

조기난소부전증 환자에서의 면역학적 연구*

I. 임파구아형의 변화

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

김정구 · 이진용 · 장윤석

Immunologic Study in Women with Premature Ovarian Failure

I. Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations

Jung Gu Kim, M.D., Jin Yong Lee, M.D. and Yoon Seok Chang, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University,
Seoul, Korea

= Abstract =

The purpose of this study is to detect certain change in peripheral blood lymphocyte subpopulations in women with premature ovarian failure.

The B cells, T cells and subsets were counted in 21 women with premature ovarian failure and 30 age-matched normal control women. The B cells were measured by identifying lymphocyte with surface membrane immunoglobulin and T cells and subsets by indirect immunofluorescence technique with the monoclonal antibodies OK T3, OK T4, and OK T8.

The results were as follows.

1. No significant difference in the absolute number of B cells, T cells and subsets between women with premature ovarian failure and normal control women was observed.
2. The percentage of B cells, T cells and OK T8(+) cells in women with premature ovarian failure was not significantly different from that in normal control subjects respectively.
3. The percentage of OK T4(+) cells and OK T4/OK T8(+) ratio was significantly higher in women with premature ovarian failure than in control subjects.

서 론

조기난소부전증은 그 자체가 질환이라기 보다는 임상적 상태인데 일반적으로 35~40세 이전에 고성선자극호르몬성 성선기능감퇴증(hypergonadotropic hypogonadism)을 동반한 이차성 무월경으로 정의되고 있다(Tulandi & Kinch, 1981; Coulam, 1982; Couldam et al., 1986). 조기난소부전증은 후천적으로 양측난소절제술, 방사선 치료, 세포독성약제의 사용등에 의하여 야기될 수 있으나 상당수의 환자에서 그 원인이 불분명하다. 조기난소부전증과 애디슨병(Addison's

*1989년도 서울대학교병원 특진연구비 보조로 이루어진것임.

disease), 중증근무력증(myasthenia gravis), 전신성 홍반성낭창(systemic lupus erythematosus), 갑상선질환 등의 자가면역성 질환과의 연관성이 보고되고 있는데(Irvine et al., 1968; Chiauuzzi et al., 1982; Alper et al., 1985; Aiman & Smentek, 1985; McNatty et al., 1977; Damewood et al., 1986) 이런 다른 자가면역성질환과의 동시적 존재는 성선 이외의 다른 조직내에서도 기능이 상을 초래하는 공통면역결손이 존재할지도 모른다는 것을 시사해해 준다.

한편 최근 단세포군항체(monoclonal antibody)를 이용하여 말초혈액내 임파구아형을 측정하는 방법이 널리 보급되어 많은 질환에서 면역반응에 대한 T임파구 조절, T임파구 분화이상에 관한 생리학적 기전에 상당한 정보를 제공

해 주고있다. Morimoto등(1980)은 활동성 전신성 흥반성낭창 환자에서 전체 T임파구의 감소, 억제 T임파구의 감소, 조력/억제 T임파구의 비율 증가를 보고 하였으며 Berrih등(1981)은 중증근무력증 환자에서 조력 및 억제 T임파구의 유의한 변화없이 조력/억제 T임파구의 비율 증가를 관찰하였다.

이에 저자들은 조기난소부전증 환자에서도 자가면역성질환에서 관찰될 수 있는 T임파구의 변화가 일어나는가를 알아보기 위하여 조기난소부전증 환자 21명과 정상건강여성 30명에서 B임파구, 전체 T임파구, 억제 T임파구, 조력 T임파구, 조력/억제 T임파구의 비율을 비교검토 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교병원 산부인과 불임상담실을 내원하여 조기난소부전증으로 진단된 21명(실험군)과 정상월경주기를 가진 정상건강여성 30명(대조군)을 대상으로 하였다. 조기난소부전증은 35세 이전에 이차성 무월경을 주소로 내원한 환자중 혈청 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone, 이하 FSH로 약함) 치가 40mIU/ml 이상인 부인에서 진단되었으며 이들 환자들은 말초혈액 임파구를 이용하여 시행된 염색체 핵형검사소견이 46XX이었고 과거력상 난소절제술, 방사선치료, 세포독성약제 사용 등이 없었다. 또한 실험군에는 별다른 급만성질환의 이환력이 없었고 적어도 3개월전에 호르몬제를 사용한 사람은 연구대상에서 배제되었다.

조기난소부전증 환자군에서의 평균 무월경기간은 21.54 ± 4.83 개월, 초경연령은 14.95 ± 0.26 세 이었고 평균혈청 FSH치는 115.19 ± 7.19 mIU/ml, 황체화호르몬(luteinizing hormone, 이하 LH로 약함)치는 80.02 ± 7.32 mIU/ml, 17β -estradiol치는 23.0 ± 4.29 pg/ml이었으며 연구당시의 평균연령은 27.71 ± 1.04 세로서(표 1) 정상건강여성의 연령 28.01 ± 1.21 세와 유의한 차이가 없었다.

2. 연구방법

실험군은 내원시에, 대조군에서는 월경 제3일에 일주기에 의한 변화(Miyawaki et al., 1984)를 배제하기 위하여 오전 9시와 11시 사이에 heparin처리한 시험관에 12ml정도의 혈액을 채취하여 그중 일부는 Technicon회사의 H-I system

Table 1. Clinical and hormonal data in 21 women with premature ovarian failure

Characteristics	Mean \pm SE
Clinical	
Age (years)	27.71 \pm 1.04
Menarcheal age (years)	14.95 \pm 0.26
Duration of amenorrhea (months)	21.54 \pm 4.83
Hormonal	
LH (mIU/ml)	80.02 \pm 7.32
FSH (mIU/ml)	115.19 \pm 7.91
E ₂ (pg/ml)	23.0 \pm 4.29

을 이용한 백혈구 및 임파구 측정에 사용하였다. 나머지는 B임파구와 T임파구 및 그 아형 측정에 사용하기 위하여 phosphate buffer saline(이하 PBS로 약함)으로 1:1희석하여 그 희석혈액과 2:1의 용적비로 Ficoll-hypaque용액을 시험관의 아래층에 넣고 희석된 혈액을 그위에 넣은후 400g에서 30분간 원심분리하여 단핵세포만을 골라내었다. 이를 PBS로 200g에서 10분간씩 3회 원심분리하여 세척한다음 0.2% bovine serum albumin(이하 BSA로 약함)이 함유되어 있는 PBS로 세포부유액을 제조하였다.

B임파구를 측정하기 위해서 5×10^6 /ml로 조절된 상기 세포부유액 100 μ l과 0.02% NaN₃로 1:5로 희석된 형광물질이 부착된 항인체면역글로부린(fluorescin isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin) 100 μ l을 시험관에 넣고 빛을 차단한후 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 100g에서 1분간 PBS로 3회 세척하였고 30% glycerin이 함유된 PBS 25 μ l을 시험관에 추가한 다음 1방울을 슬라이드에 옮겨서 형광현미경 400배 배율하에서 200개 이상의 세포를 세어 형광을 나타내는 세포의 백분율을 구하였다.

T임파구의 경우는 면역판 구멍(microplate well)에 10×10^7 /ml로 조절된 세포부유액 50 μ l과 단세포균항체 20 μ l을 넣어서 4°C에서 1시간 반응시켰다. T임파구의 표면항원에 대한 단세포균항체는 각기 전체 T임파구, 조력 T임파구, 억제 T임파구와 반응한다고 알려진 Ortho회사의 OKT3, OKT4, OKT8을 사용하였다(Reinherz et al., 1980, 1983). 상기 면역판을 0.2% BSA를 함유한 PBS로 3회 세척후 형광물질이 결합된 면역글로부린 100 μ l을 면역판 구멍에 넣고 은박지로 빛을 차단한 다음 4°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 3회 상기 세척용액으로 세척

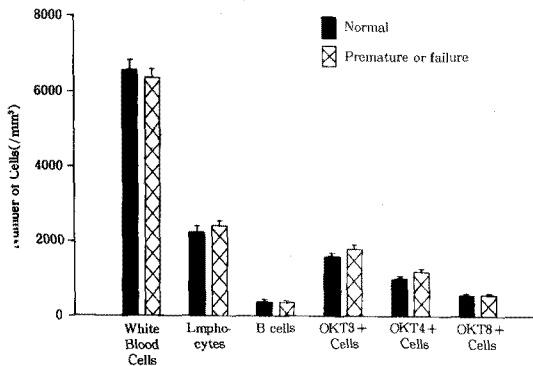


Fig. 1. The mean + S.E. (/mm³) of absolute number of white blood cells, lymphocytes and its subpopulations in women with premature ovarian failure and normal control women.

후 30% glycerin을 함유한 PBS 25 μ l을 추가한 다음 한방울을 슬라이드에 옮겨 B임파구 측정에서와 같은 방법으로 형광현미경하에서 판독하였다.

Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

그림1은 정상대조군과 조기난소부전증을 가진 실험군에서의 백혈구, 전체 임파구, B임파구, OKT3 양성세포, OKT4양성세포, 및 OKT8 양성세포들의 절대수를 보여준다. 실험군에서의 평균 백혈구수 6361.90 \pm 233.36/mm³는 대조군의 6563.33 \pm 263.87/mm³ 보다 적었으나 전체임파구, B임파구는 각기 2418 \pm 136.28/mm³ 및 375.10 \pm 40.13/mm³로 대조군의 2241.76 \pm 156.65/mm³, 370.12 \pm 62.45/mm³ 보다 많았지만 유의한 차이는 아니었다. OKT3양성세포, OKT4양성세포 및 OKT8양성세포의 경우 또한 실험군에서 각기 1794.08 \pm 117.87/mm³, 1188.56 \pm 75.54/mm³, 및 586.62 \pm 48.73/mm³로서 대조군의 1588.38 \pm 105.59/mm³, 1000.42 \pm 71.24/mm³, 565.15 \pm 40.68/mm³보다 많았으나 이들 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

전체임파구에 대한 각종 임파구아형의 평균 백분율은 표2에 표시된 바와 같다. B임파구와 OKT3양성세포의 평균 백분율은 대조군에서 각기 15.90 \pm 1.17% 및 71.17 \pm 1.30%, 실험군에서 16.24 \pm 1.72% 및 73.76 \pm 1.93%로 실험군에서 약간 높았으나 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며 OKT8양성 세포의 경우는 실험군(23.81 \pm 1.29

Table 2. Comparison of peripheral blood lymphocyte and subpopulations in women with premature ovarian failure(n=21) and normal control women(n=30)

Cell populations	Group	Normal controls Mean \pm SE	Women with premature ovarian failure Mean \pm SE
B Cell (%)		15.90 \pm 1.17	16.24 \pm 1.72
OK T3(+) cell (%)		71.17 \pm 1.30	73.76 \pm 1.93
OK T4(+) cell (%)		44.60 \pm 1.01	49.24 \pm 1.42**
OK T8(+) cell (%)		25.80 \pm 0.96	23.81 \pm 1.29
OK T4/OK T8(+)		1.81 \pm 0.29**	2.19 \pm 0.14**

**p<0.01

%)에서 대조군(25.80 \pm 0.96%)보다 약간 낮으나 그차이 또한 통계적 유의성이 없었다. 그러나 실험군에서 OKT4양성세포의 평균 백분율과 OKT8양성세포에 대한 OKT4양성세포의 비율은 각기 49.24 \pm 1.42% 및 2.19 \pm 0.14로서 대조군에서의 44.60 \pm 1.01% 및 1.81 \pm 0.29보다 유의하게 높았다(p<0.01).

고 찰

면역반응에서 B임파구, T임파구는 각기 다른 기능적 역할을 갖고 있다. B임파구는 항원 자극에 의하여 항체를 분비하며 조력 T임파구는 항원자극에 반응하여 B임파구에 의한 항체 생산의 증가에 관여하고 억제 T임파구는 임파결에서 항원자극후 면역반응을 억제한다.

B임파구는 세포막에 결합된 면역글로부린을 감지되는 방법으로 측정되며 T임파구는 표면 항원에 따라 그 아형이 결정되는데 단세포군 항체인 OKT3는 전체 T임파구, OKT4는 조력 및 유도 T임파구, OKT8은 억제 및 세포독성 T임파구에 반응한다고 알려져 있다(Reinherz et al., 1980 & 1983).

본연구에서 조기난소부전증 환자의 말초혈액 내 B임파구, T임파구 및 그아형의 절대수는 정상건강여성의 것과 유의한 차이가 없었다. 전체 임파구에 대한 백분율의 경우 B임파구, OKT3양성세포, OKT8양성세포는 유의한 변화가 없었으나 OKT4양성세포는 유의하게 증가하였다. 또한 OKT8양성세포에 대한 OKT4양성세포의 비율이 조기난소부전증 환자에서 유의하게 증가하였는데 이는 Miyake등(1987)의 성적과 일치하나 Rabinowe등(1989)은 무변화, Ho등(1988)은

감소를 보고하고 있다. 본연구에서 OKT4/OKT8 양성세포비율이 증가된 것은 OKT4양성세포의 증가에 기인한다고 사료된다.

수많은 학자들이 조기난소부전증환자에서 면역세포화학적 방법을 이용하여 말초혈액내 난소조직에 대한 자가항체를 보고하고 있다(De-Moraes Ruehse et al., 1972; McNatty et al., 1977; Coulam & Ryan 1979; Domewvod et al., 1986; Pekonen et al., 1986; Miqnot et al., 1989). 본연구에서 관찰된 조력 T임파구인 OKT4양성세포의 증가가 감작된 B임파구에 의한 항체 생산을 더 자극할 수 있다고 사료된다. 또한 조기난소부전증 환자의 30%에서 B임파구의 분화, 증식, 활성을 억제한다는 자연살해세포(natural killer cells)의 비정상적 감소가 보고 되었는데(Pekonen et al., 1986) 이에 의한 B임파구 활성화 증가가 자가항체 생산에 기여할 수도 있다. 난소세포에 대한 항체는 보체고정(complement fixation)을 통하여 또는 자연살해세포를 통하여 세포파괴를 초래할 수 있다. 실제로 McNatty 등(1977)은 조기난소부전증 및 애디슨병이 병발된 환자의 혈청내에 배양된 과립막세포에 대하여 보체의존적 세포독성작용을 나타내는 물질이 존재한다는 것을 제시하였다.

실험적으로 생후 수일내에 흉선(thymus)이 제거된 생쥐에서 난포내에 임파구침윤, 난자수감소등의 난소이발생증(ovarian dysgenesis)이 발전하고 이런 실험동물에서 자가항체가 나타나며 억제 T임파구는 감소되나 조력 T임파구는 정상적으로 존재한다고 한다(Michael, 1983). 정상적으로 억제 T임파구에 의하여 자기조직에 반응하는 자가반응성 임파구의 발전이 억제되고 있는데 억제 T임파구가 어떤 기회에 정상적으로 기능하지 못할 경우 이런 자가반응성 임파구가 나타나 자기내성(self tolerance)을 잃게되어 자가면역성 질환이 발생할 수 있다(Coulam, 1983). 조기난소부전증과 전신성 홍반성 낭창, 애디슨병, 그레이브스병(Grave's disease) 등의 자가면역성 질환과의 연관성을 고려할때 상술한 현상이 일어날 수도 있다고 가정되고 있다. 본연구에서는 억제 T임파구인 OKT8양성세포의 백분율이 감소되었으나 정상건강여성의 것과 유의한 차이가 없어 이런 가정에 상반되는 결과 처럼 보이나 이는 연구대상 환자중 자가면역성 질환이 병발된 예가 없었던 것에 기인될지도 모른다.

조기난소부전증 환자의 일부에서 채취된 임

파구를 난소단백질에 노출후 감작된 임파구로부터 백혈구 이동억제인자(migration inhibition factor)인 lymphokine유리가 증가되는 것이 관찰되었다(Edmonds et al., 1973; Pekonen et al., 1986). Rabinowe등(1989)은 활성화된 T임파구에 존재하는 Ia항원 양성인 T임파구가 조기난소부전증 환자의 35%에서 증가된다고 하였으며 Miyake등(1987)은 활성화된 T임파구 및 B임파구의 Ia유사물질과 반응한다고 알려진 HLA-DR 단세포군 항체에 양성인 세포의 백분율이 조기난소부전증 환자에서 유의하게 증가하며 이 백분율과 OKT4/OKT8양성세포의 비율과 유의한 상관관계에 있다고 하였다.

생식선호르몬 특히 estradiol과 면역계의 연관성이 시사되어 왔다. Estradiol은 억제 T임파구의 활성을 억제하여 B임파구의 성숙을 증가시킴으로서 항체생산을 더욱 증가하게 한다(Pavonen et al., 1981). 동물실험에서 생식선절제후 피부이식을 하는 경우 거부반응의 발현시기가 짧아지는 것이 관찰되었는데(Graff et al., 1969) 이는 생식선제거가 세포성면역계의 활성을 유발한다는 증거가 될 수 있다. Grossman 등(1982, 1983)은 이런 면역학적 내분비균형에 흉선의 중요성을 강조하였다. 즉 estradiol의 존재는 흉선혈청인자(thymic serum factor)의 유리를 억제하나 생식선제거시와 같이 estradiol이 없는 경우 이 인자의 유리가 자극되어 T임파구가 성숙하게 되어 기능을 발휘하게 된다.

결론적으로 조기난소부전증 환자에서 세포성면역계의 이상이 존재하는데 이런 이상이 조기난소부전증 환자에서 발견되는 estradiol감소등에 의한 이차적 현상인지 또는 조기난소부전증을 유발하는 원인적 인자인지는 확실하지 않다. 이에 대하여 앞으로 더욱더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

조기난소부전증 환자에서 면역반응에 중요한 역할을 하는 B임파구, T임파구 및 그아형의 변화를 알아보기 위하여 조기난소부전증 환자 21명과 정상월경주기를 가진 정상건강여성 30명에서, B임파구는 세포막결합 면역글로부린을 탐지하는 방법으로, T임파구 및 그아형의 경우는 단세포군항체 OKT3, OKT4 및 OKT8을 이용한 간접면역형광법으로 각각 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. B림파구, OKT3, OKT4, OKT8양성세포의 절대수는 각기 조난소부전증 환자와 정상건강여성사이에 유의한 차이가 없었다.
2. 조난소부전증 환자에서 전체림파구에 대한 B림파구, OKT3, OKT8양성세포의 백분율은 각기 정상건강여성의것과 유의한 차이가 없었다.
3. 조난소부전증 환자에서 OKT4양성세포의 백분율과 OKT4/OKT8양성세포비율은 각기 정상건강여성의 것보다 유의하게 증가 하였다 ($p < 0.01$).

참 고 문 헌

- Aiman, J. and Smentek, C.: *Premature ovarian failure. Obstet. Gynecol.* 66: 9, 1985.
- Alper, M.M. and Garner, P.R.: *Premature ovarian failure: Its relationship to autoimmune disease. Obstet. Gynecol.* 66: 27, 1985.
- Berrih, S., Gaud, S., Bach, M.A., Kung, P., Goldstein, G., LeBrigand, H., Binet, J.P. and Bach, J.F.: *Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis, using anti-T cell monoclonal antibodies. Clin. Exp. Immunol.* 45: 1, 1981.
- Chiauszi, V., Cigorraga, S., Escobar, M.E., Rivarola, M.A. and Charreau, E.H.: *Inhibition of follicle-stimulating hormone receptor binding by circulating immunoglobulins, J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 1221, 1982.
- Coulam, C.B. and Ryan, R.J.: *Premature menopause. I. Etiology. Am. J. Obstet. Gynecol.* 133: 639, 1979.
- Coulam, C.B.: *Premature gonadal failure. Fertil. Steril.* 38: 645, 1982.
- Coulam, C.B.: *Autoimmune ovarian failure. Semin. Reprod. Endocrinol.* 1: 161, 1983.
- Coulam, C.B., Adamson, S.C. and Annegers, I. F.: *Incidence of premature ovarian failure. Obstet. Gynecol.* 67: 604, 1986.
- Damewood, M.D., Zacur, H.A., Hoffman, G.J. and Rock, G.A.: *Circulating anti-ovarian antibodies in premature ovarian failure. Obstet. Gynecol.* 68: 850, 1986.
- De-Moraes Ruehsen, M., Blizzard, R.M., Garcia-Bunuel, R. and Jones, G.S.: *Autoimmunity and ovarian failure. Am. J. Obstet. Gynecol.* 112: 693, 1972.
- Edmonds, M., Lamki, L., Killinger, D.W. and Volpe, R.: *Autoimmune thyroiditis, adrenalitis and oophoritis. Am. J. Med.* 54: 782, 1973.
- Graff, R.J., Lappe, M.A. and Snell, G.D.: *The influence of the gonads and adrenal glands on the immunoresponse to skin grafts. Transplantation.* 7: 105, 1969.
- Grossman, C.J., Sholiton, L.J. and Roselle, G. A.: *Estradiol regulation of thymic lymphocyte function in the rat: mediation by serum thymic factors. J. Steroid. Biochem.* 16: 683, 1982.
- Grossman, C.J., Sholiton, L.J. and Roselle, G. A.: *Dihydrotestosterone regulation of thymocyte function in the rat: mediation by serum factors. J. Steroid. Biochem.* 19: 1459, 1983.
- Ho, P.C., Tang, G.W.K., Fu, K.H. and Lawton, J.W.M.: *Immunologic studies in patients with premature ovarian failure. Obstet. Gynecol.* 71: 622, 1988.
- Irvine, W.J., Chan, M.M.W., Scarth, L., Kolb, F. O., Hortog, M., Bayliss, R.I.S. and Drury, M.I.: *Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. Lancet.* 2: 883, 1968.
- McNatty, K.P., Short, R.V., Barnes, E.W. and Irvine, W.J.: *The cytotoxic effect of serum from patients with Addison's disease and autoimmune ovarian failure on human granulosa cells in culture. Clin. Exp. Immunol.* 22: 378, 1977.
- Miake, T., Sato, Y. and Takeuchi, S.: *Implications of circulating autoantibodies and peripheral blood lymphocyte subsets for the genesis of premature ovarian failure. J. Reprod. Immunol.* 12: 163, 1987.
- Michael, S.S.D.: *Interactions of the thymus and the ovary. In: Greenwald G.S., Terranova, P. F., ed. Factors regulating ovarian function. New York: Raven Press, 1983; 455.*
- Mignot, M.H., Schoemaker, J., Kleingeld, M., Ramanath Rao, B. and Drexhage, H.A.: *Premature ovarian failure. I. The association with autoimmunity. European J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 30: 59, 1989.
- Miyawaki, T., Taga, K., Nagaoki, T., Seki, H., Suzuki, Y. and Taniguchi, N.: *Circadian changes of T lymphocyte subsets in human per-*

- ipheral blood. *Clin. Exp. Immunol.* 55:618, 1984.
- Morimoto, C., Reinherz, E., Schlossman, S.F., Schur, P.H., Mills, J.A. and Steinberg, A. D.: *Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest.* 66:1171, 1980.
- Pavonen, T., Anderson, C.C. and Adlercreutz, H.: *Sex hormone regulation of in vitro immune response: Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppression T-cells in poleweed nitrogen-stimulated cultures. J. Exp. Med.* 154:1935, 1981.
- Pekonen, F., Sieberg, R., Makinen, T., Miettinen, A. and Yli-Korkala, O.: *Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. Clin. Endocrinol.* 25:1, 1986.
- Rabinowe, S.L., George, K.L., Ravnkar, V.A., Dluhy, R.G. and Dib, S.A.: *Premature menopause: Monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and antiovarian antibodies. Fertil. Steril.* 51:450, 1989.
- Reinherz, E.A., Kung, P.C., Goldstein, G. and Schlossman, S.F.: *A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2, J. Immunol.*, 124:1301, 1980.
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Breard, J.M., Goldstein, G. and Schlossman, S.F.: *T cell requirements for generation of helper factors in man: analysis of the subsets involved. J. Immunol.*, 124:P1883, 1980.
- Tulandi, T. and Kinch, R.A.H.: *Premature ovarian failure. Obstet. Gynecol. Surv.* 36:521, 1981.
-