

자간전증 태반에서의 Norepinephrine Transporter(NET) 발현

나규환¹ · 이현정² · 정지은¹ · 김기진^{1,*}

¹차의과학대학교 의생명과학과, ²차바이오펜디오스텍 CHA 줄기세포연구소

Expressions of Norepinephrine Transporter in Pre-eclamptic Placenta

Kyu-Hwan-Na¹, Hyun-Jung Lee², Jieun Jung¹ and Gi Jin Kim^{1,*}

¹Dept. of Biomedical Science, CHA University, Seoul 135-097, Korea

²Chabio & Diostech Co., Ltd., CHA Stem Cell Institute, Seoul 135-907, Korea

ABSTRACT : Placenta has been shown to be a site of expression of several of the monoamine membrane uptake transporters. However, the correlation between the expressions of norepinephrine transporter (NET) and placental development including gynecological diseases is still unknown. To investigate the expression and functions of NET in placenta, we conducted to compare NET expression in normal and preeclamptic placenta and analyzed the function of NET in HTR8-SV/neo trophoblast cells after NET gene transfection. The expression of NET was analyzed in placental tissues from the following groups of patients (none underwent labor): 1) term normal placenta (n=15); 2) term with preeclamptic placenta (n=15); and 3) pre-term with preeclamptic placenta (n=11) using semi-quantitative RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot. In order to evaluate the function of NET, NET gene plasmid and NET gene-specific siRNA were transduced into HTR-8/SVneo trophoblast cells for 24 hours. NET had low expression in the pre-eclamptic placenta compare with normal placenta but no difference in western blot data. NET was expressed in the trophoblasts, and the up-regulation of NET gene stimulated the invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells by 2.5 fold ($p<0.05$), whereas the NET-siRNA treatment reduced invasion rates. Also, we observed that the expression of NET induces to expression and activity of MMP-9 in HTR-8/SVneo trophoblast cells in zymography. The results suggest that the expression of NET were reduced in pre-eclampsia and should be inhibited invasion activity of trophoblasts. Therefore, these findings provide useful guidelines for the mechanisms of trophoblast invasion as well as for the basic understanding of gynecological diseases including pre-eclampsia.

Key words : Norepinephrine transporter, Placenta, Pre-eclampsia, Trophoblast, Invasion.

요 약 : 지금까지 태반에서 monoamine들을 재 흡수할 수 있는 몇 가지 membrane transporter들이 발현됨이 보고되었다. 그러나 카테콜라민 트랜스포터(norepinephrine transporter, NET)의 발현과 부인과 질환을 포함한 태반 발달과의 연관성에 관한 연구는 거의 보고된 것이 없다. 본 연구의 목적은 태반에서 NET의 발현을 동정하고, 그 기능을 알아보고자 하였다. 이를 위해 정상과 자간전증(preeclampsia) 태반에서 각각 NET 단백질을 동정하고, 영양막세포주인 HTR8-SV/neo 영양막 세포에 NET 유전자를 주입 후 그 기능을 분석하였다. NET 발현을 분석하고자 태반조직에서 다음과 같이 환자를 분류하여 semi-quantitative RT-PCR과 면역조직화학 방법을 사용하였다. 분만 고통이 없는 산모의 태반을 중심으로(none underwent labor): 1) 만기 정상 태반(term normal placenta)(n=15); 2) 만기 자간전증 태반(term with preeclamptic placenta)(n=15); 3) 중기 자간전증 태반(pre-term preeclamptic placenta)(n=11)을 수집하여, NET 발현을 RNA 수준에서 분석한 결과, mRNA 분석에서는 NET 유전자가 정상 태반 조직보다 자간전증 태반에서 낮게 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 Western blot을 통한 NET 단백질의 변화는 거의 없는 것으로 확인되었다. HTR8-SV/neo 영양막세포를 이용하여, NET 유전자의 기능을 알아보고자 NET 유전자의 플라스미드(a plasmid vector for NET gene)와 siRNA(NET gene-specific siRNA)을

HTR8-SV/neo 영양막 세포에 24시간 동안 각각 핵 내 주입하고, NET 유전자 발현에 따른 침윤은 NET 유전자를 증가시킨 경우 대조군보다 2.5배($p<0.05$) 촉진시키는 것으로 확인되었으며, NET 유전자를 감소시킨 경우는 침윤

* 교신저자: 서울특별시 강남구 역삼동 606-16번지 차의과학대학교 의생명과학부. (우) 135-097, (전) 02-3468-3687, (팩) 02-538-4102, E-mail: gjkim@cha.ac.kr

능력이 감소하는 경향이 관찰되었다. 또한 NET의 과도한 고발현 또는 저발현은 MMP-2와 MMP-9 발현과 활성을 저해하는 것이 관찰하였다. 따라서 자간전증에서 NET의 발현 감소는 영양막세포의 침윤능력을 억제하는 요인이 될 수 있다. 그러므로 이러한 결과들은 영양막세포의 침윤 기전뿐만 아니라 자간전증을 포함한 부인과 질환의 기초 연구에 지침을 제공할 것이다.

서 론

자간전증(preeclampsia)은 임신 중반 이후 산모에게서 나타나는 고혈압, 단백뇨, 그리고 부종 등을 통하여 진단되며, 이는 전체 임신부의 약 5% 이상의 발현빈도를 나타내는 산모와 신생아의 사망률이 높은 대표적인 고위험 산과 질환이다(Manyonda et al., 1998). 현재까지 알려진 자간전증 관련 병인학적 원인은 임신 초기 유전적인 요인, 산모의 면역학적 요인, 낮은 산소 분압과 같은 외부 환경적인 요인 등으로 구분될 수 있으며, 이러한 요인들로 인해 태반의 기능 저하에 따른 혈관 내피세포의 기능 저하, 그리고 영양막세포(trophoblast)의 세포사멸(apoptosis)과 세포증식(proliferation) 간의 불균형 등에 의해 자간전증이 유발된다고 알려져 있다(Benischke & Kaufmann, 2000; Roberts & Cooper, 2001). 또한, 대표적인 가설로 임신 초기 착상 이후 융모외성 세포 영양막세포(extravillous cytotrophoblast)의 침윤이 모체 동맥으로 정상적으로 이뤄지지 않게 되면, 모체 나선동맥(spiral arteries)의 혈관 내피의 확장이 불충분하게 이루어지면서, 태반을 통한 태아와 모체간의 혈액 교환, 영양공급과 가스교환 활동 등을 저해하게 되어, 자간전증을 유발하는 요인이 된다(Benischke & Kaufmann, 2000; Brosens, 1977; Ilekiş et al., 2007). 이처럼, 자간전증에서 영양막세포의 침윤에 의한 혈관 내피세포의 기능 부전(vascular endothelial dysfunction)이 주요한 원인이라고 간주하고 있다(Granger et al., 2001; Roberts et al., 1989). 특히, 자간전증의 대표적 증상인 고혈압은 말초혈관 수축으로 인해 혈압이 상승하게 되는데, 이 말초혈관 수축에 주요한 영향을 주는 병리생리학적 인자는 교감신경계의 신경전달 물질인 카테콜라아민으로, 임신 동안 노르에피네프린(norepinephrine, NE)은 다른 카테콜라민보다 혈중 농도가 높게 발현되는 것이 자간전증을 포함한 여러 부인과 질환 등에서 확인되었다(Manyonda et al., 1998; Schobel et al., 1996). 카테콜라민 트랜스포터(norepinephrine transporter, NET)은 뉴런(neuron)의 시냅스 막(synaptic membrane)에 존재하여 주로 노르에피네프린에 대해 재흡수(re-

uptake)를 하여 시냅스 기전 부위의 농도를 조절하는 역할을 한다(Mao et al., 2004). 이러한, 신경전달 물질 및 트랜스포터는 뇌 조직뿐 아니라 인간 태반에서도 발현됨이 보고되었다(Balkovetz et al., 1989; Hayer-Zillgen et al., 2002; Prasad et al., 1996; Ramamoorthy et al., 1993). 인간 태반에서 발현된 카테콜라민 트랜스포터는 태반 내 세포의 공간(extracellular space)에서 노르에피네프린의 재흡수(re-uptake)를 통해 그 농도를 조절한다(Jayanthi et al., 1993; Ramamoorthy et al., 1993). 이러한 트랜스포터들을 통해 카테콜라민의 농도가 조절됨으로써, 태아순환(fetal circulation)과 태반의 대사기능(metabolic function)을 정상으로 유지시키는 것으로 보고되었다(Bzoskie et al., 1995). 이러한 보고들을 통하여 카테콜라민 트랜스포터인 NET의 발현 변화는 영양막세포의 침윤뿐 아니라 정상적인 태반의 발달에 중요한 역할을 할 것으로 예측이 되어, 본 연구는 정상 태반과 자간전증 태반에서 NET 유전자의 발현과 단백질 발현을 확인하고, 인간 영양막세포주(human extravillous trophoblast cell line)인 HTR8-SV/neo cell를 이용하여 NET 유전자 발현 양상에 따른 영양막세포의 침윤 능력을 확인하고자 하였다. 또한 NET 유전자 발현 조절에 따른 침윤관련 분비단백질인 matrix metalloproteinase (MMP)-2와 -9의 발현 정도를 각각 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 태반조직 채취

본 연구는 성광의료재단 내 차병원 임상시험심사위원회로부터 IRB 승인(승인 번호: 2006-12)을 받아 시행되었고, 사용된 태반은 차의과학대학교 강남 차병원 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 중

기 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 기저막 부위까지 포함한 중심 부위를 채취하여 RNA와 단백질 분석을 위해 액체질소에 급속냉동 후 -80°C 에 보관하였고, 면역형광분석을 위해서 태반조직을 OCT compound(SACURA, Tokyo, Japan)를 이용하여 동결시킨 후 -80°C 에 보관하였다.

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

임신 초기 영양막세포주인 HTR-8/SVneo trophoblast cells은 Dr. Charles H. Graham(Queen's University, 캐나다)로부터 제공되었고, 100 U/ml penicillin and streptomycin (Gibco BRL, Logan, UT, USA)와 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Logan, UT, USA)가 첨가된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Logan, UT, USA)에서 37°C 온도에서 5%의 CO_2 가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 세포가 약 80~90% 정도의 confluence로 자랐을 때 0.05%의 trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 TrypLE Express 용액(Gibco BRL, Logan, UT, USA)으로 2분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 계대배양을 실시하였다.

3. 영양막세포주에서의 NET Plasmid와 siRNA Transfection

pcDNA3.1/V5 발현 벡터에 클로닝된 NET 플라스미드는 하버드의대 김광수 교수로부터 제공되었고, HTR-8/SVneo trophoblast cell이 50~60% 자랐을 때 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 transfection시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 반면, NET 유전자의 기능을 제거한 후 영향을 분석하고자 NET siRNA duplex(NET-siRNA, Bioneer, Daejeon, South Korea)를 음성 대조군과 함께 영양막세포주에 24시간 동안 transfection시킨 후 각 세포들을 회수하였다. siRNA를 위한 NET 염기서열은 5'-GAUUUCGUGACUGUAGUUU-3'(sense)와 5'-AAACU-ACAGUCACGAAAUC-3'(antisense)를 사용하였고, 음성 대조군에 대한 siRNA 염기서열은 5'-CCUACGCCACCA-AUUUCGU-3'(sense)와 5'-ACGAAAUUGGUGGCGUA-GG-3'(antisense)를 사용하였다.

4. 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)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 특히, 태반의 경우 -80°C 에 보관한 태반 조직을 액체질소를 이용하여 막자사발로 파쇄한 후 TRIzol reagent를 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, Carlsbad, CA, USA), DEPC-D.W.(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 등을 이용하여 65°C 에서 5분간 반응시키고, 5X first-strand buffer, 0.1 M DTT, RNase-out, 그리고 superscript III RT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가한 후 50°C 에서 1시간, 72°C 에서 15분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 인간 카테콜라민 트랜스포터 특이적인 프라이머와 H-Taq polymerase kit(Solgent, Taejeon, Korea)를 이용하였고, 카테콜라민 트랜스포터 프라이머는 5'-TGAAGACATCAGGAAAGGTGGTG-3'(sense)와 5'-CAATCAATACTCCAAATCCAGCCC-3'(antisense)를 사용하였고, 대조군으로 사용된 28s rRNA 프라이머 염기서열은 5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'(sense)와 5'-ACATTGTTCCAACATGCCAG-3'(antisense)으로 이용하여 Semi-quantitative RT-PCR을 실시하였다. 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 발현 차이를 규명하기 위하여, 각 밴드의 intensity를 Quantity One program(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 유전자의 발현량을 측정하였고, 정상적인 세포에서 일정하게 발현되는 28s rRNA 유전자를 함께 증폭하여 28s rRNA의 발현을 기준으로 각 그룹별 발현 정도를 정량화하여 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다.

5. 세포 침윤 분석

세포 침윤 분석은 24-well cell culture insert system(8 μm pore size; Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA)을 이용하여, 상위 insert에 각 well당 2.5×10^4 개의 세포들을 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 면봉을 이용하여 insert 위에 남아 있는 영양막 세포들을 제거하고, 영양막 세포의 침윤이 이루어진 insert의 아래 부분을 메탄올을 이용하여 고정한 후 Mayer's hematoxylin(Dako, CA, USA)으로 핵 염색을 실시하였고, 염색된 세포의 수를 계수하여 침윤 정도를 분석하였다.

6. 면역형광염색법을 이용한 NET 발현 분석

10 μm 두께로 냉동 절편한 태반조직을 찬 메탄올로 10분간 고정하고, PBS 용액으로 수세한 태반 조직에 blocking solution(Dako, CA, USA)을 이용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 anti-NET 항체(1:100 희석, Chemicon, Temecula, CA, USA)를 조직에 떨어뜨린 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 PBS 용액으로 수세 후 fluorescein isothiocyanate-conjugated 이차 항체(Alexa Fluoro 568, 1:400 희석, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS 용액으로 수세하였다. 그리고 핵 대조 염색을 위하여 DAPI를 함유한 봉입 용액(Dako, CA, USA)을 이용하여 봉입한 후 형광현미경(Axioskop2, Carl Zeiss Microimaging, Germany)을 이용하여 NET 발현을 분석하였다.

7. Western Blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

태반조직은 막자사발과 sonicator를 이용하여 파쇄하였다. 대조군 세포와 NET가 도입된 세포는 PBS 용액(Gibco BRL, Logan, UT, USA)으로 세척하고, 0.05%의 trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 TrypLE Express 용액(Gibco BRL, BRL, Logan, UT, USA)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 μg 의 단백질은 95°C의 온도에서 5분 동안 반응시킨 후, 10% SDS-PAGE를 통해 전기영

동시켜 PVDF membrane(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 transfer하였다. Membrane은 5%의 탈지분유(BD, Sparks, MD, USA)에 담아 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 anti-NET(1:2,000)와 anti-actin(1:5,000 희석; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 등을 첨가하여 4°C 냉장에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit(1:3,000 희석)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 또는 mouse(1:10,000 희석)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 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.

8. Gelatin Zymography 분석

NET-pcDNA와 NET-siRNA transfection에 따른 HTR-8/SVneo 영양막세포주에서의 MMPs 활성도를 분석하고자 zymography를 실시하였다. 2×10^5 개의 세포를 6-well culture dish에 각각 분주하여 24시간 동안 배양한 후 그 배양액을 회수하였다. 회수된 배양액 30 μl 씩을 1 mg/ml 농도의 젤라틴(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 함유한 12% SDS-PAGE 젤에 로딩하여 전기영동하였다. 전기영동 후 젤을 renaturation buffer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 용액을 이용하여 15분씩 2회 수세하였고, 증류수로 간단히 수세한 후 development buffer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후, 젤은 Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 용액으로 실온에서 1시간 동안 염색을 실시하였고, 탈색 용액(10% acetic acid/40% methanol)을 이용하여 밴드가 나타날 때까지 탈색시킨 후 건조하여 밴드의 투명도에 따른 MMPs의 활성화 정도를 분석하였다.

9. 통계

RT-PCR 반응 후 정상 태반과 자간전증 태반에서의 NET 발현 정도는 Student's *t*-test를 통해 검증하였으며, $p < 0.001$ 이 됐을 때 통계적으로 유의하다고 판정하였고, NET plasmids transfection 후 실험군과 대조군의 세포 수의 변화 등은 SAS 통계 프로그램과 Analysis of Variance(ANOVA) 프로그램을 이용하여 tukey's multiple comparison test 혹은 Scheffe's multiple comparison test로 검증하였으며, $p < 0.05$

이 되었을 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 태반 조직 내 NET mRNA 의 발현 분석

태반 내에서의 NET RNA 발현을 분석하기 위하여 정상 태반(n=15), 중기 자간전증 태반(n=11), 그리고 말기 자간전증 태반(n=15)을 이용하여, 태반의 중앙 부위와 주변 부위를 구분하였고, 태아쪽 용모막(chorionic membrane)을 포함하여 태반의 산모 쪽 부위인 탈락막까지 조직을 회수하여 28S rRNA 발현량을 기준으로 semi-quantitative RT-PCR 분석을 실시하였다. 태반의 중앙 부위에서의 NET mRNA 발현은 정상 태반조직과 각 자간전증 태반 조직 모두에서 통계학적 유의성이 관찰되었으나($p > 0.001$, Fig. 1A), 태반의 주변 부위에서의 NET mRNA 발현은 정상 태반보다 중기 자간전증 태반에서의 발현 양상이 현저하게 감소되었으며, 통계학적 유의성이 관찰되었다($p < 0.001$, Fig. 1B). 그러나, 말기 자간전증 태반에서의 NET RNA 발현은 다시 감소되는 결과가 관찰되었으나, 정상 태반과의 비교에서는 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

2. 태반 조직 내에서의 NET의 발현 분석

NET 항체를 이용하여 태반 조직 내에서의 NET 단백질 발현을 Western blot과 면역형광염색법을 이용하여 분석한 결과, 중앙 부위와 주변 부위를 포함하여 정상 태반과 자간전증 태반간의 NET 단백질 발현의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 면역형광염색법을 이용한 NET 발현은 정상 태반의 세포영양막 세포에서 관찰되었고, 정상 태반보다 자간전증 태반에서 NET 발현이 일부 감소되는 양상이 관찰되었다(Fig. 2B).

3. NET Transfection과 siRNA에 의한 영양막 세포주에서의 NET 발현

NET plasmid를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 HTR-8/SVneo 영양막 세포주로 24시간 동안 transfection시킨 후 NET mRNA를 분석한 결과, NET plasmid를 transfection 시키지 않은 음성 대조군에서도 약한 NET mRNA 발현이 관찰되었으나, NET plasmid의 농도의 증가에 따라 NET mRNA 발현 NET 단백질량은 증가됨을 관찰할 수 있었고,

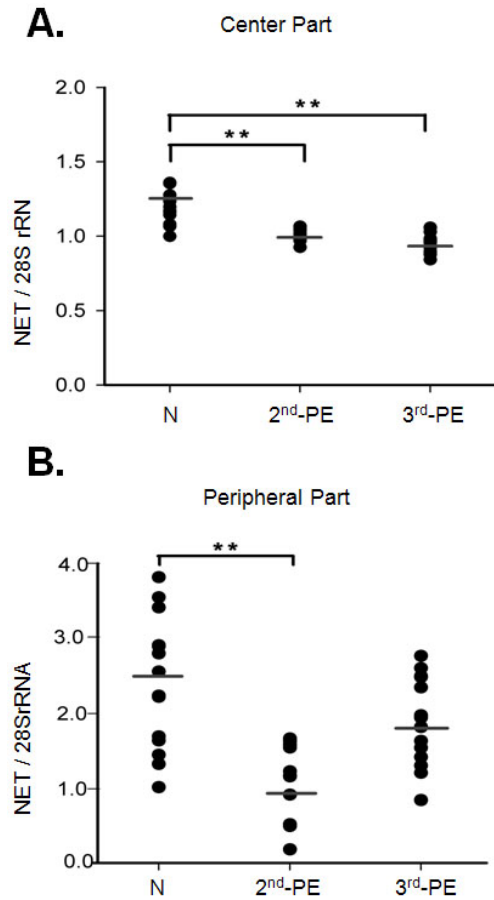


Fig. 1. Expressions of norepinephrine transporter (NET) gene in normal and preeclamptic placenta using semi-quantitative RT-PCR. (A) NET mRNA expression at center part in placental tissues. Both 2nd-PE and 3rd-PE, the expression levels of NET mRNA are more significantly reduced in preeclamptic placenta than normal placenta. (B) NET mRNA expression at center part in placental tissues. In 2nd-PE, the expression levels of NET mRNA are more significantly reduced in preeclamptic placenta than normal placenta. NET mRNA expressions were normalized to the amount of 28S rRNA and presented a dot plot. The expression levels of center and peripheral part are more significantly reduced in preeclamptic placenta than normal placenta. Significant difference are indicated by **, $p < 0.001$.

1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 강한 발현이 관찰되었다(Fig. 3A). 또한, NET-siRNA를 실시한 결과, 50 pmole 농도에서 NET mRNA와 NET 단백질량은 현저히 감소되었다(Fig. 3B).

한편, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상의 NET plasmid가 영양막 세포

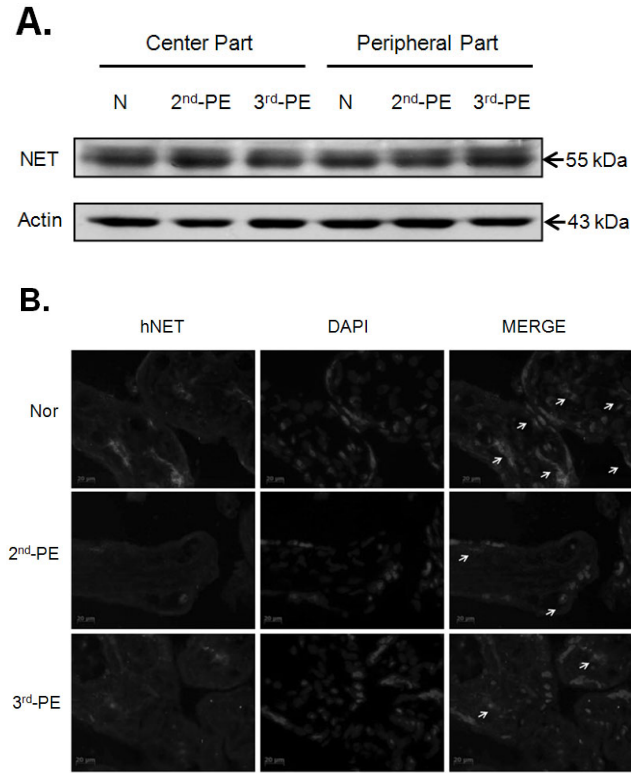


Fig. 2. Expressions of norepinephrine transporter (NET) protein in normal and preeclamptic placenta. (A) NET expression in normal and preeclamptic placenta using Western blot. Actin was used as a internal control. (B) Expression of NET in normal and preeclamptic placental tissues using immunofluorescence. Arrow means NET positive cells. Nucleus: DAPI. Magnification $\times 400$.

주로 transfection되면 영양막세포의 증식이 통계학적으로 유의성 있게 억제되는 것이 관찰되었으나($p < 0.05$, Fig. 3C), NET-siRNA의 경우, 50 pmole 농도에서도 영양막 세포의 증식에는 영향 없음이 관찰되었다(Fig. 3D).

4. NET Transfection과 siRNA에 의한 영양막세포의 침윤성 분석

NET 발현에 따른 영양막 세포의 침윤성을 분석한 결과, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 NET plasmid를 영양막 세포주에 transfection시킨 그룹에서의 영양막 세포의 침윤성은 통계학적으로 유의성 있게 증가되었다($p < 0.05$, Fig. 4A). 반면, NET 발현을 억제한 NET-siRNA의 경우 영양막 세포의 침윤성 감소는 50 pmole에서 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 4B).

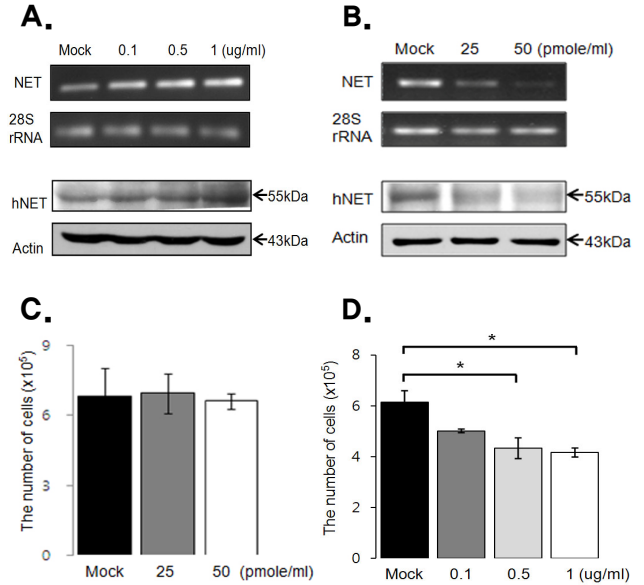


Fig. 3. Viability of HTR-8/SVneo cells depends on NET expression. (A) Expressions of NET in HTR8-SV-neo trophoblast cells with transfection of vector containing pcDNA of NET or empty vector using RT-PCR (upper) and Western blot analysis (lower). (B) Expression of NET in HTR8-SV/neo trophoblast cells by siRNA targeting NET or scramble sequence using RT-PCR (upper) and Western blot (lower). (C) Viability in HTR8-SV/neo cells after transfection of NET-pcDNA dose-dependent manner for 24 hours. Cell viability was significantly reduced at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and 1.0 $\mu\text{g/ml}$ concentration of pcDNA-NET. (D) Viability in HTR8-SV/neo cells after transfection of siRNA-NET. Columns, average value for three independent experiments. Bars, SE. Significant difference are indicated by *, $p < 0.05$.

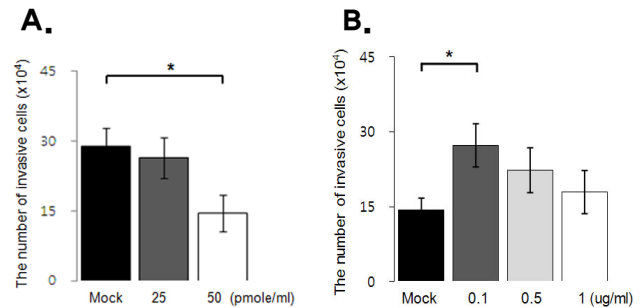


Fig. 4. Invasion analysis of HTR8-SV/neo cells depends on NET expression. (A) Invasion activity of HTR8-SV/neo cells with transfection depends on the concentration for pcDNA-NET. (B) Invasion activity of HTR8-SV/neo cells by the concentration of siRNA-NET. Columns in the graph are the diagram of the count analysis. Bars, SE. Significant difference are indicated by *, $p < 0.05$.

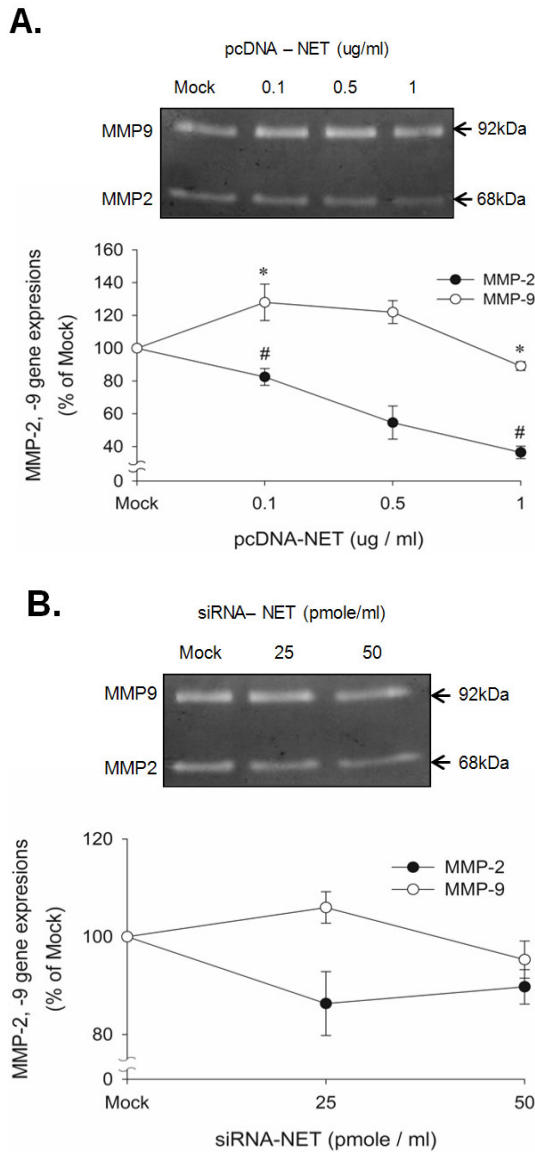


Fig. 5. Expressions of MMP-2 and MMP-9 in conditioned medium from modulation of NET activity. (A) MMP-2 and MMP-9 activities with transfection depends on the concentration for pcDNA-NET. (B) MMP-2 and MMP-9 activities by the concentration of siRNA-NET. SE. Significant difference are indicated by *, $p < 0.05$.

5. NET 발현 양상에 따른 MMPs 발현 분석

NET plasmid transfection과 NET-siRNA를 통한 NET 발현에 따른 영양막 세포의 침윤성을 비교 분석한 결과, NET 발현이 영양막 세포의 침윤을 유발시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 영양막 세포의 침윤 조절에 중요한 요인인 MMP-2와 MMP-9의 활성도를 zymography 방

법을 이용하여 분석한 결과, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 NET plasmid를 transfection 시킨 그룹에서 MMP-9의 발현이 대조군 대비 통계학적으로 유의성 있게 증가되는 반면, MMP-2의 발현은 감소되는 것이 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 5A). 또한, 고농도(1 $\mu\text{g/ml}$)의 NET plasmid를 transfection 시킨 그룹에서는 MMP-2와 MMP-9 모두 활성이 감소됨이 관찰되었다. 반면, NET-siRNA 그룹에서는 50 pmole siRNA 농도에서 MMP-2와 MMP-9의 발현의 감소가 관찰되었으나, 통계학적으로 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 5B).

고 찰

태반은 임신기간 동안 태아 발달에 중요한 역할을 하는 기관으로, 태반 발달과정에서의 다양한 유전자들의 발현 조절은 태반과 태아의 발달과 연결되므로, 태반 내 유전자 발현의 비정상적인 변화는 태아의 발달에 영향을 줄 뿐 아니라 다양한 산과질환으로 진행될 수 있다(Roberts & Von Versen-Hoeyneck, 2007). 이러한, 태반의 발달에 중요한 역할을 하는 대표적인 세포로는 영양막세포가 존재하는데, 이 세포들은 임신 초기 착상시기부터 임신 기간 동안 태반의 발달에 이르기까지 지속적인 증식, 분열, 분화, 세포사멸 등의 역동적인 단계를 거쳐 태반의 발달과 기능을 조절하는 중요한 역할을 한다(Jeschke et al., 2006; Moore & Persaud, 2008). 태반 발달과 관련된 대표적 산과질환으로 알려진 자간전증은 영양막세포가 모체의 관상동맥 내로의 침윤이 부적합하게 이루어짐으로써 혈관 내피세포의 기능이 떨어져 유발되는 대표적인 질환으로, 이로 인한 고혈압, 단백뇨, 그리고 부종 등을 유발한다(Dekker & Sibai, 1998). 이러한, 영양막세포의 침윤은 임신 초기 유발되는 저산소 조건(Hypoxia) 등에 의해 분비되는 다양한 인자들에 의해 활성화되어 조절되는 것으로 알려져 있으나, 정확한 기전 연구는 미흡한 상태이다(Cudihy & Lee, 2009; Knofler, 2010).

최근, 노르에피네프린(norepinephrine, NE)와 카테콜라민 트랜스포터(norepinephrine transporter, NET)이 고혈압, 자간전증, 그리고 우울증 등과 같은 다양한 질환에 관련된다고 보고되었다(Anderson et al., 1989; Bottalico et al., 2004; Klimek et al., 1997). 그러나, 태반 내에서 카테콜라민 트랜스포터와 관련된 자간전증의 생리학적, 병리학적 관련성에 대해서는 미흡한 실정이다. 다만, 카테콜라민 트랜스포가 태

반의 합포영양막세포(syncytiotrophoblast, sTB)의 세포막에 존재하면서 세포외성 카테콜라민(catecholamine) 농도를 조절함으로써, 태반 내 혈류의 항상성을 유지한다고 알려졌으며, 모체와 태아에서의 높은 카테콜라민 농도가 자간전증과 관련된다고 보고되었다(Ganapathy et al., 1993; Prasad et al., 1996; Ramamoorthy et al., 1993).

반면, 카테콜라민 트랜스포터(norepinephrine transporter, NET)는 카테콜라민(NE)의 재흡수에 관여하면서, 자간전증 산모의 혈액 내에는 낮은 농도로 존재한다고 보고되었다(Bottalico et al., 2004). 본 연구 결과에서도 정상 태반과 자간전증 태반에서 NET mRNA 발현 변화를 확인한 결과, 탯줄 중심에 가까이 위치한 부분(center part)과 가장자리 부분(peripheral part) 모두 자간전증 태반에서 NET mRNA 발현량이 적은 것을 확인하였다(Fig. 1). 그러나, 임신 중기 자간전증이 임신 말기 자간전증보다 그 증세가 심각하다고 알려져 있어 임신 중기 자간전증 태반에서 NET mRNA 발현 정도가 더 작을 것으로 예상했으나, 태반 중심부위 시료에서는 중기와 말기의 결과가 거의 유사하게 나왔다. 하지만 가장자리 부분에서는 중기 자간전증의 시료에서 가장 적은 발현되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 자간전증의 증세가 심각할수록 NET mRNA 발현량이 정상 임신에 비해 현저하게 떨어지는 것이라 판단되고, 태반의 위치에 따라 NET 발현의 차이가 있을 것으로 사료된다. 또한, 단백질 수준에서의 NET 발현은 모든 태반 조직에서 발현량의 변화가 미미한 것으로 관찰되었다. 그 이유는 NET 단백질은 세포의 막단백질(outer membrane protein)에서 글라이코실레이션(glycosylation)에 의해 세포막에 결합되어 그 기능을 수행하는데, 글라이코실레이션이 완벽하게 된 NET 단백질의 크기는 약 85 kDa이며, 글라이코실레이션이 되지 않은 단백질의 크기는 약 55 kDa (Melikian et al., 1996)로, 노르에피네프린(NE)은 산화적 스트레스를 통해서 PC12 세포주에서 NET의 글라이코실레이션을 감소시킨다고 보고되었고(Mao et al., 2005), 본 결과에서도 단백질의 변화가 거의 없는 원인으로 전사 후 글라이코실레이션이 정상적으로 이뤄지지 않은 것으로 사료된다. 그러나 면역형광법으로 확인한 결과, 정상 임신 시료보다 자간전증 시료에서 NET 단백질 발현 정도가 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

NET 유전자가 자간전증과 밀접하게 연관성을 보이고 있고, 발현하는 세포가 침윤 능력이 있는 영양막 세포라는 점을 연관시켰을 때 NET 유전자 발현을 조절하여 이 세포의

침윤 능력을 확인하고자, NET 유전자를 주입(pcDNA-NET transfection)시켰을 경우 침윤 능력이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고, knock-down(NET-siRNA)되면 침윤능력이 현저하게 떨어지는 것을 확인하였다(Fig. 4). HTR8-SV/neo 영양막 세포주의 침윤 능력이 NET 유전자 수준에 따라 달라지는 것은 침윤시 세포기질을 녹이는 역할을 하는 MMP-2, MMP-9의 발현 정도에서도, NET 유전자를 증가 시킨 경우 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MMP-2와 MMP-9의 발현 증가 양상을 보였고, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 오히려 통계학적으로 유의성 있게 감소되는 결과를 보였는데, 이는 고농도에 따른 세포 수 감소의 결과라 판단된다(Fig. 3C). 이러한 결과는 NET 유전자의 발현 정도에 따라 통계학적으로 유의성 있게 달라진 침윤능력으로 봤을 때 NET 유전자는 영양막 세포의 침윤 능력을 조절에 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다. 또한, *in-vitro* 침윤 실험의 결과들을 고려해 보면, NET 단백질은 NE를 제거(clearance)하는 역할을 하지만, 일정 수준 이상의 NET 발현은 침윤 관련 요소인 MMP-2와 MMP-9의 분비를 촉진하여 영양막 세포의 침윤능력을 높인다고 할 수 있다.

이상의 결과는 NET 유전자 발현이 태반 내 존재하는 영양막 세포의 침윤에 중요한 역할을 한다고 첫 보고로, 이는 자간전증의 예측 및 진단에 유용한 마커들이 부재한 상황에서 새로운 마커로서의 활용될 수 있다고 판단된다. 따라서, 향후 자간전증에서 NET 발현 저하의 이유와 NE와의 명확한 상관관계 그리고 침윤 능력 저하에 관련된 세포 신호 전달 기전 규명을 위한 연구들이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에서 사용된 임신 초기 영양막 세포주인 HTR-8/SVneo trophoblast cells와 pcDNA3.1/V5 발현 벡터에 클로닝된 NET 플라스미드를 제공해 주신 Dr. Charles H. Graham(Queen's University, 캐나다)과 하버드의대 김광수 교수께 감사를 드리며, 본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제 번호 A084923).

인용문헌

Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL (1989)

- Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 14:177-183.
- Balkovetz DF, Tirupathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V (1989) Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 264:2195-2198.
- Benischke K, Kaufmann P (2000) Pathology of the human placenta. New York: Springer-Verlag.
- Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K, Hansson SR (2004) Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 25:518-529.
- Brosens IA (1977) Morphological changes in the uteroplacental bed in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol* 4:573-593.
- Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Tseng YT, Hay WW, Jr., Padbury JF (1995) Placental norepinephrine clearance: *In vivo* measurement and physiological role. *Am J Physiol* 269:E145-149.
- Cudihy D, Lee RV (2009) The pathophysiology of pre-eclampsia: Current clinical concepts. *J Obstet Gynaecol* 29:576-582.
- Dekker GA, Sibai BM (1998) Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 179:1359-1375.
- Ganapathy V, Ramamoorthy S, Leibach FH (1993) Transport and metabolism of monoamines in the human placenta. *Placenta* 14:35-51.
- Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA (2001) Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 14:178S-185S.
- Hayer-Zillgen M, Bruss M, Bonisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136:829-836.
- Ilekis JV, Reddy UM, Roberts JM (2007) Preeclampsia--a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Reprod Sci* 14:508-523.
- Jayanthi LD, Prasad PD, Ramamoorthy S, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V (1993) Sodium- and chloride-dependent, cocaine-sensitive, high-affinity binding of nisoxetine to the human placental norepinephrine transporter. *Biochemistry* 32:12178-12185.
- Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, Kunze S, Kuhn C, Schulze S, Friese K, Mayr D (2006) 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* 25:354-360.
- Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, Meltzer HY, Kalka S, Dilley G, Ordway GA (1997) Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci* 17:8451-8458.
- Knofler M (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 54:269-280.
- Manyonda IT, Slater DM, Fenske C, Hole D, Choy MY, Wilson C (1998) A role for noradrenaline in pre-eclampsia: Towards a unifying hypothesis for the pathophysiology. *Br J Obstet Gynaecol* 105:641-648.
- Mao W, Iwai C, Qin F, Liang CS (2005) Norepinephrine induces endoplasmic reticulum stress and downregulation of norepinephrine transporter density in PC12 cells via oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2381-2389.
- Mao W, Qin F, Iwai C, Vulapalli R, Keng PC, Liang CS (2004) Extracellular norepinephrine reduces neuronal uptake of norepinephrine by oxidative stress in PC12 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H29-39.
- Melikian HE, Ramamoorthy S, Tate CG, Blakely RD (1996) Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recog-

- niton. *Mol Pharmacol* 50:266-276.
- Moore KL, Persaud TVN (2008) *The developing human-clinically orientated embryology*. Potland (OR): Elsevier Saunders.
- Prasad PD, Hoffmans BJ, Moe AJ, Smith CH, Leibach FH, Ganapathy V (1996) Functional expression of the plasma membrane serotonin transporter but not the vesicular monoamine transporter in human placental trophoblasts and choriocarcinoma cells. *Placenta* 17:201-207.
- Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V (1993) Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry* 32:1346-1353.
- Roberts JM, Cooper DW (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 357:53-56.
- Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989) Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161:1200-1204.
- Roberts JM, Von Versen-Hoeynck F (2007) Maternal fetal/placental interactions and abnormal pregnancy outcomes. *Hypertension* 49:15-16.
- Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE (1996) Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med* 335:1480-1485.
-
- (received 5 March 2010, received in revised form 25 April 2010, accepted 26 April 2010)