

Cyclosporine A의 MHC Class II 항원에 대한 억제효과

박국양* · Douglas F. Larson, Ph. D.**, Jack G. Copeland, M.D.**

=Abstract=

The Effect of Cyclosporine A on the Expression of the Major Histocompatibility Complex Antigen Class II (MHC II)

Kook-Yang Park, M.D.*, Douglas F. Larson, Ph. D.**, Jack G. Copeland, M.D.**

The present study was designed to determine whether cyclosporine A inhibits Major Histocompatibility Complex Class II antigen (MHC II) expression in the allograft rat heart myocardium. In this rat allograft study we also tried to elucidate whether CSA inhibits MHC II in a dose dependent way. Hearts were isolated from LBN rats weighing 200~250 grams and heterotopically transplanted into the abdomen of weight-matched ACI rats. The ACI rats were randomly assigned to one of the three experimental groups according to cyclosporine dosage: {1} control [no CSA], n = 6 {2} CSA 5mg/day, n = 5 {3} CSA 10mg/day, n = 5. The transplanted hearts were harvested 5 days postoperatively and analysed. MHC II expression was detected by indirect immunoperoxidase staining and quantified via computer image analysis system. The % positive area reading was obtained in each slide (50 areas per group) and compared to other groups. Significant differences were noted between three groups ($p < 0.05$). We conclude that CSA inhibits MHC II in heterotopically transplanted allograft rat heart in a dose dependent way.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 28: 443-6)

Key words : 1. Cyclosporins
2. Major histocompatibility antigen

서 론

Dr. Borel¹⁾에 의해 Cyclosporine A가 처음 발견된 것은 1972년으로 임상에서는 1978년 Dr. Calne에 의해 신이식 환자에서 처음 사용되었다. 12개의 아미노 산이 하나의 고리로 연결되어 이루어진 이 물질은 곰팡이의 일종인 *Tolypocladium inflatum* Gams에서 추출되었으며 지금은 강

력하고도 확실한 면역억제제로 거의 모든 장기의 이식에 1차 면역억제제로 자리하고 있다.

Cyclosporine A의 주된 면역억제기전은 이식 후 활성화된 CD4 T-cell에 의한 Interferon gamma (INFr), Interleukin 2 (IL2)의 분비를 억제하는 것으로 알려져 있으며 이러한 세포활성물질 (cytokine)의 분비차단은 이식항원인 Major Histocompatibility Complex class II antigen (MHC II)의 표현억제를 초래하며 결과적으로 거부반응을 억제한다.

* 부천 세종병원 흉부외과

* Sejong Heart Institute, Sejong General Hospital, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery

** Department of Surgery, Section of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University of Arizona, Tucson AZ 85724 U.S.A.

본 논문은 1994년 제25차 추계학술대회에서 구연 되었음

논문접수번호: 941108-2 심사통과일: 1994년 11월 30일

통신저자: 박국양, (422-052) 경기도 부천시 소사본2동 91-121, Tel. (032) 340-1383, Fax. (032) 349-3005

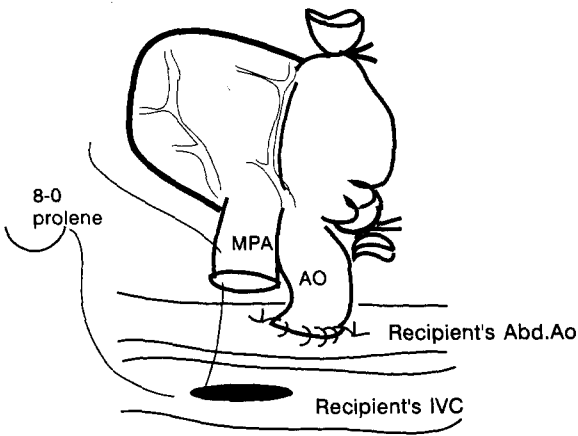


Fig. 1. Technique of heterotopic rat heart transplantation; modified Ono and Lindsey method

다. 본 실험에서는 이러한 cyclosporine A의 MHC class II 표현 억제효과를 실제적으로 규명함과 더불어 이 억제효과가 투여 약 용량에 비례하는지를 밝히는데 있다.

대상 및 방법

사용동물. 몸무게 200~250 gm인 숫컷 LBN종의 쥐를 donor로 150~250 gm인 ACI종을 recipient로 하였으며 모든 동물의 취급은 국제적규약에 따라 마취, 수술, 희생되었다(NIH Publication No. 85-23, revised 1985).

수술방법. 실험동물을 3군으로 나누어 제1군은 Cyclosporine A를 투여하지 않는 대조군으로 제2군은 Cyclosporine A 5mg 투여군으로 제3군은 Cyclosporine A 10mg 투여군으로 하였다. 각 군의 실험동물 수는 최소 5마리로 하였다. 심장의 적출, 수술에는 enflurane (Ethrane®)마취가 사용되었으며 5%에서 시작하여 2%에서 유지하였다. 이식 후 제5일째 이식된 심장의 적출시에는 복강내로 pentobarbital을 주사하여(40mg/kg) 실시하였다. LBN 공여 심장의 적출은 복부대동맥을 통한 modified Krebs-bicarbonate 심정지액투여로 이루어 졌으며 복강내 이소성 심장이식은 변형 Ono와 Lindsey법(Modified Ono and Lindsey technique)을 사용하였다. 그 방법을 간단히 기술하면 적출된 공여 심장을 냉각 식염수를 적신 거즈로 보호한뒤 10배의 미세수술용 현미경하에 보합을 실시하였다. 먼저 8-0 prolene을 이용한 대동맥 봉합을 실시하고 다음 같은 8-0 prolene을 사용하여 폐동맥봉합을 완료하였다(Fig. 1). 봉합에 걸리는 시간은 25~35분 이었으며 총 수술시간은 1

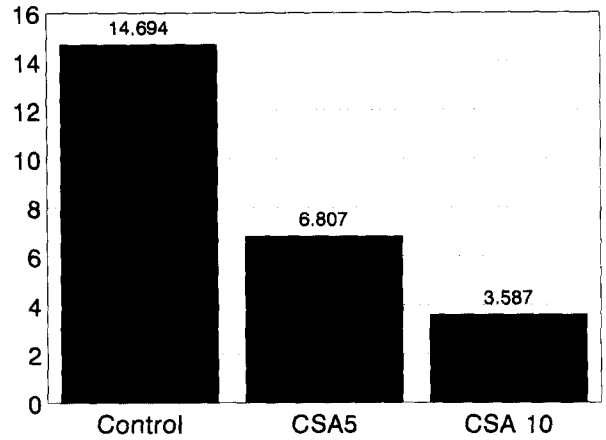


Fig. 2. Result of % positive area reading: cyclosporine A inhibit MHC II antigen expression in a dose dependent way ($p < 0.05$).

시간 30분 이내였다. 이식 후 cyclosporine A는 매일 일정한 시간에 한번씩 가는 PVC tube를 경구로 삽입하여 투여되었으며 이식 후 제5일째 이식된 심장을 적출하였다. 적출된 심장은 곧 냉각 식염수로 씻은뒤 O.C.T. compound로 덮고 liquid nitrogen으로 미리 냉각된 isopentane에 담가 급속 냉각을 유도한뒤 영하 70도의 냉장고에 보관하였다.

심정지액. 심정지액은 modified Krebs-bicarbonate 용액으로 구성은 119mM NaCl, 15mM KCl, 0.8mM CaCl₂, 5.2mM MgCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 11mM dextrose, 68mM mannitol, and 0.2mM lidocaine이었다. 계산된 osmolality는 355 mosm 이었다.

면역 조직학적 검사(Immunohistochemistry). 냉장보관되었던 조직을 5 μ m두께로 절편을 만든뒤 (Cryocut 1800, Reichert-Jung Co.) 슬라이드(slide)를 아세톤 용액에 담가 고정한뒤 염색시까지 냉장보관 하였다. 슬라이드를 염색하는 과정은 다음과 같다. 냉장고에서 꺼낸 슬라이드는 일단 상온에서 말린뒤 다시 acetone용액에 10분 동안 담가 고정한뒤 염색을 하였다.

MHC class II 항원은 소위 'indirect immunoperoxidase' 법을 사용하였는데 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 mouse anti-rat class II monoclonal antibody(OX 18, Sera-Lab)를 1:200배로 희석하여 실온에서 약 25분 동안 배양한다. 대조시약 및 세척액으로는 phosphate buffered saline(PBS)을 사용하였다. PBS로 세척 후 다시 25분 동안 일차항원에 대한 이차 항원(Goat anti-mouse IgG, Caltag

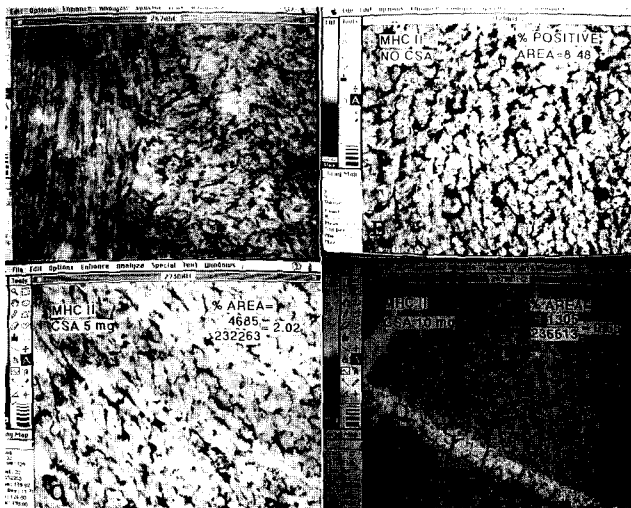


Fig. 3. Computer image analysis of MHC II expression: (A) image of a slide in which PBS was used as a primary ab. (B) no CSA (C) CSA 5mg (D) CSA 10mg. Significant differences are noted between groups.

Lab, California)을 1:200배로 희석하여 배양하고 세척 후 다시 avidin-biotin complex (Peroxidase conjugated streptavidin, Dakopatts, Denmark)로 25분 동안 배양하였으며 세척 후 슬라이드를 H₂O₂가 첨가된 0.3% DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co.)용액에 5분 동안 담근 뒤 Harris' Hematoxylin으로 염색하였다.

MHC Class II 항원의 정량적 분석. 염색 후 슬라이드에 나타난 MHC class II 항원의 정량화는 computer image analysis program (IMAGE by Wayne Rasband, NIH, version 1.40)을 사용하였다. 간단히 이 방법을 설명하면 먼저 현미경을 통해 보이는 슬라이드의 한 image를 computer와 연결된 특수 camera (Sanyo, model VDC 3875, CCD Video Camera)를 통해 computer monitor상의 화면으로 잡는다. Computer monitor 상의 고정된 image는 IMAGE software의 여러가지 기능으로 인하여 객관적인 정량분석이 이루어진다. 한 화면의 조직이 없는 부분을 고려하여 다음과 같이 % positive area를 구하였다.

$$\% \text{ Positive Area} = \frac{\text{Positive Area}}{\text{Total Tissue Area}} \times 100$$

한 슬라이드당 10개의 cross-sectional area를 이와 같은 방법으로 측정하였으며 (한 Group 당 50개 areas) 모든 data는 통계 software인 Statview 512로 기록된 후 one way

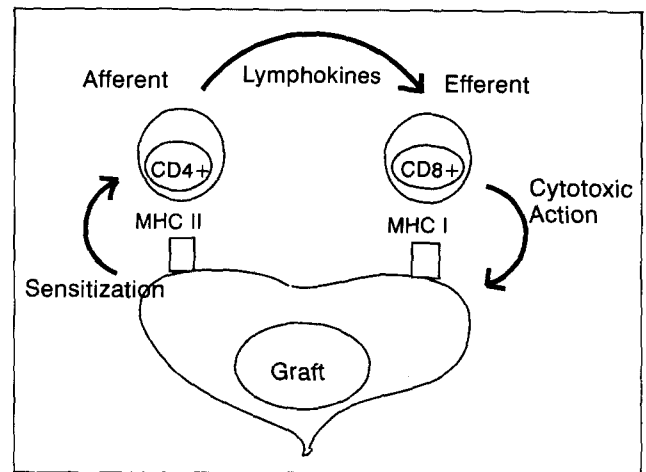


Fig. 4. Schematic view of allograft rejection

ANOVA로 그 통계적의미가 판명되었다. p-value가 0.05 이하이면 의미가 있다고 판명되었다.

결 과

Cyclosporine A를 전혀 사용하지 않는 제1군, 매일 5mg 씩 사용했던 제2군 그리고 매일 10mg 씩 사용했던 제3군의 % positive area는 각각 14.694%, 6.807%, 3.587%였으며 이 세 군 사이에는 통계적으로 의미있는 차이가 있었다 (Fig. 2). 또한 5mg 사용군보다 10mg 사용군에서 더 뚜렷한 MHC class II 항원의 감소를 볼 수 있었다 (Fig. 3).

고 찰

MHC 항원은 우리 생체내에서 자기 (self)와 비자기 (non-self)를 감별하는 역할을 하며 이식 후 나타나는 거부 반응의 기전에도 중심역할을 하기 때문에 이식항원 (transplantation antigen)이라고도 부른다²⁻⁴⁾. 거부 반응의 단계를 CD4 T-cell (helper T cell)이 감각 (sensitization)되는 afferent limb 과 CD8 T-cell (cytotoxic T cell)에 의한 세포 파괴의 과정인 efferent limb 으로 나눌 때 MHC class II 항원은 afferent limb에 관여하여 CD4 T-cell을 감각시키는 것으로 잘 알려져 있다. 즉 다시 말하면 donor의 antigen presenting cell (APC)에 있는 MHC class II 항원은 이식 후 recipient T-cell과 만나게 되고 이 중 CD4 T세포가 활성화되는 과정이 afferent limb 인 것이다. 활성화된 CD4 (T4) T세포는 γ INF, IL2 등의 lymphokine을 통해 다른 CD4 T 세포

포를 활성화시키고 또한 donor MHC II 항원의 표현을 유도하는 과정을 통해 이러한 sensitization process는 cascade를 이루게 된다^{5, 6}. CSA는 이 과정중 바로 lymphokine의 분비를 억제하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 이식 후 CSA를 투여 할 경우 MHC II 항원의 표현은 당연히 감소된다고 기대할 수 있겠다(Fig. 4).

또 한편 몇몇 논문^{5, 6}에서는 현재 면역 억제제로 가장 광범위하게 사용되고 있는 cyclosporine A가 정상적으로 Host에 존재하는 MHC 항원 조차도 억제한다고 하였으며 Halloran 등⁷도 mouse kidney study에서 매우 높은 농도의 cyclosporine을 사용했을 때 normal MHC가 억제 되어 나타남을 관찰하였다. 그러나 일부 저자³들에 의하면 CSA가 꼭 MHC를 억제 하는 것은 아니며 이식된 심장의 조직 검사 결과 위의 일반적인 통념^{7, 8}과 반대로 나타나는 경우도 있다고 한다.

CSA의 MHC억제에 대한 이러한 다양한 견해에 대해 저자는 의문을 가져 왔으며 규명을 하고자 하였다. 또한 이러한 일견 상치되는 듯한 발표가 흑시 종(species)에 따른 차이가 아닐까하고 생각하였으며 더욱이 cyclosporine A의 용량과 MHC 항원의 표현정도가 반비례하는지는 저자의 궁금한 사항이었다. 이 논문은 이와 같은 CSA와 MHC class II 항원과의 관계를 알아보하고자하는 저자의 연구의 일부이다.

본 allograft rat heart transplantation model을 통한 논문에서 저자는 CSA가 MHC II를 투여량에 비례하여 억제한다는 것을 밝혔지만 이를 일반화하여 모든 동물이나 인간의 심장에서도 동일한 결과를 가져 올 것이라고 기대하지는 않는다. 그 이유는 MHC II 항원의 표현은 매우 역동적이어서 이미 많은 저자⁹⁻¹¹에 의해 밝혀진대로 종에 따라 다르고 또 같은 종이랄 할지라도 세포에 따라 다르기

때문이다.

참고 문헌

1. Borel. *Immunological properties of cyclosporine A*. J Heart Transplant 1982;1:237-41
2. Halloran PF, Wadgyman A, Autenreid F. *The regulation of expression of major histocompatibility complex products*. Transplantation 1986;41:413-20
3. Rose ML. *Immunoregulation of MHC antigen expression*. Immunol Today 1985;6:297-8
4. Lim SML, White DJG, Calne RY. *Cyclosporine A- Induced Acceptance of Major Histocompatibility Complex-Incompatible Grafts Differs Immunologically From Class I or Minor Antigen-Mismatched Grafts Accepted in the Absence of Immunosuppression*. Transplant Proc 1987;19:4252-3
5. Groenewegen G, Buurman WA, van der Linden CJ. *Effect of cyclosporine on MHC class II expression on arterial and venous endothelium in vitro*. Transplantation 1985;40:21-5
6. Groenewegen G, Buurman WA, van der Linden CJ. *Lymphokine dependence of in vivo expression of MHC class II antigens by endothelium*. Nature 1985;316:361-3
7. Autenreid P, Halloran PF. *Cyclosporine blocks the induction of class I and class II MHC products in mouse kidney by graft vs host disease*. J Immunol 1985;135:3922-8
8. Halloran PF, Wadgyman A, Autenreid P. *Inhibition of MHC product induction may contribute to the immunosuppressive action of cyclosporine*. Prog Allergy (in press)
9. Thorby E. *Structure and function of HLA molecules*. Transplant Proc 1987;19:29-33
10. Farbre JW, Milton AD, Spencer S, Settaf A, Houssin D. *Regulation of alloantigen expression in different tissues*. Transplant Proc 1987;19:45-9
11. Fabre JW, Milton AD, Spencer S, Settaf A, Houssin D. *Regulation of alloantigen expression in different tissues*. Transplant Proc 1987;19:45-50