

모체열충격이 C57/BL6계 Hsp70 KO 태아 발생에 미치는 영향

김 원 규

한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실

간추림 : 실험동물과 사람에서 모체의 고열은 선천성기형을 유발하는 기형유발인자의 일종으로 인정되고 있다. 세 포배양실험에서 세포가 고열에 노출되면 세포내 Hsp70의 농도가 증가한다고 알려져 있으나 포유류에서는 그 방 어기전이 아직 불명확하다. 따라서 유전자 조작을 통하여 Hsp70이 결손된 생쥐와 정상 생쥐를 임신시켜 고열에 노출한 후 선천성기형을 동반한 태아의 비율을 서로 비교하면 Hsp70의 방어기전을 간접적으로 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

임신 제 8.5일에 C57/BL6계열 Hsp70 유전자결손생쥐 (Hsp70 knock-out; Hsp70 KO) 및 정상생쥐 (Hsp70 wild type; Hsp70 WT)에 열충격을 가하고, 임신 제 15.5일에 태아를 적출하여 디지털 카메라로 외형을 촬영하였고, 조직학적 관찰을 위하여 HE 염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 선천성 기형을 동반한 태아와 정상 발생중인 태아를 비교하기 위하여 열충격을 가하지 않은 생쥐 태아를 15.5일에 적출하고 외형 및 조직표본을 관찰하고 서로 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

외형관찰에서 뇌탈출증, 무안증 혹은 소안증과 같은 선천성기형을 동반한 태아는 Hsp70 KO 군에서는 총 73마 리중 53마리로 72.6%였고, Hsp70 WT 군에서는 총 90마리 중 26마리로 28.8%이었다. 조직학적 소견으로는 신경 관이 열린 상태로 발달하여 가쪽뇌실맥락얼기가 위눈꺼풀 바로 위에서 관찰되는 뇌탈출증이 관찰되었으며, 눈은 망막만이 형성되어 있거나, 눈 구조물이 전혀 형성되어 있지 않았다. 망막 및 내이의 신경세포에서는 자멸된 세포 가 많이 관찰되었다. 위팔뼈 같은 긴뼈에서는 정상 발생중인 태아에 비해 연골속뼈발생이 지연되어 있었으며, 입 천장돌기도 융합되어 있지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 Hsp70이 결손된 생쥐의 태아는 열충격에 보다 민감하게 반응하여 선천성기형을 동반 한 비율이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 Hsp70이 열충격으로부터 세포를 보호하는 기능을 갖고 있음을 입증하는 것이라고 생각된다.

찾아보기 낱말 : 모체열충격, Hsp70, 선천성기형

서 론

고열이란 정상중심체온 (normal core body temperature)보다 적어도 1.5°C 이상 체온이 상승하는 것으로 정의할 수 있고, 산모의 고열은 현재 실험동물 의 선천성 기형, 특히 중추신경계의 기형을 유발하는 물질로 입증되어 있으며, 사람에서도 기형유발인

자의 하나로 인정되고 있다. 실험동물에서 모체의 고열은 무뇌증, 뇌탈출증 (exencephaly), 소뇌증 (micrencephaly)과 수막척수류 (meningomyelocele), 소안증 (microphthalmia), 무안증 (anophthalmia), 척추 이분증 (spina bifida) 등의 중추신경계 기형과 그 외 입천장갈림증, 팔다리결손, 몸통뼈대기형과 유산 및 사산 등을 유발한다 (Alsop 1919, Edwards 1967, 1968, Hartley 등 1974, Hendrickx 등 1979, Done 1982). 사람의 경우 역학조사에 의하면 임신초기, 특

교신저자: 김원규(한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실)
전자우편: kimwg@hanyang.ac.kr

히 임신 12주 이내에 열성질환이나 잦은 사우나에 의해 무뇌아(Miller 등 1978, Shiota 1982), 수막척수류(Chance와 Smith 1978), 소안증(Fraser와 Skelton 1982), 후두부 뇌탈출증(Fisher와 Smith 1981), 얼굴형성부전(Pleet 등 1981)등이 발표되어 있으며, 소하악증(micrognathia), 외이기형, 심장결손, 요도하열, 위장관결손, 입술갈림증 및 입천장갈림증, 복벽결손, 가로막탈출증, Hirschsprung disease, Mobius syndrome, oromandibular limb hypogenesis spectrum과 자연유산(Martinez-Frias 등 2001) 등이 보고된 바 있다.

열충격단백질(heat shock protein: Hsp)은 체온상승, 아미노산 유사물에서의 배양, 유리산소기, 자외선 방사, 중금속 및 ethanol에의 노출과 같은 환경에 반응하여 생성된다고 알려져 있다. Feder 등(1996)은 Hsp70 gene copy의 수가 증가한 *D. melanogaster* 유충은 스트레스에 대한 방어 기전이 향상된다고 하였고, Johnston과 Kucey(1988)는 열충격 단백질 발현이 억제된 세포는 손상받을 가능성이 높다고 하였다. Riabowol 등(1988)은 Hsp 항체를 세포내에 주입하면 스트레스에 대한 세포의 감수성이 증가한다고 하였으며, Zimmerman과 Cohill(1991)에 의하면 진핵세포가 스트레스에 반응하여 열충격단백질의 일종인 Hsp70을 생성한다고 한다. Heads 등(1994)은 Hsp70 유전자를 세포에 transfection 하면 열충격에 더욱 저항한다고 하였다. 이상과 같이 Hsp70은 열충격과 같은 stress로부터 세포를 보호하는 기능을 갖고 있다.

이에 연구자는 Hsp70 KO 생쥐와 정상 생쥐(Hsp70 WT)를 임신시켜 열충격을 가했을 때 각각의 태아에서 선천성기형이 나타나는 비율을 비교, 분석하고, 발생중인 여러 장기에서 나타나는 기형을 정상 발생중인 태아와 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에서는 열충격단백질의 한 종류인 Hsp70을 유전자조작법으로 결손시킨 C57/BL6계 Hsp70 KO 생쥐와 정상 생쥐(Hsp70 WT)를 임신시키고 열

충격을 가한 후 선천성기형을 동반한 태아를 실험에 사용하였다. Hsp70 KO 및 WT 생쥐는 미국 텍사스소재 A&M대학교 수의과대학의 Mirkes 교수에게 기증받았다. 암컷 생쥐를 수컷 생쥐와 저녁에 3:1의 비율로 합사시키고, 다음날 아침 vaginal plug이 확인되면 임신 제 0.5일로 정하였다. 임신이 확인된 날로부터 제 8.5일에 다음과 같이 모체열충격을 시행하였다. 모체를 구멍이 뚫린 50 mL Falcon tube에 넣고, 43°C의 수조에 담근다. 2개의 탐침(probe)이 장착된 디지털 체온계를 이용하여 하나는 모체의 직장에 삽입하고, 다른 하나는 수조에 담가 열충격 동안 모체와 수조의 온도변화를 기록하였다. 열충격 동안 수조의 온도를 43°C로 일정하게 유지하면서 모체의 체온이 43°C에 도달하면 5분간 유지하였다. 열충격을 가한 후 저체온증을 방지하기 위하여 체온이 정상으로 회복될 때까지 38°C의 배양기내에 두었다. 임신 제 15.5일에 목뼈 탈골법으로 모체를 희생시키고 자궁을 적출한 후 Hank 용액에서 자궁을 절개하여 태아를 적출하고 디지털카메라(Nikon D100)로 촬영하였다. 외형관찰 후 10% 중성 formalin에 고정하여 일반적인 조직표본제작법에 따라 조직표본을 제작하고 hematoxylin 및 eosin 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 외형관찰

태령 제 15.5일 생쥐 태아에 미치는 모체열충격의 영향을 관찰하였다. 외형적으로 뇌탈출증, 무안증, 얼굴갈림증, 입천장갈림증 및 성장지연 중 어느 한 가지의 기형이 관찰되면 선천성기형을 동반한 것으로 하였다(Fig. 1). Hsp70 KO 태아에서는 총 73마리 중 53마리(72.6%)에서 선천성기형이 관찰되었고, Hsp70 WT 태아에서는 총 90마리 중 26마리(28.8%)에서 선천성기형이 관찰되었다.

2. Hematoxylin 및 eosin 염색조건

열충격을 받은 15.5일 태아(열충격군)에서 두피와

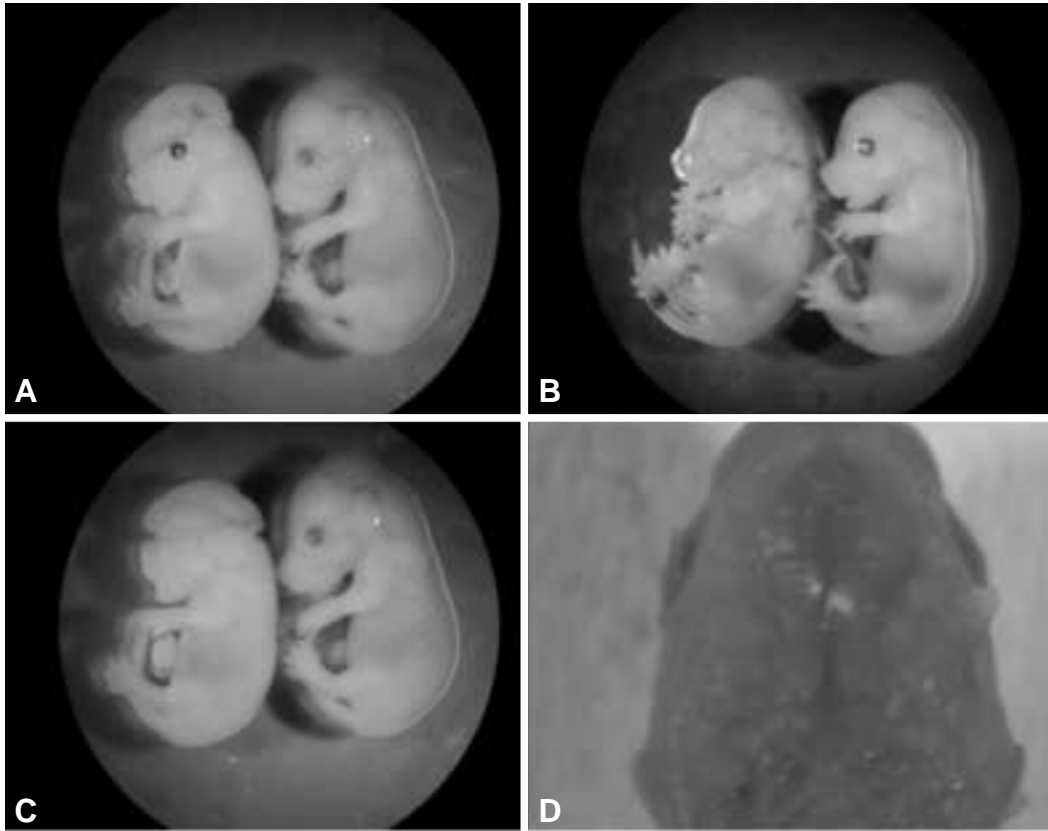


Fig. 1. External appearances of normal and heat-exposed fetuses at gestational day 15.5. (A) Normal (right) and exencephalic (left) fetuses. (B) Normal (right) and anophthalmic (left) fetuses. (C) Normal (right) and both exencephalic and anophthalmic (left) fetuses. (D) Cleft palate.

중간엽이 형성되지 않아 뇌의 실질이 탈출하여 있었고, 가쪽뇌실맥락열기가 위눈꺼풀 위에서 관찰되었다. 일부 태아의 눈에서는 망막과 결막이 형성되어 있었지만 일부 태아에서는 망막의 색소층을 제외한 어떠한 구조물도 관찰되지 않았다. 망막이 형성된 경우에도 수정체는 형성되어 있지 않았으며 눈 구조물은 완전히 매몰되어 있었다 (Fig. 2A, B). 또한 망막과 신경상피로 구성된 내이에서 자멸세포가 많이 관찰되었다 (Fig. 2C-F). 정상 발생중인 태아에서 양측의 구개돌기는 정중선에서 서로 융합하여 코안과 입안이 분리되어 있었으나, 열충격군에서는 혀 위로 상승한 구개돌기가 아직 융합하지 않았

다. 또한 치아의 발생은 정상 발생중인 태아에 비하여 지연되어 있었다 (Fig. 3A, B). 위팔뼈는 정상 발생중인 태아의 경우 연골속뼈발생이 일어나 뼈잔기둥이 뼈몸통에서 형성되어 있었으나 열충격군에서는 뼈잔기둥이 형성되어 있지 않아 연골속뼈발생이 지연됨을 알 수 있었다 (Fig. 3C, D). 가슴안과 배안 장기에서는 선천성 기형을 관찰할 수 없었다.

고 찰

모체의 고열은 모든 실험동물에서 선천성기형을

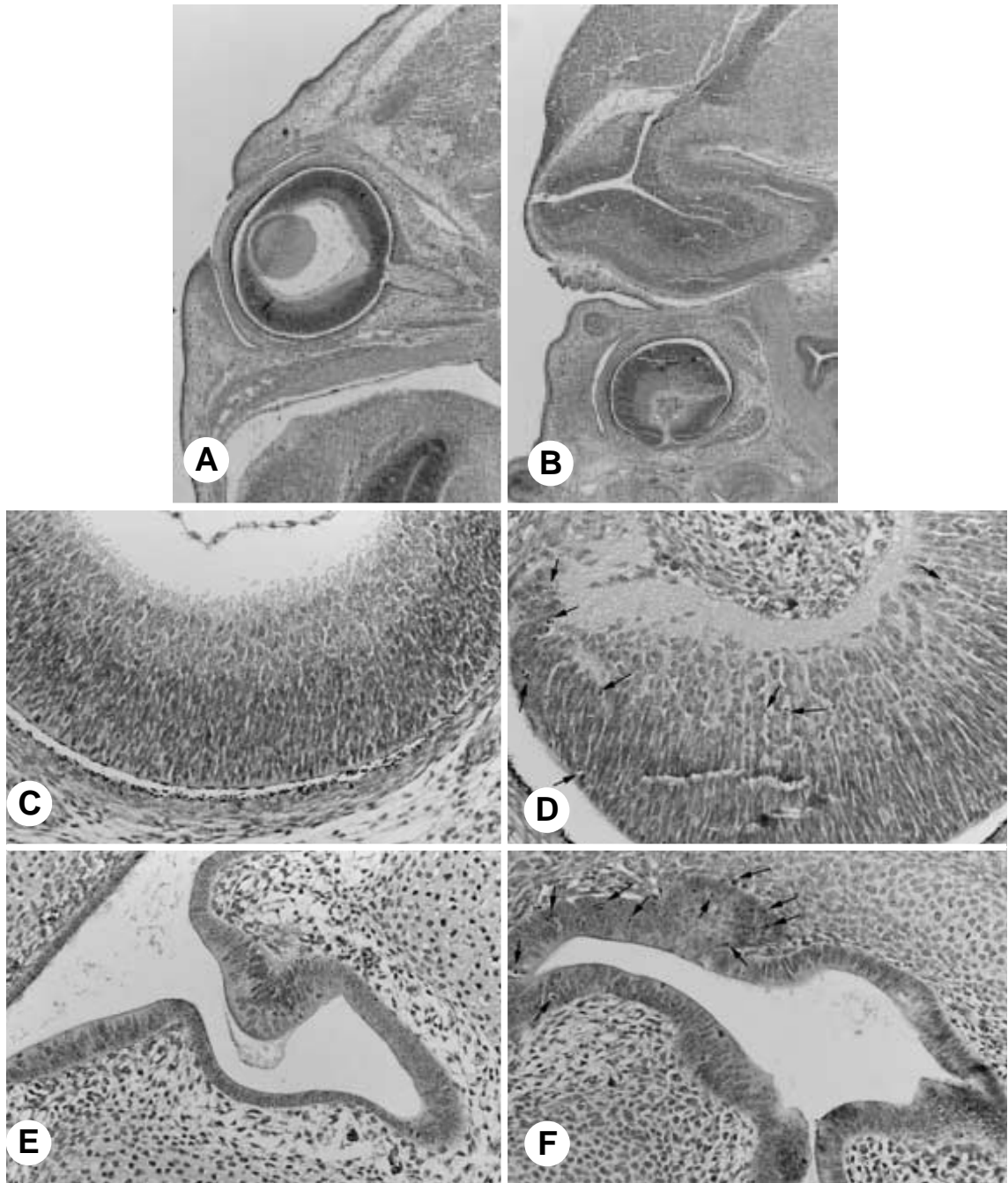


Fig. 2. Histological findings of normal (left column) and heat-exposed (right column) fetuses at gestational day 15.5. Heat-exposed fetuses show exencephaly and poorly developed choroid plexus located in just above eye (B), buried eye structure (D), and numerous apoptotic cells (arrow) in developing retina and inner ear neuroepithelium (F).

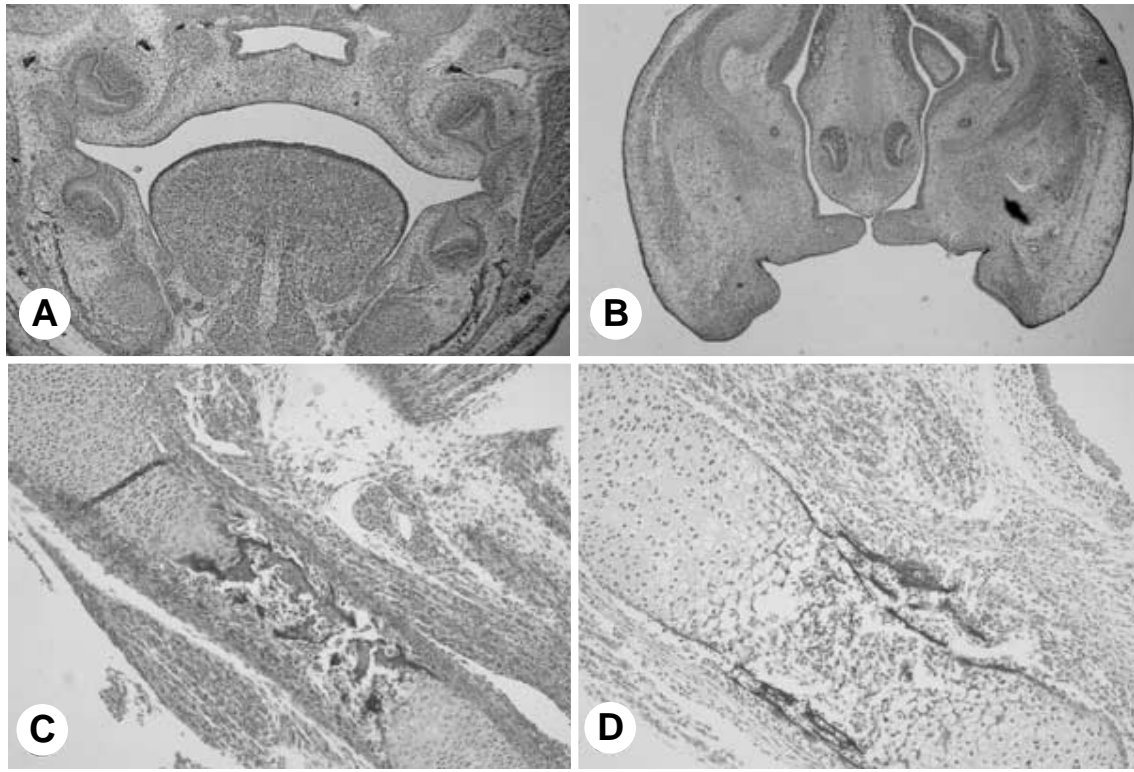


Fig. 3. Histological findings of developing palate at gestational day 15.5. (A) Both palatine processes are fused along the midline. (B) Both palatine shelves are elevated above the tongue but not fused. Developing humerus of the normal (C) and heat-treated (D) groups. Compare the process of the endochondral ossification.

유발하는 기형유발물질이며, 사람에서도 그 가능성이 높게 제기되고 있고 (Edwards 등 1995), 현재 여러 역학조사에 의하면 기형유발물질의 하나로 인정되고 있다 (Martinez-Frias 등 2001). 임신초기에 사우나, 열탕 및 열성질환에 의하여 선천성기형이 유발될 수 있으며, 고온에서 운동을 하는 경우에도 태아의 선천성기형이 유발된다 (Sasaki 등 1995). 사람의 경우 1978년 Miller 등이 고열에 의한 선천성기형의 유발 가능성을 제기하였고, Hunter (1984)에 의하면 임신 첫 1개월에 고열을 앓은 산모의 10%에서 무뇌아가 출산되었으며, Fisher와 Smith (1981)는 24%의 태아에서 뒤통수부위 뇌탈출증이 관찰되었다고 하였다. 그 밖에 여러 학자들의 보고를 종합하여 Martinez-Frias 등 (2001)은 고열에 의한 소하악

증, 외이기형, 심장결손, 요도하열, 위장관결손, 입술 갈림증 및 입천장갈림증, 복벽결손, 가로막탈출증, Hirschsprung disease, Mobius syndrome, oromandibular limb hypogenesis spectrum 등의 선천성기형과 자연유산을 보고하였다. Edwards 등 (2003)은 지금까지 행하여져 왔던 실험동물 및 사람에 대한 모체열충격의 영향에 대해 다음과 같이 정리, 보고하였다. 임신 중 고열은 배자의 사망, 유산, 성장지연 및 발달 결손을 일으킬 수 있다. 세포의 증식, 이동, 분화 및 세포계획사 같은 배자발생에 매우 중요한 일련의 과정은 모체의 고열에 의해 영향을 받는다. 중추신경계가 모체 고열에 가장 민감한 조직이다. 그러나 종마다 차이가 있으며, 같은 종에서도 유전형질에 따라 그 감수성이 다르다.

고열에 의한 세포사망은 세포계획사(programmed cell death)와 유사한 과정을 거치게 되고 결과적으로 비정상적인 발생과정을 유발하게 되어 선천성기형을 일으키게 된다. Breen 등(1999)은 고온에 노출된 태령 제 10일 흰쥐의 태아 조직에서 TUNEL 양성세포가 증가하고, 세포분열은 현저히 감소한다고 보고하였다. Mirkes와 Little(2000)은 태령 제 9일 생쥐 태아를 배양하면서 고열에 노출 시킨 결과 앞뇌세포의 사립체에서 cytochrome c의 방출, caspase-3의 활성화, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 cleavage 및 DNA 분절화를 관찰하고 이러한 소견이 고열에 의한 세포자사(apoptosis)의 특징이라고 하였다. Mirkes(2002)에 의하면 고열은 cytochrome c의 방출, procaspase-9의 활성화 및 effector caspase의 활성을 유도하는 mitochondrial apoptotic pathway를 통하여 세포사망을 일으킨다고 보고하였다.

기형유발물질에 의한 세포사(teratogen-induced cell death)는 세포와 조직에 따라 선택적으로 반응한다. 즉, 발생중인 신경외배엽세포는 고열, cyclophosphamide 및 sodium arsenite에 민감하게 반응하여 사망하지만 심장세포는 반응하지 않는다(Mirkes와 Little 1998). 따라서 발생중인 조직 중 고열에 가장 민감한 부분은 중추신경계이다. Webster와 Edwards(1984)는 창자배형성 이전 시기부터 24 분절기까지 임신한 C57/BL6 생쥐의 중심체는 43°C에 이를때까지 2회 노출시킨 결과 20%의 태아에서 뇌탈출증이 관찰된다고 하였다. Webster 등(1985)은 생쥐에서 창자배형성 후기인 임신 제 9~10일의 태아가 고열에 의한 중추신경계 결손이 가장 많이 일어나는 시기라고 하여 소안증과 뇌탈출증을 포함한 여러 중추신경계 기형이 일어난다고 하였고, Walsh 등(1997)은 흰쥐의 창자배(gastrula)를 배양하면서 열충격을 가한 결과 앞뇌뿐만 아니라 중간뇌에서도 기형이 유발된다고 하였다.

이상과 같이 고열이 세포에 독성으로 작용하는 기전은 많은 연구가 진행되어 왔지만 그 방어기전은 아직 명확하지 않다. 세포가 고열 혹은 다른 stress에 노출되면 방어기작으로 열충격유전자(heat shock gene)가 유도되고 열충격단백질을 합성하여

세포를 보호하게 된다(Lindquist 1986). Morimoto(1991)와 De Maio(1995)에 의하면 열충격단백질(heat shock protein: Hsp)은 여러 가지 불리한 환경-온도상승, 아미노산 유사물에서의 배양, 유리산소기, 자외선방사, 중금속 및 ethanol에의 노출-에 반응하여 생성된다고 한다. 열충격단백질의 한 종류인 Hsp70은 진핵세포가 열충격과 같은 스트레스에 노출되면 생성된다(Zimmerman과 Cahill 1991). Feder 등(1996)은 Hsp70 유전자 복사가 증가한 *D. melanogaster* 유충은 스트레스에 대한 방어 기전이 향상된다고 하였고, Johnston과 Kucey(1988)는 열충격 단백질 발현이 억제된 세포는 손상받을 가능성이 높다고 하였다. Riabowol 등(1988)은 Hsp 항체를 세포내에 주입하면 스트레스에 대한 세포의 감수성이 증가한다고 하였으며, Heads 등(1994)은 Hsp70 유전자를 세포에 transfection 하면 열충격에 대한 저항력이 증가된다고 하였다. Theodorakis 등(1999)은 열충격내성세포(thermotolerant cell)는 열충격 이후 Hsp70 발현을 더욱 증가한다고 하였으며, Gabriel 등(2002)은 부양중인 계태에 44°C의 고열을 가하면 Hsp70 mRNA치가 15배 이상 증가한다고 하였다. Ostberg 등(2002)은 BALB/C 생쥐에 39.5~40°C의 전신 열충격을 가하면 심장, 콩팥, 폐, 림프절 및 가슴샘에서 Hsp70 발현이 증가된다고 하였다. 이상 여러 학자들의 보고를 종합하면 세포에 열충격이 가해지면 그 방어기전으로 Hsp70 단백질이 합성, 분비됨을 알 수 있다.

고열이 배자에 미치는 영향을 연구하는 방법은 크게 배자배양법(embryo culture method)과 모체전신열충격법(whole body maternal heat shock method)으로 대별된다. 배자배양법은 현재 널리 이용되고 있지만 배자를 장기간 배양하기에 많은 제약이 따른다는 것이 중요한 단점으로 지적되고 있다. 또한 임신 말기 태아를 배양하기에는 기술적인 제약이 있다. 따라서 배아 시기에 고열에 노출된 경우, 시간이 경과하여 태아 혹은 출생 후에 어떠한 기형이 유발되는지 연구하는 것은 불가능하다. 반면에 모체열충격법은 과도한 열충격 스트레스에 의한 모체의 사망을 제외하면 배자배양법보다 훨씬 유용한 방법이다. 따라서 모체열충격법을 사용하면 다양한 실험

계획을 수립할 수 있다. 예를 들어 열충격의 시행시점, 즉 임신 제 몇 일에서 시행할 것인가, 시간간격, 즉 몇 분간 고열을 지속시킬 것인가, 열충격의 온도 설정, 즉 몇 도에서 시행할 것인가, 또한 열충격내성 실험 (thermotolerance) 등을 연구자가 원하는 대로 실시할 수 있다는 큰 장점이 있다. Webster (1985) 등은 임신 제 9~10일 모체흰쥐를 43°C에서 5분간 열충격을 시행한 결과 머리얼굴기형이 초래되었다고 하였다. Walsh 등(1987)은 흰쥐를 43°C에서 7분간 고열에 노출시킨 경우 소안증, 소뇌증이 관찰되었다고 하였다. Chernoff와 Golden (1988)은 LM/Bc 생쥐에서 임신 제 8일, 8.5일, 8.75일 및 9일에 열충격을 1회 가하였을 때보다 2회 가하는 경우 뇌탈출증의 비율이 증가한다고 보고하였다. Li와 Shiota (1999)는 임신한 ICR계 mice에 42°C와 43°C의 열충격을 각각 가하였을 때 척추의 후방변형이 관찰되며, 특히 43°C의 열충격을 가한 실험군에서는 90% 이상의 태아에서 척추후방변형이 관찰되었다고 하였다. 이와 같이 모체의 전신 열충격법은 이상 여러 학자들의 실험방법 및 결과에서 볼 수 있듯이 여러 가지 실험을 가능하게 하는 매우 유용한 방법으로 생각된다.

본 연구자는 유전자조작법을 통하여 Hsp70 유전자가 결손된 C57/BL6계 생쥐와 정상생쥐를 실험동물로 사용하여 중심체온이 43°C에 도달하면 5분간 지속시키는 실험을 시행하였다. Hsp70 KO 군에서는 임신된 태아 73마리 중 53마리에서 뇌탈출증, 소안증 혹은 무안증, 얼굴갈림증, 입천장갈림증 및 성장 지연 중 하나라도 관찰되어 고열에 의한 선천성기형아의 비율은 72.6%이었고, Hsp70 WT 군에서는 총 90마리의 태아 중 26마리에서 선천성기형이 관찰되어 그 비율은 28.2%이었다. 이 결과에서 정상생쥐도 고열에 노출되면 선천성 기형이 유발됨을 알 수 있고, 특히 Hsp70 KO 군에서 선천성 기형의 비율이 Hsp70 WT 생쥐에 비해 2.4배 이상 높음을 알 수 있었다. 또한 조직학적 소견에서 열충격에 노출된 태아는 가쪽뇌실의 맥락열기이 위눈꺼풀 위에서 관찰되었고, 일부 태아의 눈에서는 망막과 결막이 형성되어 있었지만 일부 태아에서는 망막의 색소층만이 형성되어 있었으며, 수정체도 관찰되지 않

았다. 또한 망막과 내이에서 자멸세포가 많이 관찰되었다. 구개돌기는 혀 위로 상승되어 있었지만 융합하지 않았다. 치아는 정상 발생중인 태아에 비하여 느린 발생단계를 보이고 있었다. 위팔뼈는 정상 발생중인 태아의 경우 연골내 뼈발생이 일어나 뼈간기둥이 뼈몸통에서 형성되어 있었으나 열충격군에서는 뼈간기둥이 형성되어 있지 않아 연골내 뼈발생이 지연되고 있었다. 따라서 모체열충격은 태아의 정상적인 발달과정을 저해하는 기형 유발인자로 생각되며, Hsp70은 모체열충격으로부터 태아를 보호하는 기능을 갖고 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Alsop FM : The effect of abnormal temperatures on the developing nervous system in chick embryos. *Anat Rec* 15 : 307-324, 1919.
- Breen JG, Claggett TW, Kimmel GL, Kimmel CA : Heat shock during rat embryo development in vitro results in decreased mitosis and abundant cell death. *Reprod Toxic* 13 : 31-39, 1999.
- Chance PF, Smith DW : Hyperthermia and meningomyelocele and anencephaly. *Lancet* 1 : 769-770, 1978.
- Chernoff GF, Golden JA : Hyperthermia-induced exencephaly in mice: Effect of multiple exposures. *Teratology* 37 : 37-42, 1988.
- De Maio A : The heat shock response. *New Horiz* 3 : 198-207, 1995.
- Done T, Wrathal AE, Richardson C : Fetopathogenicity of maternal hyperthermia at mid-gestation. In: *Proceedings, International Pig Veterinary Society, Mexico City*, p. 252, 1982.
- Edwards MJ : Congenital defects in guinea-pigs following induced hyperthermia during gestation. *Arch Pathol* 84 : 42-48, 1967.
- Edwards MJ : Congenital defects in the rat following induced hyperthermia during gestation. *Teratology* 1 : 173-175, 1968.
- Edwards MJ, Shiota K, Smith MSR, Walsh DA : Hyperthermia and birth defects. *Reprod Toxicol* 9 : 411-425, 1995.
- Edwards MJ, Saunders RD, Shiota K : Effects of heat on embryos and foetuses. *Int J Hyperthermia* 19 : 295-324,

- 2003.
- Feder ME, Cartano NV, Milos L, Krebs RA, Lindquist SL : Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 100 : 1837–1844, 1996.
- Fisher NL, Smith DW : Occipital encephalocele and early gestational hyperthermia. *Pediatrics* 68 : 480–483, 1981.
- Fraser FC, Skelton J : Possible teratogenicity of maternal fever. *Lancet* 2 : 634, 1978.
- Gabriel JE, da Mota AF, Boleli IC, Macari M, Coutinho LL : Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. *Growth Dev Aging* 66 : 27–33, 2002.
- Hartley WJ, Alexander G, Edwards MJ : Brain cavitation and micrencephaly in lambs exposed to prenatal hyperthermia. *Teratology* 9 : 299–303, 1974.
- Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM : Stable high level expression of a transfected human hsp70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress. *J Mol Cell Cardiol* 26 : 695–699, 1994.
- Hendrickx AG, Stone GW, Hendrickson RV, Matayoshi K : Teratogenic effects of hyperthermia in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Teratology* 19 : 177–182, 1979.
- Hunter AGW : Neural tube defects in Eastern Ontario and Western Quebec: Demography and family data. *Am J Med Genet* 19 : 45–63, 1984.
- Johnston RL, Kucey BL : Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* 242 : 1551–1554, 1988.
- Li ZL, Shiota K : Stage-specific homeotic vertebral transformations in mouse fetuses induced by maternal hyperthermia during somitogenesis. *Dev Dyn* 216 : 336–348, 1999.
- Lindquist S : The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 55 : 1151–1191, 1986.
- Martinez-Frias ML, Mazario MLG, Caldas CF, Gallego MPC, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E : High maternal fever during gestation and severe congenital limb disruptions. *Am J Med Genet* 98 : 201–203, 2001.
- Miller P, Smith DW, Shepard TH : Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* 1 : 519–521, 1978.
- Mirkes PE : 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal development. *Teratology* 65 : 228–239, 2002.
- Mirkes PE, Little SA : Teratogen-induced cell death in postimplantation mouse embryos: differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. *Cell death and differentiation* 5 : 592–600, 1998.
- Mirkes PE, Little SA : Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydrozycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol* 162 : 197–206, 2000.
- Morimoto RI : Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* 3 : 295–301, 1991.
- Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA : Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 18 : 552–562, 2002.
- Pleet H, Graham Jr. JM, Smith DW : Central nervous system and facial defects associated with maternal hyperthermia at four to 14 weeks gestation. *Pediatrics* 67 : 785–789, 1981.
- Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ : Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242 : 433–436, 1988.
- Sasaki J, Yamaguchi A, Nabeshima Y, et al : Exercise at high temperature causes maternal hyperthermia and fetal anomalies in rats. *Teratology* 51 : 233–236, 1995.
- Shiota K : Neural tube defects and maternal hyperthermia in early pregnancy: Epidemiology in a human embryo population. *Am J Med Genet* 12 : 281–288, 1982.
- Theodorakis NG, Drujan D, De Maio A : Thermotolerant cells show an attenuated expression of Hsp70 after heat shock. *J Biol Chem* 274 : 12081–12086, 1999.
- Walsh DA, Klein NW, Hightower LE, Edwards MJ : Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development. *Teratology* 36 : 181–191, 1987.
- Walsh DA, Li Z, Wu Y, Nagata K : Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol Life Sci* 53 : 198–221, 1997.
- Webster WS, Edwards MJ : Hyperthermia and the induction of neural tube defects in mice. *Teratology* 29 : 417–425, 1984.
- Webster WS, Germain MA, Edwards MJ : The induction of microphthalmia, encephalocele, and other head defects following hyperthermia during the gastrulation process in the rat. *Teratology* 31 : 73–82, 1985.
- Zimmerman JL, Cohill PR : Heat shock and thermotolerance in plant and animal embryogenesis. *New Biol* 3 : 641–650, 1991.

Abstract

**Effects of Maternal Hyperthermia on the Development of
C57/BL6 Strain Hsp70 Knock-out Mice Fetuses**

Won-Kyu Kim

Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University

To investigate the effects of maternal hyperthermia on the formation of congenital anomalies, pregnant Hsp70 knock-out and wild type mice at gestational day (GD) 8.5 were immersed in 43°C water bath until their body core temperature reached at 43°C. Thereafter, pregnant mice were given more 5 minutes hyperthermic exposure. Pregnant mice were killed at GD 15.5, and fetuses were photographed for external appearance analysis. Fetuses with congenital anomalies such as anophthalmia and exencephaly were 72.6% (53 out of 73) in KO group and 28.2% (26 out of 90) in WT group, respectively. Histological findings showed exencephaly, eye abnormalities such as eyeball with retina only or buried eyeball or absence of eye structure, numerous apoptotic cells in the retina and inner ear neuroepithelium, cleft palate, and delayed endochondral ossification.

The results of this study suggest that Hsp70 may have a protective function against heat shock.

Key words : Maternal hyperthermia, Hsp70, Congenital anomalies