

태반 내 Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) 발현

차의과학대학교 의생명과학과¹, 차바이오텍 CHA 줄기세포연구소²

전수연¹ · 이현정² · 정현민¹ · 김진경¹ · 김기진^{1*}

Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta

Su Yeon Jeon¹, Hyun-Jung Lee², Hyun Min Jung¹, Jin Kyeong Kim¹, Gi Jin Kim^{1*}

¹Department of Biomedical Science, CHA University, Seoul, Korea

²Chabiotech Co., Ltd., CHA Stem Cell institute, Seoul, Korea

Objectives: Members of the immortalization-upregulated protein (IMUP) family are nuclear proteins implicated in SV40-mediated immortalization and cellular proliferation, but the mechanisms by which their expression is regulated are still unknown in placenta. To investigate to expression and fuctions of IMUPs in placenta, we conducted to compare IMUPs expression in normal and preeclamptic placenta tissues and analyzed the function of IMUP-2 in HTR-8/SVneo trophoblast cells after IMUP-2 gene transfection.

Methods: The expression of IMUPs was analyzed in placental tissues from the following groups of patients (none underwent labor): 1) term normal placenta (n=15); 2) term with preeclamptic placeneta (n=15); and 3) pre-term with preeclamptic placenta (n=11) using semi-quantitative RT-PCR, RNA in situ hybridization, immunohistochemistry, and Western blot. In order to evaluate the function of IMUP-2 in HTR-8/SVneo trophoblast cells, IMUP-2 plasmids were trnasfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells for 24 hours.

Results: We observed that IMUPs are mainly expressed in the syncytiotrophoblasts and syncytial knot of placental villi. The expression of IMUP-1 was not differences between normal and preeclamptic placenta tissues. However, IMUP-2 expression was significantly higher in preterm preeclamptic placenta tissues than in normal placenta tissues without labor (p<0.001). Furthermore, we confirmed overexpression of IMUP-2 induced apoptosis in HTR-8/SVneo trophoblast cells through up-regulation of pro-apoptotic proteins.

Conclusions: These results suggest that the expression of IMUP-2 is involved in placental development as well as increased IMUP-2 expression is associated with preeclampsia through the inducing of trophoblast apoptosis.

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(3): 163-174.]

Key Words: Immortalization-upregulated proteins, Preeclampsia, Apoptosis, Hypoxia, Trophoblast

태반은 정자와 난자가 수정된 후 발생한 배반포 (blastocyst) 내에서 태아로 발달될 세포내괴 (inner cell mass)와 태아 발달에 여러 영양물질을 제공함

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 (과번호 A084923).

으로써 태아의 발달에 중요한 역할을 하는 영양외 배엽 (trophectoderm)으로부터 발생되는 기관이다.¹ 이러한 태반은 임신기간 동안 일시적으로 생성되는 기관으로, 태아의 발달에 필요한 영양 성분, 노폐물, 그리고 산소 등을 탯줄을 통하여 산모와 태아에게 전달할 뿐 아니라 다양한 호르몬의 합성 및 분비를 통하여 임신기간 내 태아와 자궁의 성장에 중요한

역할을 한다. 그러므로, 임신기간 내 태반의 발달과 기능은 직접적으로 태아의 성장 발달에 영향을 미쳐 심각한 성장장애를 비롯한 다양한 태아의 발달에 손상을 초래할 수 있다.²

자간전증 (preeclampsia)은 임신 중반 이후 산모에게서 나타나는 고혈압, 단백뇨, 그리고 부종 등을 통하여 진단된다. 이는 전체 임신부의 약 5% 이상의 발현빈도를 나타내며, 산모와 신생아의 사망률이 높은 대표적인 고위험 산과질환이다. 현재까지 알려진 자간전증 관련 병인학적 원인은 임신 초기 유전적인 요인, 산모의 면역학적 요인, 낮은 산소 분압과 같은 외부 환경적인 요인 등으로 구분될 수 있다. 또한 아직까지 잘 밝혀지지 않은 요인들로 인한 태반의 기능저하에 따른 혈관내피세포의 기능저하, 그리고 영양막세포 (trophoblast)의 세포사멸 (apoptosis)과 세포증식 (proliferation) 간의 부조화 등에 의해 자간전증이 유발된다고 알려져 있으나, 명확한 병인학적 원인과 기전 등에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 이유로, 자간전증의 진단 및 치료를 위한 연구가 필요한 실정이다.^{3,4}

특히, 영양막세포는 태반을 구성하는 주된 세포의 일종으로, 배반포가 산모의 자궁내막에 착상을 시작하면 배반포의 가장 자리에 존재하던 세포 영양막세포 (cytotrophoblast)가 세포간 합체 (cell-to-cell fusion)를 통하여 신속하게 합포영양막세포 (syncytiotrophoblast)로 분화한다. 이렇게 분화된 합포영양막세포는 다양한 성장인자, 단백질분해효소 및 호르몬 등을 합성 및 분비함으로써, 자궁내막 안으로 침윤 (invasion)하여, 모체의 관상동맥 (spiral artery)을 확장시켜 혈액공급을 원활하게 유도하고 임신기간 동안 다량의 혈류공급을 가능하게 한다. 이러한 기능을 다한 합포영양막세포는 세포사멸과정 동안 포합체결절 (syncytial knot)을 형성하면서 세포사멸이 유도되어 태반 내 혈액으로 배출된다.^{5,6} 따라서, 영양막세포의 증식과 세포사멸간의 균형은 혈관확장을 통한 태반 발달에 중요할 뿐 아니라 산과질환에도 영향을 주는 중요한 요소이다.^{2,7}

최근, SV40 항원의 유입으로 불사화된 (immor-

talized) 인간 섬유아 세포주에서 새롭게 발굴 및 동정된 immortalization-upregulated proteins (IMUPs)은 세포의 증식을 유도할 뿐 아니라 일부 암세포주에서 암세포의 증식과 종양형성에 관여하는 핵 단백질로 보고되었으며, RNA 전사 (RNA transcription)과정에서 RNA splicing 기전에 의해 IMUP-1 (321 bp, 10.9 kDa)과 IMUP-2 (258 bp, 8.5 kDa)으로 구분된다고 보고되어 있다.⁸⁻¹⁰ 이러한 결과는 IMUP 유전자가 세포의 증식에 관여하는 유전자임을 시사하지만, IMUPs이 정상적인 영양막세포에서의 증식, 기능, 그리고 발달 등에 관련된 보고는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 정상적인 태반 발달과정에 세포의 증식과 세포사멸간의 균형이 태반 발달에 중요한 조절 기작으로 작용될 것이라 판단되어, IMUPs 유전자 및 단백질의 발현 양상을 태반에서 분석하고자 하였다. 또한, 대표적인 산과질환인 자간전증에서의 발현 양상을 정상 태반과 비교 분석하였으며, 임신 초기 영양막세포로부터 구축된 HTR-8/SVneo trophoblast cells에서의 IMUP-2의 과발현을 유도하여 IMUP-2의 기능을 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 태반조직 채취

본 연구에 사용된 태반은 차의과학대학교 강남차병원 산부인과에 내원한 산모로부터 동의서를 받았으며, 정상 태반의 기준은 의료, 산과 및 외과적인 문제가 없고, 태아의 기형이나 다태아가 아닌 경우로 37주 이상의 태반 (n=15)을 선별하였다. 반면, 자간전증의 경우, 고혈압 (140 mmHg/90 mmHg), 단백뇨 (300 mg 이상 /24시간뇨) 그리고 부종이 관찰되는 산모를 대상으로 중기 자간전증 태반 (2nd trimester prelamptic placenta) (n=11), 그리고 말기 자간전증 태반 (3rd trimester prelamptic placenta) (n=15)을 선별하였다. 태반조직은 태반의 태아 쪽 용모막을 포함하여 태반의 기저막부위까지 포함한 중심부위를 채취하여 RNA와 단백질 분석을 위해 액체질소에 급속냉동 후 -80°C에 보관하였다. RNA

in situ hybridization 분석을 위한 태반조직의 경우 DEPC-treated 4% paraformaldehyde 용액에 고정시킨 후 파라핀 절편을 제작하였다. 또한 면역형광분석을 위해서, 태반조직을 OCT compound (SACURA, Tokyo, Japan)를 이용하여 동결시킨 후 -80°C에 보관하였다.

2. 임신 초기 HTR-8/SVneo trophoblast cell line (영양막세포주) 배양

임신 초기 영양막세포주인 HTR-8/SVneo trophoblast cells은 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°C 온도에서 5%의 CO₂가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 세포가 약 80~90% 정도의 confluence로 자랐을 때 0.05%의 trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 TrypLE Express 용액 (Gibco)으로 2분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 계대배양을 실시하였다.

3. Total RNA 분리 및 semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-quantitative RT-PCR)

HTR-8/SVneo trophoblast cells과 태반으로부터 얻은 조직은 각각 RNeasy RNA isolation kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)와 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 특히, 태반의 경우 -80°C에 보관한 태반조직을 액체질소를 이용하여 막자사발로 파쇄한 후 TRIzol reagent을 가하고 얼음에서 10분간 반응시킨 후 sonication을 하였다. 추출한 RNA는 Nanodrop spectrophotometer (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°C에서 5분간 반응시키고 5× first-strand buffer, 0.1 m DTT, RNase-out, 그리고 superscript III RT (Invitrogen)를 첨가한 후 50°C에서 1시간, 72°C에서 15분간 반응하

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR analysis

Gene	Sequence (5' → 3')	Size (bp)	Temp. (°C)
IMUP-1	ATGGAGTTCGACCTGGG TCAGTGGGGAGCCTCCTT	321	57
IMUP-2	ATGGAGTTCGACCTGGG ACTTCACATCCGTGTCCG	261	55
Bak	CCAGGTCCTCCCAGGCAG CCCAGA ACCACCAGCACG	569	58
Caspase-3	CAGAACTGGACTGTGGCA TAGCGTCAAAGGAAAAGG	266	52
Caspase-9	GAAGTTCTGCCGTGAGTC GGGTTACTGCCAGGGGAC	429	52
Bcl-2	CCGAGATGTCCAGCCAGC GCCAAACTGAGCAGAGTC	334	52
28s rRNA	TTGAAAATCCGGGGGAGAG ACATTGTTCCAACATGCCAG	100	52

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 IMUP-1, IMUP-2 특이적 프라이머와 세포사멸 관련 유전자들의 특이적 프라이머를 H-Taq polymerase kit (Solgent, Taejeon, Korea)를 이용하여 semi-quantitative PCR을 실시하였다 (Table 1). 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 발현량을 측정하였고, 정상적인 세포에서 일정하게 발현되는 28s rRNA 유전자를 함께 증폭하여 28s rRNA의 발현을 기준으로 각 그룹별 발현 정도를 정량화하여 semi-quantitative 하게 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다.

4. RNA *in situ* hybridization

DIG-labeled UTP (Roche, Mannheim, Germany)와 RNA *in vitro* transcription (Promega)을 이용하였다. IMUP-2 plasmid 내 존재하는 T7 promoter에 T7 RNA polymerase로, SP6 promoter에 SP6 RNA polymerase로 각각 digoxigenin (DIG)-labeled antisense probe와 digoxigenin(DIG)-labeled sense probe를 제작하였다. RNA free 상태로 제작된 태반 파라핀 조직을 5 μ m의 두께로 절편하여 rehydration시킨 후 *in situ* hybridization detection kit (InnoGenex, San Ramon, CA, USA)를 사용하여 hybridization을 하였다. Proteinase K (DAKO, Glostrup, Denmark) 용액으로 37°C 온도에서 10분간 반응시킨 후 1% formaldehyde solution (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 후고정을 실시하였다. 태반조직에 DIG-labeled IMUP-2 probe를 첨가하여 16시간 이상 hybridization시킨 후 0.1% Tween-20 (Sigma)을 첨가한 PBS 용액으로 세척한 뒤 biotin/streptavidin-ALP immunodetection-based methods를 이용하여 발색 후 Canada balsam (Junsei, Tokyo, Japan)으로 봉입하여 현미경 (Nikon eclipse 50i; Kawasaki,

Japan)으로 관찰하였다.

5. 면역조직화학법을 이용한 IMUP-2 발현 위치 검증

파라핀 포매한 태반절편조직은 Xylene (Junsei)으로 탈파라핀 시키고 에탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)을 이용하여 합수과정을 거친 후 Proteinase K (DAKO)를 0.05 M Tris-Hcl (pH 7.5)에 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 조직 내 고정액에 의해 변성된 항원의 부활을 유도하였다. PBS 용액으로 세척한 후 normal blocking 용액 (DAKO)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 Anti-IMUP-2 (1:50 희석, 김진경교수 제공)을 조직에 첨가하여 4°C 냉장에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 이후에 PBS 용액으로 3차례 수세한 후 메탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)에 3%의 H₂O₂ 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 Streptoavidin-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. 염색이 끝난 조직은 에탄올 (Merck)을 이용하여 단계별 탈수를 시행하고 Xylene (Junsei)으로 투명을 유도하고, Canada balsam (Junsei)으로 봉입하여 현미경 (Nikon eclipse 50i)으로 관찰을 하였다.

6. Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

태반조직은 막자사발과 sonicator를 이용하여 파쇄하였다. 대조군 세포와 IMUP-2가 도입된 세포는 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,

South Korea)을 첨가한 후 sonicator를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 태반조직과 세포는 4°C의 온도에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 한 후 상층액을 수거하였으며, 단백질의 농도는 BCA assay kit (Pierce; Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 총 40 µg의 단백질은 95°C의 온도에서 5분 동안 반응시킨 후, 12% SDS-PAGE를 통해 전기영동시켜 PVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer 하였다. Membrane은 5%의 탈지분유 (BD, Sparks, MD, USA)에 담아 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 anti-IMUP-2 (1:1000)와 apoptosis 관련 항체인 anti-Bak (1:2000 희석; EPITOMICS, Burlingame, CA, USA), anti-caspase-9 (1:4000 희석; R&D systems, Minneapolis MN, USA), anti-Bcl-2 (1:500 희석; Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA), 그리고, anti-β-actin (1:5000 희석; Santa Cruz Biotechnology) 등을 첨가하여 4°C 냉장에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit (1:5000 희석) (Bio-Rad) 또는 mouse (1:10000 희석) (Bio-Rad) 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL Advance Western blot detection kit (Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 peroxidase 활성을 밴드로 시각화하여 단백질 발현을 검출하였다.

7. IMUP-2 plasmid를 이용한 transfection

1×10^6 의 HTR-8/SVneo trophoblast cells을 100×20 mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark)에 배양하여 transfection을 실시하기 24시간 전에 항생제와 혈청이 없는 OPTI-MEM (Gibco) 배지로 교환하였으며, 이는 세포가 약 70~80% 정도 자랐을 때 실시하였다. pcDNA 3.0 vector (invitrogen)에 클로닝된 IMUP-2 플라스미드는 lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 8 µg을 세포에 transfection 하였으며, 이에 대한 대조군으로서 pcDNA 3.0 vector (mock)를 실험군과 동일한 양의 lipofectamine 2000에 넣어 세포에 처리하였다. Transfection한 뒤 6시간 이후 실험군과 대조군 세포 모두를 항생제와 FBS가 들어

있는 RPMI-1640 배지 (Gibco)로 교환하여 총 24시간 동안 배양하였다.

8. Apoptosis 핵 관찰을 위한 Prothodiodide (PI) staining

12-well plate (Nunc)에 coverslip (Nunc)을 넣고 HTR-8/SVneo trophoblast cells을 배양하여 약 70~80% 정도 자랐을 때, IMUP-2 plasmid를 통상적인 transfection 방법으로 도입시킨 후 24시간 동안 배양을 실시한 후 PBS (Gibco)로 수세하였다. 수세한 세포들은 차가운 메탄올 (Merck)로 상온에서 10분간 고정한 후 공기 중에서 건조시켰으며, 세포의 핵을 관찰하기 위하여 PI (Sigma)를 세포에 첨가하여 상온에서 2분간 반응시키고 세척 후 수용성 봉입제 (glycerol-based mounting solution; DAKO)를 이용하여 봉입한 후 형광현미경 (LSM 510 META microscope; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

9. 통계

RT-PCR 반응 후 정상 태반, 자간전증 태반에서의 IMUP-2 발현 정도와 IMUP-2 plasmids transfection 후 실험군과 대조군 (mock)의 세포 수의 변화 등은 Student's *t*-test를 통해 검증하였으며, $p < 0.05$ 이 됐을 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 태반조직 내 IMUPs mRNA의 발현 분석

태반 내에서의 IMUPs RNA 발현을 분석하기 위하여 정상 태반 (n=15), 중기 자간전증 태반 (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 발현량을 기준으로 semi-quantitative RT-PCR 분석을 실시하였다. IMUP-1의 mRNA 발현은 정상 태반조직과 각 자간전증 태반조직 모두에서 통계학적 유의성이 관찰되

지 않았으나 ($p>0.05$, Figure 1A), IMUP-2의 mRNA 발현은 정상 태반보다 중기 자간전증 태반에서의

발현 양상이 현저하게 증가되었으며 통계학적 유의성이 관찰되었다 ($p<0.001$, Figure 1B). 그러나, 말

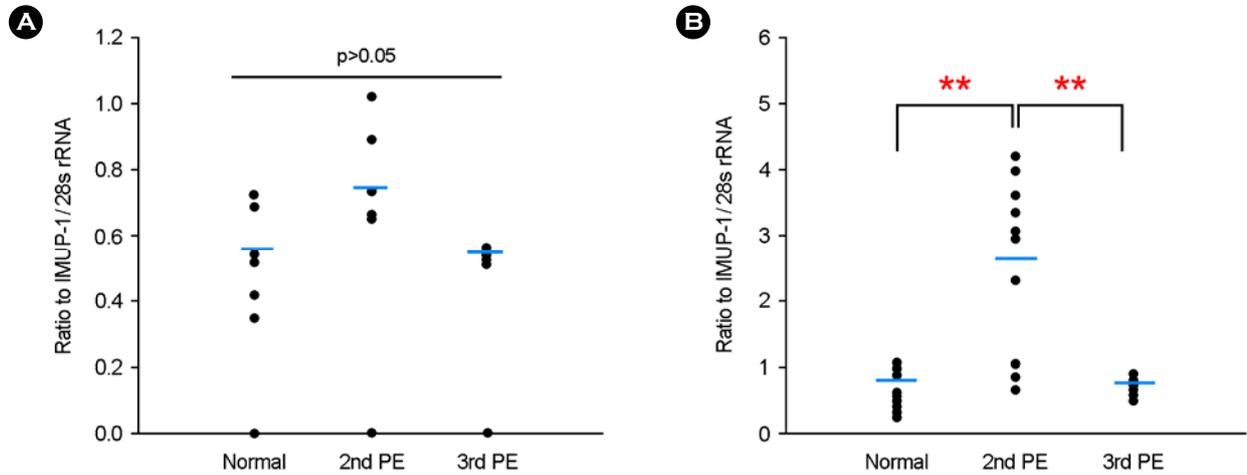


Figure 1. mRNA expression of IMUPs in normal and preeclamptic placentas. Densitometric analysis of IMUP-1 mRNA expression relative to 28s rRNA expression (A). Densitometric analysis of IMUP-2 mRNA expression relative to 28s rRNA expression (B). Data are expressed as means \pm SD. Statistical analysis was carried out by unpaired Student's *t*-tests ($**p<0.001$). PE = Preeclampsia. -, Mean value.

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

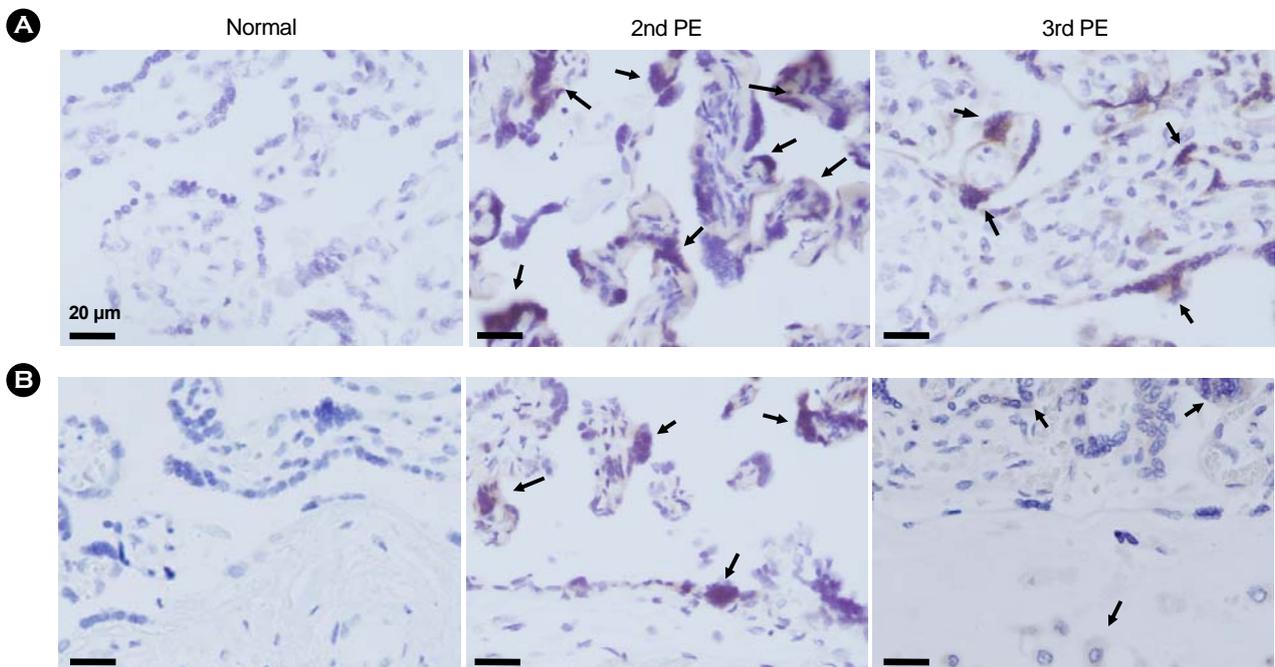


Figure 2. mRNA expression of IMUP-2 in placental villi (A) and placenta basal plates (B) using RNA *in situ* hybridization. Magnification, $\times 200$; scale bar, 20 μ m.

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

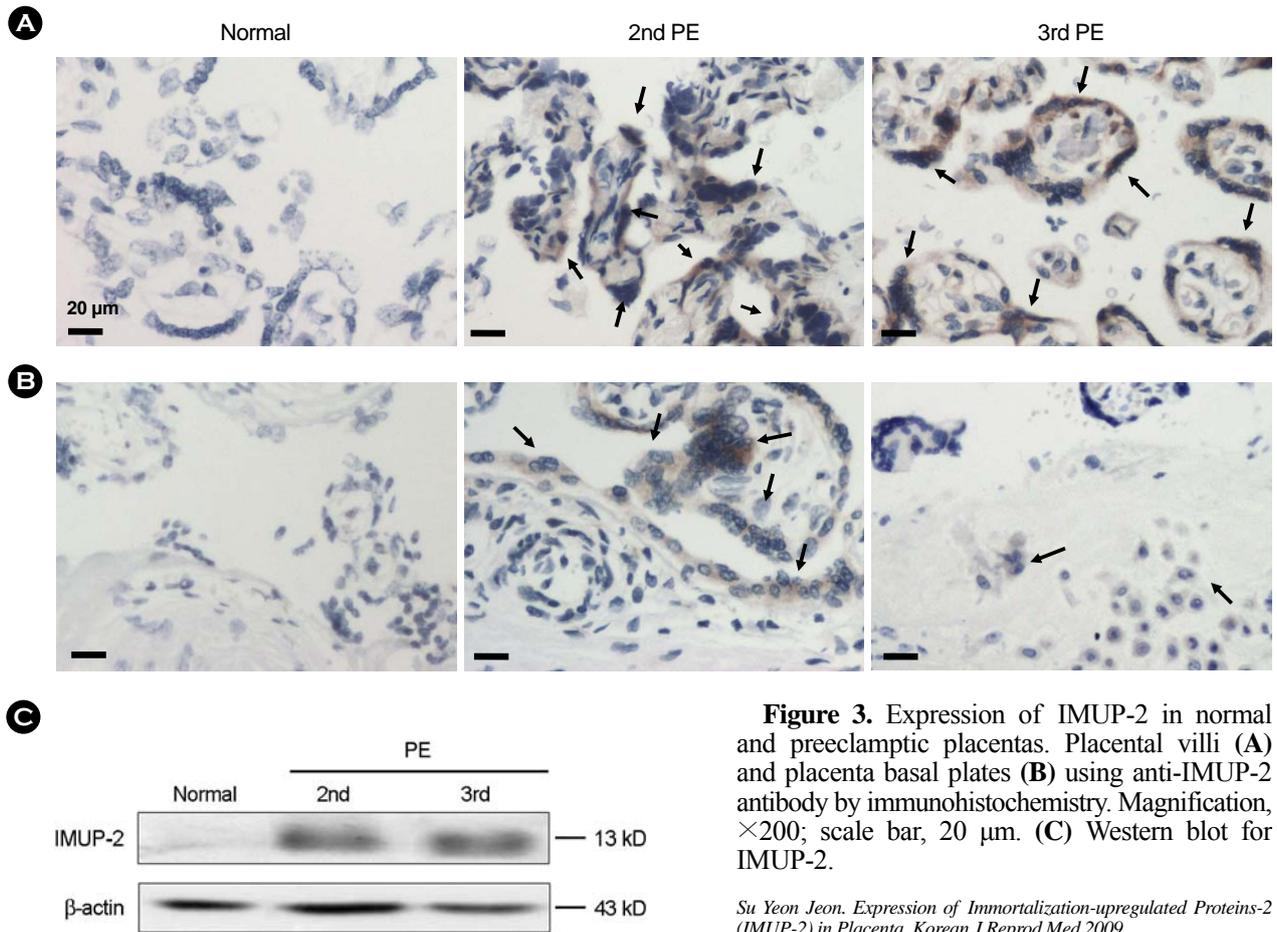


Figure 3. Expression of IMUP-2 in normal and preeclamptic placentas. Placental villi (A) and placenta basal plates (B) using anti-IMUP-2 antibody by immunohistochemistry. Magnification, $\times 200$; scale bar, 20 μm . (C) Western blot for IMUP-2.

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

기 자간전증 태반에서의 IMUP-2 RNA 발현은 다시 감소되는 결과가 관찰되었다 ($p < 0.001$, Figure 1B).

2. mRNA *in situ* hybridization 방법을 이용한 IMUP-2의 태반조직 내 발현

정상 태반과 자간전증 태반에서 발현의 차이가 관찰된 IMUP-2의 발현 위치를 확인하고자, mRNA *in situ* hybridization 방법으로 태반조직 내 발현을 분석한 결과, IMUP-2 유전자는 대부분 합포영양막 세포와 포합체결절에서 주로 발현되었으며 (Figure 2A), 태반의 기저막부위에서는 탈락막세포 (decidua cells)에서도 약한 발현 양상이 관찰되었다 (Figure 2B). IMUP-2의 발현은 정상 태반에서 매우 약한 발현을 보인 반면, 자간전증에서는 발현의 증가가 관찰되었으며, 특히, 중기 자간전증의 태반조직 내 포

합체결절에서 강한 발현이 관찰되었다.

3. 태반조직 내에서의 IMUP-2의 발현 분석

IMUP-2 항체를 이용하여 태반조직 내에서의 IMUP-2 단백질 발현을 면역조직화학법 (immunohistochemistry)을 이용하여 분석한 결과, 합포영양막세포와 포합체결절에서 관찰되었으며, 특히 중기 자간전증 태반에서 IMUP-2 단백질의 발현이 강하게 발현되는 것이 관찰되었으며, 기저막부위에서는 약한 발현 양상이 관찰되었다 (Figure 3A, B). 이러한 발현 양상은 RNA *in situ* hybridization 결과와 유사한 경향으로 관찰되었다. 반면, Western blot 분석에서는 중기 및 말기 자간전증 태반 모두에서 IMUP-2의 발현이 정량적으로 증가되는 것이 관찰되었다 (Figure 3C).

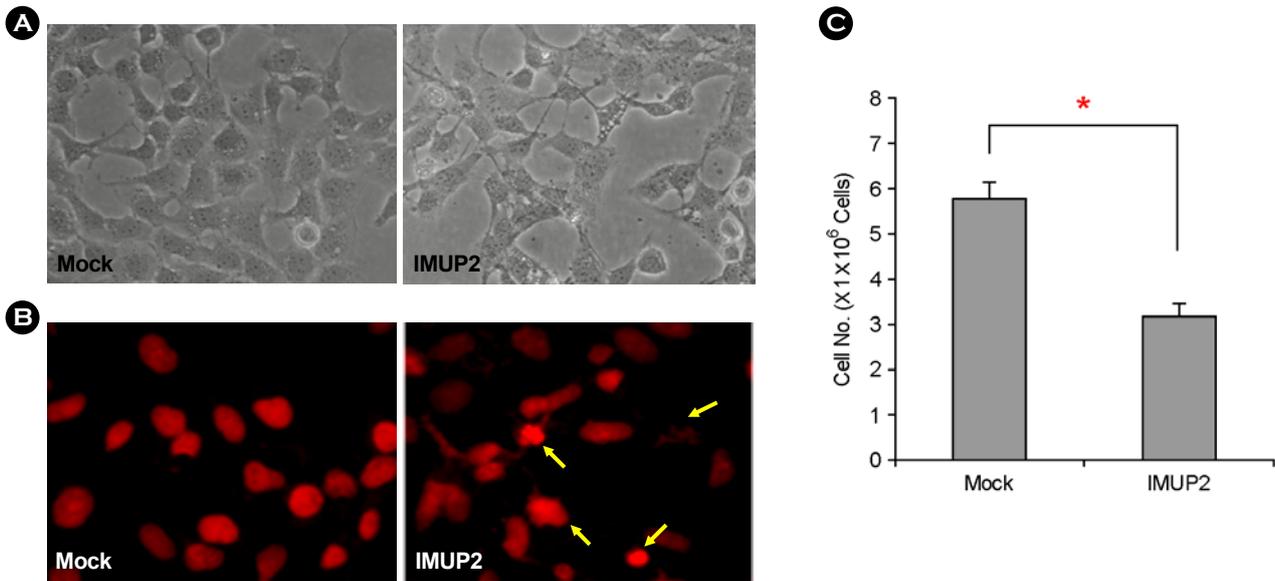


Figure 4. Viability in IMUP-2-transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells. **(A)** The morphology of mock and IMUP-2-transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells. Magnification, $\times 400$ **(B)** Apoptosis analysis in mock and IMUP-2-transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells using PI staining. Magnification, $\times 400$. Yellow arrow means apoptotic nuclei. **(C)** Cell viability between mock and IMUP-2-transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells. Statistical analysis was carried out using unpaired Student's *t*-tests ($*p < 0.05$).

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

4. IMUP-2 유전자 도입된 HTR-8/SVneo trophoblast cells에서의 특징 분석

24시간 동안 IMUP-2 유전자가 도입된 HTR-8/SVneo trophoblast cells의 경우, 영양막세포의 형태가 점차로 바뀌는 것이 관찰되었으며 (Figure 4A), propidium iodide (PI) 핵 염색 형광 시료를 통한 염색 시 대조군과 비교하여 핵의 응축, 비정상적인 핵 모양, 그리고 절단된 핵 모양들의 관찰을 통하여 과발현된 IMUP-2에 의한 세포사멸이 관찰되었다 (Figure 4B). 이러한 IMUP-2 유전자 도입 후 세포증식에 대한 세포 수를 계수한 결과, 통계학적으로 유의하게 IMUP-2 유전자의 도입 후 세포의 수가 감소됨이 관찰되었다 ($p < 0.05$, Figure 4C).

5. IMUP-2 발현 증가된 영양막세포주 (HTR-8/SVneo trophoblast cells)에서의 세포사멸 관련 유전자 분석

IMUP-2 유전자가 과발현된 HTR-8/SVneo tropho-

blast cells의 RNA를 이용하여 세포사멸 관련 유전자들의 발현을 RT-PCR 방법으로 분석한 결과, 세포사멸을 촉진시키는 Bak, caspase-3와 caspase-9의 발현은 대조군에 비해 증가되는 결과가 관찰된 반면, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현은 감소되는 결과가 관찰되었다 (Figure 5A). 또한, 세포사멸 관련 유전자들의 단백질 발현을 Western blot 방법으로 분석한 결과, IMUP-2 유전자의 도입에 의한 IMUP-2 단백질의 발현은 영양막세포주에서 대조군과 대비하여 현저한 증가되는 것이 관찰되었으며, 세포사멸 관련 유전자의 경우도 RT-PCR의 결과와 유사하게 세포사멸을 촉진하는 Bak과 caspase-9는 IMUP-2 도입된 영양막세포주에서 증가된 반면, Bcl-2의 경우는 현저히 감소하는 경향이 관찰되었다 (Figure 5B).

고 찰

태반은 임신기간 동안 태아 발달에 직, 간접적으

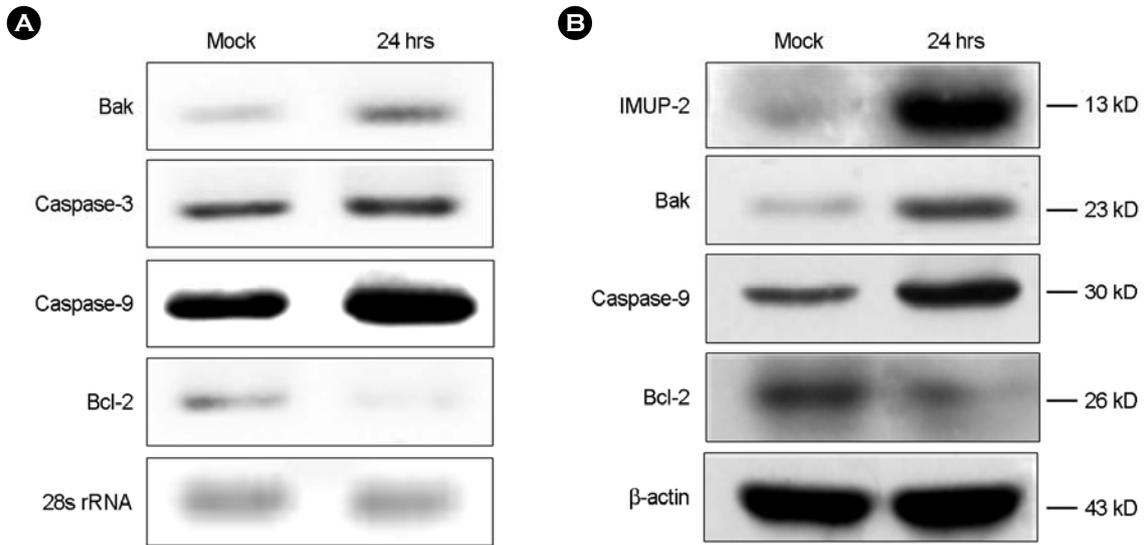


Figure 5. Expression of apoptosis-related genes in HTR-8/SVneo trophoblast cells after IMUP-2 transfection. **(A)** mRNA expression of apoptosis-related genes in IMUP-2 transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells. **(B)** Western blot of apoptosis-related genes in IMUP-2 transfected into HTR-8/SVneo trophoblast cells. 28s rRNA and β -actin were used to internal control.

Su Yeon Jeon. Expression of Immortalization-upregulated Proteins-2 (IMUP-2) in Placenta. Korean J Reprod Med 2009.

로 영향을 미치는 중요한 기관으로, 정상적인 태반의 발달과 기능은 태아의 건강에 필수적인 요인이다. 특히, 태반에서의 다양한 유전자들의 발현 조절은 태반과 태아의 발달과 연결되어 있으며, 태반내에서의 유전자 발현 조절에 이상이 유발되었을 때 태아의 발달에 영향을 줄뿐 아니라 다양한 산과질환으로 진행될 수 있다.¹¹ 이러한 태반의 발달에 중요한 역할을 하는 대표적인 세포로 영양막 세포가 존재하는데, 이 세포들은 임신 초기 착상시기부터 임신 말기 태반에 이르기까지 지속적인 증식, 분열, 분화, 세포사멸 등의 역동적인 단계를 거쳐 태반의 발달과 기능 조절하는 중요한 역할을 한다.^{1,12}

영양막세포는 태아로부터 기원한 정상적인 세포임에도 불구하고 분화 (differentiation)에 따른 침윤성 (invasion)과 이수성 (aneuploidy) 등, 암세포와 유사한 특징을 가지고 있다.² 미분화 상태의 영양막 세포, 즉, 세포영양막세포는 지속적인 세포분열로 영양막세포의 증식에 관여하며, 이러한 세포가 모체의 혈액 내 존재하는 성장인자들에 의해 섬유

성 합포영양막세포 (villous syncytiotrophoblast)로 분화되는 한편, 모체의 자궁내막에 존재하는 세포외간질 (extracellular matrix, ECM)과 만나게 되면 세포외영양막세포 (extravillous trophoblast)로 분화가 유도된다. 이러한 세포외영양막세포는 자궁내막 안으로 침윤하여 모체의 관상동맥을 확장시키기 위해, 혈관 안으로 침윤을 한 혈관 내 영양막세포 (endovascular trophoblast)와 일반 세포외간질로 침윤이 된 다핵성영양막세포 (multinucleated trophoblast)로 분화가 유도되면서 태반의 발달을 유도하여 혈관의 확장을 통한 혈액량의 증가, 영양소 공급, 가스 교환 등을 효율적으로 진행한다.¹³ 또한, 세포영양막세포의 세포간 접합 (fusion)에 의해 합포영양막세포로 분화될 수 있다.^{14,15} 이러한 세포간의 접합을 통하여 이수성 (aneuploidy)의 특징을 갖게 되며, 기능을 마친 합포영양막세포는 세포사멸에 의해 제거된다. 따라서, 이러한 영양막세포의 증식, 분화, 세포사멸은 태반의 발달과 기능에 매우 중요하다. 특히, 영양막세포의 과도한 세포사멸유도는 영양막세포의 절대적인 수를 저하함으로써, 영양막

세포의 기능 저하를 초래하여 다양한 산과질환을 유도할 수 있다.^{16,17}

자간전증은 영양막세포가 모체의 관상동맥 내로의 침윤이 부적합하게 이루어짐으로써 혈관내피세포의 기능이 떨어져 유발되는 대표적인 고위험 산모질환으로, 그 원인으로는 유전적 요인과 낮은 산소 분압 (저산소성, hypoxia) 같은 외부 환경적인 요인 등에 의한 영양막세포의 분화능 감소, 과도한 세포사멸, 그리고 침윤성 억제 등이 알려져 있다.¹⁸⁻²¹ 일반적으로, 자간전증의 경우 태반의 혈관의 기능 이상으로 인해 태반의 발달이 비정상적이며 태반의 크기는 정상적인 태반보다 작은 특징이 있다. 이러한 비정상적인 태반은 직접적으로 태아의 발달에 중요한 영향을 미치는 요인 중 하나로 알려져 있다. 그러나, 최근까지도 자간전증의 병인학적 요인과 뚜렷한 진단 요소의 부재로 논란이 많은 실정으로, 태반에서의 연구는 미흡한 실정이다.

Immortalization-upregulated proteins (IMUPs)는 최근에 새로이 동정된 핵 단백질로, 세포의 증식을 유도하고, p53 신호전달 체계에 돌연변이를 유발, 세포주기에서 S 기와 G2/M 기를 증가시킴으로써 종양형성 시 과다 발현되는 특징을 갖는 단백질로, 본 연구에서는 정상적인 태반의 발달 단계에서 이러한 IMUPs 유전자의 발현이 영양막세포증식에 미치는 영향을 조사 분석하는 과정에서, IMUP-2의 경우 정상적인 태반이 아닌 자간전증 태반에서 IMUP-2 유전자가 증가되는 새로운 결과를 관찰하게 되었고, 주로 합포영양막세포과 포합체결절에서 IMUP-2 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. 이러한 세포들의 특징은 세포의 증식이 아닌 분화를 통한 영양막세포의 세포사멸에 관련된 세포들로, 태반 내에서의 IMUP-2의 새로운 기능을 시사하는 것으로 생각된다. 또한, IMUP-2의 과발현을 유도한 영양막세포에서는 세포의 수가 줄어드는 경향이 관찰되었는데, 이는 영양막세포의 세포사멸에 의한 결과라는 것이 본 연구진에 의해 처음 규명되었다. 이러한 결과는 기존의 암세포주에서 암세포의 증식에 관여한다고 알려진 IMUP-2의 새로운 기능이라

판단되고, 특히, 이러한 결과는 IMUP-2의 발현이 태반의 발달에 중요할 뿐 아니라 IMUP-2의 과발현이 자간전증과 같은 산과질환과도 연관되어 있다는 것을 시사한다. 비록, IMUP-2의 의한 세포사멸 기작과 관련된 연구보고는 아직 없으나, IMUP-2의 과발현을 통한 영양막세포의 세포사멸 기전에 대한 연구가 필요할 뿐 아니라 낮은 산소 분압 (hypoxia) 과 같은 자간전증 유발 환경에서의 IMUP-2의 발현 및 기능에 대한 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

결론적으로, IMUP-2의 발현은 태반 발달 및 자간전증 태반 내의 영양막세포의 세포사멸에 중요한 역할을 하는 것이 처음으로 관찰되었고, 이는 자간전증의 예측 및 진단에 유용한 마커들이 부재한 상황에서 새로운 마커로서의 활용될 수 있다고 판단된다. 따라서, 앞으로 IMUP-2의 세포사 기전 규명을 위한 연구들이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에서 사용된 IMUP-2 항체를 제공해주신 김진경교수 (차의과학대학교)께 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Moore, Keith L, T.V.N. Persaud. The developing human-clinically orientated embryology. 8th ed. Portland (OR): Elsevier Saunders; 2008.
2. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta, 4th ed. New York, 2000.
3. Hemberger M. Epigenetic landscape required for placental development. Cell Mol Life Sci 2007; 64: 2422-36.
4. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. Am J Obstet Gynecol 1998; 179: 1359-75.
5. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. What we have learned about preeclampsia. Semin Perinatol 2003; 27: 239-46. Review.
6. Brosens IA. Morphological changes in the utero-placental bed

- in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol* 1997; 4: 573-93.
7. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruyse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 648-55.
 8. Kim JK, Ryll R, Ishizuka Y, Kato S. Identification of cDNAs encoding two novel nuclear proteins, IMUP-1 and IMUP-2, upregulated in SV40-immortalized human fibroblasts. *Gene* 2000; 257: 327-34.
 9. Kim JK, An HJ, Kim NK, Ahn JY, Kim KS, Kang YJ, et al. IMUP-1 and IMUP-2 genes are up-regulated in human ovarian epithelial tumors. *Anticancer Res* 2003; 23: 4709-13.
 10. Ryoo ZY, Jung BK, Lee SR, Kim MO, Kim SH, Kim HJ, et al. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with overexpression of IMUP-1 and IMUP-2 genes in cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 995-1002.
 11. Roberts JM, Von Versen-Hoeynck F. Maternal fetal/placental interactions and abnormal pregnancy outcomes. *Hypertension* 2007; 49: 15-16.
 12. 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.
 13. Kar M, Ghosh D, Sengupta J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod* 2007; 22: 2814-23.
 13. Langbein M, Strick R, Strissel PL, Vogt N, Parsch H, Beckmann MW, et al. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 175-83.
 14. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 29-39.
 15. Huppertz B, Hemmings D, Renaud SJ, Bulmer JN, Dash P, Chamley LW. Extravillous trophoblast apoptosis-a workshop report. *Placenta* 2005; 26 Suppl A: S46-8.
 16. Baumwell S, Karumanchi SA. Preeclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract* 2007; 106: c72-81.
 17. Whitley GS, Dash PR, Ayling LJ, Prefumo F, Thilaganathan B, Cartwright JE. Increased apoptosis in first trimester extravillous trophoblasts from pregnancies at higher risk of developing preeclampsia. *Am J Pathol* 2007; 170: 1903-9.
 18. Heazell AE, Moll SJ, Jones CJ, Baker PN, Crocker IP. Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. *Placenta* 2007; 28 Suppl A: S33-40.
 19. Ishioka S, Ezaka Y, Umemura K, Hayashi T, Endo T, Saito T. Proteomic analysis of mechanisms of hypoxia-induced apoptosis in trophoblastic cells. *Int J Med Sci* 2006; 4: 36-44.
 20. Redline RW, Patterson P. Preeclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 1995; 26: 594-600.

= 국문초록 =

목적: Immortalization-upregulated proteins (IMUPs) family는 SV40의 유전자 도입을 통한 불사화된 인간 섬유아세포에서 새로이 분리 동정된 핵 내 단백질로써, 세포의 증식과 종양형성에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 태반 발달과정에 따른 발현 양상과 기능에 대해서는 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구의 목적은 정상 태반과 자간전증 태반조직에서의 IMUPs 유전자의 발현을 분석하고, IMUPs 유전자의 HTR-8/SVneo trophoblast cells 내로 도입 후 IMUPs의 기능을 분석하고자 하였다.

연구방법: IMUPs 발현을 분석하고자, 정상 태반 (n=15), 중기 자간전증 태반 (n=11), 그리고 말기 자간전증 태반 (n=15)조직을 수집하여 RT-PCR, RNA *in situ* hybridization, 면역조직화학법, 그리고 Western blot 등을 실시하였다. IMUP-2의 기능을 확인하고자 HTR-8/SVneo trophoblast cells에 IMUP-2 plasmids를 transfection한 뒤 24시간 후에 각 그룹간의 세포 수를 계수하였으며, 세포사멸 관련 유전자들의 발현을 분석하고자 RT-PCR, 그리고 Western blot 분석 등을 실시하였다.

결과: IMUPs는 주로 태반 내 합포영양막세포와 포합체결절에서 주로 발현되었다. IMUP-1의 경우 정상과 자간전증 태반에서의 발현의 차이가 관찰되지 않았으나, IMUP-2의 경우 정상 태반에서 매우 약한 발현을 보였으며, 자간전증에서는 발현의 증가가 통계학적으로 유의하게 관찰되었으며 ($p < 0.001$), 특히, 중기 자간전증의 태반조직 내에서는 강한 발현이 관찰되었다. 또한, IMUP-2의 유전자 도입에 의해 과발현된 HTR-8/SVneo trophoblast cells에서는 세포사멸 관련 유전자들의 증가로 영양막세포의 수가 감소됨이 관찰되었다.

결론: 이러한 결과들은 IMUP-2의 발현이 정상 태반의 발달에 관여할 뿐 아니라 증가된 IMUP-2는 영양막세포의 세포사멸을 증가시킴으로써 자간전증과도 상관성이 있음이 관찰되었다. 따라서, IMUP-2는 자간전증을 예측 및 진단할 수 있는 마커로 유용하게 활용 가능하다고 사료된다.

중심단어: Immortalization-upregulated proteins, 자간전증, 세포사멸, 저산소성, 영양막세포