

조기난소부전증 여성에서 난소단백질에 대한 순환항체에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

이진용 · 김정구 · 박창수 · 최영민 · 신창재 · 문신용 · 장윤석

Circulating Antibodies directed toward Ovarian Proteins in Women with Premature Ovarian Failure

Jin Yong Lee, M.D., Jung Gu Kim, M.D., Chang Soo Park, M.D., Young Min Choi, M.D.,
Chang Jae Shin, M.D., Shin Yong Moon, M.D. and Yoon Seok Chang, M.D.

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

= Abstract =

The purpose of this study is to identify the presence of the circulating antibodies directed toward ovarian proteins(antiovarian antibodies, AOA) and the nature of antigenic ovarian structure by comparing the binding activities to 4 types of ovarian proteins, particulated and solubilized forms of pig ovarian and granulosa cell membranes in sera of patients with premature ovarian failure(POF) and to evaluate the usefulness of circulating AOA as a follow up tool after treatment. Measurements of AOA were performed by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) in sera of 58 patients with POF, 51 had normal chromosomes and 7 had X chromosome abnormalities. Sera of 21 natural menopausal women and 17 castrated women were also tested and sera of 32 healthy premenopausal women were served as controls. ELISA reactivities against particulated porcine granulosa cell membrane proteins was the greatest among 4 different ovarian proteins. Fifteen(29%) of 51 POF patients with normal chromosome and 1(14.3%) of 7 POF patients with X chromosome abnormalities had AOA while none of 32 controls and 21 natural menopausal women and 17 castrated women had AOA. One POF patient with 47, XXX was identified AOA positive. The ELISA reactivities were followed up monthly up to 5 months in 4 AOA positive POF patients after estrogen-progestin(E-P) therapy. There was a decreasing tendency of the ELISA reactivities in all these patients after E-P therapy and two of them converted to AOA negative. These data suggest that antigenic structure may be components of granulosa cell membrane and the determination of circulating AOA may be useful in the follow up after treatment in patients with autoimmune POF.

서 론

조기난소부전증은 40세 이전에 고성선자극 호르몬성 성선기능감퇴를 동반한 무월경을 나타내는 증후군으로 정의되며 조기에 골다공증이나 심혈관계 질환 등의 위험성이 증가될 뿐

*본 연구는 1990년도 서울대학교 병원 대단위 연구비보조에 의하여 이루어진 것임.

만 아니라 정신적인 문제와 불임 등을 야기하는 증후군이다. 생식연령의 여성이 조기난소부전증에 이환될 위험성은 대략 1% 정도로 보고 있으며 드문 질환이 아니어서 원발성 무월경 환자의 10-28%, 속발성 무월경 환자의 4-18% 정도를 차지한다(김 등, 1992). 그 원인적 인자로서 성선자극호르몬에 반응 가능한 난포의 결핍을 가져오는 다양한 인자들이 논의되고 있지만 방사선치료, 항암화학요법, 난소절제술,

감염 등의 과거력이 배제된 경우 상당수의 환자에서 그 원인이 확실하지 않다. 환자의 난소 생검 소견상 임파구 및 형질세포의 침윤이 나타나며(Coulam et al., 1981; Ho et al., 1988) 다른 자가면역성 질환과의 연관성(Turkington et al., 1967; De Moraes-Ruehsen et al., 1972; Williamson et al., 1980; Rebar et al., 1982; Kuki et al., 1981; Aiman et al., 1985; Coulam et al., 1983; Alper et al., 1985; Damewood et al., 1986; McNatty et al., 1975; Miake et al., 1967; Mignot et al., 1989; Irvine et al., 1974; Irvine et al., 1969) 및 자가면역성 질환의 회복에 따라 난소기능이 회복된다(Miake et al., 1967; Pekonen et al., 1986)는 사실 등으로 자가면역성 기전이 조기난소부전증의 발생에 기여한다는 개념이 점차 대두되고 있다.

이런 자가면역성 기전을 규명하는 일환으로 여러 학자들이 간접면역형광법(Ho et al., 1988; Pekonen et al., 1986; Damewood et al., 1986; Miake et al., 1967; Mignot et al., 1989; Ruehsen et al., 1972)이나 동위원소를 이용하는 배위자결합방법(Coulam, 1983; Coulam et al., 1979; Coulam et al., 1985) 등을 사용하여 난소조직에 대한 항체를 보고하였으나 그 결과에 차이가 많으며, 면역형광법은 주관적 판독에 의한 정성적인 결과만을 얻을 수 밖에 없다는 단점이 있고 배위자 결합방법은 불안정한 동위원소의 사용에 의한 위험성 등의 불편한 점이 많았다.

이에 저자 등은 최근 개발된 객관적이고 정량적인 double-bridge 효소면역법을 사용하여 조기난소부전증 여성의 혈중 난소단백질들에 대한 항체의 존재여부와 항원구조물을 알아보고 치료에 따른 항난소항체의 변화를 관찰하고자 본 실험을 기획하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교 병원 산부인과를 방문했던 조기난소부전증 환자 58명과 자연 폐경여성 21명, 난소절제술에 의한 폐경여성 17명을 대상으로 하였다. 조기난소부전증 환자군은 연령이 40세 이하이면서 무월경을 주소로 내원한 환자 중 정상 prolactin치, 정상 cone down X-ray 소견을 가지고 있으며 2회 이상 혈청 FSH치 측정시 40mIU/ml 이상인 경우 진단되었으며 과거

력상 골반 방사선치료, 양측 난소절제술, 세포독성화학제 사용 등이 없었고 말초혈액 염색체 핵형검사상 염색체 이상이 없는 환자 51명과 X 염색체 이상이 있는 환자 7명 등이었다. 자연 폐경여성군은 자연 폐경 후 3년 이상이 경과된 50세 이상의 여성들이었다. 또한 조기난소부전증 환자군과 연령이 비슷한(± 3 세) 정상 월경주기를 가지며 자가면역성 질환의 가족력이 없는 건강한 여성 32명을 정상대조군으로 하였다.

2. 연구방법

연구 대상자로부터 약 4ml의 혈액을 채취 후 4°C에서 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 모아서 -70°C에 저장하였다가 사용하였다.

1) 항원제조

(1) 난소막 입자형 항원의 제조

규칙적인 월경주기를 가진 돼지의 난소를 도살장에서 도살한 직후 얻어서 phosphate buffer saline(이하 PBS로 약함)으로 세척한 후 난소조직을 무게:용적 비율이 1:10인 10mM Tris buffer에서 가위로 잘게 썬 다음 균질기(homogenizer)로 30초 간격으로 5회(6 stroke/회) 균질화시키고 이 균등액(homogenate)을 튜브로 옮겨 200×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 다른 원심분리 튜브로 옮기고 pellet을 Tris buffer로 10배 희석하여 다시 원심분리 후(200×g, 10분) 얻은 상층액을 서로 혼합 후 200×g에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 생긴 상층액을 20,000×g로 30분간 원심분리하여 생긴 pellet을 10% sucrose가 함유된 10mM Tris buffer로 20,000×g 난소막 입자형 항원 부유액을 제조하였다.

(2) 과립막세포막 입자형 항원의 제조

돼지 난소의 직경 3mm 이하의 미성숙 난포로부터 침흡입법(needle aspiration)으로 난포액과 함께 과립막세포를 얻어서 15분간 4°C에서 1,000 rpm으로 원심분리하여 생긴 pellet에 동량의 ice cold PBS용액(pH 7.4)을 넣고 15분간 1,500 rpm으로 원심분리하였다. Pellet을 모아 다시 2회 PBS로 세척 후 과립막세포의 용적을 측정하여 다음 1:10 10mM Tris buffer에 부유시켜서 30분간 4°C에 방치하여 과립막세포가 팽창되도록 유도하였다. 그 후 난소막 항원에서와 같은 방법으로 20,000×g 돼지 과립막세포막 입자형 항원을 제조하였다.

(3) 용질성 항원의 제조

돼지 난소 과립막세포막 입자형 항원 또는 난소막 입자형 항원에 10% Triton X-100을 함유한 Tris/NaCl buffer 용액을 넣어 0.5% 농도로 조절하고 균질화한 후 petroleum ether를 1:3 비율로 넣어 1시간 4°C에서 혼합시켰다. 이 혼합액을 4°C 30분간 10,000×g로 원심분리하여 용질형(soluble phase)을 얻어 다시 1시간 100,000×g로 원심분리하여 용질성 항원을 제조하였다.

(4) 항원내 단백질양 측정

Bovine serum albumin(이하 BSA로 약함)을 이용하여 표준단백용액 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5μg/ml을 제조하고 20,000×g 난소막 입자형 항원, 용질성 난소막 항원, 과립막 세포막 입자형 항원 및 용질성 항원 용액 소량을 녹여 1:10, 1:20, 1:40 희석용액 100μl를 만들어 여기에 bicinchonionic acid solution과 4% CuSO₄·5H₂O의 50:1 혼합용액 2ml를 넣어 37°C 수조(waterbath)에서 30분간 반응시킨 후 562nm에서의 흡광도(optical absorbance)를 얻어 IBM 회사의 curve fitter program을 사용하여 단백질양을 측정하였다.

2) BSA의 변성(denaturation)

4°C에서 citrate buffer 100ml에 0.12M Na periodate를 넣은 다음 NaOH로 pH 5.5까지 조절하였다. 이 용액을 16% BSA 용액에 넣어 2

시간 냉장고에 방치하였다가 미리 2-3일 전 증류수에 넣어 냉장고에 보관하였던 spectrapor에 상기 혼합용액을 넣어 PBS용액을 사용하여 2일간 투석(dialysis)하였다.

3) 항원 흡착

Poly-l-lysine(1mg/100ml)이 들어있는 PBS 용액을 100μl씩 면역판(immunoplate)에 넣고 30분간 실온에 방치 후 용액을 버린 다음 0.1M Na Carbonate buffer 용액(pH 9.5)에 10μg/ml 농도의 20,000×g 난소막 입자형 항원(용질성 난소막 항원, 과립막 세포막 입자형 항원, 용질성 항원) 100μl를 넣고 4°C에서 적어도 16시간 반응시켰다. 이런 항원이 들어있는 면역판 구멍(immunoplate well)과 교대로 동일 완충용액(buffer)을 사용하여 제조한 동일한 농도의 BSA 용액을 넣었다.

4) 효소면역법

돼지의 난소항원(난소막 입자형, 용질성 항원과 과립막 세포막 입자형 및 용질성 항원)이 부착된 면역판(immunoplate)을 PBS로 3회 세척 후 1% BSA가 함유된 PBS 용액 370μl를 넣고 2시간 37°C에서 반응시킨 다음 이 용액을 버리고 연구대상자 혈청(필요시는 1% BSA, 0.1% Tween-20, 0.02% sodium azide, 0.3% denatured BSA를 함유한 PBS 용액으로 희석함) 100μl를 넣어 2시간 37°C에서 반응시킨 다음

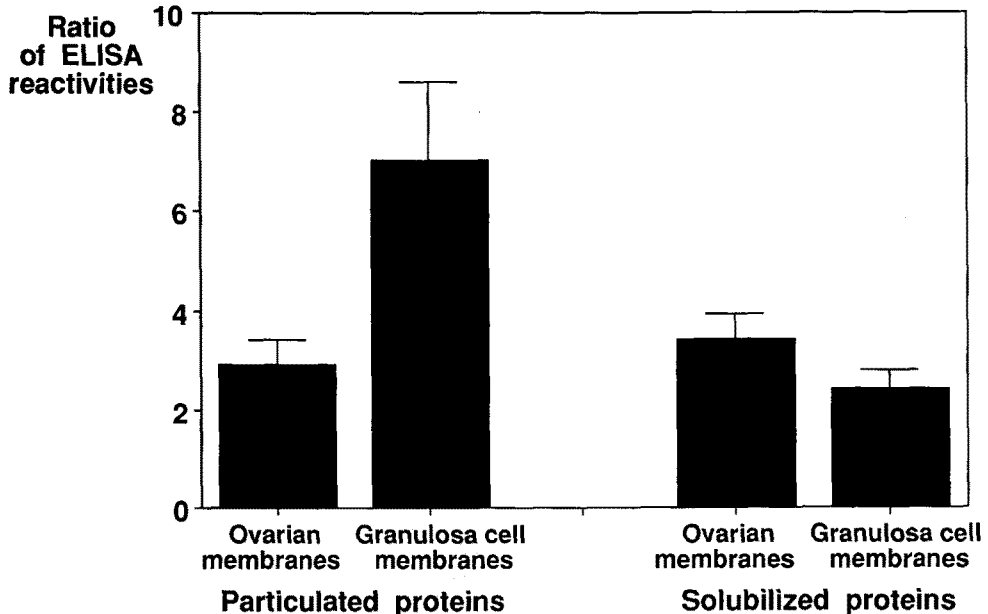


Fig. 1. Ratios(mean+SE) of ELISA reactivities of POE patients and normal premenopausal women according to 4 different ovarian proteins.

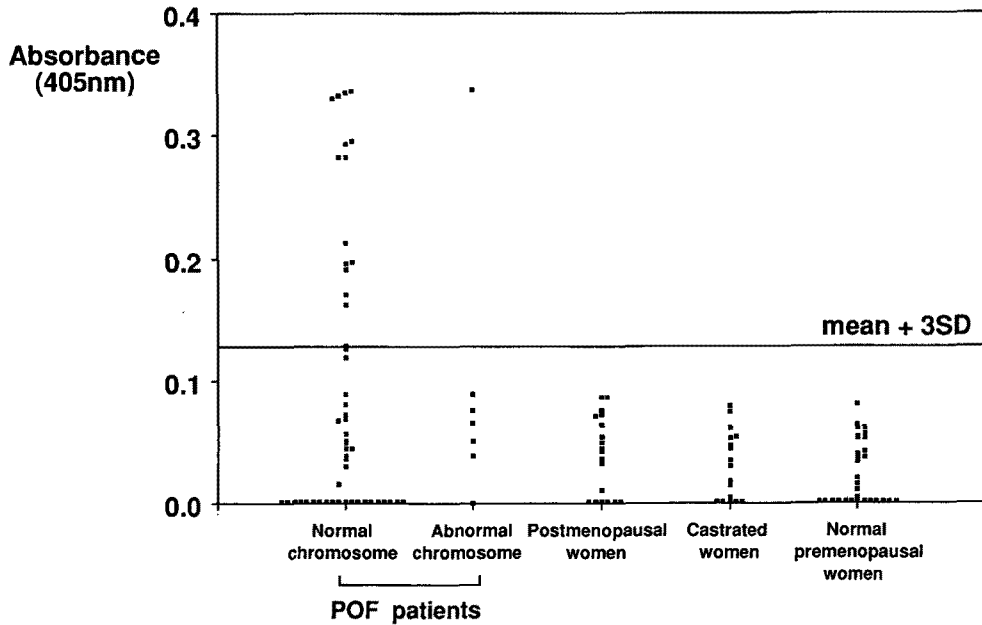


Fig. 2. Scatter diagram of absorbances in POF patients, postmenopausal women, castrated women, and normal premenopausal women.

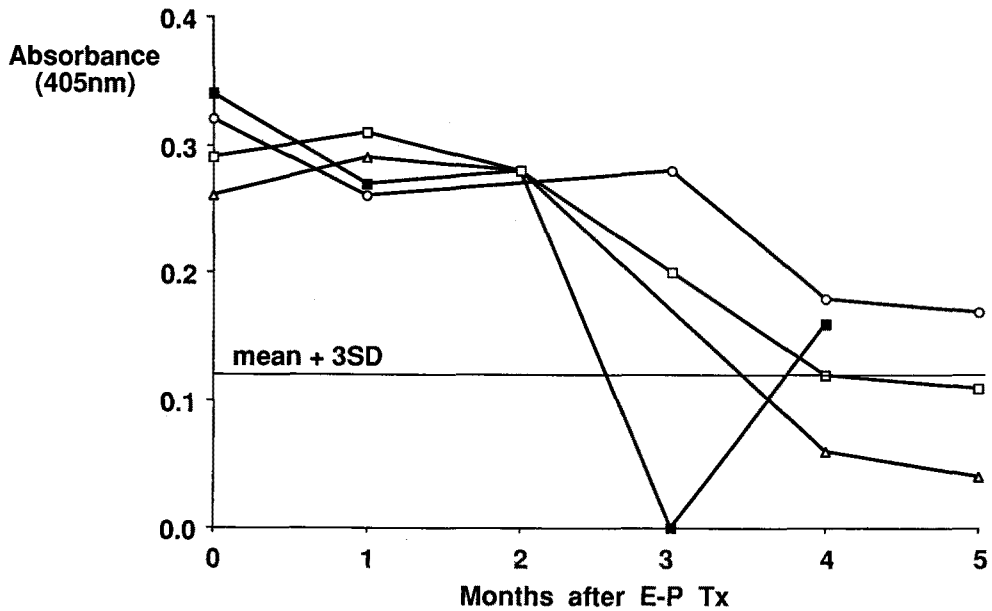


Fig. 3. Changes in ELISA reactivities after E-P therapy in 4 POF patients with antiovarian antibodies.

1% BSA, 0.1% Tween-20, 0.02% sodium azide를 함유한 PBS 용액(세척용액)을 사용하여 3회 세척하였다. 그 후 biotin이 부착된 항인체 면역글로불린 G(goat anti-human IgG-biotin conjugate) 용액을 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 다시 4회 세척하고 streptavidin이 부

착된 β -galactosidase 용액(streptavidin- β -galactosidase conjugate)을 추가한 다음 37°C에서 1시간 반응시키고 6회 세척하였다.

반응기질로 O-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 넣어 25분간 실온에서 반응시킨 후 면역판 판독기(immunoplate reader)를 사용하여 파장

Table 1. ELISA reactivities of sera from POF patients, postmenopausal women, castrated women, and normal premenopausal women

	No.	Absorbance(405nm)	
		Mean ± S.D.	Range
POF patients			
Normal chromosome	51	0.09 ± 0.11*	0.001-0.336
Abnormal chromosome	7	0.11 ± 0.12*	0.000-0.337
Postmenopausal women	21	0.04 ± 0.03	0.001-0.087
Castrated women	17	0.03 ± 0.03	0.001-0.079
Normal premenopausal women	32	0.03 ± 0.03	0.001-0.081

*p < 0.05

405nm에서의 흡광도(optical absorbance)를 측정하였다. 혈청 내 면역글로블린 G의 난소항원들에 대한 특이성결합력(specific binding activity)은 난소막 항원 존재시의 흡광도 즉, 전체결합력(total binding activity)에서 난소막 항원이 없는 경우(동일한 농도의 BSA가 들어 있는 경우)의 흡광도인 비특이성결합력(nonspecific binding activity)을 감하여 얻었다.

5) 통계처리

난소 단백질의 종류에 따른 정상대조군의 혈중 결합력에 대한 조기난소부전증 환자에서의 결합력의 비의 비교 및 조기난소부전증과 자연 폐경여성, 난소절제술에 의한 폐경여성 및 정상대조군 등 각군에서의 난소막 입자형 항원에 대한 파장 405nm에서의 평균 흡광도의 비교는 Student t-test를 이용하였고 p < 0.05인 경우에만 통계적으로 유의하게 판정하였다.

결 과

돼지 난소막 입자형, 용질성 항원과 과립막 세포막 입자형 및 용질성 항원 등의 4개의 항원에 대한 조기난소부전증 환자군의 혈청내 결합력과 정상대조군에서의 동일 항원에 대한 결합력의 비는 그림 1에 표시한 바와 같았다. 과립막 세포막 입자형 항원의 경우 정상대조군에 대한 그 결합력의 비가 7.01 ± 1.60으로 난소막 입자형 항원의 2.91 ± 0.53, 난소막 용질성 항원의 3.42 ± 0.51 및 과립막세포막 용질성 항원의 2.40 ± 0.37에 비해 통계적으로 유의하게 높았다(p < 0.05).

조기난소부전증 환자군에서 혈청내 면역글로블린 G의 난소막 입자형 항원에 대한 특이성결합력을 나타내는 파장 405nm에서의 평균 흡광도는 정상 염색체를 가진 조기난소부전증 환

Table 2. Incidence of AOA positivity in POF patients, postmenopausal women, castrated women, and normal premenopausal women

	Total No.	AOA positivity	
		No.	Percentage
POF patients			
Normal chromosome	51	15	29
Abnormal chromosome	7	1	14.3
Postmenopausal women	21	0	0
Castrated women	17	0	0
Normal premenopausal women	32	0	0

AOA(+) > mean of control + 3 S.D.

자군에서는 0.09 ± 0.11이었고, X 염색체 이상이 있는 조기난소부전증 환자군에서의 평균 흡광도는 0.11 ± 0.12로 각각 정상대조군의 평균 흡광도인 0.03 ± 0.03에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다(p < 0.05). 그러나 난소절제술 후의 폐경여성군과 자연 폐경여성군에서의 평균 흡광도는 각각 0.03 ± 0.03과 0.04 ± 0.03으로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(표 1).

그림 2는 각 대상군에서의 흡광도를 표시한 것으로 정상대조군의 평균 흡광도 + 3(표준편차) 이상, 즉 0.12 이상의 흡광도를 나타낸 경우를 항난소항체 양성으로 판독하였을 때 정상 염색체를 가진 조기난소부전증 환자군에서는 51명 중 15명(29%)이 양성이었다고 난소절제술에 의한 폐경여성군과 자연 폐경여성군 및 정상대조군에서는 모두 음성이었다. 5명의 Turner 증후군 환자와 1명의 46, XX(pure gonadal dysgenesis) 환자 및 1명의 Trisomy X 환자 등 7명의 X염색체 이상이 있는 조기난소부전증 환

Table 3. Incidence of circulating AOA in POF patients by various methods

Author	Year	Method	% of AOA(+)
Pekonen et al	1985	Indirect immunofluorescence	16.7
Damewood et al	1986	Indirect immunofluorescence	51.9
Ho et al	1988	Indirect immunofluorescence	2.2
Mignot et al	1988	Indirect immunofluorescence	6
Rabinowe et al	1989	Indirect immunofluorescence	9
Coulam et al	1985	Ligand binding method	27
Luborsky et al	1990	ELISA	69
Present study		ELISA	29

자군에서는 47, XXX(Trisomy X)의 염색체를 가진 환자에서 흡광도가 0.337로 항난소항체가 존재하여 14.3%의 양성률을 보였다(표 2).

항난소항체가 양성이었던 조기난소부전증 환자 4명에서 estrogen-progestin 치료 시작 후 1달 간격으로 난소막 입자형 항원에 대한 결합력을 추적검사한 결과, 치료 시작 후 2개월까지는 특이성 결합력의 변화가 없었으나 3개월째부터 점차 감소하는 경향을 보이기 시작했으며 5개월 후에는 2명에서 항난소항체 음성으로 변화하였다(그림 3).

고 찰

조기난소부전증은 질환이라기 보다는 임상적 상태로서 현재까지 그 원인과 치료에 있어서 많은 논란이 있으나 근래들어 각종 면역학적 연구방법의 발전으로 자가면역성기전이 조기난소부전증의 발생에 기여한다는 개념이 점차 대두되고 있다. 환자의 난소생검소견상 임파구 및 형질세포(plasma cell)의 침윤이 나타나며(Irvine et al., 1968; Coulam et al., 1981) 다른 자가면역성 질환과의 연관성(Turkington et al., 1967; De Moraes-Ruehsen et al., 1972; Williamson et al., 1980; Rebar et al., 1982; Kuki et al., 1981; Aiman et al., 1985; Coulam et al., 1983; Alper et al., 1985; Damewood et al., 1986; McNatty et al., 1975; Miake et al., 1967; Mignot et al., 1989; Irvine et al., 1974; Irvine et al., 1969) 및 자가면역성 질환의 회복에 따라 난소기능이 회복된다(Miake et al., 1967; Pekonen et al., 1986)는 사실 등은 자가면역성기전이 병인에 관여한다는 것을 시사해 준다.

조기난소부전증 환자의 66-92%에서 면역학적 이상이 발견된다고 한다(Pekonen et al., 1986;

Mignot et al., 1989). 세포성 면역계의 이상으로서 백혈구 이동억제인자(leukocyte migration inhibition factor, MIF)의 증가(Pekonen et al., 1986), 말초혈액 T임파구세포 표면의 interleukin-2 수용체 발현 증가(Nelson et al., 1991), Ia항원 양성인 T임파구의 증가(Rabinowe et al., 1986), 억제 T임파구와 조직 T임파구의 숫적 변화(Michael et al., 1983; Miake et al., 1987; Mignot et al., 1989; 김 등, 1989)등이 보고되었다. Pekonen 등(1986)의 연구에 의하면 조기난소부전증 환자의 33%에서 B임파구의 분화, 증식, 활성을 억제하는 자연살해세포의 비정상적 감소가 보고되었는데 이에 의한 B임파구 활성 증가가 자가항체 생산에 기여할 수도 있다. 또한 순환 면역복합체(immune complex)가 증가하여 자가항체의 존재와 함께 조기난소부전증의 발병에 체액성(humoral) 면역기전이 관여한다는 사실을 설명해준다.

많은 학자들이 조기난소부전증 환자의 말초혈액내에서 자가항체들을 보고하였는데 자가항체는 난소, 갑상선, 부신피질, 위점막, 췌장, 고환, 피부 등 기관에 특이한 항체와 항핵항체, 류머티스양인자, 항평활근항체(anti-smooth muscle antibody)등의 기관에 비특이한 항체로 분류할 수 있다. 이런 다양한 자가항체들은 여러 가지 항원에 대한 항체인지 아니면 여러 내분비기관에 대한 특정한 단일 항원에 대한 면역반응인지는 아직 분명하지 않다.

Vallotton 등(1966)에 의해 난자원형질에 대한 순환 항체가 증명된 이래 조기난소부전증 환자에서 항난소항체가 여러 방법에 의해 검출되어 왔으나 간접 면역형광법(indirect immunofluorescence) 등의 면역세포화학적 방법은 정성적이며 판독이 주관적이어서 위양성이 많고 보고자마다 결과에 큰 차이를 보이며, 배위자

결합방법(ligand binding method)은 방사성 동위원소를 이용하므로 설비 및 방사선 노출 위험 등의 단점이 있다. 이에 본 연구팀(김 등, 1990)은 상기한 방법의 단점들을 피할 수 있고 간단하고 안전하며 정량적 분석이 가능한 효소면역법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발한 바 있다.

조기난소부전증 환자에서 항난소항체의 빈도는 표 3에서와 같이 간접면역형광법을 이용한 경우 2.2-51.9%까지 다양하게 보고되나 효소면역법을 이용한 경우 본 연구에서는 29%의 양성률을 보였다. Luborsky 등(1990)에 의하면 효소면역법을 이용하여 인간 난소와 난자에 대해서 각각 47%의 양성률을 보였으며 어느 한쪽이라도 양성인 경우는 69%라고 하여 높은 양성률을 보고하였으나, 이것은 양성 판독 기준(cut-off value)의 차이로 Luborsky 등은 평균+2(표준편차)를 양성 판독의 기준으로 하였기 때문이라고 사료된다. 또한 과거의 보고(김 등, 1990)보다 정상 건강여성에서 난소단백질에 대한 혈청 면역글로불린 G의 특이성 결합력을 나타내는 파장 405nm에서의 흡광도가 감소한 것은 사용된 항원, 면역판 세척기, 면역판 판독기 등의 실험기구 및 시약의 변화에 기인된다고 생각된다.

난소내 어떤 구조물이 항원으로서의 역할을 하는지는 아직 분명하지 않아 성숙중의 난포(Irvine et al., 1974), 난자(Damewood et al., 1986), 황체(Williamson et al., 1980; McNatty et al., 1975; Irvine et al., 1969), 난포막세포(Williamson et al., 1980; Irvine et al., 1969; Irvine et al., 1968), 과립막세포(Damewood et al., 1986; Irvine et al., 1969) 등에서 면역형광법에 의해 형광이 관찰되었다. 다른 자가면역성 내분비질환에서와 마찬가지로 성선자극호르몬의 수용체가 항원이 될 수 있다고 가정되고 있으나 Austine 등(1979)에 의하면 황체형성호르몬(leuteinizing hormone, 이하 LH로 약함) 수용체는 항원이 될 수 없는 것으로 보이며 Chiauuzzi 등(1982)에 의하면 조기난소부전증 환자의 혈청내에 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone, 이하 FSH로 약함) 수용체와 FSH의 결합을 억제하는 면역글로블린G, 즉 항 FSH 수용체항체의 존재를 보고하여 FSH 수용체는 항원이 될 수 있다는 것을 시사하였다. 본 연구에서는 조기난소부전증 환자군의 혈청내 돼지 난소막 입자형, 용질성 항원과 과립막

세포막 입자형 및 용질성 항원 등의 4개의 항원에 대한 결합력을 정상건강여성에서의 동일 항원에 대한 결합력의 비를 비교해 본 결과 과립막 세포막 입자형 항원의 경우 정상대조군에 대한 그 결합력의 비가 다른 난소단백질보다 유의하게 높았다. 이는 과립막 세포막 입자형 항원은 FSH 수용체를 많이 포함하고 있으므로 FSH 수용체가 항원이 될 수 있다는 사실을 뒷받침해주는 소견일 수도 있으며 용질성 항원의 경우 결합력이 감소하는 것은 용질화 과정에서 항원성이 약화된 것에 기인된다고 생각되었다. 향후 더욱 다양한 항원을 제조하여 효소면역법을 시행함으로써 난소내 정확한 항원 구조물을 밝히는데도 도움이 되리라고 생각된다.

자가항체의 존재의외에 대하여도 연구자마다 의견이 달라 Edmonds 등(1973)은 자가항체의 존재는 단지 면역현상일 뿐이지 생체내에서 조직파괴 등을 유도하지 않는다고 주장하였으나 McNatty 등(1975)은 Addison병과 병발된 조기난소부전증 환자의 혈청내에서 황체에 대한 환자혈청이 배양된 과립막세포에 보체의존적 세포독성효과를 나타내는 것을 관찰하였고 이런 항난소항체의 역가와 세포독성효과는 유의한 관계에 있다고 보고하였다. 또한 김 등(1989; 1991)은 돼지의 난소과립막세포 항원을 토끼에 수동면역하여 세포막항원에 대한 항체가 검출되는 것을 관찰하였고 AOA의 역가는 혈청 FSH 농도 변화와 유의한 상관관계가 있었으며 토끼마다 AOA에 대한 혈청 FSH 농도 증가가 달랐는데 이는 혈청 FSH가 난소기능 평가의 간접적 지표라는 것으로 판단할 때 AOA에 대한 민감도가 낮은 환자에서 항체양이 적을 때는 난소기능에 유의한 영향을 미치지 못하고 반복된 면역의 결과로 항체양이 증가함에 따라 혈청 FSH 증가로 반영되는 난소기능 이상이 나타나기 시작하여 그 항체양이 충분한 양에 도달하게 되어 세포파괴가 심하게 되는 경우 난소기능부전증이 초래된다는 것을 시사한다고 주장하였다.

X염색체의 숫적 또는 구조적 이상이 조기난소부전증 환자의 5.7-45.8%에서 발견된다고 알려져 있으며 특히 Turner 증후군(45, XO)이나 성선 이형성증(gonadal dysgenesis)의 경우 생식세포의 위축이 촉진되는 것으로 알려져 있다. 2개의 정상적인 X염색체가 난소기능 유지에 필수적이어서 Turner 증후군 환자의 경우 출생시 난포수는 정상이지만 곧 위축이 일어난

다. 난소기능 유지에 필요한 유전자는 Xp11.3, Xq13, Xq26-27 부위에 포함되어 있다고 생각되는데 이런 부위에서의 DNA의 미세한 변화가 정상염색체를 가진 조기난소부전증 환자에서 발견될 수도 있으며 가족력을 가진 정상염색체의 조기난소부전증 환자군을 설명해 주기도 한다. 또한 과잉의 X염색체도 드물게 조기난소부전증을 야기할 수도 있으며 이런 환자에서 순환자항체의 존재가 증명되어(Michalak et al., 1983) 유전적요소와 자가면역성 조기난소부전증과의 연관성이 시사되고 있다. 본 연구에서는 7명의 X염색체 이상이 있는 조기난소부전증 환자에서 항난소항체를 측정 한 결과 47, XXX염색체를 가진 환자에서 항난소항체 양성의 결과를 관찰하였다. 일반적으로 자가면역성 질환 자체는 대부분 유전적인 질환은 아니지만 유전적으로 감수성이 예민한 개인에게 잘 발생한다고 알려지고 있다. 다른 자가면역성 질환과 마찬가지로 조기난소부전증에서도 특정한 HLA-DR 항원과의 연관성이 제시되고 있어 Walfish 등(1983)의 보고에 의하면 HLA-DR3 항원이 정상대조군에서는 23%인데 비하여 조기난소부전증 환자에서는 50%가 양성 이어서 HLA 항원이 면역유전학적인 지표로 유용하다고 하였다.

조기난소부전증은 소위 실무현상(all-or-nothing phenomenon)이 아니며 자연적으로 난소기능이 회복될 수도 있는 중후군이며 조기폐경으로 인한 골조중증이나 관상동맥질환을 예방하기 위하여 호르몬대체요법을 진단후 바로 시행하는 것이 원칙이다. 임신을 원하는 경우는 estrogen-progestin요법, clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin(HMG), GnRH(gonadotropin releasing hormone) agonist/HMG 등의 배란유도방법을 사용해 보며 배란유도에 잘 반응하지 않는 경우에는 난자공여(oocyte donation) 프로그램으로 임신을 시도할 수도 있다. 자가면역성 조기난소부전증일 경우에는 부신피질호르몬, 혈장반출법(plasmapheresis), azathioprine 등의 치료가 시도되고 있다. 일반적으로 이차성 조기난소부전증이 일차성 조기난소부전증보다 예후가 좋아서 김 등(1992)의 연구에서 진단 후 임신율은 일차성 조기난소부전증은 0%, 이차성 조기난소부전증은 9.2%이었고, 배란유도제와 estrogen-progestin을 사용한 후 전체 조기난소부전증 환자의 임신율은 각각 8.0%, 8.6%였다. 또한 일차성과 이차성 조기난소부

전증간에 혈청 LH, FSH, E₂치의 유의한 차이는 없었으나 LH/FSH의 비가 1이상인 비율은 이차성 조기난소부전증시 일차성 조기난소부전증보다 유의하게 높았다(김 등, 1991). 자가면역성 조기난소부전증의 경우 Davis 등(1988)은 prednisone과 estradiol-17β를 고용량의 clomiphene citrate와 병용하여 배란을 유도한 예를 보고하였고 Cowchock 등(1988)은 다성선부전증을 동반한 조기난소부전증 환자에서 Addisonian crisis를 치료하기 위하여 steroid를 사용한 후 임신된 예를 보고하였으며 Tayler 등(1989)은 steroid와 호르몬대체요법을 시행하였으나 항난소항체와 항부신향체가 지속적으로 상승되어 있던 환자에서 진단 12년후 자연적으로 임신이 된 예를 보고하였으나 주관적인 판독이 필요한 부정확한 간접 면역형광법을 이용한 연구결과이므로 신빙성에 문제가 있다. Blumenfeld 등(1993)은 비특이적 자가항체들이 검출되는 조기난소부전증 환자가 배란유도제 사용에 좋은 대상자일 수도 있다고 주장하였다. Luborsky 등(1990)은 면역억제치료(medrol)를 시행한 2예에서 항난소항체의 역가가 감소함과 동시에 임신이 된 경우를 보고하였다. 본 연구에서는 항난소항체 양성이었던 4명의 조기난소부전증 환자들에서 estrogen-progestin 치료 시작 후 1달 간격으로 난소막 입자형 항원에 대한 결합력을 추적검사한 결과, 치료시작 후 시간이 경과함에 따라 난소막 항원에 대한 결합력이 감소하는 경향이 있었으며 2명에서 항난소항체 음성으로 전환되었다. 항난소항체의 추적검사 및 예후의 지표로서의 유용성에 대해서 계속 연구 중에 있으며 향후 정확한 난소내 항원 구조물의 성격을 밝혀 조기난소부전증의 병태생리를 규명하여 진단 및 치료방법의 개발과 그 예후를 예측하기 위하여 더욱 많은 연구가 필요하리라고 사료된다.

결 론

조기난소부전증 환자의 혈중 난소단백질에 대한 항체의 존재여부 및 돼지 난소막 및 과립막세포막의 입자형 또는 용질형의 난소단백질에 대한 결합력을 비교함으로써 항원구조물을 알아보며 치료에 따른 항난소항체의 변화를 관찰하고자 염색체 이상이 없는 조기난소부전증 환자 51명, X염색체 이상이 있는 조기난소부전증 환자 7명, 자연 폐경여성 21명, 난소절제

술에 의한 폐경여성 17명, 폐경전의 정상건강 여성 32명 등 총 128명에서 효소면역법으로 난소단백질에 대한 혈중 결합력 및 항난소항체를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4개의 다른 난소단백질 중 돼지 난소과립막 세포막 입자형 단백질에 대한 조기난소부전증 환자의 혈중 결합력이 통계학적으로 유의하게 높았다.

2. 항난소항체는 염색체 이상이 없는 조기난소부전증 환자 51명 중 15명(29%), 염색체 이상이 있는 조기난소부전증 환자 7명 중 47, XXX의 염색체를 가진 환자 1명(14.3%)에서 항난소항체 양성이었다.

3. 자연 폐경여성, 난소절제술에 의한 폐경여성 및 정상건강여성에서는 모두 항난소항체 음성이었다.

4. 항난소항체 양성인 조기난소부전증 환자에서 estrogen-progestin 치료 후 난소단백질에 대한 혈중 결합력을 5개월간 추적검사한 결과 그 결합력이 감소하는 경향을 보였으며 2명에서 음성으로 전환되었다.

이상의 결과는 항원구조물은 과립막세포막의 한 성분일 수 있으며, 항난소항체의 측정은 자가면역성 조기난소부전증 환자의 치료 후 추적검사로 유용할 수도 있다는 것을 시사한다.

인 용 문 헌

- Ahonen P, Miettinen A, Perheentupa J: Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 64, 494.
- Aiman J, Smentek C: Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1985, 66, 9.
- Alper M, Garner P: Premature ovarian failure: Its relationship to autoimmune disease. *Obstet Gynecol* 1985, 66, 27.
- Austin GE, Coulam CB, Ryan RJ: A search for antibodies to leuteinizing hormone receptors in premature ovarian failure. *Mayo Clin Proc* 1979, 54, 394.
- Blumenfeld Z, Golan D, Halachmi S, Makler A, Peretz BA, Brandes JM, Shmuel Z: Premature ovarian failure—the prognostic application of autoimmunity on conception after ovulation induction. *Fertil Steril* 1993, 59, 750.
- Chiauzzi V, Cigorraga S, Escobar ME et al.: Inhibition of follicle stimulating hormone receptor binding by circulating immunoglobulins. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 54, 1221.
- Coulam CB: Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982, 38, 646.
- Coulam CB, Adamson SC, Annerggers JF: Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986, 67, 604.
- Coulam CB, Kempers RD, Randall RV: Premature ovarian failure: Evidence for an autoimmune mechanism. *Fertil Steril* 1981, 36, 238.
- Coulam CB: The prevalence of autoimmune disorders among patients with primary ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1983, 4, 63.
- Coulam CB, Ryan RJ: Premature menopause. I, Etiology. *Am J Obstet Gynecol* 1979, 133, 639.
- Coulam CB, Ryan RJ: Prevalence of circulating antibodies directed toward ovaries among women with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1985, 9, 23.
- Cowchock FS, McCabe JL, Montgomery BB: Pregnancy after corticosteroid administration in premature ovarian failure (polyglandular endocrinopathy syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 1988, 158, 118.
- Damewood MA, Zacur HA, Hoffman GJ et al.: Circulating antiovarian antibodies in premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986, 68, 850.
- Davis OK, Ravnikaar VA: Ovulation induction with clomiphene citrate in a woman with premature ovarian failure. *J Reprod Med* 1988, 33, 559.
- De Moraes-Ruehsen M, Blizzard RM, Garcia-Bunued R, Jones GS: Autoimmunity and ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1972, 112, 693.
- Edmonds M, Lamki L, Killinger DW, Volpe R: Autoimmune thyroiditis, adrenalitis and orchitis. *Am J Med* 1973, 54, 782.
- Friedman S, McCormick JN, Fudenberg HH,

- Goldfine A: Ovarian antibodies in disorders of ovarian function. *Clin Immunol Immunopathol* 1972, 1, 94.
- Ho PC, Tang GW, Fu KH et al.: Immunologic studies in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1988, 71, 622.
- Irvine WJ, Barnes EW: Addison's disease and autoimmune ovarian failure. *J Reprod Fertil* 1974, 21(Suppl), 1.
- Irvine WJ, Chan MMW, Scarth L et al.: The future characterization of autoantibodies reactive with extra-adrenal steroid-producing cells in patients with adrenal disorders. *Clin Exp Immunol* 1969, 4, 489.
- Irvine WJ, Chan MMW, Scarth L et al.: Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1968, 2, 88.
- Kim JG, Miller MM, Anderson B, Rebar RW, LaBarbera AR: Antiovarian antibody titers correlate with serum FSH concentrations in experimentally induced ovarian failure. 36th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, Mar 15-18; San Diego, California, Abstract No. 563, 1989.
- 김정구, 이진용, 장윤석: 조기난소부전증 환자에서의 면역학적 연구. I. 임파구아형의 변화. 대한불임회지 1989, 16, 147.
- 김정구: 조기난소부전증 환자에서 순환 자가항체에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 669.
- 김정구, 김석현, 최영민, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석: 돼지난소 과립막세포 항원으로 면역된 가토에서 혈청 난포자극호르몬과 항난소항체의 상호관계에 관한 연구. 대한산부회지 1991, 34, 618.
- 김정구, 박만철, 이경희, 김석현, 최영민, 신창재, 문신용, 장윤석, 이진용: 일차성 조기난소부전증과 이차성 조기난소부전증의 차이에 관한 연구. 대한산부회지 1991, 34, 1553.
- 김정구: 자가면역성 조기난소부전증. 대한내분비학회지 1992, 7(S), 20.
- 김정구, 박만철, 신창재, 문신용, 이진용, 장윤석: 조기난소부전증의 치료 및 예후인자에 관한 연구. 대한산부회지 1993.
- Kuki S, Morgan RL, Tucci JR: Myasthenia gravis and premature ovarian failure. *Arch Intern Med* 1981, 141, 1230.
- Luborsky JL, Visintin I, Boyers S et al.: Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70, 69.
- McNatty KP, Short RV, Barnes EW et al.: The cytotoxic effect of serum from patients with Addison's disease and autoimmune ovarian failure on human granulosa cells in culture. *Clin Exp Immunol* 1975, 22, 378.
- Miake T, Sato Y, Takeuchi S: Implications of circulating autoantibodies and peripheral blood lymphocyte subsets for the genesis of premature ovarian failure. *J Reprod Immunol* 1967, 12, 163.
- Michael SSD: Interactions of the thymus and the ovary. In: Greenwald GS, Terranova PF: Factors regulating ovarian function. p445, New York, Raven Press 1983.
- Michalak DP, Zacur HA, Woodruff JD: Autoimmunity in a patient with 47, XXX karyotype. *Obstet Gynecol* 1983, 62, 667.
- Mignot MH, Schoemaker J, Kleingeld M et al.: Premature ovarian failure. I: The association with autoimmunity. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989, 30, 59.
- Mignot MH, Drexhage HA, Kleingeld M, Van de Plassche-Boers EM, Ramanth Rao B, Schoemaker J: Premature ovarian failure. II. Considerations of cellular immunity defects. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989, 30, 67.
- Nelson LM, Kimzey LM, Merriam GR, Fleisher TA: Increased peripheral T lymphocyte activation in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1991, 55, 1082.
- Pekonen F, Stiegberg R, Makinen T et al.: Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol* 1986, 25, 1.
- Rabinowe SL, Ravnkar V, Srikanta S, Dib SA, Adri MNS, George KL, Dluhy RG: Monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and anti-ovarian antibodies in pre-

- mature menopause. *Endocrinol* 1986, 118 (Suppl 1), 24.
- Rebar RW, Erickson GF, Yen SSC: Idiopathic premature ovarian failure: Clinical and endocrine characteristics. *Fertil Steril* 1982, 37, 35.
- Ruehsen MM, Blizzard RM, Bunuel RG et al.: Autoimmunity and ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1972, 112, 693.
- Taylor R, Smith NM, Angus B et al.: Return of fertility after twelve years of autoimmune ovarian failure. *Clin Endocrinol* 1989, 31, 305.
- Turkington RW, Levovitz HE: Extra-adrenal endocrine deficiencies in Addison's disease. *Am J Med* 1967, 43, 499.
- Vallotton MB, Foobes AP: Antibodies to cytoplasm of ova. *Lancet* 1966, 1, 264.
- Walfish PG, Gottesman IS, Shewchuk AB, Bain J, Hawe BS: Association of premature ovarian failure with HLA antigens. *Tissue Antigens* 1983, 21, 168.
- Williamson HO, Phansey SA, Mathur S et al.: Myasthenia gravis, premature menopause and thyroid autoimmunity. *Am J Obstet Gynecol* 1980, 137, 893.
- Williamson HO, Phansey SA, Mathur S, Mathur RS, Baker ER, Fundenberg HH: Myasthenia gravis, premature menopause and thyroid autoimmunity. *Am J Obstet Gynecol* 1980, 137, 893.
-