

계류유산의 태반영양세포에서 Heat Shock Protein의 발현

가천의과대학 길병원 산부인과, 생명과학부 분자생물학*, 행복한 산부인과†

김지현·김석영·강혜진*·황유진*·손문성†

The Heat Shock Protein Expression in the Trophoblast of Women with Missed Abortion

Ji Hyun Kim, M.D., Suk Young Kim, M.D., Hye Jin Kang*, You Jin Hwang, M.D.*,
Moon Sung Son, M.D.†

Department of Obstetrics and Gynecology, Molecular Biology, *Division of Biologic Science,
†Gachon Medical School, Gil Medical Center, Incheon, Korea, Happy Womens Clinic

Objective: The aim of this study was to investigate the relationship between the early pregnancy loss and the expression of heat shock protein 90 (HSP 90), 60 (HSP 60) and 27 (HSP 27), using the trophoblast of missed abortion and normal pregnancy.

Methods: The trophoblast samples from 5 to 8 weeks gestation were prepared with aged-matched to both elective abortion and missed abortion. The expression of HSP 90, HSP 60 and HSP 27 in trophoblast from 35 cases with missed abortion and 52 cases with elective abortion were measured by the assay of western blots. The difference of HSPs' expression between the trophoblast with missed abortion and that with elective abortion were evaluated.

Results: In HSP 90, both the trophoblast in missed abortion and elective abortion was identified 90 kd bands however the intensity of HSP was not different between two groups ($p=0.93$). There was no difference in HSP 60 bands of the trophoblast between missed abortion and normal trophoblast ($p=0.92$). In HSP 27, the trophoblast in missed abortion showed stronger intensity of the bands than those in elective abortion ($p=0.035$).

Conclusion: The trophoblast in missed abortion might be induced more HSP 27 expression than those in elective abortion, and it will suggest cellular response to the various stress which will be occurred an early pregnancy failure.

Key words: Heat shock protein, Trophoblast, Missed abortion

서 론

생리적인 조건하에서 모든 생명체는 다양한 스트레스에 반응하여 항상성을 유지하기 위한 방어 기전을 나타내는데, 가장 대표적인 것 중 하나가 자극의 노출 시에 일어나는 열 충격 반응이다. 세포에 따라 열 충격에 대

한 반응의 차이를 보이게 되는데 일반적으로 세포가 열 충격을 받게 되면 대부분의 유전자 발현은 억제되지만 몇몇 유전자의 발현은 현저한 증가를 보이게 된다. 이와 같이 증가된 단백질을 가리켜 열충격단백질 (heat shock protein 이하 HSP)이라고 한다.

HSP은 배아 발생 동안에 최초로 생산되는 일차 단백질 중의 하나로 이들이 배아의 발생에 있어서 착상 전, 후의 모든 과정과 배아의 성장과 유지에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹ 따라서 본 연구는 자연유산

접수일 : 2005. 8. 11.
주관책임자 : 김석영
E-mail: ksyob@gilhospital.com

및 정상임신의 태반영양세포에서 나타나는 분자생물학적 변화에 대하여 HSP 90, HSP 60 및 HSP 27의 발현을 관찰함으로써 차이점을 확인하고 유산의 원인을 이해하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. Tissue collection

본원에서 실시되었던 임신 5-8주의 계류유산 태반영양세포 조직 35예를 이용하였으며 이에 대한 대조군으로는 개인병원에서 인공임신중절로 얻은 52예의 정상임신 태반영양세포 조직을 이용하였다. 환자에게 실험의 목적에 대해 설명하였고 동의를 얻었으며 본원 임상시험위원회의 심의를 통과하였다. 각각의 조직은 주수에 맞추어 비교하였다 (Table 1).

Table 1. The trophoblast samples with aged-matched to both elective abortion and missed abortion

GA (wks)	Missed abortion (n=35)	Elective abortion (n=52)
5	3	16
6	15	21
7	7	8
8	10	7

GA: gestational age

2. 단백질의 추출 (Protein extraction)

계류유산 및 인공임신중절을 통해 얻은 조직으로부터 나온 태반영양세포는 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어 이를 잘게 자른 후 400 μ l의 단백질 용해 용액 (proprep, inton biotechnology, Suwon, Korea)을 넣고 조직 분쇄기 (Tissue Tearor homogenizer; Biospec product, Inc, Bartlesville, USA)를 사용하여 마쇄하였다. 이를 30분간 영하 20℃에서 배양한 후 5분간 4℃에서 13,000 rpm으로 원심분리 (Micro-17R plus, Micro high speed centrifuge,

Hanil, Suwon, Korea)하여 상청액 (supernatants)을 영하 20℃에서 보관하였다.

3. Western blot analysis

5마이크로 그램의 단백질을 전기영동에 의하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)로부터 PVDF (polyvinylidene fluoride, Roche, Mannheim, Germany) membrane으로 옮겨 이를 상온의 blocking buffer (20 mmol/L Tris hydroxide, pH 7.4; 137 mmol/L NaCl; 1% Tween 20; and 5% non-fat milk)에서 배양하였다. HSP 90과 HSP 60은 1차 항체 (HSP 90 & HSP 60, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, CA)를 1:1,000으로 희석하여 4℃에서 16시간 동안 배양하였고, HSP 27은 1차 항체 (HSP 27, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, CA)를 1:200으로 희석하여 4℃에서 16시간 동안 배양하였다. 2차 항체 (ECLTM Anti-rabbit IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody, Amersham, Buckinghamshire, England; bovine anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, CA)를 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였고, western detection solution (WEST-ZOLTM plus, Intron biotechnology, Suwon, Korea)을 이용하여 X-ray film (Fuji medical X-ray film, FUJI Photo Film co., LTD., Tokyo, Japan)에 감광시켜 현상하였다.

4. Immunohistochemistry

계류유산 및 인공임신중절을 통해 얻은 조직으로부터 나온 태반영양세포를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하고 slide에 문질러 얇게 부착시켜 건조시킨 후 90% 에탄올로 고정하였다. 3차 증류수와 PBS를 이용하여 수세한 후 peroxidase blocking solution (LSAB 2^o System HRP (Ready-to-Use AEC), Dako cytomatin, CA)으로 10분간 blocking을 수행하였고 1차 항체 (HSP27, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, CA)를 1:100으로 희석하여 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 수세하였고 2차 항체 (bovine anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, CA)를

1:1,000으로 희석하여 한 시간 반응시켰다. PBS 수세 후 streptavidin-HRP solution (LSAB 2[□] System HRP (Ready-to-Use AEC), Dako cytomatin, CA)으로 10분간 반응시켰고, substrate-chromogen solution (LSAB 2[□] System HRP (Ready-to-Use AEC), Dako cytomatin, CA)을 넣고 현미경으로 색 변화를 관찰하면서 10분간 염색하였다. 3차 증류수로 수세한 후 hematoxylin (Mayer's Hematoxylin Solution, Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA)으로 핵 염색을 하였으며, 3차 증류수로 수세하여 mount (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako cytomatin, CA)를 실시하였다.

5. Interpretation & Statistical analyses

Western blots assay를 이용하여 추출한 태반영양세포에서의 단백질의 정량은 각 주수별로 모든 단백질 내에 존재하는 actin으로 확인하였으며 계류유산 조직과 정상임신 조직에서 나타나는 단백질 발현의 차이는 영상판독기 (Image writer. VILBER LOURMAT, Bio-1D type, Vallee-cedex, France)을 이용하여 정량화하여 비교하였다. Stat View II (Abacus concepts. Inc. Berkeley, CA)을 이용하여 통계 처리하였고 p -value 0.05 이하를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

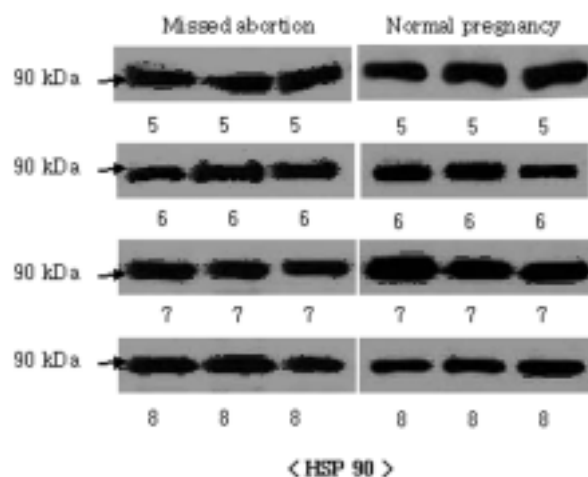
1. HSP 90

스테로이드 호르몬 합성에 관여하는 것으로 알려진 HSP 90의 발현은 5-8주의 계류유산 및 인공임신중절을 통해 얻은 조직으로부터 나온 태반영양세포에서 모두 관찰되었으며 두 조직 사이에 발현의 세기에 차이를 나타내지 않았다 ($p=0.93$) (Fig 1).

2. HSP 60

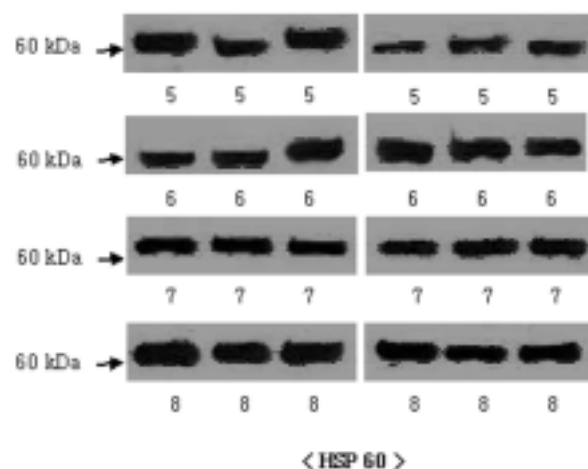
단백질 구조의 안정에 관여하며 면역학적으로 자가항체를 구성하는 것으로 알려진 HSP 60은 실험한 모든 5-8

주의 계류유산과 인공임신중절을 통해 얻은 조직으로부터 나온 태반영양세포에서 모두 관찰되었으며 두 조직 사이에 발현의 차이를 나타내지 않았다 ($p=0.92$) (Fig. 2).



$p=0.93$

Fig. 1. HSP 90 in trophoblast between missed abortion and normal pregnancy by Western blot.



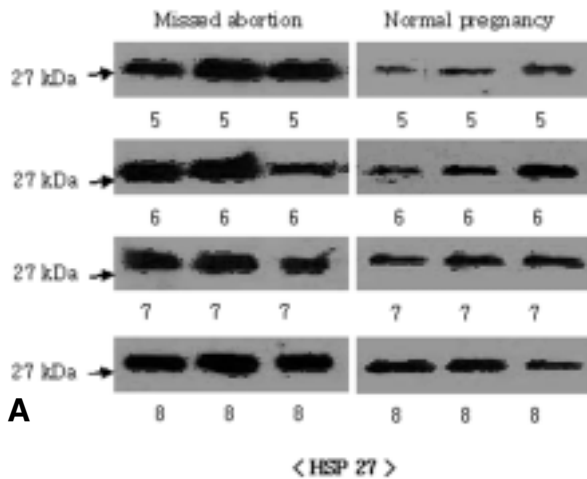
$p=0.92$

Fig. 2. HSP 60 in trophoblast between missed abortion and normal pregnancy by Western blot.

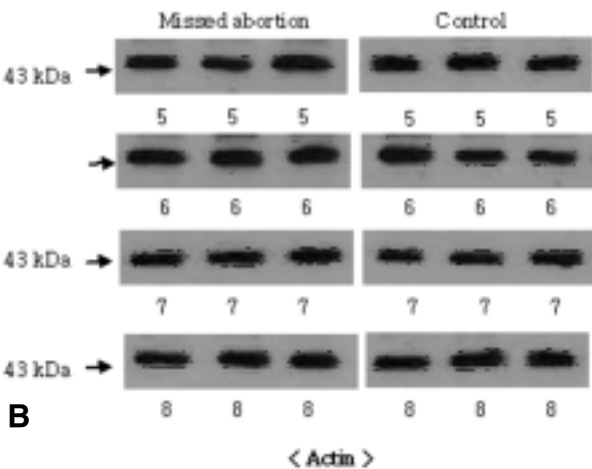
3. HSP 27

태반의 영양세포에서 잘 발현되는 HSP 27은 실험한

모든 주수의 계류유산과 인공임신중절을 통해 얻은 조직으로부터 나온 태반영양세포에서 모두 관찰되었으며 유산조직에서 정상조직보다 모든 임신 주수에서 더 강하게 발현되었다 ($p=0.035$) (Fig. 3). 또한 유산조직과 정상유모조직에서의 HSP27의 발현차이를 immunohistochemical staining을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 4, 5).



A



B

$p=0.032$

Fig. 3A. HSP 27 in trophoblast between missed abortion and normal pregnancy by Western blot.

Fig. 3B. Expression of actin (as control) by Western blot analysis.

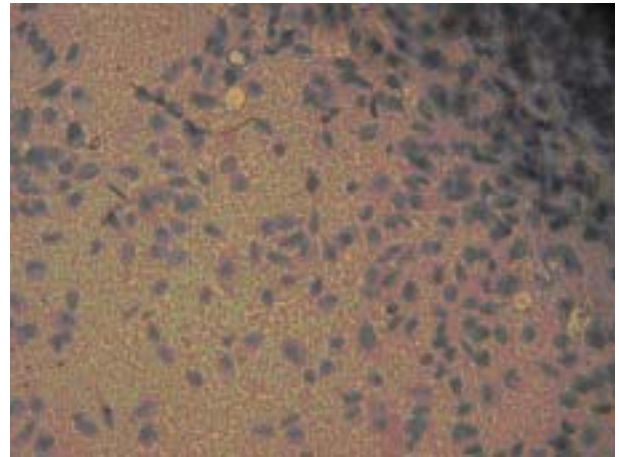


Fig. 4. HSP 27 in trophoblast of normal pregnancy ($\times 400$).

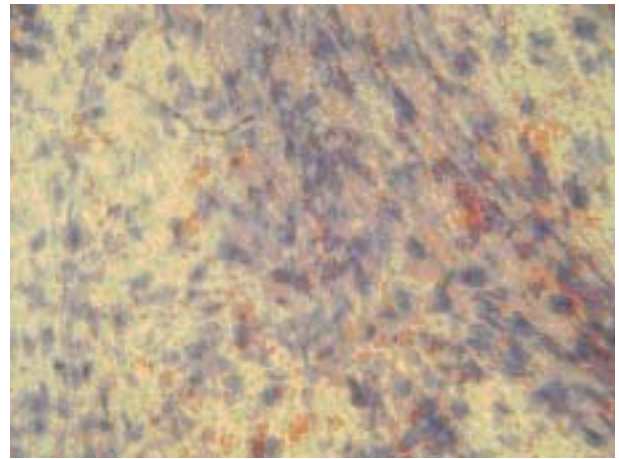


Fig. 5. HSP 27 in trophoblast of missed abortion ($\times 400$).

고 찰

1962년 Ritossa는 fruit fly (*Drosophila melanogaster*)의 salivary gland chromosome에서 열을 가하였을 때 부풀어오르는 (puffing) 특징적인 양상을 최초로 관찰하였고,² 1974년 Tissier는 이런 gene product를 'heat shock protein'으로 명명하였다.³

HSP은 세포내 여러 polypeptide와 상호작용을 통해서 변성이나 잘못되는 조합을 방지함으로써 모든 살아있는 세포에 있어서 세포방어기전을 유지하게 하고 불량한 환경에서 세포의 생존을 가능하게 하는 'molecular chaperon' 기능으로 알려지게 되었다.⁴ HSP는 모든 세포

내에 존재하여 세포가 정상적인 기능을 발휘하도록 도와주는 기능과 HSP 발현으로 면역반응을 조절하여 세포사를 유도하는 양면성을 가지고 있으며, 또한 스트레스에 대하여 먼저 전처치를 하였을 때 내성을 나타내어 세포를 보호해 주는 'stress tolerance' 기능을 나타내기도 한다.

따라서 이런 HSP의 세포생존 기전에 관련된 많은 흥미로운 사실들은 면역학, 생식의학, 종양학 및 감염증 등 여러 의학 분야에서 관심이 증가하면서 질병의 발생 기전과 연관성, 진단에 이용할 수 있는 표식자로서의 유용성, 또는 약물로 HSP의 발현을 조절하여서 새로운 치료법의 개발 등 다양한 분야에서 연구와 응용이 이루어지고 있다.⁵

HSP은 각각의 기능성보다는 분자량에 따라서 분류하는데, 잘 알려진 HSP families로 27, 60, 70, 90 kDa 등이 있다. HSP 90은 스테로이드 호르몬과 결합하는 수용체의 비활성화 형태 (inactive forms)를 안정시키는데 관여한다. 즉 호르몬 수용체 8S/9S와 결합한 HSP 90은 핵내로 이동하여서, 4S 상태로 되며, DNA의 specific gene site에 위치하여 호르몬과 결합하게 되면 HSP 90은 분리되고, 스테로이드 호르몬은 정상적인 고유의 작용을 나타내게 된다.⁶ HSP 70은 HSP families 중에서 가장 많이 알려진 대표적인 것으로 세포질과 핵에 고루 분포한다. HSP 70은 DNA strand의 파괴를 방지하여 미토콘드리아의 구조와 기능을 보호하여 궁극적으로 apoptosis를 억제한다.^{7,8} 또한 HSP 60은 주로 미토콘드리아 내에 존 intermembranous space로 미토콘드리아 전구체를 내보내거나 스테로이드 수용체를 핵내로 이동하는데 관여한다.⁹ 특히 모든 성숙, 미성숙 세포에서 다 발현되어 단백질의 수송, folding 및 조합에 관여하는 대표적인 molecular chaperons으로 알려져 있다. 한편 단백질 구조는 사람과 박테리아에서 50% 이상의 sequence homology를 보이기 때문에, HSP 60이 발현되는 곳에서의 면역 반응은 자가면역 현상과 연결시킬 수 있다.^{10,11} HSP 27은 small HSP이라고도 하며, decidual cell의 세포질이나, syncytiotrophoblast의 핵에 존재하며 에스트로겐 수용체와 상호작용을 하는 에스트로겐 조절 단백질로써 에스트로겐의 작용에 영향을

주는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴

임신과정에서 태반과 탈락막은 모체와 태아가 만나는 곳으로 왕성한 스테로이드 호르몬 합성과 높은 metabolic activity가 일어나기 때문에 이들 조직에서 HSP 발현 역시 활발할 것으로 생각된다.¹⁵ 임신중 태반과 탈락막에서 나타나는 HSP에 대한 초기 연구로 장기간의 프로게스테론 자극으로 인한 자궁내막의 탈락막 현상에서 HSP 27의 발현이 함께 나타나는 것을 In vitro에서 발견하였으며, 탈락막에서 발현되는 HSP과 조기진통의 상관관계에 관한 연구에서는 그 관련성을 발견할 수 없다고 하였다.¹⁶ 태반에서는 HSP 90, 70 및 60이 임신 제 3 분기에 발현되는 것을 관찰하였고, 이들의 발현 정도를 Immunohistochemistry로 측정하였을 때 비교적 일정하게 유지되었고, 또한 진통시에도 변화를 나타내지 않는다고 하였다.¹⁷ 그밖에 분만방법, 임신주수, Apgar 점수, 제대 pH 및 태아예후와 태반내 HSP의 분포 수준 및 발현의 정도와는 상관관계를 보이지 않았다고 하였다.¹⁸ 임신 제 1, 제 2, 제 3분기에서 탈락막과 태반에서 발현되는 HSP 90, 70, 60, 27의 분포 및 발현수준을 Immunohistochemistry를 이용하여 확인한 결과 HSP 90, 70, 60 및 27은 decidual stromal cell에서 각 분기에 걸쳐 모두 확인되었고, 염색되는 intensity가 HSP 60, 27에서는 모든 임신기간동안 일정하게 유지되는 반면에 HSP 90, 70은 임신주수가 진행될수록 intensity가 감소되는 양상을 나타내었다. HSP 90, 60은 핵내에서 주로 관찰되었고, HSP 70은 핵과 세포질에서 모두 관찰되었으며, HSP 27은 주로 세포질내에서 관찰되었다. 태반에서는 HSP 90, 70, 60은 cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, intermediate trophoblast, Hofbauer cell 및 endothelial cell에서 관찰되었다. 마찬가지로 HSP 90, 60은 핵내에서 주로 관찰되었고 HSP 70은 핵과 세포질에서 모두 관찰되었으나, HSP 27은 태반에서는 intermediate trophoblast와 syncytiotrophoblast cells에서만 관찰되었으며, 관찰되는 시기도 임신 제 1, 제 2분기로만 국한되었다.¹⁹

본 연구에서는 이처럼 HSP 90, 60, 27의 발현의 특징을 알아보고자 하였으며, 그 결과 계류유산 조직과 정상 임신 조직에서 모든 HSP가 발현되었고 특히 HSP 27은

유산 조직에서 정상조직보다 더 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이는 영양세포에서 임신기간에 따라서 차이를 보이는 HSP 27이 초기임신에서 보일 수 있는 다양한 스트레스에 대한 반응을 표현한 것으로 생각되며 계류유산에서 스트레스에 대한 보호작용으로 HSP 27이 정상조직보다 더 강하게 발현되었다고 사료되며, 이러한 현상은 초기 유산에 관여하는 많은 요인들이 세포에 많은 스트레스로 작용함을 추측 할 수 있었다. 그러나 구체적인 HSP 27를 비롯한 다양한 단백질의 기능 및 그 분자생물학적인 반응기전에 대해서는 앞으로 계속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F. Heat-shock proteins, first major products of zygotic gene activity in the mouse embryo. *Nature* 1983; 305: 331-3.
2. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-3.
3. Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. *J Mol Biol* 1974; 84: 389-98.
4. Morimoto R, Tissiere A, Georgopoulos G. The biology of heat shock proteins and molecular chaperons. 1994. NewYork Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Mizzen L. Immune responses to stress proteins: Applications to infectious disease and cancer. *Biotherapy* 1998; 10: 171-89.
6. Catelli MG, Binart N, Jung-Testas I, Renoir JM, Baulieu EE, Feramisco JR, et al. The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptor is a heat shock protein. *EMBO J* 1985; 4: 3131-5.
7. Hunt C, Morimoto RI. Conserved feature of eukaryotic hsp 70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp 70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6455-9.
8. Jaquire-Salin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT. Protective effect of hsp 70 in inflammation. *Experientia* 1994; 50: 1031-8.
9. Pratt WB, Czar MJ, Stancato LF, Owens JK. The HSP 56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplex: Could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J Steroid Biochem. Mol Biol* 1993; 46: 269-79.
10. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Intern Immunol* 1989; 1: 191-6.
11. Jones DB, Coulson AF, Duff GW. Sequence homology between hsp 60 and autoantigens. *Immunol Today* 1993; 14: 115-8.
12. Edward DP, Adams DJ, Savage N, McGuire WL. Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 93: 804-12.
13. Coffey AI, Lewis KM, Brickas AJ, King RJB. Monoclonal antibodies against a component related to soluble estrogen receptor. *Cancer Res* 1985; 45: 3686-93.
14. Dunn DK, Whelan RDH, Hill B, King RJB. Relationship of HSP 27 abdoestrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 469-79.
15. Ellis RJ. Proteins as molecular chaperon. *Nature* 1987; 328: 378-9.
16. Padwick MI, Whitehead M, King RJB. Hormonal regulation of HSP 27 expression in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 102: 9-14.
17. Driver MJ, Bulmer JN, Miller D, Lilford RJ. Placental heat shock proteins: no immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labor. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40: 236-43.
18. Li D, Gordon CB, Stagg CA, Udelsman R. Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord. *SHOCK* 1996; 5: 320-3.
19. Shah M, Stanek J, Handwerger S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochemical Journal* 1998; 30: 509-18.

「국문초록」

목적: 임신초기의 착상과 배아발달에는 다양한 면역학적 변화가 나타나며 HSP는 이러한 과정에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 계류유산 및 정상임신의 태반영양세포에서 나타나는 분자생물학적 변화에 대하여 HSP 90, HSP 60 및 HSP 27의 발현을 관찰함으로써 차이점을 확인하고 유산의 원인을 이해하고자 하였다.

연구 방법: 35예의 임신 5-8주의 계류유산 태반영양세포의 조직과 대조군으로 52예의 인공임신중절을 통해 얻은 태반영양세포조직을 이용하였다. 환자에게 실험의 목적에 대해 설명하였고 동의를 얻었으며 임상시험위원회의 심의를 통과하였다. Western blots assay를 이용하여 추출한 태반영양세포에서의 HSP 90, HSP 60 및 HSP 27의 발현을 확인하였고 계류유산조직과 정상임신조직에서 나타나는 단백질 발현의 차이를 영상판독기를 이용하여 정량화하여 비교하였다.

결과: HSP 90, HSP 60 및 HSP 27은 계류유산조직과 정상임신조직에서 모두 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 스테로이드호르몬 합성에 관여하는 것으로 알려진 HSP 90은 두 조직 사이에서 발현의 차이를 나타내지 않았다 ($p=0.93$). 단백질 구조의 안정에 관여하며 면역학적으로 자가항체를 구성하는 것으로 알려진 HSP 60도 두 조직 사이에서 발현의 차이를 발견할 수 없었다 ($p=0.92$). 그러나 태반의 영양세포에서 잘 발현되는 HSP 27은 유산조직에서 정상조직보다 모든 임신주수에서 더 강한 발현을 나타내었다 ($p=0.035$).

결론: 초기유산에 관여하는 많은 요인들로 인하여 세포에 많은 스트레스의 작용이 관여함을 확인할 수 있었으며, 구체적인 HSP 27를 비롯한 분자생물학적인 반응기전에 대해서는 앞으로 계속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

중심단어 : 열충격 단백질, 태반영양세포, 계류유산
