

반복 유산 및 착상실패를 보이는 환자에서 Th1 면역반응에 대한 연구

제일병원 산부인과 불임생식내분비분과¹, 시카고 의과대학 산부인과²

한애라¹ · 양광문^{1*} · 곽영희²

Predominant T Helper 1 Immune Response in Women with Reproductive Failures

Ae Ra Han¹, Kwang Moon Yang^{1*}, Joanne Kwak Kim²

¹Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea,

²Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Chicago Medical School at Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago, IL, USA

Objective: To evaluate whether T helper 1 (Th1) immune response is predominant in women with reproductive failures (recurrent spontaneous abortion and recurrent implantation failure) and the activation of T cell is related to Th1 propensity.

Methods: Women with a history of recurrent implantation failure or recurrent spontaneous abortion comprise the study group (n=37). Controls are normal fertile women without a history of infertility or pregnancy losses (n=11). Th1/Th2 ratios of interferon (INF)- γ /interleukin (IL)-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α /IL-10 expression on CD3⁺/4⁺ cells, CD154, and CD69 expression on T cells are measured by flow cytometric analysis.

Results: The ratios of TNF- α to IL-10 expressing on CD3⁺/4⁺ cells (Th1/Th2 cell ratios) are significantly higher in study group (42.1 \pm 2.3) as compared with that of controls (28.7 \pm 2.7) ($p=0.002$). The overall trend of CD154 and CD69 expression on T cells are elevated in study group than those of controls. The proportion (%) of CD3⁺/4⁺/154⁺ cells (1.7 \pm 0.5 vs. 0.3 \pm 0.2, $p=0.038$) and the % of CD3⁺/8⁺/154⁺ cells (0.6 \pm 0.2 vs. 0.1 \pm 0.0, $p=0.024$) are significantly higher in study group. The % of CD3⁺/69⁺ cells (5.6 \pm 1.9 vs. 1.3 \pm 5.4, $p=0.046$) and % of CD3⁺/8⁺/69⁺ cells (4.8 \pm 1.3 vs. 1.8 \pm 0.2, $p=0.035$) among CD3⁺/8⁺ cells are significantly increased in study group.

Conclusion: Women with reproductive failures have Th1 propensity with increased T cell activation. These finding means that activated T cell has a harmful effect on early pregnancy and implantation by induction of Th1 immunity.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(3): 231-237.]

Key Words: T cell activation, T helper 1 immunity, Reproductive failure

착상과 임신의 유지를 위해서는 태아의 동종항원에 대한 모체의 면역반응의 균형이 필수적이며, 이러한 균형에 문제가 생겨 과도한 면역반응이 유

도될 경우, 태반의 성장에 심각한 장애를 초래하여 착상부전 (recurrent implantation failure, RIF)이나 반복적 유산 (recurrent spontaneous abortion, RSA), 전 자간증과 같은 생식부전 (reproductive failure)의 원인이 될 수 있다.¹ 이에 임신과 관련된 면역반응에 대해 다양한 연구들이 진행되어, 탈락막 내의 증가된 helper T (Th) cell의 활성이 자연 유산의 원인으로

접 수 일: 2010년 7월 26일, 수정일: 2010년 8월 26일
게재확정일: 2010년 9월 3일
주관책임자: 양광문, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과
Tel: (02) 2000-7545, Fax: (02) 2000-7790
e-mail: km1yang@naver.com

로 제시된 바 있으며,² RSA 및 전자간증이 Th1 면역반응의 증가와 관련있는 것으로 보고된 바 있다.³ 또한 체외수정술 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)을 시행한 RSA 및 RIF 환자의 말초혈액에서 Th1/Th2 세포 비율이 증가한다는 연구가 있어,⁴ 이러한 생식-면역반응에 T 림프구의 역할이 중요하다고 할 수 있겠다.

CD154 (CD40 ligand)는 활성화된 CD4⁺ (Th cell)의 세포막에서 주로 발현되는 tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 단백질로, 항원제공세포 (antigen-presenting cells, APC)에 결합된 CD40과 결합하여 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 특히 APC에서 interleukin (IL)-12의 분비를 유도하여 naïve T cell의 Th1 cell로 분화를 촉진하고 Th2 면역반응의 발달을 억제함으로써,^{5,6} 이들 CD40과 CD154의 상호작용은 Th cell의 기능과 Th1/Th2 면역반응의 균형에 중요한 역할을 한다.

CD69 역시, 활성화된 Th cell 표면에서 발현되는 단백질로 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)와 CD3 복합체가 형성된 직후 빠르게 그 발현이 증가하여 자극이 소실되면 단시간 내에 사라지는 것으로 알려져 있다.⁷ CD69가 발현된 활성화된 T 세포는 IL-2와 TNF-alpha (TNF- α), interferon-gamma (INF- γ)와 같은 사이토카인의 생산을 증가시키고,⁸ CD8⁺ 세포 (cytotoxic T cell)을 통한 세포매개 이식 거부반응에 관여한다.⁹

이에 본 연구는 Th cell의 세포 내 사이토카인 발현을 분석함으로써 RSA와 RIF 환자에서 Th1 면역반응의 우세 현상을 규명하는 한편, CD154와 CD69와 같은 T 림프구 활성화 표지자의 발현 양상이 Th1 면역반응에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

2009년 1월부터 2009년 6월까지, 반복적 유산 (RSA) 또는 반복적 착상실패 (RIF) 환자를 대상으로

로 전향적 연구를 시행하였다. 재태연령 20주 이전에 2회 이상의 원인불명의 자연 유산을 반복적 유산으로 정의하고, 2회 이상의 보조 생식술 (reproductive technology [ART], i.e. IVF-ET)을 시행했으나 임신에 실패한 경우를 반복적 착상실패로 정의하였다. 45세 이상의 고령 여성이나 난소자극에 낮은 반응을 보이는 군 (저반응군 - 채취된 난자 수가 3개 이하인 경우, 또는 기저 난포자극호르몬 수치가 20 IU/mL 이상인 경우), 현재 자가면역질환을 앓고 있거나 자가면역질환의 병력을 가진 경우 및 난자공여 주기 등은 제외하고, 총 18명의 반복 유산 환자와 19명의 반복적 착상실패 환자를 연구군으로 하였으며, 불임이나 유산의 기왕력이 없으며 정상아의 분만력을 가진 건강한 여성 11명을 대조군으로 수집하였다.

2. 연구방법

1) 세포 분리 및 염색

해당 치료를 시작하기 전의 대조군과 연구군의 혈액을 헤파린으로 처리한 시험관에 채취하여, 원심분리기 (Ficoll-Hypaque, Biotech, Sweden)와 완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS)을 이용하여 말초혈액 내 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 분리하였다. 분리된 PBMC를 완충용액 (PBS with 1% heat-inactivated fetal bovine serum and 0.09% w/v sodium azide [staining buffer])을 이용하여 세척한 후 각각의 특정 세포표면항원에 대한 형광-항체 (fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies) 들을 부착하여 15분 동안 배양하였다.

T 림프구를 분리하기 위해 항-CD3와 항-CD4 항체를 사용하였고, 이들 세포의 활성화 표지자로 항-CD154와 항-CD69 항체를 사용하였다. 세포 내 사이토카인 (cytokine)을 측정하기 위해 250 μ L의 cytofix/cytoperm 용액 (Pharminogen, San Diego, CA, USA)을 이용하여 세포의 고정 및 침투를 시행하였다.

2) 유세포분석기를 이용한 자료 수집

염색된 검체를 유세포분석기 (Coulter XL flow cytometer, Beckman-Coulter, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)와 그 분석 프로그램 (XL software) 이용하여 특정 세포표면항원 및 세포 내 특정 사이토카인을 발현하는 세포의 분율을 구하였다.

그래프 상 CD3와 CD4가 함께 발현된 세포구역을 설정하여 해당 구역 내 CD154가 발현된 세포의 분율을 구하고 같은 방법으로 CD69가 발현된 세포 분율을 구하여 각각 CD3⁺/4⁺ cell 중 활성화된 세포 분율로 정의하였다. CD3가 발현된 세포 중 CD3와 CD4가 함께 발현된 세포구역을 제외한 나머지 부분을 CD3⁺/8⁺ 세포로 정의하고 이들 중 활성화된 세포 분율을 구하기 위해 CD154와 CD69를 이용하여 위와 같은 방법을 시행하였다.

각각의 검체 내 Th cell의 분화 방향, 즉 Th1 및 Th2 반응을 보기 위해 Th1 세포에서 분비되는 사

이토카인으로 알려진 TNF- α 와 INF- γ , Th2 사이토카인으로 알려진 IL-10에 대한 형광-항체를 이용하여 CD3⁺/4⁺ 세포 중 각 사이토카인이 발현된 세포의 분율을 구하였다.

3. 통계분석

통계학적인 분석은 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여, 평균값의 비교를 위해 Student's t-test를, 상관관계 확인을 위해 Pearson's correlation 분석을 시행하였으며, p -value<0.05일 경우에 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

연구군의 평균연령은 35.3±4.3세였고, 연구군 중 RSA 그룹의 평균 자연 유산 횟수는 2.5회였다. RIF 그룹에서 일차성 불임 환자는 61.1%였으며, 이들의

Table 1. Comparison of clinical characteristics and the expression of lymphocyte activation markers

	Study group	Control group	Significance
No. of patient	37	11	
Age (yr)	35.3±4.3	31.0±8.2	NS
TNF- α /IL-10 expressing CD3 ⁺ /4 ⁺ cell	42.1±2.3	28.7±2.7	$p=0.002^*$
INF- γ /IL-10 expressing CD3 ⁺ /4 ⁺ cell	18.4±2.2	16.2±1.8	NS
CD154 ⁺ cell among PBMC	19.3±4.2	6.9±2.4	$p=0.017^*$
CD3 ⁺ /154 ⁺ cell among CD3 ⁺ cells	5.6±1.8	1.5±0.9	$p=0.053$
CD3 ⁺ /4 ⁺ /154 ⁺ cell among CD3 ⁺ /4 ⁺ cells	3.5±1.1	0.7±0.5	$p=0.031^*$
CD3 ⁺ /8 ⁺ /154 ⁺ cell among CD3 ⁺ /8 ⁺ cells	2.3±0.7	0.5±0.1	$p=0.018^*$
CD69 ⁺ cell among PBMC	15.6±3.9	6.7±1.7	$p=0.045^*$
CD3 ⁺ /69 ⁺ cell among CD3 ⁺ cells	5.6±1.9	1.3±0.5	$p=0.046^*$
CD3 ⁺ /4 ⁺ /69 ⁺ cell among CD3 ⁺ /4 ⁺ cells	3.9±2.0	0.5±0.2	NS
CD3 ⁺ /8 ⁺ /69 ⁺ cell among CD3 ⁺ /8 ⁺ cells	4.8±1.3	1.8±0.2	$p=0.035^*$

Values were mean±SE (standard error).

TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; INF, interferon; NS, no statistically significant (p -value > 0.05); PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

* Statistically significant (p -value < 0.05).

Ae Ra Han. Predominant T Helper 1 Immune Response in Women with Reproductive Failures. Korean J Reprod Med 2010.

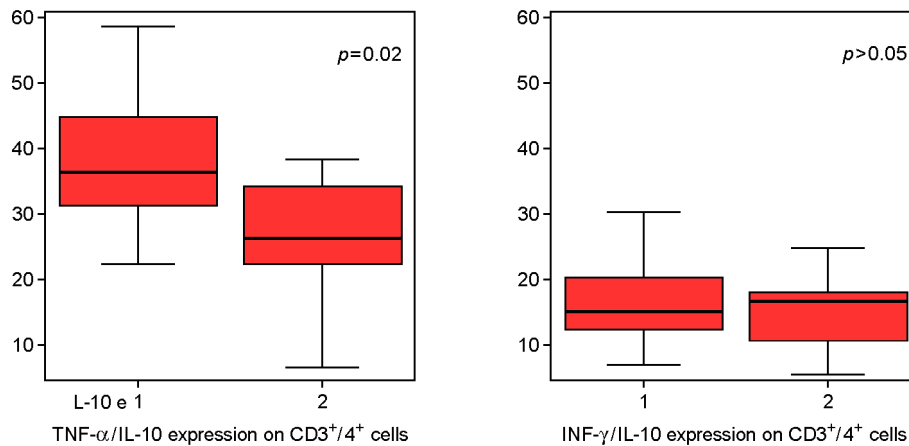


Figure 1. Mean ratio of TNF- α or INF- γ to IL-10 expression on CD3⁺/4⁺ Cells. Values were mean \pm SE (standard error). Black colored bold line in red box means median values. 1: Study group, 2: Control group. TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; INF, interferon.

Ae Ra Han. Predominant T Helper 1 Immune Response in Women with Reproductive Failures. Korean J Reprod Med 2010.

평균 ART 횟수는 3.1회였다.

1. 세포 내 사이토카인의 발현과 T 림프구 활성화도

Th cell 내 TNF- α /IL-10의 발현 비율은, 대조군에 비해 연구군에서 유의하게 높은 (42.1 ± 2.3 vs. 28.7 ± 2.7 , $p=0.002$) 결과를 보였다. 반면, INF- γ /IL-10의 발현 비율은 두 군간 차이를 보이지 않았다 (Table 1, Figure 1).

2. CD154와 CD69의 발현

대조군에 비해 연구군에서 CD154와 CD69가 발현된 세포의 비율이 전반적으로 높았다. CD154의 경우, Th cell과 Tc cell 모두에서 유의하게 높은 발현을 보였으며, CD69의 경우, 전체 T 림프구와 Tc cell에서 통계적으로 높은 발현을 확인할 수 있었다 (Table 1, Figure 2).

고 찰

T cell은 전체 림프구의 약 70%를 차지하며 T cell receptors (TCR)로 불리는 T cell 고유의 수용체 및 CD3 세포표면항체의 발현으로 특징지어진다. 이들은 TCR 단백질의 구성성분에 따라 T $\alpha\beta$ cell에

속하는 Th cell 및 Tc cell, Memory T cell, Regulatory T (Treg) cell, Natural killer T (NKT) cell과 T $\gamma\delta$ cell로 구분된다. 이 중 Th cell은 다른 여러 백혈구들의 면역반응을 조절하여 helper T cell이라 명명되며, CD4 세포표면항체를 발현하여 CD4⁺ cell로도 불린다. 이는 APC의 major histocompatibility complex class II에 의해 제공된 펩타이드 항원에 의해 활성화되어 증식, 분화하며 다양한 사이토카인의 분비를 통해 면역반응을 활성화한다.

Th cell은 분화를 거쳐 서로 다른 사이토카인을 분비하게 되며 이에 따라 Th1, Th2, Th3, Th17 등으로 나뉜다. 이 중 Th1, Th2 반응의 균형은 착상과 임신에 필요한 면역환경의 구성에 매우 중요한 역할을 한다.¹⁰ TNF- α 와 INF- γ 는 Th1 면역반응을 통해 분비되는 대표적인 염증성 사이토카인으로^{11,12} 자연 유산의 병인으로 알려져 있다.¹³ 반면, IL-4와 IL-10은 Th2 cell에 의해 생산되며 용모막의 세포자멸사에 대한 저항력을 증가시켜 임신 유지에 기여하는 것으로 보고되었으며,¹⁴ 이는 RSA 환자의 말초혈액에서 TNF- α 를 분비하는 (Th1 면역반응) Th cell의 비율이 IL-10을 분비하는 (Th2 면역반응) Th cell에 비해 유의하게 높다는 몇몇 보고를 통해 뒷받침된다.^{4,15} 한편 Kwak-Kim 등⁴은 원인이 불분명

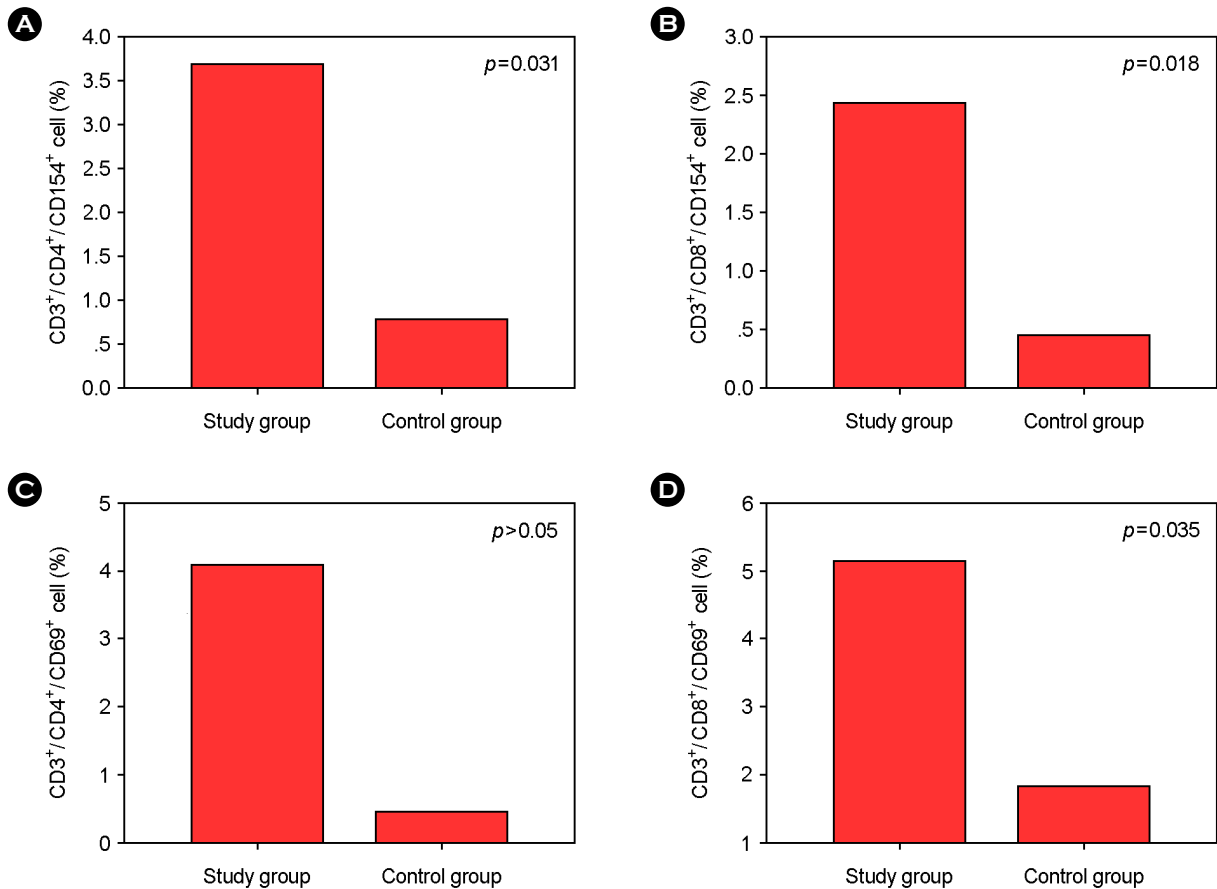


Figure 2. Mean ratios of expressing lymphocyte activation markers (CD154 or CD69) expressing cells among CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. (A) mean ratio of CD154 expressing cell among CD3⁺/4⁺ cells, (B) mean ratio of CD154 expressing cell among CD3⁺/8⁺ cells, (C) mean ratio of CD69 expressing cell among CD3⁺/4⁺ cells, (D) mean ratio of CD69 expressing cell among CD3⁺/8⁺ cells.

Ae Ra Han. Predominant T Helper 1 Immune Response in Women with Reproductive Failures. Korean J Reprod Med 2010.

한 RIF 환자를 대상으로 Th cell 내의 사이토카인을 측정된 결과 습관성 유산 환자와 유사하게 RIF 환자군에서도 Th1 사이토카인을 함유한 Th1 cell의 증가가 관찰됨을 보고하였으며 이 같은 결과는 RIF의 면역학적 원인에 대한 진단적 방법으로 이용할 수 있음을 제안하였다.

CD40 ligand (CD40L 또는 CD154)는 CD40과 결합하여 antigen presenting cell (APC)에서 IL-12를 분비하게 하며, 그 결과 naïve CD4⁺ T cell을 Th1 cell로 분화하도록 유도하는 동시에, Th2 면역반응을 억제하는 작용을 한다.^{5,6,16,17} 결국 CD40-CD154의 상호작용은 Th cell의 활성화와 Th1/Th2의 균형 유지

에 중요한 역할을 한다.⁷ 한편, TCR이 T cell에 부착하여 활성화되면 CD69 marker가 해당 세포의 표면에 발현되며, 이는 자극에 대해 T cell이 활발한 반응을 하고 있음을 의미한다.

본 연구는 RIF 및 RSA 환자에서 CD4⁺ 세포질 내 TNF-α와 INF-γ와 같은 Th1 사이토카인과 IL-10과 같은 Th2 사이토카인의 발현도를 측정하여 연구군에서 Th1 면역반응이 항진되어 있음을 확인하였으며, 이들 환자군에서 말초혈액 내 CD154 또는 CD69의 발현으로 표현되는 T 림프구의 활성화 또한 유의하게 증가함을 확인하였다. 이는 RSA를 주 대상으로 T 림프구의 활성화와 Th1 면역반응의 우세

를 연구한 기존의 연구들에 부합하는 결과로, RIF 환자들에서도 같은 병리를 확인하였다는 의의가 있으나, 연구군 규모의 문제로 RIF 환자들로만 소그룹 분석을 따로 시행하지 못한 한계가 있다. 향후 좀 더 많은 환자를 대상으로 실험하여 동일한 결과가 도출되는가에 대한 추가 연구가 필요하며, RIF 환자들에서 T 림프구의 활성화를 억제하거나, TNF- α 의 분비를 조절함으로써 좋은 임신결과를 얻을 수 있는가에 대한 연구 또한 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Wilczynski JR. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? *Hum Immunol* 2006; 67: 492-511.
2. Quack KC, Vassiliadou N, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion. *Hum Reprod* 2001; 16: 949-55.
3. Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Hum Reprod* 2002; 17: 2439-44.
4. Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18: 767-73.
5. Noelle RJ. CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 1996; 4: 415-9.
6. Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1125-8.
7. Ziegler SF, Levin SD, Johnson L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol* 1994; 152: 1228-36.
8. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yague E, et al. Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1253-9.
9. Santamaria M, Marubayashi M, Arizon JM, Montero A, Concha M, Valles F, et al. The activation antigen CD69 is selectively expressed on CD8+ endomyocardium infiltrating T lymphocytes in human rejecting heart allografts. *Hum Immunol* 1992; 33: 1-4.
10. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6.
11. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
12. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001; 13: 219-27.
13. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 447-58.
14. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1853-61.
15. Rezaei A, Dabbagh A. T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR607-10.
16. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-9.
17. Martin M, Metzger DJ, Michalek SM, Connell TD, Russell MW. Distinct cytokine regulation by cholera toxin and type II heat-labile toxins involves differential regulation of CD40 ligand on CD4(+) T cells. *Infect Immun* 2001; 69: 4486-92.

= 국문초록 =

목적: 반복적 유산 또는 반복적 착상실패 환자의 T 림프구의 Th1 면역반응 정도를 알아보고, T 림프구 활성화 정도를 분석하고자 하였다.

연구방법: 반복적 유산 및 반복적 착상실패를 경험한 37명의 환자를 연구군으로 설정하고, 유산이나 불임의 병력이 없이 정상분만의 경력이 있는 11명의 가임 여성을 대조군으로 모집하였다. 유세포분석기를 이용하여, 이들의 말초혈액 중 T helper 세포 내 TNF- α 와 INF- γ 및 IL-10의 발현도를 측정하고 Th1/Th2 세포 비율 (TNF- α /IL-10 및 INF- γ /IL-10 발현도)을 계산하여 Th1 면역반응의 우세 정도 및 T 림프구의 활성도를 분석하였으며, 활성화 표지자인 CD154와 CD69 발현 정도를 비교하였다.

결과: 연구군의 평균연령은 35.3 \pm 4.3세였으며, 이들에게서 T helper cell 내 TNF- α /IL-10의 발현 비율이 대조군에 비해 유의하게 높았고 (42.1 \pm 2.3 vs. 28.7 \pm 2.7, $p=0.002$), CD154와 CD69의 발현율 또한 대조군에 비해 전반적으로 높았다. CD154의 경우, T helper cell (1.7 \pm 0.5 vs. 0.3 \pm 0.2, $p=0.038$)과 T suppressor cell (0.6 \pm 0.2 vs. 0.1 \pm 0.0, $p=0.024$) 모두에서 유의하게 높은 발현을 보인 반면, CD69의 경우, 전체 T 림프구 (5.6 \pm 1.9 vs. 1.3 \pm 5.4, $p=0.046$)와 T suppressor cell (4.8 \pm 1.3 vs. 1.8 \pm 0.2, $p=0.035$)에서 통계적으로 높은 발현을 확인할 수 있었다.

결론: 반복적 유산 및 반복적 착상실패를 보이는 여성에서 T 림프구의 활성화도와 Th1 면역반응이 증가하였으며 이는, 이들 여성에서 활성화된 T 림프구가 Th1 면역반응을 유도하여 초기 임신의 유지와 착상에 좋지 않은 영향을 미치기 때문으로 생각된다.

중심단어: T 림프구 활성화, Th1 면역반응, 반복적 유산, 반복적 착상실패