

보존된 동종동맥편 조직의 면역성 변화에 관한 연구

임창영* · 전예지** · 박영훈** · 강영선*** · 최희숙***

=Abstract=

Changes in Immunogenicity of Preserved Aortic Allograft

Chang Young Lim, M.D.*, Ye Jee Jun, M.D.**, Young Hoon Park, M.D.**,
Young Sun Kang, B.S., Hee Sook Choi, Ph.D.***

The causes of degenerative changes in allograft cardiac valves are not well known to this day. Today's preserved allografts possess highly viable endothelial cells and degeneration of allografts can be facilitated by immune reaction which may be mediated by these viable cells. To test the antigenicity of endothelial cells, pieces from aortic wall were obtained from fresh and cryo-preserved rat allograft. Timings of sampling were prior to sterilization, after sterilization, after 1, 2, 7, 14 days of fresh preservation and cryopreservation. Endothelial cells were tested by immunohistochemical methods using monoclonal antibodies to MHC class I(MRC OX-18), class II(MRC OX-6) and ICAM-1 antigens. After transplantation of each group of aortic allograft at the subcutaneous layers of rats, population of CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell were analyzed with monoclonal antibodies after 1, 2, 3, 4, 6 and 8 weeks.

MHC class I expression was 23.95% before preservation and increased to 35.53~48.08% after preservation(p=0.0183). MHC Class II expression was 9.72% before preservation and 10.13~13.39% after preservation(P=0.1599). ICAM-1 expression was 15.02% before preservation and increased to 19.85~35.33% after preservation(P=0.001).

The proportion of CD4⁺ T-cell was 42.13% before transplantation. And this was 49.23~36.8% after transplantation in No treat group (p=0.955), decreased to 29.56~32.80% in other group(p=0.0001~0.008). In all the groups, the proportion of CD8⁺ T-cell increased from 25.57% before transplantation to 42.32~58.92% after transplantation(p=0.0001~0.0002). The CD4⁺/CD8⁺ ratio decreased from 1.22~2.28 at first week to 0.47~0.95 at eighth week(p=0.0001).

The results revealed that the expression of MHC class I and ICAM-1 in aortic allograft endothelium were increased but that of MHC class II were not changed, despite the different method of preservation. During 8 weeks after transplantation of aortic allograft, the subpopulations of CD4⁺ T cell were not

* 중앙길병원 심장센터 흉부외과

* Dept. of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Heart Center, Gil Medical Center

** 리라병원 흉부외과

** Dept. of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Rira Hospital

*** 건국대학교 동물자원연구센터

*** Senior Scientist, Animal Resources Research Center, Konkuk University

논문심사일 : 96년 4월 29일 심사통과일 : 96년 6월 11일

책임저자 : 임창영, (405-220) 인천광역시 남동구 구월동 1198. Tel. (032) 460-3656, Fax. (032) 460-3117

changed or only slightly decreased but those of CD8⁺ T cell were progressively increased.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 1173-81)

Key words: 1. Allograft, heart valve
2. Immunity, cellular
3. Immunity, humoral
4. Endothelium, vascular

서 론

동종동맥편(aortic allograft)은 획득후 적절한 보존처리 과정을 거쳐서 인체에 이식할 경우, 기존의 심장판막치환 수술에 사용되는 조직판막에 비해 내구성이 뛰어나고 혈액역학적 기능도 우수하며, 심내막염과 같은 감염에도 강한 내성을 갖고있다. 또한 복잡심기형에 대한 선천성 심장병 수술시 우심실 유출로재건등 여러용도로 사용되고있다. 그러나 동종심장판막도 기존의 동물조직판막처럼 이식후 많은 경우에서 이식된 조직의 손상으로 인한 기능부전이 발생된다. 이러한 이식후 조직손상의 기전에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으나 이식과정에서 발생하는 수술 기술상의 문제점을 제외하고는 조직의 퇴행변화(degeneration)의 원인에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않은 실정이다.

최근에 들어 획득한 동종동맥편의 보존기법이 발전함에 따라 보존된 동종동맥편조직의 생육성이 상당한 정도로 보존된다. 따라서 생육성이 보존된 상태에서 이식된 동종동맥편조직에 대한 인체의 면역반응이 이식된 조직의 변성 및 퇴화에 결정적인 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다¹⁻³⁾. 특히, 혈관조직의 이식에 있어서 면역반응의 가장 중요한 인자로 생각되는 혈관내피세포의 생육성이 약 50% 이상으로 보존되기 때문에^{4,5)} 보존처리된 동종동맥편의 내피세포가 갖는 면역성(immunogenicity)에 관한 연구가 필요하다.

이에 저자들은 보존처리된 동종동맥편의 항원성이 보존처리과정에 따라 변화가 있는지와, 변화가 있을 경우 변화된 항원성과 보존처리된 동종동맥편을 이식받은 수혜자에게서 일어나는 면역반응과의 관계를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

대상 및 방법

1. 연구내용

보존처리한 동종동맥편의 면역표현(antigenic expression)

ssion)을 보기위하여 동종동맥편의 혈관내피세포에 대하여 면역조직화학검사(immunohistochemical study)를 하였다(in vitro). 내피세포의 MHC표현을 찾기위한 항체로는 anti-MHC class I antibody(MRC OX-18:FITC)와 anti-MHC class II antibody(MRC OX-6:Phycoerythrin conjugate)를 사용하였고, adhesion molecule표현을 찾기 위하여 anti-ICAM-1 antibody (CD 54:FITC)를 사용했다. 내피세포와 이들 항체를 반응시킨후 flow cytometry로 분석하여 조직이 나타내는 면역표현을 정량성으로 측정하였다.

또한 이식된 동종동맥편에 대한 수혜자의 면역반응검사는 혈액내의 림프구에 대한 면역조직화학검사(immunohistochemical study)를 하였다(in vivo). CD4⁺ T-cell과 CD8⁺ T-cell의 분포 및 CD4⁺ T-cell/CD8⁺ T-cell의 비율을 보기위한 항체로서 anti-rat T helper cytotoxic/suppressor cell monoclonal antibody-FITC를 사용하였다. 각 단계의 보존처리된 동종동맥편을 흰쥐에 이식하고 일정시간이 경과된후 채혈하여 이들 항체와 반응시킨후 flow cytometry로 분석하여 정량적으로 측정하였다.

2. 실험방법

1) 동종동맥편의 획득방법

조직공여동물(donor)및 이식수혜동물(recipient)은 모두 200~250gm의 Sprague-Dawley female rat으로 하였다. 흰쥐의 복강내에 3.6% chloral hydrate(1ml/100 gm body weight)를 주입하여 마취시킨 뒤 멸균된 기구를 사용하여 심장과 흉복부 대동맥을 적출하였다. 적출한 장기에서 동맥벽절편을 채취하고(멸균처리전군: Fresh), 나머지 적출장기를 멸균용액(RPMI-1640 with 10% FBS, CLPV mixture; Cefoxitin 240mcg/ml, Lincomycin 120mcg/ml, Polymyxin B 100mcg/ml, Vancomycin 50mcg/ml)에 24시간 동안 4℃로 냉장보관하여 멸균처리를 했다. 멸균처리된 장기를 2군으로 나누어 한 편은 보존용액(RPMI-1640 with 10% FBS)에 담가 4℃로 각각 1, 2, 7, 14일간 냉장보관하고(냉장보존 1, 2, 7, 14일군: 1 day, 2 days, 7 days, 14 days), 나머지 한 편은 10% DMSO를 첨가한 냉동용액에

넣어 -1°C/min의 controlled freezing process를 거쳐서 -196°C로 2주간 보관한후 급속해동(rapid thawing)하였다 (냉동보존군: cryo).

2) 면역표현 검사방법

위와같은 방법으로 얻은 각각의 동종동맥편의 절편을 1% type I collagenase 100 mg/ml (SIGMA-9891)에 넣어 38°C에서 30분간 배양해서 PBS(phosphate buffered saline)로 씻어낸 후 조직절편을 유리봉으로 가볍게 긁어 결체조직으로부터 내피세포층만을 분리하였다. 내피세포가 포함된 부유액을 cell counting하여 1.0x10⁶cell/500 l PBS씩 3개의 falcon tube에 분주한후 개별 tube에 anti-MHC class I antibody(MRC OX-18, FITC;SEROTEC), anti-MHC class II antibody(MRC OX-6, Phycoerythrin conjugate; SEROTEC), anti-ICAM-1 antibody(CD 54, FITC; SEROTEC)를 15 µl Ab./3x10⁵ cell/300 µl PBS가 되는 농도로 넣어 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그후 PBS로 2차례에 걸쳐 세척하여 내피세포에 부착되지 않은 항체를 제거한 후 적어도 5,000개 이상의 내피세포를 flow cytometry로 분석하여 분석된 전체 내피세포수 중 항체가 부착된 세포수의 비율을 면역표현정도(antigenic expression)로 판정하였다.

3) 면역반응 검사방법

각 실험군(별균처리전군, 냉장보존 2, 7, 14일군, 냉동보존군)에서 획득한 동종동맥편을 각각 흰 쥐 5마리의 복부 피하층에 이식하였다. 이식하기 전과 이식한 후 1, 2, 3, 4, 6, 8주째에 꼬리정맥에서 채혈하여 실온에서 정맥혈 1ml와 PBS 1ml를 흔들어 섞은뒤 1ml의 histopaque solution이 담긴 tube에 넣었다. Tube를 실온에서 1700 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층부의 plasma와 platelet layer를 제거하고 mononuclear cell(lymphocyte) layer 만을 채취하였다. 채취한 lymphocyte를 PBS로 2회 세척한 뒤 18~20°C에서 1500rpm으로 5분간 원심분리하여 순수한 lymphocyte만을 채취하였다. 이렇게 채취한 lymphocyte를 Media A (PBS, pH7.2 + 5% normal serum of host species + 100 µl of 2M sodium azide)에 넣어 현탁액을 만들어 이 현탁액을 cell counting하여 1x10⁶ cell/50 µl Media A가 되도록 분주하였다. 각각에 Anti-rat T Helper cell monoclonal antibody-FITC(CD4 equivalent; CEDARLANE)와 Anti-rat T cytotoxic/Suppressor cell monoclonal antibody-FITC(CD8 equivalent; CEDARLANE)를 5.25 µl 씩 100g antibody/1.05ml PBS의 농도로 첨가하였다. 이것을 잘 섞은 후 4°C에서 30분간 배양하여 Media B (PBS, pH 7.2 +

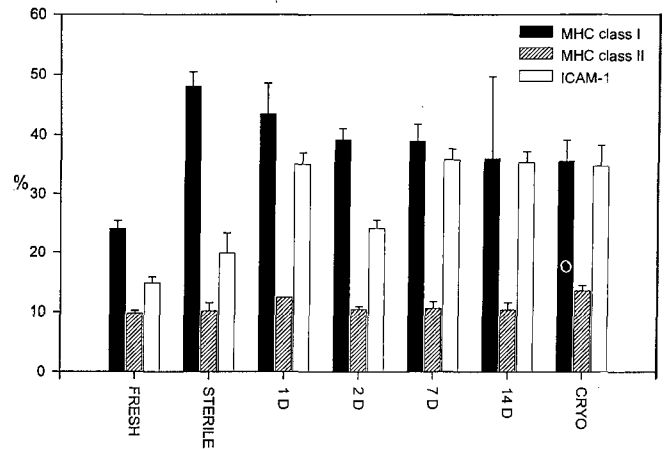


Fig. 1. Changes of MHC class I, class II and ICAM-1 in each experimental group.

0.5% BSA + 100 µl of 2M sodium azide)로 2회 세척한 후 500 l PBS에 섞어 현탁액을 만든뒤 lymphocyte 전체중 CD4 및 CD8 antibody가 부착된 세포의 비율을 flow cytometry로 분석하였다.

3. 통계학적 분석

통계학적 검증은 SAS program을 이용하여 모수적 분석과 비모수적 분석을 병행하였으며, 각 군간의 차이를 검정하기 위하여 반복측정(Repeated Measures Analysis of Variances)에 대한 분산분석(ANOVA test)을 이용하였다.

실험 결과

1. 동종동맥편 보존처리과정 각단계에서 혈관내피세포의 면역표현정도.

1) 내피세포의 MHC class I 표현

별균처리전(fresh)군에서 23.95 ± 5.53%, 별균처리후(sterile)군에서 48.08 ± 4.15%, 냉장보존 1일후(1 day)군에서 43.46 ± 10.15%, 냉장보존 2일후(2 days)군에서 39.22 ± 4.50%, 냉장보존 7일후(7 days)군에서 38.94 ± 4.85%, 냉장보존 14일후(14 days)군에서 36.02 ± 19.39%, 냉동보존(cryo)군에서 35.53 ± 8.01%였다. MHC class I의 표현은 별균처리후와 보존처리한 경우에 별균처리전에 비하여 의미있게 증가하였다(p=0.01) (Fig. 1).

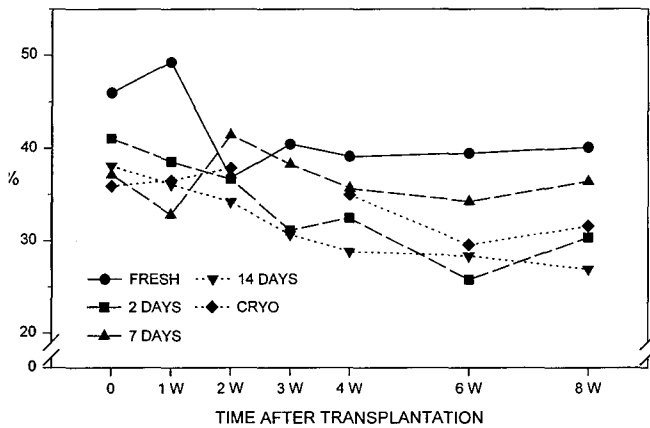


Fig. 2. Changes of CD4⁺ T-cell in each experimental group after transplantation.

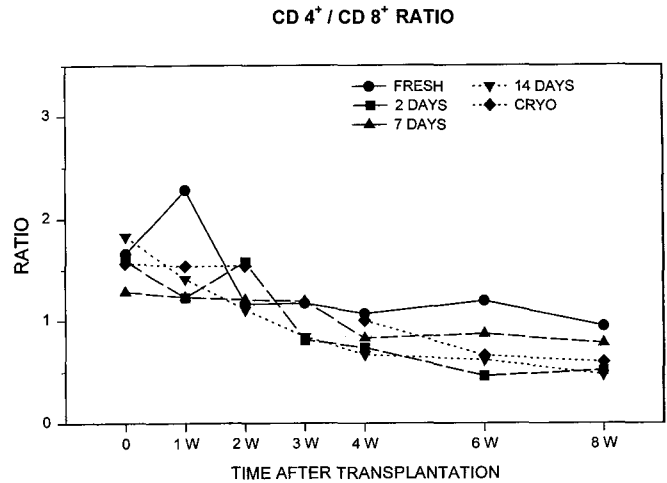


Fig. 4. Changes of CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio after transplantation.

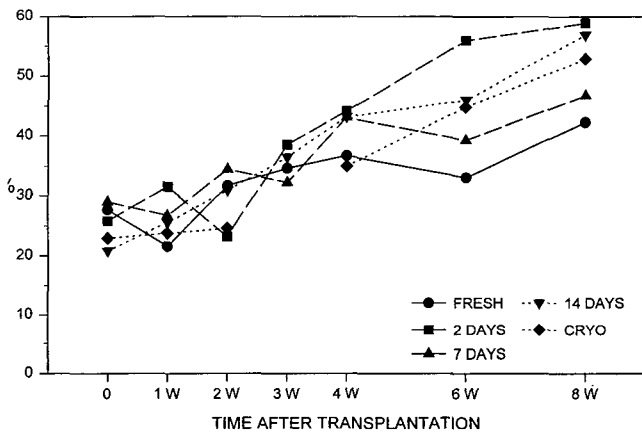


Fig. 3. Changes of CD8⁺ T-cell in each experimental group after transplantation.

2) 내피세포의 MHC class II 표현

멸균처리전(fresh)군에서 $9.72 \pm 1.44\%$, 멸균처리후(sterile)군에서 $10.13 \pm 2.36\%$, 냉장보존 1일후(1 day)군에서 $39 \pm 0.00\%$, 냉장보존 2일후(2 days)군에서 $10.35 \pm 1.12\%$, 냉장보존 7일후(7 days)군에서 $10.50 \pm 3.00\%$, 냉장보존 14일후(14 days)군에서 $10.27 \pm 1.70\%$, 냉동보존(cryo)군에서 $13.39 \pm 3.43\%$ 였다. 각 군에서 MHC class II의 표현은 의미있는 차이가 없었다($p=0.1$)(Fig. 1).

3) 내피세포의 ICAM-1 표현

멸균처리전(fresh)군에서 $14.81 \pm 3.43\%$, 멸균처리후(sterile)군에서 $19.85 \pm 5.90\%$, 냉장보존 1일후(1 day)군에서 $35.01 \pm 2.86\%$, 냉장보존 2일후(2 days)군에서 $24.05 \pm$

1.99% , 냉장보존 7일후(7 days)군에서 $35.83 \pm 3.61\%$, 냉장보존 14일후(14 days)군에서 $35.33 \pm 3.66\%$, 냉동보존(cryo)군에서 $34.67 \pm 8.60\%$ 으로 ICAM-1의 표현정도는 보존처리를 한 경우에 멸균처리군에 비하여 의미있게 증가하였다($p=0.001$)(Fig. 1).

2) 보존처리된 동종동맥판 이식술후의 면역반응결과

가) 멸균처리전(fresh)의 동종동맥판을 이식한 군

CD4⁺ T-cell의 분포는 이식전이 $40.16 \pm 0.51\%$, 1주후에 $42.73 \pm 1.79\%$ 2주후에 $30.73 \pm 1.72\%$, 3주후에 $41.71 \pm 2.12\%$, 4주후에 $40.35 \pm 2.90\%$, 6주후에 $41.50 \pm 6.01\%$, 8주후에 $37.50 \pm 4.50\%$ 로 변화를 보이지 않았다($p=0.9055$). CD8⁺ T-cell의 분포는 이식전에 $24.81 \pm 1.63\%$, 1주후에 20.63 ± 5.70 , 2주후에 $29.94 \pm 7.44\%$, 3주후에 $37.03 \pm 9.00\%$, 4주후에 $38.71 \pm 3.81\%$, 6주후에 $33.55 \pm 1.85\%$, 8주후에 $42.64 \pm 6.83\%$ 로 증가하였다($p=0.0001$). CD4⁺/CD8⁺ T-cell의 비율은 이식전이 1.63 ± 0.08 , 1주후에 3.20 ± 1.70 , 2주후에 1.07 ± 0.24 , 3주후에 1.18 ± 0.30 , 4주후에 1.05 ± 0.1 , 6주후에 1.25 ± 0.23 , 8주후에 0.94 ± 0.22 로 감소하였다($p=0.0001$)(Fig. 2, 3, 4).

나) 냉장보존 2일후(2 days)의 동종동맥판을 이식한 군

CD4⁺ T-cell의 분포는 이식전이 $40.48 \pm 3.90\%$, 1주후에 $38.78 \pm 5.98\%$ 2주후에 $40.02 \pm 4.02\%$, 3주후에 $33.49 \pm 2.28\%$, 4주후에 $34.89 \pm 3.87\%$, 6주후에 $33.33 \pm 0.53\%$, 8주후에 $31.33 \pm 4.24\%$ 로 감소하였으며($p=0.0001$) CD8⁺ T-cell의 분포는 이식전에 $24.09 \pm 2.53\%$, 1주후에 $32.91 \pm$

6.50, 2주후에 33.76±3.95%, 3주후에 37.99±3.61%, 4주후에 45.06±6.07%, 6주후에 52.53±6.47%, 8주후에 52.34±10.93%로 증가하였다(p=0.0001). CD4⁺/CD8⁺ T-cell의 비율은 이식전이 1.75±0.27, 1주후에 1.23±0.38, 2주후에 1.19±0.09, 3주후에 0.88±0.06, 4주후에 0.78±0.11, 6주후에 0.58±0.07, 8주후에 0.63±0.25로 감소하였다(p=0.0001) (Fig. 2, 3, 4).

다) 냉장보존 7일후(7 days)의 동종동맥판을 이식한 군

CD4⁺ T-cell의 분포는 이식전이 43.68±2.44%, 1주후에 31.73±5.75% 2주후에 38.59±2.88%, 3주후에 38.61±3.80%, 4주후에 34.82±1.35%, 6주후에 34.15±2.85%, 8주후에 35.74±1.68%로 감소하였으며(p=0.008), CD8⁺ T-cell의 분포는 이식전에 21.67±4.93%, 1주후에 34.04±7.86, 2주후에 37.98±12.30%, 3주후에 35.32±4.58%, 4주후에 42.65±3.47%, 6주후에 38.22±2.88%, 8주후에 46.30±1.12%로 증가하였다(p=0.0002). CD4⁺ / CD8⁺ T-cell의 비율은 이식전이 2.11±0.53, 1주후에 0.98±0.34, 2주후에 1.10±0.36, 3주후에 1.10±0.11 4주후에 0.82±0.08, 6주후에 0.89±0.03, 8주후에 0.77±0.05로 감소하였다(p=0.0001) (Fig. 2, 3, 4).

라) 냉장보존 14일후(14 days)의 동종동맥판을 이식한 군

CD4⁺ T-cell의 분포는 이식전이 45.61±2.49%, 1주후에 36.10±2.47%, 2주후에 36.40±3.54%, 3주후에 32.40±5.48%, 4주후에 29.97±3.92%, 6주후에 27.81±3.16%, 8주후에 27.02±3.49%로 감소하였으며(p=0.0001), CD8⁺ T-cell의 분포는 이식전에 19.71±3.84%, 1주후에 27.40±5.42, 2주후에 32.62±9.95%, 3주후에 35.91±4.54%, 4주후에 42.88±1.89%, 6주후에 45.95±0.93%, 8주후에 58.77±1.38%로 증가하였다(p=0.0001). CD4⁺/CD8⁺ T-cell의 비율은 이식전이 2.37±0.39, 1주후에 1.35±0.21, 2주후에 1.22±0.48, 3주후에 0.90±0.05, 4주후에 0.70±0.08, 6주후에 0.61±0.06, 8주후에 0.46±0.06로 감소하였다(p=0.0001) (Fig. 2, 3, 4).

마) 냉동보존(cryo)한 동종동맥판을 이식한 군

CD4⁺ T-cell의 분포는 이식전이 43.55±2.16%, 1주후에 41.71±3.78%, 2주후에 40.49±6.59%, 3주후에 36.61±6.06%, 4주후에 35.40±5.32%, 6주후에 35.43±2.35%, 8주후에 34.37±5.97%로 감소하였으며(p=0.0018), CD8⁺ T-cell의 분포는 이식전에 23.04±3.79%, 1주후에 25.45±

2.98, 2주후에 27.53±7.35%, 3주후에 28.92±5.62%, 4주후에 33.38±2.95%, 6주후에 44.92±9.20%, 8주후에 51.58±8.45%로 증가하였다(p=0.0001). CD4⁺/CD8⁺ T-cell의 비율은 이식전이 1.92±0.22, 1주후에 1.66±0.26, 2주후에 1.55±0.47, 3주후에 1.30±0.30, 4주후에 1.07±0.19, 6주후에 0.82±0.22, 8주후에 0.68±0.16로 감소하였다(p=0.0001) (Fig. 2, 3, 4).

고 찰

1962년 영국의 Ross⁶⁾가 최초로 동종동맥판을 사용하여 본래의 대동맥판륜 위치에 대동맥판막 치환을 시행하였으나, 술후 대동맥판폐쇄부전의 빈도가 높고 장기적인 보전 기술이 성립되지 않아 장기공급에 문제가 있었다. 그후 1975년 O' Brien 등이 단기간의 항생제를 사용하여 멸균후 조직의 생육성을 보존한 채로 장기간 보존이 가능한 냉동 보존방법을 표준화 하는데 성공하여⁷⁾ 1980년대 이후 CryoLife에 의한 상업적 공급이 가능하게 되었다. 이후로 동종동맥판 획득기법이나 냉동보존 기술이 발전을 거듭하여 최근에는 동종동맥판 조직의 생육성이 거의 완벽히 보존되는 동종동맥판(homovital homograft)의 사용이 보편화 되기에 이르렀다.

동종동맥판은 생체와 동일한 혈류(central, non-obstractive flow)를 이루므로 적은 내경일 때도 혈액학적 기능이 뛰어나고 혈전발생률이 적고 적혈구의 용해율도 낮으며 심막염에 대한 내성이 강하다. 내구성 역시 기존의 조직판막보다 길다는 장점을 갖는다. 그러나 장기적으로 볼 때에 많은 경우에서 이식된 동종동맥판의 손상으로 인한 기능부전이 발생한다.

기존의 조직판막에서 생기는 변성의 물리적인 중요한 원인은 염증세포의 침윤과 콜라겐의 퇴화현상이다⁸⁾. 콜라겐 피로현상, 대식세포의 판막소엽침윤과 판막소엽의 마모 등에 의한 판막중심부 파손으로 판막의 폐쇄부전이 일어난다. 그러나 살아있는 세포를 포함하는 동종동맥판에서 생기는 변화는 동맥벽과 판막의 석회화인데, 석회화는 판막파열보다는 판막협착을 초래한다고 한다. Mitchell 등은 생육성을 유지한 동종동맥판의 혈관내피세포는 세포간질을 보존할 수 있어 판막자체의 콜라겐 구조를 유지하며, 이렇게 자가 분해에 내성이 있는 콜라겐 구조의 보존이 판막기능유지의 구조적 기초가 되는 것으로 생각된다고 하였다⁹⁾. 또한 이식된 동종동맥판막을 수개월에서 수년후에 떼어내 관찰했을 때, 판막 판첩(leaflet)보다는 주로 대동맥벽쪽에 석회화 침윤이 있다고 보고 하였다. 이러한 변성의

원인중의 하나로 생육성을 유지하고 있는 동종동맥편이 가지는 항원효과에 의한 면역반응의 가능성이 제기되었다¹⁰⁾.

동종동맥편을 구성하는 세포구조로는 간질(matrix)과 섬유아세포(fibroblast), 혈관내피세포 등이 있다. 이 중에서 혈관내피세포는 결합조직의 구성성분인 collagen, elastin, microfibrils, laminin, mucopolysaccharide, fibronectin, thrombospondin을 생산하고 기저막을 생산한다. 또한 혈관내피세포의 표면에는 ABO 항원, HLA-A,B항원, Ia 항원을 가지고 있다¹¹⁻¹⁴. 그러므로 생육성이 유지된 혈관내피세포는 판막의 구조를 이루는 콜라겐 간질구조를 유지하는 동시에 항체표현세포의 역할을 하여 면역 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹⁴⁾. 과거의 여러 연구에 의하면 동종동맥편의 혈관내피 세포는 보존처리과정이나 이식 후의 초기단계에 대부분이 떨어져 나가거나 면역거부 반응에 의해 파괴되는 것으로 생각되어 왔다^{9, 15)}. 여러 보고들에서 혈관내피세포에 의한 면역반응의 가능성을 전제로 하고 조직부합검사나 면역억제요법을 시도하여서 그로 인한 동종동맥편의 변성이 예방되거나 감소되는 효과를 알아보고자 하였으나 의미있는 결과를 얻지 못하였다. 이러한 연구의 결과로, 임상적으로 동종동맥편의 항원성은 문제가 되지 않는 것으로 간주되어왔다^{9, 16, 17)}. 그러나 최근에 Yankah등은 단기간에 걸친 면역억제제의 투여로 동종동맥편에 대한 거부반응을 중단시킬 수 있어서 동종동맥편의 조기변성을 예방할 수 있다고 하였다¹⁸⁾. 다른 보고에서도 1세 이하에서 우심실유출로 재건술을 할 때에는 비생육성 동맥편을 사용하거나 단기간의 면역억제제의 사용을 권하고있다^{19, 20)}. 또한 보존처리 과정에서 사용하는 fetal calf serum역시 항원성이 있다는 보고가 있고¹⁵⁾ 이식술환자에서 볼수있는 불명열이 약한 면역거부반응에 의한 것일수도 있다는 가설이 제기되고 있다²¹⁾. 특히 근자에 들어 동종동맥편 보존기법의 발달과 함께 심장이식시 채취된 판막(homovital homograft)의 사용이 증가함에 따라 그도의 생육성을 유지한 동종동맥편이식이 증가하게 되며, 이들 동종동맥편의 혈관내피세포나 섬유아세포가 유지하고 있는 약한 항원성에 의한 장기적이고 지속적인 거부반응에 의해서 동종동맥편의 변성이 초래될수 있다는 가능성을 배제할 수 없게 되었다.

본 실험에서는 동종동맥편 혈관내피세포의 항원성이 보존처리과정에 의해 변화되는지를 보기 위하여 혈관내피세포에 대한 면역조직화학검사를 하였다. 이 때 보존처리과정중에 생육성을 유지하고 있는 혈관내피세포의 양이 감소하여 동종동맥편의 항원성이 감소한다는 연관성을 배제

하기 위해 각 조건에서 동일한 숫자의 혈관내피세포만을 분리하여 그 자체의 면역표현을 정량적으로 알아보았다.

혈관내피세포의 표면에 존재하는 MHC Class I 항원과 MHC Class II 항원, ICAM-1항원을 각각의 단일클론항체와 결합시킨후 면역조직화학검사를 하였다. MHC Class I 항원은 세포성 면역(cellular immunity)을, MHC Class II 항원은 체액성 면역(humoral immunity)를 매개하는 항원이며 adhesion molecule 은 T-cell과 항원을 가진 세포간의 부착을 촉진하고 T-Cell 활성화에 대한 조절정보를 전달하는 기능을 가지고 있어 면역반응의 여러단계에 관여한다^{22, 23)}. Pober등에 의하면 표준 배양된 혈관내피세포와 T-cell 간의 반응에서 T-cell 이 인식하는 혈관내피세포의 항원은 MHC Class I 이라고 한다. 또한 활성화된 T-cell이나 T-cell이 생성한 lymphokine immune interferon은 MHC Class II 항원을 유도시키며 동시에 MHC Class I의 표현을 증가시킨다고 한다^{12, 24)}. Cosimi 등에 의하면 영장류에서 이식신장의 거부반응이 일어난 경우 혈관내피세포, 침윤된 단핵백혈구, 세노관세포에서 ICAM-1의 표현이 증가되어 있었다. 이때 R6.5(murin IgG2a monoclonal antibody)를 투여하면 혈액내의 T-cell은 변화가 없었지만 조직검사시 T-cell의 침윤이 감소하는 것이 관찰되었고 진행되던 거부반응이 반전되었다고 한다²³⁾. 다른 이들도 LFA-1(leukocyte function-associated antigen-1)과 ICAM-1의 상호작용이 T-cell기능 수행에 중요하다고 보고하였다²²⁾. Khatib와 Cochran 등은 쥐에서 동종동맥편을 복부대동맥에 이식하고 3주후에 피부이식을 하여 이식된 피부의 2차적인 거부반응 여부를 보았을때, 동종동맥편은 항원성을 가지고 있고 수혜동물에서 감각을 일으킨다고 했는데 이들 항원성은 냉동보존 방법으로 변하지 않았다고 했다^{25, 26)}.

본 실험의 결과, 멸균처리전군의 면역표현에 비하여 멸균처리후 및 각각의 냉장보존군과 냉동보존군에서 MHC Class I 과 ICAM-1의 면역표현이 증가되었고 MHC Class II 의 면역표현은 변화가 없었다. 또한 멸균처리후군, 냉장보존 1, 2, 7, 14 일후군과 냉동보존군 모두에서 같은 결과를 보여 혈관 내피세포의 면역 표현 변화는 멸균처리나 보존방법에 의해 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

또한 동종동맥편을 이식받은 생체에서의 면역학적인 변화를 보기 위하여 여러 가지 조건의 동종동맥편을 이식한 뒤 혈중의 CD4⁺ T-cell 분포, CD8⁺ T-cell 분포, CD4⁺/CD8⁺ T-cell 비율을 단일클론항체를 사용하여 측정하였다. CD4⁺ T-cell은 MHC Class II 항원과, CD8⁺ T-cell 은 MHC Class I 항원과 반응하여 면역반응을 수행

하며 이들 CD4⁺, CD8⁺ T-cell은 B-cell의 영향을 거의 받지 않는다²⁷⁾. 장기이식을 받은 환자에서 거부반응이나 거부반응으로 인한 합병증이 발생한 경우 MHC class II와 ICAM-1표현이 증가하고 동시에 CD4⁺ T-cell과 CD8⁺ T-cell이 증가하는 것을 볼 수 있어 면역기전에 의해 합병증이 발생한다고 추정했으며 이때 CD4⁺/CD8⁺ T-cell의 비율이 현저히 감소하였다²³⁾.

본 실험에서도 동종동맥판을 흰쥐의 복부피하층에 이식한 후 경과시간에 따라 검사한 혈액내 임파구중의 CD4⁺ T-cell과 CD8⁺ T-cell의 분포는 CD4⁺ T-cell은 이식전에 비해 큰 변화가 없었으나 CD8⁺ T-cell은 증가하는 양상을 보였고 CD4⁺ / CD8⁺ T-cell의 비율 역시 이식후 시간이 지나면서 감소하는 양상이었다.

본 실험에서는 동종동맥판을 복부피하층에 이식하였기 때문에 실제로 동종동맥판이 혈류속에 존재하는 임상에서의 상황과는 다를 수 있으나 결체조직내의 대식세포등이 혈관내피세포의 항원을 인식, 매개하는 역할을 하여 혈액내의 T-cell에 영향을 주었다고 유추할 수 있다. 특히 항원이 혈류내(심장이나 혈관내)에 있을 때는 피하층에 있을 때에 비하여 반응이 약해진다고 하였으므로 미약한 항원성을 발견하기에는 피하층이식이 유리할 것으로 생각된다²⁸⁾. 또한 동종동맥판에 대한 이물질 반응의 가능성이나 감염의 가능성을 완전히 배제할 수는 없었지만 여러 가지의 조건에서 만들어진 결과들이 모두 유사한 경향을 보이고 있으며, 본 실험에서 관찰된 경향성이 면역거부반응시에 볼 수 있는 소견과 일치하였다. 그리고 면역표현 검사에서 얻은 MHC Class I 면역표현이 증가하고 MHC Class II 면역표현이 변화 없었던 결과와 혈액내 T cell의 변화를 비교할 때, 유사한 경향성을 관찰할 수 있었으나 위의 두가지 실험이 서로 상관관계를 갖는가에 대한 결론은 좀 더 많은 연구를 필요로 할 것이다.

이상과 같은 연구결과를 볼 때 생육성을 유지하고있는 혈관내피세포는 보존처리과정을 지난 후에도 면역표현능력을 유지하고 있으며, 동종동맥판을 이식하였을 때 수용체내에서 면역반응이 일어나는 것처럼 보인다. 그리고 동종동맥판 자체의 내피세포가 보존과정과 이식후에 면역반응이나 혈류에 의해 모두 소실된 후에도 판막조직에 침윤된 활성화임파구등에 의해 그 면역효과가 지속적으로 약한 정도로 존재할 수 있을 것이다. 그러나 이러한 반응들이 혈관내피세포에 의한 반응이라는 확실한 증거는 없으며, 동시에 동물실험자체에 관련되는 요인에 의한 오류를 최소화하여야 한다는 한계점을 가지고 있다.

결 론

냉장 및 냉동보존처리된 동종동맥판 혈관내피세포의 MHC class I 과 ICAM-1의 표현은 보존처리전에 비하여 의미있게 증가하였으며 MHC class II의 표현은 의미있는 차이가 없었다. 그러나 이러한 면역표현의 변화는 보존처리기간 중에는 의미있는 변화가 없어 동종동맥판의 멸균 및 보존처리과정이 혈관내피세포의 면역표현을 변화시킨다고 생각되지 않는다.

이식된 수혜자에서 일어나는 면역반응의 변화는 보존처리의 전과 후에 CD4⁺ T-cell의 분포가 이식전의 수준을 유지하거나 약간 감소된 반면, CD8⁺ T-cell의 분포는 이식 후 1 주에서 8 주에 걸쳐 지속적으로 증가되었고 CD4⁺ / CD8⁺ T-cell의 비율은 관찰기간동안 계속 감소하여 MHC class I 반응이 증가되어있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 이런 결과와 보존된 동종동맥판의 혈관내피세포에서 증가된 MHC class I 면역표현의 연관관계는 불분명하다.

본 연구의 결과로 동종동맥판을 이식한 후 생기는 면역반응은 수술초기에 국한되거나 아주 미약하여 단기적으로는 문제가 되지 않지만 장기적으로 불매 정도가 낮은 면역거부반응도 동종동맥판 구조유지 및 기능수행에 영향을 미친다고 생각된다. 따라서 이러한 약한 정도의 면역반응의 효과와 역할에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 생각되고 이러한 연구들의 결과에 의해 좀 더 나은 보존방법이나 이식술후의 치료방법이 제시될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Gonzalez Lavin L, Bianchi J, Graf D, Amini S, Gordon CI. *Homograft valve calcification : Evidence of an immunologic influence.* In : Yankah AC, Hetzer R, Miller DC, Ross DN, Sommerville J, Yacoub MH. *Cardiac valve allograft 1962-1987.* New York : Springer-Verlag New York. 1988 ; 69-74
2. Yankah AC, Wottge HU, Muller-Ruchholtz W. *Antigenicity and fate of cellular components of heart valve allografts.* In : Yankah AC, Hetzer R, Miller DC, Ross DN, Sommerville J, Yacoub MH. *Cardiac valve allograft 1962-1987.* New York : Springer-Verlag New York. 1988 ; 77-87
3. Muller-Hermelink HK, Yankah AC. *Immunohistopathology of cardiac valve allograft explants.* In : Yankah AC, Hetzer R, Miller DC, Ross DN, Sommerville J, Yacoub MH. *Cardiac valve allograft 1962-1987.* New York : Springer-Verlag New York. 1988 ; 89-94

4. Lim CY, Hong EK. *Flow cytometric analysis of endothelial cell viability in arterial allograft*. Int J Angiology 1996. Accepted to publication
5. Christy JP, Lupinetti FM, Mardan AH, Thompson SA. *Endothelial cell viability in the rat aortic wall*. Ann Thorac Surg 1991;51:204-7
6. Ross DN. *Homograft replacement of the aortic valve*. Lancet 1962;2:487
7. Kirklin JW, Blackstone EH, Maehara T, et al. *Intermediate-term fate of cryopreserved allograft and xenograft valved conduits*. Ann Thorac Surg 1987;44:598-606
8. Dahm M, Lyman WD, Schwell AB, Factor SM, Frater RWM. *Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium*. J Thorac Cardiovasc Surg 1990;99:1082-90
9. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. *Structure-Function Correlations in Cryopreserved Allograft Cardiac Valves*. Ann Thorac Surg 1995;60:S108-13
10. Simon A, Zavazava N, Sievers HH, Muller-Ruchholtz W. *In vitro Cultivation and Immunogenicity of Human Cardiac Valve Endothelium*. J Card Surg 1993;8:656-65
11. Wolfenberger L Jr, Hopkins RA. *Biology of Heart Valve Cryopreservation*. In: Hopkins RA. *Cardiac Reconstructions with Allograft Valves*. New York: Springer-Verlag. 1989;21-33.
12. Pober JS, Collins T, Gimbrone MA, Reiss CS. *Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium*. Transplantation 1986;41:141-6
13. Marin ML, Hardy MA, Gordon RE, Reemtsma K, Benvenisty AI. *Induction of Ia Antigen Expression on Endothelium of Rat Vein Allografts*. Transplantation Proceedings 1989;21:113-4
14. Hoeksta F, Knoop C, Aghai Z, et al. *Stimulation of Immune-Competent Cells in Vitro by Human Cardiac Valve-Derived Endothelium Cells*. Ann Thorac Surg 1995;60:S131-4
15. Bodnar E, Olsen EGJ, Florio R, Guerreiro D, Ross DN. *Heterologous antigenicity induced in human aortic homografts during preservation*. Eur J Cardiothorac Surg 1988;2:43-7
16. Fischeline T, Schutz A, Haushofer M, et al. *Immunologic Reaction and Viability of Cryopreserved Homografts*. Ann Thorac Surg 1995;60:S122-30
17. Weipert J, Meisner H, Mendler N, et al. *Allograft Implantation in Pediatric Cardiac Surgery: Surgical Experience From 1982 to 1994*. Ann Thorac Surg 1995;60:S101-7
18. Yankah AC, Wottge HU, Ruchholtz WM. *Short-Course Cyclosporin A Therapy for Definite Allograft Valve Survival Immunosuppression in Allograft Valve Operation*. Ann Thorac Surg 1995;60:S146-50
19. Yankah AC, Alexi-Meskishvili V, Weng Y, Schorn K, Lange PE, Hetzer R. *Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life*. Ann Thorac Surg 1995;60:S71-7
20. Clarke DR, Bishop DA. *Allograft degeneration in infant pulmonary valve allograft recipients*. Eur J Cardiothorac Surg 1993;7:365-70
21. Shapira OzM, Fonger JD, Reardon K, Shemin RJ. *Unexplained Fever After Aortic Valve Replacement With Cryopreserved Allografts*. Ann Thorac Surg 1995;60:S151-5
22. Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. *Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1*. Science 1992;255:1125-7
23. Cosimi AB, Conti D, Delmonico FL, et al. *In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1(CD54) in nonhuman primates with renal allografts*. J Immunol 1990;144:4604-12
24. Pober JS, Gimbrone MA, Collins T, et al. *Interactions of T Lymphocytes with Human Vascular Endothelial Cells: Role of Endothelial Cells Surface Antigen*. Immunobiol 1984;168:483-94
25. Khatib HA, Lupinetti FA. *Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts*. Transplantation 1990;49:765-7
26. Cochran RP, Kunzelman KS. *Cryopreservation does not alter antigenic expression of aortic allografts*. J Surg Res 1989;46:597-9
27. Shelton MW, Walp LA, Basler JT, Uchiyama K, Hanto DW. *Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4⁺ and CD8⁺ T cells*. Transplantation 1992;4:278-86
28. Carpentier A. *Principles of tissue valve transplantation*. In: Ionescu MI, Ross DN, Wooller GH(eds). *Biologic tissue in heart valve replacement*. London: Butterworths. 1972;137-94

=국문초록=

동종동맥편의 보존기법이 발전하면서 상당한 정도의 생육성이 보존되며, 특히 면역반응의 주된 요인인 내피세포 생육성이 약 50%이상 보존되기 때문에 보존처리된 동종동맥편 내피세포의 면역능력을 평가하는것이 동종동맥편의 임상적변화의 원인을 규명하는데 필요할 것이다. 실험은 200~250gm의 Sprague-Dawley Rat를 사용하였다. Rat로부터 적출한 동맥벽을 현재 임상적으로 사용하고 있는 냉장보존법과 냉동보존법을 사용하여 2주일간 보존하였으며 보존처리전(No treat)과 멸균처리후(sterile), 냉장보존후 1(1day), 2(2day), 7(7day), 14일째(14day), 2주간의 냉동보존후(cryo)에 표본을 채취하여 보존시간에 따른 변화를 관찰하였다.

면역표현에 대한 연구를 위하여 혈관조직으로부터 내피세포를 분리한 뒤 면역조직화학검사(Immunohistochemical study)를 하였다. 혈관내피세포의 항원 표현정도를 정량적으로 분석하기 위하여 anti-MHC class I antibody(MRC OX-18)과 anti-MHC class II antibody(MRC OX-6), anti-ICAM antibody를 사용하였다. 처리된 내피세포를 Flow cytometry로 분석하여 항체가 부착된 내피세포의 비율을 알아냄으로써 내피세포의 항원성(antigenic expression)을 조사하였다. 또한 보존처리된 동종동맥편에 의한 생체내에서의 면역반응을 평가하기 위하여 위에서와 같은 방법으로 보존처리전(No treat), 멸균처리후 2일 보존후(2day), 7일 보존후(7day), 14일 보존 후(14day), 냉동보존(cryo)된 동종동맥편을 Mouse에 이식한 후 일정기간(1, 2, 3, 4, 6, 8주)이 경과된 시점에서 혈중의 CD4⁺, CD8⁺ T cell분포를 측정하였다. 이를 위하여 Mouse의 미정맥에서 채취한 혈액에 monoclonal antibody를 처리한 뒤 flow cytometry를 이용하여 lymphocyte중의 CD4⁺, CD8⁺ T cell 비율을 측정하였다.

내피세포의 MHC Class I 표현정도는 No treat에서 23.95%였고, sterile에서 48.08%로 증가한 뒤 14day 까지 36.02%로, cryo에서도 35.53% 로 증가되어 있었다(p=0.0183). MHC Class II 표현정도는 No treat에서 9.72%, sterile 에서 10.13%이었고 14day 에서 10.27%, cryo 에서 13.39% 였다(P=0.1599). ICAM-1 표현정도는 No treat에서 15.02%, sterile 에서 19.85%였고, 14day 에서 35.33%, cryo 에서 34.67% 로 증가하였다(P=0.001).

정상 Mouse에서 CD4⁺, CD8⁺ T-cell분포는 각각 42.13%, 25.57% 였고 CD4⁺/CD8⁺ ratio는 1.64였다. 동종동맥을 이식받은 Mouse의 정맥혈중 CD4⁺ T-cell분포는 No treat군에서 1주에서 8주사이에 49.23%에서 36.8%사이로 변화를 보이지 않았고(p=0.955), 2 day군에서는 30.36%로 감소하였고(p=0.0001), 7 day군에서는 32.8%로 감소하였고(p=0.008), 14 day 군은 26.92%로 감소(p=0.0001), cryo군은 29.56%로 감소하였다(p=0.0018). CD8⁺ T-cell은 모든 군에서 1주에서 8주 사이에 42.32%에서 58.92%사이로 증가하였다(p=0.0001~0.0002). CD4⁺/CD8⁺ ratio는 모든 군에서 1주에 1.22 에서 2.28 사이에 있었으나 8주 후에는 모든 군에서 0.47에서 0.95 사이로 감소하였다(p=0.0001).

즉, 보존처리된 동종동맥편의 내피세포는 보존처리과정의 초기에는 MHC class I과 II항원효과를 동시에 보이고, 보존기간이 길어지면서 MHC class II항원효과는 변함이 없으나 MHC class I 항원효과는 증가함을 알 수 있다. 또한 CD4⁺ T-cell은 보존처리 기간중 소폭의 변화를 보임에 반하여 CD8⁺ T-cell은 보존처리된 기간에 관계없이 이식된 후 8주간에 걸쳐 지속적으로 증가함을 알 수 있다. 4℃에 냉장보존한 군과 냉동보존한 군간에는 차이가 없었다. 이와같은 결과를 볼 때 동종동맥편을 체내에 이식할 경우 내피세포에 의한 MHC class I 항원효과가 지속적으로 유지되고 있음을 추측할 수 있다.

- 중심단어** : 1. 동종동맥편
2. 세포성 면역
3. 체액성 면역
4. 혈관내피세포