

## 자궁내 발달지연과 정상 말기임신 태반에서의 Telomerase 활성도와 MIB-1 및 Fas, Fas Ligand 발현차이에 관한 연구

전이경 · 홍성란 · 양문호\*

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 병리과  
경희대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2004년 11월 22일  
게재승인 : 2005년 1월 25일

책임저자 : 양 문 호  
우 130-702 서울시 동대문구 회기동 1  
경희의료원 병리과  
전화: 02-958-8731  
Fax: 02-958-8730  
E-mail: yang0604@khmc.or.kr

\*본 연구는 2001년도 삼성제일병원 제일의  
료장학재단 연구비지원으로 수행되었음.

### Telomerase activity and Expression of MIB-1, Fas and Fas Ligand in Placentas from Women with and without Intrauterine Growth Retardation

Yi Kyeong Chun, Sung Ran Hong and Moon Ho Yang<sup>1</sup>

Department of Pathology, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; <sup>1</sup>Department of Pathology, Kyung Hee University, College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** The placenta from a pregnancy that is complicated by intrauterine growth retardation (IUGR) tends to be smaller than that from a normal pregnancy. To investigate this difference, we analyzed the telomerase activity, the proliferative activity and the mRNA levels of apoptosis mediators in placentas. **Methods :** In 20 placentas from normal third-trimester pregnancies and 22 placentas from pregnancies that were complicated by IUGR, the telomerase activity was detected by a telomeric repeat amplification protocol assay. The proliferative activity was assessed by immunohistochemical staining using the MIB-1 monoclonal antibody. The expression of the apoptosis mediator was evaluated by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions for fas and fas ligand. **Results :** Telomerase activity was detected in 2 (10%) of 20 normal placentas, whereas it was not observed in all tested 13 placentas that were associated with IUGR. The proliferative activity was significantly low in the placentas that were associated with IUGR ( $7.44 \pm 2.96\%$ ), compared with the normal placentas ( $11.0 \pm 3.48\%$ ,  $p=0.002$ ). There was no statistically significant difference in the mRNA levels of fas or fas ligand between two groups. **Conclusions :** Low telomerase and proliferative activities in the placenta may play a role in the pathogenesis of IUGR.

**Key Words :** Telomerase; MIB-1; Fas; Fas-ligand; Placenta

태반은 태아와 모체간의 실질적인 물질을 교환하고 내분비 기능을 통하여 임신 기간 동안 태아의 생존에 필요한 항상성을 유지시키는 기능을 담당한다. 그리고 이러한 과정은 세포의 증식과 성숙, 사멸의 상호균형으로 이루어진다. 또한 태반은 임신 중에만 그 기능을 하고 태아의 출생과 함께 퇴화하기 때문에, 세포의 증식이나 성숙, 사멸 등의 변화가 현저하여 세포의 증식이나 세포자멸사(apoptosis)를 연구하기에 적합한 장기이다.<sup>1</sup>

자궁내 발달지연은 주산기 사망률과 이환율을 높이는 가장 중요한 위험인자로 자궁기형이나 쌍태아 및 다태아 임신, 산모의 영양결핍, 자간전증이나 자간증, 담배나 약물남용 등 여러 가지 원인에 의해 발생한다. 자궁내 발달지연 태반은 정상임신 태반보다 크기가 작고, 정상보다 적은 수의 세포를 포함하게 된다.<sup>2</sup> 이와 같은 크기와 세포수의 감소는 세포 증식력의 감소나 세포자멸사의 증가, 또는 양자 모두에 의해 발생하는 것으로 생각된

다. 그 기전을 밝히는 일은 자궁내 발달지연의 병리를 이해하고 나아가 인간의 노화나 사망을 연구하는 데 기여할 수 있을 것이다.

최근 세포의 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 telomerase에 대한 관심이 높아지고 있다. Telomerase는 telomeric DNA를 합성하여 종말체의 길이를 연장시키는 특수한 역전사 효소로서, 세포내에 활성화된 telomerase가 없으면 세포분열을 하는 동안 종말체의 길이가 짧아져 노화 또는 사망에 이르게 된다. 인체 내의 대부분의 세포는 telomerase를 가지고 있으나 불활성 상태로 있기 때문에 세포가 노화하거나 죽지만, 조혈세포나 생식세포, 종양세포 등에서는 telomerase가 활성화되어 있어서 계속 분열하고 증식하게 된다. 현재까지의 연구에 의하면 정상 태반에서의 telomerase는 임신 후반보다 임신 초기에 더 많이 활성화되어 있는 것으로 알려졌다.<sup>1,3,4</sup> 자궁내 발달지연 태반에서의 세포증식은 연구자에 따라 정상과 차이가 없거나 감소하는

등 결론이 나지 않은 상태이다.<sup>3,5</sup>

1972년 Kerr 등<sup>6</sup>에 의해 처음 기술된 세포자멸사는 DNA 손상을 받은 세포가 복구되지 않을 경우 능동적으로 세포사망에 이르게 하는 경로이며, fas와 fas ligand, bcl-2, bax 등 여러 인자에 의하여 조절이 되는 복잡한 과정이다. 사람의 정상 태반에서는 임신기간이 오래 경과할수록 세포자멸사가 증가하는 것으로 알려졌다.<sup>4,7,8</sup>

Fas와 fas ligand는 tumor necrosis factor (TNF) family에 속하는 세포막 단백질이다. Fas-fas ligand system은 각막이나 정소와 같은 immune-privileged site에서 세포자멸사를 촉진하여 염증세포를 죽이는 기능을 한다.<sup>9,10</sup> Fas는 다양한 조직에서 발견되지만 fas ligand는 순환하는 림프구, immune-privileged site와 태반의 영양막세포에서만 발견된다.<sup>11</sup> 임신성 고혈압이나 자간전증에서의 세포자멸사의 증가에 fas와 fas ligand의 발현의 변화가 관련된다고 한다.<sup>12,13</sup> Smith 등<sup>14</sup>과 Kudo 등<sup>15</sup>은 자궁내 발달지연 태반에서 세포자멸사가 증가하였다고 보고하였다. 그러나 자궁내 발달지연 태반에서 세포자멸사를 조절하는 fas와 fas ligand와 같은 각각의 인자들에 대하여는 아직 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 자궁내 발달지연 태반에서 세포수가 줄어드는 기전을 밝히고, 세포증식에 관련하여 telomerase 활성도와 MIB-1 염색을 통하여 자궁내 발달지연 태반과 정상 임신태반과의 차이를 비교하고자 하였다. 또한 세포자멸사를 조절하는 인자인 fas와 fas ligand의 발현이 자궁내 발달지연 태반에서의 세포자멸사 증가와 관련이 있는지를 살펴보고자 하였다.

## 재료와 방법

### 연구 대상

자궁내 발달지연 태반조직 22예와 대조군인 정상 말기임신 (third trimester) 태반조직 20예로 구성된 총 42예를 연구 대상으로 하였다. 자궁내 발달지연 태반조직 22예는 신선타반 13예와 파라핀 블록 9예로 이루어졌고, 정상 말기임신 태반조직 20예는 모두 신선타반이었다. 자궁내 발달지연 태반조직 22예 중 신선타반 13예는 2000년 4월부터 2001년 6월까지 성균관의 대 삼성제일병원 산부인과에서 자궁내 발달지연으로 진단받고 제왕절개한 산모 중에서 태아의 체중이 10 percentile 미만이었던 예에서 얻었다. 자궁내 발달지연 태반조직 중 파라핀 블록 9예는 성균관의대 삼성제일병원 병리과에 보관되어 있던 블록 중 1998년에 자궁내 발달지연으로 진단받고 제왕절개로 얻은 태반 가운데 태아의 체중이 10 percentile 미만이었던 예에서 골랐다. 자궁내 발달지연 태반조직은 임신 30주에서 40주 (평균 36.6 ± 2.3주) 사이에 분만된 여성으로부터 채취하였고, 태반의 무게는 평균 290 ± 78 gm, 태아는 평균 1,907 ± 421 gm이었다. 정상

말기임신 태반조직은 임신 38주부터 40주 (평균 38.3 ± 0.6주) 사이에 제왕절개로 분만된 것을 사용하였고, 태반의 무게는 평균 510 ± 95 gm, 태아는 평균 3,227 ± 366 gm이었다.

신선타반조직은 정상 말기임신 태반 20예와 자궁내 발달지연 태반 13예였고, 제왕절개 분만 후 30분 이내에 채취한 신선타반조직을 telomerase와 fas, fas ligand 발현을 보기 위하여 액화질소에서 급속 냉동한 후 -70°C 냉동고에 동결 보관하였다. 태반조직은 용모조직만을 얻기 위하여 변연부는 피하였고 육안상 정상으로 보이는 부분에서 채취하였다. 태반조직의 일부는 H&E염색과 MIB-1 면역조직화학염색을 위하여 10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀 블록으로 보관하였다.

9예의 자궁내 발달지연 태반은 MIB-1 면역조직화학염색을 시행하기 위하여 보관되어 있던 파라핀 블록 중에서 고정이 잘 되고 조직 상태가 좋은 증례로 골랐다.

### Telomerase 활성도 측정을 위한 Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay

#### 단백질 추출

절제한 태반조직을 액체질소가 들어 있는 용기에 넣어 급속 냉동시킨 후 실험을 하기 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다. 액체질소 하에서 급속 냉동된 조직을 분말 상태가 될 때까지 막자로 분쇄한 후 분말을 1.5 mL 튜브로 옮겼다. 냉각된 lysis 완충액(10 mM tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS (Sigma, USA), 10% glycerol) 300 μL를 넣고 용해시켰다. 얼음에서 30분간 반응한 후 4°C, 15,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 실험에 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 추출물의 단백질 농도는 Bradford assay (Bio-Rad, USA)로 측정하였다.

#### Polymerase Chain Reaction (PCR)

0.2 mL PCR용 튜브에 15 pmol의 CX primer (5'-CCCTT-ACCCTTACCCTTACCCTAA-3')를 넣고 wax로 차단하였다. 그리고 20 mM tris-HCl (pH 8.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA, 50 M dNTPs, 15 pmol의 TS primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')와 추출한 단백질 1 μg과 2U의 Taq DNA polymerase를 넣은 후, 증류수로 전체량이 50 μL가 되게 하였다. 25°C에서 30분간 반응시키고, 94°C에서 2분간 가열하여 telomerase의 활성을 억제시켰다. 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 45초의 반응을 35회 실시하였다. PCR 산물은 12% polyacrylamide gel에서 전기영동한 다음, ethidium bromide로 가시화하였다. Telomerase 활성도는 추출한 단백질 1 μg을 반응시켰을 때 6 bp DNA ladder가 보이는 것을 양성, 없는 것을 음성으로 하였다. 양성 대조군으로는 암세포주인 C33A를 사용하였고, 음성 대조군은

lysis 완충액와 양성 대조군인 C33A의 RNA에 RNase를 처리하여 사용하였다.

### 반정량적 RT-PCR (Semiquantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 의한 fas, fas ligand의 발현

#### Total RNA 획득

동결된 태반조직을 분말 상태로 분쇄하여 1.5 mL 튜브에 옮기고 Tri-reagent solution (MRC, USA) 1 mL를 첨가하여 용해하였다. Chloroform 용액 200  $\mu$ L를 첨가하여 혼합하고, 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 혼합하여 10분간 정지하였다. 그리고 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 다음 RNA pellet을 70% ethanol로 세척하였다. RNA pellet을 적당량의 0.1% DEPC가 처리된 증류수에 용해하였다.

#### cDNA 합성

0.2 mL PCR용 튜브에 4  $\mu$ g의 total RNA, 5X RT buffer, 10mM dNTPs, 100 pmol Oligo dT (17), MMLV reverse transcriptase 200 units를 넣은 후 증류수로 전체량이 25  $\mu$ L가 되게 혼합하였다. 37°C에서 1시간 동안 배양하여 cDNA를 합성하였다.

#### PCR

0.2 mL PCR용 튜브에 2-4  $\mu$ L의 total RNA, 10X PCR buffer, 10 mM dNTPs, 각각 10 pmol 씩의 상류와 하류 primer, Taq DNA polymerase 1 unit를 넣은 후 증류수로 전체량이 50  $\mu$ L가 되게 혼합하였다. Fas는 94°C 50초, 60°C 30초, 72°C 30초의 반응을 35회 실시하였고, fas ligand는 94°C 50초, 64°C 30초, 72°C 30초의 반응을 35회 실시하였다. Fas와 fas ligand 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자의 증폭을 위하여 사용한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다. 증폭된 산물은 2% agarose gel에서 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

Table 1. Sequences of fas, fas ligand and GAPDH primers

Primers	Sequences	Product
Fas		187 bp
forward	5'-GGACCCAGAATACCAAGT-3'	
reverse	5'-GGCAAAAGAAGAAGACAAAG-3'	
Fas ligand		212 bp
forward	5'-GGAATGGGAAGACACCTATGG-3'	
reverse	5'-GATGGAGGGGAAGATGATGA-3'	
GAPDH		306 bp
forward	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'	
reverse	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTAAGAC-3'	

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### 영상분석기(Image analyzer)를 통한 정량분석

Fas와 fas ligand 유전자의 발현정도를 영상분석기(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량분석하였다. 분석 방법으로는 fas와 fas ligand PCR 산물의 밀도(density)를 house keeping 유전자인 GAPDH PCR 산물의 밀도로 나누어 보정한 후 정량하는, 반정량적 분석 방법을 사용하였다.

### MIB-1의 면역조직화학염색

Avidin-biotin conjugate법을 이용하여 MIB-1 항체에 대한 면역조직화학염색을 하였다. 파라핀 포매된 태반조직은 4  $\mu$ m의 두께로 박절하여 poly L-lysine으로 처리한 슬라이드에 붙인 후 신전기에서 2시간 이상 건조하고 탈파라핀 단계와 함수단계를 거쳤다. 0.01 M sodium citrate 완충액(pH 6.0)에서 5분간 3회 전자렌지를 이용한 가열처리 후, Tris 완충액으로 3회 세척하고 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시켜서 내인성 과산화효소의 작용을 억제하였다. 그리고 정상 혈청으로 30분간 반응하여 비특이적 결합을 억제시킨 후 일차 항체인 MIB-1 (Immunotech, France)을 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 다음 이차 항체(biotinylated anti-mouse antibody)를 25분간 반응시키고 avidin-biotin peroxidase complex와 25분간 반응시켰다. 이 과정은 DAKO-LSAB kit를 이용하여 수행하였다. 발색제로 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)를 사용하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색한 후, 수용성 봉입제로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

MIB-1 항체에 의해 염색된 검체는 고배율(400 $\times$ , Olympus BX40) 시야에서 가장 염색이 잘된 다섯 군대를 선택하여 양성으로 염색된 세포의 백분율을 구하였다.

### 통계 처리

통계 처리는 Statistical Product and Service Solution (SPSS) 프로그램을 이용하여 비교분석하였다. Telomerase 활성도는 Fisher's exact test로 분석하였고, MIB-1 염색에 의한 세포증식능은 Mann-Whitney test로 분석하였다. Fas와 fas ligand 유전자의 발현은 t-test로 분석하였다. 통계적 검정의 유의수준은 5% 미만으로 하였다.

## 결 과

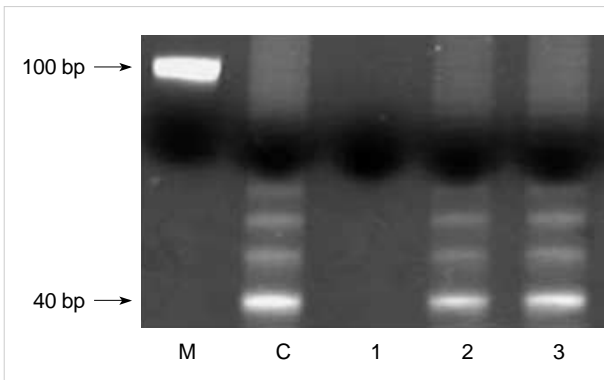
### TRAP assay에 의한 telomerase의 발현

TRAP assay에 의한 PCR 생성물을 12% acrylamide gel에서 전기영동한 결과, 6 bp의 DNA laddering을 관찰하였다. 양성 대조군으로 사용한 C33A 암세포주에서는 ladder가 관찰되었으나, 음성대조군으로 사용한 RNase로 처리한 암세포주와 lysis

완충액에서는 ladder가 관찰되지 않았다. 본 연구에서 대조군인 정상 말기임신 태반에서는 20예 중 2예(10%)에서 telomerase ladder가 발현되었고, 자궁내 발달지연 태반 13예는 모두 발현되지 않았다(Fig. 1)(Table 2). 통계분석에서 정상 말기임신 태반과 자궁내 발달지연 태반 간의 telomerase 발현 정도는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fisher's exact test,  $p>0.05$ ).

**MIB-1 항체**

MIB-1 단클론성 항체로 면역조직화학염색을 한 결과 주로 영양막세포의 핵에서 갈색으로 염색되었으나, 간질세포나 혈관세포에서도 간혹 염색되었다(Fig. 2). 정상 말기임신 태반 20예는  $11.0\pm 3.48\%$ , 자궁내 발달지연 태반 22예는  $7.44\pm 2.96\%$ 의 증식지수를 나타내어 정상태반이 자궁내 발달지연 태반보다 유의하게 높은 증식능을 보였다(Mann-Whitney test,  $p=0.002$ )(Table 2).



**Fig. 1.** Telomerase activity is detected in placenta from normal term pregnancy by TRAP assay. Telomerase positive samples produced a characteristic 6 bp DNA ladder. M: molecular weight, 100 bp DNA ladder; C: positive control (c33A); 1: negative sample; 2, 3: positive samples.

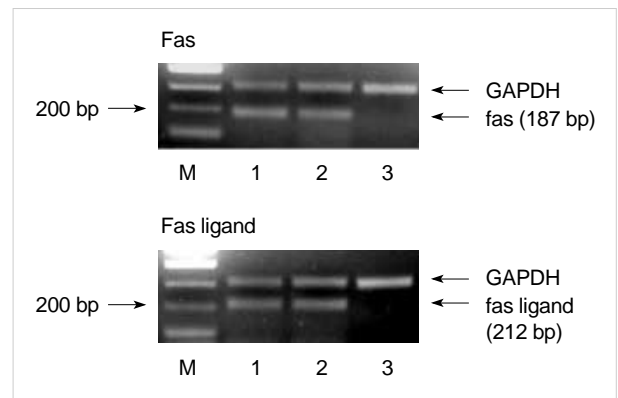
**Fas**

정상 말기임신 태반과 자궁내 발달지연 태반조직에서 RT-PCR에 의해 fas 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 자궁내 발달지연 태반 13예 중 10예(76.9%)와 정상 말기임신 태반 20예 중 19예(95.0%)에서 187 bp의 band를 확인하였다. 이는 정상태반에서 자궁내 발달지연 태반보다 다소 높은 발현 양상을 보인 것이나, 그 발현 정도는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 3).

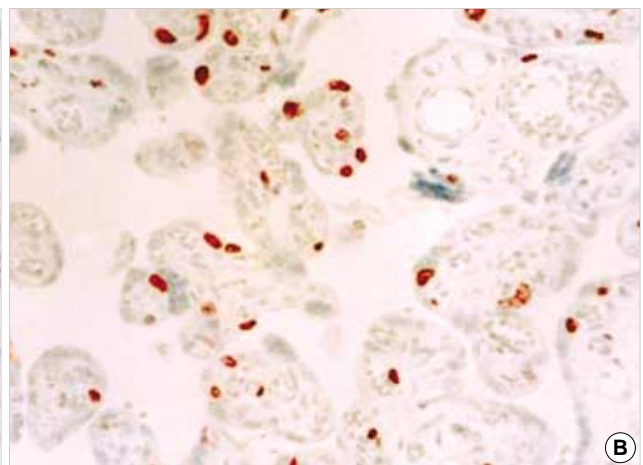
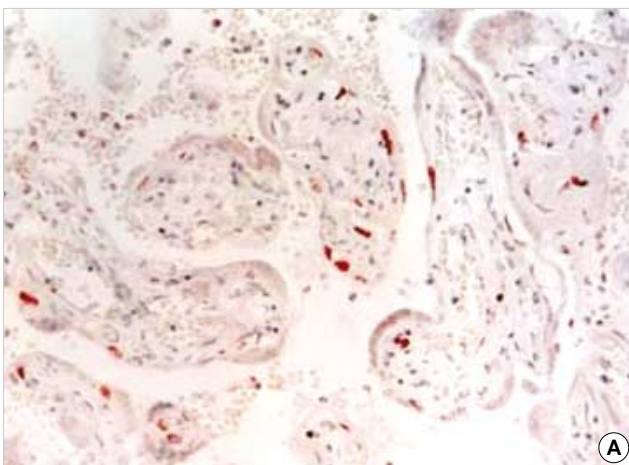
**Table 2.** Summary of telomerase activity and expression of MIB-1 in placenta with intrauterine growth retardation and from normal term pregnancy

	Placenta with IUGR	Term placenta
Telomerase activity <sup>a</sup>	0/13	2/20 (10%)
MIB-1 <sup>b</sup>	$7.44\pm 2.96\%$	$11.0\pm 3.48\%$

<sup>a</sup>, Fisher's exact test,  $p>0.05$ ; <sup>b</sup>, Mann-Whitney test,  $p=0.002$ ; <sup>c</sup>, mean  $\pm$  standard deviation. IUGR: intrauterine growth retardation.



**Fig. 3.** Human fas and fas ligand genes are expressed in human placental tissue using RT-PCR. M: molecular weight, 100 bp ladder; 1, 2: positive samples; 3: negative sample.



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining of MIB-1 monoclonal antibody shows lower proliferative activity in the placenta with intrauterine growth retardation (A) compared with the placenta from normal term pregnancy (B).

**Table 3.** The mRNA expression of fas and fas ligand in placenta with intrauterine growth retardation and from normal term pregnancy

	Placenta with IUGR	Term placenta
Expression rate <sup>a</sup>		
fas	10/13 (76.9%)	19/20 (95%)
fas ligand	10/13 (76.9%)	16/20 (80%)
Semiquantitation <sup>b</sup>		
fas	0.264±0.213 <sup>c</sup>	0.349±0.260 <sup>c</sup>
fas ligand	0.260±0.250 <sup>c</sup>	0.234±0.183 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>, t test, p>0.05; <sup>b</sup>, t test, p>0.05; <sup>c</sup>, mean±standard deviation.

### Fas ligand

정상 말기임신 태반과 자궁내 발달지연 태반조직에서 RT-PCR에 의해 fas ligand의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 자궁내 발달지연 태반 13예 중 10예(76.9%)와 정상 말기임신 태반 20예 중 16예(80.0%)에서 212 bp의 band를 확인하여 발현율에 차이를 보이지 않았고, 발현 정도에 대한 분석에서도 유의한 차이가 없었다(Table 3).

## 고 찰

자궁내 발달지연은 자궁기형이나 염증, 쌍태아 및 다태아임신, 산모의 영양결핍, 자간전증이나 자간증, 담배나 약물남용 등 여러 가지 원인에 의해 발생한다. 태아-태반간 혈관병증(feto-placental vasculopathy), 태반경색이나 혈중, 영양막세포의 증식, 핵농축과 용융영양막 결절의 증가, 염증, 혈관이 없는 용모가 과다하게 관찰되는 등 다양한 병리조건이 태반에서 관찰된다.<sup>15</sup> 공통적인 소견으로는 태반의 크기가 정상임신 태반보다 더 작고 더 적은 수의 세포를 포함한다는 것이다.<sup>2</sup> 태반 세포 수의 감소는 세포 증식력의 감소나 세포자멸사의 증가, 또는 양자 모두에 의해 발생할 것이다. 자궁내 발달지연 태반에서 세포자멸사가 정상보다 더 증가한다고 보고되고 있으나, 세포증식능에서는 이견을 보이고 있다.<sup>3,4,8,14,16</sup> 본 연구는 세포 수가 줄어드는 과정에서 세포증식능의 변화가 동반되는지의 여부를 밝혀보고자, TRAP assay로 telomerase 활성도를 보고 MIB-1 면역조직화학 염색으로 세포증식지수를 구하였다.

최근 telomerase와 종말체가 세포의 생명 주기를 조절하는 인자로 밝혀져 많은 연구가 이루어지고 있다. Telomere는 TTAGGG의 반복염기서열로 구성되며 염색체말단부위에 존재한다.<sup>17</sup> 염색체말단을 안정화시키고 변성이나 말단융합, 재배열 등의 변화로부터 염색체를 보호하는 기능이 있다. Telomerase는 telomeric DNA를 합성하여 종말체의 길이를 연장시켜 염색체 말단을 안정화시키는 특수한 역전사효소이며, 세포 내에 활성화된 telomerase가 없으면 세포분열을 하는 동안 종말체의 길이가 짧아지게 되어 사멸한다. 사람의 정상태반에서 telomerase 활성도

는 초기임신에서는 높지만 말기임신에서는 현저하게 낮아진다고 한다.<sup>1,3,4,18,19</sup> Izutsu 등<sup>3</sup>과 Kudo 등<sup>4</sup>은 초기태반에서 각각 93.3%와 93.5%의 높은 활성도를 보였으나, 임신 중기와 말기에서는 64.3%와 62.5%로 낮아졌다고 하였다. 조 등<sup>1</sup>은 초기임신 태반에서 81.3%, 말기임신 태반(37-41주, 평균 39.3주)에서 9.5%의 활성도를 보였다고 하였다. Cheung 등<sup>18</sup>은 초기태반에서 36.7%, 말기태반에서 20%였다고 하였고, Kyo 등<sup>19</sup>은 용모막에서 telomerase 활성도를 연구하였는데 초기태반에서 76%, 말기태반에서 4%였다고 하였다. 본 연구에서는 말기임신 태반(38-40주, 평균 38.3주) 20예 중 2예인 10%에서 telomerase 발현을 보였다.

자궁내 발달지연이 있는 태반에서의 telomerase 활성도는 없거나, 있어도 정상보다 약하다고 한다.<sup>3,4</sup> Kudo 등<sup>4</sup>은 정상 태반의 특징적인 6 bp의 DNA ladder와 비교하여 자궁내 발달지연 태반에서는 밀도가 약한 band가 관찰되어 telomerase 활성도가 약하다고 하였다. Izutsu 등<sup>3,20</sup>은 자궁내 발달지연 태반에서 telomerase 활성도가 관찰되지 않았다고 하였다. 본 연구에서 telomerase 활성도는 정상 말기임신 태반에서 10%, 자궁내 발달지연 태반에서는 관찰되지 않았고, 두 군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 본 연구에 사용된 태반의 연령이 자궁내 발달지연 임신이 평균 36.6주이고 정상말기 임신이 평균 38.3주로, 자궁내 발달지연 태반이 정상태반보다 조금 이르며, 사람의 정상 말기태반에서의 telomerase 활성도가 4-20%<sup>1,18,19</sup>로 낮은 점을 고려한다면, 본 연구 결과로는 정상태반보다 자궁내 발달지연 태반에서 telomerase 활성도가 낮은 것으로 생각할 수 있다.

Ki-67은 세포의 증식능을 평가할 때 흔히 쓰이는 핵내 단백질로, G<sub>0</sub>와 초기 G<sub>1</sub>기를 제외한 모든 세포주기에서 발현되는 항원이다. Ki-67항원의 재조합체에 대해 만들어진 MIB-1 항체는 파라핀 포매된 조직에서 세포증식능을 평가할 수 있다.<sup>21</sup> 정상태반에서의 MIB-1 증식지수도 telomerase 활성도와 마찬가지로 초기 임신일수록 높고 말기로 갈수록 낮아진다.<sup>1,3,5</sup>

Izutsu 등<sup>3</sup>은 MIB-1 증식지수가 정상 초기태반에서 28.1±1.7%, 정상 말기태반에서 7.0±2.9%, 자궁내 발달지연 태반에서 1.9±0.6%로, 자궁내 발달지연 태반에서 정상 임신 태반보다 세포증식능이 감소한 것으로 보고하였다. 그러나 Smith 등<sup>5</sup>은 정상 초기태반에서 11.8%, 중기태반에서 9.88%, 말기태반에서 3.15%로, 임신이 진행될수록 세포증식능이 감소하는 소견을 보이지만, 말기의 자궁내 발달지연 태반에서는 3.7%로 정상말기 임신과 의미 있는 차이를 보이지 않았다고 하였다. 본 연구에서는 MIB-1 증식지수는 정상 말기태반에서 11.0±3.48%, 자궁내 발달지연 태반은 7.44±2.96%로 정상태반이 자궁내 발달지연 태반보다 유의하게 높았다. 본 연구에 사용된 태반은 자궁내 발달지연 태반이 정상태반보다 조금 더 이른 시기에 얻어졌는데, 세포증식능은 오히려 더 낮은 것으로 나타났다. 이와 같은 증식능의 감소는 자궁내 발달지연 임신에서 정상임신보다 태아와 태반이 작고 태반의 세포 수가 감소하는 데 직접적으로 기여

할 것으로 생각된다.

태반에서의 세포자멸사는 초기 태반에서는 영양막세포에서 주로 보이고 말기에는 융합세포영양막에서 보이며 임신이 진행될 수록 증가하며, 자궁내 발달지연 태반에서 정상보다 더 증가한다고 보고되고 있다.<sup>4,8,14,16,22</sup> Kudo 등<sup>4</sup>은 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labelling (TUNEL) 염색으로 세포자멸사 지수를 구하였는데, 임신 26주와 39주 사이의 자궁내 발달지연 태반에서는  $9.7 \pm 7.4\%$ 인 데 반하여 정상 초기임신 태반에서는  $1.1 \pm 1.9\%$ , 정상 중기와 말기임신에서는  $2.9 \pm 3.7\%$ 로 자궁내 발달지연 태반에서 의미 있게 세포자멸사가 증가하였다고 하였다. Smith 등<sup>14</sup>은 말기 자궁내 발달지연 태반에서는 0.24%, 정상 임신의 말기태반에서는 0.14%로 유의한 차이를 보였다고 하면서, 세포자멸사는 시작에서 종료까지 1-2시간밖에 걸리지 않는 빠른 과정이기 때문에 미세한 변화라도 전체 세포 수의 증감에서는 큰 차이를 나타낸다고 하였다. Axt 등<sup>8</sup>도 말기 자궁내 발달지연 태반에서  $4.2 \pm 2.96\%$ , 정상 말기임신에서  $0.93 \pm 0.12\%$ 로 의미있는 차이가 있다고 하였으나, 세포자멸사의 증가가 자궁발달지연의 원인인지 결과인지 분명하지 않다고 하였다. 이와 같이 자궁발달지연 태반에서 세포자멸사의 증가가 있기 때문에 저자들은 세포자멸사를 유도하거나 억제하는 물질에 대한 비교연구가 필요하다고 생각하였다.

Fas ligand (APO-1L 또는 CD95L)는 TNF family에 속하는 세포막 단백질로 그 수용체인 fas보다 제한된 조직에서 발견된다.<sup>11</sup> 태반에서는 융합세포영양막이나 extravillous trophoblast에서 만들어진 fas ligand가 용모사이나 태반 기저부에서 세포를 용해시킬 수 있는 fas-bearing maternal lymphocyte의 공격으로부터 태아를 보호하여, 태반을 immune-privileged site로 유지시킨다.<sup>23</sup>

Koenig 등<sup>12</sup>은 임신성 고혈압에서 양막과 탈락막에서 fas와 fas ligand의 발현이 대조군보다 높다는 것을 면역조직화학염색으로 밝히고 세포자멸사의 증가와 관련이 있을 것이라고 하였다. Allaire 등<sup>13</sup>도 자간전증에서 면역조직화학염색과 TUNEL 염색으로 fas와 fas ligand의 발현과 세포자멸사를 관찰하였다. 대조군과 비교하여 fas ligand의 발현은 낮고 fas는 높으며 세포자멸사는 증가한 것으로 나타났고, 이러한 세포자멸사와 fas, fas ligand 발현의 변화가 자간전증의 발병기전에 영향을 미칠 것이라고 하였다. 저자들은 자궁내 발달지연 태반에서 세포자멸사가 증가하기 때문에 자간전증과 같은 fas와 fas ligand의 발현의 변화가 동반될 수 있을 것이라고 생각하였다. 그러나 RT-PCR 방법으로 fas와 fas ligand의 발현을 보고 반정량한 결과, 자궁내 발달지연 태반과 정상 말기임신 태반 간에 통계학적으로 유의한 차이를 관찰하지 못하였다.

이상의 결과를 요약하면 telomerase 활성도와 MIB-1 염색을 통한 세포증식력 비교에서 자궁내 발달지연 태반은 정상 말기임신 태반보다 더 낮은 증식력을 보였다. 따라서 자궁내 발달지연

임신 태반에서 정상 말기임신 태반보다 세포증식력이 감소하기 때문에 태반의 크기가 작아지고 세포 수가 감소하는 것으로 생각된다. 세포자멸사에 관여하는 인자인 fas와 fas ligand 발현은 자궁내 발달지연 태반과 정상 말기임신 태반 사이에 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 세포자멸사는 여러 인자가 복합적으로 작용하는 과정이며 아마도 자궁내 발달지연 태반에서의 세포자멸사의 증가에는 fas와 fas ligand 이외에 다른 인자가 더 관여하리라고 생각된다. 정상태반의 세포자멸사에서 bcl-2와 bax 비의 변화와 TNF- $\alpha$ 가 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.<sup>16</sup> 앞으로는 이와 같은 인자에 대한 활발한 연구가 자궁내 발달지연 태반에서 이루어질 것으로 예상된다.

## 참고문헌

1. Cho JS, Kang YS, Moon IG, *et al.* Telomerase activity and expression of MIB-1 and bcl-2 in human chorionic villi from early and term normal pregnancy. Korean J Pathol 2000; 34: 927-33.
2. Teasdale F. Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta. Placenta 1984; 5: 83-92.
3. Izutsu T, Kudo T, Sato T, Nishiya I, Ohyashiki K, Nakagawara K. Telomerase and proliferative activity in placenta from women with and without fetal growth restriction. Obstet Gynecol 1999; 93: 124-9.
4. Kudo T, Izutsu T, Sato T. Telomerase activity and apoptosis as indicators of aging in placenta with and without intrauterine growth retardation. Placenta 2000; 21: 493-500.
5. Smith SC, Price E, Hewitt MJ, Symonds EM, Baker PN. Cellular proliferation in the placenta in normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction. J Soc Gynecol Investig 1998; 5: 317-23.
6. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.
7. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1997; 177: 57-65.
8. Axt R, Kordina AC, Meyberg R, Reitnauer K, Mink D, Schmidt W. Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. Clin Exp Obstet Gynecol 1999; 26: 195-8.
9. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science 1995; 270: 1189-92.
10. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD 95 ligand in preventing graft rejection. Nature 1995; 377: 630-2.
11. Bamberger AM, Schulte HM, Thuncke I, Erdmann I, Bamberger

- CM, Asa SL. Expression of the apoptosis -inducing Fas ligand (FASL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrine Metab* 1997; 82: 3173-5.
12. Koenig JM, Chegini N. Enhanced expression of fas-associated proteins in decidual and trophoblastic tissues in pregnancy-induced hypertension. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 347-9.
13. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 271-6.
14. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1395-401.
15. Wigglesworth. The placenta in perinatal pathology In: *Perinatal pathology*. 2nd ed. MPP 15, Philadelphia: WB Saunders, 1996; 48-77.
16. Lea RG, Riley SC, Antipatis C, *et al.* Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42: 100-9.
17. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
18. Cheung AN, Zhang DK, Liu Y, Ngan HY, Shen DH, Tsao SW. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease. *J Clin Pathol* 1999; 52: 588-92.
19. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, *et al.* Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 498-503.
20. Izutsu T, Kudo T, Sato T, *et al.* Telomerase activity in human chorionic villi and placenta determined by TRAP and in situ TRAP assay. *Placenta* 1998; 19: 613-8.
21. Cattoretti G, Becker MH, Key G, *et al.* Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.
22. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 1998; 19: 21-6.
23. Guller S, LaChapelle L. The role of placental fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 39-44.