

백서에서의 동종이형의 심장이식후 Colchicine 변형 물질 투여군의 장기 생존

김영학* · 이형창* · 정원상* · 강정호* · 김 혁* · 전순호** · 신성호***

Colchicine Derivatives Allows Prolonged Survival of Cardiac Allograft in the Rat

Young Hak Kim, M.D.*, Hyung Chang Lee, M.D.*, Won Sang Chung, M.D.*, Jung Ho Kang, M.D.*
Hyuck Kim, M.D.*, Sun Ho Chon, M.D.**, Sung Ho Shinn, M.D.***

Background: Colchicine with its immunosuppressive properties has been used with beneficial effects in autoimmune disease, such as Gout, etc. Whether colchicine, by virtue of the above property, could attenuate the process of cardiac allograft rejection in the rats is investigated in this report. **Material and Method:** We compared the untreated group (Control, n=6), Cyclosporin A group (10 mg/kg, daily, n=20), and Colchicine derivative group (Colchicine 40 µg/kg, n=20) of cardiac allografts in the rats. **Result:** In the untreated control group (n=6), all of 6 rats showed rejection within 3 weeks after cardiac allograft. In the cyclosporin A group (n=20), cyclosporin A (10 mg daily oral dose) was administered at a 10 mg daily oral dose and promoted long-term survival (over 100 days). The cyclosporin A group had one mortality at the 18th post-operative day due to infection. Furthermore, in the Colchicine derivatives group (n=20) with a daily IP (Intra Peritoneum) dose (40 ug/kg/day), we observed long-term survival(>100 days), except for one rat that died of an anesthetic problem (respiratory failure) at the 9th post-operative day. **Conclusion:** Experiments have also been performed to evaluate whether the effect of colchicine derivatives allowed prolonged survival of cardiac allografts compared with the cyclosporin A administration group in the rats.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2005;38:595-600)

Key words: 1. Allograft
2. Drugs
3. Immunosuppression

서 론

말기의 장기 부전 환자들에 있어 장기 이식 수술은 근본적인 치료를 가능하게 하는 방법으로 현재까지 여러 장기

의 이식이 가능하게 되었으며 이에 여러 가지 질병의 치료가 보편화되었다. 신장, 간, 췌장, 심장 및 폐 이식 등 많은 장기의 이식 수술이 이미 보편화되었으며, 이미 국내에서도 세포이식 및 장기 이식을 하고 있다. 그러나, 일반

*한양대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Hanyang University

**한양대학교 구리병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Hanyang University Kuri Hospital

***울산대학교 서울아산병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Asan Medical Center, University of Ulsan

†본 논문의 요지는 제37차 추계학술대회에서 발표되었음.

논문접수일 : 2005년 3월 2일, 심사통과일 : 2005년 7월 31일

책임저자 : 정원상 (133-792) 서울시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2290-8466, 8481, (Fax) 02-2290-8462, E-mail: wschung@hanyang.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

적으로 이식 장기에 따르는 거부 반응이 나타나는 바, 이 거부반응은 1일 이내의 초급성 거부반응(hyperacute rejection), 1주 이내의 급성 거부반응(acute rejection), 그리고 장기적으로 나타나는 만성 거부 반응(chronic rejection) 으로 나눌 수 있다. 이러한 거부반응 중 초급성 거부 반응의 경우는 공여자와 수혜자의 유전자형을 미리 조사하여 조직의 적합성과 이에 따르는 면역 반응을 미리 예상하여 공여자와 수혜자의 조직 적합성을 맞추으로써 해결할 수 있다. 지금까지 수많은 면역억제제들의 개발 발전으로 인해 그 억제 능력이 향상되어 이에 따른 장기이식 수술의 생존 성적이 향상되어 왔다. 현재 장기 이식 수술 후의 면역 억제제로서는 종류가 다양하나, 그중 기본적으로 사이클로스포린(cyclosporin A)이 가장 널리 사용되어 왔다. 이는 T 림파구(lymphocyte)의 증식을 유도하고 사이토카인(cytokine)인 인터루킨2 (interleukin-2)의 생성을 억제하고 인체 내 면역 체계에 중추적인 역할을 수행하는 T-림파구의 활성화 및 증식을 억제하고 장기 이식 수술 후의 면역 활성화 반응을 억제하는 역할을 한다[1]. 그러나, 이는 T-림파구의 특이적인 면역 억제제가 개발되어 그 특이성이 T-림파구에 국한되어 있다고는 하나 그 외의 신독성, 고혈압 등의 부작용이 나타나고 있는 실정이다[2]. 이로써 기존의 면역억제제와는 다른 기전의 천연물로서 발굴된 활성 물질이며, 또한 자가 면역 질환인 통풍(Gout) 등의 치료제로 이용되는 콜키신을 변형시킨 변형활성물질(colchicine derivatives)을 개발하여 사이클로스포린(cyclosporin A)을 대체할 만한 물질로써 동물 실험에 적용하고자 하였다.

대상 및 방법

백서(Lewis Rat)를 공여군과 수혜군(이식군)으로 나누고, 공여군은 200~250 gm 암백서(Female Rat)로, 수혜군은 300~350 gm 수백서(Male Rat)를 이용하였으며, 공여군의 백서는 에테르(ether)를 이용한 흡입 마취를 시행하여 양측 흉부를 개흉한 다음, 상공 정맥은 결찰하고 대동맥을 절제한 후 하공 정맥을 통해 4°C cold saline으로 주입한 후 주 폐동맥을 절제한 다음 폐정맥 등을 한꺼번에 결찰한 후 절제하여 심장 적출을 시행한 후 4°C cold saline에 담아 저장 보관하였다. 또한 이식군의 백서는 에테르를 이용한 흡입 마취를 시행후 정중 복부 절개술 후 복부 대동맥과 하공 정맥을 노출한 다음 혈관점자(vascular clamp)를 시행하고 공여군의 적출된 심장의 대동맥과 폐동맥을 이식군의 복부 대동맥과 단측 문합(end-to-side Anastomo-

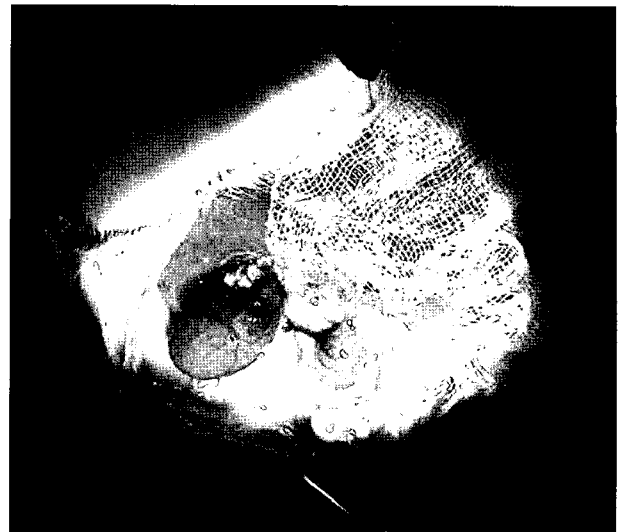


Fig. 1. Photograph of operative field, post operative state.

sis)을 6배율 현미경 하에 9-0 ethilon (Johnson & Johnson 사 제공)을 이용하여 각각 문합술을 시행하여 연결하는 방법인 Ono-Lindsey Method로 수술한 다음[3] 충분히 지혈을 한 후 회복된 복부를 봉합한 후, 수술을 마쳤다(Fig. 1). 복부에 이식된 심장의 박동(beat)을 촉진하거나, 심전도를 찍어 보는 방법으로 추적 관찰하였다.

결 과

Ono-Lindsey Method로 동종 이형 심장이식된 이식군은 각각 면역 억제제를 투여 하지 않은 대조군(n=6)과 사이클로스포린을 10 mg/kg/day의 용량으로 경구 투여군(n=20)과 콜키신 변형물질을 40 ug/kg/day의 용량으로 복막내 투여(intraperitoneal, IP)한 군(n=20)으로 나누어 각각의 생존 기간을 비교 검토 하였으며, 사이클로스포린 투여 군에서 수술 후 18일에 감염으로 추정되는 원인으로 사망한 한 마리와 콜키신 변형물질 투여 군에서 복막 내로 투여하기 위해 마취 중에 호흡부전(respiratory failure)로 사망한 각 1 마리를 제외하고 각 군의 19마리를 비교하였다(Table 1).

각 군의 이식된 심장을 떼내어 조직 검사를 시행하여 동종이형의 이식된 심장의 거부 반응을 Stanford Criteria인 Billingham Grade로 나누어 본 바[4], 대조군에서는 6마리 모두에서 심한 거부반응(Severe rejection)을 보였으며 사이클로스포린 투여 군에서 장기 생존한 19마리 중 16마리는 경도 (Grade I (mild)), 2마리는 중등도 (Grade II (moderate)), 1 마리는 심한 거부반응 (Grade III (severe))을 보였

Table 1. The comparison of long - term survival between groups

Control group (n=6)	11,14,16,16,17,20 days
Cyclosporin group (n=20)	Over 100 days except 1 (POD*#18)
Colchicine-derivative group (n=20)	Over 100 days except 1 (POD*# 9)

*POD=Post operative day.

Table 2. Biopsy result for rejection of each group

Group	Grade	Number
Control	>Grade I	6
	Grade I	16
Cyclosporin	Grade II	2
	Grade III	1
Colchicine derivative	Grade I	17
	Grade II	2

으며, 콜키신 변형물질 투여군에서는 17마리가 경도 (Grade I (mild)), 2마리에서 중등도 (Grade II (moderate)) 소견을 나타내었다. 이로써 콜키신 변형 물질 투여군과 사이클로스포린 투여군 사이에 장기 생존 및 거부 반응의 차이가 없음을 알 수 있었다(Table 2).

고 찰

자가 면역질환 및 장기 이식 후의 거부 반응에 대한 면역 억제제의 개발에는 많은 노력과 투자가 필요하며, 면역학, 약학, 의학 등 다방면의 조화와 협조 하에 이루어져야 하나, 국내 실정상 아직 선진국 수준에는 못 미치고 있다. 현재까지 개발되었거나 개발 되고 있는 면역 억제제들은 다음과 같은 몇 가지의 기전별로 나누어 볼 수 있다.

첫째, 동종 이식 항원을 세포 표면에서 인지하는 과정에서 작용하는 약물로 corticosteroid, 15-deoxyspergualin 등이 있으며[5], 둘째, T 임파구의 활성화 초기에 임파구 활성 물질인 cytokine의 합성을 억제하는 약물로 흔히 사용되고 있는 cyclosporin A, FK 506 등이 있으며[2,6], 셋째, T 임파구의 활성화 말기에 작용하는 약물인 rapamycin, leflunomide 등이 있으며[7], 넷째, 활성화된 임파구의 분열, 증식을 억제하는 약물인 azathioprine (immuran), mycophenolate mofetil (Cellcept) 등이 있으며[8], 다섯째, T 임파구의

수용체 또는 인터루킨-2 (interleukin-2) 수용체에 대한 항체 약물인 OKT3[9], 여섯째, T임파구 작용 시에 필수적인 이차 신호전달의 표면단백질에 대한 단일클론 항체 약물 등으로 나눌 수 있으며, 이외에도 여러 가지 작용기전의 면역억제제들이 연구, 개발되고 있는 실정이다. 그러나, 이러한 면역 억제제들의 개발은 다른 여타 조직에는 영향을 주지 않아야 하기 때문에 면역 세포에 특이적이어야만 하고 이를 위해서는 면역 반응을 주관하게 되는 여러 가지 세포들에 대한 면밀한 실험과 연구가 이루어져야만 한다.

이에 천연물에서 발굴된 면역억제 효과를 지니는 활성 물질에 대해 가능성을 조사하고 기본적인 구조를 유지하는 새로운 유도체의 합성 및 약효 검증을 통하여 신도 물질을 선정하는 데 있어서 현재 자가 면역 질환에 널리 사용되고 있는 콜키신을 기본으로 하여 새로운 천연물에서 발굴된 변형물질을 추출하여 이의 면역억제 효과를 알아보고자 실험을 고안하였다.

콜키신은 정확한 작용기전은 아직 잘 모르나, 면역억제 작용(Immunosuppression)과 항염증효과(Anti-Inflammatory effect)를 갖고 있어 여러 자가 면역 질환에 널리 사용되고 최근에는 면역체계에 세포학적, 분자 생물학적 기전으로 약효 검증을 제공하기도 한다.

임상적으로 장기 이식에 따른 면역 억제제 사이클로스포린 투여 군이 증가함에 따라 사이클로스포린과 연관된 통풍의 환자가 증가하게 되어 그 빈도가 약 10%까지도 보고되기도 한다. 심장 이식 환자들에서는 사이클로스포린과 연관된 통풍의 치료시에 투여하고 있으나, 병행시에는 콜키신에 의한 근 신경 장애를 일으킬 수 있으므로 용량을 감소하여 투여하는 것이 좋다고 하였다[10].

혹은 기존에 가지고 있던 통풍이 사이클로스포린 투여로 악화되어 나타난다고 한다. 그러나, 이때 일반적인 용량으로 치료하게 되면 위장관염, 혈액질환, 근 신경 장애 등을 일으킨다고 한다[11]. 이와 같은 상승작용을 일으키는 것으로 보아 콜키신에 면역억제기능이 있음을 간접적

Table 3. Cell proliferation for B & T lymphocyte at BALB/C mouse spleen

Density	Cyclosporine A		Colchicine		Colchicine derivative	
	LPS* (%)	ConA [†] (%)	LPS (%)	ConA (%)	LPS (%)	ConA (%)
0 nm control	0	0	0	0	0	0
1 nm	-17	-20	15	12	75	63
10 nm	-19	-18	56	21	75	39
100 nm	-26	4	79	72	79	77
1,000 nm	-40	66	80	75	81	80
10,000 nm	-44	81	83	76	94	95

The data represent the average inhibition %. *LPS=Lipo-Polysaccharide; [†]ConA=Concanavalin A.

으로 시사한다 할 수 있겠다.

콜키신의 항염증 작용은 전통적으로 항히스타민 효과와 다형체 주화성(polymorph chemotaxis)의 억제에 기인한다고 한다[12]. 보다 최근 연구에서는 콜키신은 세포 연관성 면역 반응(cell-mediated immune response)을 막을 수 있음이 밝혀졌다[13].

최근 면역 체계에 대한 콜키신의 여러 효과에 대한 메카니즘(Mechanism)을 알기 위해 많은 연구가 진행되고 있다[14]. Borisy & Tayler 등은 세포 배양 연구에서 콜키신이 주 세포 표적인 투불린 단백질이 마이크로투불린(microtubulin)으로 중합화되는 것을 방지함으로써 결합하게 됨을 증명하였다[15]. 면역 반응의 초기 단계에서 Class II의 구조적 적합성 분자(class II MHC molecules)의 발현이 필요한데, 콜키신은 시험관내 연구에서 배양에서 대장암 세포 표면에 class II MHC molecules 발현을 유도하는 인터페론 감마 유도성 발현(interferon-gamma-induced expression)을 방해한다. 이는 세포표면에서 세포질(cytoplasm)로부터 단백질 이동을 방해하는 것으로 설명되어진다[16]. 항원 발현(antigen presenting)시에 T-림프구 활성화는 사이토카인(cytokine) 합성을 필요로 하며 특히 인터루킨 1(interleukin 1, IL-1), 인터루킨 2, tumor necrotic factor (TNF) 등이 세포 표면에서 특이 수용체로서 작용하게 된다. 이로서 콜키신은 많은 그러한 작용을 억제하고 여러 세포 합성에서 TNF- α 분비를 감소시키고, 말초 단핵 세포의 표면에 IL-2 수용체의 발현을 차단한다[17].

이상과 같은 최근 연구를 종합하여 볼 때 콜키신은 세포 연관 면역의 초기 단계에서 중요한 메카니즘을 가지고 있음을 알 수 있으며 항원 인식과정을 향진시키는 것을 방해하므로써 T-세포 증식을 일으키는 이차적인 반응을

억제함으로써 작용하는 것으로 볼 수 있다.

이에 Osterman 등은 콜키신으로 면역 억제 효과를 신장 동종이식에서 증명하였고, 용량에 관계 된다고 하였던 바, 본 실험에서는 동물실험에서 권장되는 용량인 40 ug/kg/day로 하였으며, 이전의 실험에서 관찰되었던 콜키신의 면역기능 조절 효과를 확인하고, 이를 심장이식 후의 면역억제에 이용할 수 있는지를 본 연구에서 확인하고자 하였다[18]. 동물실험에서 콜키신의 변형 물질을 이용하여 동종이식의 심장 이식 실험 군에서 장기 생존과 거부반응을 일으키는 것에 대하여 면역 억제 효과를 증명하고자 고안하였다.

현재 널리 사용되는 콜키신은 분자량 399로 유나이트 제약에서 생산되는 바 1 정당 0.6 mg을 함유하고 있다. 본 실험에서는 이의 변형물질로 분자량은 552로 C-TRI 제약에서 검체를 제공하였다. 또한, 검증된 면역억제제로 널리 사용되고 있는 사이클로스포린은 한미약품에서 제공한 임플란타(implanta)를 이용하였다. 상기 검체들에 대하여 작용기전을 알아보기 위해 검체를 처리하지 않은 BALB/C 쥐의 비장 세포를 B, T 세포의 유도 물질인 LPS (Lipo-polysaccharide)과 Con A (concanavalin A)로만 각각 처리하여 얻어진 OD 값을 0퍼센트로 하여 싸이클로스포린, 콜키신 및 콜키신 변형물질의 검체를 농도별로 처리하여 얻은 OD 값과 비교하여 얻은 억제정도를 퍼센트로 나타내었다(Table 3).

Table 3에서 보는 바와 같이 싸이클로스포린인 경우 LPS로 처리된 비장의 증식은 억제시키지 않고 농도에 따라 약간 증가시키는 것을 알 수 있다. 반면 Con A로 처리한 세포는 1000 mM에서 대조군에 비해 66퍼센트의 세포 증식을 억제하는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 앞선 보고

에서와 같이 사이클로스포린이 T-임파구를 선택적으로 억제시킨다는 보고와 일치하고 있다.

한편 콜키신과 콜키신 변형물질의 검체들은 T 임파구 뿐만 아니라 B 임파구의 세포증식도 억제하는 것을 보여 주었다. 그러나, 콜키신 검체들의 정확한 면역억제 효과에 대한 작용기전은 보다 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

현재 자가 면역 질환인 통풍, 과민혈관염(leucocytoclastic vasculitis) 등의 치료 약제로 이용되고 있는 콜키신의 변형 물질, 천연물에서 발굴한 면역 억제 효과를 지니는 활성 물질에 대하여 그 가능성을 조사한 실험으로서 시행하여 본 바, 현재까지 널리 사용되고 있는 사이클로스포린 투여 군과 비교하여, 양 군 간에 거부 반응이나 장기 생존 등에서 비슷한 성적을 얻을 수 있었으며 백서를 이용한 동종 이형의 심장이식 실험에서는 콜키신 변형물질의 투여 군에서 면역 억제 효과가 있었음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Burke JF Jr, Pirsch JD, Ramos EL, et al. Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 1994;331:358-63.
- Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, et al. Eight-year results of cyclosporin-treated patients with cardiac transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;99:500-9.
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;57:225-9.
- Billingham ME. (Diagnosis of cardiac rejection by) The post-surgical heart. *The pathology of cardiac transplantation.* *Am J Cardiovasc Pathol* 1988;1:319-34.
- Meiser BM, Reichant B. New trends in clinical Immunosuppression. *Transplant Proc* 1994;13:3181-3.
- Shumway SJ. Basic immunologic concepts involved in organ transplantation. In: Baumgartner WA, Reitz BA, Achoff SC. *Heart & Heart-Lung transplantation.* Philadelphia: WB Saunders. 1990;15-24.
- Morris RE, Wu J, Shorthouse R. A study of the contrasting effects of cyclosporine, FK506, & rapamycin on suppression of allograft rejection. *Transplant Proc* 1990;9:1634-41.
- Young CJ, Sollinger HW. RS61443: A new Immunosuppressive Agent. *Transplant Proc* 1994;13:3144-6.
- Kormos RL, Glassman LR, Pham SM, et al. Long-term outcome in a randomized trial of rabbit antithymocyte globulin vs OKT3 immunoprophylaxis. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:S42.
- Lin HY, Rocher LL, Moquillan MA, Schmaltz S, Pallella TD, Fox IH. Cyclosporin-induced hyperuricemia and gout. *New Engl J Med* 1989;321:287-92.
- Yussim A, Bar-Nathan N, Lustig S, et al. Gastro-intestinal hepatorenal and neuromuscular toxicity caused by cyclosporine-colchicine interaction in renal transplantation. *Transplant Proc* 1994;13:2825-6.
- Seidemann P, Fjellner B, Johannessen A. Psoriatic arthritis treated with oral colchicine. *J Rheumatol* 1987;14:777-9.
- Rosenman SJ, Ganji AA, Gallatin WM. Contact dependent redistribution of cell surface adhesion and activation molecules reorganization. *FASEB J* 1991;5:603.
- Lyons MJ, Amador R, Petit C, Nagashima K, Weinreb H, Zabriskie JB. Inhibition of acute experimental allergic encephalitis by colchicine. *J Exp Med* 1986;164:1803-7.
- Borisy GG, Taylor EW. The mechanism of action of colchicine-binding of colchine-3H to cellular protein. *J Cell Biol* 1967;34:533-48.
- Rosenthal AS, Shevach EM. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 1973;138:1194-8.
- Freed BM, Lempert N, Lawrence DA, et al. The inhibitory effects of N-ethylmaleimide, colchicine and cytocholasins on human T-cell functions. *Int J Immunopharmacol* 1989;11:459-65.
- Osterman D, Perico N, Imbert O, Barbui C, Bontempelli M, Remuzzi G. Colchicine allows prolonged survival of highly reactive renal allograft in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:1294-9.

=국문 초록=

배경: 콜키신(Colchicine)은 면역 억제 작용을 갖고 있어 자가 면역 질환인 통풍(Gout) 등의 질환의 치료제로 이용되어 왔다. 본 연구는 콜키신을 동종이형의 심장이식된 백서에 투여하여 면역억제효과를 확인하고자 하였다. 대상 및 방법: 백서에서의 동종이형 심장이식 거부 반응에 대하여 면역억제제를 투여하지 않는 대조군(Control group)(n=6)과 사이클로스포린(Cyclosporin A) 투여군(n=20), 콜키신 변형물질 투여군(n=20)을 비교함으로써 콜키신의 면역 억제 효과를 비교 검토 하였다. 결과: 면역억제제를 투여하지 않은 대조군(n=6)에서는 모두 3주 이내에 거부반응을 보였고, 사이클로스포린(Cyclosporin A) 투여군(n=20)에서는 감염으로 추정되는 한 마리가 술 후 18일째 죽었고, 나머지 19마리는 100일 이상 생존하였다. 또한 콜키신 변형물질 투여군(n=20)에서도 술 후 9일 째에 마취 문제로 인한 호흡부전으로 한 마리가 사망한 외에 나머지는 100일 이상 생존하였다. 결론: 본 실험에서는 백서에서의 동종이형 심장 이식 후 현재 면역억제제로 널리 사용되고 있는 Cyclosporin A 투여군과 콜키신 변형물질 투여군을 비교하여 본 바 콜키신 변형 물질 투여군에서도 Cyclosporin A 투여군과 마찬가지로 장기 생존의 결과를 얻을 수 있어 면역 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

- 중심 단어 : 1. 동종 이식
2. 약물
3. 면역억제