

돼지의 대동맥 판막 및 심낭에서 녹색콩 알파-갈락토시다아제를 이용한 알파-갈 항원결정인자 제거

박성식* · 김웅한** · 김경환** · 이창하*** · 최선영** · 이 철** · 오삼세*** · 김관창**** · 김용진**

Removal of α -Gal Epitopes in Aortic Valve and Pericardium of Pig Using Green Coffee Bean α -Galactosidase

Seongsik Park, M.D.*, Woong-Han Kim, M.D.**, Kyung-Hwan Kim, M.D.**, Chang-Ha Lee, M.D.***, Sun-Young Choi**, Cheul Lee, M.D.**, Sam-Sae Oh, M.D.***, Kwan-Chang Kim, M.D.****, Yong-Jin Kim, M.D.**

Background: It is currently thought that tissue valve degeneration is related to an animal's immune response, which is mainly due to cell surface α -Gal epitopes. Cell surface α -Gal epitopes are known to be degraded by the enzyme called green coffee bean α -galactosidase. It is also well known that α -Gal epitopes are immunologically stained by Griffonia Simplicifolia isoelectin type B4. We know that many commercially available tissue valves are made of aortic valves and pericardial tissue of pig. So, we investigated whether α -Gal epitopes of the aortic valve and pericardial tissue of a pig can be removed by green coffee bean α -galactosidase, and we did so by comparing immunologic staining of the tissues before and after the enzyme treatment. **Material and method:** After treating fresh porcine aortic valve and pericardial tissue with green coffee bean α -galactosidase at concentrations of 0.5 unit/mL, 1.0 unit/mL, 2.0 unit/mL, respectively, under the condition of pH 6.5, temperature 4°C and 24 hours of incubation, each sample was stained with Griffonia Simplicifolia isoelectin type B4 immunofluorescent labeling. We then examined whether the α -Gal epitopes were reduced or abolished in each consecutive concentration of green coffee bean α -galactosidase by comparing the degree of the Griffonia Simplicifolia isoelectin B4 staining in each sample. **Result:** In the pig aortic valve tissue, a 1.0 unit/mL concentration of green coffee bean α -galactosidase at pH 6.5, 4°C and reaction for 24 hours was enough for complete removal of α -Gal epitopes from the cell surface on the immunostaining with Griffonia Simplicifolia isoelectin B4. On the other hand, more α -Gal epitopes were present in the pig pericardial tissue on Griffonia Simplicifolia isoelectin B4 staining before the enzyme treatment, and 1.0 unit/mL of galactosidase was not sufficient for complete removal of α -Gal from the tissue. 2.0 units/mL of green coffee bean α -galactosidase was needed to completely remove the α -Gal epitopes from the pericardial tissue on immunostaining. **Conclusion:** The α -Gal epitopes of the pig's aortic valve and pericardial tissue were successfully stained with Griffonia Simplicifolia isoelectin B4. We could remove nearly all the α -Gal epitopes using green coffee bean α -galactosidase at the concentration of 1.0 unit/mL in the aortic valve of pig, and 2.0 unit/mL was need to nearly completely remove all the α -Gal epitopes in the pericardial tissue of pig under the condition of pH 6.5, 4°C and 24 hours of reaction time. In the near future, removal of α -Gal epitopes in the pig's aortic valve and pericardial tissue will become a powerful tool for the improvement of the tissue valve durability. It needs

*단국대학교 의과대학 단국대학교병원 흉부외과학교실

Department of Cardiothoracic Surgery, Dankook University Hospital, College of Medicine, Dankook University

**서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

***부천세종병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sejong General Hospital, Sejong Heart Institute

****이화여자대학교 의학전문대학원 목동병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular, Mokdong Hospital, Ewha University School of Medicine

†이 논문은 바이오이종장기개발사업단과, 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A040004).

논문접수일 : 2007년 10월 17일, 심사통과일 : 2007년 11월 10일

책임저자 : 김용진 (110-460) 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-5209, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

to be determined if α -galactosidase treated pig tissue is immune to human anti-Gal antibody or anti-Gal monoclonal antibodies.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:12-24)

Key words: 1. Immunology
2. Tissue transplantation

서 론

오랜 심장수술의 역사에서 돼지의 판막, 판막도관 및 심낭절편은 성인의 심장판막 질환과 소아의 각종 선천성 심기형의 수술적 치료에 다양한 형태로 적용되어왔다. 특히 다양한 종류의 조직판막은 수술 후 환자에게 영구적인 항응고요법이 필요 없고 혈액학적 특성이 우수하여 이상적인 인간판막의 대체제로 여겨진다. 그러나 일정 기간이 경과한 뒤 나타나는 구조적 손상으로 인한 내구성 문제는 조직판막을 보다 광범위하게 사용하는데 제한이 되고 있으며 이는 특히 유소년기의 환자에서 두드러진 문제점으로 알려져 있다[1]. 조직판막의 구조적 손상의 원인은 첫째, 반복되는 사용에서 오는 기계적 소모, 둘째, 조직판막을 고정하는데 사용된 글루탈알데히드(glutaraldehyde)가 유발하는 만성 염증 반응 및 조직판막과 환자의 면역학적 반응 등으로 인한 콜라겐 단백질의 손상과 이에 따른 칼슘 침착[2,3], 마지막으로 만성 염증 반응에 의한 조직 증식으로 초래되는 판누스 과도증식(pannus overgrowth) 등으로 설명되고 있는바 각각의 원인이 서로 영향을 미치면서 복합적으로 조직판막의 구조적 손상을 초래하게 된다고 생각하고 있다. 한편 최근에는 동물의 조직 세포 표면에 존재하는 대표적인 이종 항원(xenoantigen)인 알파-갈 항원결정인자(α -Gal epitope)가 글루탈알데히드로 고정(fixation)한 상업적으로 판매되는 조직판막에도 여전히 존재하며, 조직판막을 이식 받은 환자들에서 알파-갈 항원결정인자에 대한 자연항체(natural antibody)의 수치가 상승한다는 보고가 있어[4] 조직판막의 구조적 손상에 있어 면역반응, 특히 동물면역반응이 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지고 있다.

알파-갈 항원결정인자는 동물의 세포막 표면에 존재하는 당단백질(glycoprotein) 및 당지질(glycolipid)에 갈락토실(galactosyl)기가 결합한 Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc로 표현되는 탄수화물고리의 일종으로 영장류를 제외한 포유류

에서 발현되며 포유류의 알파-1,3 갈락토실트랜스퍼라아제(α -1,3 galactosyltransferase)에 의해 생성된다[5,6]. 이는 포유류의 종에 따라, 또한 같은 종 내에서도 개체에 따라 그 발현 빈도가 다르나 일반적으로 세포 한 개당 10^6 개에서 35×10^6 개 정도로 그 양이 많으며 영장류에게 강한 면역학적 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다[7]. 이러한 알파-갈 항원결정인자는 영장류에 본래부터 존재하는 자연항체인 항-갈(anti-Gal)과 반응하여 포유류의 장기가 영장류에 이식되었을 때 강한 면역반응을 유발하게 되는데 특히 포유류 혈관내피세포의 알파-갈 항원결정인자가 영장류의 혈액 내에 존재하는 항-갈과 반응하여 과급성거부반응(hyperacute rejection)을 일으키게 된다[8]. 그러나 포유류의 장기가 아닌 판막이나 심낭을 이용하는 데 있어서는 그 이종항원성(xenoantigenicity)을 제거하고 가능한 감염원을 없애며 조직을 강화하기 위하여 고정을 하게 되므로 장기 이식에 비하여 면역반응에 대한 우려가 상대적으로 덜했던 것이 사실이며 조직판막의 구조적 손상의 원인들 중에서도 면역반응은 주목을 덜 받아왔다. 하지만 위에서 기술하였듯이 최근 글루탈알데히드로 고정된, 상업적으로 판매되는 조직판막에서 동물 면역반응이 관찰됨에 따라 조직판막의 구조적 손상의 원인으로 동물 면역반응이 주목 받고 있는 실정이다.

한편 커피의 열매에서 추출한 식물성 효소인 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)는 배양된 돼지의 혈관내피 세포에서 알파-갈 항원결정인자를 직접 반응조건하에서 완전히 제거하는 것으로 보고되어 있고[9], 돼지의 관절 연골 및 관절초승달(articular meniscus)에 고농도로 적용하였을 때 알파-갈 항원결정인자를 완전히 제거한다고 되어있으며[10] 돼지의 서혜부정맥을 알파-갈락토시다아제로 처리하였을 때 30분 이내에 면역조직염색 검사상 알파-갈 항원결정인자가 발현되지 않았다고 한다[11]. 또한 포유류의 세포표면에 존재하는 탄수화물기의 일종

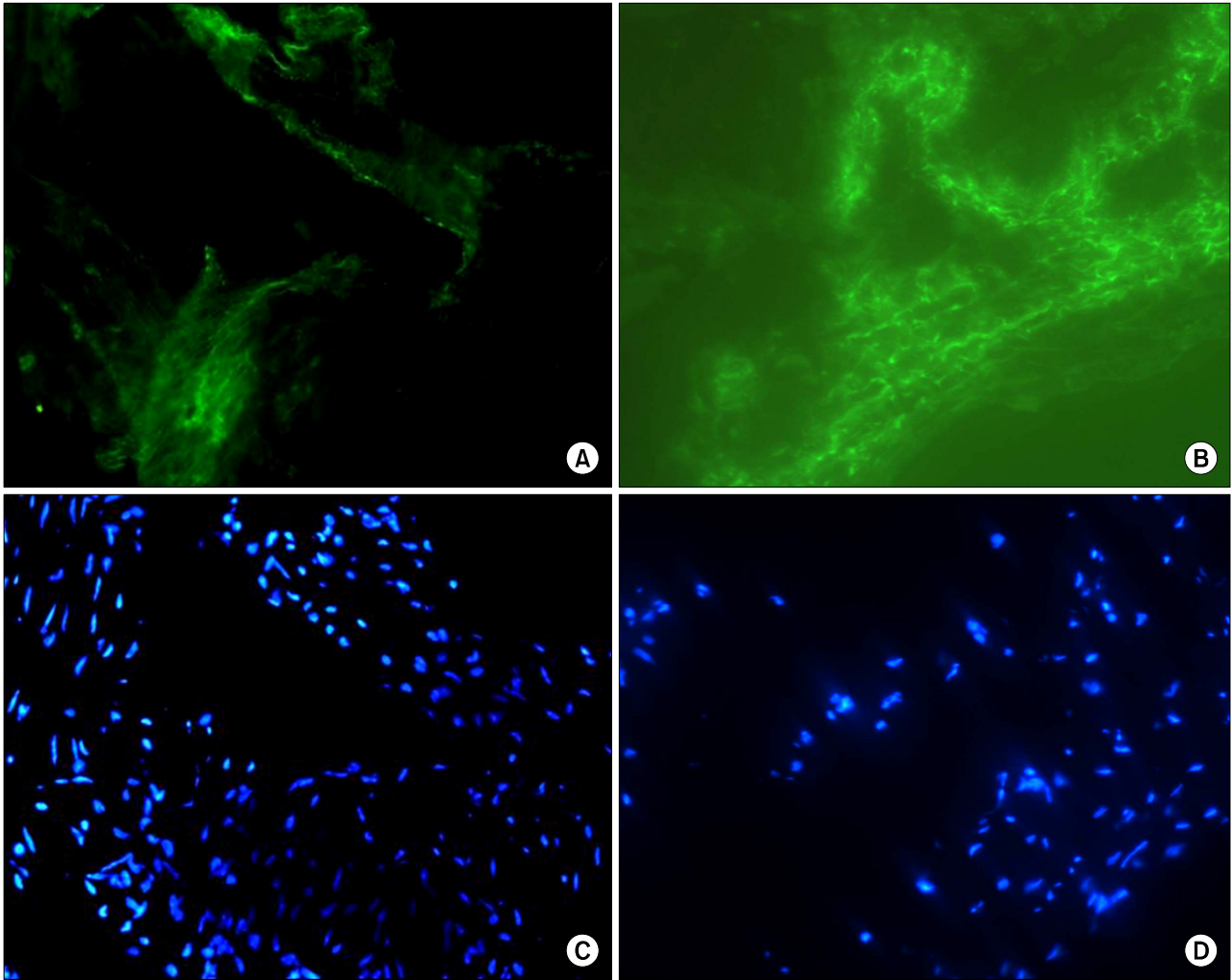


Fig. 1. GS-IB4 staining on pig aortic valve (A) and pericardium (B)/DAPI staining on the same tissues (C, D) before green coffee bean α -galactosidase treatment; $\times 200$ =more GS-IB4 staining on pig pericardium indicates more α -Gal on the pericardial tissue.

인 알파-갈 항원결정인자는 아프리카산 관목의 일종인 *Griffonia simplicifolia*에서 추출된, 탄수화물과 반응하는 당단백질인 렉틴(lectin) 중 갈락토실기와 선택적으로 반응하는 동종렉틴 B4 (isolectin B4)를 사용한 면역조직염색에 의해 염색이 된다고 알려져 있다[12-14]. 따라서 돼지의 조직을 다양한 농도의 알파-갈락토시다아제로 처리한 후 *Griffonia simplicifolia* I isolectin B4 (GS-IB4)를 사용한 면역조직형광염색법(fluorescein labelled immunohistostaining)으로 염색하면 동물 면역반응의 주원인인 알파-갈 항원결정인자를 알파-갈락토시다아제로 어떠한 조건에서 얼마만큼 효과적으로 없앨 수 있는지 알아볼 수 있을 것이며 이는 향후 돼지의 판막 및 심낭으로 만들어지는 조직판막에 대한 동물 면역학적 연구에 중요한 기초 자료

가 될 수 있을 것이다. 이에 본 연구팀은 조직판막의 재료로 가장 많이 사용되고 있는 돼지의 심장판막 및 심낭 절편을 다양한 농도의 알파-갈락토시다아제로 처리한 후 조직내의 알파-갈 항원결정인자를 GS-IB4로 면역조직형광염색하여 그 변화를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 알파-갈 항원결정인자 염색

도살장에서 돼지의 심장 및 심낭절편을 4°C 생리식염수에 담아 실험실로 가져온다. 이를 박리하여 돼지의 대동맥판막과 심낭절편을 얻고 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 여러 번 세척하여 준비한다. 실험

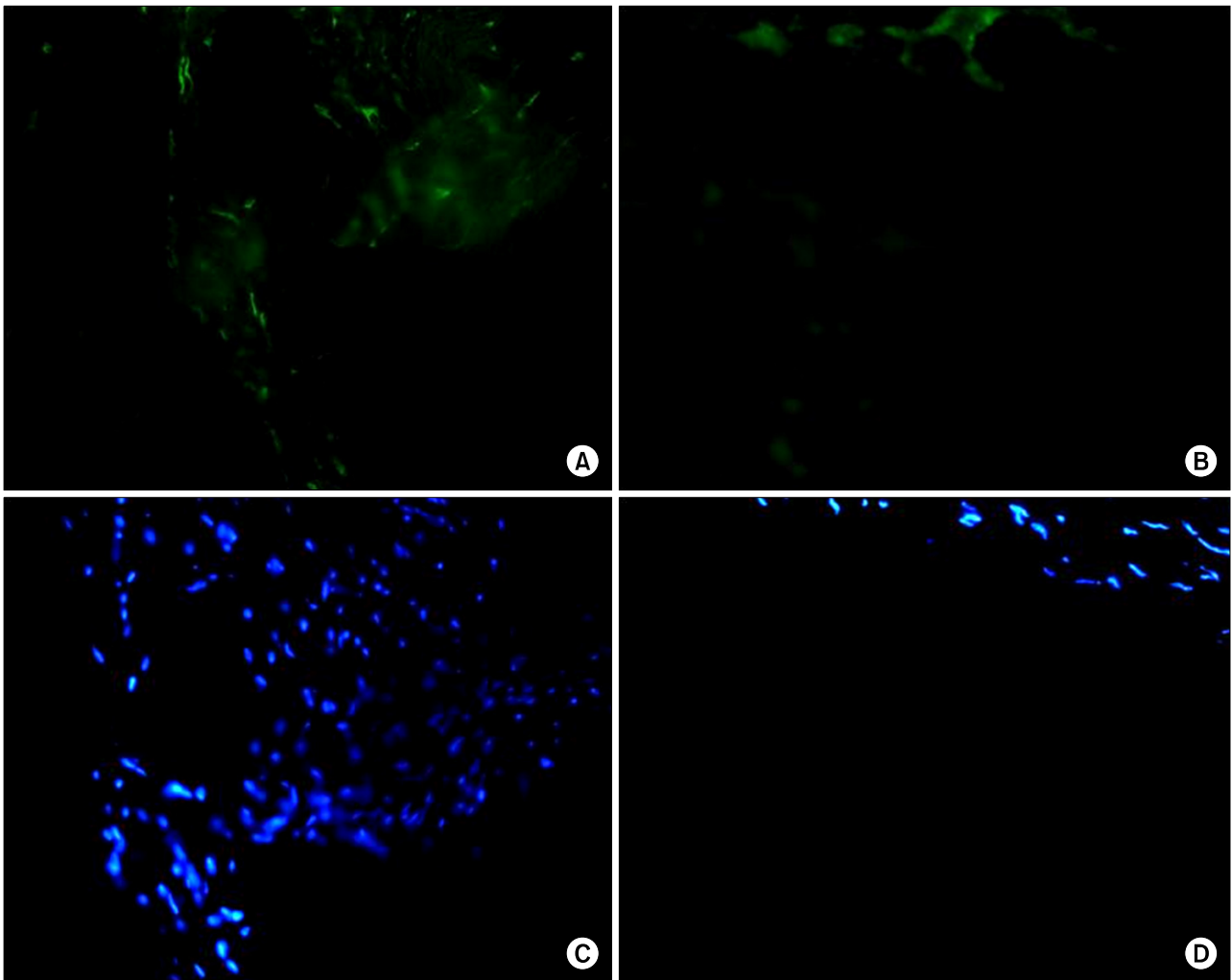


Fig. 2. Treatment with 0.5 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on aortic valve tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =considering DAPI staining, rare differences between pre and post enzyme treatment.

이 시작되면. 판막조직 및 심낭조직을 각각 5×5 mm 크기로 자른 뒤 PBS 완충액으로 5분씩 3회 세척하고 30% 설탕(sucrose) 용액에 가라앉을 때까지 담가둔다. 이후 조직을 꺼내서 동결절편하고 슬라이드에 얹은 뒤 차가운 아세톤에 10분간 담가 고정하고 이 슬라이드를 다시 PBS 완충액으로 5분씩 3회 세척한다. Griffonia simplicifolia I isolectin B4 (GS-IB4) (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 염화칼슘 완충액(calcium chloride buffer) 0.5 mL에 녹이고 이를 PBS 완충액에 1 : 500 희석하여 슬라이드에 0.2 mL 정도 떨어뜨린 후 이를 37°C에서 2시간 정도 배양/incubation)한 뒤 형광봉입제(fluorescence mounting medium)로 덮고 관찰하여 알파-갈 항원결정인자의 염색 정

도를 확인한다. 이때 형광염색 부위의 분포와 세포의 분포를 비교하기 위하여 세포핵 염색법인 DAPI 염색을 같은 슬라이드에서 동시에 실시한다.

2) 녹색 커피콩 알파-갈락토시다아제(green coffee bean α -galactosidase) 처리

먼저 80 mM의 칼륨인산염 완충액(potassium phosphate buffer)을 pH 6.5로 맞추어 준비하고 5×5 mm 크기로 자른 판막조직 및 심낭조직을 칼륨인산염 완충액에 5분씩 3회 세척하여 PBS 성분을 완전히 제거한다. 녹색커피콩 알파-갈락토시다아제(Sigma, St. Louis, MO)를 위에서 준비한 칼륨인산염 완충액에 첨가하여 0.5 unit/mL, 1.0

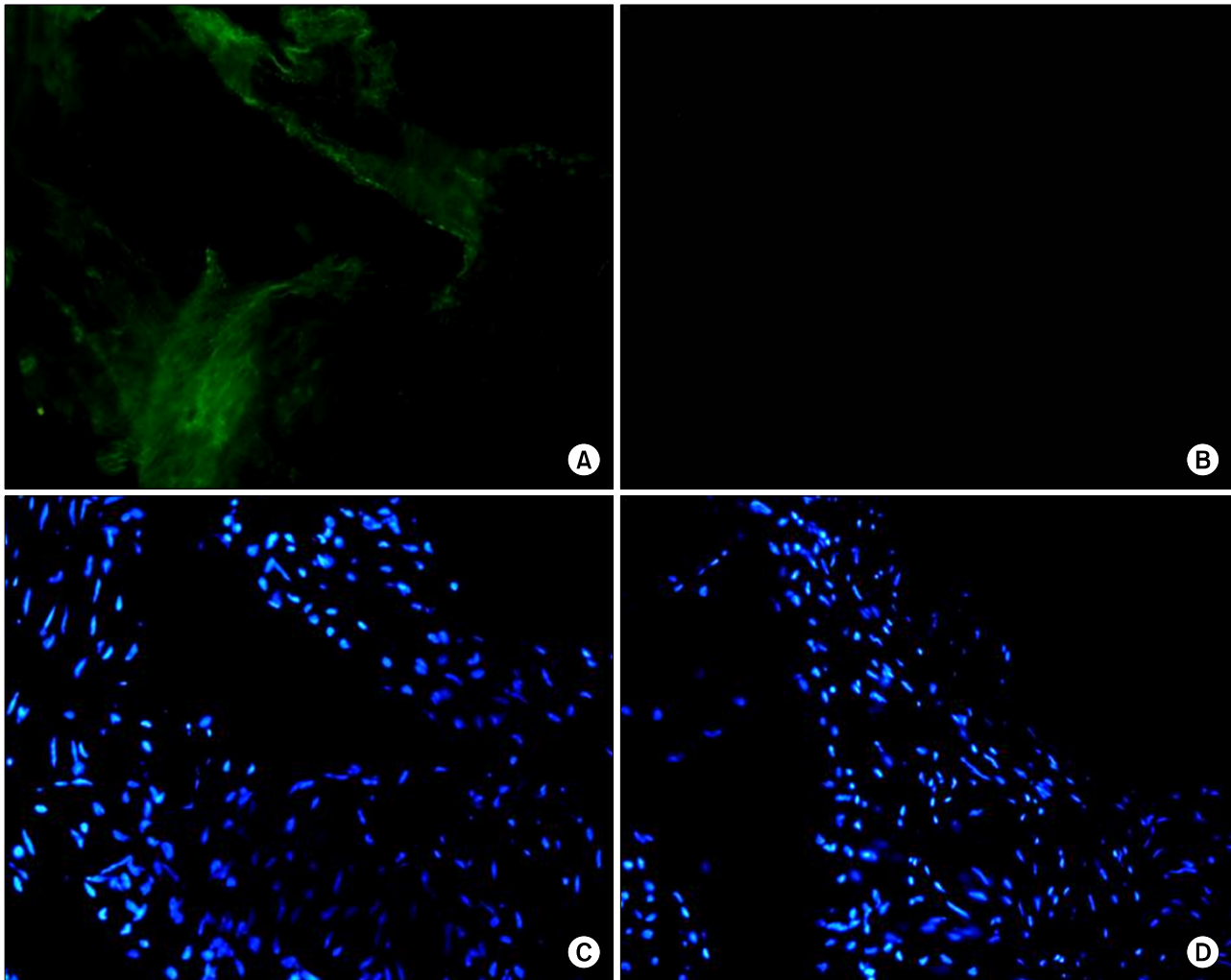


Fig. 3. Treatment with 1.0 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on aortic valve tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =after the enzyme treatment; nearly complete absence of GS-IB4 staining on many DAPI positive cells was noted; This indicates near complete eradication of α -Gal on the tissue.

unit/mL, 2.0 unit/mL의 농도로 준비하고 이에 세척한 대동맥 판막 조직 및 심낭 조직을 넣어 4°C에서 반응시킨다. 이때 반응시간은 24시간으로 한다. 반응이 끝나면 조직을 PBS 완충액으로 5분씩 3회 세척하고 30% 설탕 용액에 가라앉을 때까지 담가둔다. 이후 조직을 꺼내서 동결절편하고 슬라이드에 얹은 뒤 위에서 기술한 방법대로 GS-IB4를 이용한 형광염색과 DAPI를 이용한 세포핵염색을 비교하여 갈락토시다아제 처리 후 알파-갈 항원결정인자의 염색 정도 변화를 관찰한다.

결 과

돼지의 대동맥 판막 및 심낭 조직을 GS-IB4로 면역조직형광염색하여 녹색 커피콩 알파-갈락토시다아제 처리 전, 후 알파-갈 항원결정인자의 세포표면 분포를 보여주는 슬라이드를 얻을 수 있었으며 각각 0.5, 1.0, 2.0 unit/mL 농도의 갈락토시다아제를 이용하여 4°C에서 24시간 반응시켜 알파-갈 항원결정인자를 제거하였을 때 조직에 따라 다양한 항원결정인자의 제거 정도를 보였다.

1) 알파-갈 항원결정인자 염색

녹색 커피콩 알파-갈락토시다아제 처리 전 GS-IB4를

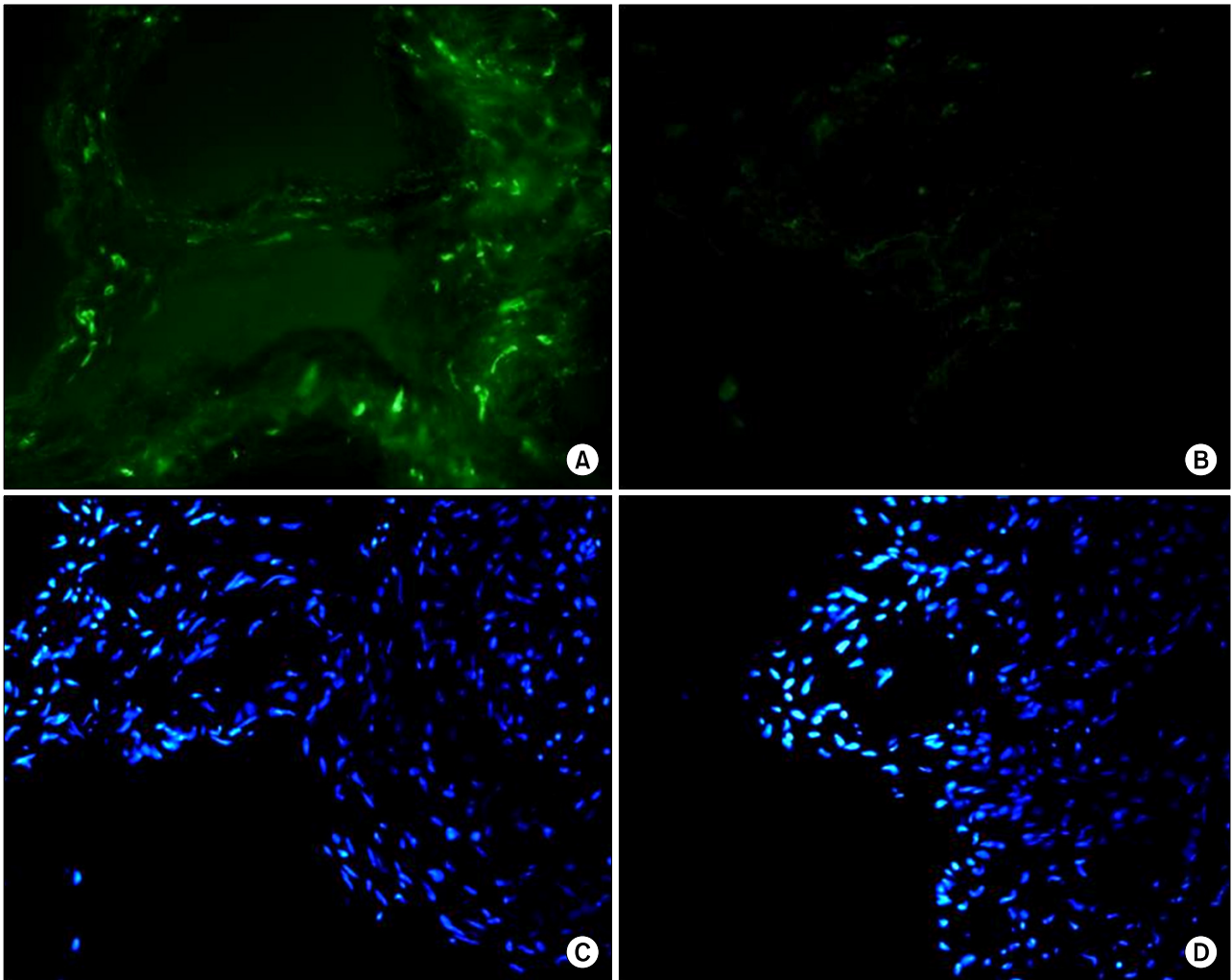


Fig. 4. Treatment with 2.0 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on aortic valve tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =same result with 1.0 unit/mL enzyme concentration indicates near complete eradication of α -Gal on the tissue with this concentration.

이용한 알파-갈 항원결정인자 염색에서, 세포핵에 대한 염색인 DAPI 염색에서의 세포 분포와 일치하는 분포를 보이는 형광염색을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1) 돼지의 대동맥 판막 조직에서보다 심낭 조직에서 더 많은 형광염색을 보여 알파-갈 항원결정인자가 돼지의 대동맥 판막 조직 보다 심낭 조직에 더 많이 분포한다는 것을 보여주고 있다.

2) 녹색 커피콩 알파-갈락토시다아제 처리

대동맥 판막 조직의 경우 녹색 커피콩 알파-갈락토시다아제 처리 후, 판막 조직에 대한 GS-IB4 염색에서 효소 농도에 따른 알파-갈 항원결정인자의 염색에 상당한

차이를 보였는데 0.5 unit/mL의 농도에서는 거의 변화를 보이지 않다가(Fig. 2) 효소의 농도를 1.0 unit/mL로 증가시켰을 때 GS-IB4 염색이 거의 되지 않는 모습을 보였으며(Fig. 3) 농도를 2.0 unit/mL로 증가시켰을 때 그 차이는 1.0 unit/mL이었을 때와 비교하여 경미하였다(Fig. 4). 따라서 대동맥 판막 조직에서는 1.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제로 4°C에서 24시간 반응시켰을 때 면역형광염색에서 염색되지 않을 만큼 알파-갈 항원결정인자가 제거되는 양상을 보였으며 이는 효소의 농도를 더 증가시켜도 비슷한 양상을 보여 돼지의 대동맥 판막 조직의 경우, 1.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제가 세포 표면의 알파-갈 항원결정인자를

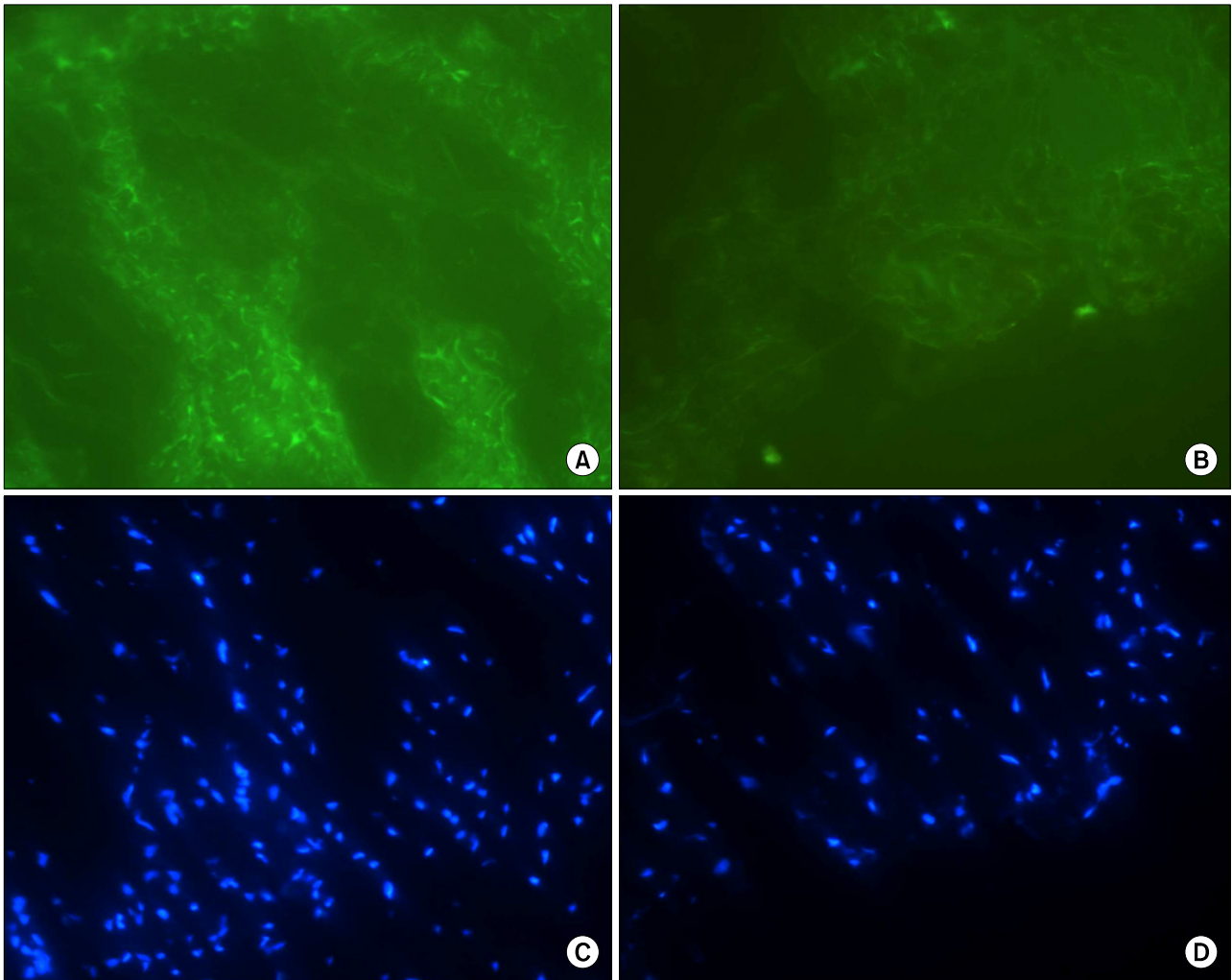


Fig. 5. Treatment with 0.5 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on pig pericardial tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =rare differences between pre and post enzyme treatment in this concentration.

제거하는데 적합하다 하겠다. 한편 돼지의 심낭 조직의 경우 효소 처리 전 GS-IB4 염색에서도 돼지의 대동맥 판막조직에서 보다 많은 양의 알파-갈 항원결정인자를 보였으며 0.5 unit/mL의 농도에서는 물론(Fig. 5) 대동맥 판막조직에서 알파-갈 항원결정인자를 모두 제거할 수 있었던 1.0 unit/mL의 농도에서 효소 처리 후에도 아직 많은 양의 GS-IB4 형광염색을 보였고(Fig. 6) 효소의 농도를 2.0 unit/mL로 올렸을 때 비로소 형광염색에 검출되지 않을 정도의 알파-갈 항원결정인자의 제거가 가능하였다(Fig. 7). 따라서 심낭 조직의 경우에는 대동맥 판막에서의 경우와 달리 완벽한 알파-갈 항원결정인자의 제거를 위하여 보다 고농도의 알파-갈락토시다아제가 필요

하다 하겠다.

고 찰

최근 평균수명이 증가하고 승모판막 질환에 대한 성형 수술이 일반화 되면서 성인 심장판막 질환 수술 중 판막 치환술의 대부분이 대동맥 판막 치환술인 형편이며 선진국에서는 70세 이상의 대동맥 판막 치환 수술 중 조직 판막을 사용하는 경우가 70%에 이르고 있다[15,16]. 따라서 조직판막의 내구성을 증대시키는 일은 심장판막 수술 분야에 있어 매우 시급하며, 기계판막에 비해 혈액학적 우수성 및 항응고요법이 필요치 않다는 장점을 가짐

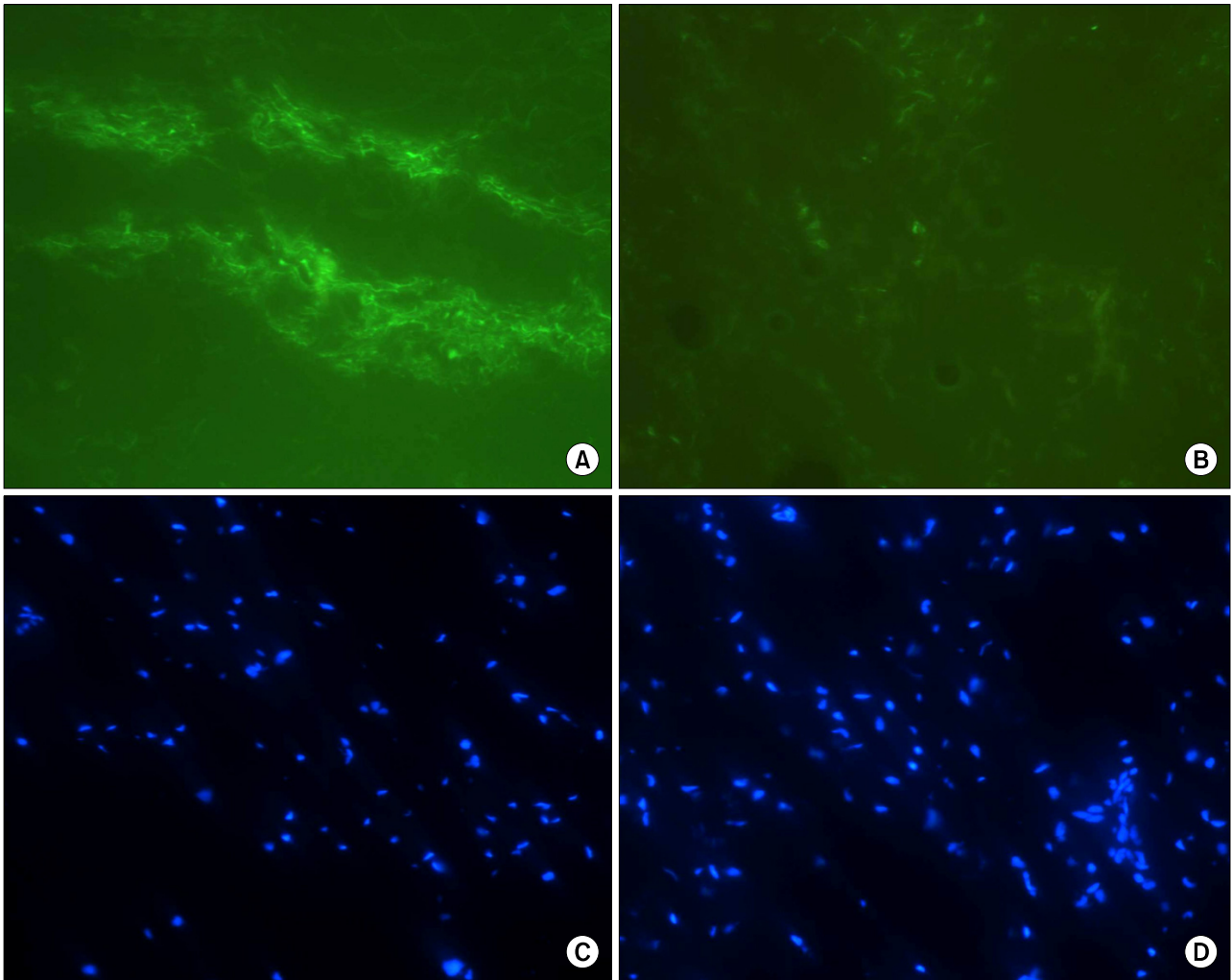


Fig. 6. Treatment with 1.0 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on pig pericardial tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =after the enzyme treatment; some reduction in GS-IB4 staining was noted but never complete clearing as in pig aortic valve tissue.

에도 불구하고 제한된 내구성으로 인하여 사용에 제한을 받는 조직판막의 사용을 증진시킬 수 있다는 면에서 중요한 과제이다. 조직판막의 내구성을 증대시키는 방법에는 여러 가지가 있을 수 있으나 최근 동물의 장기이식에서 과급성거부반응을 일으키는 알파-갈 항원결정인자가 동물의 판막조직이나 심낭을 이용한 조직판막에도 존재하며, 환자의 항-갈 항체가 조직판막 안에 존재하는 알파-갈 항원결정인자와 반응하여 면역 반응을 일으키고 결국 판막의 석회화 및 이에 따른 파괴에 일정부분 역할을 할 것이라는 가설이 설득력을 얻고 있으며 따라서 조직판막 내의 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 것이 판막의 내구성 증대에 기여할 것이라고 생각한다[4]. 조직

판막을 만드는데 많이 사용되는 돼지의 세포 표면에 광범위하게 존재하는 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 방법에는 먼저 알파-갈락토시다아제라는 효소를 이용하여 세포의 표면에 존재하는 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 방법[9-11]이 있고 돼지의 체내에서 알파-갈 항원결정인자를 만드는 알파-1,3 갈락토실트랜스퍼라아제를 발현시키는 유전자를 동물 복제기법을 이용하여 제거하는 방법(α -Gal knockout pig)이 있는데[17,18], 알파-갈 녹아웃 돼지(α -Gal knockout pig)를 사용하면 돼지의 조직뿐 아니라 장기도 과급성거부반응의 걱정 없이 환자에게 이식할 수 있으나 아직 경제적 효용성이 없는 상태이다. 반면 효소를 이용하여 알파-갈 항원결정인자를 제거하는

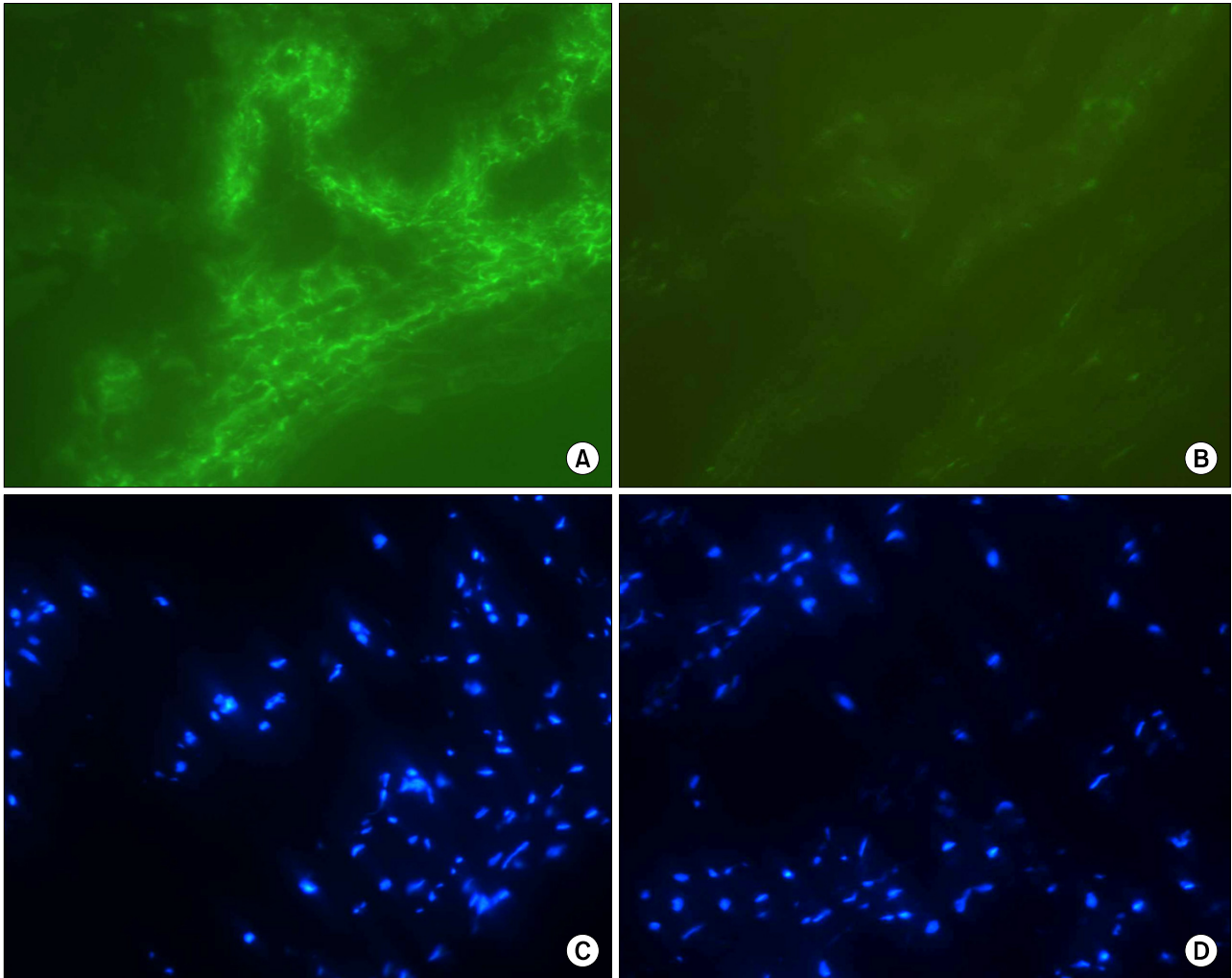


Fig. 7. Treatment with 2.0 unit/mL green coffee bean α -galactosidase on pig pericardial tissue (A, C=before enzyme treatment; B, D=after enzyme treatment); GS-IB4 staining (A, B); DAPI staining (C, D); $\times 200$ =after the enzyme treatment with this concentration, nearly complete absence of GS-IB4 staining on many DAPI positive cells was noted; This indicates near complete eradication of α -Gal on the tissue.

방법은 쉽고 가격이 저렴한 장점이 있으나 살아있는 조직 내에서는 일정 시간이 지나면 알파-갈 항원결정인자가 다시 발현된다[11]는 단점이 있다. 따라서 살아있는 장기가 아닌 고정된 심장판막 조직이나 심낭을 이용하고자 하였을 때에는 효소를 이용하여 동물세포에서 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 방법이 유용할 것이다. 알파-갈락토시다아제는 식물에서 추출한 효소로서 알파-갈 항원결정인자(Gal $\alpha 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc)의 Gal $\alpha 1-3$ Gal 사슬을 끊음으로써 그 이중항원성을 제거한다[9-11]. 본 실험에서는 돼지의 심낭과 대동맥 판막을 5×5 mm로 잘라서 효소처리를 하였는데 처리조건을 4°C, pH 6.5로 하였을 때 효소의 농도 및 반응시간에 따라 면역조직형광

염색 검사상 알파-갈 항원결정인자의 감소 정도가 다르게 나타났다. LaVecchio 등에 따르면 돼지의 대동맥 혈관내피세포를 배양하여 0.5 unit/mL/10⁶cells 농도의 알파-갈락토시다아제로 37°C, pH 6.0 상태에서 2시간 처리를 하였을 때 FITC (fluorescein isothiocyanate) 표지된 GS-IB4 (FITC labelled GS-IB4)를 사용한 흐름세포측정(flow cytometry) 정량분석에서 알파-갈 항원결정인자가 완전히 제거되었다고 한다. 그리고 효소처리로 알파-갈이 제거된 세포에 인간 혈장을 반응시키면 종특이성(species specific) 이차항체인 항-인간 면역글로불린 M (anti-human IgM)과 항-인간 면역글로불린 G (anti-human IgG)에 FITC를 결합시켜 시행한 흐름세포측정 정량분석에서 인간의

자연항체인 항-갈 면역글로불린 M (anti-Gal IgM)과 항-갈 면역글로불린 G (anti-Gal IgG)가 효소처리 이전에 비하여 각각 71%, 59% 감소되어 발현된다고 하였다[9]. 또한 Luo 등의 돼지의 서혜부 정맥을 사용한 실험에서는 2.5 cm 길이와 0.5 cm 지름을 가진 서혜부 정맥 내에 20 unit/mL 농도의 알파-갈락토시다아제를 4°C, pH 6.5 상태에서 반응시켰을 때 30분이 지나면 GS-IB4를 이용하여 시행한 면역조직염색 검사상 알파-갈 항원결정인자가 염색되지 않았으며 동일한 조건에서 두 시간이 경과하면 전자현미경 검사상 혈관내피세포의 파괴가 시작된다고 하였다[11]. 돼지의 대동맥 판막 및 심낭조직을 사용한 본 실험에서도 대동맥 판막의 경우 1.0 unit/mL, 심낭 조직의 경우 2.0 unit/mL 농도 이상의 알파-갈락토시다아제를 이용하여 pH 6.5, 4°C 상태에서 반응시켰을 때 24시간이 지나면 거의 완전히 염색이 되지 않는 것을 발견할 수 있었다. 이는 원래 심낭조직 표면에 존재하는 알파-갈 항원결정인자가 대동맥 판막 조직에서 보다 많고, 심낭 조직 자체가 대동맥 판막 조직에 비하여 두꺼운 관계로 효소의 침투가 상대적으로 용이하지 않은데 기인한 것으로 생각하며 향후 알파-갈락토시다아제를 처리하여 알파-갈 항원결정인자를 제거하여 만드는 조직판막의 제조과정에서 고려되어야 할 사실이라 하겠다.

단, 본 실험은 면역조직형광염색을 사용하여 알파-갈 항원결정인자의 염색 정도만을 관찰한 것이므로 정량분석이라고 보기 어려우며 따라서 본 실험에서 사용한 알파-갈락토시다아제의 반응조건으로 완벽하게 알파-갈 항원결정인자를 제거하였다고 보기는 어렵다. 또한 조직에 대한 직접적인 면역조직염색이 세포 표면의 모든 알파-갈 항원결정인자를 완벽하게 나타내 주지도 못한다. 실제로 Chen 등의 연구에 따르면 돼지의 대동맥 판막조직에 대하여 직접 GS-IB4로 면역조직염색을 시행하였을 때에는 판막내피세포(valvular endothelial cell; VEC)에서 알파-갈 항원결정인자가 발현되지 않았으나[19], 판막내피세포를 배양하여 역전사효소중합연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 검사를 통한 전령알엔에이(messenger RNA) 검사를 시행하였을 때에는 대동맥 내피세포에서와 동일한 분량의 알파-1,3 갈락토실트랜스퍼라아제 유전자가 발현된다고 하였다[20]. 또한 대동맥 내피세포와 대동맥판막 내피세포에서의 알파-갈 항원결정인자의 발현을 조직 내에서의 GS-IB4를 이용한 면역조직염색이 아닌 각각의 세포를 배양하여 FITC 표지된 GS-IB4를 이용한 흐름세포측정 정량분석을 시행하여 비

교하였을 때에는 대동맥 내피세포나 대동맥 판막 내피세포 모두에서 동일한 분량의 알파-갈 항원결정인자를 검출할 수 있었다고 하였다[20]. 즉 조직에 직접 면역조직염색을 시행하였을 때에는 염색되지 않았던 대동맥 판막내피세포 표면의 알파-갈 항원결정인자가 유전자 발현 검사나 흐름세포측정 정량분석에서는 대동맥 내피세포에서와 동일한 양으로 세포표면에 존재한다는 것이다. 이는 조직에 직접 면역화학염색을 할 때 면역반응 후 조직체과정을 거치게 되는데 이때 알파-갈 항원결정인자와 결합한 GS-IB4 중 여러 가지 이유로 느슨하게 결합된 GS-IB4 렉틴이 대부분 유실되어 면역염색이 되지 않기 때문이며 따라서 조직 내에서 직접 GS-IB4를 이용하여 면역조직염색을 시행하면 검사의 민감도(sensitivity)가 현저히 감소한다는 것을 의미한다[20]. 또한 이 결과는 Konakci 등[4]의 보고에서 상업적으로 구입 가능한 조직판막에서 시행한 GS-IB4 면역조직염색 및 내피세포, 기질세포에 대한 선별염색 결과 판막기질세포(valve matrix cell)인 섬유모세포(fibroblast)에서만 다량의 알파-갈 항원결정인자가 발현되며 판막내피세포에서는 알파-갈 항원결정인자를 발견할 수 없었는데도 이를 이식한 환자에게서는 수술 후 10일만에 항-갈 면역글로불린 M 항체의 증가가 나타난 것을 설명할 수 있게 한다. 즉 판막내피세포에서 알파-갈 항원결정인자가 염색되지 않았는데도 이식 후 단시일 내에 항-갈 항체가 발현된다는 것은 판막내피세포의 GS-IB4를 이용한 면역조직염색 결과상 알파-갈 항원결정인자가 발현되지 않았다고 해서 실제로 판막내피세포에 알파-갈 항원결정인자가 전혀 존재하지 않는다고 할 수는 없다는 것이다. 본 실험에서는 내피세포에 대한 선별염색을 하지 않은 상태에서 알파-갈 항원결정인자에 대한 면역형광염색을 시행하였기 때문에 대동맥 판막내피세포에서의 알파-갈 항원결정인자와 판막기질세포에서의 알파-갈 항원결정인자가 서로 명확하게 구분되어 염색되지는 않았다. 또한 알파-갈락토시다아제 처리 후 면역형광염색의 정도가 현저히 줄어들기는 하였으나 위에서 기술한 대로 조직에 대한 직접적인 면역염색의 감소량과 비례하여 알파-갈 항원결정인자가 감소하였다고 말하기는 어렵다.

대표적 동물 항원인 알파-갈 항원결정인자를 검출하는 방법은 현재까지 Gal α 1-3Gal에 특이적인 결합을 보이는 Griffonia simplicifolia의 씨앗에서 추출한 type I 렉틴 중 동종렉틴 B4 (GS-IB4)를 사용하는 방법이 대표적이며 [12-14] 그밖에 Galili 등이 개발한, 알파-갈 녹아웃 생쥐

(α -Gal knockout mice)와 토끼의 적혈구 세포막의 알파-갈 항원결정인자를 반응시켜 만든 단클론항체(monoclonal antibody)인 M86을 이용하는 방법[21] 그리고 인간의 항-갈 면역글로불린 M, 항-갈 면역글로불린 G에 대한 종특 이성 이차항체인 항-인간 면역글로불린 M, 항-인간 면역글로불린 G 등에 FITC 등을 결합시켜 FACS (fluorescence activated cell sorter) 분석을 통해 검출하는 방법[9] 등이 있다. 그런데 알파-갈 항원결정인자가 풍부한 신당단백질(neoglycoprotein)과 생쥐의 라미닌(laminin)을 GS-IB4, 단클론항체 M86, 인간의 혈장에 존재하는 자연항체 등과 반응시킨 Kirkeby 등의 연구[22]에 따르면 각각의 반응을 효소면역측정법(ELISA)을 사용하여 분석한 결과 GS-IB4 렉틴의 결합부위가 단클론항체 M86 및 인간의 항-갈 자연항체의 결합부위와 서로 다르며, 신당단백질 및 생쥐의 라미닌의 알파-갈 항원결정인자를 알파-갈락토시다아제를 사용하여 제거한 후 렉틴 및 항-갈 항체와 반응시켰을 때 항-갈 항체 반응의 감소가 렉틴 반응의 감소보다 더 현저하다고 하였다. 이는 결국 알파-갈락토시다아제 처리를 한 후 조직에 대한 직접적인 면역조직 염색에 비하여 그 민감도가 우수한 효소면역측정법을 사용한 GS-IB4반응에서 알파-갈 항원결정인자가 발현되지 않았다고 해도 여전히 인간의 자연항체와 반응할 수 있는 알파-갈 항원결정인자가 남아 있다는 것을 의미한다. 또한 이 결과는 LaVecchio 등의 연구[9]에서 GS-IB4를 이용한 흐름세포측정 정량분석에서 발견되지 않았던 알파-갈 항원결정인자가 상당한 양의 항-갈 면역글로불린 M, 항-갈 면역글로불린 G를 발현시켰던 결과와 일치하는 것이며 본 실험에서 돼지의 심장판막 및 심낭 조직에 대한 알파-갈락토시다아제 처리 후 GS-IB4 면역형광 염색으로 확인한 알파-갈 항원결정인자 발현의 감소가 돼지의 해당 조직을 인간에게 이식하였을 때 이에 상응하는 정도의 자연항체 발현 억제력을 보장하지는 않는다는 것을 의미하는 것이다. 따라서 동물의 세포 표면에서 알파-갈 항원결정인자를 제거하여 동물면역반응을 완벽하게 억제하고자 한다면 알파-갈 항원결정인자에 특이적으로 반응한다고 알려져 있는 GS-IB4 반응뿐 아니라 항-갈 단일클론항체나 인간의 항-갈 자연항체에서의 반응도 확인하여 세포 표면의 모든 알파-갈 항원결정인자를 제거하였다는 것을 증명하여야 할 것이다. 그러나 포괄적으로 볼 때 알파-갈락토시다아제 처리 조직에 대한 항-갈 자연항체의 전체 양의 감소는 분명 예측할 수 있는 것이므로 동물면역반응이 완전히 제거되지는 않았다고

할지라도 여전히 효소 처리 후 이식된 돼지의 판막 및 심낭 조직의 이종면역 반응 감소나 지연에 따른 장기적인 내구성 증가는 가능할 것이라고 생각한다. 이를 증명하기 위하여 향후 신선한 돼지의 판막조직 및 심낭 조직을 본 실험에서 찾아낸 알파-갈락토시다아제의 적정 반응조건으로 처리 후 이를 글루탈알데히드로 고정된 뒤에 인간혈장의 항-갈 항체를 반응시켜 항체 반응의 정도를 관찰하고, 상업적으로 판매되는 글루탈알데히드로 고정된 돼지의 조직판막을 인간혈장의 항-갈 항체와 반응시켜 이의 반응을 서로 비교하면 알파-갈락토시다아제로 처리한 돼지의 조직으로 만드는 조직판막의 동물면역 반응 감소 여부를 보다 직접적으로 알 수 있게 될 것이며 이는 알파-갈락토시다아제로 처리한 판막의 장기적 내구성 증가를 간접적으로나마 증명할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.

결 론

본 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 돼지의 대동맥 판막 조직과 심낭 조직의 알파-갈 항원결정인자는 Griffonia simplicifolia 의 type I 렉틴 중 동종렉틴 B4를 사용한 면역조직형광염색에서 잘 염색되었으며 이를 알파-갈락토시다아제를 사용하여 제거하였을 때 GS-IB4 동종렉틴의 염색 정도가 현저히 감소하였다.
- 2) 돼지의 대동맥 판막 조직과 심낭 조직에 각각 1.0 unit/mL, 2.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제를 4°C, pH 6.5의 조건에서 24시간 반응시켰을 때 동물면역 반응을 일으키는 대표적인 동물항원인 알파-갈 항원결정인자를 효과적으로 상당량 제거할 수 있었다.
- 3) 향후 돼지의 판막조직 및 심낭조직으로 만드는 조직판막의 내구성 증대에 대표적인 동물면역항원인 알파-갈 항원결정인자의 제거가 유용한 도구가 될 수 있을 것이며 이를 위한 앞으로의 실험에 본 실험의 결과가 기초자료로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.
- 4) 앞으로 알파-갈락토시다아제로 처리한 돼지의 조직판막에 대한 인간혈장의 항-갈 항체 및 항-갈 단클론항체를 이용한 직접적인 면역학적 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Jamieson WRE, Rosado LJ, Munro AI, et al. Carpentier? Edwards standard porcine bioprosthesis: primary tissue

- failure (structural valve deterioration) by age groups. *Ann Thorac Surg* 1988;46:155-62.
2. David TE, Ivanov J. Is degenerative calcification of the native aortic valve similar to calcification of bioprosthetic heart valves? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:939-41.
 3. Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg* 2001;71:S385-8 [suppl].
 4. Konakci K, Bohle B, Blumer R, et al. α -Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest* 2005;35:17-23.
 5. Galili U, Clark MR, Shohet S, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal (α 1-3) Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1369-73.
 6. Galili U, Shohet S, Kobrin E, Stults CLM, Macher BA. Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988;263:17755-62.
 7. Galili U, Andrews P. Suppression of α -galactosyl epitopes synthesis and production of the natural anti-Gal antibody: a major evolutionary event in ancestral old world primates. *J hum Evol* 1995;29:433-42.
 8. Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DKC. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ transplantation. *Transplantation* 1993;56:1433-42.
 9. LaVecchio JA, Dunne AD, Edge ASB. Enzymatic removal of alphagalactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. *Transplantation* 1995;60:841-7.
 10. Stone KR, Ayala G, Goldstein J, Hurst R, Walgenbach A, Galili U. Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey: III Transplantation of α -galactosidase treated porcine cartilage. *Transplantation* 1998;65:1577-83.
 11. Luo Y, Wen J, Luo C, Cummings RD, Cooper DKC. Pig xenogeneic antigen modification with green coffee bean α -galactosidase. *Xenotransplantation* 1999;6:238-48.
 12. Goldstein IJ, Blake DA, Ebisu S, Williams TJ, Murphy LA. Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* 1 isolectins. Lectins which are mono-, di-, tri-, and tetravalent for N-acetyl-D-galactosamine. *J Biol Chem* 1981;266:3890-3.
 13. Goldstein IJ, Winter HG. The *Griffonia simplicifolia* 1-B4 isolectin. A probe for α -D-Galactosyl end groups. *Subcell Biochem* 1999;32:127-41.
 14. Kirkeby S, Moe D. Binding of *Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B4 (GSI B4) to α -galactose antigens. *Immunol Cell Biol* 2001;79:121-7.
 15. Treasure T. Rethink on biological aortic valves for the elderly. *Lancet* 1999;354:964-5.
 16. The United Kingdom Heart Valve Registry Report 1997. London: UK Heart valve registry, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, 1999.
 17. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al. Production of (alpha) 1,3-galactosyltransferase deficient pigs. *Science* 2003;299:411-4.
 18. Dai Y, Vaught TD, Boone J, et al. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnol* 2002;20:251-5.
 19. Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Adams DH. Fresh porcine cardiac valves are not rejected in primates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:1216-20.
 20. Farivar RS, Filsoufi F, Adams DH. Mechanism of Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -Gal) expression on porcine valve endothelial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:306-14.
 21. Galili U, Latemple DC, Radic MZ. A sensitive assay for measuring α -Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. *Transplantation* 1998;65:1129-32.
 22. Kirkeby S, Andre S, Gabius HJ. Solid phase measurements of antibody and lectin binding to xenogenic carbohydrate antigens. *Clin Biochem* 2004;37:36-41.

=국문 초록=

배경: 최근 조직판막의 구조적 손상에 있어서 동물면역 반응이 중요한 역할을 할 가능성이 제기되면서 동물의 대표적 이중항원 물질인 알파-갈 항원결정인자에 대한 환자의 면역반응에 관한 관심이 높아지고 있다. 또한 알파-갈은 세포 표면에 존재하며 이는 녹색콩 알파-갈락토시다아제 라는 효소를 이용하여 제거할 수 있다고 알려져 있고 조직 표면의 알파-갈 항원결정인자는 Griffonia Simplicifolia의 동종렉틴 중 B4 타입에 선택적으로 결합하여 이를 이용해서 염색할 수 있다고 알려져 있다. 이에 본 연구팀은 조직판막을 만드는데 많이 사용되는 돼지의 대동맥 판막 및 심낭 조직을 가지고 녹색콩 알파-갈락토시다아제를 이용하여 이들 조직의 알파-갈 항원결정인자를 제거할 수 있는지 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 신선한 돼지의 대동맥 판막 및 심낭 조직을 0.5 unit/mL, 1.0 unit/mL, 2.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제로 pH 6.5, 4°C에서 24시간 처리한 뒤 이를 Griffonia Simplicifolia 동종렉틴 B4 타입을 이용한 면역조직형광염색으로 염색하여, 각각의 농도에서 효소 반응 후 해당 조직의 알파-갈 항원결정인자가 얼마나 제거되는지를 형광염색의 정도로 판단하였다. **결과:** 돼지의 대동맥 판막 조직의 경우 1.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제를 pH 6.5, 4°C에서 24시간 처리하였을 때 형광염색이 거의 되지 않을 정도로 알파-갈 항원결정인자가 제거되었고 이는 효소의 농도를 2.0 unit/mL로 증가시켰을 때에도 비슷한 양상을 보였다. 돼지의 심낭 조직의 경우 효소 처리 전의 알파-갈 염색에서도 대동맥 판막조직에 비하여 많은 양의 형광염색을 보였으며 효소 처리의 농도도 대동맥 판막의 경우보다 높은 2.0 unit/mL의 농도에서 알파-갈 항원결정인자가 제거되는 양상을 보였다. **결론:** 돼지의 대동맥 판막 조직과 심낭 조직의 알파-갈 항원결정인자는 Griffonia simplicifolia의 동종렉틴 B4를 사용한 면역조직형광염색에서 잘 염색되었으며 이를 알파-갈락토시다아제를 사용하여 제거하였을 때 각각 1.0 unit/mL, 2.0 unit/mL 농도의 녹색콩 알파-갈락토시다아제를 4°C, pH 6.5의 조건에서 24시간 반응시켰을 때 효과적으로 상당량 제거할 수 있었다. 향후 돼지의 판막조직 및 심낭조직으로 만드는 조직판막의 내구성 증대에 대표적인 동물 면역항원인 알파-갈 항원결정인자의 제거가 유용한 도구가 될 수 있을 것이며 앞으로 알파-갈락토시다아제로 처리한 돼지의 조직판막에 대한 인간혈장의 항-갈 항체 및 항-갈 단클론항체를 이용한 직접적인 면역학적 연구가 필요하다.

중심 단어 : 1. 면역학
2. 조직이식