

Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에서 췌도의 문정맥내 동계 이식*

계명대학교 의과대학 내과학교실, 일반외과학교실**

박근용 · 여준기 · 이인규 · 강구정** · 조원현**

서 론

1965년 Moskalewski가 collagenase소화법¹⁾으로 설치류에서 성공적인 췌도분리를 보고한 이래 췌도 분리에 대한 많은 기술들이 발표되었으며 최근들어 당뇨병환자에서 근본적인 치료방법으로 췌도이식이 활발히 연구되고 있다. 실험적으로 많이 이용되는 이식부위로는 문정맥을 통한 간내 이식²⁾, 비장내 이식³⁾, 신장피막하 이식⁴⁾ 등을 들 수 있으며, 또한 면역학적 거부반응에 대해 안전한 곳으로 알려진 뇌 또는 뇌실내 이식⁵⁾, 고환내 이식⁶⁾, 앙구전방내 이식⁷⁾ 등이 연구중에 있다. 특히 문정맥을 통한 간내 이식은 이식췌도의 혈액공급이 원활하고, 적은 췌도수로 췌도이식에 성공할 수 있으며, 수술기법이 쉬운 장점 등을 들 수 있다²⁾.

이에 저자들은 향후 인체에 췌도이식의 첫단계 연구로서 흰쥐를 대상으로 췌도분리기술의 습득 및 췌도이식의 경험을 축적하고자 분리된 췌도를 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 흰쥐의 문정맥내에 이식하여 이식췌도의 내분비 기능 및 생착여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

저자들의 실험에 이용된 동물은 Wistar계 흰쥐 수컷으로 체중 300~400gm의 쥐를 췌장공여군으로 사용하였고, 췌도 수여군은 체중 150~240gm의 흰쥐를 사용하였다. 실험기간동안 일정한 사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였다.

2. 당뇨병 유발

췌도 수여군의 당뇨병 유발은 Streptozotocin(Sigma)을 체중 1kg당 600mg을 복강내 주사하였고, 6일후 비공복상태에서 미부정맥에서 혈액을 채취한 후 One touch II (Johnson & Johnson사)를 이용하여 혈당을 측정하였고, 혈당차가 300mg/dl 이상인 경우만을 실험대상으로 하였다.

3. 췌도분리

췌도분리는 Lacy와 Kostianovsky(1967) 방법⁴⁾을 변형하여 사용하였다. 췌도분리방법을 간단히 요약하면 실험전날 금식시킨후 0.2ml sodium amyalt를 복강내 주사하고 ether pad로 마취시킨후 개복하였다. Ampular of Vater부위에서 총수담관을 clamping시킨후 28G 주사침을 삽입후 Hank's balanced salt solution(HBSS) 20ml를 주입하여 췌장을 부풀게 한다음 비장쪽으로부터 췌장을 분리하여 50ml tube에 담고 2ml collagenase 용액을 혼합하여 얼음 속에 넣어두었다. 다른 3마리 쥐의 췌도도 같은 방법으로 분리하여, 37°C 항온수조에 20분간 방치하였다.

Vortex로 1~3회 혼합후 1% fetal calf serum과 M199 media가 혼합된 용액으로 2회 세척후 1400rpm으로 10분간 원심한뒤 상층을 버리고 하층의 것을 wire mesh filter를 이용하여 내분비조직, 혈관 및 림프조직등을 제거하였다. 그다음 Ficoll을 HBSS에 용해시켜 23%, 20.5%, 17%, 11% 용액을 준비하였다. 먼저 23% Ficoll 용액 10ml에 원심분리한 조직 2ml를 50ml 원심분리 시험관에 넣어 혼합한뒤 20.5% 용액 10ml, 17%와 11% 용액을 각각 5ml씩 총화시켜 넣은 후 800G로 20분간 원심분리후 각종 사이에 부유된 췌도를 pipette로 채취하였다. 마지막으로, 수거한 양의

* 이 논문은 1992년도 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어졌다

9배 HBSS로 2회 세척후 dish에 담아 해부현미경 하에 glass loop를 이용하여 혈도를 수거하였다.

4. 혈도이식

한마리의 혈도수여 쥐에게 혈도를 이식하기 위해 서 4마리의 혈장 공여쥐를 사용하였고, 각각에서 분리된 혈도수를 측정하였다. 그리고 streptozotocin 주사후 4~5일이 경과하여 혈당치가 300mg/dl 이상인 쥐로 ether 마취하에 개복하였다. 1ml의 HBSS 용액이 든 주사기에 분리된 혈도를 담아 28G 주사침을 사용하여 문정액내에 주입하였다.

5. 혈도이식후 경과관찰

이식의 성공 및 거부반응의 발생시기를 관찰하기 위해 이식하루전과 이식후 5일간 매일 오전 급식하지 않은 상태에서 쥐의 미첨부를 천자한후 혈액을 받아 One touch II로 혈당치를 측정하였고 이후부터

는 매 2일마다 측정하였다.

결과

혈도의 분리

1마리당 수거한 혈도의 수는 평균 250 ± 310 개 정도였으며 분리된 혈도의 모양은 다양하였다(Fig. 1).

이식후 혈당검사에 의한 결과

10마리의 당뇨쥐에 혈도이식을 시행하였으며 이식한 혈도수는 1마리당 500~1000개 정도였다. 이식 후 성공기준에 해당한 예는 3예였으며(33.3%) 실패한 경우의 7마리는 수술직후 사망한 경우로서 마취상의 미숙점이 중요한 문제로 생각된다.

이식후 성공한 경우는 이식한 다음날부터 혈당치가 정상화되었다(Table 1). 이식후 정상혈당의 지속기간은 3예에서 각각 3일, 8일, 14일이었다(Fig. 2).

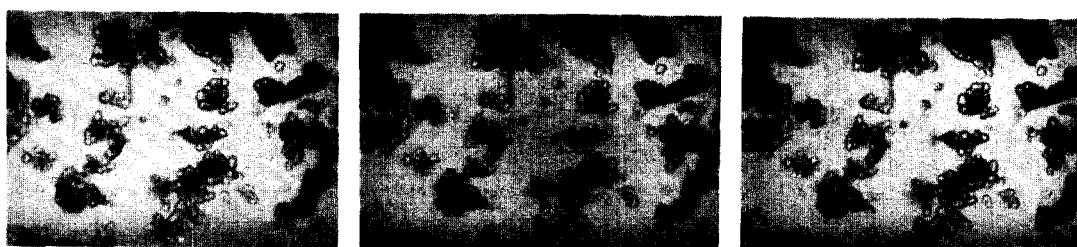


Fig. 1. Isolated Islets of Rat.

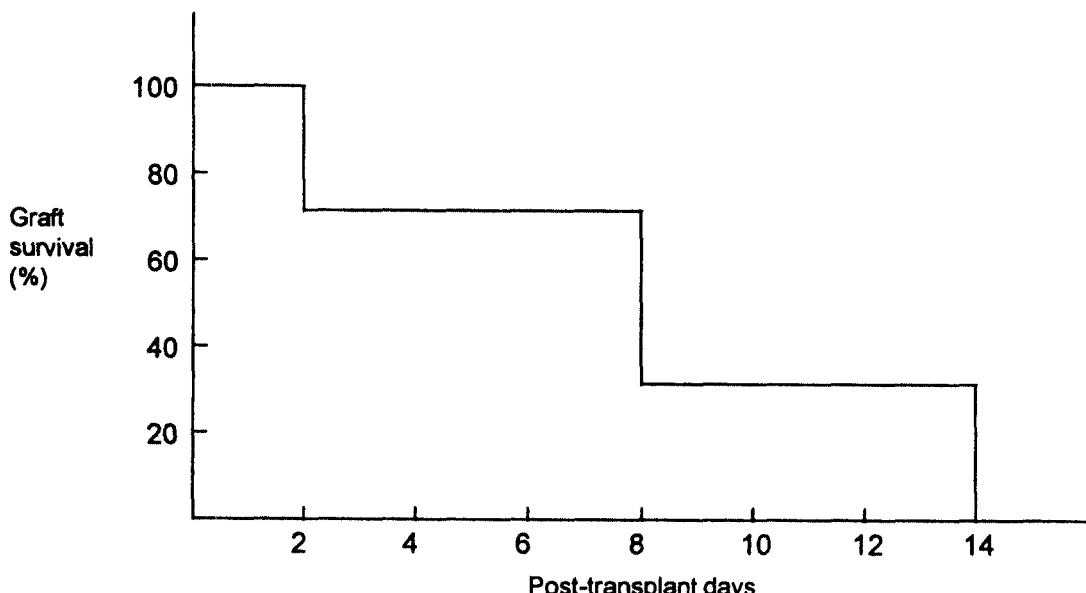


Fig. 2. Graft survival rate in the successful transplanted rats(n=3)

Table 1. Laboratory Findings for Normal and Transplanted Rats

	Normal(n=5)	Successful transplanted Rats(n=3)	
		1 day before TxPL	1 day after TxPL
Blood glucose(mg / dl)	110±6.4	365±52.4	121±15.5
Serum insulin(uU / ml)	31±4.3	8.5± 2.1	32.1±5.4

고 칠

1965년 Moskalewski가 collagenase소화법으로 설치류의 혈도분리에 성공한 이후¹⁾ Lacy와 Kostianovsky가 혈도분리기술⁴⁾을 보완하였고 현재까지 분리된 혈도의 인슐린 생합성 및 분비 등의 많은 생화학적 연구를 통하여 발전을 이루해왔다. 그리고 1972년 Ballinger와⁸⁾ Lacy 등이 실험적으로 유발시킨 당뇨병 쥐에서 성공적 혈도이식을 보고한 이래로 혈도이식 연구도 활발히 진행되고 있다.

일반적으로 collagenase소화법과 Ficoll density gradient를 이용하여 성장한 쥐 한마리로부터 약 150~400개의 혈도를 분리할 수 있으며⁹⁾ 실험적으로 유발된 당뇨병 쥐에게 성공적인 혈도이식에 필요한 혈도수는 최소 240개¹⁰⁾에서 최대 2100개¹¹⁾가 필요하다고 알려져 있다. 그러나 성공적인 혈도이식에는 이식된 혈도수 뿐만 아니라 분리된 혈도의 내분비 기능 정도¹²⁾, 실험적으로 유발된 이식수여 쥐의 당뇨병 상태¹²⁾ 및 면역계에 의한 거부반응¹³⁾, 혈장공여 쥐의 연령^{14, 15)} 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서도 collagenase소화법 및 Ficoll density gradient법을 이용하여 혈도를 분리하였으며 이 방법으로 한마리의 성장한 쥐로부터 약 200~400개 정도의 혈도를 분리할 수 있었으며, 이는 다른 연구결과와 유사하였다.

현재까지 실험적으로 시도된 혈도이식 장소는 많았으나, 효과적으로 이용할 수 있는 곳으로 문정맥^{2),} 비장내^{3),} 그리고 신장피막하부⁴⁾ 등이 있다. 흰쥐를 대상으로 성공적인 문정맥내 혈도이식의 경우 400내지 800개의 혈도가 필요한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐의 문정맥내로 최소 200개에서 최대 600개까지 분리된 혈도를 이식하여 성공하였다.

문정맥을 통한 간내이식의 단점은 첫째, 이식혈도의 전색으로 인한 문맥압 항진 및 과종성 혈관내 응고병증 등이 발생할 수 있고¹⁵⁾, 둘째, 간내에 다양 존재하는 망상내피 세포계의 대식세포에 혈도가 쉽게

노출되어 조기 거부반응을 유발할 수 있는 점¹⁶⁾ 등이 있다. 특히 Reece-smith 등¹⁷⁾은 신장피막하 혈도이식과 문정맥을 통한 간내혈도 이식과의 보고연구에서 간내이식보다 신장피막하 이식의 경우 혈당 조절이 월등히 오랜 기간 유지된다고 보고하였으며 그 주된 이유로는 이식혈도에 대한 거부반응에 주로 대식세포가 관여한다고 시사하였다.

본 연구에서는 문정맥내 혈도이식 후 24시간이내 사망한 7예중 1예는 복강내 출혈에 의한 것으로 추측되었고, 문맥압항진이나 과종성 혈관내 응고병 등은 관찰할 수 없었다. 그리고 나머지 6예는 마취약제의 과도사용으로 수술후 마취에서 회복되지 못했다. 또한 문정맥내 혈도이식에 성공한 3마리중 1마리는 이식후 3일째부터 미부천자에 의한 공복혈당이 250내지 400mg%로 일반적으로 이식혈도에 대한 거부반응이 발생되는 시기인 7~10일보다 훨씬 짧은 점으로 미루어 볼때 거부반응보다는 다른 요인에 기인한 것으로 생각된다. 이의 가능성으로서는 이식된 혈도수가 충분치 못한 점, 이식혈도가 간실질에 존재하고 있다는 점, 신경의 자배를 받지 않는다는 점 등을 들 수 있고, 이외에도 이식쥐의 수술과 계속적인 혈당검사로 인한 스트레스 등¹⁸⁾을 들 수 있다. 또한 본 연구에서는 이식예중 2마리는 각각 1주, 2주 정도 정상 혈당치를 유지하였다.

이상으로 미루어 볼때 collagenase소화법과 Ficoll density gradient법을 이용하여 분리된 혈도의 문정맥내 이식은 성공적으로 시행될 수 있으며, 향후 인체의 혈도이식술의 제 1단계 연구로 매우 중요하리라 생각된다.

요 약

저자들은 혈도이식 연구의 첫단계로 collagenase 소화법 및 Ficoll density gradient법을 이용하여 분리한 흰쥐 혈도를 10마리의, streptozotocin으로 당뇨병이 유발된 동계쥐의 문정맥에 이식하였다.

1) 성공적으로 이식된 예는 3례였으며 이식을 위

해 사용된 분리체도수는 250 ± 310 개였고 이식이 성공한 경우는 모두 이식후 1일째 혈당치가 정상으로 회복되었다(121 ± 15.5 mg / dl).

2) 성공적으로 이식된 예에서 이식체도의 생존은 각 3일, 8일, 14일이었다.

이상의 결과를 종합하면 collagenase 소화법 및 Ficoll density gradient법을 이용하여 분리한 체도를 사용한 문점맥내 체도이식은 이식의 성공률을 높이기 위한 마취상의 미숙점을 보완한다면 기술적으로 어려움없이 가능하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Moskalewski S: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 1965; 5(3): 342-353
2. Delmonico FL, Chase CM, Russel PS: Transplantation of rat islets of Langerhans into diabetic mice. *Transplant Proc* 1977; 9(1): 367-369
3. Sutherland DER: Pancreas and islet transplantation I. experimental studies. *Diabetologia* 1981; 20(3): 161-185
4. Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16(1): 35-39
5. Sharp DW, Kemp CB, Knight MJ, Ballinger WF, Lacy PE: The use of Ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas. *Transplantation* 1973; 16(6): 686-689
6. Matas AJ, Sutherland DER, Payne WD, Najarian JS: On the interpretation of islet allograft and xenograft results. *Transplantation* 1978; 25(5): 281-283
7. Rizza RA, Gerich JE, Haymod MW, Westland RE, Hall LD, Clemens AJ, John Service F: Control of blood sugar in insulin-dependent diabetes: Comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy. *N Engl J Med* 1980; 303(23): 1313-1318
8. Ballinger WF, Lacy PE: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972; 72(2): 175-186
9. Hess WN, Root KW: Study of the pancreas of the islets of Langerhans and the effects of age and fasting. *Am J Physiol* 1948; 152(18): 36-41
10. Henriksson C: Isolation and transplantation of islets of Langrhan. *Acta Chir Scand(Suppl)* 1978; 483: 1-21
11. Rumpf D, Lohlein D, Pichalmayr R: Multiple transplantation of islets of Langerhans. *Eur Surg Res* 1977; 9(6): 403-410
12. Rabinovitch A, Muller WA, Vastutis F, Malaisse-Lagae F, Mintz DH: Pancreatic islet transplantation. Influence of severity of diabetes in the recipient. *Diabetologia* 1976; 12(6): 415-419
13. Steiniger B, Klempnauer J, Wonigeit K: Altered distribution of class I and class II MHC antigens during acute pancreas allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1985; 40(3): 234-239
14. Selawry H, Harrison J, Patipa M, Mintz DH: Pancreatic islet islet transplantation: Effects of age and organ culture of donor islets on reversal of diabetes in rats. *Diabetes* 1978; 27(6): 625-631
15. Hegre OD: Islet cell transplantation, in Ivolk BW, Arquila ER(eds): *The diabetic pancreas*, de2. New York, Plenum Medical Book CO. 1986, pp 513-521
16. Reckard CR, Ziegler MM, Barker CF: Physiological and immunological consequences of transplanted isolated pancreatic islets. *Surgery* 1973; 74(1): 91-99
17. Reece-Smith H, DuToit DF, McShane P, Morris PJ: Prolonged survival of pancreatic islet allografts transplanted beneath the renal capsule. *Transplantation* 1981; 31(4): 305-306
18. Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal MA, Karl IE, Posternak J: Neural regulation of insulin secretion in the dog. *J Clin Invest* 1973; 52(1): 210-214

=Abstract=

Isotransplantation of Rat Pancreatic Islet into Portal Vein of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*

**Keun Young Park, MD; Jun Ki Yeo, MD; In Kyu Lee, MD;
Koo Jeong Kang, MD**; Won Hyun Cho, MD****

*Department of Internal Medicine and Surgery**,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

We evaluated the functional ability of fresh isolated islet of rats by the methods of collagenase digestion/Ficoll density gradient and we performed isotransplantation of rat islet into portal vein as a first step procedure to islet cell transplantation.

The results obtained were as follows.

- 1) Three out of 10 transplanted rats receiving 250 ± 310 isolated islets normalized their nonfasting morning blood glucose(121 ± 15.5 mg / dl) and insulin levels(32.1 ± 5.4 uU / ml).
- 2) Normoglycemia has been maintained for 3 days, 8 days and 14 days in each 3 successfully transplanted rats.

This study suggests that the islet isotransplantation into portal vein by the methods of collagenase digestion and Ficoll denisty gradient is feasible and appropriate method in treating the diabetes and can be used in the human also for the treatment of diabetes and could be used in the human diabetes.

Key Words: Isotransplantation, Islet