

# 생쥐 두개골에서 동종골 이식 시 면역억제에 대한 cyclosporine A의 효과

김방신 · 박상묵 · 김경락 · 정연욱 · 한만승 · 국민석 · 박홍주 · 유선열 · 오희균

전남대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:353-9)

## The immunosuppression effect of cyclosporine A on the allogenic calvarial bone graft in mice

Bang-Sin Kim, Sang Mook Park, Kyung-Rak Kim, Younwook Jeoung,  
Man-Seung Han, Min-Suk Kook, Hong-Ju Park, Sun-Youl Ryu, Hee-Kyun Oh

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Korea

**Introduction:** This study examined the effect of cyclosporine A (CsA) on the allogenic cranial bone graft in the mice.

**Materials and Methods:** Twenty eight 12-week-old male ICR mice weighing 40 g were used. The experimental group was injected subcutaneously with CsA (10 mg/kg/day) diluted in Caster oil for 7 days prior to the graft until sacrifice. The control group was injected with the same solution without CsA.

Two full-thickness bone defects with a diameter of 3 mm were made with a trephine bur in the parietal bone lateral to the sagittal suture. A calvarial defect of a mouse was grafted with allogenic calvarial bone disc from another mouse. The experimental and control groups were injected with CsA and the solution without CsA in the same manner before surgery, respectively. The mice were sacrificed at 1 week, 2 weeks and 4 weeks after the bone graft, respectively.

**Results:** In the experimental group, fibrous connective tissues and small amounts of inflammatory cells were observed. At 2 weeks after the allograft in the experimental group, new bone formation in fibrous collagenous tissue and around the allogenic bone was noted. At 4 weeks after the allograft, new bone formation was active along and at the periphery of the mature allogenic bone. The proliferation of blood vessels increased in bone marrow. In the control group, fibrous tissues and inflammatory cells were observed around the allogenic bone and existing bone at 1 week. At 2 weeks after the allograft, the proliferation of blood vessels accompanied by inflammatory cells were scattered in the fibrous connective tissues. New bone formation around the allogenic and existing bone could be observed. At 4 weeks after the allograft, inflammatory cells were severely infiltrated around the allogenic bone. Osteoclasts were scattered along the allogenic bone and induced bone resorption.

**Conclusion:** These results suggest that the daily administration of CsA (10 mg/kg/day) induces efficient immunosuppression without serious complications, and this protocol might be useful for the experimental model of allogenic bone grafts.

**Key words:** Cyclosporine A, Allogenic bone graft, Allograft, Immunosuppression, Osteoclasts

[paper submitted 2010. 7. 5 / revised 2010. 10. 18 / accepted 2010. 10. 22]

## I. 서 론

Cyclosporine A (CsA)는 장기이식 시 면역억제를 위해 사용하는 약물로서, natural killer (NK) 세포를 억제한다고 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 또한 CsA는 T 임파구로부터 NK 세포를 활성화시키는 인자의 생산이나 분비를 억제시켜 숙주의 면역을 억제시키며, B 임파구나 대식세포에는 영향을 미치지 않는다고 보고되고 있다<sup>3-5</sup>.

동종골은 강력한 항원으로 작용할 수 있으며, 임파구 및

### 오희균

501-757 주광역시 동구 학동 5번지  
전남대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Hee-Kyun Oh  
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,  
Chonnam National University

5 Hak-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-757, Korea  
Tel: +82-62-220-5436 Fax: +82-62-220-5437  
E-mail: hkoh@jnu.ac.kr

세포독성 항체를 활성화시켜 결과적으로 면역반응에 의한 이식편의 소실이나 이식의 실패로 이어진다<sup>6-11</sup>. Ekelund와 Nilsson<sup>12</sup>은 CsA가 탈회 동종골이나 탈회 이종골 이식 시 면역반응에 의한 골형성장애를 억제시켜 이형골형성(heterotrophic bone formation)을 증가시킨다고 하였다. Friedlaender<sup>7</sup>는 신선 이종골이 탈회 이종골보다 더 강한 면역반응을 보인다고 보고하였다.

실험동물의 선택 시 필요한 요구조건에 대하여 Frame<sup>13</sup>은 실험동물은 경제적이고, 다루기 쉬우며, 실험부위가 안정적이고, 골재생에 대한 평가가 정확하게 이루어져야 한다고 하였다. 최근에는 세포배양에 대한 실험이 백서나 생쥐의 두개세포를 이용하여 많이 이루어지고 있다<sup>14-16</sup>. 그러나 백서를 이용한 *in vivo* 실험은 많이 개발되었으나, 생쥐를 이용한 실험은 보고된 예가 많지 않다. 또한 생쥐에서 신선 동종골이식에 대한 연구가 많지 않고, 동종골이식 시의 면역반응에 대한 CsA의 효과에 대한 연구도 거의 보고된 바

없다. 그러므로 생쥐에서 동종골이식 시 거부반응과 이에 대한 CsA의 효과에 대하여 알아볼 필요가 있다.

본 연구는 생쥐의 두개골에서 동종골이식 시 면역억제에 대한 CsA의 효과를 알아보고자 시행하였다.

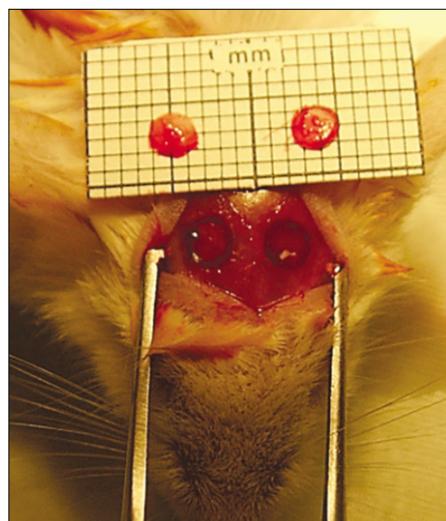
## II. 연구대상 및 방법

### 1. 면역억제제 투여

생후 12주된 체중 40 g 내외의 수컷 ICR mouse 28마리를 이용하였다. 실험군의 면역억제를 위해 동종이식을 시행하기 7일 전부터 희생하기 전까지 CsA (Sandimmun, Sandoz, Basel, Switzerland)를 10 mg/kg씩 매일 피하주사하여, 1주째, 2주째와 4주째 희생한 군에서는 각각 2주, 3주 및 5주간 CsA를 투여하였다. CsA는 피마자 기름을 이용하여 5 mg/mL의 농도로 희석하였다. 대조군은 피마자 기름만을 피하주사하였다.

### 2. 골이식 및 조직학적 관찰

Xylazine (Rompun, Bayer Co, Seoul, Korea)과 Ketamine hydrochloride (Ketalar, Yuhan Co., Seoul, Korea)을 각각 10 mg/kg와 200 mg/kg씩 복강 내 주사하여 전신마취를 하였다. CsA를 투여한 실험군 생쥐의 양측 두정골부위의 털을 깎고 포타딘으로 소독하였다. 생쥐 두개골의 정중선을 따라 약 1.5 cm의 절개를 가하고 골막기자로 양측 두정골을 노출하였다. 외경이 3 mm인 trephine bur를 이용하여 골결손부를 형성하였고, 이때 열에 의한 손상을 최소화하기 위하여 생리식염수를 관주하였다. 골결손부의 형성 시 뇌경막이 손상되지 않도록 주의하였다. 이렇게 양측 두정골에 형성된 골결손부는 각각 직경 3 mm였다. 이와 동시에 만들어진 골반(bone disk)의 크기는 약 2.8-2.9 mm로 비교적 균일하였으며 이를 이식편으로 이용하였다.(Fig. 1) 각 개체에서 나온 이식편은 서로 다른 개체에 동종이식을 하였다. 대조군도 실험군과 같은 방법으로 이식을 시행하였다. 이식 후 6-0 nylon사를 이용하여 봉합하였다.



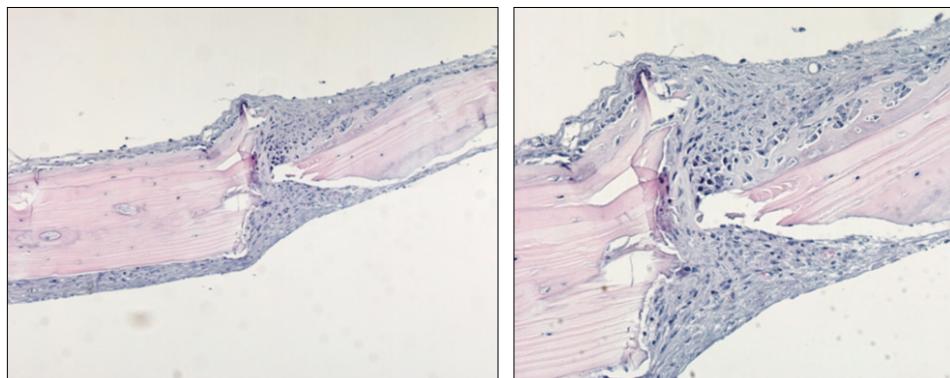
**Fig. 1.** Intraoperative photograph. Bone defects in both parietal bones and two 3 mm-sized calvarial bone discs derived from the same mouse were shown.

Ether를 이용하여 실험동물을 각각 실험 1주, 2주 및 4주째 희생하고, 동물의 두부 및 흉선을 채취하여 중성 포르말린에 3일간 고정하였다. 그 후 두부에서 채취한 시편은 5일간 Gooding's decalcification solution을 이용하여 탈회시킨 후 파라핀에 포매하였고, 흉선 조직은 탈회과정 없이 파라핀 포매 후 4  $\mu$ m로 조직 절편을 제작하였다. 광학현미경 관찰을 위해 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

## III. 결 과

### 1. 대조군

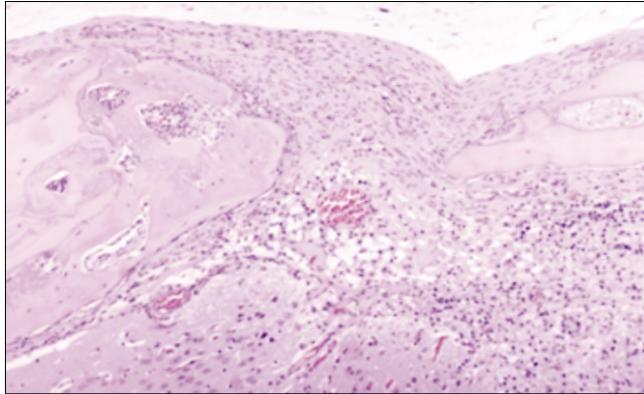
골이식 1주째 동종골 주변은 결체조직에 의한 치유를 보이며, 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 동종골 내부의 골세포가 관찰되었으며, 정상적인 골수는 관찰되지 않았다.(Fig. 2) 골이식 2주째 이식된 골편 사이와 동종골 주위로 염증세포의 침윤이 보였으며, 동종골 주변을 따라 혈관의 증식이 관찰되었다. 동종골 내부의 골세포는 여전히 관



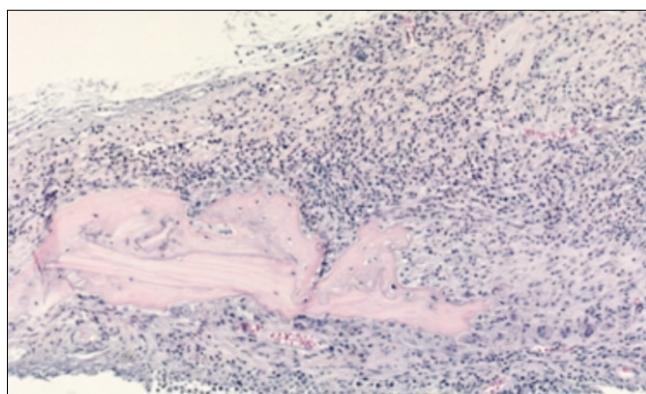
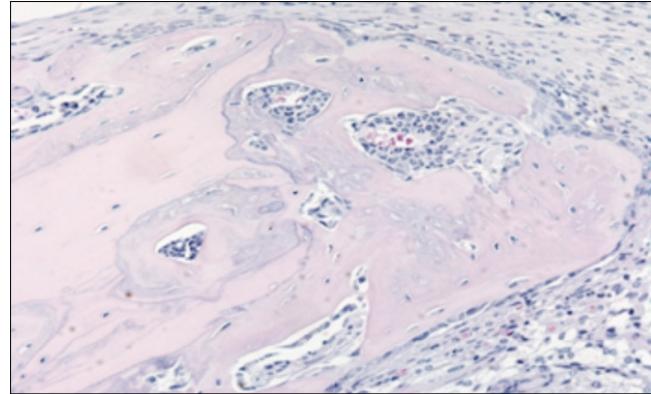
**Fig. 2.** Photomicrograph of 1 week after allograft in the control group. Fibrous tissues and inflammatory cells are observed around allogenic bone and host bone. Some osteocytes in the lacunae and the necrosis of bone marrow can be seen in grafted bone. (H&E staining, original magnification  $\times 100$ ,  $\times 200$ )

찰되었으며, 골수의 변성을 보였다. 수여부의 골편과 동종골에서 신생골의 형성이 관찰되었다.(Fig. 3) 골이식 4주째에는 동종골 주변으로 심한 염증세포의 침윤과 함께 동종골의 가장자리를 따라 파골세포들과 골흡수를 관찰할 수

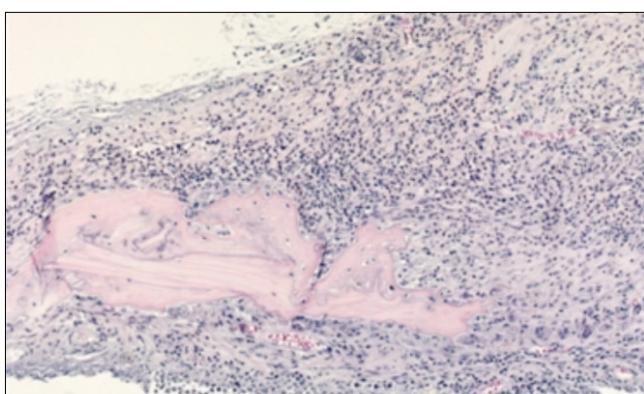
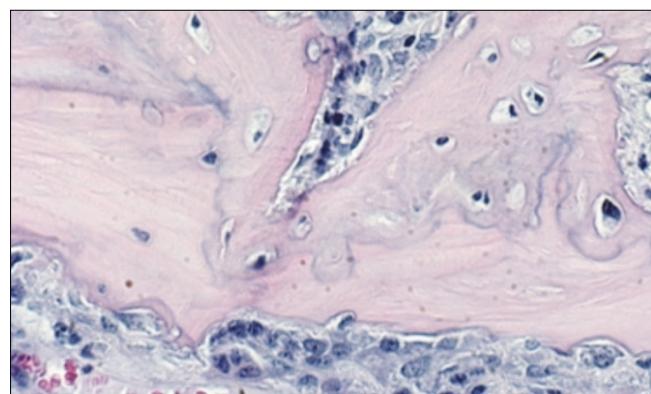
있었다. 중앙부에서는 거의 골이 흡수된 소견을 보였으나 동종골 내부의 골세포에서는 골흡수소견이 관찰되었다.(Fig. 4) 대조군의 흉선은 피질부와 수질부로 경계가 뚜렷하며, 다수의 germinal center가 관찰되었다.(Fig. 5)



**Fig. 3.** Photomicrograph of 2 weeks after allograft in the control group. The proliferation of blood vessels in bone marrow is increased. Some osteocytes the necrosis of bone marrow of grafted bone are observed. Osteocytes newly formed marrow are observed in woven bone.(H&E staining, original magnification  $\times 100$ ,  $\times 200$ )



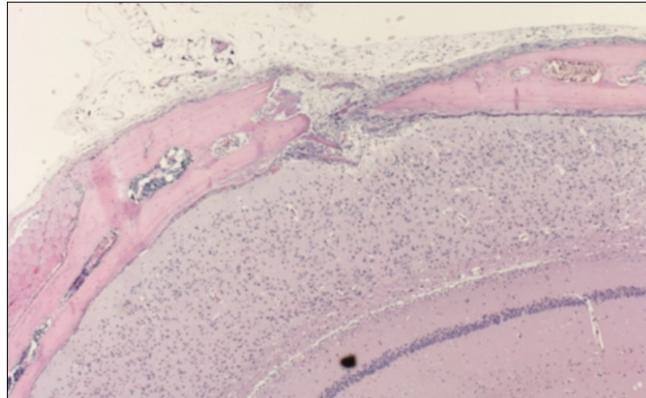
**Fig. 4.** Photomicrograph of 4 weeks after allograft in the control group. Infiltration of severe inflammatory cells around the allogenic bone is noted. Osteoclasts along the allogenic bone with bone resorption are observed. And some osteocytes in the lacunae of grafted bone are still alive.(H&E staining, original magnification  $\times 100$ ,  $\times 200$ )



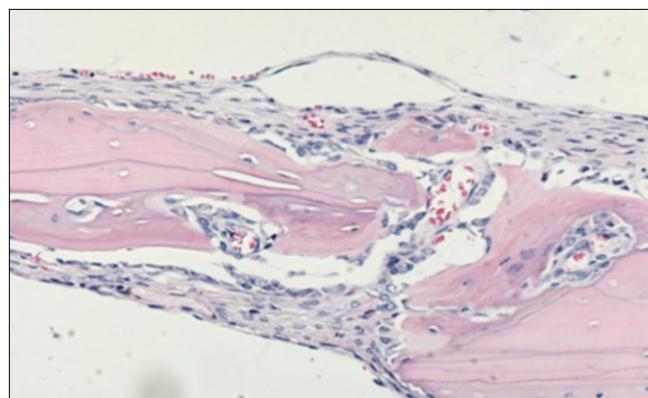
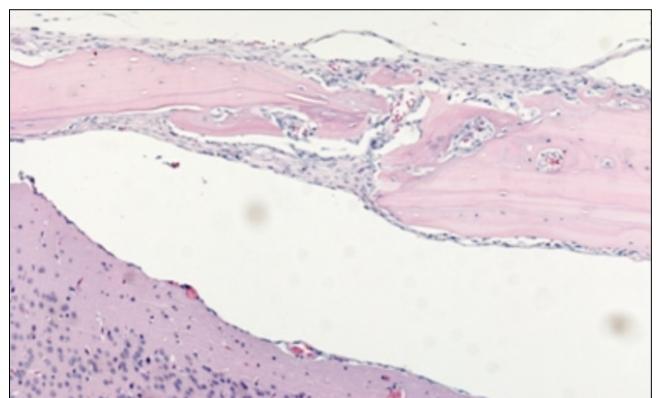
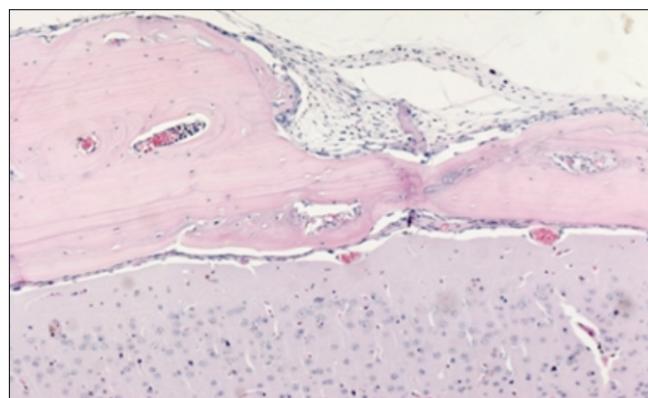
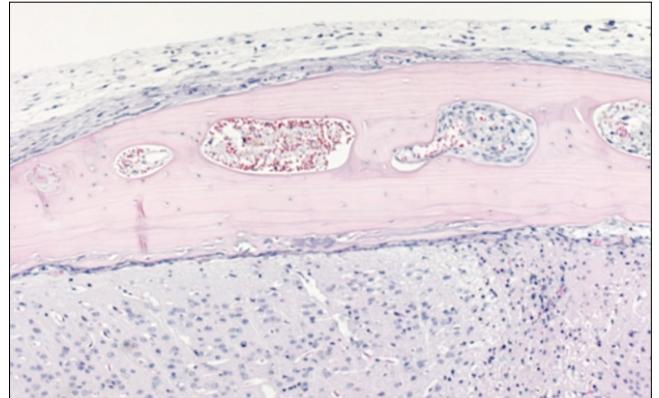
**Fig. 5.** Photomicrograph of normal thymus. The thymus comprises a densely staining peripheral region (cortex) and a lighter staining central portion (medulla).(H&E staining, original magnification  $\times 40$ )

## 2. 실험군

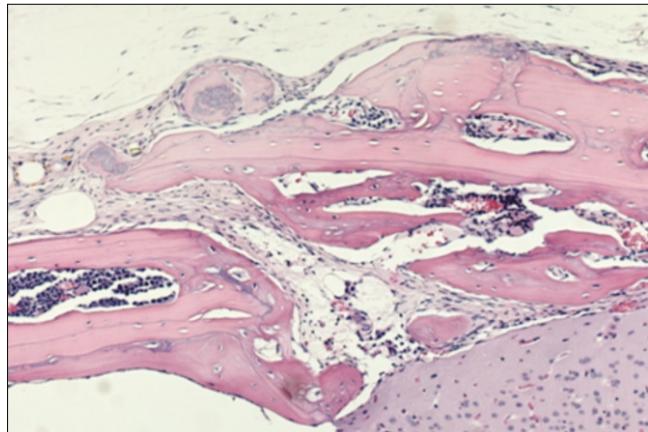
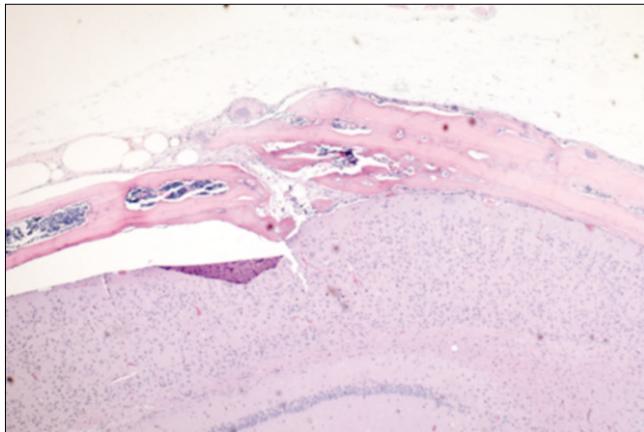
골이식 1주째 이식된 동종골 주변으로 섬유성 결체조직과 함께 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이식골의 골세포가 일부 관찰되었고, 골수는 괴사된 소견을 보였다.(Fig. 6) 골이식 2주째에는 동종골과 수여부 골사이의 결체조직과 골 주변부에서 신생골의 형성이 관찰되었다. 여전히 동종골의 골세포가 관찰되었으며, 골수의 변성을 보였다.



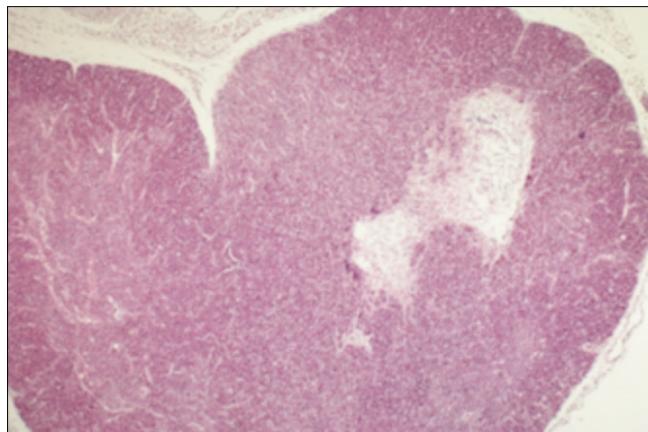
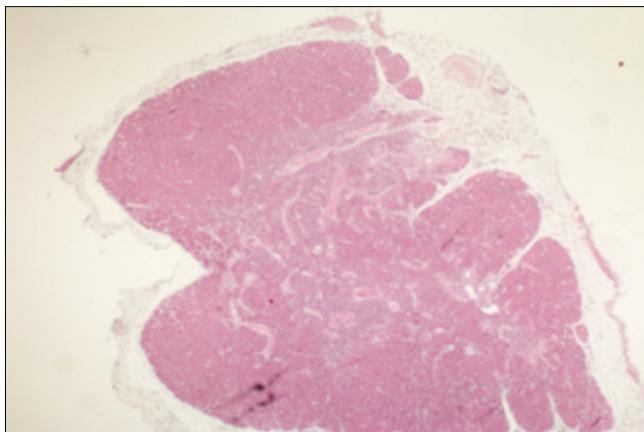
**Fig. 6.** Photomicrograph of 1 week after allograft in the experimental group. Fibrous connective tissues and small amounts of inflammatory cells are shown. Many osteocytes in the lacunae of grafted bone are alive and the necrosis of bone marrow of grafted bone is noted. (H&E staining, original magnification  $\times 40$ ,  $\times 100$ )



**Fig. 7.** Photomicrograph of 2 weeks after allograft in the experimental group. Newly formed marrow in woven bone is noted. Many osteocytes in the lacunae of grafted bone and the necrosis of bone marrow of grafted bone can be observed. (H&E staining, original magnification  $\times 100$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ )



**Fig. 8.** Photomicrograph of 4 weeks after allograft in the experimental group. The proliferation of blood vessels in bone marrow is seen. The maturation of newly formed marrow in woven bone and the necrosis of bone marrow of grafted bone is observed. Some osteocytes are still seen in the lacunae of grafted bone. (H&E staining, original magnification  $\times 40$ ,  $\times 100$ )



**Fig. 9.** Photomicrograph of thymus at 2 weeks and 4 weeks after cyclosporine injection. The whole thymus is destructed and has not germinal center. (H&E staining, original magnification  $\times 40$ )

#### IV. 고 찰

CsA는 장기이식을 받은 환자나 건선 또는 류마티TM관절염 등의 NK 세포에 면역장애를 가지는 환자에서 면역억제를 목적으로 이용되는 약물이다<sup>17-19</sup>. 이러한 면역억제는 NK 세포에 대한 직접적인 억제 및 T 임파구에 대한 세포활성물질의 생산 및 분비를 억제시킴으로써 나타나며, 용량의존적으로 나타난다<sup>1-5</sup>. Boland 등<sup>20</sup>은 생쥐의 각종 장기에서 CsA에 분포 및 투여량에 따른 부작용에 대하여 보고하였는데, 12.5 mg/kg/day의 농도로 6주간 투여 시 별다른 부작용을 보이지 않았다고 하였다. 다른 실험에서는 생쥐의 면역억제를 위해 CsA를 각각 25 mg/kg/day와 10 mg/kg/day의 농도로 투여하였다<sup>21,22</sup>. CsA 투여에 의한 합병증으로 Boland 등<sup>20</sup>은 CsA를 생쥐에 50 mg/kg/day나 200 mg/kg/day로 투여하였을 때 체중 감소, 설사, 장중첩 및 치명적인 신경독성이 나타난다고 하였으며 더불어 비장, 흉선, 장간막 임파절, 간, 신장 등에 손상이 나타난다고 하였다. 본 연구

에서는 10 mg/kg/day의 농도로 투여하였으며, 장기손상에 대해서는 조직학적으로 확인하지 못하였지만 임상적으로 별다른 합병증은 보이지 않았다.

술전 CsA의 투여시기에 대해 Fabien 등<sup>22</sup>은 10 mg/kg/day의 농도로 투여 후 6일째부터 흉선이 상당히 감소되며, 8일째에는 흉선의 수질부가 파괴된다고 하였다. Wachowiak은 CsA 투여 후 경과시간에 따른 연구에서 1일째에 NK 세포 활성의 일시적인 감소를, 3일째에 정상으로 회복을, 그리고 9일째에 가장 적은 활성도를 보인다고 하였다. Boland 등<sup>20</sup>은 CsA를 지속적으로 투여 시 처음 1주일 동안은 지속적으로 약물의 농도가 상승하며, 그 이후에는 농도가 지속됨을 보고하였다. 본 연구에서는 숙주의 면역이 적절하게 억제되고, 약물 농도가 지속적으로 유지되는 점을 고려하여 이식하기 7일 전부터 매일 CsA를 투여하였다. 실험군의 2주째 흉선은 대조군에 비해 전반적인 파괴소견을 보였으며, 대조군에서 보이는 편질부나 수질부는 관찰되지 않았다.

술후 CsA의 투여에 대해 Aramant와 Turner<sup>23</sup>는 이식의 성공을 위해서는 지속적인 투여가 필요하다고 하였고, Lems 등<sup>24</sup>은 오랫동안 생착된 동종피부이식에서 CsA 투여의 중단 후에 거부반응이 일어난 것에 대해 보고하였다. 본 연구에서도 이러한 점을 고려하여 실험동물의 희생되기 전까지 2주, 3주 및 5주간 매주 지속적으로 10 mg/kg/day로 CsA를 피하주사하였다.

다른 여러 가지 합성물질의 개발에도 불구하고, 동종골의 이식은 변형되지 않은 구조와 모양, 강도 및 골유도능 등이 수여부와 유사하여 여전히 많이 이용하고 있다<sup>11</sup>. 그러나 동종골이 가지는 항원성이 이식부의 치유, 골개조 및 이식골의 생착을 방해하며 이로 인해 이식골에 대한 거부반응을 나타내고 이는 NK 세포나 T 세포의 감작이 원인이다<sup>3,5,9</sup>. Horowitz와 Friedlaender<sup>9</sup>는 생쥐의 신선한 이종골은 강력한 항원으로 작용하며, 이에 의해 T 세포의 반응을 자극한다고 하였다. CsA는 NK 세포와 T 세포를 억제시켜 항원성에 의한 직접적인 탐식작용이나 여러 가지 세포활성 물질들의 분비를 억제시켜 이식거부반응을 나타내지 않도록 한다<sup>15</sup>. 또한 Autenried와 Halloran<sup>25</sup>은 CsA가 이종이식편의 class I과 II 항원의 유도를 억제한다고 하였다. 본 연구에서 CsA을 투여한 실험군은 이식한 동종골의 거부반응을 보이지 않았으나, 면역억제를 하지 않은 대조군에서는 4주째 이식골편의 심한 흡수가 관찰되었다.

신선한 동종골은 살아있는 세포에 의한 골생성과 많은 성장인자의 생산, 기질 내의 골유도물질 및 골전도에 의한 골형성을 가능하게 하는 구조 등을 제공한다<sup>11,26</sup>. 또한 이러한 신선한 동종골은 살아있는 세포를 가지게 되는데, Halloran 등<sup>26</sup>은 살아있는 세포에 의해 면역반응이 유도되며, 이종이식편의 대부분의 실질세포들은 죽지만 골세포처럼 이식골 내에 존재하는 일부의 세포는 살아서 적어도 4주 이상 면역반응을 일으킬 수 있다고 하였다. 본 연구에서 실험군 및 대조군에서 1주와 2주째 이식편의 가장자리에서 신생골의 형성을 볼 수 있었다. 실험군 4주째에는 신생골 내에 골수가 새로이 형성되었다. 이식골의 골수는 대부분이 모든 군에서 변성되었으며, 골세포는 실험군과 대조군에서 1주, 2주, 및 4주째까지 관찰할 수 있었다. 대조군 4주째에는 심한 염증과 골흡수를 보였으며, 이는 Halloran 등<sup>26</sup>의 연구에서처럼 이식편 내부에 살아있는 골세포에 의한 항원성 때문일 것으로 생각된다. 실험군의 4주째에도 심한 염증세포의 침윤 및 골흡수와 동시에 이식된 골편에서는 신생골의 형성이 관찰되었다. 이는 Stevenson과 Horowitz<sup>11</sup> 및 Urist 등<sup>27</sup>에서처럼 신선한 동종골이 가지는 많은 성장인자나 골유도물질 등에 의한 골의 형성이라고 생각한다.

## V. 결 론

본 연구는 생쥐의 두개골에서 동종골 이식 시 면역억제

에 대한 CsA의 효과에 대하여 알아보고자 시행되었다. 실험군은 CsA를 10 mg/kg/day의 농도로 동종골 이식 1주 전부터 희생할 때까지 피하를 통해 주입하였다. 대조군에는 CsA가 들어있지 않은 용매를 동량 피하주사하였다. 실험군은 동종골의 흡수나 거부반응을 보이지 않고 잘 유지되었으며, 이식편의 주변부에서는 신생골의 침착이 관찰되었다. 그러나 CsA를 투여하지 않은 대조군에서는 2주째에 골세포에 의한 이식골의 흡수가 관찰되었고, 4주째에는 심한 골흡수를 보였다. 이상의 결과는 생쥐에서 CsA를 10 mg/kg/day의 농도로 투여 시 심각한 임상적인 부작용을 보이지 않으면서 적절한 면역억제를 얻을 수 있음을 시사한다.

## References

1. Yanagihara RH, Adler WH. Inhibition of mouse natural killer activity by cyclosporin A. Immunology 1982;45:325-32.
2. Wachowiak J. Effects of cyclosporin A on the activity of mouse natural killer cells and hybrid resistance. Immunol Lett 1986;13: 95-9.
3. Yanagihara RH, Adler WH. Cyclosporin a inhibits T cell-mediated augmentation of mouse natural killer activity. Immunopharmacology 1982;4:243-52.
4. Nemlander A, Häyry P. Effect of cyclosporin A on the generation of cytotoxic T lymphocytes in mouse mixed lymphocyte culture. Scand J Immunol 1980;12:493-8.
5. Alberti S, Boraschi D, Luini W, Tagliabue A. Effects of *in vivo* treatments with cyclosporin-A on mouse cell-mediated immune responses. Int J Immunopharmacol 1981;3:357-64.
6. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. Clin Orthop Relat Res 1983;(174):58-68.
7. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. J Bone Joint Surg Am 1991;73:1119-22.
8. Horowitz MC, Friedlaender GE. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. Orthop Clin North Am 1987;18:227-33.
9. Horowitz MC, Friedlaender GE. Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. J Bone Joint Surg Am 1991;73: 1157-68.
10. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. J Bone Joint Surg Am 1987;69:573-82.
11. Stevenson S, Horowitz M. The response to bone allografts. J Bone Joint Surg Am 1992;74:939-50.
12. Ekelund AL, Nilsson O. Effects of cyclosporin A on bone turnover and on resorption of demineralized bone matrix. Clin Orthop Relat Res 1996;(326):127-34.
13. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. J Oral Surg 1980;38:176-80.
14. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J. Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. Calcif Tissue Int 1990;46:46-56.
15. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE. Ultrastructural analysis of bone nodules formed *in vitro* by isolated fetal rat calvaria cells. Bone 1988;9:155-63.
16. Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Butler WT, Sodek J. Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. Biochem J 1991;274:513-20.
17. Ellis CN, Fradin MS, Messana JM, Brown MD, Siegel MT, Hartley AH, et al. Cyclosporine for plaque-type psoriasis.

- Results of a multidose, double-blind trial. *N Engl J Med* 1991; 324:277-84.
18. Green CJ. Experimental transplantation and cyclosporine. *Transplantation* 1988;46(2 Suppl):3S-10S.
  19. Tugwell P, Bombardier C, Gent M, Bennett KJ, Bensen WG, Carette S, *et al.* Low-dose cyclosporin versus placebo in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990;335:1051-5.
  20. Boland J, Atkinson K, Britton K, Darveniza P, Johnson S, Biggs J. Tissue distribution and toxicity of cyclosporin A in the mouse. *Pathology* 1984;16:117-23.
  21. Shi CL, Rooth P, Täljedal IB. Effects of cyclosporin A and verapamil on mouse pancreatic islets. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;129:54-8.
  22. Fabien NH, Auger C, Moreira A, Monier JC. Effects of cyclosporin A on mouse thymus: immunochemical and ultrastructural studies. *Thymus* 1992;20:153-62.
  23. Aramant R, Turner JE. Cross-species grafting of embryonic mouse and grafting of older postnatal rat retinas into the lesioned adult rat eye: the importance of cyclosporin A for survival. *Brain Res* 1988;469:303-7.
  24. Lems SP, Capel PJ, Koene RA. Rejection of long-surviving mouse skin allografts after withdrawal of cyclosporin A therapy. *Transplant Proc* 1980;12:283-6.
  25. Autenried P, Halloran PF. Cyclosporine blocks the induction of class I and class II MHC products in mouse kidney by graft-vs-host disease. *J Immunol* 1985;135:3922-8.
  26. Halloran PF, Lee EH, Ziv I, Langer F, Gross AE. Orthotopic bone transplantation in mice. II. Studies of the alloantibody response. *Transplantation* 1979;27:420-6.
  27. Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 1967;53: 243-83.