

말초혈액 자연살해세포 분획 및 세포용해 활성도 분석을 통한 습관성 유산 위험군의 진단적 유용성에 관한 연구

관동대학교 의과대학 제일병원 분자종양학연구소¹, 산부인과², 불임연구소³

최지영¹ 황수진¹ 한애라² 유지희² 박동욱³ 박찬우² 김혜옥² 차선화²
김진영² 송인옥² 궁미경² 강인수² 양광문^{2*}

Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion

Ji Young Choi¹, Su Jin Hwang¹, Ae Ra Han², Ji Hee Yoo², Dong Wook Park³, Chan Woo Park²,
Hye Ok Kim², Sun Hwa Cha², Jin Young Kim², In Ok Song², Mi Kyoung Koong²,
In Soo Kang², Kwang Moon Yang^{2*}

¹Laboratory of Molecular Oncology, Division of Reproductive Endocrinology & Infertility,

²Department of Obstetrics & Gynecology, ³Laboratory of Reproductive Biology and Infertility,
Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: To testify whether the increased peripheral blood natural killer (pbNK) cells fraction and their cytolytic activity could coincide with patient's history of recurrent spontaneous abortion (RSA) and to evaluate these factors are can be valuable diagnostic markers in RSA.

Methods: Women with a history of RSA comprised the patient group (n=35). Normal fertile women, who were experienced at least one healthy term birth without history of infertility or recurrent miscarriage, were included as the healthy control group (n=15). The pbNK cells of CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ and their cytolytic activities against K562 cells were measured by flow cytometry and the values were compared between study and control groups.

Results: Proportions of pbNK cells among peripheral blood monocytes (PBMC) (14.2±5.2 vs. 9.4±3.7%, p=0.002, 95% confidence interval [CI], 1.8 to 7.8) was significantly higher in the patient group. The odds ratio of having RSA history was increased as 8.4 folds (59% of sensitivity, 80% of specificity, and 95% CI: 2.0 to 35.8) in patients who showed pbNK cells fraction above 12.1% which was determined as cut-off value by using ROC curve analysis. The cytolytic activities of pbNK cells which measured by three different ratio of effector pbNK cells to target K562 cells and calculated by the percent of cytolytic K562 cells, were significantly higher in study group than that of control group (in 50:1 ratio, 48.3±19.0 vs. 31.3±11.9%, p=0.002; in 25:1 ratio, 37.0±18.1 vs. 20.2±9.2%, p<0.001; in 12.5:1 ratio, 23.5±12.7 vs. 12.4±7.3%, p=0.001). With the cut-off values of cytolytic activity of pbNK cells as 43.1% (50:1), 26.9% (25:1), and 17.4% (12.5:1) each, the risk of having RSA history was increased by 10.0, 11.4, and 15.0 folds in patients who had increased in each effector of pbNK to target of K562 cells ratio.

Conclusion: The analysis of pbNK cells fraction and their cytolytic activity can be valuable diagnostic markers for RSA. We are going to planning the large scaled studies which include the data of obstetric outcomes in subsequent pregnancies to clarify our results of this study.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(2): 115-124.]

Key Words: CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ peripheral blood natural killer cell, Flow cytometry, Cytolytic activity, Recurrent spontaneous abortion, Digosanitic markers

접수일: 2010년 5월 18일, 수정일: 2010년 6월 19일, 게재확정일: 2010년 6월 20일

주관책임자: 양광문, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과

Tel: (02) 2000-7545, Fax: (02) 2000-7790, e-mail: kmlyang@naver.com

습관성 유산 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 은 임신 20주 이전에 3번 이상 자연적으로 임신이 소실되는 경우를 말하며 전체 임신부의 약 1%의 빈도로 보고된다.¹ 저자들에 따라 2번 연속 자연 유산 시 습관성 유산으로 진단에 포함한다는 견해도 있으나,² 2회 연속 자연 유산이 습관성 유산의 정의에 포함되지는 않지만 특별한 경우 즉, 1) 유산 전 태아의 심박동이 관찰되었던 경우, 2) 임신 여성의 나이가 35세 이상인 경우, 3) 힘든 과정을 거쳐서 임신을 성공한 불임 부부 등의 경우에는 2회 이상의 연속 유산 시 습관성 유산의 임상적 진단을 위한 검사가 실시되어야 한다는 것이 일반적인 견해이다. 습관성 유산의 원인으로서는 태아의 염색체 이상이 2.6~7.7%, 모체의 해부학적 이상이 15.4~27%, 내분비학적 요인이 5.1~35%, 면역학적 요인이 40%, 원인불명이 30~50%를 차지하고 있다고 보고된 바 있으며,³ 이 중 자가항체에 기인한 자가면역과 다양한 면역세포의 역할에 기인한 동종면역의 기전으로 설명되는 면역학적 요인에 대한 관심이 최근 증가하고 있는 실정이다.

습관성 유산의 동종면역학적 기전에 관련된 면역세포는 자연살해세포 (natural killer cell, NK cell), T 세포 (T cell), B 세포 (B cell), 대식세포 (macrophage), 그리고 수지상세포 (dendritic cell) 등이 있으며 이들의 세포는 각각 고유의 역할을 담당하면서 상호 보완 또는 경쟁적으로 작용하여 반이소성 태아에 대한 모체의 면역 거부 및 면역 관용에 효과적인 역할을 수행한다.⁴ 임신 중 태아에 대한 모체의 면역에 관여하는 세포들 중 NK cell의 착상과 임신을 유지하는 과정에서의 역할에 대한 연구가 최근 비교적 활발히 이루어지고 있다. 특히, NK cell의 적절한 면역반응에 대한 조절을 실패는 습관성 유산, 불임 (infertility), 그리고 전자간증 (pre-eclampsia) 같은 병리학적 기전들과 관련이 있다고 보고되고 있으며,⁵⁻⁸ 특히, 근래에 습관성 유산의 원인과 관련하여 NK cell에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

말초혈액에서 NK cell (peripheral blood NK cell,

pbNK cell)은 대부분이 CD56, CD16 세포 표면 항원을 발현하고 강한 세포독성 (cytotoxicity)을 가지는 반면 CD56 세포 표면 항원은 강하게 발현하지만 CD16 세포 표면 항원은 발현하지 않는 자궁 내 NK cell (decidual NK cell, dNK)은 세포독성은 약하고 다양한 종류의 cytokine을 분비하는 특징을 가지는 것으로 보고되고 있다.^{9,10} 여러 문헌에 의하면, 정상 임신 초기에는 pbNK cell의 활성도와 분획은 감소하는 반면 습관성 유산 환자에서는 증가되어 있고, 임신을 확인하기 전에 측정된 경우 역시 습관성 유산의 경력이 있는 여성에서 pbNK cell의 비율이 높게 나타나 pbNK cell의 세포용해 활성도 또는 분획의 증가는 연속되는 임신에서 습관성 유산의 위험성을 증가시키는 원인으로 보고되었으며, 그 결과는 NK cell의 면역작용에 대한 성공적인 조절이 임신의 성공 및 유지에 중요한 요소라는 결론이 제시되었다.^{5-8,11,12} 한편, 유산이 진단된 유산산물의 탈락막 내에서 CD56⁺CD16⁻ 형태의 dNK cell이 높게 검출되어 dNK cell의 작용부위가 착상부위임을 보고하였으며,¹³ 결국 습관성 유산 및 착상 부전 등 NK cell에 의한 생식 부전의 진단에는 자궁 내의 NK cell의 세포용해 활성도와 분획의 분석이 정확한 진단에 도움이 될 것으로 여겨지지만 검체 채취의 윤리성과 검사방법의 어려움으로 연구 수행에 많은 제한이 있다. 따라서, 습관성 유산의 위험도를 진단의 방법으로 pbNK cell의 분획과 세포용해 활성도의 변화 등에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이다.

본 연구에서 저자들은 임신 전 말초혈액 내 CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ NK cell의 세포용해 활성도와 분획을 정상군과 습관성 유산의 기왕력을 가진 환자군으로 나누어 비교, 분석하고 습관성 유산의 위험도를 제시할 수 있는 임상적으로 유용한 cut-off value를 설정하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상군

본 연구는 전향적으로 진행된 연구로서 2010년 1월부터 4월까지 습관성 유산을 원인으로 본원 습관성 유산 클리닉을 방문한 습관성 유산의 기왕력이 있는 여성을 환자군 (n=35)으로 하였으며, 대조군은 불임이나 습관성 유산의 기왕력이 없으며 정상아의 출산 경험이 있는 건강한 여성을 대상으로 하였다 (n=15). 본 연구는 연구 시작 전 연구의 윤리적 타당성을 검증하기 위해 본원의 의학연구 심의위원회 (제일병원 의학연구 심의위원회)의 심의를 득하였다.

모든 환자군은 습관성 유산을 진단하기 위한 기본적인 검사 즉, 습관성 유산의 해부학적, 내분비적, 유전적 그리고 감염원인에 대한 검사가 시행되었으며, 자가면역원인에 대한 검사로 항인지질 항체 (anti-phospholipid antibody), 루프스 항응고 항체 (lupus anti-coagulant) 및 항갑상선 항체 (anti-thyroid antibody) 등에 대한 검사가 실시되었고, 동종면역원인을 진단하기 위해 말초혈액의 단핵세포군에 대한 pbNK cell의 분획 및 세포용해 활성화 등에 대한 검사를 실시하였다. 사전 검사 결과에 따라 해부학적, 유전적, 감염에 의한 유산의 기왕력이 있는 환자 및 자가항체가 양성 결과를 보인 환자들은 연구 대상에서 제외하였다.

2. CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ pbNK cell 분획 (fraction) 측정

각각의 환자로부터 말초혈액 10 mL을 채취하여 그 중 100 μ L의 전혈을 사용하였다. CD3, CD56 및 CD16 세포 표면 항원을 혈액세포에 단클론항체 (monoclonal antibody)를 이용하여 간접 형광 염색하여 유세포분석기 (FACS Calibur, Becton-Dickinson Co, San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 단클론항체는 CD3⁻FITC/CD56⁺CD16⁺PE를 사용하였다. 간접 형광 염색법에서는 모두 FITC-IgG1/PE-IgG2를 음성 대조형광물질로 사용하였다.

헤파린이 처리된 진공시험관에 채취한 전혈 100 μ L에 형광색소가 부착된 각각의 항체 10 μ L를 넣어준 후, 잘 혼합하여 4°C에서 20분간 반응시킨

다. 적혈구 용혈용액 1 mL을 넣고 잘 혼합하고 실온 암소에서 10분간 반응시켰다. 5분간 원심분리 (1,600 rpm)하여 상층액을 버리고 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액을 넣고 잘 섞어준 후 분석하였다. 결과 분석은 Cell Quest pro software (FACS Calibur)을 이용하여 림프구만을 gating (R1)한 후, 선별된 림프구들 중에서 CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ 부분만을 백분율 (CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ number/lymphocyte number \times 100)로 구하였다 (Figure 1A).

3. pbNK cell의 세포용해 활성화 측정

각각의 환자로부터 말초혈액 10 mL을 채취하여 Ficoll-hypaque gradient solution을 이용하여 림프구와 단핵세포층 (peripheral blood monocytes, PBMCs)을 분리하여 세척하였다. 수확한 PBMCs와 PKH2로 염색한 K562 세포주를 사용하였다. 림프구가 포함된 단핵세포층과 K562 세포를 함께 배양하였으며, 용혈된 표적세포는 propidium iodide dye (PI)를 이용하여 핵을 염색하여 유세포분석기를 사용하여 분석하였다.

헤파린이 처리된 진공시험관에 채취한 말초혈액 10 mL에서 PBMCs를 분리하고, 세포 수를 측정하였다. K562는 배양액으로 세척한 후, PKH2 염색약 1 μ L를 넣고 잘 섞어 1분간 반응시킨 후, 세포용해 활성화 분석용 K562 세포를 준비하였다. 세포용해 활성화도는 effector cell:target cell (E:T)의 비율을 50:1, 25:1, 그리고 12.5:1로 2시간 동안 PBMC와 K562 cell을 함께 반응시킨 후, PI로 1~5분간 염색한 후 분석하였다. 결과 분석은 Cell quest pro software를 이용하여 각각의 E:T 비율에서의 세포용해 활성화도 (K562 dead cell number/K562 whole cell number \times 100)를 계산하였다 (Figure 1B).

4. 통계적 분석

연구 결과는 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL USA) 통계 프로그램을 사용하여 분석하였다. 습관성 유산 환자군과 대조군 간의 비교를 위해 연

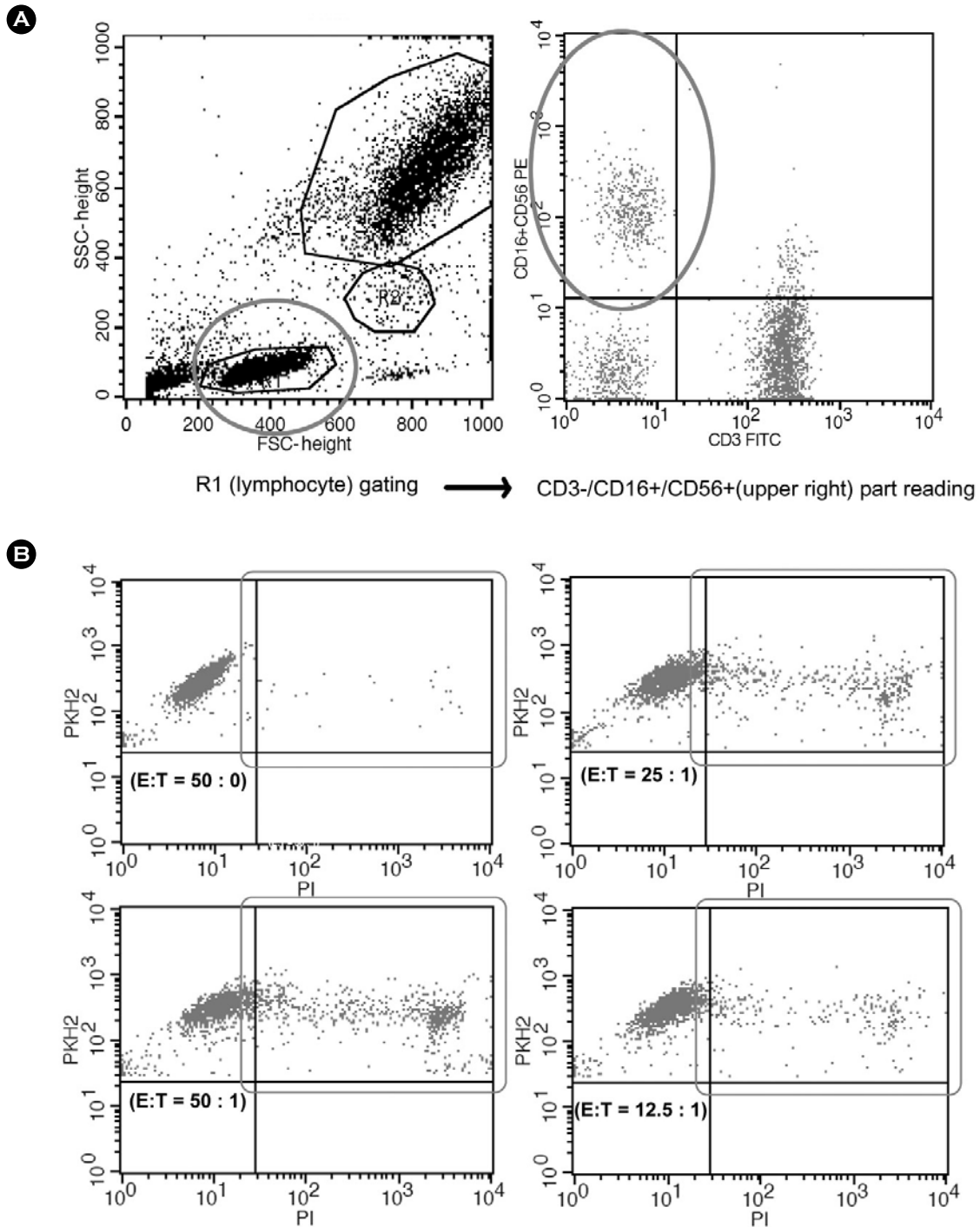


Figure 1. (A) Gating strategy for three-color flow cytometry evaluation of pbNK cell. Step1 describes analysis gate around Lymphocyte (R1), excluding cell debris. Step2 shows upper left region as $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ (B) Cytolytic activity of pbNK cell. Step1 describes analysis gate around K562 (target cell) live and dead cell, excluding cell debris. Step2 shows upper right region (cytolytic target cell) as cytolytic activity. pbNK cell, peripheral blood natural killer cell; SSC-height, Side scatter-height; FSC-height, Forward scatter-height; PI, propidium iodide dye; PKH2, Green fluorescent cell linker dye.

Ji Young Choi. Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion. Korean J Reprod Med 2010.

Table 1. Characteristics of patients with recurrent spontaneous abortion (RSA) and control

	RSA group	Control group	Significance
Age	35.4±3.1	35.5±3.5	NS
Mean number of gravidity	3.3±0.3	2.0±0.0	<i>p</i> =0.001
Mean delivery number of live birth*	0.3±0.6	1.6±0.8	<i>p</i> =0.000
Mean number of spontaneous abortion	2.9±0.3	0.0±0.0	<i>p</i> =0.000
Incidence of patients with having infertility history (%)	18.8	0	ND
Mean duration of infertility (mon)	21.3±7.6	ND	ND

*Pregnancies which sustained at least 26 gestational weeks.
Values are presented as mean ± SD.
NS, not significant; ND, not determined.

Ji Young Choi. Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion. Korean J Reprod Med 2010.

속변수의 비교는 t-test와 chi-square를 이용하였고, receiver operating characteristic curve (ROC curve) 분석을 통해서 cut-off value를 선정하였다. Cut-off value는 specificity에 중점을 두어, specificity는 90% 이상이면서 sensitivity가 높은 수치로 정하였다. 통계 분석 후 *p*값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의함으로 정의하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

습관성 유산 환자군과 대조군 간의 평균 나이는 차이가 없었으나, 임신력 (3.3 vs. 2.0), 생존 가능아 분만력 (0.3 vs. 1.6) 그리고 평균 자연유산 경험 횟수 (2.9 vs. 0.0) 등은 양군 간에 의미있는 차이를 보였다. 즉, 임신력 및 자연유산 횟수는 습관성 유산 환자군에서 유의하게 높은 반면 생존 가능아 분만력은 대조군에서 통계적으로 높은 결과를 나타내었다. 한편, 습관성 유산 환자군 중 불임의 진단 하에 불임 치료를 받는 경우는 약 18.8%의 빈도를 보였으며 이들의 불임 기간은 약 21.3개월로 조사되었다 (Table 1).

2. 말초혈액 내에서 CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ NK cell (pbNK cell) 분획 측정

습관성 유산 환자군에서 CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ pbNK cell의 분획이 정상 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 높음을 확인하였다 (14.2±5.2 vs. 9.4±3.7%, *p*=0.002, 95% CI: 1.8~7.8) (Figure 2A). 환자군과 대조군에서의 pbNK cell 분획에 대한 ROC curve를 분석하여 12.1% (59% of sensitivity, 80% of specificity)를 cut-off value로 정하였다 (Figure 3A). 그 결과 cut-off value에서 습관성 유산의 위험도가 환자군에서 8.4배 높아짐을 알 수 있었다 (95% CI: 2.0~35.8) (Table 2).

3. pbNK cell의 세포용해 활성화 측정

세포용해 활성화도는 습관성 유산 환자군이 정상 대조군에 비하여 각각의 E:T 비율에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났다 (50:1 ratio, 48.3±19.0 vs. 31.3±11.9%, *p*=0.002; 25:1 ratio, 37.0±18.1 vs. 20.2±9.2%, *p*<0.001; 12.5:1 ratio, 23.5±12.7 vs. 12.4±7.3%, *p*=0.001) (Figure 2B-2D).

환자군과 대조군에서 pbNK cell의 세포용해 활성화도에 대한 ROC curve를 분석하여 각각의 E:T 비율에서 43.1% (50:1, 50% of sensitivity, 91% of specificity),

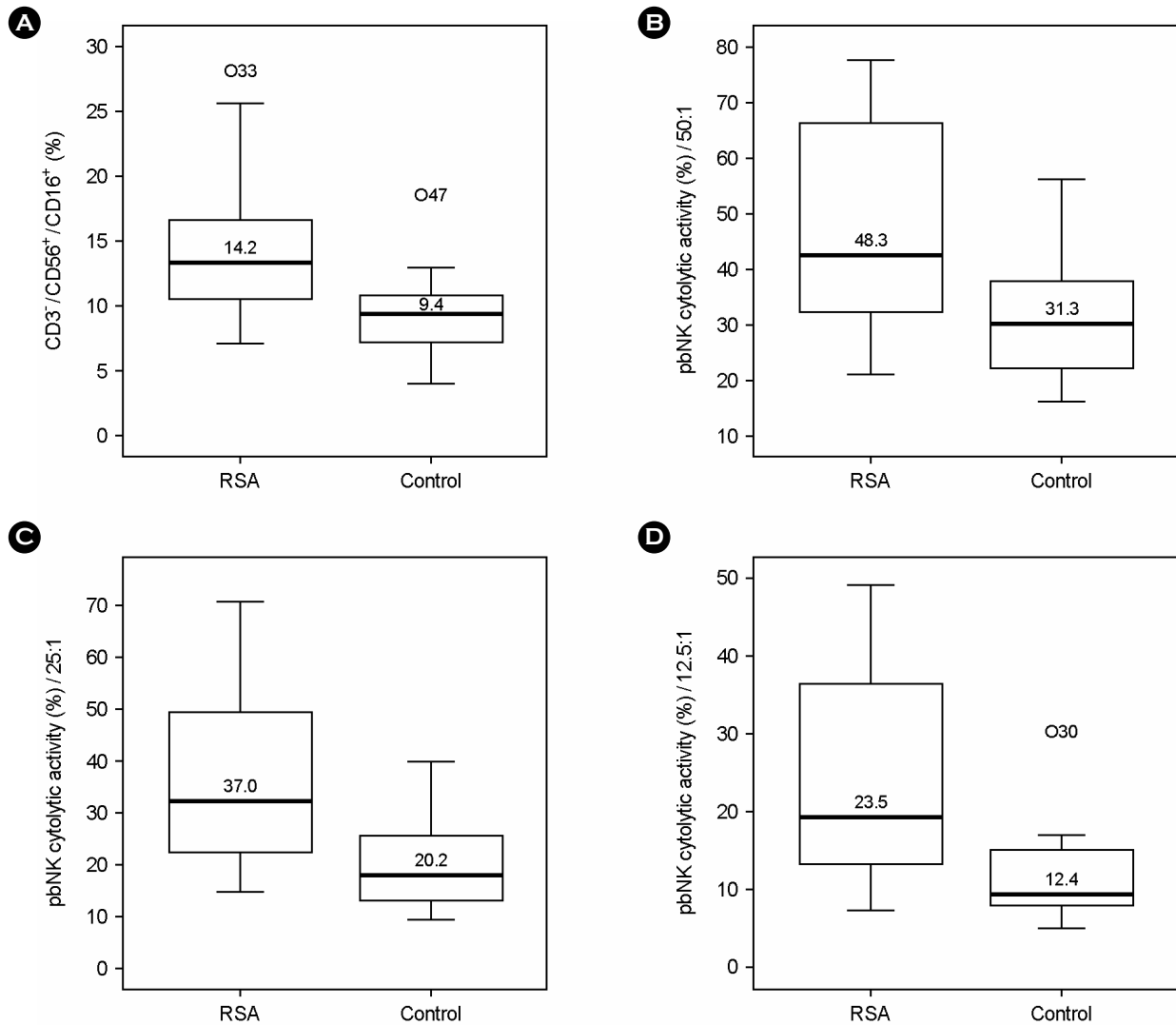


Figure 2. (A) Percentages of pbNK cell (CD3⁺/CD56⁺/CD16⁺) in RSA and control group. Cytolytic activity of pbNK cells in RSA and control group. E:T ratio is (B) 50:1, (C) 25:1, (D) 12.5:1, respectively. Bars indicate the lowest and highest reading and the shaded box depicts the 25, 50, and 75 percentiles. pbNK cell, peripheral blood natural killer cell; RSA, recurrent spontaneous abortion.

Ji Young Choi. Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion. Korean J Reprod Med 2010.

26.9% (25:1, 53% of sensitivity, 91% of specificity), 그리고 17.4% (12.5:1, 60% of sensitivity, 90% of specificity)로 cut-off value로 정하였다 (Figure 3B).

각각 E:T 비율의 cut-off value에서 정상 분만 대조군에 비해서 습관성 유산 환자군의 위험도가 50:1에서 10.0배, 25:1에서 11.4배, 그리고 12.5:1에서 15.0배 높아짐을 알 수 있었다 (Table 2).

고찰

습관성 유산의 원인으로 일반적으로 받아들여지는 자궁기형 원인, 유전적 요인 그리고 호르몬이상 등의 원인이 진단되지 않는 경우 면역학적 원인의 규명을 위한 자가항체 및 동종 면역검사가 시행되며, 진단 후 태아에 대한 모체의 면역거부현상을 줄이기 위한 다양한 치료가 시도되고 있다. NK cell

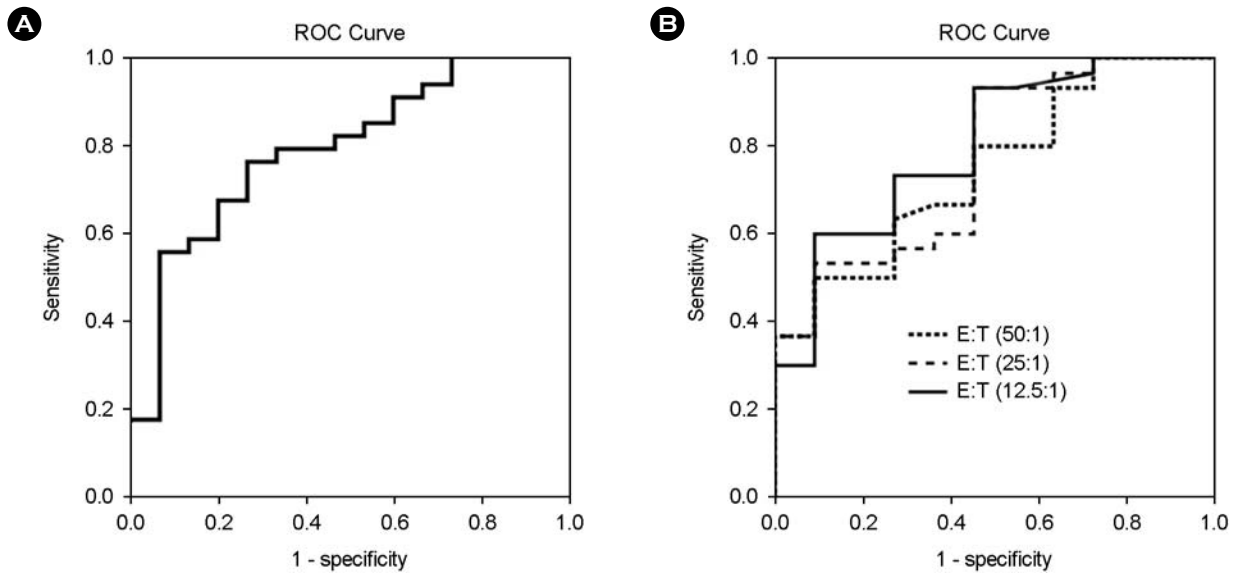


Figure 3. (A) ROC curve of pbNK cell percentage in RSA group. RSA group was statistically significance ($p < 0.001$). These data was shown that pbNK cell percentage was a valuable diagnostic marker to indicate RSA. (B) ROC curve of pbNK cell cytolytic activity in RSA group. RSA group was statistically Significance ($p < 0.001$). These data was shown that pbNK cell cytolytic activity was valuable diagnostic markers to indicate RSA. ROC, Receiver operating characteristic curve; RSA, recurrent spontaneous abortion; E:T, effector cell:target cell.

Ji Young Choi. Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion. Korean J Reprod Med 2010.

Table 2. Predictions of risk of recurrent abortion by pbNK cell fraction and pbNK cell cytolytic activities in RSA patients. Over 90% specificity with the highest sensitivity was set for the cut-off values as valuable diagnostic markers

	pbNK cell (%)	pbNK cell cytolytic activity (%) in each E:T ratio		
		50:1	25:1	12.5:1
Cut-off value	12.1	43.1	26.9	17.4
Specificity	80.0	90.9	94.1	90.9
Sensitivity	58.8	50.0	41.7	60.0
Positive predictive value (PPV)	67.6	93.8	53.3	94.7
Negative predictive value (NPV)	80.0	40.0	90.9	45.5
Odds ratio	8.4	10.0	11.4	15.0
95% CI	2.0~35.8	1.1~88.2	1.3~100.8	1.7~132.9

pbNK cell, peripheral blood natural killer cell; E:T, effector cell:target cell; RSA, recurrent spontaneous abortion; CI, confidence interval.

Ji Young Choi. Increased Peripheral NK Cell Fraction and Their Cytolytic activity in Patients with History of Recurrent Spontaneous Abortion. Korean J Reprod Med 2010.

은 임신 초기에 영양막 세포를 동종항원으로 인식하여 면역반응을 시작하는데, 임신부의 말초혈액에서 얻은 NK cell을 통해 자가 태반세포에 대한 세

포독성을 나타냄이 실험적으로 증명되었고, 본원의 이전 연구 결과에서도 실제 습관성 유산 여성의 말초혈액 세포의 세포용해 활성도가 34.9%로 정상

출산 여성의 8.9%보다 통계적으로 유의하게 높음을 확인하였다.¹⁴ Ruiz 등¹⁵은 임신 초기에 CD56⁺ NK cell을 감소시킴으로써 습관성 유산을 막고 성공적인 출산 결과를 얻을 수 있다고 보고하였다. 한편, 정맥 내 면역글로블린의 주입을 통한 수동면역치료법은 효과적인 과민면역억제 방법으로 다양한 면역질환의 치료에 이용되고 있으며,¹⁶ 전체적인 NK cell의 활성을 저하시키고 착상부위의 NK cell의 활성을 억제시킬 수 있는 작용을 통해 유산을 방지하는 효과가 있음이 보고되기도 하였다.¹⁷

많은 연구자들에 의해 습관성 유산의 원인 중 하나의 기전으로 NK cell의 활성도와 말초혈액에서의 차지하는 비율에 대한 연구가 진행되었으며, Yamada 등¹²은 성공적인 임신의 수행을 위해서는 NK cell의 활성에 대한 적절한 조절이 필요하며 임신 전 말초혈액 내 NK cell의 증가는 습관성 유산의 원인이 될 수 있다는 연구 결과를 보고하였다.

Beer 등⁷은 면역학적 원인을 가진 습관성 유산 여성의 면역표현형 (immune-phenotype)을 조사하고 많은 습관성 유산 환자들에서 말초혈액 내 CD56⁺, CD56⁺/16⁺ NK cell과 CD19⁺ B 세포가 현저하게 증가되어 있다고 보고하였고, Yamada 등¹²은 원인 불명의 습관성 유산 여성에서 임신 전 NK cell의 세포용해 활성도가 46% 이상일 때 유산 위험도가 3.6배, 말초혈액 림프구중 CD56⁺ 세포 분획이 16.4% 이상일 때 유산 위험도가 4.9배로 향후 임신에서 생화학적 임신과 정상 염색체를 갖는 태아의 자연 유산의 위험도가 더 높음을 보고하였고, CD56⁺ NK cell의 활성도가 향후 임신의 결과를 예측하고 치료 방침을 세우는 데 있어 중요한 요인이라고 주장하였다. 또한 Kwak 등⁵은 습관성 유산 환자의 임신 전과 임신 중 말초혈액을 분석하여 CD56⁺/CD16⁺ NK cell이 정상군에 비해서 증가되었음을 보고하였고, 임신 전 pbNK cell의 활성도의 증가를 보이는 습관성 유산 환자에서 다음 임신 시 유산율이 유의하게 높음을 보고하였다. 본 저자들도 이전 연구에서 말초혈액 CD56⁺ NK cell 분획을 15%를 cut-off value로 하여 습관성 유산의 위험도를

진단하면 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specificity)가 각각 68.8%과 92.9%이며, 유산 위험도는 3.4배 증가한다고 보고하였다.¹⁸

dNK cell의 기능에 대해서 아직까지 완전히 알려져 있지는 않지만, 이들은 혈관 성장 인자들 (angiogenic growth factors)을 분비하여 혈관의 생성과 기능을 조절하며, 그 기전으로 생리주기에 따른 자궁 점막의 성장과 분화, 탈락과 재생을 조절함이 보고되었다.¹⁹ Loke 등²⁰은 dNK cell이 착상과정과 이후 태반의 성장과 발달에 중요한 역할을 할 것이라고 제시하였다. 한편, Park 등²¹은 말초혈액 CD56⁺/CD16⁺ NK cell이 증가되어 있는 군에서 자궁 내 CD56⁺ NK cell이 유의하게 증가되어 있는 결과를 보고하여 pbNK cell이 dNK cell의 변화를 반영함을 제안하였다.

본 연구에서도 정상 출산을 한 대조군에 비해 습관성 유산 환자군에서 pbNK cell 분획이 높았으며 유산 위험도 역시 8.4배 증가하였다. 한편, pbNK cell의 세포용해 활성도 역시 분획 결과와 마찬가지로 습관성 유산 환자군에서 높게 나타났으며 유산 위험도도 11.4배 (25:1)나 높아짐을 확인하였다.

본 연구 결과, 기존의 여러 검사 상 원인이 분명하지 않은 습관성 유산 환자에서 pbNK cell의 분획과 세포용해 활성도를 측정하는 것은 면역학적 원인, 특히 동종면역 요인에 의한 습관성 유산의 진단 시 유용한 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 한편, 정상 출산을 한 대조군에 비해 습관성 유산 환자군이 pbNK cell 분획이 유의하게 높은 결과를 토대로 그 진단 cut-off value을 12.1%로 정하였다. 또한, pbNK cell의 세포용해 활성도 역시 습관성 유산 환자군에서 높게 나타났으며, 그 cut-off value을 36.4% (50:1), 26.9% (25:1), 그리고 14.7% (12.5:1)로 제시할 수 있었다. 향후 본 연구에서 제시한 지표에 근거하여 동종면역 원인에 의한 습관성 유산 환자에서 면역학적 원인의 치료 전, 후 pbNK cell의 분획과 세포용해 활성도를 측정, 비교하여 그 효용성을 증명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Hannes M, Englert Y, Gotlieb W, Dupont E. Recurrent spontaneous miscarriage. *Rev Med Brux* 1992; 13: 103-6.
2. Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 397-400.
3. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 140-6.
4. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 113-34.
5. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD56⁺, CD56⁺/CD16⁺, and CD19⁺ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 93-9.
6. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 388-400.
7. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 376-82.
8. Coulam CB, Roussev RG. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 58-62.
9. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-40.
10. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-51.
11. Higuchi K, Aoki K, Kimbara T, Hosoi N, Yamamoto T, Okada H. Suppression of natural killer cell activity by monocytes following immunotherapy for recurrent spontaneous aborters. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33: 221-7.
12. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H. Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-4.
13. Daya S, Gunby J, Clark DA. Intravenous immunoglobulin therapy for recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 69-76.
14. Yokoyama M, Sano M, Sonoda K, Nozaki M, Nakamura G, Nakano H. Cytotoxic cells directed against placental cells detected in human habitual abortions by an in vitro terminal labeling assay. *Am J Reprod Immunol* 1994; 31: 197-204.
15. Ruiz JE, Kwak JY, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Kim YB, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 370-5.
16. Daya S, Gunby J, Porter F, Scott J, Clark DA. Critical analysis of intravenous immunoglobulin therapy for recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 475-82.
17. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* 1992; 326: 107-16.
18. Cha SH, Kim HS, Kim HO, Song IO, Yoo KJ, Koong MK, et al. The preconceptional level of peripheral natural killer cells which was expected to bring successful treatment outcome using low-dose intravenous gamma immunoglobulin (IVIg) infusion in patients with recurrent spontaneous abortion. *Korean J Fertil Steril* 2005; 32: 217-22.
19. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
20. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995; 10(Suppl 2): 14-21.
21. Park DW, Lee HJ, Park CW, Hong SR, Kwak-Kim J, Yang KM. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 173-80.

= 국문초록 =

목적: 임신 전 CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ 말초혈액 자연살해세포 (pbNK cell)의 분획과 세포용해 활성도를 정상군과 습관성 유산의 기왕력을 가진 환자군으로 나누어 비교, 분석하고 습관성 유산의 위험도를 제시할 수 있는 각각의 cut-off value를 설정하고자 하였다.

연구방법: 전향적 연구로서 습관성 유산의 기왕력이 있는 여성을 환자군 (n=35)으로 하였으며, 대조군으로 불임이나 습관성 유산의 기왕력이 없으며 정상아의 출산 경험이 있는 여성을 대조군 (n=15)으로 설정하였다. 유세포분석기를 이용하여 pbNK cell 분획 및 세포용해 활성도를 측정 후 그 결과를 비교 분석하였다.

결과: pbNK cells의 분획은 습관성 유산 환자군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보였다 (14.2±5.2 vs. 9.4±3.7%, $p=0.002$, 95% confidence interval [CI] 1.8~7.8). Receiver operating characteristic curve (ROC) 곡선을 이용하여 pbNK cell의 분획에 대한 cut-off values을 12.1%로 정하였을 때 습관성 유산의 위험도는 8.4배 증가하였다. pbNK cell의 K562 세포용해 활성도를 3가지 다른 Effector to Target (E:T) 비율 (50:1, 25:1, 12.5:1)을 사용하여 측정된 결과 각각의 경우에 있어 습관성 유산 환자군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가된 결과를 보였다 (48.3±19.0 vs. 31.3±11.9% in 50:1 ratio, $p=0.002$; 37.0±18.1 vs. 20.2±9.2% in 25:1 ratio, $p<0.001$; 23.5±12.7 vs. 12.4±7.3% in 12.5:1 ratio, $p=0.001$). ROC 곡선을 이용하여 각각 E:T 비율에서 세포용해 활성도의 cut-off values (43.1% in 50:1, 26.9% in 25:1, and 17.4% in 12.5:1)을 설정하여 분석한 결과 습관성 유산의 위험도는 각각 10.0배, 11.4배, 그리고 15.0배 증가된 결과를 보였다.

결론: 원인이 분명하지 않은 습관성 유산 환자에서 pbNK cell의 분획과 세포용해 활성도를 측정하는 것은 면역학적 원인, 특히 동종면역 요인에 의한 습관성 유산의 유용한 진단 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 향후 동종면역반응에 의한 습관성 유산 환자에서 면역학적 원인의 치료 전, 후 pbNK cell의 분획과 세포용해 활성도를 측정, 비교하여 그 효과를 증명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심단어: CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺ 말초혈액 자연살해세포, 유세포분석기, 세포용해 활성도, 습관성 유산, 진단 지표