

쥐 심장 및 피부 이식모델에서의 항혈소판 제제의 효과

서울대학교 의과대학 외과학교실¹, 서울대학교 의학연구원 장기이식연구소²

김성엽¹ · 안상현¹ · 민상일¹ · 김시화¹ · 정유진¹ · 민승기¹ · 김상준^{1,2} · 하종원^{1,2}

Effects of Antiplatelet Agents on the Graft Survival in Murine Cardiac and Skin Transplantation Model

Seong Yup Kim, M.D.¹, Sang Hyun Ahn, M.D.¹, Sang Il Min, M.D.¹, Si Hwa Kim, M.S.¹, Yu Jin Jeong, B.S.¹, Seung Kee Min, M.D.¹, Sang Joon Kim, M.D.^{1,2} and Jongwon Ha, M.D.^{1,2}

Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine¹, Transplantation Research Institute, Seoul National University Medical Research Center², Seoul, Korea

Background: At the initiation of immunologic response, platelets rapidly release chemical mediators which may induce rejection of transplanted organ. The purpose of this study was to investigate the effect of antiplatelet agents in murine cardiac and skin transplantation models.

Methods: In the minor major histocompatibility (MHC) mismatch model, BALB/c (H2d) mice underwent heart transplantation from B10.D2 (H2d) mice. In the major MHC mismatch model, CBA (H2k) mice were used as the recipients and C57BL/10 (H2b) mice as donors. The recipients were divided into four groups and each group was treated with distilled water (DW), sarpogrelate, cilostazol, or clopidogrel respectively. For skin transplantation, the recipients in the minor MHC mismatch model were divided into four groups similar to those in cardiac transplantation. The recipients in the major MHC mismatch model were divided into DW-treated and sarpogrelate-treated groups. All treatments were done by the per oral route of administration.

Results: For graft survival in the minor MHC mismatch model of cardiac transplantation, sarpogrelate-treated group showed increased median survival time (MST) compared to the other groups (DW-treated group 17.5 days, sarpogrelate-treated group 88 days, cilostazol-treated group 13 days, clopidogrel-treated group 23 days). Similar results were observed in the major MHC mismatch model. In the major MHC mismatch model, the expression of adhesion molecules (L-selectin, intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1], Mac-1, lymphocyte function associated antigen-1 [LFA-1]) was significantly higher in DW-treated group compared to sarpogrelate-treated group ($P < 0.05$). In the minor MHC mismatch model, MST in the antiplatelet-treated skin graft group was not remarkably prolonged compared to DW-treated group. In the major MHC mismatch model, sarpogrelate-treated group showed prolonged survival compared to DW-treated group (MST 25 vs. 19 days, $P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the proportion of activated T cells and regulatory T cells.

Conclusions: The tendency for a better survival of grafts was observed in the sarpogrelate-treated skin and heart transplant group compared to DW-treated group. However, further mechanistic study is necessary to these results.

Key Words: Platelet aggregation inhibitors, Transplantation, Blood platelets

중심 단어: 항혈소판제제, 이식, 혈소판

서 론

혈소판은 단순히 혈전의 생성에 관여하는 것뿐만 아니라 백혈구를 활성화시켜 염증반응을 전파한다. 이 작용은

활성화된 혈소판이 P-selectin을 표면에 발현하여 이것의 리간드인 호중구와 단핵구 표면의 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)과 결합하여 혈소판-백혈구 응집체를 형성하고 이어서 혈관내피세포의 Mac-1의 발현을 증가시키는 것으로 이루어진다(1). 혈소판에 가장 풍부한 생체아민인 serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)은(2) 혈소판 응집을 가속화시키고 혈관을 수축시켜 모세혈관에 혈전의 생성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 기전을 통해 serotonin은 거부반응이 있는 이식조직에서 조직괴사와 기능부전을 유발하는 것으로 추측하고 있다(3).

책임저자 : 하종원, 서울시 종로구 연건동 28번지
서울대학교병원 외과, 110-744
Tel: 02-2072-2991, Fax: 02-766-3975
E-mail: jwhamd@snu.ac.kr

접수일 : 2010년 12월 30일, 심사일 : 2011년 3월 10일
게재승인일 : 2011년 3월 12일

Cilostazol, clopidogrel, sarpogrelate 등은 모두 항혈소판 제제로서, cilostazol은 선택적 phosphodiesterase-3A (PDE-3A) 길항제로서 항응고, 혈관확장의 효과가 있다. Clopidogrel은 혈소판의 adenosine diphosphate (ADP) 수용체의 길항제로서 혈소판 응집을 억제한다. Sarpogrelate hydrochloride는 선택적 serotonin 2A (5-HT_{2A}) 수용체의 길항제로서 강력한 항응고 효과를 가지고 있다.

급성 항체성 거부반응의 실험모형 및 임상증례에서 혈관 내 혈소판의 응집이 두드러지게 나타나는 것으로 알려져 있으며(4-7), 혈소판은 보체계의 활성화, 유착분자의 발현, 사이토카인의 분비 등에 의해 항체성 거부반응을 증폭시키는 것으로 알려져 있다(8). 한편, 급성 세포성 거부반응과 관련하여 Czapiiga 등(9)은 혈소판 유래의 CD154나 CD154의 재조합항원 삼합체가 직접 수지상세포를 활성화시키며 CD154에 대한 단클론항체로 활성화를 억제할 수 있다고 보고하였고, Xu 등(10)은 쥐의 심장이식모형에서 혈소판 유래의 CD154나 정제된 CD154의 삼합체만으로 거부반응을 유도할 수 있고, CD154 knockout 쥐에서 거부반응을 막을 수 있음을 증명하였다.

이상의 연구결과들에서 혈소판은 거부반응이 일어난 조직에서 단순히 혈전의 생성에 관계할 뿐만 아니라 자체적으로 면역반응을 시작하고 증폭시킬 수 있음을 알 수 있다. 하지만 그 작용기전은 정확하게 알려져 있지 않으며, 모든 항혈소판 제제가 같은 효과를 내는 지에 대해서는 알려져 있는 바가 없다. 그러므로 본 연구는 쥐의 심장이식과 피부이식모형에서 항혈소판 제제의 이식편의 생존에 대한 영향을 분석하고, 가능한 작용기전에 대한 연구를 하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 6주령의 B10.D2 (H2d), BALB/c (H2d), C57BL/10 (H2b), CBA (H2k) 종으로 중앙실험동물실에서 구입한 후 본 연구기관에서 적응을 위해 7일 동안 식이제한 없이 사육하였다. 수컷으로 무게는 24~26 g이었다. 제공생쥐와 수용생쥐는 무특이 병원균 조건(specific pathogen free, SPF)에서 양육한 것을 사용하였다. 본 실험은 서울대학교병원 동물실험윤리위원회(Seoul National University Hospital Institutional Animal Care and Use Committee, SNUH-IACUC)의 승인 후 진행하였다.

2) 심장이식모형

심장이식편의 상행대동맥과 폐동맥을 수용동물의 복부

대동맥과 하대정맥에 각각 단측 문합하였고, 이식 후 맥박을 매일 확인하여 맥박이 확인되지 않을 때를 거부반응으로 간주하였다. 실험은 두 종류의 생쥐 실험모형을 통해 진행하였는데, 첫 번째 모형은 major histocompatibility (MHC) minor mismatch 모형으로서, 제공생쥐를 수컷 B10.D2 (H2d)로, 수용생쥐를 수컷 BALB/c (H2d)로 하여 증류수 투여군, sarpogrelate 투여군, clopidogrel 투여군, cilostazol 투여군으로 나누어 심장이식편의 생존을 관찰하고 활성화된 T 림프구의 분획, 조절 T 림프구(regulatory T cell)의 분획을 조사하였고, 두 번째 모형은 MHC major mismatch 모형으로서 제공생쥐를 수컷 C57BL/10 (H2b), 수용생쥐를 수컷 CBA (H2k)로 하여 심장이식편의 생존을 첫 번째 모형처럼 각 약품 투여군별로 나누어 관찰하고, 활성화된 T 림프구의 분획, 조절 T 림프구의 분획을 조사하였다. 세포부착분자(L-selectin, PSGL-1, lymphocyte function associated antigen-1 [LFA-1], Mac-1, P-selectin, intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1], vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1], platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 [PECAM-1])와 백혈구 화학주화성 사이토카인(CXCR4, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted [RANTES])의 발현양상을 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 조사하였다.

3) 피부이식모형

제공생쥐의 귀와 꼬리의 피부조직을 1×1 cm 크기로 잘라 수용생쥐의 등에 이식하고 1회용 반창고로 고정하였고 7일째 반창고를 제거하고 이식편의 생존을 확인하였으며 이후 피부이식편의 생존을 매일 확인하였다. 거부반응은 이식편이 모두 소멸한 시점으로 확인하였다. 실험은 두 종류의 생쥐 실험모형을 통해 진행하였는데 첫 번째 모형은 MHC minor mismatch 모형으로서, 제공생쥐를 수컷 B10.D2 (H2d)로, 수용생쥐를 수컷 BALB/c (H2d)로 증류수 투여군, sarpogrelate 투여군, clopidogrel 투여군, cilostazol 투여군으로 나누어 피부이식편의 생존을 관찰하고, MHC major mismatch 모형으로는 제공생쥐를 수컷 C57BL/10 (H2b), 수용생쥐를 수컷 CBA (H2k)로 하여 증류수 투여군과 sarpogrelate 투여군으로 나누어 피부이식편의 생존을 관찰하고 활성화된 T 림프구의 분획, 조절 T 림프구의 분획을 조사하였다.

4) 약품의 투여방법

Sarpogrelate 투여군은 심장이식수술 당일부터 7일까지는 sarpogrelate 60 mg/kg를 1일 1회씩 증류수에 녹여 경구로 투여하였고, 수술 후 8일부터 1주일에 2회씩 60

mg/kg를 투여하였다. Cilostazol 투여군은 같은 방식으로 1회 용량을 40 mg/kg로 하였으며, clopidogrel 투여군은 1회 용량을 15 mg/kg로 하였다. 대조군은 증류수만 같은 방식으로 투여하였다. 피부이식모형에서도 같은 방식으로 약물을 투여하였으며 단, 피부이식모형에서 MHC minor mismatch 모형에서는 모든 투여약물의 용량을 절반으로 하였다.

5) T 림프구의 활성화 정도

T 림프구의 활성화 정도를 시사하는 CD4 양성 T 림프구 중 CD25 양성세포(이하 CD4⁺CD25⁺ T 림프구)의 분획 및 CD8 양성 T 림프구 중 CD25 양성세포(이하 CD8⁺CD25⁺ T 림프구)의 분획을 수술 후 2주에 유세포분석기를 이용해 구하였다. 수용생쥐의 꼬리에서 채취한 말초혈액의 적혈구를 용혈시킨 후 fluorochrome-conjugated antibody (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 염색한 후 FACSCalibur 유세포분석기의 CellQuest 프로그램(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 통해 세포를 분석하였다.

6) 조절 T 림프구의 분획

활성화된 림프구인 CD4⁺CD25⁺ T 림프구 중 조절 T 세포의 분획을 시사하는 FoxP3 양성인 T 림프구의 분획(이하 FoxP3⁺/CD4⁺CD25⁺)을 수술 후 2주에 구하였다. 수용생쥐의 꼬리에서 채취한 말초혈액의 적혈구를 용혈시킨 후 fluorochrome-conjugated antibody (anti-FoxP3, Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 염색한 후 FACSCalibur 유세포분석기의 CellQuest 프로그램(Becton Dickinson)을 통해 세포를 분석하였다.

7) RT-PCR

이식수술 후 2주에 수용생쥐의 이식한 심장을 적출하여 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA로부터 cDNA를 만든 후 원하는 세포부착분자 및 사이토카인(L-selectin, PSGL-1, CXCR4, RANTES, LFA-1, Mac-1, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 대한 Primer/Probe를 제작하고 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 reverse transcription PCR을 real time PCR 방법으로 시행하였다.

8) 통계

데이터는 SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 분석하였다. 단변량분석은

Mann-Whitney non-parametric rank sum test를 사용하고 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 사용하였다. 모든 값은 mean±standard error로 표기하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 확인하였다.

결 과

1) 심장이식모형

(1) 제공생쥐 B10.D2, 수용생쥐 BALB/c에서의 심장이식편 생존과 분자생물학적 분석: 증류수 투여군(n=6), sarpogrelate 투여군(n=5), cilostazol 투여군(n=5), clopidogrel 투여군(n=5)에서 심장이식편의 생존기간의 평균은 각각 45.17±23.5일(median survival time [MST], 17.5일), 86.2±21.9일(MST, 88일), 31.4±12.1일(MST, 13일), 24.6±5.37일(MST, 23일)이었다. Sarpogrelate 투여군의 이식편의 MST는 cilostazol, clopidogrel 투여군에 대해서는 통계적으로 유의하게 더 좋았고($P < 0.05$), 증류수 투여군에 대해서는 MST가 더 좋은 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성을 보이지는 않았다(Fig. 1). 각 군의 유세포분석 결과 CD4⁺ T 림프구에 대한 CD4⁺CD25⁺ T 림프구의 분획은 각각 20.15±1.99%, 18.18±2.34%, 19.03±1.09%, 18.67±2.07%였으며, CD8⁺ T 림프구에 대한 CD8⁺CD25⁺ 림프구의 분획은 각각 12.84±6.56%, 8.56±3.48%, 7.81±1.54%, 8.36±2.58%였고, CD4⁺CD25⁺ T 림프구에 대한 FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ 림프구의 분획은 73.85±5.76%, 70.06±4.15%, 74.84±0.88%, 70.19±3.34%로 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

(2) 제공생쥐 C57BL/10, 수용생쥐 CBA에서의 심장이식편 생존과 분자생물학적 분석: 증류수 투여군(n=7), sarpogrelate 투여군(n=5), cilostazol 투여군(n=5), clopidogrel 투여군(n=5)에서 심장이식편의 생존기간의 평균은 각각 45.17±23.5일(median survival time [MST], 17.5일), 86.2±21.9일(MST, 88일), 31.4±12.1일(MST, 13일), 24.6±5.37일(MST, 23일)이었다. Sarpogrelate 투여군의 이식편의 MST는 cilostazol, clopidogrel 투여군에 대해서는 통계적으로 유의하게 더 좋았고($P < 0.05$), 증류수 투여군에 대해서는 MST가 더 좋은 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성을 보이지는 않았다(Fig. 1). 각 군의 유세포분석 결과 CD4⁺ T 림프구에 대한 CD4⁺CD25⁺ T 림프구의 분획은 각각 20.15±1.99%, 18.18±2.34%, 19.03±1.09%, 18.67±2.07%였으며, CD8⁺ T 림프구에 대한 CD8⁺CD25⁺ 림프구의 분획은 각각 12.84±6.56%, 8.56±3.48%, 7.81±1.54%, 8.36±2.58%였고, CD4⁺CD25⁺ T 림프구에 대한 FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ 림프구의 분획은 73.85±5.76%, 70.06±4.15%, 74.84±0.88%, 70.19±3.34%로 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

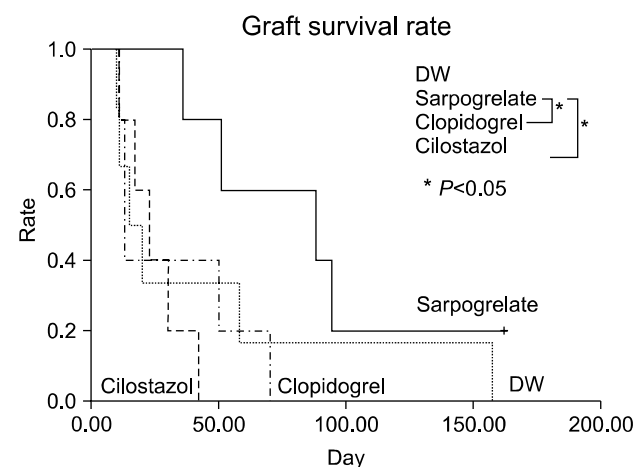


Fig. 1. Graft survival of minor mismatched cardiac transplantation (Donor: B10.D2, Recipient: BALB/c). Abbreviation: DW, distilled water.

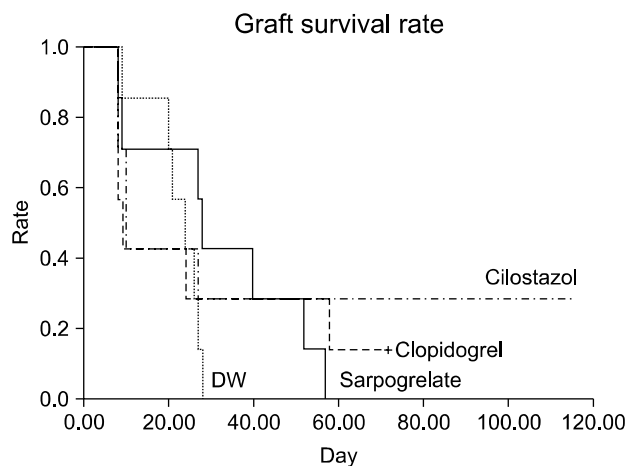


Fig. 2. Graft survival of major mismatched cardiac transplantation (Donor: C57BL/10, Recipient: CBA). Abbreviation: DW, distilled water.

grelate 투여군(n=7), cilostazol 투여군(n=7), clopidogrel 투여군(n=7)에서 심장이식편의 생존기간의 평균은 각각 22.14 ± 2.46 일(MST, 24일), 31.57 ± 7.29 일(MST, 28일), 34.57 ± 15.44 일(MST, 10일), 26.71 ± 10.24 일(MST, 9일)이었다. 각 투여군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2). 각 군의 유세포분석 결과 $CD4^+$ T 림프구에 대한 $CD4^+CD25^+$ T 림프구의 분획은 각각 $31.74 \pm 4.65\%$, $25.80 \pm 1.34\%$, $33.26 \pm 12.61\%$, $27.65 \pm 3.39\%$ 였으며, $CD8^+$ T 림프구에 대한 $CD8^+CD25^+$ 림프구의 분획은 각각 $24.19 \pm 2.31\%$, $17.06 \pm 1.11\%$, $16.72 \pm 4.67\%$, $18.47 \pm 2.67\%$ 였고, $CD4^+CD25^+$ T 림프구에 대한 $FoxP3^+CD4^+CD25^+$ 림프구의 분획은 각각 $51.94 \pm 5.85\%$, $48.00 \pm 3.40\%$, $47.00 \pm 6.19\%$, $44.78 \pm 6.13\%$ 로 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

세포부착분자와 백혈구 화학주화성 사이토카인에 대한 RT-PCR을 시행하였을 때, 그 값의 차이에 통계적인 유의성이 있었던 경우는 L-selectin, ICAM-1, Mac-1, LFA-1였는데($P < 0.05$), 모든 경우에 있어서 증류수 투여군이 더 많은 세포부착분자의 발현을 보였다(Fig. 3).

2) 피부이식모형

(1) 제공생쥐 B10.D2, 수용생쥐 BALB/c에서의 피부이식편의 생존: 증류수 투여군(n=7), sarpogrelate 투여군(n=7), cilostazol 투여군(n=7), clopidogrel 투여군(n=7)에서 피부이식편의 생존기간의 평균은 각각 17.28 ± 1.70 일(MST, 18일), 15.57 ± 0.79 일(MST, 15일), 16.86 ± 2.19 일(MST, 17일), 17.71 ± 1.60 일(MST, 18일)이었다. MST은 다른 모든 군에서 sarpogrelate 투여군보다 통계적인 차이를 보이며

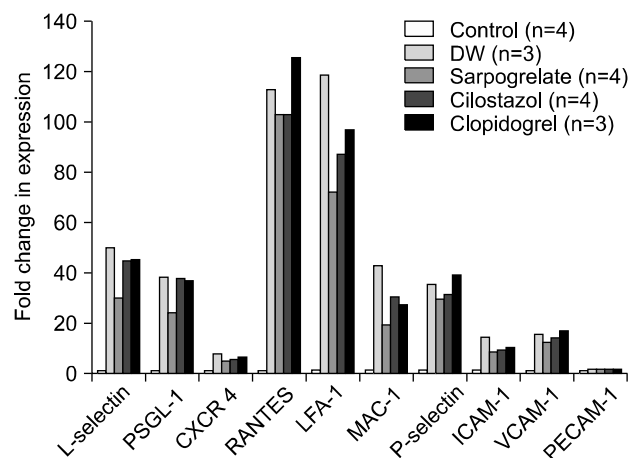


Fig. 3. Quantitative RT-PCR of adhesion molecules and chemo-attractive cytokine. Abbreviation: DW, distilled water.

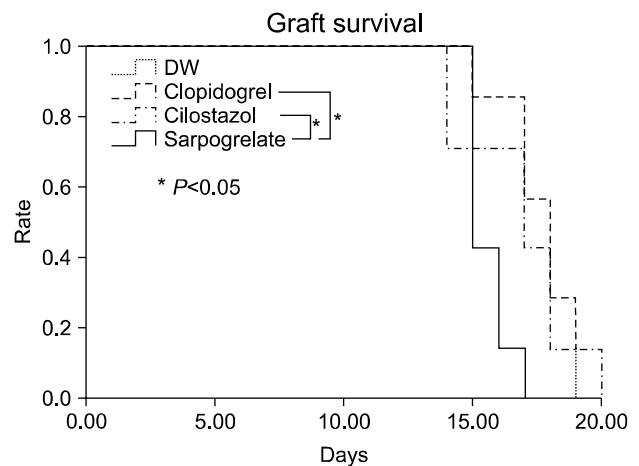


Fig. 4. Graft survival of minor mismatched skin graft (Donor: B10.D2, Recipient: BALB/c). Abbreviation: DW, distilled water.

더 길었으나($P < 0.05$) 증류수 투여군, cilostazol 투여군, clopidogrel 투여군 간에는 서로 통계적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

(2) 제공생쥐 C57BL/10, 수용생쥐 CBA에서의 피부이식편 생존과 분자생물학적 분석: 증류수 투여군(n=5), sarpogrelate 투여군(n=5)에서 이식편의 생존기간의 평균은 각각 20.0 ± 1.04 일(MST, 19일), 26.4 ± 1.40 일(MST, 25일)이었고, MST은 sarpogrelate 투여군이 통계적으로 유의하게 더 길었다(Fig. 5). 각 군의 유세포분석 결과 $CD4^+$ T 림프구에 대한 $CD4^+CD25^+$ T 림프구의 분획은 각각 $3.62 \pm 0.57\%$, $5.37 \pm 3.22\%$ 였으며 $CD8^+$ T 림프구에 대한 $CD8^+CD25^+$ 림프구의 분획은 각각 $0.66 \pm 0.31\%$, $1.87 \pm 1.96\%$ 였고, $CD4^+CD25^+$ T 림프구에 대한 $FoxP3^+CD4^+CD25^+$ 림프구의 분획은 각각 $86.08 \pm 4.33\%$, $79.14 \pm 13.93\%$ 였고 통계적으

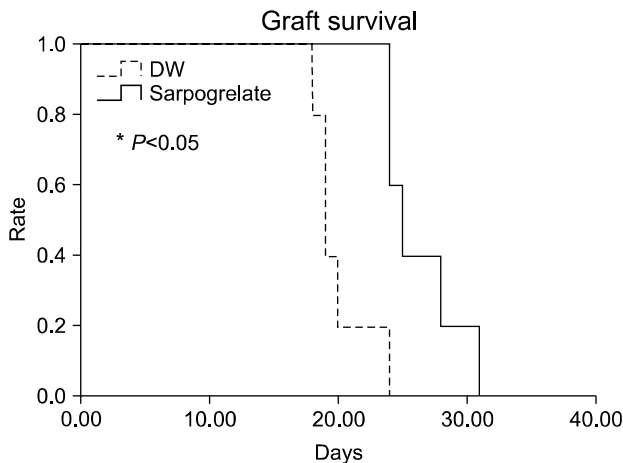


Fig. 5. Graft survival of major mismatched skin graft (Donor: C57BL/10, Recipient: CBA). Abbreviation: DW, distilled water.

로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

고 찰

장기이식은 신장, 간, 심장, 췌장, 폐 등의 고형장기의 기능부전에 가장 효과적인 치료방법으로 알려져 있으며 현재 널리 시행하고 있다. 면역억제요법의 발달과 더불어 이식장기의 생존율도 증가하여 신장이식의 경우 국내에서의 2년 생존율은 93.6%에 달하는 것으로 알려져 있다. 이러한 발전에도 불구하고 신장이식환자의 약 30~60%까지 급성 거부반응이 발생하는 것으로 보고되어 있으며 이러한 급성 거부반응은 만성 거부반응의 가장 중요한 위험인자이며 이식편의 장, 단기 생존율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

급성 및 만성 거부반응을 막기 위한 여러 노력이 시도되고 있으나, 아직 완전히 거부반응을 막을 수 있는 방법은 없으며 계속 새로운 방법들이 시도되고 있다. 거부반응 시 나타나는 현상 중 혈소판 응집은 급성 및 초급성 거부반응에서 중요한 병리적 현상 중 하나로 알려져 있으며 거부반응의 초기에 사구체 모세혈관내피세포에 혈소판의 응집으로 인한 혈전성 모세혈관염을 일으킨다(7,11,12). 이번 연구에서는 장기이식 시 거부반응의 중요한 병리현상을 일으키는 매개체인 혈소판의 기능을 저하시키는 항혈소판 제제의 이식편에 대한 보호효과를 규명하고자 다른 면역억제제를 투여하지 않았다. 그리고 MHC major mismatch 모형과 minor mismatch 모형을 나누어 실험하여 다른 면역학적 기전에 의해서 가려질 수 있는 항혈소판 제제의 효과가 드러날 수 있도록 하였다.

심장이식모형에서 sarpogrelate 투여군이 minor mis-

match 모형에서 다른 항혈소판 제제에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였지만 major mismatch 모형에서는 그러한 차이를 보이지 못한 것은 sarpogrelate의 이식편에 대한 보호효과가 major mismatch의 면역반응을 극복할 정도는 아니었기 때문으로 생각한다. 한편 Akiyoshi 등(3)은 major mismatch 모형에서 sarpogrelate를 투여한 군에서 이식편의 중간생존기간(median survival time)이 100일 이상으로 증류수 투여군보다 통계적인 의미를 가지며($P<0.01$) 길었다고 보고하였다. 이러한 차이를 보인 것은 본 연구에서는 sarpogrelate를 경구투여하였고, 제제를 시판하고 있는 것(Anplag, Ynhan, Seoul, Korea)을 사용하였으며 Akiyoshi 등은 sarpogrelate를 첫 회는 정맥투여하고 이후 복강 내 투여하였으며 시판제제가 아니라 원재료를 직접 사용하였다는 점에서 투여경로의 효율성 때문에 이러한 차이를 보였다고 추정할 수도 있을 것이나, 정확한 이유는 확실하지 않다.

조절 T 림프구의 분획을 시사하는 FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ 림프구의 분획이 심장이식모형의 minor mismatch, major mismatch 모형과 피부이식모형의 major mismatch 모형에서 모두 70% 이상으로 높게 측정되었다. 인간의 조절 T 림프구에 대해서는 쥐와는 달리 FoxP3의 mRNA의 발현과 단백질의 합성이 활성화된 비조절 T 세포에서 일시적으로 올라갈 수 있기 때문에 FoxP3로 조절 T 림프구의 분획을 정확히 파악할 수 없다는 보고가 있다(13-15). Walker 등(14)은 조절 T 림프구의 표지자로 FoxP3를 검정한 실험들 중 쥐의 세포를 사용한 연구들은 T 세포를 주로 비장이나 임파선에서 채취하였기 때문에 naïve T 세포일 가능성이 많고 인간의 세포를 사용한 경우에는 말초 혈액에서 세포를 채취하였기 때문에 memory T 세포일 가능성이 많아 이러한 차이를 보였을 수 있다고 추측하였으며 이번 연구에서는 쥐의 말초혈액에서 혈액을 채취하였기 때문에 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T 림프구의 분획이 높게 나왔을 가능성이 있다.

LFA-1은 모든 백혈구의 표면에 발현되는 분자로서 항원 특이성 반응에 중요한 역할을 하며 ICAM-1은 LFA-1의 리간드로 작용한다. ICAM-1은 혈관내피세포에도 발현이 되는데 백혈구 표면에도 발현이 되며 염증반응이 있는 곳에서 증가한다(16). L-selectin은 대부분의 백혈구 표면에서 발현되며 염증반응이 있는 곳의 혈관내피세포에서 백혈구의 유착을 유도한다(17). Mac-1도 역시 세포 부착분자로서 ICAM-1의 리간드로 역할을 하며 백혈구의 유착에 중요한 역할을 한다(18). 이번 연구에서 심장이식 모형에서 세포부착분자와 백혈구 화학주화성 사이토카인에 대한 RT-PCR을 시행하였을 때 증류수 투여군에서 세

포부착분자(L-selectin, ICAM-1, Mac-1, LFA-1)의 양이 증가한 결과를 보였다. 하지만 항혈소판 제제에 의해 부착분자의 발현이 감소하였으며, 이로 인해 T 림프구의 활성이 억제되었을 것으로 생각한다. 이 중 T 임파구의 표면에 있는 LFA-1과 그 리간드로서 항원전달세포(antigen presenting cell)의 표면에 있는 ICAM-1에 의한 신호전달을 단일클론항체(monoclonal antibody)로 억제하여 memory T 임파구의 증식억제를 통해 원숭이의 췌도세포이식모형에서 이식편의 생존율을 증가시켰다는 보고가 있으며(19), 쥐의 췌도세포이식모형에서는 Th1 세포의 증식을 억제하고 Th2 세포의 증식을 강화하는 기전을 통해 이식편의 생존율을 증가시켰다는 보고도 있다(20). 저자들의 연구에서도 LFA-1과 ICAM-1의 발현이 항혈소판 제제를 사용한 치료군에서 더 적게 나타나며, 특히 sarpogrelate에 의해 40% 정도 감소되는 것이 다른 항혈소판 제제보다 이식편의 생존기간이 증가되는 것에 어느 정도 기여하였을 것으로 생각한다.

RT-PCR 결과와 유세포분석의 결과를 종합하여 고찰하였을 때, 항혈소판 제제는 조절 T 림프구의 유도와 T 림프구의 활성억제를 통해 면역학적으로 이식편에 영향을 주는 것보다 혈소판 응집 자체를 직접 억제하여 모세혈관 폐색에 의한 조직의 괴사를 막고 염증반응의 파급을 줄여서 이식편을 보호하였을 가능성이 많다는 것을 시사한다. 하지만 이에 대해서는 이번 연구의 결과만으로는 명확한 판단이 어려우므로 향후 추가적인 연구가 필요하다.

Sarpogrelate는 5-HT_{2A} 수용체의 특이 길항제인데(21) León-Ponte 등(22)은 활성화된 T 림프구에서 5-HT_{2A} 수용체의 발현이 증가되며 serotonin에 의한 5-HT_{2A} 수용체의 신호의 전달이 지속적인 T 림프구의 분열에 기여할 가능성이 있다고 하였다. Akiyoshi 등(3)은 sarpogrelate가 조절 T 세포의 발현을 증가시켜 동종면역반응을 직접 억제한다고 하였다. 이번 연구에서 심장이식모형에서는 증류수 투여군에 비해서는 통계적인 유의함을 보여주지는 못했지만 sarpogrelate 투여군의 이식편 중간생존기간이 가장 좋은 경향을 보여 주었고, 피부이식모형에서는 증류수 투여군과 비교하여 이식편의 중간생존기간에 있어 통계적으로 유의한 차이를 보여주었는데 이러한 이유는 전술한 León-Ponte 등(22)과 Akiyoshi 등(3)의 연구결과에 비추어 볼 때 다른 항혈소판 제제와 달리 sarpogrelate는 동종면역반응에 직접 관여할 가능성이 많기 때문에 다른 제제보다 더 효과적일 수 있다. 항혈소판 제제의 종류에 따른 조절 T 세포의 발현의 차이를 본 연구를 통해 확인하려 하였지만 확인하지 못하였다. 동종면역반응에 sarpogrelate가 어떤 경로를 통해 관여하는가에 대해

서는 확정적인 증거는 없으며 더 연구가 필요하다(23).

이번 연구의 제한점은 첫째, 심장이식모형에서는 major mismatch 모형에서 cilostazol, clopidogrel, sarpogrelate를 각각 투여군을 만들었는데 피부이식모형의 major mismatch 모형에서는 sarpogrelate 투여군만 실험하였다. 이는 cilostazol, clopidogrel은 심장이식모형에서 증류수 투여군과 비교해 더 좋은 결과를 보이지 않았기 때문에 배제한 것이다. 둘째, 다른 면역억제제의 사용 없이 항혈소판 제제만 사용하여 이식편의 생존기간을 조사하였는데, 항혈소판 제제를 사용한 군과 증류수만 투여한 군 사이에 이식편 생존기간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 못한 이유가 혈소판 활성화 외의 다른 면역학적인 기전을 배제하기 못하였기 때문일 수도 있다고 생각한다.

결 론

항혈소판 제제가 이식편에 미치는 영향을 확인하기 위해 현재 임상에서 사용 중인 항혈소판 제제인 clopidogrel, cilostazol, sarpogrelate를 생쥐의 심장이식모형을 통해 실험하였을 때는 통계적으로 유의한 중간생존기간의 증가는 보이지 못하였지만 sarpogrelate가 좋은 경향을 보였고 피부이식모형에서는 통계적으로 유의하게 생존율의 증가를 보였다. 혈관부착분자 발현의 감소가 하나의 기전으로 설명될 수 있겠으나, 더 구체적인 기전과 임상적 적용에 대해서는 향후 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 신진교수연구비지원(과제번호: 800-20070130)으로 이루어졌음.

REFERENCES

- 1) Graff J, Harder S, Wahl O, Scheuermann EH, Gossmann J. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78: 468-76.
- 2) Barradas MA, Mikhailidis DP. Serotonin, histamine and platelets in vascular disease with special reference to peripheral vascular disease. *Braz J Med Biol Res* 1992;25: 1063-76.
- 3) Akiyoshi T, Zhang Q, Inoue F, Aramaki O, Hatano M, Shimazu M, et al. Induction of indefinite survival of fully

- mismatched cardiac allografts and generation of regulatory cells by sarpogrelate hydrochloride. *Transplantation* 2006; 82:1051-9.
- 4) Wasowska BA, Qian Z, Cangello DL, Behrens E, van Tran K, Layton J, et al. Passive transfer of alloantibodies restores acute cardiac rejection in IgKO mice. *Transplantation* 2001;71:727-36.
- 5) Nakashima S, Qian Z, Rahimi S, Wasowska BA, Baldwin WM 3rd. Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *J Immunol* 2002;169:4620-7.
- 6) Ota H, Fox-Talbot K, Hu W, Qian Z, Sanfilippo F, Hruban RH, et al. Terminal complement components mediate release of von Willebrand factor and adhesion of platelets in arteries of allografts. *Transplantation* 2005;79: 276-81.
- 7) Meehan SM, Limsrichamrern S, Manaligod JR, Junsanto T, Josephson MA, Thistlethwaite JR, et al. Platelets and capillary injury in acute humoral rejection of renal allografts. *Hum Pathol* 2003;34:533-40.
- 8) Morrell CN, Sun H, Swaim AM, Baldwin WM 3rd. Platelets an inflammatory force in transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:2447-54.
- 9) Czapiga M, Kirk AD, Lekstrom-Himes J. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. *Exp Hematol* 2004;32:135-9.
- 10) Xu H, Zhang X, Mannon RB, Kirk AD. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J Clin Invest* 2006; 116:769-74.
- 11) Porter KA. Renal transplantation. In: Heptinstall RH, ed. *Pathology of the Kidney*. 4th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Raven; 1992:1799-931.
- 12) Lowenhaupt R, Nathan P. Platelet accumulation observed by electron microscopy in the early phase of renal allotransplant rejection. *Nature* 1968;220:822-5.
- 13) Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 2007;37:21-3.
- 14) Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003;112:1437-43.
- 15) Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005;35: 1681-91.
- 16) Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* 1997;245:215-32.
- 17) Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005;9:255-66.
- 18) Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003;171:6105-11.
- 19) Badell IR, Russell MC, Thompson PW, Turner AP, Weaver TA, Robertson JM, et al. LFA-1-specific therapy prolongs allograft survival in rhesus macaques. *J Clin Invest* 2010;120:4520-31.
- 20) Arai K, Sunamura M, Wada Y, Takahashi M, Kobari M, Kato K, et al. Preventing effect of anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies on murine islet allograft rejection. *Int J Pancreatol* 1999;26:23-31.
- 21) Doggrell SA. Sarpogrelate: cardiovascular and renal clinical potential. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:865-74.
- 22) León-Ponte M, Ahern GP, O'Connell PJ. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* 2007;109: 3139-46.
- 23) Kirk AD, Morrell CN, Baldwin WM 3rd. Platelets influence vascularized organ transplants from start to finish. *Am J Transplant* 2009;9:14-22.