

# 이소 생쥐심장이식 모델에서 조기 시간경과에 따른 관상동맥의 면역병리학적인 변화

이 정 렬\* · 임 흥 국\* · 서 정 욱\*\*

=Abstract=

## Early Time Course of Immunopathologic Changes in Coronary Arteries of Heterotopically Transplanted Mouse Heart

Jeong Ryul Lee, M.D. \*, Hong Gook Lim, M.D. \*, Jeong Wook Seo, M.D. \*\*

**Background:** In this study, we investigated the early time course of expression of the major histocompatibility(MHC) antigens, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), interleukin-6 and the histopathological changes in the coronary arteries of cardiac allografts exchanged between inbred mice strains that differ in one loci of class I major histocompatibility antigen (B10.BR to B10.A). **Material and Method:** No immunosuppressive therapy was used. Both allografts and the hearts of the recipients were harvested at 7(group 1, n=6), 15(group 2, n=6), 21(group 3, n=6), and 30(group 4, n=6) days after transplantation. They were examined by immunohistochemistry, microscopy and morphometry. All allografts had contractions at the time of harvest. **Result:** A strong MHC class I antigen expression was present on the endothelial and medial cells of the coronary arteries in group 1 and remained unchanged in the rest of the groups. However, MHC class II reactivity was none or very little at any time. Mild to moderate ICAM-1 expression was observed on the endothelial cells, but not on the medial cells at any time by 30 days. VCAM-1 expression was strong both on the endothelial and medial cells at any time. Moderate degree expression of interleukin-6 was observed from 7 to 30 day specimens. Histopathologically, percentage of affected vessels(vessels with intimal thickening) was less than 10 % in 7 day group and increased up to 50 % at 30 days. Mean percent narrowing of the lumen of the affected vessels revealed less than 20 % at 7 days and 40 % at 30 days.

---

\* 서울대학교 어린이병원 흉부외과, 서울대학교의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교 의학연구원부설 심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Children's Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Medical Research Center, Heart Research Institute

\*\* 서울대학교병원 병리과, 서울대학교의과대학 병리학교실, 서울대학교 의학연구원부설 심장연구소

Department of Pathology, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Medical Research Center, Heart Research Institute

† 본 논문은 1998년도 대한흉부외과학회 사석연구비 지원의 결과임.

‡ 본 논문은 1998년도 제30차 대한흉부외과 추계학술대회에서 구연되었음.

논문접수일 : 98년 9월 26일 심사통과일 : 98년 11월 5일

책임저자 : 이정렬 (110-744) 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 어린이병원 흉부외과. (Tel) 02-760-2877, (Fax) 02-765-7117,

e-mail: jrl@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

The area occupied by tropomyosin positive cells in the intimal lesion, graded from 0 to 3, showed gradual increase but remained between grade 0 to 1 by 30 days. Medial integrity was also well preserved at any time. Moderate perivascular mononuclear cell infiltration was observed at 7 days and it was progressively increased upto 30 days. Recipients' heart revealed no positive immunopathologic findings. **Conclusion:** In this study, the early time course of progression of the transplantation vasculopathy was demonstrated in the murine heterotopic heart transplant model.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:1119-26)

**Key word :** 1. Atherosclerosis  
2. Transplantation, immunology  
3. Coronary arteriosclerosis

## 서 론

이식심장의 관상동맥에 발생하는 가속화된 이식동맥 경화증(accelerated graft atherosclerosis, AGAS)은 여전히 장기생존의 중요한 제약요인으로 존재하고 있다. 특히 이식시 이식심장에 관여하는 신경이 모두 차단되므로 말기관상동맥병변으로 진행하더라도 임상적으로 증상이 없을 수 있으며 이로 말미암아 관상동맥 병변의 발견이 지연될 가능성은 물론 그 결과 급사의 위험까지 존재하게 된다<sup>1)</sup>. 가속화된 이식동맥경화증의 병인은 확실히 규명된 바 없으나 공여심장의 관상동맥내피세포에 대한 지속적인 경도(low grade)의 면역학적인 공격이 병변을 일으킬 수 있다는 증거가 실험적으로 보고되고 있다<sup>2,3)</sup>. 이러한 일련의 면역반응을 유도할 수 있는 중요한 원인 중의 하나로 주조직적합성항원(major histocompatibility antigen)을 들 수 있는데<sup>4~6)</sup> 공여심장과 피이식자 사이의 주조직적합성의 정도를 달리하는 차이는 공여심장 관상동맥내피세포를 이물질로 인식시키기에 충분하며 이로 인해 주조직적합성항원의 발현을 증가시켜 면역반응을 초기화시킬 수 있다. 그 결과 혈소판원성장인자(platelet derived growth factor, PDGF), 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor), 변환성장인자(transforming growth factor) 등이 생성되고 이러한 물질들은 병변의 형성에 원인이 되는 혈관평활근세포의 이동과 증식에 관여하며 동시에 면역학적인 공격이 내피세포의 파괴, 나화 등을 초래함은 물론 혈소판 침착까지 유도하게 된다<sup>7)</sup>. 결국 혈관내세포의 증식, 평활근세포의 증식 및 이동, 국소적으로 축적되는 혈관 이물질들로 인해 진행성 혈관폐쇄를 초래하여 심근 허혈을 초래하게 된다<sup>8)</sup>. 또한 이러한 일련의 면역반응 초기에 면역세포와 혈관내피세포사이의 상호작용을 위해서는 부착물질(adhesion molecule)의 역할이 필수적이다<sup>9)</sup>.

본 연구에서는 유전적인 배경이 아주 가까운 생쥐 종조합

(B10.A to B10.BR)을 이용한 이소심장이식을 시행하여 경도의 만성거부반응을 일으키는 모델을 만들어 이식후 비교적 조기인 4주 이내의 병변발현의 진행속도를 관찰하고 시간경과에 따른 싸이토카인, 부착물질들의 발현양상을 규명하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물:** 7주에서 10주정도 연령이고 무게로 17~25 gm 되는 생쥐군 중 B10.A-B10.BR 종조합(strain-combination)을 이용하여, B10.A종으로부터 적출한 심장을 공여심장으로, B10.BR종을 피이식취로 이용하였다. 상기 두 가지 종은 주조직적합성항원의 제1분류(class I)중 D좌위 단일위치만 다른 종조합이다. 실험 군은 이식후 1, 2, 3, 4 주된 공여심장으로 4분하고 각 군에는 5~6 마리의 생쥐를 포함시켰다.

**이소심장이식:** 상기 두 가지 종의 생쥐를 이용하여 이소심장이식을 실시하였다. 공여심장 적출 방법: 에테르(ether) 또는 심장 무작용이 적은 메톡시플루레인(methoxyflurane) 마취제가 들어있는 단지(jar)에 수 분동안 방치하여 흡입 마취를 유도하여 생쥐가 호흡을 제외한 모든 운동 능력이 소실되었다고 생각되면 수술 판에 사지를 고정시키고 4% 클로랄하이드레이트(chloral hydrate)를 체중 20 gm 당 0.1cc 용량으로 복강 내에 주입한 후 수술 부위에 해당하는 흉부의 세발을 시행하였다. 전 흉벽(anterior chest wall)을 "U"자 모양으로 개흉한 후 그 덮개 부위를 머리 쪽으로 들어올려 고정함으로써 가능한 커다란 흉벽 개구부를 확보하였다. 좌우 상공정맥을 5-0 명주사로 결찰하고 하공정맥으로, 26G 바늘을 이용하여 농도 100 unit/cc 헤파린이 포함된 섭씨 4℃의 냉각 생리식염수를 0.5 cc 정도 심장이 확장되지 않는 범위 내에서 분할 주입하여 심정지를 유도하며 이때 국소냉각도 동시에 실시하여 심근을 냉각시켰다. 하공정맥을 정맥-우심실 경계부 위에

서 결찰하였다. 근위부 대동맥과 폐동맥을 절단하여 좌-우 심장을 감압시킨 후 상, 하공정맥들을, 결찰한 부위보다 원위부에서 절단하였다. 네개의 분지를 가진 폐정맥을 좌심방과 경계 부위에서 하나의 실(5-0 명주사)을 이용하여 결찰하고 그보다 원위부에서 절단하여 적출을 완료하였다. 공여심장은 피이식생쥐가 준비될 때까지 섭씨 4°C의 냉각 생리식염수에 침적 보존하였다. 피이식생쥐에의 이소심장이식: 마취는 공여심장 쪽과 동일하게 유도하며 수술 도중 100% 산소를 3L/min로 공급하여 피이식생쥐의 동맥혈 산소 포화도를 높게 유지하였다. 복부를 세발한 후 복부 정중중절개로 개복하고 복강내 장(腸)(intestinal organ)들을 복강 밖으로 끌어내어 습한 도포로 보호하였다. 후복막을 열어 신동맥 직하부의 복부대동맥과 대정맥을 동시에 박리 노출시킨 후 5-0 명주사를 이용하여 이식부위 혈관의 근위부와 원위부를 결찰하였다. 복부대동맥을 중절개하여 공여심장의 대동맥 개구부와 10-0 나일론(nylon) 봉합사로 단-측문합(end-to-side anastomosis)하였다. 같은 방법으로, 공여심장의 폐동맥과 피이식생쥐의 대정맥을 단-측문합하였다. 근위부 결찰을 먼저 풀어 피이식생쥐의 대동맥혈이 공여심장의 관상동맥을 관류시키도록 하였으며 관상정맥등으로 환원된 정맥혈이 공여심장의 폐동맥을 경유하여 피이식생쥐의 대정맥으로 배혈될 수 있도록 하는 무작업심관류회로(non-working heart perfusion circuit) 모델을 완성하였다. 술직후 관리: 이식이 완료되면 복부 절개를 폐쇄한 뒤 산소 공급이 충분히 되는 장치 속에 방치하여 의식과 호흡이 완벽하게 회복될 때까지 관찰하고 이후 생쥐-장(mouse cage)으로 옮겨 수분과 먹이를 공급하였다. 이식심장의 기능평가: 이식심장의 기능 평가는 심전도, 촉지 등 여러 가지 방법이 있으나 본 연구에서는 다소 주관적이라는 단점이 있지만 시행하기 간편하고 많이 시행되고 있는 방법인 촉지법을 이용하였다. 즉 일정 간격으로 엄지와 검지를 이용하여 복부를 촉지해 봄으로써 이식심장의 수축의 정도를 감지하여 이를 네 단계로 분류하였다.(grade 0=no beating, grade 1=beating but very weak, grade 2=beating but slightly decreases, grade 3=normal vigorous beating). Grade 1 이하는 이식 실패로 간주하고 시기와 관계없이 적출하여 병리조직학적인 소견을 관찰하였다.

면역조직학적 검사: 해당되는 날짜에 피이식생쥐를 사망시킨 후 이식심장을 적출하여 이식편을 아이소펜테인을 포함한 액체 질소에 침적시켜 급속 냉각시킨 후 -70°C에서 보관하였다. 이렇게 보관된 조직편을 OCT(Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN, USA)에 담아서 순간 냉동하였다. 냉동절편은 4μm 두께로 Sialane으로 표면 처리된 유리 슬라이드에 올려놓고 -20°C 아세톤에 5분간 고정된 후 건조시켰다. 슬라이드를 PBS에 3번 씻어낸 후 일차항체를 붙이기 전에 0.15% 정

상 마혈청이 포함된 PBS로 30분 동안 비특이적인 결합을 차단하였다. 절편을 일차항체(for ICAM-1=purified hamster anti-mouse CD54 monoclonal antibody, Pharmigen, dilute 1:50 in blocking serum, for VCAM-1=hamster anti-mouse CD106 monoclonal antibody, Pharmigen, dilute 1:100 in blocking serum)와 상온 가습된 방에서 2시간 동안 잠복시킨 후 배경 잡염색을 감소시키기 위하여 0.1% triton X-100이 포함된 PBS에 3분 동안 담그고 연속해서 3회에 걸쳐 PBS로 다시 씻어내었다. 다음으로 표본을 FITC 표시한 이차항체(for ICAM-1=FITC-conjugated anti-hamster IgG, Pharmigen, dilute 1:50 in blocking serum, for VCAM-1=FITC-conjugated rabbit anti-rat IgG, Pharmigen, dilute 1:100 in blocking serum)와 빛이 차단된 채로 상온에서 30분 동안 잠복시켰다. 0.05% tween20이 포함된 PBS로 씻은 후 슬라이드를 컸다. 프로포디움 아이오다이드(propodium iodide)/antidate(Oncor)로 배경염색을 실시하고 형광 마운팅 매체(fluorescent mounting media, Dako, Denmark)에 올려놓은 후 눈가림법으로 grade 1, 2, 3으로 등급하였다. 형광현미경 영상에 대하여 사진촬영(Olympus, Japan)도 실시하였다.

동물관리: 모든 실험동물들은 the National Society for Medical Research에 의해 공식화된 "Principles of Laboratory Animal Care"와 the National Institute of Health에 의해 발간된 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"(NIH publication No. 85-32, revised 1985)에 따라 관리하였다.

통계: 모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였다.

## 결 과

모든 이식편들은 적출시기에 촉진으로 수축운동을 확인하였다(평균수축등급:3.6±0.2). 공여심장의 냉장 허혈시간은 평균 48±6(범위:45~59) 분이었다. 1군의 이식편의 관상동맥혈관계 내피세포상에서 강한 제1분류 주조직적합성항원(MHC class I)의 반응이 관찰되었다. 나머지 군들에서 발현의 강도는 변함이 없었다. 제2분류 주조직적합성항원(MHC class II)의 발현은 어느 시기에서도 내피세포에서 거의 없거나 탐지되지 않을 수준이었다. 혈관의 중층세포는 유사한 정도의 강도로 제1분류와 제2분류 주조직적합성항원을 발현하였다. 경도에서 중등도 정도의 세포간부착분자-1(ICAM-1)의 발현은 네군 모두의 혈관내피세포상에서 관찰되었으나 중층세포 내에서는 존재하지 않았다. 혈관세포부착분자(VCAM-1)는 모든 시기에서 중층세포와 내피세포 모두에 강하게 발현되었다. 인터루킨-6의 발현은 1군에서 중등도로 관찰되었으나 변함이 없었고, 피이식생쥐의 심장에서는 4군을 제외하고는 내피세포 인터루킨-6의 발현은 거의 없었다(Fig. 1).

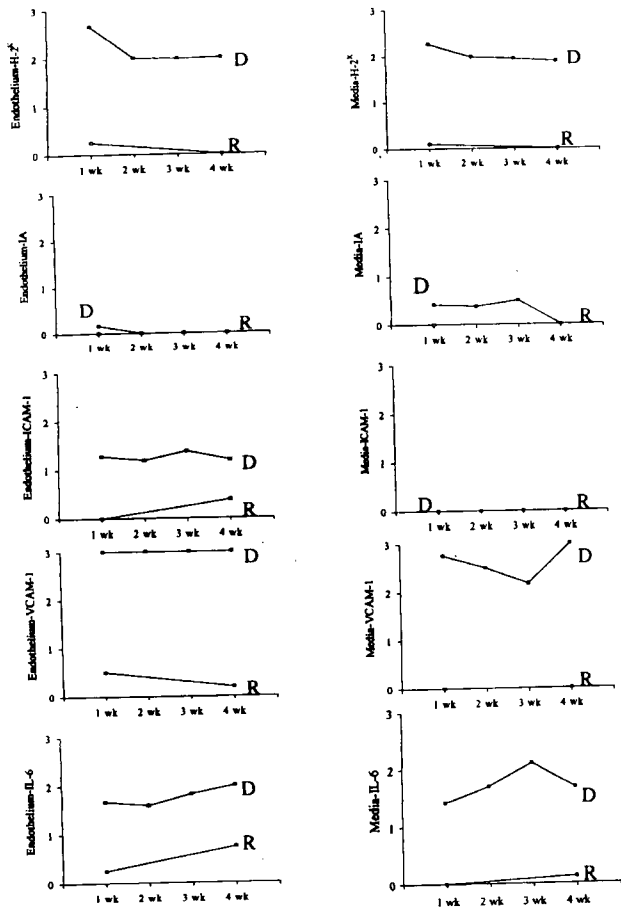


Fig. 1. The expression of MHC class I, MHC class II, ICAM-1, VCAM-1, and interleukin(IL)-6 on the endothelial cells and medial cells from 1 week to 4 weeks. D denotes the expressions of donor's hearts and R denotes the expressions of recipient's hearts.

손상된 혈관-1mm 이상 두께의 혈관내막 증식을 보이는 혈관의 백분율은 이식후 1주일된 군에서 10% 미만이었지만 4주 경과된 군에서는 50% 이상으로 증가되었다(1군=5.83±4.43, 2군=36.40±1.65, 3군=33.83±9.09, 4군=50.50±7.71). 신생혈관내막 과형성 분석은 다음의 식(1 - DL2/DIEL2x100 ; DL=diameter of the lumen, DIEL=diameter of internal elastic lamina)에 의해 내강의 폐색 백분율로 표현되었으며, 이식후 2주에는 20% 미만 그리고 4주에는 40%로 나타났다(1군=3.99±3.61, 2군=19.19±1.56, 3군=31.75±7.63, 4군=35.55±7.91%). 혈관내막 손상은 트로포마이오신 양성 세포에 의해 점유되는 정도에 따라 0에서 3까지 등급을 내려 측정하였는데 점차적으로 증가되는 것으로 보였으나, 4주까지 0에서 1등급에 머물렀다(1군=0.12±0.05, 2군=0.37±0.06, 3군=0.42±0.17, 4군=0.94±0.28). 중층의 백분 보전도(intactness)로 표현되는 중층

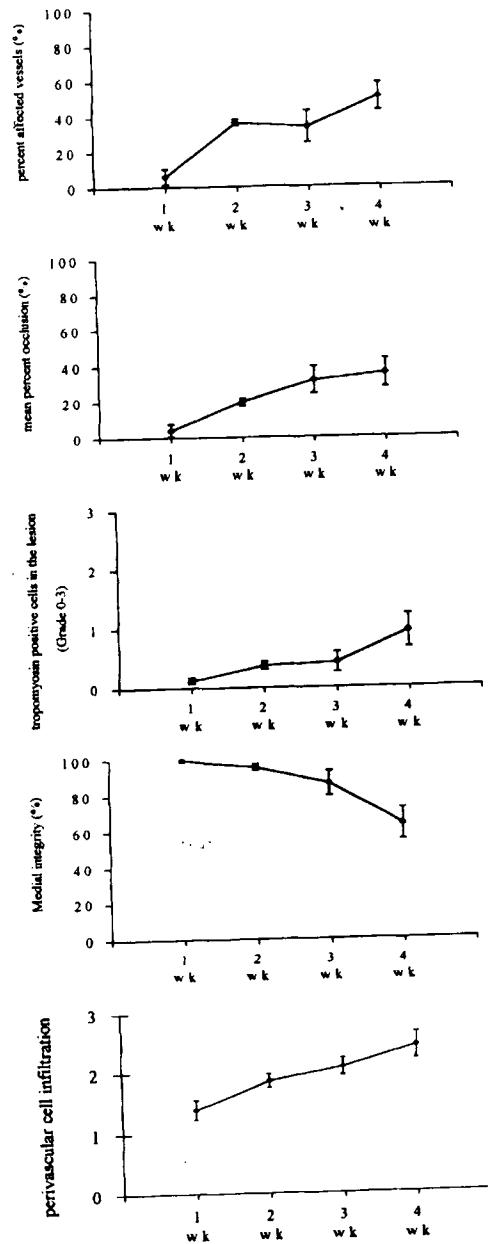


Fig. 2. Histopathological findings of allografts from 1 week to 4 weeks. The percentage of affected vessels(vessels with intimal thickening), the percent occlusion of the lumen of the affected vessels, the area occupied by tropomyosin positive cells in the intimal lesion, graded from 0 to 3, the percentage of medial integrity, and perivascular cell infiltration, graded from 0 to 3, are presented.

세포의 상태(medial integrity)는 2주경까지도 잘 보존되는 것으로 관찰되었다(1군=99.62±0.24, 2군=95.68±1.51, 3군=86.40

정도의 외막 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이 외막성 림프구들은 공통적으로 심외막성 혈관들과 산재되어 있는 대식세포에서 보였다. 이러한 발견들은 이소심장이식에 따르는 쥐의 관상동맥에서 앞서 기술된 것과 유사하다.

### 결 론

결론적으로 연구자 등은 본 실험에서 생쥐의 근교계간 심장 이식에 발생하는 가속화된 이식동맥 경화증에서의 초기 단계적인 면역병리학적 변화를 관찰하여 관련 싸이토카인, 부착물질, 그 결과 형성되는 병리조직학적 변화양상을 규명하였으며, 초기 4주내의 이식동맥 경화증 발현의 진행속도를 관찰하였다. 아울러 본 모델이 이식동맥 경화증에 대한 병인 규명, 새로운 치료방법(therapeutic modality)의 개발에 관한 향후 연구에 적합하다는 사실을 발견하였다.

### 감사의 말

본 논문 내용 중의 면역조직학적 검사에 서울대학교의과대학 병리학교실 정향민 선생의 도움에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR. *Cardiac allograft vasculopathy: Current concepts, recent developments, and future directions.* J Heart Lung Transplant 1992;11(1):9-23.
2. Salomon RN, Hughes CCW, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS, Libby P. *Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis: Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells.* Am J Pathol 1991; 138(4):791-8.
3. Adams DH, Tilney NL, Collins Jr. JJ, Karnovsky MJ. *Experimental graft arteriosclerosis: I. The Lewis-to-F-344 allograft model.* Transplantation 1992;53(5):1115-9.
4. Burdick JF, Clow LW. *Rejection of murine cardiac allografts: I. Relative roles of major and minor antigens.* Transplantation 1986;42(1):67-72.
5. Marboe CC, Buffaloe A, Fenoglio Jr. JJ. *Immunologic aspects of rejection.* Progress in Cardiovascular Diseases. 1990;32(6):419-32.
6. Wang YC, Mayne A, Sell KW, Ahmed-Ansari A. *The influence of MHC and non-MHC genes on the nature of murine cardiac allograft rejection: I. Kinetic analysis of mononuclear cell infiltrate and MHC-class I/class II expression in donor tissue.* Transplantation 1990;50(2): 313-24.
7. Foegh ML. *Chronic rejection-Graft arteriosclerosis.* Transplant Proc 1990;22(1):119-22.
8. Hruban RH, Beschoner WE, Baumgartner WA, et al.

9. Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH, Pigott R. *Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts.* Transplantation 1992;54(3):451-57.
10. Ardehali A, Billingsley A, Laks H, Drinkwater Jr. DC, Sorensen TJ, Drake TA. *Experimental cardiac allograft vasculopathy in mice.* J Heart Lung Transplant 1993;12(5):730-5.
11. Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. *Primarily vascularized allografts of hearts in mice: The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection.* Transplantation 1973;16(4): 343-50.
12. Thomson JG. *Production of severe atheroma in a transplanted human heart.* Lancet 1969;22:1088-92.
13. Graham AR. *Autopsy findings in cardiac transplant patients: A 10-year experience.* Am J Clin Pathol 1992;97(3): 369-75.
14. Pucci AM, Forbes C, Billingham ME. *Pathologic features in long-term cardiac allografts* J Heart Transplant 1990;9(4): 339-45.
15. Billingham ME. *Histopathology of graft coronary disease.* J Heart Lung Transplant 1992;11(3):S38-S44.
16. Ardehali A, Laks H, Drinkwater Jr. DC, et al. *Expression of major histocompatibility antigens and vascular adhesion molecules on human cardiac allografts preserved in university of Wisconsin solution.* J Heart Lung Transplant 1993;12(6):1044-52.
17. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. *Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. I. Time course and immunogenetic and immunopathological considerations.* Am J Pathol 1994;144(2):260-74.
18. Cramer DV, Wu GD, Chapman FA, Cajulis E, Wang HK, Makowka L. *Lymphocytic subsets and histopathologic changes associated with the development of heart transplant arteriosclerosis.* J Heart Lung Transplant 1992;11(3):458-66.
19. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. *Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium: Potential role in postreperfusion inflammatory injury.* Circulation 1995;92(7): 1866-75.
20. Bankey PE, Williams JG, Guice KS, Taylor SN. *Interleukin-6 production after thermal injury: Evidence for nonmacrophage sources in the lung and liver.* Surgery 1995;118(2):431-9.
21. Ardehali A, Drinkwater Jr. DC, Laks H, Drake TA. *Cardiac allograft vasculopathy.* Am Heart J 1993; 126(6):1498-502.
22. McEver RP. *Leukocyte-endothelial cell interactions.* Current Opinion in Cell Biology 1992;4:840-9.
23. Tanio JW, Basu CB, Albelda SM, Eisen HJ. *Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in normal and posttransplantation*

었다.

목표조직으로 세포의 이주를 유도하는데 있어 혈관내피세포에 백혈구가 부착하는 것은 필수적인 단계이다. 혈관내 부착물질들은 이런 과정을 조절하며, 이식거부반응에 있어 중요한 역할을 수행한다. 단계적인 싸이토카인의 방출은 백혈구의 부착과 내피세포를 통과하는 조직으로의 이주를 향상시킨다. 조직 내에서 싸이토카인의 방출로 제1분류 주조직적합성항원과 세포간부착분자-1(ICAM-1)의 발현이 상승되는데 이는 곧 심근세포를 LFA-1, CD8 양성 T-세포의 세포독성 손상에 대한 목표물(target)로 만든다<sup>22)</sup>. Tanio 등<sup>23)</sup>은 세포간부착분자 발현이 동종이식거부의 강도(severity)와 밀접한 상관관계가 있음을 보여주었다. 정상적이거나 거부반응이 일어나지 않은 모세혈관의 내피세포들도 일정하게 내재적으로 세포간부착분자-1을 발현할 수 있다. Tanaka 등<sup>24)</sup>은 세포간부착분자-1 발현이 토끼의 심장 동종이식에서 이식 2일 후에 시작되었음을 관찰하였다. 본 연구의 관찰한 30일 동안, 모든 군에서 상승 조절된 세포간부착분자-1의 발현은 생쥐 심장동종이식편의 내피와 중층세포 모두에서 높은 수준으로 유지되었으며 이는 이물질에 대한 면역반응의 일환으로 부착 물질 역시 상당히 이른 시기에 발현을 시작한다는 간접적인 증거이며 향후 연구에서는 이식 직후 수시간부터 수일내의 변화양상을 관찰하여 그 활성화의 시작점을 포착하는 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

혈관세포부착분자(VCAM)-1은 염증부위에 있는 혈관내피세포에서 유도되는 세포부착물질이며, VLA (very late antigen)-4에 대한 라이간드(ligand) 중 하나이다<sup>25,26)</sup>. 사람의 동종이식거부와 토끼의 만성 염증부위, 그리고 생쥐의 바이러스성 심근염부위에서 혈관세포부착분자-1 발현이 있음이 확인되었다. 이러한 관찰들은 혈관세포부착분자-1이 면역부위에서 뿐만 아니라 동종이식편 거부반응에서도 백혈구 동원을 촉진할 가능성을 제안하는 것이다. Pelletier<sup>27)</sup>는 생쥐에서 이식후 3일째에 동종이식편의 내피세포에서 혈관세포부착분자-1 반응이 발생하며 이것은 상당량의 T-세포 침윤이 있는 시기와 유사함을 관찰하였다. 우리는 여기서 이식 1주에서 4주까지 혈관세포부착분자-1의 높은 수준의 발현이 동종이식편 관상동맥의 내피와 중층세포 모두에서 탐지되었음을 관찰하였다. 동종이식편의 거부반응에서 내피세포 혈관세포부착분자-1의 역할은 완전히 이해된 상태는 아니다. Tanaka 등<sup>24)</sup>은 토끼 심장 동종이식편에서 급성 거부반응 후기 단계에 혈관내 평활근세포의 혈관세포부착분자-1과 세포간부착분자-1 발현이 있었으며, 이러한 현상들이 이식된 심장에서 가속화된 이식동맥 경화증의 후기 발생에 기여함을 보여주는 것이라 설명하였다. 그는 또한 급성 거부반응동안 내피세포에서는 세포간부착분자-1의 발현보다 혈관세포부착분

자-1의 발현이 선행한다는 것을 발견하였다. Ferran<sup>26)</sup>은 임상적 이식에서 발견되기 전인 2주경에 거부반응의 조직학적 증거인 혈관세포부착분자-1의 발현이 심장내 생검에서 발견되었다고 보고하였다. Orosz 등<sup>28)</sup>은 내피세포 세포간부착분자-1 발현과 관련된 염증적 향상이 비거부성 동종이식편과 거부성 동종이식편 모두에서 발견되었음에 주목했다. 대조적으로 내피세포 혈관세포부착분자-1 발현에 의한 면역반응의 유도는 거부성 동종이식편에서만 관찰되었다. 이러한 관찰들은 혈관세포부착분자-1이 동종이식편 거부반응에서 초기 지표로서 역할할 수 있음을 제안한다. 우리의 결과도 여기서 혈관세포부착분자-1 발현이 관찰한 초기 4주 동안 높은 수준으로 유지되었음을 보여주었다.

이식동맥 경화증의 초기단계는 이식편의 내피세포계에 작용하는 면역반응에 포함되며, 이런 반응은 반복되는 내피세포 손상에 대한 반응으로서 혈관내막 증식과 평활근세포 성장을 촉진할 수 있다. 이런 혈관내막의 병변은 이식 후 경과된 시간과 이식편의 관상동맥질환의 정도에 따라 다양하다. Russell 등<sup>17)</sup>은 같은 종조합의 이식에서 2주에서 3주까지 어떠한 혈관내막성 병변들을 관찰할 수 없었던 반면, Cramer 등<sup>18)</sup>은 LEW/F344를 이용한 쥐(rat) 종조합사이에서 1주일 경에 상호교환된 이식편 혈관에서 부분적 폐색을 동반한 심각한 혈관내막 증식을 발견하였다. 본 연구에서는 관찰된 관상동맥의 10% 미만이 1주일경에 혈관내막성 손상을 보였으나 30일경에는 혈관의 절반에서 손상의 소견이 관찰되었다. 그러나 혈관내막성 손상에 대한 내강의 폐색정도를 백분율로 나타낼 때 모든 군에서 40% 미만이었다. 내피세포계는 형태학적으로 30일경까지 어느 시기에서도 혈소판혈전(platelet thrombus) 없이 원상태 그대로였다. 내막손상은 평활근세포의 변형을 일으켰다. 본 연구에서 혈관내막성 손상을 트로포마이오신 양성세포에 의해 점유된 지역에 의해 0에서 3까지 등급을 내려 측정하였는데, 0에서 1등급 사이의 정도를 보였다. 이러한 발견은 이식후 첫 1달 동안 내막의 비후가 평활근에 의한 것이 아니라 일차적으로 염증세포의 존재에 의한 것이라는 전 연구와 상통한다. Clausell 등<sup>29)</sup>은 공여자 관상동맥내에 내피하평활근세포는 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen)에 양성으로 염색되지 않았음을 보여주었다. 이러한 사실들은 그런 평활근세포가 상주하는 내피하세포의 활성화 증식에 의해서라기 보다 오히려 중층으로부터 이주해왔을 가능성이 더 크다는 것을 암시한다. 본 연구에서 다수의 염증세포들이 내피세포계에 근접한 부위뿐만 아니라 외막에서도 관찰되었으며 내막성 증식의 초기 단계에서 내피하 림프구들이 뭉쳐진 덩어리(cluster)들도 보였다. 내피손상이 있는 부근에 염증세포들이 동원되었고, 내피하 공간내에 축적되었다. 본 연구에서는 1주일군에서 경도에서 중등도

정도의 외막 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이 외막성 림프구들은 공통적으로 심외막성 혈관들과 산재되어 있는 대식세포에서 보였다. 이러한 발견들은 이소심장이식에 따르는 쥐의 관상동맥에서 앞서 기술된 것과 유사하다.

### 결론

결론적으로 연구자 등은 본 실험에서 생쥐의 근교계간 심장이식시에 발생하는 가속화된 이식동맥 경화증에서의 초기 단계적인 면역병리학적 변화를 관찰하여 관련 사이토카인, 부착물질, 그 결과 형성되는 병리조직학적 변화양상을 규명하였으며, 초기 4주내의 이식동맥 경화증 발현의 진행속도를 관찰하였다. 아울러 본 모델이 이식동맥 경화증에 대한 병인 규명, 새로운 치료방법(therapeutic modality)의 개발에 관한 향후 연구에 적합하다는 사실을 발견하였다.

### 감사의 말

본 논문 내용 중의 면역조직학적 검사에 서울대학교의과대학 병리학교실 정향민 선생의 도움에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR. *Cardiac allograft vasculopathy: Current concepts, recent developments, and future directions.* J Heart Lung Transplant 1992;11(1):9-23.
2. Salomon RN, Hughes CCW, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS, Libby P. *Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis: Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells.* Am J Pathol 1991; 138(4):791-8.
3. Adams DH, Tilney NL, Collins Jr. JJ, Karnovsky MJ. *Experimental graft arteriosclerosis: I. The Lewis-to-F-344 allograft model.* Transplantation 1992;53(5):1115-9.
4. Burdick JF, Clow LW. *Rejection of murine cardiac allografts: I. Relative roles of major and minor antigens.* Transplantation 1986;42(1):67-72.
5. Marboe CC, Buffaloe A, Fenoglio Jr. JJ. *Immunologic aspects of rejection.* Progress in Cardiovascular Diseases. 1990;32(6):419-32.
6. Wang YC, Mayne A, Sell KW, Ahmed-Ansari A. *The influence of MHC and non-MHC genes on the nature of murine cardiac allograft rejection: I. Kinetic analysis of mononuclear cell infiltrate and MHC-class I/class II expression in donor tissue.* Transplantation 1990;50(2): 313-24.
7. Foegh ML. *Chronic rejection-Graft arteriosclerosis.* Transplant Proc 1990;22(1):119-22.
8. Hruban RH, Beschoner WE, Baumgartner WA, et al.

9. Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH, Pigott R. *Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts.* Transplantation 1992;54(3):451-57.
10. Ardehali A, Billingsley A, Laks H, Drinkwater Jr. DC, Sorensen TJ, Drake TA. *Experimental cardiac allograft vasculopathy in mice.* J Heart Lung Transplant 1993;12(5):730-5.
11. Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. *Primarily vascularized allografts of hearts in mice: The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection.* Transplantation 1973;16(4): 343-50.
12. Thomson JG. *Production of severe atheroma in a transplanted human heart.* Lancet 1969;22:1088-92.
13. Graham AR. *Autopsy findings in cardiac transplant patients: A 10-year experience.* Am J Clin Pathol 1992;97(3): 369-75.
14. Pucci AM, Forbes C, Billingham ME. *Pathologic features in long-term cardiac allografts* J Heart Transplant 1990;9(4): 339-45.
15. Billingham ME. *Histopathology of graft coronary disease.* J Heart Lung Transplant 1992;11(3):S38-S44.
16. Ardehali A, Laks H, Drinkwater Jr. DC, et al. *Expression of major histocompatibility antigens and vascular adhesion molecules on human cardiac allografts preserved in university of Wisconsin solution.* J Heart Lung Transplant 1993;12(6):1044-52.
17. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. *Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. I. Time course and immunogenetic and immunopathological considerations.* Am J Pathol 1994;144(2):260-74.
18. Cramer DV, Wu GD, Chapman FA, Cajulis E, Wang HK, Makowka L. *Lymphocytic subsets and histopathologic changes associated with the development of heart transplant arteriosclerosis.* J Heart Lung Transplant 1992;11(3):458-66.
19. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. *Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium: Potential role in postreperfusion inflammatory injury.* Circulation 1995;92(7): 1866-75.
20. Bankey PE, Williams JG, Guice KS, Taylor SN. *Interleukin-6 production after thermal injury: Evidence for nonmacrophage sources in the lung and liver.* Surgery 1995;118(2):431-9.
21. Ardehali A, Drinkwater Jr. DC, Laks H, Drake TA. *Cardiac allograft vasculopathy.* Am Heart J 1993; 126(6):1498-502.
22. McEver RP. *Leukocyte-endothelial cell interactions.* Current Opinion in Cell Biology 1992;4:840-9.
23. Tanio JW, Basu CB, Albelda SM, Eisen HJ. *Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in normal and posttransplantation*

- myocardium: Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts.* Circulation 1994;89(4):1760-8.
24. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Cybulsky MI, Schoen FJ, Libby P. *Endothelial and smooth muscle cells express leukocyte adhesion molecules heterogeneously during acute rejection of rabbit cardiac allografts.* Am J Pathol 1994;144(5):938-51.
  25. Kumar AG, Dai XY, Kozak CA, Mims MP, Gotto AM, Ballantyne CM. *Murine VCAM-1: Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form.* J Immunol 1994;153:4088-98.
  26. Ferran C, Peuchmaur M, Desruennes M, et al. *Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection.* Transplantation 1993; 55(3):605-9.
  27. Pelletier RP, Morgan CJ, Sedmak DD, et al. *Analysis of inflammatory endothelial changes, including VCAM-1 expression, in murine cardiac grafts.* Transplantation 1993; 55(2):315-20.
  28. Orosz CG, Ohye RG, Pelletier RP, et al. *Treatment with anti-vascular cell adhesion molecule 1 monoclonal antibody induces long-term murine cardiac allograft acceptance.* Transplantation 1993;56(2):453-60.
  29. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. *Increased interleukin-1 $\beta$  and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets.* Am J Pathol 1993;142(6):1772-86.

=국문초록=

**배경:** 연구자 등은 본 연구에서 가속화된 이식동맥 경화증의 조기 진행경과를 규명하기 위하여 제1분류 주조직적합성항원(MHC class I)의 한자리만 다른 생쥐 종조합을 이용하여 이소심장이식을 시행하고 이식심장의 관상동맥에서의 주조직적합성항원(MHC), 세포간부착분자-1(ICAM-1), 혈관세포부착분자-1(VCAM-1), 인터루킨-6의 발현 및 조직병리학적 병변의 변화 양상이 이식 후 4주 이내의 초기에 시간 경과에 따라 어떻게 변화하는지를 관찰하였다. **대상 및 방법:** 생후 7~10주된 B10.A 생쥐를 공여심장으로, B10.BR 생쥐를 피이식 생쥐로 이용하였다. 이식후 피이식생쥐에 면역억제요법은 사용하지 않았으며 군을 7일, 15일, 21일, 30일 등 네 군으로 분류하여 각각 해당되는 날짜에 공여심장과 피이식생쥐의 심장을 적출하였다. 심장조직표본은 면역조직화학법, 현미경적소견, 형태학적 측정법으로 분석하였으며 평가는 중복관찰을 통한 경, 중등, 강의 등 급계제로 반정량적인 방법으로 평가하였다. **결과:** 제1분류 주조직적합성항원의 발현은 7일 경과 표본에서 이미 강하게 발현되기 시작하였으며 그 후에도 계속 높은 수준으로 유지되었다. 제2분류 주조직적합성항원의 발현은 모든 군에서 미미하거나 발현이 되지 않았다. 세포간부착분자-1 발현은 7일 경과 표본부터 경도 내지 중등도로 관상동맥내피세포에서 발현되었으나 혈관중층세포에서의 발현은 관찰되지 않았다. 혈관세포부착분자-1 발현은 네군 모두에서 혈관내피세포 및 중층세포에서 강하게 발현되었다. 인터루킨-6의 발현은 모든 군에서 중등도로 발현이 되었다. 조직병리학적 소견의 변화양상은 혈관내피세포의 증식을 보이는 혈관이 7일 경과 표본에서는 관찰혈관 중 평균 10%에서 보이다가 30일 경과 표본에서는 50%의 혈관에서 관찰되었다. 그 결과 혈관 내강의 면적의 감소가 20%에서 40%로 증가하였다. 혈관중층평활근의 증식여부를 관찰하기 위한 트로포마이오신 염색의 결과는 적어도 30일까지는 경도 이하로 관찰이 되었으며 중층완전성도 역시 잘 유지되었다. 혈관주변 단핵세포 침윤은 7일 경과 표본에서 중등도 정도로 관찰되다가 이후 점진적으로 증가하는 양상을 보였다. 피이식생쥐의 심장표본에서는 네군 모두에서 면역병리학적인 소견이 전혀 관찰되지 않았다. **결론:** 본 연구에서 이소 생쥐심장이식 모델에서 공여심장의 관상동맥에서 발현되는 부착물질 및 싸이토카인 등이 이미 7일 이내의 초기부터 발현되기 시작하는 것을 규명하였으며 혈관내막세포증식, 혈관주변세포침윤 등 조직병리학적인 병변의 진행양상 역시 30일이 경과하는 사이에도 점진적으로 진행되는 양상이라는 사실을 발견하였다. 연구자 등은 연구 결과를 토대로 가속화된 이식동맥 경화증이 급작스런 현상이 아닌 만성적인 면역반응의 결과일 가능성이 높다고 추론하였다.