

출생 시 신생아의 혈압에 따른 태반 내 lectin-like oxidized LDL 수용체-1 및 heat shock protein 70의 발현에 관한 연구

최시영, 안영모, 민정원¹, 박혜숙^{1,4}, 김영주^{2,4},
박은애^{3,4}, 하은희^{1,4}, 이화영⁴

이화여자대학교 의학전문대학원 해부학교실, ¹에방의학교실,

²산부인과학교실, ³소아과학교실, ⁴의과학연구소

간추림 : 태아 성장에 있어서 자궁 내 환경과 태반의 기능변화는 태아의 성장과정에 영향을 미칠 뿐만 아니라 성인기의 질병 발생에도 장기적인 영향을 줄 수 있다. 특히 태반의 산화손상은 임신결과에 영향을 주는 중심 기전의 하나로 성인기 질병 발생과 태아 프로그래밍을 이어주는 연결고리로 관여하고 있을 가능성이 제시되어 왔으나 이의 기전과 관련된 기초적 연구 자료는 매우 미비하다.

본 연구는 출생 전 태아환경으로서 태반의 산화손상수준이 출생 후 자손의 심혈관계통의 기능 상태에 영향을 줄 가능성을 제시하고자, 신생아의 혈압수준에 따른 태반의 산화손상수준의 차이를 확인하고자 하였다. 이를 위해 정상 임신부를 대상으로 하여 출산 후 6시간 이내에 신생아의 혈압을 측정하고, 측정된 신생아의 혈압수준에 따라 신생아기의 혈압이 높은 군과 혈압이 낮은 군에서 각각의 태반조직을 대상으로 산화손상 수준의 지표로써 lectin-like oxidized LDL 수용체-1(LOX-1) 및 heat shock protein 70(HSP70)의 발현양상과 그 수준을 western blot 분석과 면역조직화학적 조사를 통하여 비교, 분석하였다.

그 결과 출생 후 높은 수준의 혈압을 보이는 신생아군에서 낮은 수준의 혈압을 보이는 신생아군에 비하여 LOX-1과 HSP70의 발현이 유의적으로 높게 관찰되었으며 이를 통해 높은 수준의 혈압을 보이는 신생아군에서 태반 내 산화손상수준이 유의하게 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 출생 전 태반의 산화손상 및 기능변화는 정상 임신결과를 보였을지라도 출생 후 건강상태에 잠재적인 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 태반, 태아환경, 산화손상, 신생아 혈압, lectin-like oxidized LDL 수용체, heat shock protein 70

서 론

태아기에 노출되는 자궁 내 환경과 태반의 기능은 태아의 성장과 발달의 중요한 요인으로 출생 이전의 발생과정 뿐만 아니라 출생 후 건강상태에도 영향을 줄 수 있다(Coe 등 2005).

출생 시의 체중이 출생 후 성인기의 심혈관계 질환 발생율과 관련되어 있음이 Barker에 의하여 처음 제시된 이후(Barker 등 1989) 고혈압, 심장동맥(관상동맥)질환 및 제2형 당뇨병 등의 다양한 성인기 질환의 발생이 출생 전 태아시기에 노출되는 자궁 내 환경(intrauterine environment)의 영향을 받을 수 있음을 시사하는 역학적 연구조사 결과들이 보고되었다(Law 와 Shiell 1996, Hattersely 와 Tooke 1999, Huxley 등 2000). 또한, 동물실험을 통하여

교신저자 : 이화영(이화여자대학교 의학전문대학원 해부학교실)
전자우편 : hylee38@ewha.ac.kr

임신기간 중 자궁동맥을 결찰하거나 저단백식을 공급한 경우 출생 후 성숙한 자손의 혈압이 대조군에 비하여 높게 나타났다(Vehaskari 등 2001, Alexander 2003, Bellinger와 Langley-Evans 2005, Wlodek 등 2005). 즉, 출생 전 노출되는 자궁 내 환경은 출생 후 심혈관계 질환 발생 위험 요인의 하나로 생각될 수 있으며, 이는 태아가 생존을 위하여 모체의 상태에 적응하는 단기간의 과정이 태아시기에 구조적, 생리적 및 대사적 변화를 유발함으로써 출생 후 성장과정에 장기적이고 부정적인 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

태반은 모체와 태아사이의 교통 경로로서, 신호전달체계, 호르몬과 효소의 생산과 분비, 영양분과 대사물질의 전달, 착상과정 및 세포성장과 성숙, 그리고 최종적으로 분만에 이르기까지의 다양한 수준에서 임신 중인 모체의 환경적 요인의 영향을 받고 있다(Miller 등 1993). 특히, 모체의 산화스트레스 증가는 체내에 반응성 산소기의 생산을 증가시키거나 항산화물질의 양을 감소시켜 임신결과에 부정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 태반의 산화손상을 유발하거나 태반으로 가는 혈류의 양을 감소시켜 태반 기능이상(placental dysfunction)을 초래할 수 있다(Hubel 1999, Chen 등 2003). 이미 태반의 산화손상은 자간전증(preeclampsia), 자궁내성장지연(intrauterine growth retardation), 조산(preterm delivery) 및 조기양막파열(premature rupture of membranes) 등의 부정적인 임신결과를 유발하는 중심기전의 하나로 제시되어 왔다(Ishihara 1978, Hubel 등 1989, Robert 등 1989, Friedman 등 1991, Uotila 등 1994, Schwarz 등 1995). 본 연구진은 산화손상으로 인하여 야기되는 lipid peroxidation을 정량화하는 강력한 지표로서(Renke와 Rainer 2003) lectin-like oxidized LDL 수용체(LOX-1)의 발현이 자간전증 임신부 태반의 융합영양막세포(syncytiotrophoblast)에서 현저히 증가되어 있으며 이들의 세포자멸사(apoptosis) 과정에 관여할 가능성을 제시한 바 있다(Lee 등 2005). 또한 최근, 정상 임신결과를 보인 임신부의 경우에서도 이들의 태반조직에서 태반세포의 LOX-1의 발현과 세포자멸사 비율이 임신 중인 모체의 혈중 항산화비타민 수준에 의하여 영향을 받고 있

음을 관찰하였다(Ahn 등 2007). 따라서 본 연구진은 태반의 상태가 모체의 다양한 요인에 따른 자궁 내 환경을 반영하는 하나의 지표가 되며, 태아환경으로서 태반 기능 상태의 변화는 임신기간 중 다양한 수준에서의 조절을 통하여 태아기의 적응과정(adaptation)에 관여함으로써 출생 후 성장, 발달에 따른 건강상태에 장기적인 영향을 미칠 수 있음에 주목하였다.

태아환경을 구성하는 중심요소로서 태반기능의 변화는 임신결과 뿐만 아니라 출생 후 성장과 발달의 과정에서 소아기와 성인기 건강상태의 주요 결정요인으로 생각되나 태아가 노출되는 모체 환경과 출생 후 건강상태와의 연관성에 관하여는 그 대부분이 전향적 및 후향적 추적조사를 통한 역학적 수준에서 연구되어 왔을 뿐이며(Ounsted 등 1985, Gennser 등 1988), 태반의 기능 상태를 중심으로 출생 후 건강상태와의 연관성 및 그와 관련된 기전을 규명하기 위한 기초적 연구 자료는 매우 미흡한 상태이다.

본 연구는 출생 전 환경인 태반의 산화손상수준이 출생 후 자손의 심혈관계통의 기능 상태에 영향을 줄 가능성을 조사하기 위한 연구의 일환으로, 신생아의 혈압수준에 따른 태반의 산화손상수준의 차이를 임신결과와 연관된 태반 산화손상지표로서 연구되어 온(Hnat 등 2005) LOX-1 및 heat shock protein 70 (HSP70)을 중심으로 살펴보고자 하였다. 이를 위하여 정상 임신부를 대상으로 출산 후 6시간에 신생아의 혈압을 측정하고, 측정된 신생아의 혈압수준에 따라 혈압이 높은 군과 혈압이 낮은 군을 대상으로 각각의 분만 시 분리된 태반조직에서 LOX-1 및 HSP70의 발현양상과 수준을 측정, 이를 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

2004년 1월부터 2005년 7월까지 이화여자대학교 목동병원 산부인과에 내원하여 연구에 동의한 건강

한 임신부를 선별하였으며 이들에게서 출생한 정상 신생아 중 혈압을 측정할 68명을 대상으로 연구를 시행하였다. 신생아의 혈압은 출생 후 6시간 이내에 측정하였다. 혈압측정은 숙련된 전문가에 의하여 시행되었으며 측정 시 안정 상태를 취하도록 하는데 유의하였고 오른쪽 위팔에서 자동혈압계 (General Electrics, USA) Dash 3000 model을 사용하여 두 번 반복 측정한 값의 평균치를 사용하였다. 측정된 혈압 수치를 대상으로 정상혈압의 범위에서 수축기혈압을 기준으로 상위 30 percentile에 속하는 신생아 20례와 하위 30 percentile에 속하는 신생아 20례, 총 40례에 해당하는 각각의 신생아의 분만 시 적출, 수집된 태반을 연구에 사용하였다. 대상이 되는 신생아 중 선천성 심장 기형을 포함한 선천성 기형이 있는 신생아는 없었다. 신생아에서 측정된 평균수축기혈압과 평균이완기혈압은 높은 혈압군에서 각각 80.93 ± 7.40 mmHg과 49.71 ± 10.94 mmHg으로, 낮은 혈압군의 61.19 ± 4.47 mmHg과 36.67 ± 6.63 mmHg보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 그러나 각 군에 해당되는 임신부의 평균이완기혈압과 평균수축기혈압은 Table 1에 나타난 바와 같으며 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 신생아의 출생체중은 신생아 혈압이 높은 군이 혈압이 낮은 군보다 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 산모의 연령, 태반무게, 제태연령에 있어서 두 군 간에 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 연구방법

1) 태반조직의 채취

태반조직의 채취는 분만 직 후 분만실에서 시행

되었고 모체 측 태반 가운데에서 $3 \times 3 \times 3$ cm³ 크기로 채취하여 실험이 이루어 질 때까지 -70°C 에 동결상태로 보관하였다.

2) Western blot analysis

동결해 두었던 태반 조직을 protein extraction solution (iNtRON, Korea)으로 용해시켜 균질기로 균질화한 후에 12,000 rpm으로 원심분리 하여 전체 단백질을 추출하였다. BCA Protein assay kit (Pierce, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였고, 정량된 단백질 30 µg을 취하여 8% SDS-PAGE에 전기영동을 시킨 후, PVDF membrane (Amersham Biosciences, Sweden)으로 단백질을 전달하였다. Membrane을 PBS-T (0.1M phosphate buffered saline, 0.1% Tween 20)로 5%가 되게 만든 skim milk에 1시간 30분 동안 반응시켜 비특이적 반응을 억제시켰다. 1차 항체인 LOX-1 (Santa Cruz Biotechnology, USA), HSP70 (Stressgen, Canada), 또는 actin (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 각각 1:4,000, 1:1,000, 1:2,000으로 2% skim milk에 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, PBS-T로 5분간 4번 세척하였다. 다시 membrane을 1% skim milk에 horse-radish peroxidase가 결합된 rabbit anti-goat IgG (Southern Biotechnology Inc, USA)와 goat anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Inc, USA)를 각각 1:4,000과 1:2,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Protein bands는 ECL solution (Santa Cruz Biotechnology, USA)처리하고, X-ray (Kodak, USA) 필름에 감광 후 확인하였다.

Table 1. Clinical characteristics of the patients

Group	Maternal age (year)	Gestational age (week)	Placental weight (kg)	Birth weight (kg)	Neonatal BP		Maternal BP	
					Systolic BP (mmHg)	Diastolic BP (mmHg)	Systolic BP (mmHg)	Diastolic BP (mmHg)
1	32.4	39.2	0.65 ± 0.08	3.42 ± 0.26*	80.93 ± 7.40*	49.71 ± 10.94*	110.00 ± 9.61	74.29 ± 8.52
2	32.0	39.3	0.61 ± 0.06	3.14 ± 0.36	61.19 ± 4.47	36.67 ± 6.63	115.33 ± 15.06	75.33 ± 12.46

Group 1, high neonatal blood pressure group; Group 2, low neonatal blood pressure group; BP, blood pressure. Values are represented as the means ± SD. Differences among the means were statistically analyzed by Mann-whitney U test. Asterisk (*) indicates significant difference from the lower blood pressure group ($P < 0.05$ by Mann-whitney U test).

3) 면역조직화학염색

분만실에서 얻은 태반 조직은 4% 파라포름알데히드(*para*-formaldehyde)로 4°C에서 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 뒤 5 µm의 두께로 잘라 슬라이드에 붙이고 탈파라핀화 시킨 후 에탄올과 증류수를 사용해서 함수시켰다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소 용액에 15분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.1M phosphate buffered saline (PBS)로 세척하였다. 0.1% triton-X가 포함된 10% donkey serum과 10% goat serum (Dako, Denmark)에 비특이적 반응을 억제시킨 후, 일차항체인 LOX-1 또는 HSP70을 1% serum에 희석하여 4°C에서 overnight한 후, 0.1M PBS로 세척하였다. 이차항체인 biotinylated anti-goat IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) 또는 biotinylated anti-mouse IgG

(Jackson Immunoresearch Laboratories, USA)를 1% serum에 1 : 500으로 희석하여 실온에서 2시간 반응 후 세척하고 avidin-biotin-horse radish peroxidase complex (PK-6102, Vector Laboratories, CA)를 반응시켰다. DAB 발색 후 대조염색을 시행하였다. 최종적으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경 (Zeiss Axioskop 2, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

4) 자료분석

그룹간의 차이 검증은 출생체중의 차이를 배제한 순수한 혈압에 따른 LOX-1과 HSP70의 발현을 규명하기 위해 출생체중을 공변인으로 하는 공분산분석 (ANCOVA)을 실시하였다.

본 연구의 자료분석은 SPSS version 11.0 program을 이용하였으며, *P*값이 0.05 미만인 경우 유의성이

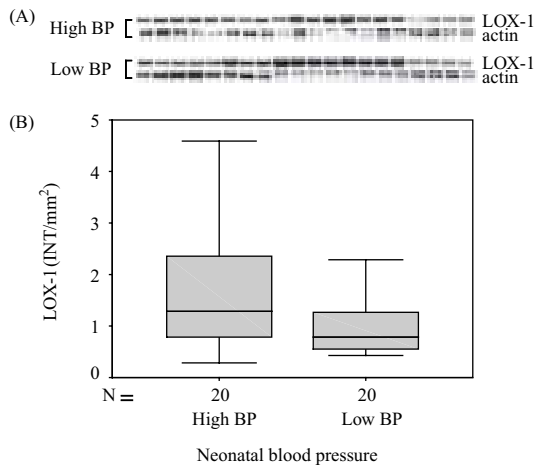


Fig. 1. Western blot analysis of LOX-1 expression in placentas from high neonatal blood pressure (BP) group and low neonatal blood pressure group. (A) Western blot assay showing activation of LOX-1 band in placenta. (B) Distribution of placental LOX-1 expression by low and high levels of neonatal blood pressure. A median line of box means middle 50% of the data and the upper and lower hinges of box represent 75th and 25th percentiles of the data, respectively. The lower and higher lines represent minimum point and maximum point of data, respectively. Placental LOX-1 expression is increased in the high neonatal BP group compared to the low neonatal BP group ($P < 0.05$ by Mann-whitney U test).

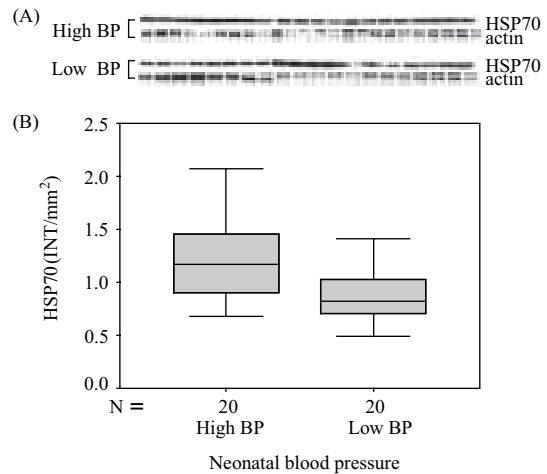


Fig. 2. Western blot analysis of HSP70 expression in placentas from high neonatal blood pressure (BP) group and low neonatal blood pressure group. (A) Western blot assay showing activation of HSP70 band in placenta. (B) Distribution of placental HSP70 expression by low and high levels of neonatal blood pressure. A median line of box means middle 50% of the data and the upper and lower hinges of box represent 75th and 25th percentiles of the data, respectively. The lower and higher lines represent minimum point and maximum point of data, respectively. Placental HSP70 expression is increased in the high neonatal BP group compared to the low neonatal BP group ($P < 0.001$ by Mann-whitney U test).

있다고 판단하였다.

결 과

1. 태반의 LOX-1 및 HSP70 발현

출생 시 낮은 혈압수준을 보인 신생아군과 높은 혈압수준을 보인 신생아군의 각각의 태반조직에서 Western blot 분석을 통하여 LOX-1 및 HSP70의 발현수준을 비교한 결과, 신생아 혈압이 높은 군에서

LOX-1과 HSP70의 발현이 통계적으로 유의한 수준에서 증가되어 있었다(1.62 ± 1.10 in high BP vs 0.93 ± 0.48 in low BP, $P < 0.05$ / 1.21 ± 0.34 in high BP vs 0.87 ± 0.25 in low BP, $P < 0.001$) (Figs. 1, 2). 순수한 혈압에 따른 LOX-1과 HSP70의 발현 차이를 보기 위해 출생체중으로 보정한 LOX-1과 HSP70의 교정 평균 역시 혈압이 높은 군에서 통계적으로 유의하게 높았다(Table 2, 3).

Table 2. Adjusted means of placental LOX-1 protein expression in high neonatal blood pressure group and low neonatal blood pressure group

Group	Number of subject	Adj. M density (mm^2)	SE	95% CI	p-value
1	20	1.59	0.19	1.18~1.99	0.04
2	20	0.98	0.19	0.57~1.38	

Group 1, high neonatal blood pressure group; Group 2, low neonatal blood pressure group; Adj. M density, adjusted mean of placental LOX-1 protein expression; SE, standard error; CI, Confidence Interval. Statistical analysis is carried out using ANCOVA, adjusted for birth weight.

Table 3. Adjusted means of placental HSP70 protein expression in high neonatal blood pressure(BP) group and low neonatal blood pressure (BP) group

Group	Number of subject	Adj. M density (mm^2)	SE	95% CI	p-value
1	20	1.25	0.67	1.12~1.39	0.00
2	20	0.83	0.67	0.70~1.97	

Group 1, high neonatal blood pressure group; Group 2, low neonatal blood pressure group; Adj. M density, adjusted mean of placental HSP70 protein expression; SE, standard error; CI, Confidence Interval. Statistical analysis is carried out using ANCOVA, adjusted for birth weight.

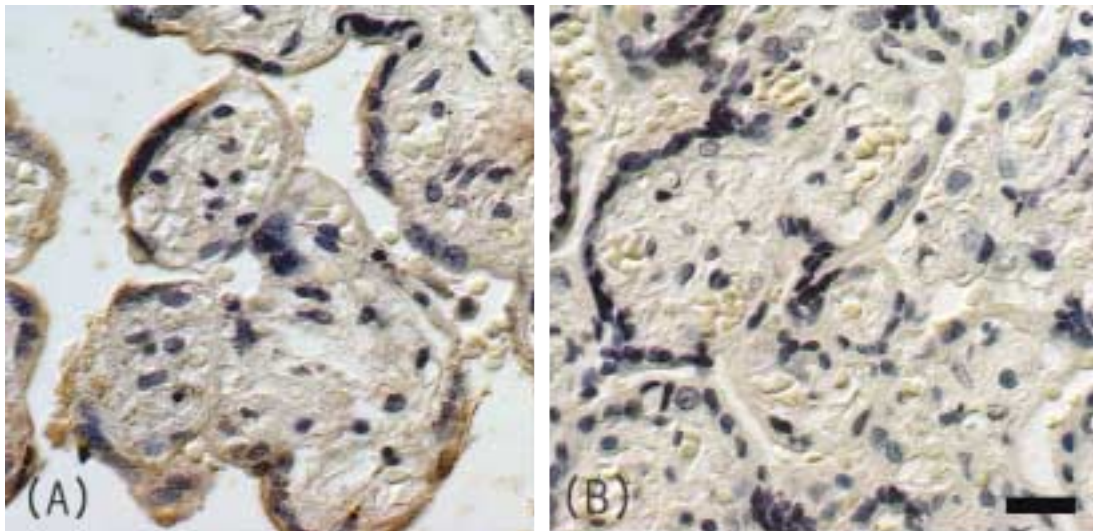


Fig. 3. Immunohistochemical staining for LOX-1 in the placenta of high neonatal blood pressure group (A) and low neonatal blood pressure group (B). LOX-1 immuno-reactivity is highly increased in high blood pressure group compared with low blood pressure group. Scale bar=25 μm

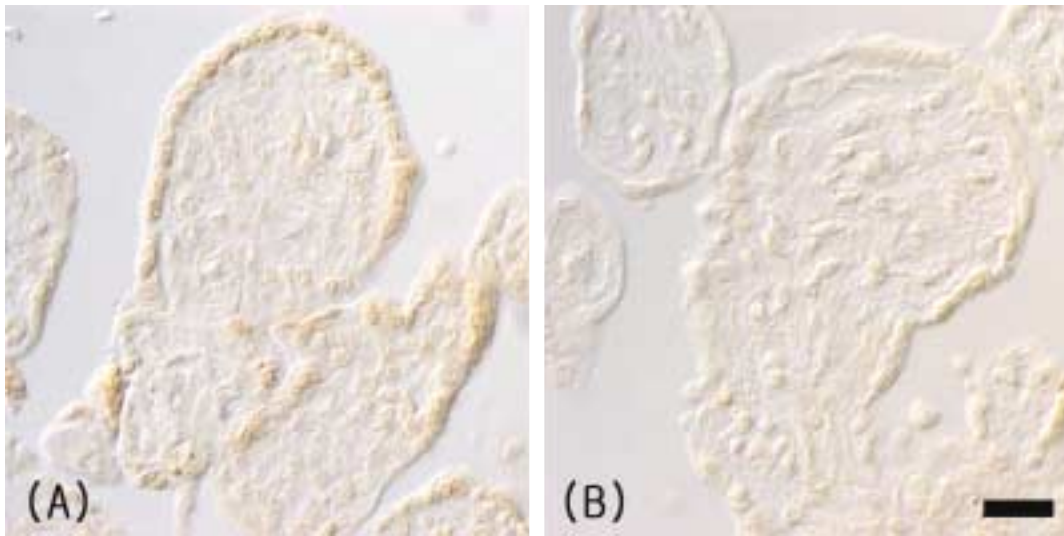


Fig. 4. Immunohistochemical staining for HSP70 in the placentas of high neonatal blood pressure group (A) and low neonatal blood pressure group (B). HSP70 reactivity is highly increased in high blood pressure group compared with low blood pressure group. Scale bar=25 μ m

2. 태반에서 LOX-1과 HSP70에 대한 면역조직화학 염색

LOX-1 또는 HSP70에 대한 면역조직화학염색결과 태반 용모의 가장 바깥층을 이루고 있는 융합영양막세포(syncytiotrophoblast)에서 갈색의 면역반응성이 관찰되었다. 또한 신생아혈압이 낮은 군의 태반보다 신생아혈압이 높은 군의 태반에서 LOX-1 또는 HSP70의 면역반응성이 상대적으로 증가되어 짙은 갈색으로 관찰되었으며 염색된 세포의 관찰되는 빈도도 높았다(Figs. 3, 4).

고 찰

태아 프로그래밍(fetal programming)은 태아가 자궁 내에서 어떠한 시기에 특정한 환경에 노출되는 경우 그 영향으로 인하여 출생 후에 일정한 질병을 가질 수 있다는 기본 개념에서 출발하는 것으로(Zinner 등 1974, Berenson 등 1998, Ophir와 Oettinger 2000, Stary 2000), 성인기의 각종 질환이 이미 출생 전 태아기에 일어나는 developmental plasticity

와 태아적응(fetal adaptation)과정에서 기원할 수 있음을 의미한다(Berenson 등 1998). 태아는 생존을 위하여 다양한 형태학적 및 생리학적 변화를 통하여 자궁 내 자극에 대응하나, 이러한 발생초기의 변화는 다른 유전학적 및 환경적 요인과 함께 성인기에 이르러 심장혈관 및 대사성 질환의 발생위험도를 높이는 요인으로 작용하게 된다.

태아기에 노출되는 여러 가지 자궁 내 환경의 변화는 태아조직으로 공급되는 산소농도 변화를 초래하고 이로 인하여 태아에 발생한 산화성 스트레스는 태아조직에 다양한 변화를 유도하게 된다. 발생과정 중의 산화환원 반응(redox reaction)은 유전자 발현을 조절하므로 태아기 발생 중에 일어난 산화 스트레스는 유전자의 발현에 직접적인 영향을 미친다. 아울러 이러한 산화스트레스의 악화는 산화된 분자의 농도 증가를 통하여 태아기의 발생과정에 간접적인 영향을 줄 수 있다. 즉, 태아기의 발생과정 중 일어난 산화스트레스는 유전적 발현과정이나 대사과정에 직접 및 간접적인 영향을 줄 수 있다. 출생체중이 작거나 미숙아로 태어난 경우 출생 후 성인기에 이르러 제2형 당뇨병 및 심장혈관계통 질환

등의 발생율이 높게 나타났으며 이들에게서 공통적으로 높은 수준의 산화손상이 관찰된 바 있다(Barker 등 1993, Barker 1995, Singhal 등 2001, Singhal 등 2003). 따라서 산화손상이 성인기 질병 발생과 태아 프로그래밍을 이어주는 연결고리로 관여하고 있을 가능성을 충분히 고려해 볼 수 있으며, 실제로 그 가능성이 제시된 바 있다(Luo 등 2006).

본 연구는 출생 전 환경인 태반의 산화손상수준이 출생 후 자손의 심혈관계통의 기능 상태에 영향을 줄 가능성을 제시하고자, 출생 후 측정된 신생아의 혈압수준과 이들의 태반의 산화손상수준의 연관성을 살펴보았으며, 그 결과 높은 수준의 혈압을 보이는 신생아군에서 낮은 수준의 혈압을 보이는 군에 비하여 이들의 태반 내 산화손상수준이 유의하게 증가되어 있음을 관찰하였다.

태반의 산화손상은 산모 및 태아 사망률의 주된 원인인 자간전증의 발생 기전에 있어서 중심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Maseki 등 1981, Walsh와 Wang 1993). ROS (reactive oxygen species) 생성 유발요인으로 알려진 호중성백혈구(neutrophil)가 자간전증 임신부의 태반에서 정상태반에 비하여 증가되어 있었으며(Zusterzeel 등 2001), 이들은 융합영양막세포에서 ROS의 생성을 자극하는 것으로 관찰되었다(Aly 등 2004). 또한 자연유산이 되거나 자간전증인 태반에서 산화손상의 지표인 HSP70, nitrotyrosine residues 및 지질 과산화물(lipid peroxidation)의 발현이 정상 태반보다 증가되어 있음이 보고되었다(Morris 등 1998, Hempstock 등 2003). 자간전증에서와 같은 태반의 산화손상에 따른 기능 변화가 흔히 태아 성장에 의한 대사요구수준을 제한함으로써 태아의 자궁 내 성장 장애를 유발할 뿐만 아니라 출생 후 성장, 발달과정에도 부정적인 영향을 줄 수 있으며, 이는 곧 성인기의 다양한 질병 발생 위험도의 증가와 강한 연관성을 지니고 있음이 동물실험 및 사람을 대상으로 한 많은 역학적 연구를 통하여 입증되었다(Sinclair 등 1990, Wang 등 1991).

따라서 태반의 기능 상태는 소아기와 성인기 건강상태의 주요 결정요인의 하나로 생각되나, 이를 뒷받침하고 그 기전을 이해하기 위한 형태학적 연

구 자료는 아직 미흡하다. 본 연구를 통하여 신생아의 혈압수준이 태반 융합영양막세포에서의 LOX-1 및 HSP70의 발현과 관련되어 있으며, 출생 시의 혈압이 높은 군의 태반 융합영양막세포의 세포질에서 LOX-1 및 HSP70의 발현수준이 출생 시 혈압이 낮았던 군에 비하여 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다.

LOX-1은 oxidized LDL의 주요 수용체로서, LOX-1의 발현은 혈관에서 혈액과 접하는 내피세포의 손상을 유발하는 oxidized LDL수준과 관련되어 있다(Chen 등 2002). 태반에서 융합영양막세포는 태반을 통한 태아와의 교류과정에서 모체의 혈액과 직접 접촉하는 세포층을 이루며 혈관내피세포의 역할을 수행하는 부분이다. 따라서 융합영양막세포의 LOX-1 면역염색성의 증가는 oxidized LDL의 증가 및 세포에 대한 산화손상을 통한 태반기능이상의 지표로 해석될 수 있다.

Heat shock protein (HSP)은 열충격, 감염, 중금속, ROS 및 프로스타글란딘 등의 다양한 자극에 의해서 유도되는 단백질(stress-induced protein)로서(Wataba 등 2004) 산화손상의 지표일 뿐만 아니라 이의 혈중 수치의 증가는 혈관성질환(vascular disease)의 발생과 관련되어 있다(Pockley 등 2000). 특히 태반에서의 산화손상의 증가로 인하여 유발되는 것으로 알려진 자간전증 임신부의 태반이나 유산된 태반에서 HSP70이 높게 발현된다(Morris 등 1998, Jauniaux 등 2000, Hempstock 등 2003). 본 연구결과, 혈압이 높은 신생아 군의 태반조직에서 LOX-1 및 HSP70의 발현과 이들에 대한 융합영양막세포에서의 면역반응성이 모두 증가되어 있었다. 따라서 출생 시 혈압이 높은 신생아군의 태반에서 혈압이 낮은 신생아군에 비하여 태반의 산화손상수준이 증가되어 있으며 이를 통한 태반기능의 상대적인 저하가 있었음을 예측할 수 있다.

아울러 본 연구가 건강한 정상임산부를 대상으로 시행되었으며 이들에게서 출생한 신생아의 혈압수준이 태반의 LOX-1 및 HSP70의 발현과 유의한 연관성을 보였음을 고려할 때, 태반의 산화손상 및 기능변화가 임신결과에는 영향을 주지 않는 범위 내에서도 출생 후의 건강상태에 잠재적인 영향을 줄

가능성을 고려할 수 있다.

사람에서 영아기의 혈압이 성장 이후 성인기 혈압을 예측하는 지표가 됨은 이미 많은 연구조사에 의하여 보고되어 왔으며 (Zinner 등 1971, DeSwiet 등 1976) 이는 임상적인 고혈압의 발병 이전에 이를 예견하고 조절하기 위한 조기표지를 찾는 차원에서 중요한 의미를 갖는다. 특히 신생아기의 혈압은 태아기의 심장발달과 기능을 반영하는 지표로 해석되고 있다 (Hornberger 등 2000, Lipshultz 등 2002). 반면 출생 후 6개월에 이르는 시기의 혈압이 실제로 아동기 또는 성인기의 혈압을 비롯한 심장혈관기능의 미치는 영향에 관하여는 그동안 시행되어온 연구조사의 한계성과 단편성으로 인하여 아직 명확히 입증되어 있지 않다.

따라서 출생 전 환경으로서 태반의 기능이 출생 후 심장혈관질환발생에 미치는 영향을 평가하기 위해서는 신생아기의 혈압수준이 태아환경인 태반의 산화손상에 의하여 영향을 받을 수 있음을 제시한 본 연구결과를 토대로 보다 체계적인 수준에서 전향적인 추적과 연구조사가 필요하다. 이를 위하여 본 연구진은 연구대상이 된 신생아들의 성장에 따른 추적관리를 진행하고 있으며 향후 이를 통하여 좀 더 다양한 태반의 기능적 지표와 함께 소아기 및 학동기의 혈압 등 심장혈관질환 관련 지표와의 관련성에 관한 체계적인 연구 수행을 계획하고 있다.

참고 문헌

- Ahn YM, Kim YJ, Park B, Park B, Lee H : Prenatal vitamin C status is associated with placental apoptosis in normal-term human pregnancies. *Placenta* 28: 31-38, 2007.
- Alexander BT : Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 41: 457-462, 2003.
- Aly AS, Khandelwal M, Zhao J, Mehmet AH, Sammel MD, Parry S : Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 190: 252-258, 2004.
- Barker DJ, Osmond C, Golding G, Kuh D, Wadsworth ME : Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.
- Barker DJ, Hales CN, Fail CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM : Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X) : relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67, 1993.
- Barker DJ : Fetal origin of coronary heart disease. *BMJ* 311: 171-174, 1995.
- Bellinger L, Langley-Evans SC : Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin Sci (Lond)* 109: 413-420, 2005.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W : Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med* 338: 1650-1656, 1998.
- Chen K, Thomas SR, Keaney JF : Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 35: 117-132, 2003.
- Chen M, Masaki T, Sawamura T : LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells : implication in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95: 89-100, 2002.
- Coe CL, Lubach GR : Prenatal origins of individual variation in behavior and immunity. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 39-49, 2005.
- DeSwiet M, Fayers P, Shinebourne EA : Blood pressure survey in a population of newborn infants. *BMJ* 2: 9-11, 1976.
- Friedman S, Talor R, Roberts J : Pathophysiology of preeclampsia. *Clin Perinatol* 18: 661-682, 1991.
- Gennser G, Rymark P, Isberg PE : Low birthweight and risk of high blood pressure in adulthood. *BMJ* 296: 1498-1500, 1988.
- Hattersley AT, Tooke JE : The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birth weight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 353: 1789-1792, 1999.
- Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ : The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 34: 1265-1275, 2003.
- Hornberger LK, Lipshultz SE, Easley KA : Cardiac structure and function in fetuses of mothers infected with HIV : the prospective P2C2HIV multicenter study. *Am Heart J* 140:

- 575-584, 2000.
- Hnat MD, Meadows JW, Brockman DE, Pitzer B, Lvall F, Myatt L : Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 193: 836-840, 2005.
- Hubel CA, Roberts JM, Taylor N, Thomas J, Musci TJ, McLaughlin K : Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1025-1034, 1989.
- Hubel CA : Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 222-235, 1999.
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM : The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systemic review of the literature. *J Hypertens* 18: 815-831, 2000.
- Ishihara M : Studies on lipoperoxide of normal pregnant woman and of patients with toxemia of pregnancy. *Clin Chim Acta* 84: 1-9, 1978.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ : Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. *Am J Pathol* 157: 2111-2122, 2000.
- Law CM, Shiell AW : Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens* 14: 935-941, 1996.
- Lee H, Park H, Kim YJ, Kim HJ, Ahn YM, Park B : Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in human preeclamptic placenta: possible implications in the process of trophoblast apoptosis. *Placenta* 26: 226-233, 2005.
- Lipshultz SE, Easley KA, Orav EJ : Cardiovascular status of infants and children of women infected with HIV-1 (P2C2 HIV) : a cohort study. *Lancet* 360: 368-373, 2002.
- Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M : Tracing the origin of "fetal origin" of adult disease: Programming by oxidative stress?. *Medical Hypotheses* 66: 38-44, 2006.
- Maseki M, Nishigaki I, Hagihara M, Tomoda Y, Yagi K : Lipid peroxide levels and lipid serum contents of serum lipoprotein fractions of pregnant subjects with and without preeclampsia. *Clin Chim Acta* 155: 155-160, 1981.
- Miller RK, Faber W, Asai M, D'Gregorio RP, Ng WW, Shah Y, Neth-Jessee L : The role of the human placenta in embryonic nutrition. Impact of environmental and social factors. *Ann N Y Acad Sci* 678: 92-107, 1993.
- Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Knight M, Linton EA, Dhir S, Anggard EE, Redman CW : Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 105: 1195-1199, 1998.
- Ophir E, Oettinger M : Fetal intrauterine life - a window to adult disease?. *Isr Med Assoc J*, 2: 43-47, 2000.
- Ounsted MK, Cockburn JM, Moar VA, Redman CW : Factors associated with the blood pressures of children born to women who were hypertensive during pregnancy. *Arch Dis Childhood* 60: 631-635, 1985.
- Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J : Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 36: 303-307, 2000.
- Renke M, Rainer HB : Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atheroscler Suppl* 4: 5-17, 2003.
- Roberts JM, Taylor JN, Misci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK : Preeclampsia: an endothelial disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1200-1204, 1989.
- Schwarz KB, Cox J, Sharma S, Witter F, Clement L, Sehnert S : Cigarette smoking is pro-oxidant in pregnant women regardless of antioxidant nutrient intake. *J Nutr Environ Med* 5: 225-234, 1995.
- Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J : Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 43: 334-344, 1990.
- Singhal A, Cole TJ, Lucas A : Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet* 357: 413-419, 2001.
- Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A : Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet* 361: 1089-1097, 2003.
- Stary HC : Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 72: 1297S-306S, 2000.
- Uotila J, Kirkkola AL, Rorarius M, Tuimala R : The total peroxyl radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Radic Biol Med* 16: 581-590, 1994.
- Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J : Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 59: 238-

- 245, 2001.
- Walsh SW, Wang Y : Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of tromboxane and lipid peroxides. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1456-1461, 1993.
- Wang Y, Walsh SW, Guo J, Zhang J : The imbalance between tromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1695-1700, 1991.
- Wataba K, Saito T, Takeuchi M, Nakayama M, Suehara N, Kudo R : Changed expression of heat shock proteins in various pathological findings in placentas with intrauterine fetal growth restriction. *Med Electron Microsc* 37: 170-176, 2004.
- Wlodek ME, Westcott KT, O'Dowd R, Serruto A, Wassef L, Moritz KM : Uteroplacental restriction in the rat impairs fetal growth in association with alterations in placental growth factors including PTHrP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1620-R1627, 2005.
- Zinner SH, Levy PS, Kass EH : Familial aggregation of blood pressure in childhood. *N Engl J Med* 284: 401-404, 1971.
- Zinner SH, Martin LF, Sacks F : A longitudinal study of blood pressure in childhood. *Am J Epidemiol* 100: 437-442, 1974.
- Zusterzeel PL, Wanten GJ, Peters WH, Merkus HM, Steegers EA : Neutrophil oxygen radical production in pre-eclampsia with HELLP syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 99: 213-218, 2001.

Abstract

**Possible Implications of Placental Expressions for
Heat Shock Protein 70 and Lectin-like Oxidized Low Density
Lipoprotein Receptor-1 on Postnatal Blood Pressure in Their Newborns**

Si-Young Choi, Young-Mo Ahn, Jung-Won Min¹, Hye-Sook Park^{1,4}, Young-Ju Kim^{2,4},
Eun-Ae Park^{3,4}, Eun-Hee Ha^{1,4}, Hwa-Young Lee⁴

*Department of Anatomy, ¹Preventive Medicine, ²Obstetrics & Gynecology, and ³Pediatrics,
⁴Ewha Medical Research Center, School of Medicine, Ewha Womans University*

The 'fetal origin' hypothesis propose the alteration in fetal environment result in developmental adaptation, the permanently change in structure, physiology and metabolism, thereby predisposing to cardiovascular, metabolic and endocrine disease in adult life. Evidence is accumulating that the fetal environment affects newborn cardiac structure and function in humans, and blood pressure (BP) in newborn predicts the likelihood of developing hypertension in adult life. However, few studies have reported the influence of fetal factors on BP in neonates and an attempt to relate fetal factors to a neonate's BP seems to be important to identify individuals at risk of developing hypertension later in life.

As the placenta is the regulator of nutrient composition and supply from mother to fetus and the source of hormonal signals that affect maternal and fetal metabolism, appropriate development of the placenta is crucial to normal fetal development. By virtue of these roles the placenta is in a key position to play a direct role in fetal programming. The aim of this study was to evaluate positive relationship between placental oxidative stress and BP in their healthy newborn offsprings, and propose to relate fetal factors to a neonatal BP.

Systemic blood pressure was measured by automated device in 68 healthy term newborns who were born at Ewha Womans Medical Center, and their tissue samples of placentas were obtained from 40 cases which are 20 cases from high neonatal blood pressure group and 20 cases from low neonatal blood pressure group. We investigated placental expressions for heat shock protein (HSP) 70 and lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), as markers for placental oxidative stress using immunohistochemistry and Western blot analysis, and evaluated their association with BP in healthy term newborn babies.

The mean values of placental LOX-1 and HSP 70 were significantly higher in newborns with high BP group compared to those with low BP group. Increase in placental oxidative stress was associated with higher newborn systolic blood pressure. These findings suggest that newborn blood pressure may represent prenatal influence on cardiac structure and function.

Key words : Placenta, Fetal environment, Oxidative stress, Neonatal blood pressure, Lectin-like oxidized LDL receptor-1, Heat shock protein 70