

IN VITRO SUPPRESSION OF NATURAL KILLER CELL CYTOLYTIC ACTIVITIES BY PREDNISOLONE IN PATIENTS WITH HISTORY OF UNEXPLAINED RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION AND ELEVATED PERIPHERAL BLOOD NK CELL FRACTION

Hyun Suk Ahn, MD¹, Sun Hwa Cha, MD¹, Hwa Seon Koo, MD¹, Ju Youn Bae, MD¹, Ji Hee Yoo, MD¹, In Ok Song, MD¹, Hyun Kyoung Ahn, MD¹, Su Jin Hwang, MS², Dong-Wook Park, PhD³, Kwang Moon Yang, MD¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Laboratory of Molecular Oncology, ³Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Cheil General Hospital, Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective

We aimed to evaluate the effect of prednisolone (PDS) on natural killer cell (NK cell) cytolytic activity *in vitro*.

Methods

Blood samples from 74 patients with history of unexplained recurrent spontaneous abortion who elevated peripheral blood NK cell fraction were collected prospectively. Peripheral blood monocytes which containing NK cells were isolated and separated to three different tubes which containing target (K562) cells by the 50:1 effector to target (E:T) ratio. PDS or intravenous immunoglobulin (IVIG) was additionally added to 2 tubes for evaluate their suppressive effect. The percentage killing of target cells was recorded numerically by using flow cytometer and the values between groups were statistically analyzed.

Results

The mean target cell killing percentage was 40.5% in co-culture tube which was not added PDS or IVIG. In culture experiments which was added IVIG, the killing percentage is reduced to 37.7% which showed no significant differences compared to that of co-cultured tube which was not added PDS or IVIG. But, in experiments with added PDS, the killing percent was reduced to 19.5% and the difference was statistically significant ($P<0.001$) compared to that of co-cultured tube which was not added PDS or IVIG. On comparing the reduction in killing percentage of target cells by PDS and IVIG, statistically significant reduction in the PDS co-culture was noted ($P<0.005$).

Conclusion

NK cell cytolytic activity is effectively down-regulated by using PDS *in vitro*. Moreover, the effect of PDS in down-regulation of NK cell cytolytic activity is seems to superior than that of IVIG. But, large scaled *in vivo* study is needed.

Keywords: Recurrent miscarriage; Natural killer cell cytolytic activity; Prednisolone

습관성유산(recurrent spontaneous abortion, RSA)은 임신 20주 이전에 3번 이상 자연적으로 임신이 소실되는 경우를 말하며 전체 임신부의 약 1%의 빈도로 보고되고 있다[1]. 습관성유산의 원인으로는 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[2], 이 중 자가항체에 기인한 자가면역과 다양한 면역세포의 역할에 기인한 동종면역의 기전으로 설명되는 면역학적 요인에 대한 관심이 최근 증가하고 있다.

습관성유산 동종면역학적 기전에 관련된 면역세포에는 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)는 T 세포(T cell), B 세포(B cell), 대식세포

Received: 2011. 3. 7. Revised: 2011. 4.17. Accepted: 2011. 6.10.
Corresponding author: Kwang Moon Yang, MD, PhD
Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital and Women's Health Care Center, Kwandong University College of Medicine, 1-19 Mukjeong-dong, Jung-gu, Seoul 100-380, Korea
Tel: +82-2-2000-7545 Fax: +82-2-2000-7790
E-mail: km1yang@naver.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

(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[3]. 임신중 태아에 대한 모체의 면역반응에 관여하는 세포들 중 착상과 임신을 유지하는 과정에서의 NK 세포의 역할에 대한 연구가 비교적 활발히 이루어지고 있으며, 습관성유산, 불임(infertility), 그리고 전자간증(pre-eclampsia) 같은 병리학적 기전들과 관련성이 있음이 보고되고 있다[4-7].

말초혈액에서 NK 세포(peripheral blood NK cell, pbNK cell)는 대부분이 CD56, CD16 세포 표면 항원을 발현하고 강한 세포 독성(cytotoxicity)을 가지는 반면 CD56 세포 표면 항원은 강하게 발현하지만 CD16 세포 표면 항원은 발현하지 않는 자궁내 NK 세포(decidual NK cell)는 세포독성은 약하고 다양한 종류의 cytokine을 분비하는 특징을 가지는 것으로 보고되고 있다[8,9].

기존의 여러 연구에 의하면 정상임신 초기에는 말초혈액내 NK 세포 세포용해 활성도(cytolytic activity)와 면역세포 중 차지하는 비율(fraction)은 감소하는 반면 습관성유산 환자에서는 의미 있게 증가되어 있고, 임신 전에 측정된 경우에도 역시 습관성유산의 기왕력이 있는 여성에서 NK 세포의 분획이 더 높았다[4,6,10,11]. 따라서 NK 세포의 세포용해 활성도 또는 분획의 증가는 습관성유산의 위험성을 증가시키는 원인으로 보고되었으며, NK 세포의 면역작용에 대한 성공적인 조절이 임신의 성공 및 유지에 중요한 요소라는 결론이 제시된 바 있다[4-7,11,12].

정맥내 면역글로불린 주사(intravenous immunoglobulin, IVIG)는 면역이상에 기인한 여러 질환의 치료에 이용되어 왔으며[13], 그 작용 기전은 활성화된 말초혈액 림프구의 자연 과사를 촉진시키는 역할에 있다고 알려진 바 있다[14]. 한편, IVIG의 투여가 비 정상적 면역체계에 그 원인이 있는 습관성유산의 기왕력을 가진 환자의 치료에 효과가 있음이 보고되었다[15,16]. 그러나 아직까지 면역학적 원인의 습관성유산 환자에서 면역글로불린 치료의 효과에 대해서 논란이 되고 있는데, 1995년 Coulam 등[17]과 Christiansen 등[18]은 면역글로불린과 위약의 임신 성공률을 비교한 연구에서 각각 62.1% vs. 34.4% (odds ratio [OR], 3.12), 52.9% vs. 29.4% (OR, 2.70)으로 면역글로불린이 습관성유산 환자의 반복되는 유산의 방지에 효과가 있음을 보고하였으나, 이 연구 결과는 1994년 German RSA/IVIG group [19]과 1998년 Stephenson 등[20]의 60.6% vs. 67.7% (OR, 0.73), 50.0% vs 52.6% (OR, 0.90)로 의미 있는 효과가 없다는 보고와 서로 상반된 결과를 보였다. 한편, 국내에서 Kim 등[21]은 3회 이상의 반복적 자연유산을 경험한 습관성유산 여성에서 습관성유산의 기왕력이 없는 여성에 비해 유의하게 임신 전 말초혈액 림프구의 CD56⁺ NK 세포의 백분율이 높음(8.9% vs. 24.5%)을 보고하였고, CD56⁺ NK 세포가 15% 이상 증가된 습관성유산의 기왕력이 있는 여성에서 저용량의 면역글로불린을 주사함으로써 치료하지 않은 군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 생존분만을 획득할 수 있다고 보고하였다[22].

프레니솔론은 착상부전, 습관성유산 등의 NK 세포 또는 여러 가지 항염증성 사이토카인을 포함하는 면역학적 원인을 치료하는 데 도움이 된

다는 보고가 있다[23-29]. NK 세포에서 글루코 코르티코이드 수용체는 세포의 표면에서 발견되고 있으나[30], 프레드니솔론이 NK 세포의 활성을 억제하는 것과 연관된 기전으로는 NK 세포 표면의 Nkp44 수용체에 길항적으로 작용하는 것과 알려져 있다[31]. 한편, Thum 등[32]은 불임 또는 습관성유산 환자의 말초혈액을 이용하여 생체 외에서 프레드니솔론이 NK 세포의 세포용해능을 현저하게 억제하며 이는 면역글로불린의 NK 세포 세포용해능 억제 효과와 유사함을 보고하였다.

본 연구에서 저자들은 그 원인을 알 수 없는 습관성유산 환자 중 말초혈액 NK 세포 증가에 기인한 동종면역 요인이 진단된 습관성유산 환자들의 혈액을 이용하여 프레드니솔론의 NK 세포 세포용해 활성도 억제에 대한 효과에 대해 생체외적으로 평가하고자 하였고 그 효과를 면역글로불린의 투여와 비교하고자 하였다.

연구대상 및 방법

본 연구는 2010년 4월부터 2010년 12월까지, 임신 20주 이전에 2번 이상의 자연유산을 경험 후 관동대 제일병원 습관성유산 클리닉을 방문한 여성을 대상으로 전향적으로 진행되었다. 모든 환자군은 습관성유산을 진단하기 위한 기본적인 검사, 즉 자궁난관조영술, 복강경 및 자궁경 검사, 자궁경부근배양검사, 부부염색체검사, 자가면역원인에 대한 검사로 항갑상선 항체(anti-thyroid antibody) 루프스 항응고 항체(lupus anti-coagulant) 및 항인지질 항체(anti-phospholipid antibody) 등에 대한 검사가 실시되었고, 그 원인이 밝혀지지 않은 환자에서 동종면역 원인을 진단하기 위해 말초혈액 NK 세포의 백분율 측정, 배란 7일 후 황체호르몬검사, 자궁내막검사를 시행하여 그중 원인이 NK 세포의 증가에 기인한 면역학적 요인의 경우를 실험군에 포함하였고, NK 세포의 증가에 의한 반복유산의 진단의 정의는 임신전 말초혈액을 채취하고 NK 세포의 백분율을 측정하여 15% 이상이 되는 경우로 정의하였으며, 단핵세포군에 대한 말초혈액 NK 세포의 분획 및 세포용해 활성도 등에 대한 검사를 실시하였다. 사전검사 결과에 따라 해부학적, 유전적 또는 감염에 의한 유산의 기왕력이 있는 환자 및 자기항체가 양성 결과를 보인 환자들은 연구 대상에서 제외하였으며 습관성유산의 원인이 말초혈액 NK 세포의 증가에 기인한 동종면역 원인에 국한된 74명의 여성을 연구 대상으로 최종 선정하였다.

1. CD3⁺/CD56⁺/CD16⁺ pbNK 세포 분획(fraction) 측정

각각의 환자로부터 말초혈액 10 mL를 채취하여 그중 100 μ L의 전혈을 사용하였다. CD3, CD56 및 CD16 세포 표면 항원을 혈액세포에 단클론항체(monoclonal antibody)를 이용하여 간접 형광 염색하여 유세포 분석기(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 혼합

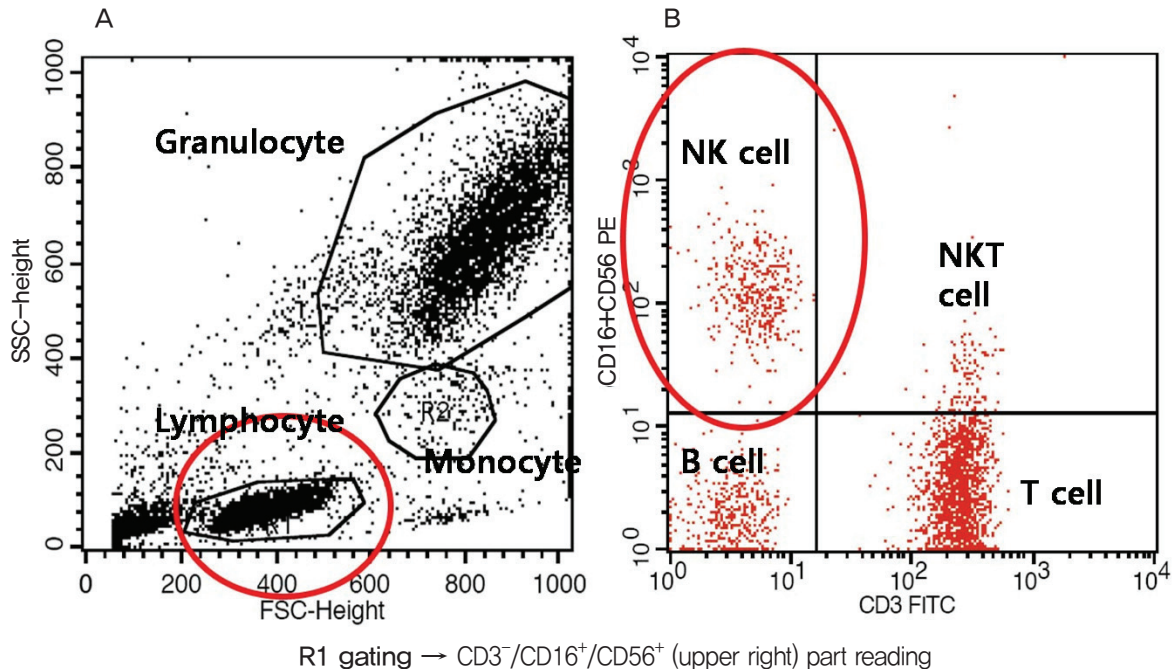


Fig. 1. Determination of immune cell profiles in peripheral blood. Gating strategy for three color flow cytometry evaluation of peripheral blood immune cell. This step describes analysis gate around lymphocyte (R1), excluding cell debris (A). Next step shows four regions as NK cell; $CD3^+/16^+/56^+$. (B) NKT cell; $CD3^+/16^+/56^+$, T cell; $CD3^+/56^-$ and B cell ($CD3^+/56^-$) each. SSC, side scatter; PI, propidium iodide dye; PKH2, green fluorescent cell linker dye; NKT, natural killer T cell; NK, natural killer.

하여 4°C에서 20분간 반응시킨다. 적혈구 용혈용액 1 mL를 넣고 잘 혼합하고 실온 암소에서 10분간 반응시켰다. 5분간 원심분리(1,600 rpm)하여 상층액을 버리고 phosphate buffered saline로 2회 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액을 넣고 잘 섞어준 후 분석하였다. 결과 분석은 Cell Quest pro software (FACS Calibur)를 이용하여 림프구만을 gating (R1)한 후, 선별된 림프구들 중에서 $CD3^+/CD56^+/CD16^+$ 부분만을 백분율($CD3^+/CD56^+/CD16^+$ number/lymphocyte number $\times 100$)로 구하였다 (Fig. 1).

2. pbNK 세포의 세포용해 활성도 측정

각각의 환자로부터 말초혈액 10 mL를 채취하여 Ficoll-hypaque gradient solution을 이용하여 림프구와 단핵세포층(peripheral blood monocytes, PBMCs)을 분리하여 세척하였다. 수확한 PBMCs와 green fluorescent cell linker dye (PKH2)로 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 활성도 분석용 K562 세포를 준비하였다. 세포용해 활성도는 effector cell:target cell (E:T)의 비율을 50:1, 25:1, 그리고 12.5:1로 2시간 동안 PBMC와 K562 세포를 함께 반응시킨 후, PI

로 1-5분간 염색한 후 분석하였다. 결과 분석은 Cell quest pro software를 이용하여 각각의 E:T 비율에서의 세포용해 활성도($K562$ dead cell number/ $K562$ whole cell number $\times 100$)를 계산하였다(Fig. 2).

3. 생체 외에서 면역글로블린 또는 프레드니솔론 투여 후 NK 세포용해 활성도 측정

PBMC와 K562 세포주가 50:1의 E:T 비율로 공배양되고 있는 시험관에 Immuglobulin (Livgamma[®] INJ 2.5 g/50 mL, SK Chemical, Seongnam, Korea) 또는 프레드니솔론을 각각 12.5 μ g/mL와 5 μ g/mL 농도로 첨가 후 위에서 기술한 pbNK 세포의 세포용해 활성도 측정 방법과 같은 순서로 진행하여 NK 세포의 세포용해 활성도에 면역글로블린 및 프레드니솔론의 투여가 미치는 영향을 알아보고자 하였으며 사용된 약제의 농도는 기존의 문헌에서 제시한 생체 내 치료 용량에 유사한 농도를 사용하였다[32].

4. 통계적 분석

연구 결과는 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 사용하여 분석하였다. 두 군 간의 비교를 위해 연속변수의 비교는 *t*-test와 chi-square를 이용하였고, receiver operating characteristic curve 분석을 통해서 cut-off value를 선정하였다. Cut-off value는 specificity에 중점을 두어, specificity는 90% 이상이면 sensitivity가 높은 수치로 정하였다. 통계 분석 후 *P*값이 0.05 이하인 경우 통계적으로

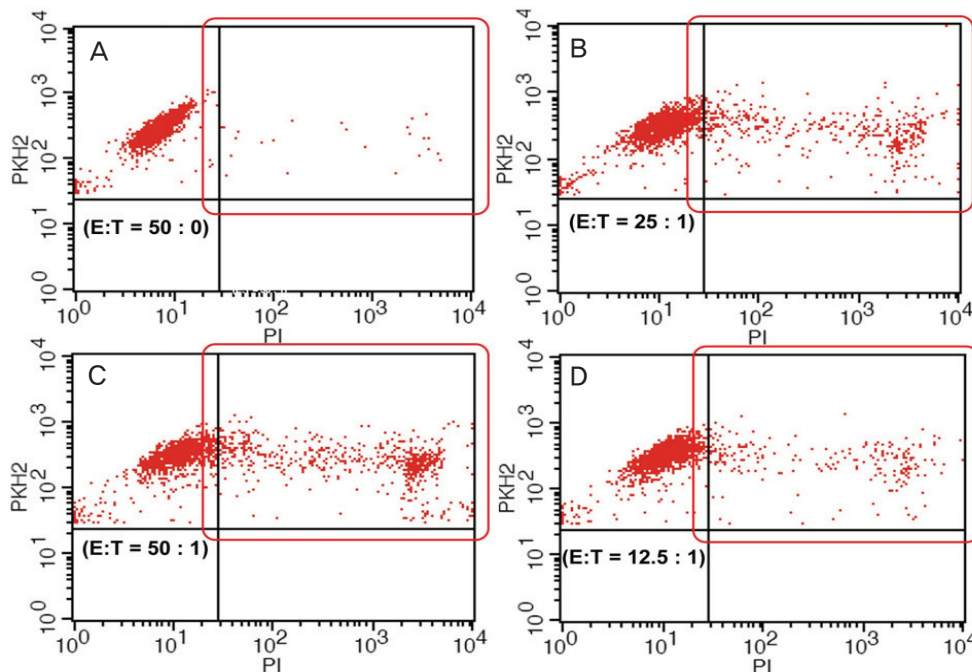


Fig. 2. Determination of peripheral blood natural killer cell cytolytic activities. Figures describes analysis gate around K562 (target cell) live & dead cell in control (A, no effector cell), 50:1 effector cell:target cell (E:T) ratio (B), 25:1 E:T ratio (C), and 12.5:1 ET ratio (D) each which excluding cell debris. PKH2, green fluorescent cell linker dye; PI, propidium iodide dye.

유의함으로 정의하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

본 연구에서 총 244명의 습관성유산 환자에서, 이 중 말초혈액 NK 세포 증가에 기인한 동종 면역 원인의 습관성유산 환자의 수는 총 74명이었으며, 환자의 평균 나이는 35.8세(범위, 28–44세)였으며, 이 환자들의 평균 자연유산 횟수는 2.6회(범위, 2–7회)였고, 평균 생존아 분만력은 0.2명(범위, 0–1명)이었다. 한편 pbNK 세포의 분획은 평균 15.8%의 수치를 나타내었다(Table 1).

2. 습관성유산 환자군에서 NK 세포용해 활성도

습관성유산 환자군에서 각각 다른 세 가지의 E:T 비율에서 세포용해 활성도의 평균은 50:1 ratio에서는 40.5%, 25:1 ratio에서는 32.5% 그리고 12.5:1 ratio에서는 19%로 나타났다(Fig. 3).

3. 생체 외에서 면역글로불린과 프레드니솔론 사용 후 NK 세포용해 활성도 변화

체외배양 실험에서 IVIG를 첨가한 경우 NK 세포용해 활성도는 37.7%로 감소되어 약물을 첨가하지 않은 군의 40.5%와 비교하여 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않은 반면 프레드니솔론을 첨가한 군의 실험 결과에서는 19.5%로 감소되어 약물을 첨가하지 않은 군 및 면역글로불린을 투여한 군들에 비교하여 통계적으로 유의하게 NK 세포용해 활성

Table 1. Clinical characteristics and peripheral blood immune cell profiles in study population

Mean age	35.8 (28–44)
Mean number of spontaneous abortion	2.6 (2–7)
Mean number of previous live birth	0.2 (0–1)
T lymphocyte (CD3 ⁺) (%)	65.6 (46.9–79.9)
T helper cell (CD3 ⁺ /4 ⁺) (%)	39.3 (24.8–55.4)
T cytotoxic cell (CD3 ⁺ /8 ⁺) (%)	26.2 (9.9–39)
Th1/2 ratio	1.6 (0.9–4.1)
NKT cell (CD3 ⁺ /56 ⁺) (%)	5.4 (1.2–14.1)
B lymphocyte (CD3 ⁺ /19 ⁺) (%)	11.8 (6.3–18.2)
NK cell (CD3 ⁺ /56 ⁺ /16 ⁺) (%)	15.8 (5.2–30.0)

NKT, natural killer T cell; NK, natural killer.

도가 감소하는 결과를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

임신을 원하는 부부에 있어 많게는 약 3–5%가 자연유산이 반복되는 습관성유산으로 보고된 바 있으며, 이러한 습관성유산의 원인으로서는 여러 가지 다양한 원인이 거론되고 있으나[33], 비교적 최근 습관성유산의 원인으로서는 동종 면역 거부반응의 중요성이 점차 증가하고 있다[34]. 이런 동종 면역 거부반응을 유발하는 하나의 원인기전으로 NK 세포의 활성 및 수적 증가가 여러 연구자들에 의해 연구되고 있는데 그 결과, 태

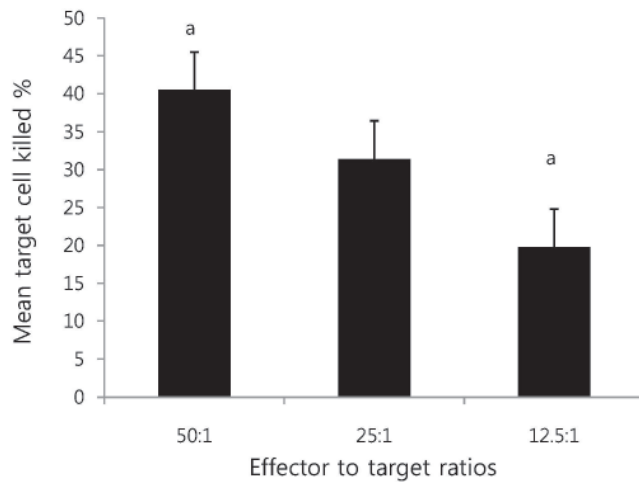


Fig. 3. Mean percentage of target cell killed with different effector to target cell ratios. ^a $P < 0.05$, analysis of variance.

아 염색체 이상과 상관없는 반복되는 유산을 경험한 여성에서 NK 세포가 증가되어 있으며, NK 세포의 증가가 관찰되는 임신초기 여성에서 유산의 가능성이 매우 높았고[35], 정상 임신에서 말초혈액의 NK 세포의 활성화와 숫자는 감소되는 반면, 임신초기 습관성유산 환자에서는 그 숫자의 증가가 관찰되었으며[4,11], 더 나아가 임신 전 말초혈액 내의 NK 세포의 활성화 및 수적 증가가 있는 습관성유산 환자에서 다음 임신 시 반복된 유산과 연관성이 있음이 보고되기도 하였다[35,36].

NK 세포는 선천면역계(innate immune system)의 핵심적인 요소로서 각종 바이러스, 박테리아와 같은 외부항원들에 대응하여 초기의 면역반응을 유발하는 데 중요한 역할을 하며, 표적세포에 대한 세포 살해기능 및 cytokine을 포함한 여러 가지 단백질을 분비하는 기능을 갖고 있다 [8,37]. 임신 시 NK 세포는 임신초기에 영양막 세포를 동종항원으로 인식하여 면역반응을 시작하는데, 임신부의 말초혈액에서 얻은 NK 세포를 통해 자가 태반세포에 대한 세포독성을 나타냄이 실험적으로 증명되었고, 본원의 이전 연구 결과에서도 실제 습관성유산 여성의 말초혈액 세포의 세포용해 활성도가 34.9%로 정상 출산 여성의 8.9%보다 통계적으로 유의하게 높음을 확인하였다[38]. 한편, Yamada 등[12]은 원인 불명의 습관성유산 여성에서 임신 전 NK 세포 활성도가 46% 이상일 때 상대 위험도가 3.6배, 말초혈액 림프구 중 CD56⁺ 세포 백분율이 16.4% 이상일 때 상대 위험도가 4.9배로 향후 임신에서 생화학적 임신과 정상 염색체를 갖는 태아의 자연유산의 위험률이 더 높았음을 증명하였고, 따라서 CD56⁺ NK 세포가 향후 임신의 결과를 예측하고 치료 방침을 세우는 데 있어 효율적인 방법이라고 주장하였다. 이에 Ruiz 등[39]도 임신초기에 CD56⁺ NK 세포를 감소시키므로써 습관성유산을 막고 성공적인 출산 결과를 얻을 수 있다고 보고한 바 있다[39].

한편, 습관성유산 환자에 대해 태아에 대한 모체의 면역 거부 현상을 줄이기 위한 다양한 연구 및 치료가 시도되고 있으나 아직 그 진단 방법과 치료 효과에 대해서는 의견이 분분하며, 명확한 결론은 없는 상태이다.

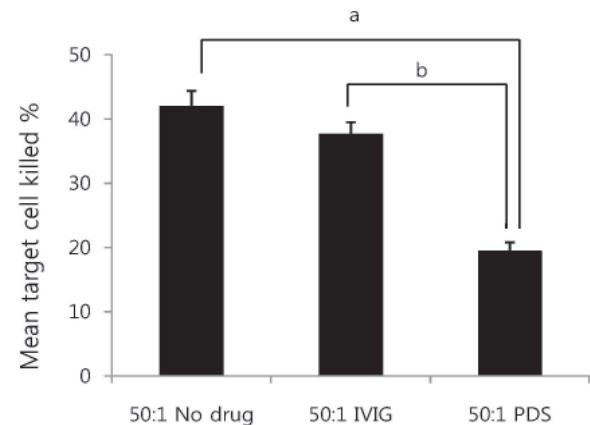


Fig. 4. Mean percent to target cells with intravenous immunoglobulin or prednisolone coculture. IVIG, intravenous immunoglobulin; PDS, prednisolone. ^a $P < 0.05$, analysis of variance (ANNOVA). ^b $P < 0.05$, ANNOVA.

습관성유산 환자에서 모체의 면역 거부 현상을 줄이기 위해 시도되는 정책 내 면역글로불린의 주입을 통한 수동면역치료법은 효과적인 면역억제 방법으로 다양한 면역질환의 치료에 이미 이용되어 왔는데[40], 최근에는 이 치료법이 전체적인 NK 세포의 활성을 억제시키는 작용이 있음이 보고되어 유산을 방지하는 효과가 있음이 보고되기도 하였다[41].

프레드니솔론은 항염증성 사이토카인을 포함하는 면역학적 원인을 치료하는 데 도움이 된다는 보고가 있으며[23–29], NK 세포 표면의 활성 수용체인 Nkp44 수용체에 길항적으로 작용하는 것으로 알려져 있다 [31]. 최근 연구에 의하면 프레드니솔론은 불임 또는 습관성유산 환자의 말초혈액을 이용하여 생체 외에서 프레드니솔론이 NK 세포의 세포용해능을 현저하게 억제하며 이는 면역글로불린의 NK 세포용해능 억제 효과와 유사함을 보고하였다.

본 연구에서는 그 원인을 알 수 없는 습관성유산 환자 중 말초혈액 NK 세포 증가에 기인한 동종면역 요인이 진단된 습관성유산 환자들의 혈액을 체외 배양하여 IVIG를 첨가한 경우 NK 세포용해 활성도는 37.7%로 감소되는 결과를 보였으나 약물을 첨가하지 않은 군의 40.5%와 비교하였을 때 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지는 않았던 반면, 프레드니솔론을 첨가한 군의 실험결과에서는 19.5%로 감소되어 약물을 첨가하지 않은 군 및 면역글로불린을 투여한 군들에 비교하여 통계적으로 유의하게 NK 세포용해 활성도가 감소하는 결과를 보였다. 이는 불임 및 습관성유산 환자를 대상으로 동일한 실험을 시행하여 면역글로불린과 프레드니솔론의 생체 외 NK 세포용해 활성도가 유사함을 보고한 기존의 논문[32]과 다른 결과를 보이며 이러한 이유는 원인을 알 수 없는 습관성유산 환자 중 말초혈액 NK 세포 증가에 기인한 동종면역 요인이 진단된 습관성유산 환자들의 혈액을 그 재료로 이용한 본 연구와 기존 연구의 연구 집단의 차이에 기인할 것으로 생각되며 추후 동일 연구군의 비교 연구를 통해 그 결과의 비교가 가능할 것으로 여겨진다.

프레드니솔론의 면역조절기능에 대해서는 잘 알려져 있지만, 생리학적인 기능은 완전하게 설명되고 있지는 않다. 그러나 Xu 등[42]은 프

레드니솔론이 Type 2 helper T 세포인 필수 항염증 사이토카인인 IL-10 (Th2 cytokine) 변화 또는 감소 없이 태반조직에서의 TNF- α (Th1 cytokine) 생성을 억제할 수 있다고 보여주었으며, Xu 등[42]의 논문은 프레드니솔론이 NK 세포를 포함한 염증세포들에 의한 TNF- α (Th1 cytokine) 생성을 억제할 수 있다고 주장한 Steer 등[43]의 발표와 맥락을 같이한다.

저자들의 본 연구 결과에 의하면 원인 불명의 습관성유산 여성에서 면역글로불린과 프레드니솔론 치료를 시행하는 데 있어 말초혈액 내 CD56⁺ NK 세포의 활성도를 측정하는 것은 유용한 지표로 이용될 수 있고, 생체외적으로 NK 세포용해 활성도의 억제에 프레드니솔론의 투여가 효과적인 것으로 나타났다. 더 나아가, 말초혈액 NK 세포가 증가된 원인불명의 습관성유산 환자를 대상으로 한 본 연구 결과에서 프레드니솔론의 NK 세포용해 활성도 억제에 대한 효과는 IVIG보다도 더 우월한 것으로 나타났다. 그러나 본 연구의 결론을 확인하기 위해 향후 더 큰 규모의 생체 내 연구뿐 아니라 프레드니솔론의 용량과 반응 등에 관련된 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다

References

- Hannes M, Englert Y, Gotlieb W, Dupont E. Recurrent spontaneous miscarriage. *Rev Med Brux* 1992;13:103-6.
- 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.
- Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update* 2001;7:113-34.
- 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.
- Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:388-400.
- 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.
- 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.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633-40.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ronda N, Hurez V, Kazatchkine MD. Intravenous immunoglobulin therapy of autoimmune and systemic inflammatory diseases. *Vox Sang* 1993;64:65-72.
- Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, et al. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol* 1998;161:3781-90.
- Scott JR, Branch DW, Kochenour NK, Ward K. Intravenous immunoglobulin treatment of pregnant patients with recurrent pregnancy loss caused by antiphospholipid antibodies and Rh immunization. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1055-6.
- Kwak JY, Quilty EA, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Intravenous immunoglobulin infusion therapy in women with recurrent spontaneous abortions of immune etiologies. *J Reprod Immunol* 1995;28:175-88.
- Coulam CB, Krysa L, Stern JJ, Bustillo M. Intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:333-7.
- Christiansen OB, Mathiesen O, Husth M, Rasmussen KL, Ingerslev HJ, Lauritsen JG, et al. Placebo-controlled trial of treatment of unexplained secondary recurrent spontaneous abortions and recurrent late spontaneous abortions with i.v. immunoglobulin. *Hum Reprod* 1995;10:2690-5.
- Intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage. The German RSA/IVIg Group. *Br J Obstet Gynaecol*

- col 1994;101:1072-7.
20. Stephenson MD, Dreher K, Houlihan E, Wu V. Prevention of unexplained recurrent spontaneous abortion using intravenous immunoglobulin: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:82-8.
21. Kim MY, Kim HS, Cha SH, Koong MK, Song HJ, Song IO, et al. A change of peripheral CD56+natural killer cell fraction in recurrent pregnancy loss patients who successfully treated with intravenous immunoglobulin in previous pregnancy. *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47:1926-30.
22. Cha SH, Park CW, Kim HS, Cho DH, Kim JY, Kang IS, et al. Effectiveness of intravenous immunoglobulin therapy in women with recurrent spontaneous abortions and elevated pre-conceptional peripheral blood CD56+ natural killer cell percentage. *Korean J Fertil Steril* 2005;32:165-70.
23. Forges T, Monnier-Barbarino P, Guillet-May F, Faure GC, Béné MC. Corticosteroids in patients with antiovarian antibodies undergoing in vitro fertilization: a prospective pilot study. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:699-705.
24. Taniguchi F. Results of prednisolone given to improve the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in women with antinuclear antibodies. *J Reprod Med* 2005;50:383-8.
25. Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, Vince G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2005;84:980-4.
26. Hasegawa I, Yamanoto Y, Suzuki M, Murakawa H, Kurabayashi T, Takakuwa K, et al. Prednisolone plus low-dose aspirin improves the implantation rate in women with autoimmune conditions who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;70:1044-8.
27. Mottla GL, Smotrich DB, Gindoff PR, Stillman RJ. Increasing clinical pregnancy rates after IVF/ET. Can immunosuppression help? *J Reprod Med* 1996;41:889-91.
28. Ando T, Suganuma N, Furuhashi M, Asada Y, Kondo I, Tomoda Y. Successful glucocorticoid treatment for patients with abnormal autoimmunity on in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:776-81.
29. Polak de Fried E, Blanco L, Lancuba S, Asch RH. Improvement of clinical pregnancy rate and implantation rate of in-vitro fertilization-embryo transfer patients by using methylprednisone. *Hum Reprod* 1993;8:393-5.
30. Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:440-9.
31. Chiossone L, Vitale C, Cottalasso F, Moretti S, Azzarone B, Moretta L, et al. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood* 2007;109:3767-75.
32. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Bansal A. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:259-65.
33. Daya S. Habitual abortion. In: Copeland LJ, Jarrell, JF, McGregor JA, editors. Text book of gynecology. Philadelphia (PA): WB Saunders Company; 1993. p.204-30.
34. Daya S. Immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1997;8:65-77.
35. 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.
36. Emmer PM, Veerhoek M, Nelen WL, Steegers EA, Joosten I. Natural killer cell reactivity and HLA-G in recurrent spontaneous abortion. *Transplant Proc* 1999;31:1838-40.
37. Lanier LL, Le AM, Ding A, Evans EL, Krensky AM, Clayberger C, et al. Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL 2-dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. *J Immunol* 1987;138:2019-23.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* 1992;326:107-16.
42. Xu B, Makris A, Thornton C, Hennessy A. Glucocorticoids inhibit placental cytokines from cultured normal and preeclamptic placental explants. *Placenta* 2005;26:654-60.
43. Steer JH, Vuong Q, Joyce DA. Suppression of human monocyte tumour necrosis factor-alpha release by glucocorticoid therapy: relationship to systemic monocytopenia and cortisol suppression. *Br J Clin Pharmacol* 1997;43:383-9.

말초혈액 자연살해세포가 증가되어 있는 원인불명의 습관성유산 환자에서 prednisolone을 이용한 자연살해 세포의 세포용해능 감소에 관한 연구

관동대학교 의과대학 제일병원 ¹산부인과, ²분자중앙연구실, ³불임연구실

안현숙¹, 차선화¹, 구화선¹, 배주연¹, 유지희¹, 송인옥¹, 안현경¹, 황수진², 박동욱³, 양광문¹

목적

자연살해세포(natural killer cell, NK cell)가 증가되어 있는 원인을 알 수 없는 습관성유산 환자에게 프레드니솔론과 면역글로불린 주사제를 첨가한 후 생체외적으로 NK 세포 세포용해 활성도의 억제에 대한 효과를 각각 비교하고자 하였다.

연구방법

전향적 연구로서 습관성유산의 기왕력이 있는 여성 총 74명의 말초혈액을 채취하였으며, 유세포분석기를 이용하여 peripheral blood NK 세포 분획 및 세포용해 활성도를 측정 후 그 결과를 비교 분석하였고, 프레드니솔론이나 면역글로불린 주사제를 첨가하여 각각의 NK 세포 세포용해 활성도 억제 효과를 비교하였다.

결과

체외배양 실험에서 면역글로불린 주사제를 첨가한 경우 NK 세포 세포용해 활성도는 37.7%로 감소되어 약물을 첨가하지 않은 군의 40.5%와 비교하여 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않은 반면 프레드니솔론을 첨가한 군의 실험결과에서는 19.5%로 감소되어 약물을 첨가하지 않은 군 및 면역글로불린을 투여한 군들에 비교하여 통계적으로 유의하게 NK 세포 세포용해 활성도가 감소하는 결과를 보였다($P<0.001$). 따라서, 프레드니솔론과 면역글로불린 주사제를 첨가한 후 NK 세포 세포용해 활성도의 감소 정도를 분석한 결과 프레드니솔론 사용 군에서 사용 후 NK 세포 세포용해 활성도가 의미 있게 감소함을 알 수 있었다($P<0.005$).

결론

본 연구의 결과로, 프레드니솔론 사용으로 NK 세포 세포용해 활성도가 의미 있게 감소함을 알 수 있었다. 더하여 프레드니솔론 투여에 의한 NK 세포 세포용해 활성도의 효과는 면역글로불린을 투여했을 때보다 더 효과가 좋은 것으로 나타났다. 그러나 본 연구의 결론을 확인하기 위해 향후 더 큰 규모의 생체 내 연구뿐 아니라 프레드니솔론의 용량과 반응 등에 관련된 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심단어: 습관성 반복유산, NK 세포 세포용해 활성도, 프레드니솔론