

습관성 유산환자 단핵구에서의 CD56/CD16 항원 표현과 혈청 TNF- α 정량

김혜련¹ · 박애자¹ · 이미경¹ · 조동희²

중앙대학교 의과대학 진단검사의학과교실¹, 성균관대의대 삼성제일병원 진단검사의학과²

CD56/CD16 Expression on Mononuclear Cells and Concentration of Serum TNF- α in Recurrent Spontaneous Abortion

Hye-Ryoun Kim, M.D.¹, Ae-Ja Park, M.D.¹, Mi-Kyung Lee, M.D.¹, and Dong-Hee Cho, M.D.²

Departments of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine¹ and Sungkyunkwan University School of Medicine, Cheil General Hospital², Seoul, Korea

Background : Recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined as the occurrence of three or more consecutive spontaneous abortion before 20 gestational weeks. But, 40-50% of RSA still remain "unexplained". Cytokines seem to play a critical role in the pathogenesis of unexplained RSA, and Th1 cytokines have been shown to exert deleterious effects on pregnancy. NK cytotoxicity has been reported to be predictive of subsequent abortion in women who had unexplained recurrent abortions. The aim of this study was to investigate immunophenotypic characteristics of peripheral blood mononuclear cells and evaluate Th1 cytokine (TNF- α) production in women with RSA.

Methods : The study group comprised 93 women with RSA, and the control group consisted of 40 healthy pregnant women. The population of CD56/CD16 cells was observed by using a two-color scattergram in FACScan (Becton Dickinson, San Jose CA, USA). Concentration of TNF- α was measured by an enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) using commercial kits (NEOGEN corporation, Lexington KY, USA).

Results : The percentage of CD56+/CD16- cells were significantly higher ($P<0.05$) in the patients with RSA ($13.40 \pm 7.95\%$) than in the pregnant control group ($9.12 \pm 3.93\%$). We observed a significantly higher level of TNF- α (medians: 85.59 ± 8.29 pg/mL versus 44.80 ± 9.78 pg/mL; $P<0.05$) in RSA women compared to controls.

Conclusions : This study indicates that an increased proportion of CD56+/CD16- mononuclear cells and increased level of serum TNF- α are related to RSA. Thus, the two factors could be used as an indicator of subsequent successful implantation and maintenance of gestation. (*Korean J Lab Med* 2006;26:198-203)

Key Words : Recurrent spontaneous abortion, CD56+/CD16- mononuclear cell, Tumor necrosis factor- α

서론

접 수 : 2006년 2월 17일 접수번호 : KJLM1929
수정본접수 : 2006년 5월 22일
게재승인일 : 2006년 5월 23일
교신저자 : 박애자
우 140-757 서울시 동작구 흑석동 224-1
중앙대학교병원 진단검사의학과
전화 : 02-6299-2718, Fax : 02-6263-6410
E-mail : ajcp@unitel.co.kr

*본 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

습관성 유산은 임신 20주 이전에 연속하여 3회 이상 임신이 자연 종료되는 것을 말한다[1]. 이는 임신의 약 15%에서 생길 수 있는 가장 흔한 합병증 중의 하나이며 그 중 50-60%는 태아의 염색체 이상, 감염, 모체의 내분비적 이상 또는 해부학적 이상이 원인이고 그 외 40-50%는 아직 원인을 알 수 없다[2]. 모태 면역계

의 부계 항원 인지 여부가 임신 유지에 중요하며 이를 면역학적으로 설명하나 아직까진 정상 임신에서 태아가 모태의 면역계로부터 안전하게 보호되는 기전이 모두 밝혀지지는 않았다[3].

면역에 관여하는 T helper (Th) 세포들은 시토카인(cytokine)을 생성하며, 작용하는 시토카인에 따라 Th1과 Th2 림프구로 나누어진다. 각각의 시토카인들은 습관성 유산의 병태생리에 결정적인 역할을 할 것으로 생각되어지며, Th1 림프구에서 생성하는 시토카인들은 태아의 성장과 발육을 저해하고 Th2 림프구의 시토카인들은 성공적인 임신에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다[4, 5]. Hill 등은 정상 임신에서 말초 혈액의 단핵 세포를 자극 시켰을 때 Th2에서 IL-4와 IL-10의 분비가 증가되고 Th1에서 IFN- γ 나 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 분비가 관찰되지 않아 정상 임신에서 습관성 유산보다 IL-4와 IL-10은 증가되어 있고 TNF- α 의 혈중 농도는 감소되어 있었다고 보고하였다[6].

말초 혈액의 자연살 림프구는 전체 림프구의 4-10%이며 3개의 다른 항원 표현형으로 나타난다. CD56+/CD16+와 CD56-/CD16+ 군이 약 90%를 차지하며 나머지는 이 두 군에 비하여 세포 독성이 약한 CD56+/CD16-군인 것으로 알려져 있다[7]. 말초 혈액의 자연살 림프구의 양과 활성도는 습관성 유산과 관련이 있어 자연살 림프구의 기능적인 분석이 임신 성공의 감시와 치료에 유용하게 사용되어져 왔다[8-10]. 면역 항체나 동종 림프구의 정맥 주사 치료는 결과적으로 자연살 림프구의 활성도를 떨어뜨려 임신을 잘 유지시켜 주게 되는 것이며, 그 중 말초 혈액 CD56+ 자연살 림프구는 습관성 유산에서 정상 임신에 비하여 증가되어 있어 습관성 유산 환자에서 임신 실패 여부를 예견하는 인자로 쓸 수 있다고 하였다[11, 12]. 또한 자연살 림프구가 IFN- γ , TNF- α 와 IL-2 등에 의해 Lymphokine activated killer (LAK) 세포로 전환되면 영양막(trophoblast)를 파괴시켜 유산의 원인이 될 수 있다고도 하였다[13].

이에 본 연구에서는 습관성 유산과 정상 산모의 말초 혈액에서 CD56과 CD16을 측정하여 습관성 유산을 예견할 수 있는 인자로

단핵구 중 어떤 세포표현형이 의미가 있는지 알아 보고 자연살 림프구가 LAK 세포로 전환되는 데 영향을 주는 시토카인 중 하나인 TNF- α 의 정량 검사를 실시하여 습관성 유산 예측 인자로 사용할 수 있는지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2004년 8월부터 2005년 8월까지 본원에 내원한 임신 20주 이전에 3회 이상 유산한 경험이 있는 환자를 습관성 유산으로 정의하여 93명을 대상으로 하였고 이때 유산 경험이 없는 임신부 40명을 정상 대조군으로 하였다. 습관성 유산 환자군이나 정상 대조군 모두 정기적인 검진을 위해 내원한 경우를 대상으로 하였다. 습관성 유산 환자군의 임신 주수는 4주에서 12주 사이에 정상 대조군은 7주에서 12주 사이인 초기 임신(first trimester) 상태에서 검체를 채취하였다. 습관성 유산 환자군은 임신 전에 기본 검사인 자궁난관 조영술, 복강경, 자궁 내시경, 배란초음파 검사, 배란 7일 후 황체호르몬 검사, 자궁내막 검사, 자가항체 검사(항카디오리핀 항체, 항핵 항체, 항DNA 항체, 항갑상선글로부린 항체, 루푸스 항응고인자), 감염검사(TORCH), 그리고 부부의 염색체 검사 등을 시행하였다. 이런 검사를 통해 염색체이상, 자궁의 형태적 이상, 내분비이상 및 감염에 의한 습관성 유산 등을 제외시켰다.

2. 방법

1) 이중 염색 세포 표지자를 이용한 CD56과 CD16의 분석

두 군의 말초혈액을 채혈하여 각각의 검체 100 μ L를 튜브(BD Falcon, Cat. No. 352008)에 넣고 형광 표지자가 부착된 단클론성 항체(Monoclonal Antibody: mAb, Becton Dickinson, San

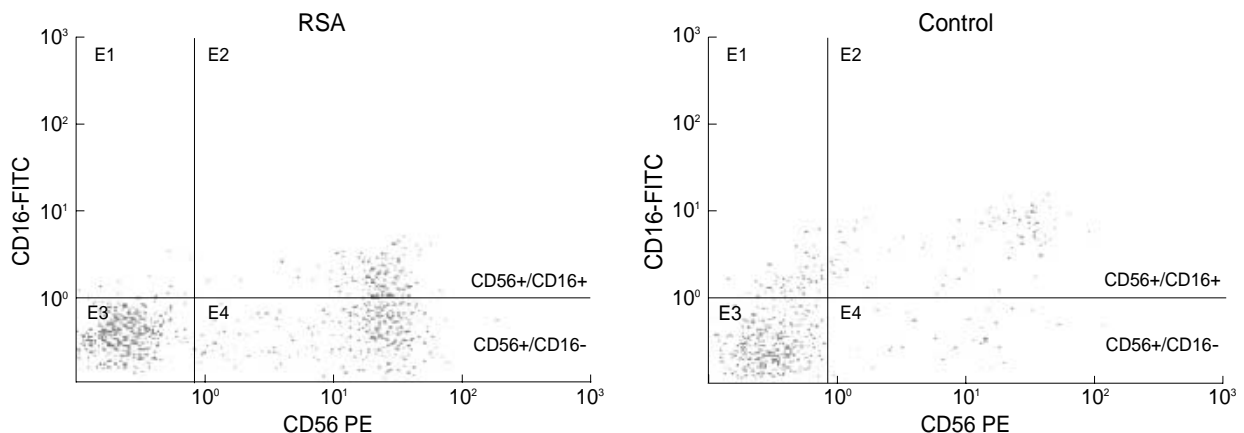


Fig. 1. Two color flow cytometric analysis of peripheral mononuclear cells from recurrent spontaneous abortion and control individuals. The X-axis represents the CD56-PE and the y-axis the CD16-FITC. The percentage in the upper right represents the CD56+/CD16+ mononuclear cells, and the lower right quadrant represents the percentage of CD56+/CD16- mononuclear cells.

Abbreviation: RSA, recurrent spontaneous abortion.

Jose CA, USA)인 항CD16-FITC와 항CD56-PE를 각각 20 μ L 씩 검체에 넣었고 잘 혼합 후 실온 암소에서 20분간 반응시켰다. 여기에 2 mL의 1×FACS lysing solution (X10, Cat. No. 349202, Becton Dickinson, San Jose CA, USA)를 넣고 암소, 실온에서 10분간 방치하여 적혈구를 용해시켰으며, 2 mL의 PBS 완충액으로 2회 세척 후 PBS 완충액 1 mL로 세포를 부유시켜 FACSscan (Becton Dickinson)를 이용하여 측정하고 분석하였다(Fig. 1). 데이터 분석은 isotype control을 포함하여 FACSscan (Becton Dickinson)에서 CellQuest™을 이용하여 분석하였다.

2) TNF-alpha 정량

TNF-alpha 농도는 TNF-alpha에 대한 토끼의 다클론 항인 TNF-alpha 항체를 붙이고 항 토끼 항체에 대해 발색을 시켜 측정하는 Sandwich ELISA (NEOGEN corporation, Lexington KY, USA) 방법으로 측정하였다. 검체는 혈청을 이용하였으며 측정된 흡광도와 양을 알고 있는 표준 곡선의 흡광도와 비교하여 농도를 구하였다.

3) 통계학적 분석

습관성 유산 환자군과 대조군의 단핵구 항원과 TNF-alpha의 농도의 비교는 Student t-test를 하였으며, 통계 프로그램은 Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 사용하였다. 자료는 평균값±표준편차로 나타내었다. $P<0.05$ 이면 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 습관성 유산 환자와 대조군의 비교

습관성 유산군 93명과 대조군 40명의 평균 연령과 표준 편차는 각각 31.0 ± 3.27 년과 31.3 ± 2.95 년이었고, 임신 주수에 따른 검체 채취 시기도 7.36 ± 3.49 주와 8.68 ± 2.09 주로 통계학적 차이는 없었다($P>0.05$). 습관성 유산 환자군에서는 검체 채취 후 면역글로부

Table 1. Mononuclear cells in patients with a history of recurrent abortions and in control individuals

Mononuclear cells	RSA patients (n=93) % positive MN cells	Controls (n=40) % positive MN cells	Significance (P) [†]
CD56+	$23.78\pm8.59^*$	23.60 ± 6.33	NS
CD16+	12.38 ± 6.73	19.39 ± 8.30	NS
CD56+/CD16+	10.40 ± 6.61	14.35 ± 5.21	$P<0.05$
CD56+/CD16-	13.40 ± 7.95	9.12 ± 3.93	$P<0.05$
CD56-/CD16+	1.99 ± 1.35	5.06 ± 4.27	NS

*Expressed as mean \pm standard deviation; [†] $P<0.05$, Significant difference in % positive mononuclear cells between the recurrent spontaneous abortion patients and the controls.

Abbreviations: RSA, recurrent spontaneous abortion; MN, mononuclear; NS, statistically non significant.

린 치료를 받은 경우도 있었다. 습관성 유산군과 대조군에서 각각 8명과 5명이 추적검사를 시행하지 못해 정상 분만 여부를 확인할 수 없었으며 추적검사 결과 습관성 유산군에서 14명(16.5%)이 대조군에서 2명(5.7%)이 자연 유산되었다.

2. 습관성 유산 환자와 대조군의 세포표현형 비교

유세포분석기에서 단핵구를 대상으로 이중 염색 표지 방법으로 측정된 CD56+ (CD56+/CD16+와 CD56-/CD16-의 합계) 세포와 CD16+ (CD56+/CD16+와 CD56-/CD16+의 합계) 세포의 수는 습관성 유산 환자군과 대조군 두 군 사이에 통계학적 의의가 없었으나($P>0.05$), CD56+/CD16- 단핵구 수는 습관성 유산 환자군에서 $13.40\pm7.95\%$ 로, 대조군의 $9.12\pm3.93\%$ 보다 유의하게 증가되어 있었다($P<0.05$). 또한 CD56+/CD16+ 단핵구 수는 습관성 유산 환자군에서 $10.40\pm6.61\%$ 로, 대조군의 $14.35\pm5.21\%$ 보다 유의하게 감소되어 있었다($P<0.05$) (Table 1).

3. 습관성 유산 환자와 대조군의 시토카인(TNF- α)의 비교

TNF-alpha의 농도는 환자군에서 85.59 ± 8.29 (pg/mL)와 대조군에서 44.80 ± 9.78 (pg/mL)로 환자군에서 유의하게 증가되어 있었다($P<0.05$) (Fig. 2).

고 찰

골수에서 생성된 자연살 림프구는 초기 성숙 과정 중에 말초혈액을 순환하고 이 중 인테그린 $\beta_2\alpha_L$ (integrin $\beta_2\alpha_L$)과 상호작용을 한 림프구는 말초혈액에 남아 있고 탈락막 혈관 내피세포의 세

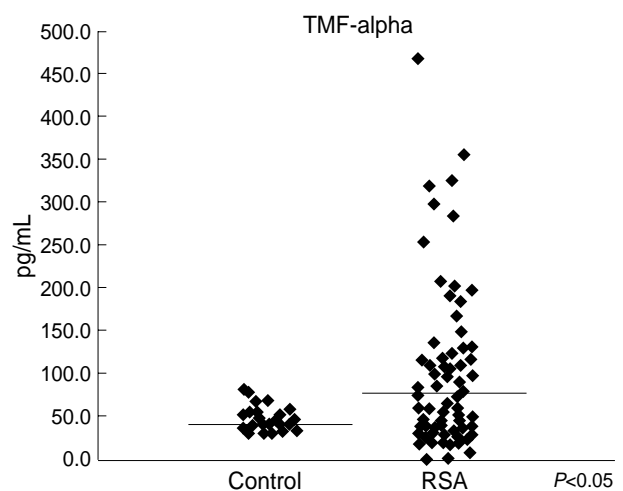


Fig. 2. Distribution of TNF-alpha concentration in controls individuals and patients with recurrent spontaneous abortion. Median is indicated on the graph with a line.

Abbreviation: RSA, recurrent spontaneous abortion.

포내 부착분자 1 (intracellular adhesion molecule-1)과 상호작용한 자연살 림프구는 자궁내막과 탈락막으로 이동하는 것으로 생각되고 있다[14]. 말초혈액의 자연살 림프구는 보통 CD56 항원과 CD16 항원을 발현하고 그 외에도 CD94, CD69, CD128, CD122 그리고 CD25 등을 발현하는 것으로 알려져 있으나[15], 세포 독성이 강한 탈락막의 LAK 세포는 전형적인 자연살 림프구 항원인 CD56은 발현하나 CD16, CD3과 같은 항원은 발현하지 않아 말초혈액의 자연살 림프구와는 다른 항원표현형을 가진다. 아직 그 정확한 기능은 밝혀지지 않았으나 과다한 영양막의 침입을 조절하고 국소 감염을 예방하며[16], 착상과 임신 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 임신 초기가 지난 후에는 감소하는 것으로 보고되고 있다[17]. 말초혈액과 탈락막에 있는 자연살 림프구의 면역표현형은 서로 다르나 말초혈액의 단핵구 중 탈락막 LAK 세포와 같은 면역표현형을 보이는 세포가 탈락막의 LAK 세포의 기능적 상태를 반영할 수 있다고 생각되어져 검체 채취가 용이한 말초혈액을 사용한 면역표현형 연구가 계속되고 있다[15]. 습관성 유산 환자의 말초혈액에서 CD56+ 세포가 정상 임신군보다 높다는 보고가 있으며 유세포분석기의 형광 강도에 따라 CD56의 발현을 bright와 dim으로 나누어 비교하는 CD56의 아집단(subset) 평가가 중요하다는 보고도 있다[18].

본 연구에서는 말초혈액에서 탈락막과 자궁내막에 나타나는 LAK 세포와 같은 면역표현형을 가지는 세포의 존재를 확인하기 위하여 CD56과 CD16을 이중 염색을 이용하여 유세포분석기로 분석하여 보았다. 전체 CD56+ 또는 CD16+ 세포는 습관성 유산군과 정상 임신군에서 차이를 발견할 수 없었으나 탈락막이나 자궁내막의 주 림프구로 알려져 있는 CD56+/CD16-인 LAK 세포는 습관성 유산군에서 의미있게 증가되어 있었다. 이는 검체를 얻기 어려운 탈락막이나 자궁내막에 비하여 말초혈액에서 유세포분석기를 이용해 쉽게 얻을 수 있는 결과여서 의미가 있었으나 말초혈액의 단핵구를 bright와 dim CD56으로 나눈 분석은 시도하였으나 두 군을 명확히 나뉘줄 수 없어 분석할 수 없었다.

습관성 유산 환자 탈락막에서 CD69+/CD25+ T 세포가 증가하였고 말초혈액에서도 CD69+인 자연살 세포가 습관성 유산군에서 증가되었다는 보고는 말초혈액에서 나타나는 항원이 의미있게 탈락막을 반영할 수 있다는 증거이다[15, 19]. 이에 말초혈액의 CD56+/CD16- 단핵구가 탈락막의 그것을 반영해 줄 수 있으며 습관성 유산 환자군에서 말초혈액의 CD56+/CD16- 단핵구 항원을 검사하여 임신 유지 여부를 예견할 수 있을 것으로 생각된다.

정상인 말초혈액의 CD56+/CD16- 림프구는 비교적 세포 독성이 약한 편으로 알려져 있으나 습관성 유산 환자군의 탈락막 및 말초혈액에서 증가된 CD56+/CD16- 림프구는 좀더 강력한 세포 독성을 보인다. 이는 CD56+/CD16- 림프구가 다양한 시토카인을 분비하고 또한 그 시토카인에 대한 수용체가 있어 시토카인이 다시 CD56+/CD16- 림프구를 활성화시키는 것으로 생각되어 진다. 1993년 Th1 시토카인이 CD56+/CD16- 림프구를 활성화시켜 유산을 유발하는 것을 보고하였고 IL-2가 CD56+/CD16- 림

프구에서 영양막에 대한 세포독성을 유발하는 것을 실험적으로도 증명하였다[20, 21]. 그래서 CD56+/CD16- 림프구의 주 기능은 세포 자체를 파괴시키는 것이 아니라 다양한 시토카인을 분비시켜 이 시토카인들이 영양막들의 성장을 촉진, 저해하고 또는 영양막을 공격하는 탐식구(macrophage)를 활성화시키기도 한다는 것이 알려졌다[22, 23].

다양한 연구에서 습관성 유산에서 Th1/Th2 시토카인의 비를 보고하였으며 Th1 시토카인은 임신 실패에 Th2 시토카인은 임신 유지에 영향을 준다고 하며 Th1 시토카인 중 하나인 TNF- α 는 배아독성의 원인이 되기도 한다[24, 25]. TNF- α 는 프로스타글란딘의 합성을 증가시키고 프로스타글란딘은 자궁 수축을 시작시키며 세포자멸사를 초래하고 혈관에 혈전을 일으켜 배아로 가는 혈류를 감소하게 한다. 이런 결과로 TNF- α 는 유산에 중요하며 TNF- α 치가 증가되어 있는 것이 유산을 미리 예견할 수 있는 인자로 생각되어 진다[25]. 또한 Th2 시토카인의 경우는 태반의 발달과 임신 유지에 중요하다는 연구도 있지만 의미있게 차이가 없다는 연구도 있다[26, 27]. 이에 결론적으로 TNF- α 의 증가가 다른 Th2 시토카인의 감소보다 임신 실패에 치명적인 인자로 생각되어 진다. 본 실험에서도 TNF- α 치가 습관성 유산 환자에서 정상 임신군에 비해 의미있게 증가했으며 이 결과는 TNF- α 를 포함한 Th1 면역이 반복 유산에서 중요한 작용을 한다는 그 전의 결과들을 뒷받침해주는 결과로 생각된다.

결론적으로 습관성 유산군과 정상 대조군에서 유산을 예견하는 지표로 총 CD56+ 단핵구를 단독으로 측정하는 것보다 이중 염색을 이용하여 CD56+/CD16- 단핵구를 측정하는 것이 더 효과적일 것으로 사료되며 혈청 내 TNF- α 의 정량은 유산을 예견할 수 있는 단독 시토카인으로 중요하나 향후 임신 주수에 따른 추가 검사나 다른 시토카인과 함께 검사를 시도하여 분석할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

배경 : 습관성 유산은 임신 20주 이전에 연속하여 3회 이상 임신이 자연 종료되는 것을 말한다. 아직 40-50%에서 정확한 원인을 알 수는 없으나 시토카인이 중요한 인자로 인식되어 있다. Th1 시토카인은 임신에 유해하고 자연살 림프구의 세포독성도 임신 유지에 영향을 미쳐 유산 예견 인자로 사용할 수 있다고 한다. 본 연구에서는 습관성 유산군에서 말초혈액 단핵구에서 항원의 특성과 Th1 (TNF- α) 생성의 차이를 알아보고자 하였다.

방법 : 3회 이상의 유산 경험이 있는 습관성 유산 환자 93명과 정상 대조군으로 건강 산모 40명을 대상으로 하였다. 말초 혈액에서 CD56과 CD16은 단핵구를 각각의 형광항체로 이중 염색을 시행한 후 FACSscan (Becton Dickinson, San Jose CA, USA)으로 측정하고 분석하였다. 혈청 TNF- α 정량은 ELISA (NEOGEN corporation, Lexington KY, USA)방법으로 측정하였다.

결과 : 단핵구에서 CD56+/CD16-의 항원은 습관성 유산균이 정상 대조군 보다 유의하게 증가되어 있었다($13.40 \pm 7.95\%$ vs $9.12 \pm 3.93\%$, $P < 0.05$). 또한 혈청 TNF- α 의 농도도 습관성 유산 환자군이 정상 대조군에 비해 증가된 소견이었다(85.59 ± 8.29 pg/mL vs 44.80 ± 9.78 pg/mL, $P < 0.05$).

결론 : 본 연구 결과 습관성 유산에서 말초 혈액 내 CD56+/CD16- 단핵구와 혈청 TNF- α 의 양이 의미있게 증가되어 있어, 임신부에서 이 두 인자를 성공적인 임신 유지 여부를 예견할 수 있는 지표로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

- Regan L and Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:839-54.
- Druckmann R and Druckmann MA. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:389-96.
- Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003;9:163-74.
- Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-82.
- Choudhury SR and Knapp LA. Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update* 2001;7:113-34.
- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortions. *J Am Med Assoc* 1995;273:1933-6.
- King A, Hiby SE, Verma S, Burrows T, Gardner L, Loke YW. Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:459-62.
- Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-2.
- Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:40-6.
- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, et al. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:132-6.
- 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 abortions. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:370-5.
- Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, Pando M, Larriba J, Irigoyen M, et al. Is the paternal mononuclear cells' immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol* 2000;44:129-35.
- Clark DA. Are there immune abortions? *Res Immunol* 1990;141:202-7.
- Moller MJ, Kammerer R, von Kleist S. A distinct distribution of natural killer cell subgroups in human tissues and blood. *Int J Cancer* 1998;78:533-8.
- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, et al. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001;16:855-61.
- Day CP, Grove J, Daly AK, Stewart MW, Avery PJ, Walker M. Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia* 1998;41:430-4.
- King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989;24:195-205.
- Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996;156:4027-34.
- Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1999;14:1194-200.
- 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.
- Ferry BL, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW. Cytotoxic activity against trophoblast and choriocarcinoma cells of large granular lymphocytes from human early pregnancy decidua. *Cell Immunol* 1991;132:140-9.
- Loke YW and King A. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997;3:153-9.
- Hunt JS and Robertson SA. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol* 1996;32:1-25.
- Carp HJ, Toder V, Mashiach S, Nebel L, Serr DM. Recurrent miscarriage: a review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. *Obstet Gynecol Surv* 1990;45:657-69.
- Gilstrap LC 3rd, Hauth JC, Bell RE, Ackerman NB Jr, Yoder BA, Delemos R. Survival and short-term morbidity of the premature neonate. *Obstet Gynecol* 1985;63:37-41.
- Arslan E, Colakoglu M, Celik C, Gezginc K, Acar A, Capar M, et al. Serum TNF- α , IL-6, Lupus anticoagulant and anticardiolipin antibody in women with and without a past history of recurrent miscarriage. *Arch Gynecol Obstet* 2004;270:227-9.

27. Lockwood CJ, Romero R, Feinberg RF, Clyne LP, Coster B, Hobbins JC. The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant

and anticardiolipin antibodies in a general obstetric polulation. Am J Obstet Gynecol 1989;161:369-73.