

Deferoxamine과 Deferasirox에 의한 면역반응 비교

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, ¹내과학교실, ²생화학교실

정영숙 · 배이영 · 정낙균 · 조 빈 · 김학기 · 민창기¹ · 한치화¹ · 김호식² · 정대철

Comparison of Immune Responses Induced by Deferoxamine and Deferasirox

Yeong Suk Jung, M.D., E Young Bae, M.D., Nack Gyun Chung, M.D., Bin Cho, M.D., Hack Ki Kim, M.D., Chang Ki Min, M.D.¹, Chi Wha Han, M.D.¹, Ho Shik Kim, M.D.² and Dae Chul Jeong, M.D.

Departments of Pediatrics, ¹Internal Medicine and ²Biochemistry, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: The iron chelating agents (ICA) have various biological effects besides iron chelation. We investigated the immunomodulatory effects of Deferasirox (DFS) compared to Deferoxamine (DFO).

Methods: Spleen cells (SP) were obtained from 5 week-old C57/BL6 (H-2^b). The cytotoxicity of ICAs was examined using the CCK8 method. For the cell proliferation assay, SP were cultured with irradiated in addition to 10, 50, 100 μ M of DFS or DFO and 200ng/mL of cyclosporin A (CSA). Cytokines and nitrite levels were evaluated from supernatants by ELISA.

Results: The viability of ICA was reported to be over 100%. Both DFS and DFO inhibited cell proliferation in a manner comparable to CSA. Cell proliferation without iron was reduced at the concentration of 100 μ M of DFO. With iron treatment, the reduction of the stimulation index was dependent on DFO concentrations. DFS decreased the proliferation without reference to the concentrations. After stimulation of phytohemagglutinin, the nitrite concentrations increased with iron. With lipopolysaccharides, the nitrite levels were higher in DFO with iron than control, but similar in DFS regardless of iron treatment. The levels of interleukin-2 were not different. Interleukin-10 was more abundantly produced in 50 μ M of DFO compared to DFS. Transforming growth factor- β was higher in DFS than DFO at the low concentration, but opposite at the high concentration.

Conclusion: These data suggested that both iron chelating agents possessed immune suppressive effects comparable to CSA. The immunosuppressive effect of DFS may be distinct from DFO. More experiments are required to determine the exact mechanism of the immunosuppressive effect of DFS. (*Korean J Hematol* 2008;43:150-158.)

Key Words: Deferoxamine, Deferasirox, Immunosuppressive effect

접수 : 2008년 5월 27일, 수정 : 2008년 7월 21일

승인 : 2008년 7월 24일

교신저자 : 정대철, 인천시 부평구 부평 6동 665

☎ 403-720, 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원
원 소아청소년과

Tel: 032-510-5687, Fax: 032-503-9724

E-mail: dcjeong@catholic.ac.kr

본 연구의 일부는 가톨릭대학교 성모자애병원 임상의학 연구비의 보조로 이루어졌음.

Correspondence to : Dae Chul Jeong, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, The Catholic University of Korea

665, Bupyeong 6-dong, Bupyeong-gu, Incheon 403-720, Korea

Tel: +82-32-510-5687, Fax: +82-32-503-9724

E-mail: dcjeong@catholic.ac.kr

서론

철은 성장, 발달 및 미생물을 포함한 생물에서 생존을 위해서 필요한 영양소이지만 부족하거나 과다한 경우 심각한 질환을 유발한다.¹⁾ 철이 부족하면 빈혈과 함께 현저한 면역결핍이 일어나는 반면,²⁾ 철 과다는 자유기 유리기 생성, 신체 보호체계 감소, 면역체계 방해, 필수영양소 기능방해, 암세포 성장촉진, 대식세포의 항종양 효과의 억제 등 다양한 생물학적 변화를 일으킨다.³⁾ 또한, 철 과다 상태에서는 철을 사용하는 효소의 활성화와 함께 잉여로 남은 철로 인하여 미생물 증식이 현저하게 되어 임상적으로 심각한 감염이 초래한다.⁴⁾ 임상에서 주기적으로 수혈을 받는 재생불량빈혈, 골수형성이상증후군, 또는 다양한 빈혈에서 체외로 배출이 되지 않는 철의 과다는 간, 심장 및 내분비기관에 축적되어 매우 심각한 질환을 유발함으로써 환자들의 생존을 위협한다.

이러한 철 과다에 대한 치료로서 다양한 철제거제들이 개발되어 환자들에게 투여되고 있다.⁵⁾ 임상에서 사용되는 철제거제들은 철제거 뿐만 아니라 세포 자멸사나 면역조절과 같은 다양한 생물학적 효과가 알려져 있다.⁶⁾ Deferoxamine (DFO)은 철제거와 함께 면역억제 효과를 포함한 다양한 생물학적 특성을 가지고 있지만,⁶⁾ 최근 개발되어 임상에서 사용되고 있는 Deferasirox (DFS)에 대한 생물학적 효과는 아직 명확히 알려져 있지 않다.⁵⁾

이번 연구에서는 철제거제가 가지고 있는 세포자체의 독성을 확인하고 조직조직합항원이 불일치하는 마우스의 비장세포를 이용하여 약제의 면역반응과 철을 처리한 다음 약제와 혼합하였을 경우의 면역반응에서의 차이점을 알고자 하였다. 특히, 연구자들은 기존의 철제거제인 DFO와 DFS의 면역반응에서 차이를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 비장세포의 분리 및 배양

5주된 암컷 C57/BL (H-2^b), 수컷 BALB/c (H-2^d) 마우스(H-2^d)를 사용하였다(오리엔트 바이오, 경기도, 한국). 특정 병원체가 없는 마우스를 무균 사육기에서 멸균된 사료와 물을 공급하고, 실험에 들어가기 전 1주의 적응기간을 거쳐 실험에 이용하였다. 모든 마우스는 경추 탈골시켜 즉사시킨 다음 멸균적 방법으로 비

장을 제거하여 nylon mesh를 이용하여 단핵세포를 얻어 인산완충용액(phosphate buffered saline; Gibco BRL, Island, NY, USA)에 2차례 세척한 다음 비장세포(spleen cell, SP)의 수와 생존율을 trypan blue염색으로 확인하였다.

분리된 비장세포는 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol과 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; JRH Bioscience, Lennexa, KA, USA)이 함유된 RPMI1640 (Gibco BRL, Island, NY)으로 배양하였다.

2. 철제거제의 세포독성

철제거제에 의한 세포독성은 cell counting kit-8 (CCK8 kit, Dojindo Laboratory, Japan)를 이용한 방법으로 확인하였다. 5×10^4 개의 비장세포를 96 well flat bottom plate에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 약제를 처리하지 않는 경우를 대조군으로 하였으며 면역억제제인 cyclosporine A (CSA) 200ng/mL과 20 μ M의 FeCl₃, 10, 50, 100 μ M의 DFO (Deferoxamine, Norvatis, Basel, Switzerland), 10, 50, 100 μ M의 DFS (Deferasirox, Novartis, Basel, Switzerland)를 첨가하고 48시간 배양한 다음 10 μ L의 CCK8 시약을 거품이 발생하지 않게 넣고 4시간 배양하였다. 450 nm파장에서 ELISA reader (Molecular Device Co, Sunnyville, CA, USA)에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 모든 처리된 약제의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포의 생존율을 확인하였다.

3. 철제거제에 의한 세포증식반응의 변화

BALB/c 비장세포에 2,500cGy의 방사선을 조사하여 자극세포(stimulator)로 사용하고, C57BL/6 비장세포를 반응세포(responder)로 사용하였고, 세포증식반응은 bromo-deoxy-uridine (BrdU; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 방법을 사용하여 ELISA법으로 측정하였다. 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol과 10% FBS가 함유된 RPMI1640 배양액에 반응세포와 자극세포를 각각 1×10^5 개씩 동량으로 넣고 5 μ g/mL의 phytohemagglutinin (PHA)를 혼합하였다. 혼합하여 37°C로 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 일부에서는 lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/mL을 혼합하였으며, 철제거제의 면역반응을 확인하기 위하여 약제를 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하고 위의 방법과 동일하게 약제 농도별로 혼합하여 37°C로 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 동일한 실험을 3회 이상 반복하여 시행하였다. 72시간에 상층액 100 μ L를 채취하여 -80°C에 보관하

였으며, 새로운 배양액을 첨가한 다음 BrdU를 넣고 12~18시간 배양한 다음, ELISA 방법으로 흡광도를 측정하였으며, 세포증식은 다음과 같은 공식을 이용하여 세포자극지수(stimulation index)를 확인하였다.

$$\text{세포자극지수}(\%) = \frac{(\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

4. 철을 처리한 비장세포에서 철제거제의 세포증식

철제거제의 효과를 확인하기 위하여 모든 비장세포를 $20 \mu\text{M}$ FeCl_3 농도에서 12~24시간 배양한 이후에 세포증식정도를 위와 같은 방법으로 시행하였다. 자극 세포와 반응세포를 1:1 비율로 혼합하여 FeCl_3 를 함유한 배양액에서 배양한 다음 PBS로 2차례 세척하고 철만 처리한 경우와 DFO, DFS, CSA를 위의 농도에 따라 혼합하여 위와 동일한 배양액에서 72시간 배양하고 BrdU 방법을 이용하여 세포의 증식도를 확인하였다.

5. 철제거제에 의한 nitrite의 농도

세포증식을 확인하기 위해 배양된 상층액으로 nitrite를 ELISA 방법(total NO/nitrite/nitrate assay kit, R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면, 상층액을 반응회석액으로 5배 희석시킨 다음 여과시켰다. 희석된 시료 $50 \mu\text{L}$ 를 96 well plate에 넣고 $50 \mu\text{L}$ 의 Griess 반응시약을 혼합한 다음 부드럽게 흔들어 시약과 시료를 잘 섞이게 하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 이후에 540nm의 파장에서 각각의 흡광도를 측정하여 표준시약에 대한 nitrite

의 값을 확인하였다.

6. 철제거제에 의한 시토카인 농도

세포증식으로 배양된 상층액을 이용하여 IL-2, IL-10, TGF- β 의 농도를 확인하였다. 모든 시토카인은 ELISA 방법으로 확인하였으며 모든 ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)를 통하여 구입하여 사용하였다. 각 시토카인의 최소값은 IL-2가 3.0pg/mL , IL-10이 4.0pg/mL , TGF- β 가 250pg/mL 이었으며, 모든 시료에 대하여 실험지시서에 준하여 검체의 시토카인을 확인하였다.

7. 통계방법

세포의 생존율, 세포증식정도는 one-way ANOVA로 비교 분석하였고 DFO, DFS, CSA의 농도에 따른 비교 분석은 repeated measured ANOVA로 분석하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 철제거제의 농도에 따른 세포 생존율

이미 알려져 있는 철제거제인 DFO는 10, 50, $100 \mu\text{M}$ 에서 세포의 생존율이 $107.2 \pm 5.6\%$, $110.4 \pm 6.9\%$, $115.5 \pm 4.6\%$ 였고, 새로운 철제거제인 DFS는 10, 50, $100 \mu\text{M}$ 에서 세포의 생존율이 $111.0 \pm 7.7\%$, $115.0 \pm 6.3\%$, $126.9 \pm 6.7\%$ 로서 차이가 없었다(Fig. 1A). 또한, 염화철로 처리한 다음에 각 약제에 대한 세포생존율은 DFO에서

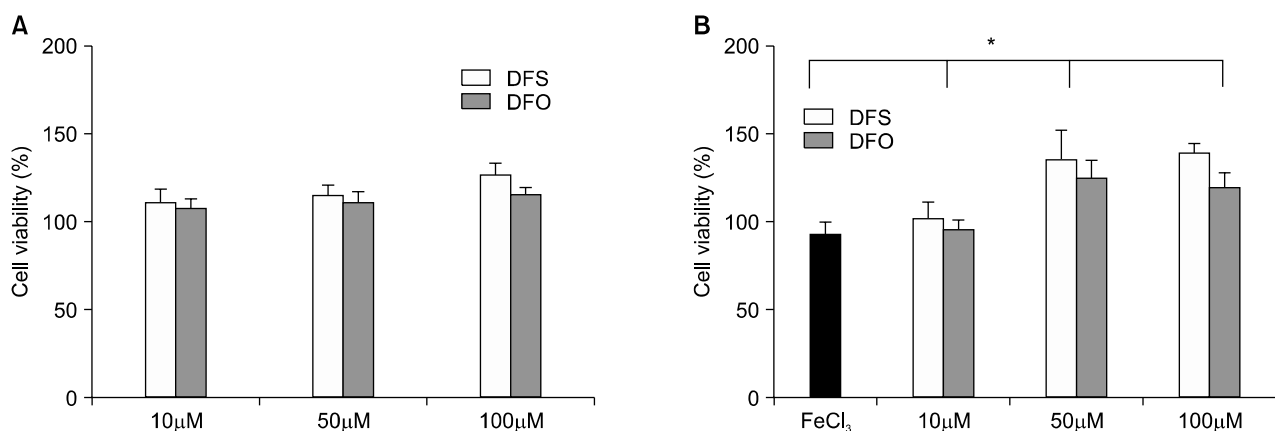


Fig. 1. Cell viability according to concentrations of iron chelating agents (ICA) by CCK 8 method. (A) There is no difference in cell viability among various concentrations of ICA without ferric chloride ($n=5$). (B) The viability is significantly diminished at $20 \mu\text{M}$ ferric chloride, but there are no difference in viability among ICA in spite of presence of iron ($n=5$) (*: $P<0.05$). Abbreviations: DFS, deferasirox; DFO, deferoxamine; FeCl_3 , ferric chloride.

95.0±5.8%, 124.9±10.2%, 120.1±7.5%였으며, DFS에서 102.4±8.7%, 135.5±16.5%, 139.9±5.3%로서 두 약제의 농도에 따른 세포생존율에서는 차이가 없었으나($P>0.05$), 염화철만 처리한 경우의 세포생존율 92.8±8.5%보다 모두에서 유의하게 높았다($P<0.05$) (Fig. 1B).

2. 철제거제에 의한 세포증식 억제

염화철 처리와 관계없이 모든 세포증식에 대한 실험에서 철제거제인 DFS와 DFO 모두에서 이미 알려져 있는 CSA보다 유의하게 세포증식이 억제되었다($P<$

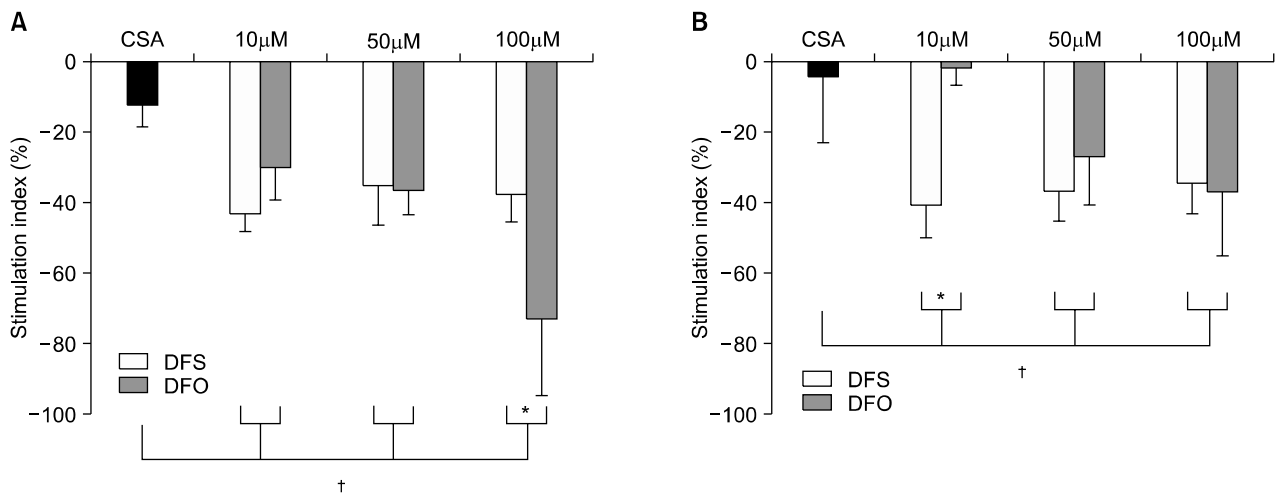


Fig. 2. Stimulation index (SI) of C57/BL6 spleen cells (SP) and irradiated BALB/c SP under 5 μ g/mL of phytohemagglutinin with 1 : 1 ratio according to the concentration of iron chelating agents (ICA) ($n=7$) without (A) and with (B) ferric chloride. There are significant differences between cyclosporin A (CSA) and ICA with or without ferric chloride († : $P<0.05$). (A) The high level (100 μ M) of deferoxamine (DFO) exerts profound inhibition of cell proliferation than deferasirox (DFS) (*: $P<0.05$), although it is not different at 10 and 50 μ M of DFO. Deferasirox (DFS) showed no difference in SI among any concentrations. (B) The decrement of SI is dependent on concentration in DFO († : $P<0.01$), but is not in DFS. There is a significant difference in SI between DFO and DFS at 10 μ M (*: $P<0.01$).

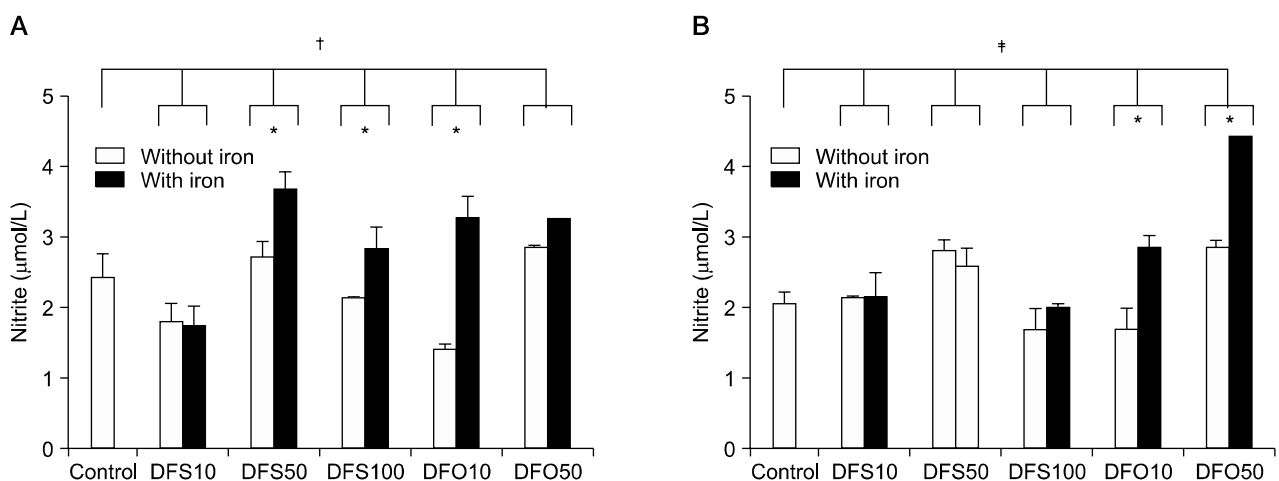


Fig. 3. The levels of nitrite in supernatants from cell proliferation assay with or without ferric chloride according to the concentration of iron chelating agents by non-specific mitogen (A; phytohemagglutinin (PHA), B; lipopolysaccharide (LPS)). All nitrite levels after stimulation are not different according to PHA or LPS. (A) There is lower nitrite in 10 μ M of Deferoxamine (DFO) and Deferasirox (DFS) among ICA without iron, and higher at 10 μ M of DFS than other ICA with iron († : $P<0.01$). (B) The levels of nitrite are not different among ICA without iron, but higher only in DFO with iron († : $P<0.01$). *: $P<0.05$ in each ICA concentration according to presence with iron. Abbreviations: DFS, deferasirox; DFO, deferoxamine.

0.01). DFO는 10, 50 μ M에서 $30.5 \pm 8.8\%$, $36.6 \pm 7.3\%$ 의 세포증식억제가 있었으나 100 μ M에서 $73.8 \pm 21.5\%$ 로 유의하게 현저한 세포증식이 억제되었지만 ($P < 0.01$), DFS는 10, 50, 100 μ M에서 $43.8 \pm 4.6\%$, $35.8 \pm 11.0\%$, $37.9 \pm 7.9\%$ 의 세포증식억제를 보여 농도에 따른 차이가 없었다 ($P > 0.05$). 같은 농도에서 두 약제 간의 세포증식억제의 차이는 100 μ M에서만 DFO가 DFS에 비해 유의한 세포증식억제를 보였다 ($P < 0.01$) (Fig. 2A).

염화철을 처리한 다음에 시행한 세포증식은 DFO가 10, 50, 100 μ M에서 $2.2 \pm 4.6\%$, $26.9 \pm 13.9\%$, $37.1 \pm 17.8\%$ 의 세포증식 억제를 보여 DFO 농도에 따라 세포증식이 억제됨을 알 수 있었다 ($P < 0.01$) (Fig. 2B) 그렇지만, DFS는 10, 50, 100 μ M에서 $41.3 \pm 8.7\%$, $37.1 \pm 8.2\%$, $34.8 \pm 8.5\%$ 의 세포증식억제를 보여 농도에 따른 세포증식의 차이는 없었다 (Fig. 2B). 같은 농도에서 두 약제 간의 차이는 10 μ M에서만 DFS가 DFO보다 유의하게 세포증식이 억제되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 2B).

3. 철제거제에 의한 nitrite 농도의 차이

PHA로 자극된 비장세포에서는 철을 처리하지 않은 경우 10 μ M DFO와 DFS에서 nitrite가 낮았다 ($P < 0.01$). 철을 처리한 경우 10 μ M DFS만이 낮은 nitrite 값을 보였다. 각 ICA에서 철처리에 따른 nitrite 값은 10 μ M DFO에서 철을 처리하지 않았던 경우보다 유의하게 nitrite의 농도가 증가되어 있었으나 ($P < 0.05$), 50 μ M에서는 차이가 없었다. 또한, DFS에서 50, 100 μ M에서 철을 처리하지 않았던 경우보다 철과 같이 반응하였던 경우가 유의하게 nitrite의 농도가 증가되어 있었다 ($P < 0.05$) (Fig. 3A).

또한, LPS로 자극된 비장세포에서는 철을 처리하지 않은 경우 ICA 농도에 따른 nitrite 농도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($P > 0.05$). 각 ICA에서 철처리에 따른 nitrite 값은 50 μ M의 DFO에서만 유의하게 높았

다 ($P < 0.01$). ICA 종류와 농도에 따른 철 처리효과에서 DFS는 대조군과 비슷하며 nitrite의 농도는 차이가 없었다. DFO는 철과 반응하였을 경우 nitrite의 농도가 증가되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 3B).

4. 철제거제에 의한 시토카인의 변화

세포증식으로 얻은 상층액에서 IL-2, IL-10, TGF- β 의 농도를 측정하였다. 염화철을 처리하지 않은 상태에서 IL-2의 농도는 대조군과 차이는 없었으나 이미 알려져 있는 바와 같이 CSA 처리군에서는 현저하게 감소되었다 ($P < 0.01$). 철제거제인 DFO나 DFS의 농도에 따른 IL-2의 차이는 없었으며 동일한 농도의 DFO와 DFS 사이에서도 차이가 없었다. IL-10은 모든 실험에서 대조군과 차이가 없었으나 50 μ M의 DFO에서 같은 농도의 DFS보다 IL-10의 농도가 높았다 ($P < 0.05$). 또한, TGF- β 는 10 μ M의 DFS에서 같은 농도의 DFO보다 높았으나, 100 μ M의 DFS는 동일한 농도의 DFO보다 낮았다 ($P < 0.05$) (Table 1).

염화철을 처리한 후 얻은 상층액에서는 IL-2의 농도는 대조군과 CSA를 포함한 ICA 농도에 따른 차이가 유의하지는 않았으나 ($P = 0.056$), 50 μ M의 DFO에서 가장 높았다. 그러나 DFO와 DFS 사이의 동일한 농도에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. IL-10은 ICA 농도에 따른 차이가 현저하였으며 100 μ M의 DFS에서 가장 높았다 ($P < 0.01$). 동일한 농도의 DFO와 DFS에서는 50 μ M에서 차이가 있어 보이지만 통계적 유의성은 없었으며 100 μ M DFS에서 DFO보다 높았다 ($P < 0.05$). TGF- β 는 전체 실험군에서 10 μ M의 DFS에서 가장 높았으나 ($P < 0.01$) 동일 농도의 DFO와 DFS에서는 차이가 없었다 (Table 2).

고 찰

정상상태에서 체내 철은 흡수와 배설속도가 거의 일

Table 1. The level of cytokines in supernatants from cell proliferation assay according to the concentration of iron chelating agents without ferric chloride (n=4~6)

(pg/mL)	Control	CSA	10 μ M		50 μ M		100 μ M	
			DFO	DFS	DFO	DFS	DFO	DFS
IL-2	49.7 \pm 7.2	17.9 \pm 10.4 [†]	41.4 \pm 16.3	46.9 \pm 7.3	36.9 \pm 14.3	40.8 \pm 12.0	55.7 \pm 9.9	25.1 \pm 16.5
IL-10	18.2 \pm 7.0	15.5 \pm 2.8	25.1 \pm 5.0	12.8 \pm 7.8	14.4 \pm 0.1*	7.4 \pm 4.7	12.8 \pm 5.2	10.3 \pm 5.3
TGF- β	1,575.8 \pm 473.4	1,424.8 \pm 466.7	1,248.8 \pm 82.2	1,567.0 \pm 472.3*	1,222.2 \pm 82.1	1,133.4 \pm 151.9	1,362.9 \pm 402.3*	1,279.9 \pm 39.7

Abbreviations: CSA, cyclosporin A; DFO, deferoxamine; DFS, deferasirox. *: $P < 0.05$ between DFO and DFS, [†]: $P < 0.01$ among experimental group.

Table 2. The level of cytokines in supernatants from cell proliferation assay according to the concentration of iron chelating agents with ferric chloride (n=4~6)

(pg/mL)	Control	CSA	10 μ M		50 μ M		100 μ M	
			DFO	DFS	DFO	DFS	DFO	DFS
IL-2	42.4 \pm 10.6	29.8 \pm 16.8	30.5 \pm 17.3	41.7 \pm 12.4	62.6 \pm 23.8	33.41 \pm 15.3	49.3 \pm 32.3	47.9 \pm 23.3
IL-10	21.1 \pm 8.0	19.2 \pm 5.9	7.6 \pm 3.4	13.2 \pm 12.1	41.0 \pm 11.5	8.06 \pm 3.4	7.3 \pm 1.7	30.5*\pm11.3
TGF- β	1,066.6 \pm 53.6	1,376.8 \pm 317.2	1,355.0 \pm 276.0	1,672.7 \pm 372.1 [†]	1,374.7 \pm 252.7	1,498.9 \pm 352.1	1,202.0 \pm 2.7	1,225.9 \pm 66.8

Abbreviations: CSA, cyclosporin A; DFO, deferoxamine; DFS, deferasirox. *: $P < 0.05$ between DFO and DFS, [†]: $P < 0.05$ among experimental group.

정하게 유지되어 조절되고 있다. 그러나 재생불량빈혈, 골수형성이상증후군, 혹은 다양한 빈혈에서 주기적인 수혈은 철 배설 속도보다 흡수 속도가 빠르게 되어 철이 축적되게 되며 이러한 경우 인체는 철을 빠르게 배설시킬 수 있는 다른 기전이 없기 때문에 축적된 철로 인해 여러 장기의 손상을 유발하게 된다.⁷⁾ 이에 체내 저장철을 효과적으로 배출시켜 철 축적으로 인한 조직과 장기 손상을 막고자 하는 치료법으로 철제거제들이 사용되어 왔다. 철제거제인 DFO는 철이 축적된 환자들의 생존율을 증가시키긴 하였으나 경구로 투여할 수 없고 주사를 맞아야 하기 때문에 수혈을 받아 철이 축적된 환자들의 약 10% 정도만이 DFO를 투여받고 있다.⁸⁾ 최근 경구로 투여되는 DFS가 개발되어 임상에서 사용되고 있다. 이러한 DFO를 제외한 철제거제들에 대한 생물학적 특성에 대한 연구가 현재 진행 중에 있다.

DFO는 철제거 이외에도 세포자멸사 유도, 면역조절과 같은 다양한 생물학적 효과를 가지며 DFO는 면역억제 효과를 가지는 것으로 잘 알려져 있으나⁶⁾ DFS는 새로운 경구용 철제거제로 생물학적 효과에 대하여 아직 명확히 알려져 있지 않다. 이에 연구자들은 새로운 경구용 철제거제에 대한 면역학적 반응에 대하여 알아보고자 하였다.

DFS와 DFO의 세포에 대한 생존율을 비교하였는데 10, 50, 100 μ M에서 세포의 생존율이 염화철만을 처리한 경우보다 모두 생존율이 유의하게 높았으며 48시간 배양한 모든 실험에서 세포의 생존율이 100% 이상으로서 철제거제가 세포를 사멸시키지 않는다고 생각한다. 이러한 본 연구의 결과는 PHA으로 자극된 인체의 림프구가 증식하는 경우에 세포자멸사가 증가된다는 결과와 다른데,^{9,10)} 본 연구에서 세포의 생존율에 대하여 비특이적 세포 mitogen을 사용하지 않은 상태에서 약제 자체의 세포독성만을 확인하여 실험적 차이가 있을 것이다. 또한, 본 연구에서는 철제거제의 농도가

100 μ M 이하이기 때문에 100 혹은 130 μ M의 DFO를 이용한 다른 결과와 차이라고 생각한다. 반면, DFO를 이용한 림프구의 증식 반응이 억제되었다는 Soyano 등의 결과에서는¹¹⁾ 세포의 생존율의 변화가 없이 세포증식이 억제되었다는 결과와 본 연구의 결과와 유사하다고 할 수 있다. 새로운 철제거제인 DFS에 대해서는 아직 발표된 세포독성에 대한 자료가 없지만 DFS도 DFO와 같이 약제 자체에 의한 세포독성은 없을 것이다.

본 연구에서 철제거제인 DFO와 DFS 모두에서 마우스 SP의 세포증식은 이미 알려져 있는 CSA보다 유의하게 억제되었다. 그렇지만, DFO와 DFS 사이의 세포증식 억제는 높은 농도인 100 μ M DFO에서만 차이가 있었으며 DFS는 모든 농도에서 세포증식에 차이가 없었다. 철을 처리한 후의 세포증식도 두 약제 모두에서 억제되었으나 낮은 농도의 DFO에서 세포증식억제 효과가 낮았다. 이런 결과로서 두 약제의 세포증식 억제 효과는 세포 내 기전에 차이가 있을 것이다. DFS의 경우 농도에 따른 세포증식억제 효과가 철 처리와 관계없이 일정한 반면 DFO는 철 처리와 관련이 있다고 생각한다. DFO는 림프구증식을 억제한다는 이전의 연구결과와 일치한다고 할 수 있다.^{12,13)} 또한, 본 연구에서 PHA와 구조적 적합항원이 불일치하는 마우스의 비장 세포로 자극을 준 상태이어서 아마도 고농도의 DFO에서의 세포증식억제는 일부 반응세포의 세포자멸사와 같이 동반되어 나타났다고 할 수 있다. 철을 처리한 경우 DFO에서는 저농도에서 세포증식 억제가 다른 실험군에 비하여 현저하게 감소되었는데 이는 염화철을 처리한 다음 세포의 증식이 증가된다는 결과와 유사하다고 할 수 있다.¹⁴⁾ 세포증식억제에 대한 다른 기전으로서 자극된 세포가 증식하면서 철과 연관된 ribonucleotide reductase의 활성화가 철제거제에 의해 감소되어 세포증식을 억제할 수 있다고 할 수 있으며,¹⁵⁾ DFO에서 IL-2 수용체에 영향을 주어 세포증식이 억제되었다

고 할 수 있다.¹⁶⁾ 아직 DFS에 의한 세포증식억제 기전에 대하여 알려져 있지 않지만, 세포증식에 관여하는 ribonucleotide reductase의 기능을 감소시키는 기전이 관여할 것으로 생각할 수 있으나, 철을 처리한 경우에도 처리하지 않은 경우와 비슷한 세포증식억제가 있어 다른 기전이 관여할 것으로 생각되어 앞으로 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

철제거제에 의한 nitrite의 농도 차이는 철을 처리하였을 경우 DFO와 DFS가 PHA 자극으로 비교적 증가되었으며 LPS를 자극하였을 경우에서 DFO만이 철을 처리한 여부에 따라 nitrite가 증가되었다. 철을 처리하지 않았을 경우 비교적 DFO와 DFS 모두 PHA나 LPS 자극에 대하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 그렇지만, 철을 처리하였을 경우 nitrite의 농도가 증가되는 경향을 보였지만, LPS로 자극하였을 경우에는 DFS가 DFO와 달리 nitrite 농도의 차이가 없었고 DFO는 철을 처리하면서 LPS로 자극하면 nitrite 농도가 증가되었다. 이는 철을 포식하여 활성화된 대식세포(macrophage)가 세포 내 존재하는 철로 인하여 유도산화질소 합성효소(inducible NO synthetase)를 통하여 질산염을 생산하는 과정에서 DFO가 대식세포에서 질산염의 분비를 증가시키는 결과로 이해할 수 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 그러나 철을 함유하고 있는 대식세포가 LPS로 자극할 경우 DFO 단독으로 산화질소 분비가 정상으로 나타나지 않고 chloroquine을 병합하였을 경우 정상적인 대식세포의 산화질소의 분비가 이루어진다는 결과로 볼 때 DFO가 산화질소분비에 일부 관여한다고 할 수 있다.²⁰⁾ 따라서 철을 처리하였을 경우 비특이적 자극제인 LPS로 대식세포를 자극하면 DFO에서 nitrite가 증가하지만, DFS는 nitrite의 변화가 없어 DFS에 대한 nitrite 생성과 분비에는 DFO와 다른 기전이 있을 것으로 생각한다.

철제거제에 의한 시토카인의 변화에서 CSA와 달리 IL-2의 농도는 큰 변화가 없었다. 본 연구의 결과는 DFO가 IL-2 생성에서 차이는 없으나 IL-2 수용체를 차단하는 역할로 세포주기의 정지를 유발한다는 결과로서 이해할 수 있으며,¹⁶⁾ 이러한 생리적 작용으로 인하여 세포증식도 억제된다고 할 수 있다. DFS도 DFO와 같이 IL-2 농도의 변화가 없었으나 아직 생물학적 근거에 대한 결과가 없어 앞으로 연구를 필요로 한다. IL-10은 DFO로 처리하였을 경우 감소되는 경향을 보이지만,²¹⁾ 본 연구에서는 IL-10에 대한 일정한 변화를 확인할 수 없었다. DFO와 DFS 사이에서 IL-10의 농도에 따른 차이가 있었으나, 전체 실험군 사이의 통계적

유의성이 없어 시료를 더 확보하여 연구를 해야 할 수 있을 것이다. 이번 연구에서 TGF- β 가 저농도의 DFS에서 DFO보다 증가되어 있고 고농도의 DFO가 DFS보다 증가되었다. DFO가 TGF- β 의 변화를 유발하여 노화되는 간세포의 세포주기를 정지시켜 간세포의 증식을 억제한다는 결과로 비추어 본다면,²²⁾ 철제거제가 세포 내 신호전달에서 세포주기와 연관되어 TGF- β 의 생성이나 분비를 조절한다고 할 수 있다. 따라서 철제거제인 DFO와 DFS에 대한 세포 내 신호전달과 연관된 연구와 각 약제의 농도에 따른 기전을 확인할 필요가 있다.

본 연구를 통하여 새로운 철제거제인 DFS가 DFO와 유사한 면역억제능력이 있고 DFO와 달리 농도에 따른 차이보다는 약제 자체가 가지고 있는 면역억제 기전이 있을 것이라는 결과를 유추할 수 있었다. DFO와 DFS가 철로 인하여 나타나는 염증성 변화에 대한 산화질소의 분비는 약제간의 차이가 있고 시토카인 분비의 차이가 있어 세포 내 신호전달과 연관된 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

배경: 철제거제들은 철 제거 효과 이외에도 세포자멸사와 면역조절과 같은 다양한 생물학적 효과를 가진다. 본 연구에서는 기존의 철제거제인 Deferoxamine (DFO)와 비교하여 DFS의 면역반응에서 차이를 알아보고자 하였다.

방법: 5주된 C57/BL (H-2^b: 반응세포)와 BALB/c (H-2^d: 자극세포)의 비장세포를 사용하였고 철제거제 자체의 세포독성을 철제거제의 다양한 농도에 배양하여 CCK8 방법으로 생존율을 알아보았다. 약물농도는 cyclosporin A (CSA) 200ng/mL와 10, 50, 100 μ M 농도의 DFO와 DFS를 사용하였다. 철제거제에 의한 비장세포증식을 자극세포와 반응세포의 비율을 1 : 1로 하여 철제거제의 농도에 따라 72시간 배양하여 확인하였고 세포증식반응의 상층액을 이용하여 nitrite와 시토카인을 분석하였다. 일부는 12시간 동안 20 μ M의 염화철을 처리한 다음 세포들은 세척하여 같은 방법으로 세포증식정도와 nitrite 및 시토카인을 확인하였다.

결과: DFO나 DFS 모두 여러 농도에 따른 세포생존율은 100% 이상이었으며 염화철만을 처리한 경우보다 좋았다($P < 0.05$). DFO와 DFS의 다양한 농도에서 CSA보다 유의하게 세포증식이 억제되었으며 철을 처리하지 않은 경우 DFO는 100 μ M에서 유의하게 세포증식

이 현저하게 감소되었으나, DFS는 모든 농도에서 세포 증식에 차이가 없었다. 철을 처리한 경우 DFO는 농도에 따라 세포증식이 억제되었으나, DFS는 농도와 관계없이 세포증식이 감소되었다. Nitrite는 PHA로 처리한 경우 철제거제 농도에 따른 차이가 없었으나, 철을 처리하였을 경우 철을 처리하지 않은 경우보다 유의하게 증가되었다($P<0.05$). LPS로 처리한 경우에는 DFO는 철과 반응하였을 경우 nitrite의 농도가 증가되었으나, DFS는 철 처리와 무관하게 대조군과 비슷한 농도를 보였다. IL-2는 DFO와 DFS 사이에 차이가 없었다. IL-10은 $50\mu\text{M}$ 의 DFO에서 DFS보다 높았고, TGF- β 는 저농도에서 DFS가 DFO보다 높았으나 고농도에서는 DFS가 DFO보다 낮았다.

결론: DFO와 DFS는 CSA와 견줄 만한 면역억제 효과를 가지며 DFS는 DFO와 달리 농도에 따른 차이보다는 약제 자체가 가지고 있는 세포 내 기전이 있을 것으로 생각되며 면역억제 기전에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구를 위해 많은 실험에 도움을 주셨던 성모자 애병원 임상의학연구실 이희철, 염미영, 손유미 연구원들께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Heeney MM, Andrews NC. Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18:1379-403.
- Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr* 2001;131(Suppl): S616-S35.
- Gabutti V, Borgna-Pignatti C. Clinical manifestations and therapy of transfusional haemosiderosis. *Baillieres Clin Haematol* 1994;7:919-40.
- Marx JJ. Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:411-26.
- Cohen AR. New advances in iron chelation therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 42-7.
- Polson RJ, Jenkins R, Lombard M, et al. Mechanism of inhibition of mononuclear activation by the iron-chelating agent deferrioxamine. *Immunology* 1990;71:176-81.
- Kontoghiorghe GJ, Eracleous E, Economides C, Kolnagou A. Advances in iron overload therapies. Prospects for effective use of deferiprone (L1), deferioxamine, the new experimental chelators ICL670, GT56-252, L1NA11 and their combinations. *Curr Med Chem* 2005;12:2663-81.
- Kontoghiorghe GJ, Pattichi K, Hadjigavriel M, Kolnagou A. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferioxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci* 2000;23:211-23.
- Hileti D, Panayiotidis P, Hoffbrand V. Iron chelators induce apoptosis in proliferative cells. *Br J Haematol* 1995;89:181-7.
- Kim BM, Choi JY, Kim YJ, Woo HD, Chung HW. Desferrioxamine (DFX) has genotoxic effects on cultured human lymphocytes and induces the p53-mediated damage response. *Toxicology* 2007; 229:226-35.
- Soyano A, China M, Romano EL. The effect of desferrioxamine on the proliferative response of rat lymphocytes stimulated with various mitogens in vitro. *Immunopharmacology* 1984;8:163-9.
- Bowern N, Ramshaw IA, Badenoch-Jones P, Doherty PC. Effect of an iron-chelating agent on lymphocyte proliferation. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1984;62: 743-54.
- Whitley WD, Hancock WW, Kupiec-Weglinishi JW, DeSousa M, Tilney NL. Iron chelation suppress mononuclear cell activation, modifies lymphocyte migration patterns, and prolongs rat cardiac allograft survival in rats. *Transplantation* 1993;56:1182-8.
- Hileti D, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells. *Br J Haematol* 1995;89:181-7.
- Cory JG, Lasater L, Sato A. Effect of iron-chelating agents on inhibitors of ribonucleotide reductase. *Biochem Pharmacol* 1981;30:979-84.
- Carutenuto P, Pontesilli O, Cambier JC, Hayward AR. Desferoximine blocks IL-2 receptor expression on human T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136: 2342-7.
- Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorganic Biochem* 2002;91:9-18.
- Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001;55:333-9.
- Fritsche G, Larcher C, Schennach H, Weiss G. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis* 2001;183:

1388-94.

- 20) Legssyer R, Josse C, Piette J, Ward RJ, Crichton RR. Changes in function of iron-loaded alveolar macrophages after in vivo administration of desferrioxamine and/or chloroquine. *J Inorganic Biochem* 2003;94:36-42.
 - 21) Golenser J, Domb A, Mordechai-Daniel T, Leshem B, Luty A, Kremsner P. Iron chelators: correlation between effects on *Plasmodium* spp. and immune functions. *J Parasitol* 2006;92:170-7.
 - 22) Yoon G, Kim HJ, Yoon YS, Cho H, Lim IK, Lee JH. Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1)-mediated p27Kip1 expression. *Biochem J* 2002;366:613-21.
-