

+14bp/-14bp Polymorphism of HLA-G Gene in Iranian Women with Recurrent Spontaneous Abortions

ARTICLE INFO

Article Type

Original research

Authors

Paknahad B.¹ BSc,
Saadat Nia G.* Ph.D,
Mirza Ahmadi S.² Ph.D,
Salehian P.³ MD

How to cite this article

Paknahad B, Saadat Nia G, Mirza Ahmadi S, Salehian P. +14bp/-14bp Polymorphism of HLA-G Gene in Iranian Women with Recurrent Spontaneous Abortions. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;2(3):99-103.

ABSTRACT

Aims Spontaneous abortion is one of the most common complications of pregnancy. Human leukocyte antigen G (*HLA-G*) is thought to have a mediating role in mother and fetus interactions. The aim of this study was to investigate the association of the +14bp/-14bp polymorphism of *HLA-G* gene with recurrent spontaneous abortion (RSA) among Iranian women.

Materials & Methods This case-control study was conducted on 50 patients with RSA and 50 normal women referred to Sarem women hospital (Tehran, Iran) during a six-month period from October 2012 to March 2013. After preparation of the blood samples and extraction of DNA, the exon 8 of *HLA-G* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and observed by polyacrylamide gel electrophoresis. Statistical analysis of data was done by Chi-square test using SPSS software.

Findings There was a significant difference in the frequency of homozygous genotypes between patient and control groups ($p=0.034$). The homozygous genotypes of +14bp or -14bp were found more frequently in patients with RSA (60%) than the control group (34%). The odds ratio (OR) for homozygous genotypes relative to heterozygote genotype was found as 2.91.

Conclusion The frequencies of heterozygous and homozygous genotypes of the polymorphism, +14bp/-14bp of the *HLA-G* gene, differ between Iranian women with a history of RSA and healthy women.

Keywords 14+bp/14-bp Polymorphism; HLA-G Gene; Abortion, Habitual; HLA-G Antigens

CITATION LINKS

[1] The prognostic value of anti paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages [2] Maternal influences on placental development [3] Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis [4] A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage [5] Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome [6] Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors [7] Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population [8] HLA-G and immune tolerance in pregnancy [9] An update in recurrent spontaneous abortion [10] Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population [11] HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortion [12] Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion [13] A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [14] Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients [15] Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions [16] Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy [17] Recurrent spontaneous abortions: An overview of genetic and non-genetic backgrounds [18] HLA-G and pregnancy [19] HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance [20] Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions

*Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

¹Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

²Basic Sciences Faculty, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

³Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111

Phone: +98 (21) 44670888

Fax: +98 (21) 44670432
gitasaadat@irost.ir

Article History

Received: March 17, 2017

Accepted: June 21, 2017

ePublished: August 15, 2018

پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G در میان زنان ایرانی با سابقه سقط مکرر خودبه خودی

بهار پاکتهد BSc

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

گیتا سعادتنیا PhD

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

سینا میرزا احمدی PhD

دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

پیروز صالحیان MD

مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صرم، بیمارستان فوق تخصصی صرم، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سقط خودبه خودی یکی از شایع‌ترین عوارض بارداری است. تصور می‌شود که آنتی ژن لوکوسیتی انسانی HLA-G دارای نقش میانجی‌گری در ارتباط بین مادر و جنین باشد. هدف این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G با سابقه سقط مکرر خودبه خودی (RSA) در میان زنان ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی، در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۱ روی ۵۰ زن بیمار مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی و ۵۰ فرد با باروری طبیعی مراجعه‌کننده به بیمارستان فوق تخصصی صرم شهر تهران انجام شد. پس از تهیه نمونه‌های خونی و استخراج DNA، آگزون ۸ ژن HLA-G در هر دو گروه بیمار و کنترل با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر و به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۰٪ بررسی شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای در نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: ژنوتیپ هموزیگوت $+14bp$ و یا $-14bp$ در ۶۰٪ افراد مبتلا به سقط‌های مکرر خودبه خودی مشاهده شد، در حالی که در گروه کنترل فقط ۳۴٪ افراد ژنوتیپ هموزیگوت را نشان دادند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0.034$). نسبت شانس (OR) در مقایسه هموزیگوت به هتروزیگوت، ۲/۹۱ بود.

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G در میان زنان ایرانی از نظر فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت با سابقه RSA بین زنان بیمار و سالم تفاوت دارد.

کلیدواژه‌ها: پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G، سقط مکرر خودبه خودی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

نویسنده مسئول: gitasaadat@irost.ir

مقدمه

سقط خودبه خودی یکی از شایع‌ترین عوارض بارداری است. تعداد سه یا بیشتر ختم حاملگی خودبه خودی قبل از هفته ۲۰ یا حتی ۲۸ حاملگی سقط مکرر خودبه خودی (RSA) گفته می‌شود [1]. علل سقط مکرر خودبه خودی مولتی فاکتوریال است، ولی می‌توان دلایل آن را به دو دسته عمده جنینی و مادری تقسیم کرد. در مورد علل مادری می‌توان اختلالات انعقادی، اختلالات غدد درون ریز و نقص‌های اندومتریال را نام برد [2, 3]. از دیگر عوامل مهم، عوامل ایمنولوژیک هستند. در کل، علت حدود نیمی از موارد سقط مکرر، ناشناخته است که در این میان نقش عوامل ایمنولوژیک بیش از سایر عوامل مطرح است [4].

آنتی ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) یک مولکول غیرکلاسیک از HLAهای رده I است که برخلاف HLA کلاسیک، پلی مورفیسیم کمی

دارد. یکی از پلی مورفیسیم‌های شناخته شده در این ژن، پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ در آگزون شماره ۸ است که با پایداری mRNA ژن HLA-G و الگوی پردازش متفاوت آن ارتباط دارد که در نتیجه میزان بیان و عملکرد HLA-G را در دوران بارداری تحت تاثیر قرار می‌دهد. مولکول HLA-G در ابتدا، روی سلول‌های تروفوبلاست تهاجمی مشاهده شده و تصور می‌شود نقش میانجی‌گری در ارتباط مادر و جنین دارد [4].

آنتی ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) برای گیرنده‌های سلول‌های کشنده طبیعی (NK) یک لیگاند است و می‌تواند از فعالیت سلول‌های NK جلوگیری کند. در صورت محدود نشدن، به طور بالقوه می‌تواند به جنین آسیب وارد شود [5]. پروموتور HLA-G به شدت با خطر سقط خودبه خودی در ارتباط است، عدم تعادل در پروموتور از این رابطه علت و معلولی ممانعت به عمل می‌آورد [6].

آنتی ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) یک سرکوب‌کننده بسیار قوی سیستم ایمنی است و در مدولاسیون سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری و در نتیجه پذیرش جنین نیمه آلوژن توسط مادر بسیار مهم به نظر می‌رسد [4, 7, 8]. مطالعات روی پلی مورفیسیم HLA-G در بیماران مبتلا به سقط خودبه خودی در جوامع مختلف قومی، گزارش شده است [4, 8-10]. با این حال، نتیجه‌گیری در مورد ارتباط پلی مورفیسیم HLA-G با بارداری پاتولوژیک همچنان بحث‌انگیز باقی مانده است [10, 11].

پیشنهاد شده است که پلی مورفیسیم درج/حذف $+14bp/-14bp$ در آگزون شماره ۸، رونویسی این ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد درج $+14bp/-14bp$ در این ژن، با سطوح پایین HLA-G محلول در ارتباط است و این رابطه خطر سقط خودبه خودی را افزایش می‌دهد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که زنان هموزیگوت برای درج $+14bp/-14bp$ دارای افزایش خطر ابتلا به سقط بوده‌اند و سطح HLA-G محلول پلاسما این افراد به طور معنی‌داری کمتر از افراد هتروزیگوت یا فاقد $+14bp/-14bp$ بوده است [11-14].

هدف این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسیم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G با سابقه RSA در میان زنان ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی روی زنان ایرانی مراجعه‌کننده به کلینیک سقط مکرر بیمارستان فوق تخصصی صرم شهر تهران در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۱ انجام شد. از ۵۰ زن مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی که نتایج بررسی کاربوتیپ، شرایط هیستروسکوپی، مقادیر هورمونی، عفونت‌ها و انعقاد خون آنها نرمال بود و ۵۰ زن با سابقه بارداری نرمال با حداقل ۲ فرزند، نمونه خون گرفته شد. از زنان شرکت‌کننده در مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه مطابق کدهای اخلاق پزشکی اخذ شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از نمونه خون افراد از کیت استخراج Fermentas، شماره کاتالوگ K0512 (Thermo Fisher Scientific)، ایالات متحده) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر نمونه خون با ۴۰۰ میکرولیتر محلول لیزکننده مخلوط شد و ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای 65°C قرار گرفت، سپس ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها افزوده و به حالت تعلیق درآورده شد و در ادامه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی به یک لوله تازه انتقال داده شد و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب‌دهنده به آن اضافه شد و در دمای اتاق ۲-۱ دقیقه مخلوط شد. در مرحله بعد، نمونه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از

Volume 3, Issue 2, Summer 2018

ایزوفرم‌های محلول موجب نتایج منفی در IVF می‌شود و نتیجه گرفتند که پلی‌مورفیسم HLA-G با بارداری پاتولوژیک ارتباط دارد، با این وجود، این موضوع هنوز بحث‌برانگیز باقی مانده است.

وید و همکاران^[5] در مطالعه دیگری نشان دادند که HLA-G یک لیگاند برای گیرنده‌های سلولی NK است و می‌تواند فعالیت سلول‌های NK را مهار کند، به‌طوری که در صورت محدودنشدن این فعالیت، به‌طور بالقوه قادر است به جنین آسیب وارد کند. علاوه بر این، آنها پلی‌مورفیسم $+14bp/-14bp$ را بررسی کردند. این پلی‌مورفیسم در لقاح "در شیشه" نیز بررسی شد و ۲۹ زن مبتلا به RSA و ۹۳ زن بارور از نظر این ژنوتیپ مقایسه شدند. افرادی که برای $+14bp$ هموزیگوت بودند به‌طور معنی‌داری با کاهش باروری و سقط مکرر و در نتیجه درمان ناموفق با روش IVF مواجه بودند. یافته‌های وید و همکاران نشان می‌دهد بیان HLA-G نقش تنظیم‌کننده ایمنی در مادر و جنین طی لانه‌گزینی و بارداری دارد. نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر تا حدودی مشابه مطالعاتی است که در دانمارک انجام شده است، به‌طوری که تعداد بیشتری از افراد هتروزیگوت برای پلی‌مورفیسم $14bp$ در گروه کنترل وجود داشت و افزایش خطر RSA را در زنان با پلی‌مورفیسم $+14bp$ به‌خصوص به‌صورت هموزیگوت نشان می‌دهد. هرچند این مغایرت در یافته‌ها وجود داشت که در مطالعه حاضر ژنوتیپ $14bp$ - در گروه بیماران نیز افزایش یافته بود.

پاندی و همکاران^[12] براساس یک مطالعه در ایالات متحده پیشنهاد داده‌اند پلی‌مورفیسم $+14bp/-14bp$ در ناحیه ترجمه‌نشده 3' ژن HLA-G در آگرون ۸، رونویسی این ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات ایمونوتراپی با استفاده از پروپ نشان می‌دهد $+14bp$ در این ژن با سطوح پایین HLA-G محلول در ارتباط است و خطر سقط خودبه‌خودی را افزایش می‌دهد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که زنان هموزیگوت $+14bp$ دارای افزایش خطر ابتلا به سقط خودبه‌خودی هستند و سطح HLA-G محلول پلاسمای این افراد نیز به‌طور معنی‌داری کمتر از افراد هتروزیگوت یا فاقد توالی ۱۴جفت‌باز است. پلی‌مورفیسم $14bp$ در آگرون ۸ با پایداری mRNA ژن HLA-G و با الگوی پردازش متفاوت آن ارتباط دارد، در نتیجه میزان بیان و عملکرد HLA-G را در دوران بارداری تحت تأثیر قرار می‌دهد^[10,15].

در مطالعه تریپاتی و همکاران^[16] در هندوستان فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت $+14bp/14bp$ - در زنان RSA از نظر آماری افزایش یافته بود. در مطالعه دیگری که توسط بان و همکاران^[20] در چین انجام شد، ژنوتیپ ۱۰۹ زن بارور به‌عنوان گروه کنترل و ۷۹ زن با سابقه RSA تفاوت معنی‌داری در مقدار فراوانی آلل‌های $+14bp$ یا $14bp$ - بین گروه کنترل و افراد RSA نشان نداد، اما آلل $+14bp$ در زنان RSA نسبت به گروه کنترل بیشتر دیده شد و افراد بیمار اغلب ژنوتیپ هتروزیگوت $+14bp/14bp$ - داشتند. مطالعه دیگری در چین توسط ژو و همکاران^[10] انجام شد بررسی ۲۴ فرد RSA و ۸۸ فرد نرمال نشان داد فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت $+14bp/14bp$ - به‌طور معنی‌داری در بیماران RSA در مقایسه با افراد نرمال بیشتر است، این نتایج با نتایج به‌دست آمده از دانمارک مغایر بود^[11].

تفاوت‌های مشاهده شده در نتایج می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های نژادی باشد. همچنین مشاهده شده است که مقدار رونوشت آلل HLA-G با اضافه‌شدن $14bp$ به‌طور معنی‌داری نسبت به مواردی که آلل دارای حذف $14bp$ است، کاهش می‌یابد. مشاهده‌شدن آلل با اضافه‌شدگی $14bp$ در گروه RSA امکان دارد که با میزان mRNA ایزوفرم‌های HLA-G و یا احتمالاً با غلظت این پروتئین ارتباط

داشته باشد^[16]. در مطالعه دیگری در هندوستان ارتباط این پلی‌مورفیسم در ۱۴۳ زوج RSA و ۱۵۰ زوج به‌عنوان گروه کنترل بررسی شد ولی تفاوت معنی‌داری $+14bp$ یا $14bp$ - یافت نشد، در حالی که یک افزایش میزان هموزیگوتی در حذف $14bp$ در زنان مبتلا به RSA یافت شد که می‌تواند باعث افزایش میزان HLA-G محلول شود^[17].

یافته‌های این تحقیق حاکی از اختلاف معنی‌دار بین گروه بیمار و کنترل از نظر هتروزیگوتی و هموزیگوتی بود، به‌طوری که در گروه بیمار، افراد هتروزیگوت کمتری وجود دارد، هرچند که برای بیان ارتباط این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر خودبه‌خودی بررسی‌های بیشتری لازم است. تفاوت‌های موجود در این نتایج با مطالعات دیگر نیز می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های نژادی باشد. بنابراین، لازم است که مطالعات بیشتری با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر و قومیت‌های نژادی مختلف کشور جهت بررسی این ارتباط به‌عنوان یک عامل مستعدکننده RSA انجام شود.

نتیجه‌گیری

پلی‌مورفیسم $+14bp/-14bp$ ژن HLA-G در میان زنان ایرانی از نظر فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت با سابقه RSA بین زنان بیمار و سالم تفاوت دارد.

تشکر و قدردانی: از همکاران آزمایشگاه جنرال بیمارستان فوق تخصصی صرم کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تأییدیه اخلاقی: از زنان شرکت‌کننده در این مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه مطابق کدهای اخلاق پزشکی اخذ شد.

تعارض منافع: تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهار پاکنهاده (نویسنده اول)، نگارنده مقاله / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۳۰٪)؛ گیتا سعادت‌نیا (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله / روش‌شناس / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۳۰٪)؛ سینا میرزا احمدی (نویسنده سوم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی / تحلیل‌گر آماری (۱۰٪)؛ پیروز صالحیان (نویسنده چهارم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی / نگارنده بحث (۳۰٪)

منابع مالی: این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است که با استفاده از اعتبارات پژوهشگرده سلولی‌مولکولی و سلول‌های بنیادی صرم، انجام شد.

منابع

- 1- Orgad S, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H. The prognostic value of anti paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages. Hum Reprod. 1999;14(12):2974-9.
- 2- Aplin J. Maternal influences on placental development. Semin Cell Dev Biol. 2000;11(2):115-25.
- 3- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis. Hum Reprod Update. 2002;8(5):463-81.
- 4- 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(2):163-74.
- 5- Hviid TV, Hylénius S, Lindhard A, Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. Tissue Antigens. 2004;64(1):66-9.

procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

14- Shankarkumar U, Shankarkumar A, Chedda Z, Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(3):143-6.

15- Aruna M, Sirisha PV, Andal Bhaskar S, Tarakeswari S, Thangaraj K, Reddy BM. Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2011;77(2):131-5.

16- Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens.* 2004;64(6):706-10.

17- Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: An overview of genetic and non-genetic backgrounds. *Int J Hum Genet.* 2006;6(2):109-17.

18- Le Bouteiller P, Mallet V. HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod.* 1997;2(1):7-13.

19- Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas Freiss N. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252.

20- Yan WH, Lin A, Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, et al. Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2006;68(6):521-3.

6- Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):135-60.

7- Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod.* 2003;18(4):728-33.

8- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *Official Pub Fed Am Soci Exper Biol J.* 2005;19(7):681-93.

9- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272(2):95-108.

10- Xue S, Yang J, Yao F, Xu L, Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 2007;69(Suppl 1):153-5.

11- Hviid TV, Hylénius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2002;60(2):122-32.

12- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2004;269(3):161-72.

13- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out