotensive placentas.

Conclusion: Differences in endothelial nitric oxide synthase expression in terminal villous vessels and syncytiotrophoblast may be a result of vascular alterations or damage that take place in the placenta in preeclampsia.

Key word: Preeclampsia; Nitric oxidase synthase; Nitric oxide

자간전증은 모성 및 주산기 사망 및 유병률의 주 원인으로서, 태아 발육 부전과 관계되며 전임신의 약 7%를 점하고 있으나,¹ 이 질환의 병태 생리는 확실하게 규명되지 않고 있다.

자간전증은 태아가 없는 경우, 임신이 종결된 경우, 태반이 제거된 이후에도 종종 발생하나 대개 임신에 국한되어 발생하며, 이는 태반의 병인과 관련 있는 것으로 여겨지고 있으며,² 이 또한 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 자간전증에서의 내피세포의 상처 또는 기능장애는 태아와 태반조직을 포함한 많은 장기의 광범위한 혈관수축과 관류부족(poor perfusion)의 결과이며,³ 최근에는 내피세포에서 생성되는 강력한 혈관 확장제인 prostacy-

clin, endothelial-derived relaxing factor(EDRF), 일산화질소(nitric oxide)^{4,5}의 활동성 변화, 즉 이들 물질의 합성의 저하가 자간전증의 혈관계의 변화를 유발하는 주원인으로 알려져 있다. 임신된 쥐에서 산화질소의 생성을 억제한 결과 자간전증과 유사한 증상을 나타내었으며⁶, 혈관확장제인 calcitonin gene-related peptide로 치료한 결과 자간전증 증상이 소멸되었다⁷. 자간전증에서 prostacyclin 합성의 감소현상은 잘 알려져 있으나, 자간전증에서의 일산화질소의 합성 감소에 대하여서는 잘 알려져 있지 않다.⁸

일산화질소 基(NO)는 일산화질소 합성효소(e-NOS)의 작용에 의해 L-arginine의 대사과정에서 생성되며,⁹ e-NOS

는 세 가지 이상의 동형(isoform)이 존재한다.¹⁰

이들 동형(isoform)들은 유도동형(inducible isoform)과 구성동형(constitutive isoform)으로 구분되며, 유도동형은 대식세포, 간 세포 내에 cytokine이나 growth factor에 의해 자극을 받을 때까지는 이들 세포내 존재하지 않으며, 반면 구성 동형은 내피성 세포나, 신경원 세포내 항상 존재하며, calicum-calmodium의 경로를 통하여 활성화되어, NO가 생성되며, 생성된 NO는 내피성 세포 등의 생성 세포에서 특별한 heme를 함유한 단백 목표에 결합하여 작용하기 위하여 혈관내 형활근세포 등의 목표 세포 내로 산재한다.¹¹ 예를 들어 내피세포의 일산화질소가 평활근 내에 들어가 guanylate cyclase와 결합해서 C-GMP 합성을 증가시켜 혈관이완 작용을 초래한다.¹²

정상 태반의 villous trophoblast에서의 일산화질소 합성효소(e-NOS)의 역할은 아직까지 확실히 밝혀지지 않고 있으나, 영양세포막에서 유리되는 NO는 산재압(perfusion pressure)이 특징적으로 낮은 용모간강 내에서 용합세포 영양막의 표면에 platelet와 leukocyte의 adhesion을 방지한다.^{13,14} 자간전증 산모의 태반에서 보여지는 용합세포 영양막내의 구조적인 변화, 혈소판의 기능 부전의 발생, 혈소판 소모의 증가, intervillous thrombi 발생의 증가 등의 소견이 영양세포막 e-NOS 발현이 감소되는 것을 짐작하게 한다.^{15,16}

저자들은 자간전증 태반에서 내피성 일산화질소 합성효소(enodothelial e-NOS)의 발현이 정상태반의 발현과 다를 것이라는 가설 하에, 자간전증과 정상임신 태반내의 e-NOS의 발현의 차이를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

I. 연구 대상 및 방법

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과학 교실에서 정상임신과 자간전증으로 진단된 임산부 각 5예에서 분만 후 채취한 태반조직을 사용하였다.

자간전증의 진단은 일일 0.3 mg/L의 당백뇨와 부종이 동반된 6시간의 간격으로 측정한 혈압이 140/90 mmHg 이상의 경우로 진단하였으며, 용모막염이 의심되거나, 당뇨병, 염색체 이상, 전 고혈압의 기왕력이 있는 경우의 태반은 검사에 이용하지 않았다.

각 태반은 용모막판(chorionic plate)과 기저판(basal plate) 부위 및 제대(umbilical cord)를 1x1x1cm 크기로 절개한 다음 액체질소에 급속 냉각시킨 후 조직블록을 -70°C로 보관하였다. 보관된 태반조직을 -20°C의 동결절편기에 OCT 블록을 만든 후 30분간 방치시킨 뒤 약 7~8 μm의 동결절편을 만들었다. 조직내에 e-NOS(Zymed, USA) 단클론항체 H32를 사용하였다. 먼저 조직절편을

0.5% 소혈청 일부 민과 정상 염소혈청이 함유된 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 15분간 실온에서 처리하였다. 그 뒤 e-NOS 일차 단클론항체를 실온에서 3시간 반응시키고 PBS로 6회 수세한 후 실온에서 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse immuno-globulin G를 1시간 동안 처리하였으며, 다음에 다시 PBS로 6회 세척한 후 25 mg/ml 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane(DABCO)(Sigma, USA)가 함유된 PBS : glycerol(1:9)로 조직절편을 봉입하여 면역형광현미경으로 관찰하였다.

e-NOS의 발현의 검사는 한 명의 관찰자(병리 의사)에 의해 각 단면당 시야를 무작위로 선정하여 검사하였으며, 각 시야 당에 대한 용합세포의 발현 정도(intensity)와 부위(location), 용모 혈관 내의 발현 정도(intensity)와 부위(location), 제대혈 내의 발현 정도(intensity)와 부위(location)에 대한 반정량 분석을 위하여, 회미하게 발현되는 경우는 1, 1 및 3의 중간 정도로 발현되는 경우는 2, 선명하게 발현되는 경우는 3으로, 발현 부위는 기저층(basal)은 1, 혼합(continuous)은 2, 상층부(apical)는 3으로 점수를 낸 후 그 평균을 산출하였으며, 대상군과 대조군의 non-parametric data(비주기적 매개변수의 결과)의 분석을 위하여 Mann-Whitney U-test를 이용하였다. 대조군과 대상군의 대상군의 평균 연령은 28.1±4.2, 26.1±4.7 세였으며, 각각의 임신주수는 38.9±1.7주, 34.9±3.5주, 신생아의 체중은 3060.0±600g, 2160±800g, 태반의 무게는 528±97g, 417±154g 이었다(Table 1).

Table 1. Patient Characteristics

Group	Control(n=5)	Preeclampsia(n=5)
Age	28.1±4.2	26.1±4.7
Gestational Age(week)	38.9±1.7	34.9±3.5
Birthweight(gm)	3060.0±600	2160.0±800
Placental weight(gm)	528±97	418±514

검은 바탕에서 내피성 일산화질소 합성효소(e-NOS)의 위치를 녹색면역형광 발현시킨 결과, 일차성 항체가 있는 경우 녹색 형광으로 발현되었으며 일차성 항체가 없는 경우(대조군)는 발현되지 않았다(Fig. 1, 2).

제대동맥 및 정맥의 내피세포에서 e-NOS를 면역학적 형광 발현시 발현위치나 발현강도는 대상군의 태반이나 대조군의 태반에서 큰 차이가 없었다(Table 2).

제대정맥에서의 면역 형광 발현은 한 층의 subendothelial elastic lamina를 따라 나타났다(Fig. 3).

용모막판(chorionic plate)에서의 e-NOS의 면역학적 형광 발현은 대상군과 대조군 모두에서 차이점을 발견할 수가 없었으며, 용모혈관 내피세포(terminal villous vessel)에서의 면역형광 발현은 대상군의 태반에서만 e-NOS의 발현을 보여 주었다(Table. 3, Fig. 4.).

Table 3. Scoring for Endothelial Nitric Oxide Synthase(e-NOS). Immunostaining in Endothelium of Placental Vessels

Group		SVV	TVV
Control	1	1.2	NS
	2	1.5	NS
	3	1.0	1.0
	4	1.3	NS
	5	2.0	1.0
Preeclampsia	1	1.8	2.0
	2	2.0	1.6
	3	1.6	1.2
	4	2.2	1.4
	5	2.7	2.4

Value represent Mean

SVV : Stem Villous Vessels, TVV : Terminal Villous Vessels
Intensity : 1=Low, 2=Moderate, 3=Bright, NS=Not stained

Fig. 1. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from normal pregnancy. Diffuse syncytial e-NOS staining is seen(X 400).

Fig. 2. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from normal pregnancy without primary antibodies. There is no evidence of e-NOS staining(X 400).

Table 2. Scoring for Endothelial Nitric Oxide Synthase(e-NOS) Immunostaining in Umbilical Cord.

Group		Intensity of artery	Intensity of vein
Control	1	1.2	1.0
	2	1.0	1.4
	3	NS	NS
	4	1.4	1.2
	5	NS	1.2
Preeclampsia	1	1.0	1.2
	2	1.6	1.6
	3	1.0	1.2
	4	1.6	1.4
	5	1.4	1.0

Value represent Mean

Intensity: 1=Low, 2=Moderate, 3=Bright, NS=Not stained

Fig. 4. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from PIH. Basal distribution of e-NOS staining is seen(X 400).

Syncytiotrophoblast에서의 e-NOS 발현은 대조군과 대상군에서 모두 발현되었으나 발현되는 위치에서 대상군에서는 e-NOS가 융합세포영양막(syncytiotrophoblast)의 기저층(basal)에서, 대조군에서는 e-NOS가 융합세포영양막(syncytiotrophoblast)의 상층부(apical)에서 주로 발현되었다(Table 4, Fig. 5, 6).

III. 고 칠

일산화질소의 인간 태아-태반 혈관계에 대한 약리학적 작용은 이미 Myatt 등에 의해 연구 되었다¹⁶. NO는 thromboxane과 endothelin(ET-1)과 같은 혈관수축제의 작용을 축소하거나 혈관의 톤(tone)을 조절하는 것으로 알려져 있다. 정상 태반에서는 제대(umbilical cord), choriocytic plate, 그리고 stem villous vessels 등의 내피세포에서는 e-NOS가 존재하나, terminal villous capillary의 내피세포에서는 e-NOS가 나타나지 않는다고 하였다.¹⁷

자간전증은 Robert 등에 의해 모체나 태아혈관계의 내피성 기능 부전으로 묘사된 바 있고,¹⁸ 자간전증에서 prostaglandin I₂ (PGI₂)의 변화와 제대혈관에서의 NO의 생성이 내피세포의 기능 부전의 증거라고 제시하고 있다.^{19,20}

Fig. 3. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from normal pregnancy. Weak e-NOS staining is seen the endothelium(X 400).

Table 4. Scoring for Endothelial Nitric Oxide Synthase(e-NOS) Immunostaining in Syncytiotrophoblast.

Group	Intensity	localization
Control	1	2.2
	2	2.0
	3	2.8
	4	2.4
	5	2.6
Preeclampsia	1	3.0
	2	2.6
	3	2.0
	4	2.6
	5	2.4
Value represent Mean		

Intensity : 1=Low, 2=Moderate, 3=Bright, NS=Not stained

Localization : 1=Basal, 2=Continuous, 3=Apical

^aZ=-2.041, p<0.05(Mann-Whitney U-Test) for preeclampsia group compared with control.

Fig. 5. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from PIH. Diffuse e-NOS staining is seen in the endothelium of stem villous vessels and syncytiotrophoblast(X 400).

Fig. 6. Immunofluorescent e-NOS staining of villous tissue from normal pregnancy. Focal weak e-NOS staining is seen in the endothelium of stem villous tissue from normal pregnancy. Focal weak e-NOS staining is seen in the endothelium of stem villous vessels(X 400).

Doppler flow velocity waveforms을 이용시 자간전증이나 자궁내 태아성장장애 등이 동반된 임신에서의 태아태반 혈관계 내의 혈류에 대한 저항이 증가됨을 나타내

는데, 이러한 증가된 저항은 용모혈관계 내의 변화된 혈관계의 반응성과 변화된 혈관 조직에 기인한다.²¹ 자간전증에서 용모 혈관 수의 감소와 더불어 혈관 조직의 변화가 일어난다는 것은 이미 기술된 바 있다.²⁴

자간전증 태반이나 정상 태반의 syncytiotrophoblast에서는 e-NOS의 면역형광발현은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다고 하였으나,²⁴ 본 조사에서는 syncytiotrophoblast에서의 e-NOS 면역형광발현은 정상군과 대조군 모두에서 나타났다. 그러나 이 두 집단에서 e-NOS 발현의 강도나 형태의 차이는 없었으나 발현되는 위치는 뚜렷한 차이를 보여주어, 대상군에서는 e-NOS가 용합세포영양막(syncytiotrophoblast)의 기저층(basal)에서, 대조군에서는 e-NOS가 용합세포영양막(syncytiotrophoblast)의 상층부(apical)에서 주로 발현되었다. Intervillous space에 존재하는 endothelial dysfunction과 연관 관계가 있는 것으로 보여지나, 아직까지 용합세포영양막에서의 NO 생성의 기전은 밝혀지지 않고 있다. 또한 terminal villous vessels과 stem villous vessels의 내피세포에서 정상 태반에서 보이는 것과는 달리 자간전증군에서 e-NOS 발현이 보다 강하게 나타났다. 또한 stem villous vessels에서는 정상 군에서도 e-NOS가 약하게 발현되었으나 terminal villous vessels에서는 e-NOS가 거의 발현되지 않았다. 자간전증에서 태반혈관조직의 현미경 소견상 변화는 terminal villi의 혈관수 감소, 혈관 직경의 축소, 혈관 벽의 smooth muscle의 thickening을 볼 수 있는데 최근 연구에서 이러한 변화된 혈관에서 nitrate분해 산물인 일산화 질소의 면역형광발현을 많이 볼 수 있다.²⁵

증가된 e-NOS의 발현이 자간전증의 질병의 특이한 소견은 아니지만 resistance의 증가, perfusion의 감소에 의해 초래되는 것으로, 용합세포 영양막 및 terminal villous vesselsdml e-NOS의 면역학적 염색의 발현차이는 자간전증의 태반에서 발생하는 혈관의 손상 및 손상의 결과와 자간전증 태반 혈류 내의 국소적 조절 변화 등에 기인하는 것으로 생각되어진다.

참고문헌

1. Roberts JM. Pregnancy-related hypertension. In : Cresy RK, Resnik R, eds. Maternal-fetal medicine : principles and practice. Philadelphia : WB Saunders, 1994; 804~43.
2. Redman CGW. Current topic : preeclampsia and the placenta. Placenta 1991; 12: 301~8.
3. Robert JM, Taylor RN, Goldfen A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. Am J Hypertens 1991; 4: 700~8.
4. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GSJ. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. Lancet 1993; 342: 242~3.
5. Ramsay B, De Belder A, Campbell S, Moncada S, Martin JF. A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of preeclampsia. Eur J Clin Invest 1994; 24: 76~8.

6. Buhimschi I, Vallampalli C, Chwalisz K, Garfield RE. Preeclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibitions : effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Hum Reprod* 1995; 10: 2723~2730.
7. Yallampalli C, Dong YL, Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases the fetal mortality in preeclampsia rats induced by N⁶-nitro-L-arginine methyl ester. *Hum Reprod* 1996; 11: 895~899.
8. Cameron IT, Van Papendrop CL, Palmer RMJ. Relationship between nitric oxide synthesis and increase in systolic blood pressure in women with hypertension in pregnancy. *Hypert Preg* 1993; 12: 85~92.
9. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329: 2002-2008.
10. Lowerstein CJ, Dinnerman JL, Snyder H. Nitric oxide : a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-237.
11. Tasi AL. How does NO activate hemoproteins? *FEBS Lett* 1994; 341: 141-145.
12. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation : the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(suppl. 5): S115-S118.
13. De Graaf JC, Bang JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma J. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow condition. *Circulation* 1992; 85: 2284-90.
14. Provost P, Lam JYT, Iacoste L, Merhi Y, Waters D. Endothelium derived nitric oxide attenuate neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 331-5.
15. Perry KJ, Martin JN. Abnormal Hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 9: 58-75.
16. Soma H, Yoshida K, Mudaida T, Tabuchi Y. Morphologic changes in the hypertensive placenta. *Contrib Gynecol Obstet* 1982; 9: 58-75.
17. Myatt L, Brewer AS, Langdon G. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol*, 1992; 166: 244-230.
18. Myatt L, Brockman DE, Eis ALW. Immunohistochemical localization of nitric oxide in the human placenta. *Placenta* 1993; 14: 487-495.
19. Roberts JM, Talor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens* 1991; 4: 700-708.
20. Remuzzi G, Marchessi D, Zaja C. Reduced umbilical and placental prostacyclin in preeclampsia. *Prostaglandins* 1980; 20: 105-110.
21. Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P. Endothelial-derived relaxing factor released by endothelial cell of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 507-513.
22. Trudinger BJ, Giles WD, Cook CM. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance : clinical significance. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 92: 23-30.
23. Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance : pathological correlation. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 31-38.
24. Ghabour MS, Eis ALW, Brockman KE. Immunohistochemical characterization of placental nitric oxide synthase expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 173-180.
25. Mohamed S, Annie L, Diane E, Jennifer S, Leslie M. Immunohistochemical characterization of placental nitric oxide synthase expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 9: 687-694.

=국문초록=

목적: 자가전증 태반에서 내피성 일산화질소 합성효소(endothelial e-NOS)의 발현이 정상태반의 발현과 다를 것이라는 가설 하에, 자가전증과 정상임신 태반내의 e-NOS의 발현의 차이를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구 방법: 정상임신부와 자간전증 임신부의 태반 및 제대를 동편 절삭하여 monoclonal e-NOS를 이용하여 발현유무를 비교 연구하였다.

결과: 대상군과 대조군의 연령의 차이는 거의 없었으며 대조군의 임신주수는 38.9 ± 1.7 주, 대상군의 임신주수는 34.9 ± 3.5 주로서 차이가 있었으며, 태아의 체중은 각각 3060.0 ± 528 g, 2160 ± 417 g, 태반의 무게는 각각 528 ± 97 g, 417 ± 154 g으로 차이를 나타내었다. 제대 혈관에서의 e-NOS의 면역형광발현의 차이는 대상군이나 대조군에서 별 차이를 나타내지 않았다. 태반 혈관에서의 e-NOS 면역형광발현은 stem villous vessels에서는 대상군에서 e-NOS 발현이 뚜렷하게 나타났으나 대조군에서는 발현되지 않는 차이를 보였다. 융합 세포 영양막(syncytiotrophoblast)에서는 대상군과 대조군에서 다 같이 비슷한 강도로 e-NOS가 발현되었으나, 발현되는 위치에서 대상군의 태반에서는 기저층에서, 대조군의 태반에서는 상층부에서 e-NOS가 많이 발현되었다.

결론: 증가된 e-NOS의 발현이 자간전증의 질병의 특이한 소견은 아니지만 resistance의 증가, perfusion의 감소에 의해 초래되는 것으로, 융합세포 영양막 및 terminal villous vessels의 e-NOS의 면역학적 염색의 발현 차이는 자간전증의 태반에서 발생하는 혈관의 손상 및 변형의 결과로 여겨지며, 이 차이들은 자간전증 태반내에서 발생하는 혈관계내의 변화 및 손상의 결과와 자간전증 태반 혈류 내의 국소적 조절 변화 등에 기인하는 것으로 생각되어진다.

중심단어: 자간전증, 내피성 일산화질소