

태반-특이유전자의 흰쥐 태반내 발현분포

최은화, 정채용, 남광일, 이승원, 배춘상, 김백윤, 박성식, 안규윤

전남대학교 의과대학 해부학교실, 전남대학교 의과학연구소
(2011년 3월 8일 접수, 2011년 3월 18일 수정접수, 2011년 3월 21일 게재승인)

간추림 : Homeobox 유전자는 분화, 발생 및 발암 등을 유도하는 유전자들의 발현을 조절하는 많은 전사인자들을 암호화하고 이 유전자의 특징은 서로 다른 종 간에도 일정한 염기서열이 잘 보존되어 있다는 것이다. 본 연구는 homeobox 유전자계에 속하는 흰쥐의 새로운 태반-특이 유전자(rPsx)로부터 digoxigenin이 표지된 cRNA probe를 만들어 *in situ* hybridization 조직화학 기법을 이용하여 임신 7.5일부터 16.5일까지의 흰쥐 태반에서 이의 발현 및 분포를 알아보고자 하였다.

In situ hybridization 조직화학 소견에서 임신 10.5일에 처음으로 태반-특이유전자의 mRNA가 용모막외배엽에서 처음으로 발현되기 시작하였다. 임신 11.5일에서 hybridization signal은 미로영양막층과 거대영양막세포층에서만 관찰되었다. 임신 12.5, 13.5 및 14.5일에서는 hybridization signal은 거대영양막세포층, 해면영양막층 및 미로영양막층에서 관찰되었다. 임신 15.5일에서는 hybridization signal이 미로영양막층과 해면체영양막층에서 관찰되었으나 거대영양막세포층에서는 관찰되지 않았다. 해면체영양막층에서의 hybridization signal은 임신 14.5일에 비해 상당히 감소하였다. 임신 16.5일에서는 hybridization signal이 미로영양막층에서만 관찰되었고 해면체영양막층이나 거대영양막세포층에서는 관찰되지 않았다. 임신 경과에 따른 hybridization signal은 임신 10.5일부터 점차 증가하여 14.5일에 최고조에 달한 후 그 이후에는 감소하는 경향이였다.

이상의 결과로 흰쥐에서 새로운 태반-특이유전자는 임신 10.5일부터 발현되기 시작하여 태반의 용모막외배엽, 미로영양막층, 해면영양막층 및 거대 영양막세포층에서만 발현되며 영양막세포의 분화 및 발육에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

찾아보기 낱말 : 태반-특이유전자, 태반, 유전자 발현, *in situ* hybridization 조직화학

서 론

영양막세포(trophoblast)는 태반의 중요한 구성요소이며, 이 태반은 임신과 관련된 호르몬을 생산하고 태아를 면역학적 및 물리적으로 보호할 뿐만 아니라 모체와 태아 사이의 영양 및 노폐물의 교환 등 많은 기능을 가지고 있어 임신 동안 태아의 성장과 발육에 중요한 역할을 한다(Cross 등 1994). 흰쥐의 태반은 형태학적으로 서로 다른 4층 즉, 모체의 탈락막층(decidua), 거대영양막세포층(trophoblast giant cell layer), 해면영양막세포층(spongiotrophoblast layer) 및 태아와 연결되는 가장 안쪽 층인 미로영양막세포층(labyrinthine trophoblast layer)

으로 구성되어 있다(Rossant 1995). 거대영양막 세포는 중요한 내분비 기능과 침윤능을 가지고 있고, 해면영양막세포는 형태학적으로 거대영양막세포와는 다르지만 내분비 기능을 가지고 있다. 또한 미로영양막은 태아와 가장 가까이 있고 영양 및 노폐물 교환의 장소를 제공한다(Soares 등 1996, Takata 등 1997, Orwig 등 1998).

영양막 세포들의 발육 장애는 태반형성에 영향을 미쳐 태아 성장 지연이나 태아 사망에까지 이르게 할 수 있다(Luo 등 1997, Kraut 등 1998). 이는 영양막세포들의 발육과 분화의 정확한 유전학적 조절이 포유류 태아의 정상 발육에 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있다. 그래서 포유류 영양막세포의 유전적 조절을 이해하기 위해서는 영양막세포에서 발현되는 유전자들의 특성이 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

Homeobox 유전자는 형태발생, 기관발생, 세포분화 및

세포의 운명을 조절하는 역할을 하고 이 유전자의 돌연변이는 많은 유전질환을 야기시킨다(Maconochie 등 1996, Boncinelli 1997, Mann 등 1998). 이 유전자들은 homeo-domain이라 불리는 DNA 결합 영역(DNA-binding domain)을 암호화하는 180 bp 크기의 염기서열을 공통적으로 가지고 있다.

Homeobox 유전자는 대부분 생쥐에서 클론되었다. 즉, Pbx (Han 등 1998, Chun 등 1999), Esx 1 (Li 등 1997, 1998), Pbx (Lin 등 1994), GATA-2, 3 (Ng 등 1994), Irf6 (Kraut 등 1998), Mash-2 (Guillemot 1994) 및 Hxt (Cross 등 1995) 유전자 등이 알려져 있는데 이들 유전자의 태반 내 분포 양상은 서로 특이하게 발현된다 하였다.

이와 같이 생쥐 태반에서 homeobox 유전자들이 많이 분리되었지만 그들의 생물학적 및 생리학적 기능은 아직까지 정확히 알려지지 않았다. 그렇지만 homeobox 유전자들이 많이 존재한다는 것은 임신조절이나 태아 발육에 각각 서로 다른 역할을 할 것으로 추측된다. 본 연구는 최근에 흰쥐에서 분리되어 homeobox 유전자계에 속하는 것으로 알려진 태반-특이유전자의 태반 내 발현시기와 분포를 알아보고자 digoxigenin이 표지된 cRNA probe를 이용하여 *in situ* hybridization 조직화학 기법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley 계 (대한실험동물센터, 대한민국) 암컷 흰쥐로 수컷 흰쥐와 한우리에 넣어 두었다가 다음날 아침 vaginal plug를 확인하거나 질 도말표본에서 정자를 관찰하면 이를 임신 0.5일(E 0.5)로 하였다. 임신이 확인된 흰쥐는 임신 7.5일(E 7.5), 8.5일(E 8.5), 9.5일(E 9.5), 10.5일(E 10.5), 11.5일(E 11.5), 12.5일(E 12.5), 13.5일(E 13.5), 14.5일(E 14.5), 15.5일(E 15.5) 및 16.5일(E 16.5) 후에 희생시켰으며 각 군당 2마리 이상 사용하였다.

2. cRNA probe 제작과 *in situ* hybridization 조직화학

태반-특이유전자에 특이한 sense와 antisense probe는 SP6, T7 RNA polymerase와 digoxigenin-11-UTP (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 제작하였다. Paraffin에 포매된 태반 조직 표본제작과 *in situ* hybridization 조

직화학실험은 Ahn 등(1996)의 방법을 따랐다. 즉, 동물은 pentobarbital sodium (50 mg/kg, ip)으로 마취하여 개복하고 좌심실을 통해 PBS (phosphate buffered saline; NaCl: 137 mM, KCl: 2.7 mM, Na₂HPO₄: 4.3 mM, KH₂PO₄: 1.4 mM)와 4% paraformaldehyde 고정액으로 관류 고정시켰다. 태반을 절제한 후 상기 고정액에 3시간 동안 4°C에서 고정한 후 PBS로 3회 세척하고 ethanol로 탈수과정을 거친 후 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직은 회전식 절편기로 6 μm 두께의 절편을 얻어 *in situ* hybridization 조직화학 실험에 사용하였다. 절편조직은 50% formamide가 포함된 hybridization 용액에서 14~16시간 동안 48°C에서 hybridization 시켰다. Hybridization signal은 colorimetric 반응에서 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate (Roche)로 검출하였다.

결 과

태반-특이유전자 mRNA의 발현시기와 태반내 분포를 알아보기 위해 임신 흰쥐 7.5일부터 16.5일까지의 태반에 *in situ* hybridization 조직화학을 실시하였다. Anti-sense probe를 이용한 *in situ* hybridization 조직화학 실험에서 임신 7.5일부터 임신 9.5일까지는 hybridization signal을 관찰할 수 없었다(Fig. 1A~1C). 임신 10.5일에서 처음으로 태반-특이유전자의 mRNA가 융모막외배엽(chorionic ectoderm)에서 발현되기 시작하였다(Fig. 1D). 임신 11.5일에서는 hybridization signal은 미로영양막층과 거대영양막세포층에서만 관찰되었다(Fig. 1E). 임신 12.5, 13.5 및 14.5일에서는 hybridization signal이 거대영양막세포층, 해면영양막층 및 미로영양막층에서 관찰되었다(Fig. 1F, 1G, 1H). 임신 15.5일에서는 hybridization signal이 미로영양막층과 해면체영양막층에서 관찰되었으나 거대영양막세포층에서는 관찰되지 않았다. 해면체영양막층에서의 hybridization signal은 임신 14.5일에 비해 상당히 감소하였다(Fig. 1I). 임신 16.5일에서는 hybridization signal이 미로영양막층에서만 관찰되었고 해면체영양막층이나 거대영양막세포층에서는 관찰되지 않았다(Fig. 1J). 임신 경과에 따른 hybridization signal은 임신 10.5일부터 점차 증가하여 14.5일에 최고조에 달한 후 그 이후에는 감소하는 경향이 있었다. 미로영양막세포에서의 발현은 임신 11.5일부터 16.5일까지 지속되지만 거대영양막세포에서는 임신 11.5일부터 14.5일까지만 발현되고 그 이후에는 발현되지 않았다. 해면체영양막세포에서는 12.5일부터 15.5일까지만 발

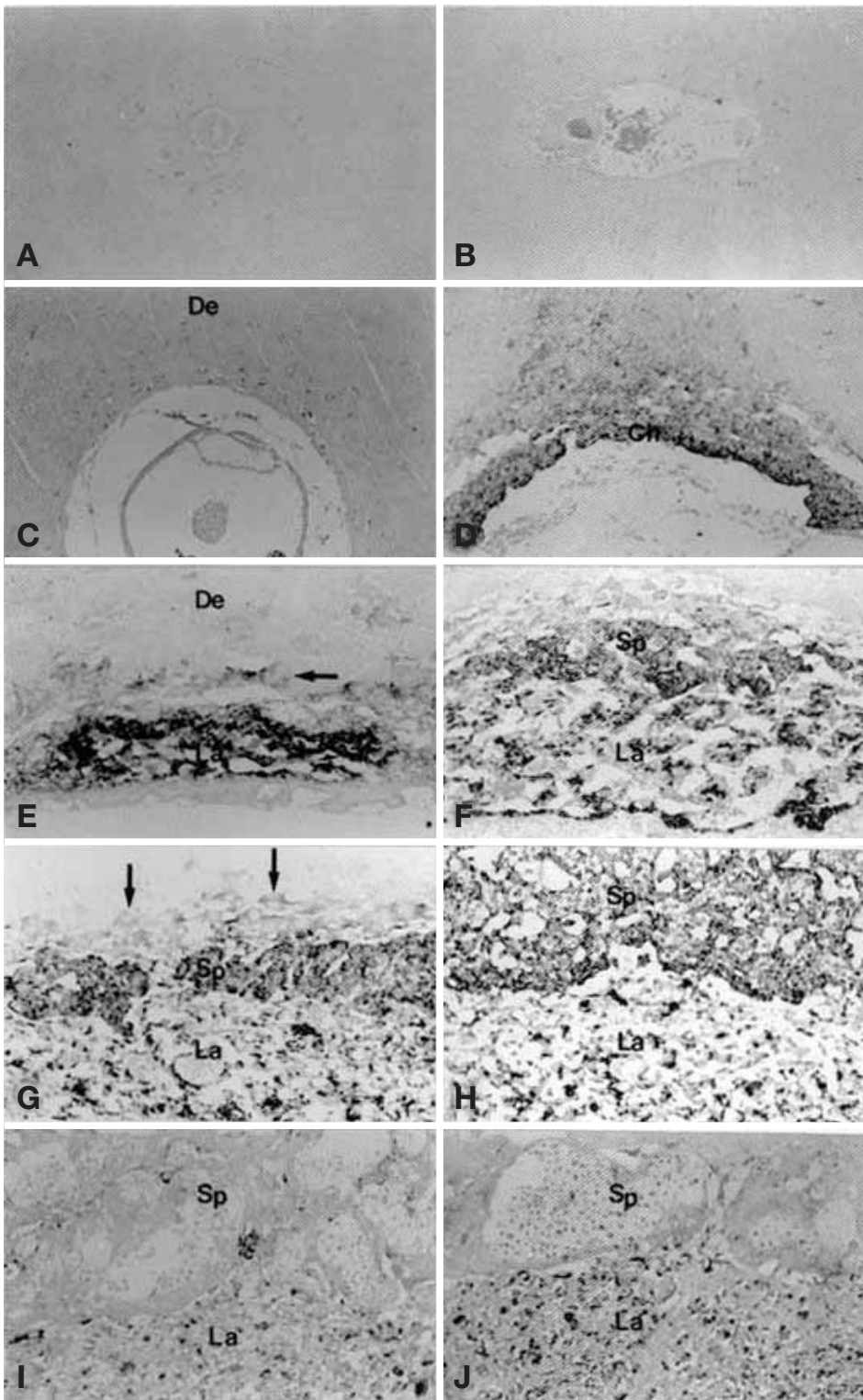


Fig. 1. Cellular distribution of placenta-specific homeobox (Psx) gene mRNA in rat by *in situ* hybridization histochemistry. Sagittal sections through conceptuses within the rat uterus at E 7.5 (A), E 8.5 (B), E 9.5 (C), E 10.5 (D), E 11.5 (E), E 12.5 (F), E 13.5 (G), E 14.5 (H), E 15.5 (I), and E 16.5 (J) were hybridized with Psx antisense riboprobes. Hybridization signals are detected in chorionic ectoderm (Ch), trophoblast giant cells (arrows), labyrinthine trophoblast (La), and spongiotrophoblast cells (Sp). No hybridization signals are detected with antisense probe in any tissues at E 7.5 (A), E 8.5 (B), and E 9.5 (C). All magnifications are $\times 60$.

현되고 16.5일에서는 발현되지 않았다. 임신 시기에 관계없이 배자부분의 태반 층을 제외한 어느 부위에서도 태반-특이유전자의 mRNA는 발현되지 않았다(data not

shown). Sense probe를 이용한 조직에서는 어느 시기에서도 hybridization signal을 관찰할 수 없었다(data not shown).

고 찰

본 연구는 흰쥐 homeobox 유전자계에 속하는 새로운 유전자를 분리 동정하여 흰쥐 태반 내 발현시기와 분포를 *in situ* hybridization 조직화학 기법으로 관찰한 것이다. 이 새로운 라이겐드는 생쥐 태반-특이유전자들과 공통의 homeodomain을 가지고 있어서 rP_{sx}라 명명되었다.

Homeobox 유전자는 대부분 생쥐에서 클론되어졌고 이들의 태반 내 분포 양상에 관해서는 보고된 유전자에 따라 서로 특이하게 발현되었다. 즉 생쥐 태반-특이유전자는 임신 8.5일의 태반에서 발현되기 시작하여 임신이 끝날 때까지 지속되고 태반 내 분포는 융모막외배엽, 거대영양막세포 및 미로영양막세포에서 발현됨을 보고하였다(Han 등 1998, Chun 등 1999). 생쥐 Esx 1은 미로영양막세포의 발육에 필수적이고 융모막외배엽, 난황낭의 장측내배엽 및 미로영양막세포 그리고 일시적으로 거대영양막세포에서 발현되었음을 보고하였다(Li 등 1997, 1998). Lin 등(1994)은 생쥐 Pem 유전자가 미로영양막세포, 해면영양막세포 및 거대영양막세포 뿐만 아니라 난황낭의 장측내배엽 융모막외막판(chorioallantoic plate)에서도 발현됨을 보고하였다. 그 외 GATA-2, 3(Ng 등 1994), I-mfa(Kraut 등 1998), Mash-2(Guillemot 1994) 및 Hxt(Cross 등 1995) 등의 homeobox 유전자들도 생쥐 태반 내에서 특이하게 발현되었음을 보고하였다. 본 연구 소견에서도 흰쥐 태반-특이유전자가 융모막외배엽, 미로영양막세포, 해면영양막세포 및 거대영양막세포에서 발현되어 타 태반-특이유전자들과는 구별되었다. 이와같은 발현의 차이는 태반 내에서 발현되는 많은 homeobox 유전자들이 임신조절이나 태아 발육에 각각 서로 다른 역할을 할 것으로 추측된다.

본 연구 결과 흰쥐 태반-특이유전자 mRNA의 태반 내 발현시기는 임신 10.5일 이후이고, 본 실험재료에 포함된 16.5일까지 계속되었다. 본 실험재료에는 출생 직전의 태반을 사용하지는 않았지만 흰쥐 태반-특이유전자 mRNA는 생쥐 태반-특이유전자계와 유사한 발현(Han 등 1998, Chun 등 1999)을 보이는 것으로 보아 출생 직전까지 계속되리라고 생각되나 본 연구 소견상 임신 14.5일에 최고조에 달하고 그 이후에는 감소되는 경향이 있어 임신 17.5일부터는 감소하여 출생 직전에 사라질 것으로 생각된다. 이는 추후 임신 17.5일 이후의 태반을 사용하여 발현 유무를 Northern 분석이나 *in situ* hybridization 조직화학을 행해야 할 것으로 생각한다.

본 연구 소견에서 흰쥐 태반-특이유전자 mRNA가 처음으로 발현되는 시기는 임신 10.5일이었다. 그러나 생

쥐에서 Chun 등(1999)은 생쥐 태반-특이유전자 mRNA가 임신 8.5일에, Shi와 Kellems(1998)는 Ap-2 γ mRNA가 임신 6.5일에, Lin 등(1994)은 Pem mRNA가 임신 5.5일에, Li 등(1997)은 Esx 1 mRNA가 임신 8.5일에, Ng 등(1994)은 GATA-2, 3 mRNA가 처음으로 발현되었다고 보고한 결과들과는 약간의 차이가 있었다. 상기 보고자들의 결과를 종합해 보면 이들 homeobox 유전자들은 임신 초기나 임신중기에서 시작하여 계속된다는 것이었다. 이와 같은 차이는 첫째, homeobox 유전자가 임신조절이나 태아 발육에 각각 서로 다른 역할을 할 것으로 추측되기 때문에 각 유전자들의 발현 시기가 서로 다를 수밖에 없을 것으로 생각되고 둘째, 생쥐 태반의 발육이 흰쥐보다 3일 정도 빨라 흰쥐와 생쥐 간의 발육의 차이일 수도 있다.

태반에서 흰쥐 태반-특이유전자 mRNA의 분포는 세포 특이적으로 발현되었다. 태반을 구성하는 세포층은 4층으로 모체의 탈락막, 거대영양막세포층, 해면영양막층 및 미로영양막층으로 구성되는데 이 중에서 탈락막을 제외한 거대영양막세포층, 해면영양막층 및 미로영양막층에서 발현되었다. 임신 경과에 따른 hybridization signal은 임신 10.5일부터 점차 증가하여 14.5일에 최고조에 달한 후 그 이후에는 감소하는 경향이였다. 미로영양막세포에서의 발현은 임신 11.5일부터 16.5일까지 지속되지만 거대영양막세포에서는 임신 11.5일부터 14.5일까지만 발현되고 그 이전이나 그 이후에는 발현되지 않았다. 해면영양막세포에서는 12.5일부터 15.5일까지만 발현되고 임신 12.5일 이전이나 임신 16.5일에서는 발현되지 않았다. 이와 같은 발현의 차이는 태반을 만드는 영양막세포들의 분화 발육과 깊은 연관이 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 이 유전자가 homeobox 유전자이기 때문에 시기에 따른 다양한 호르몬의 분비에도 관여 할 것으로 생각된다. 이는 이 유전자를 결손시킨 연구나 다른 분자생물학적인 연구를 통해서 구명되리라 생각한다.

임신 15.5일에서 해면영양막에서의 hybridization signal은 세포에 따라서 관찰되기도 하고 관찰되지 않는 경우도 있었다. 이는 분화된 해면영양막세포와 미분화 해면영양막세포로 분류할 수 있을 것 같다. 이와 같은 소견이 해면영양막세포의 분화 정도의 차이 인지는 추후 해면영양막세포의 세포주에서 시기별 분화에 따른 세포배양을 실시해 발현 유무를 연구해 보아야 할 과제라 생각된다.

이상의 결과로 흰쥐에서 새로운 태반-특이유전자는 임신 10.5일부터 발현되기 시작하여 태반의 융모막외배

엽, 미로영양막층, 해면영양막층 및 거대 영양막세포층에서만 발현되며 영양막세포의 분화 및 발육에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Ahn KY, Park KY, Kim KK, Kone BC : Chronic hypokalemia enhances expression of the H⁺-K⁺-ATPase α 2-subunit gene in renal medulla. *Am J Physiol* 271: F314-F321, 1996.
- Boncinelli E : Homeobox genes and disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 331-337, 1997.
- Chun JY, Han YJ, Ahn KY : The Psx homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells of mouse placenta. *Dev Dyn* 216: 257-266, 1999.
- Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Rutter WJ, Werb Z : Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* 121: 2513-2523, 1995.
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ : Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 266: 1508-1518, 1994.
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL : Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371: 333-336, 1994.
- Han YJ, Park AR, Sung DY, Chun JY : Psx, a novel murine homeobox gene expressed in placenta. *Gene* 207: 159-166, 1998.
- Kraut N, Snider L, Chen CMA, Tapscott SJ, Groudine M : Requirement of the mouse I-mfa gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO J* 17: 6276-6288, 1998.
- Li Y, Behringer RR : Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nature Genet* 20: 309-311, 1998.
- Li Y, Lemaire P, Bechringer RR : Esx1, a novel X-chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev Biol* 188: 85-95, 1997.
- Lin TP, Labosky PA, Grabel LB, Kozak CA, Pitman JL, Kleeman J, MacLeod CL : The pem homeobox gene is X-linked and exclusively expressed in extraembryonic tissues during early murine development. *Dev Biol* 166: 170-179, 1994.
- Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V : Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- β . *Nature* 388: 778-782, 1997.
- Maconochie M, Nonchev S, Morrison A and Krumlauf R : Paralogous HOX genes: function and regulation. *Annual Review of Genetics* 30: 529-556, 1996.
- Mann RS, Affolter M : Hox proteins meet more partners. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 423-429, 1998.
- Ng YK, George KM, Engel JD, Linzer DIH : GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development* 120: 3257-3266, 1994.
- Orwig KE, Wolfe MW, Cohick CB, Dai G, Peters TJ, Soares MJ : Trophoblast-specific regulation of endocrine-related genes. *Trophoblast Res* 11: 65-85, 1998.
- Rossant J : Development of the extraembryonic lineages. *Semin Dev Biol* 6: 237-247, 1995.
- Shi D, Kellems RE : Transcription factors AP-2 γ regulates murine adenosine deaminase gene expression during placenta development. *J Biol Chem* 273: 27331-27338, 1998.
- Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Kamei DT, Orwig KE : Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta* 17: 277-289, 1996.
- Takata K, Fujikura K, Shin BC : Ultrastructure of the rodent placenta labyrinth: a site of barrier and transport. *J Reprod Dev* 43: 13-24, 1997.

Expression and Cellular Localization of Psx Gene in Rat Placenta

Eun Hwa Choi, Chaeyong Jung, Kwang Il Nam, Seung Won Lee, Choon Sang Bae,
Baik Yoon Kim, Sung Sik Park, Kyu Youn Ahn

Department of Anatomy, Chonnam National University Medical School,
Research Institute of Medical Science, Chonnam National University

Abstract : Homeobox genes seem to play critical roles in regulating morphogenesis, patterning, organogenesis, and differentiation. They have the conserved sequence that codes the DNA-binding domain called homeodomain. The expression and cellular localization of rPsx mRNA in rat placenta during placental development were examined by *in situ* hybridization histochemistry at different embryonic stages (Embryonic days 7.5 ~ 16.5).

rPsx mRNA was first detected in chorionic ectoderm of placenta at E 10.5. This transcript was localized in labyrinth trophoblast and trophoblast giant cells at E 11.5. Hybridization signals were observed in labyrinth trophoblast, spongiotrophoblast, and trophoblast giant cells at E 12.5, E 13.5, and E 14.5. At E 15.5, hybridization signal was detected in labyrinth trophoblast and spongiotrophoblast but not in trophoblast giant cells. Hybridization signal was only detected in labyrinth trophoblast at E 16.5. rPsx mRNA was not detected in decidua and any tissues of the embryo from E 7.5 to E 9.5 of gestations.

From these results, a new rPsx homeobox gene is first expressed at E 10.5 and detected in chorionic ectoderm, labyrinth trophoblast, spongiotrophoblast and trophoblast giant cells of the placenta. This gene may play a critical role in differentiation and development of trophoblast cells.

Keywords : Placenta specific homeobox gene, Placenta, Gene expression, *in situ* hybridization histochemistry