

## 랫드 간경변 모델에서 발현되는 단백질의 탐색

연세대학교 의과대학 방사선종양학교실<sup>1</sup>, 간경변증임상연구센터<sup>2</sup>, BK 21 의과학사업단<sup>3</sup>

안정희<sup>1,3</sup> · 성진실<sup>1,3</sup> · 오해진<sup>1,3</sup> · 김원우<sup>1,3</sup> · 한광협<sup>2,3</sup> · 백용한<sup>2</sup>

### Abstract

### Protein Expression Profiles in a Rat Cirrhotic Model Induced by Thioacetamide

Jeung Hee An, Ph.D.<sup>1,3</sup>, Jinsil Seong, M.D.<sup>1,3</sup>, Haejin Oh, M.S.<sup>1,3</sup>, Wonwoo Kim, M.S.<sup>1,3</sup>, Kwang-Hyub Han, M.D.<sup>2,3</sup> and Yong Han Paik, M.D.<sup>2</sup>

Department of Radiation Oncology<sup>1</sup>, Liver Cirrhosis Clinical Research Center<sup>2</sup>, Brain Korea,  
21 Project for Medical Science<sup>3</sup>, Yonsei University Medical College, Seoul, Korea

**Background/Aims:** The reactive oxygen species from thioacetamide (TAA) induces rat liver cirrhosis that resembles the human disease, and it can serve as a suitable animal model for studying human liver cirrhosis. The aim of this study was to identify the molecular protein signatures via a proteomics approach with using a rat model with TAA-induced liver cirrhosis. **Methods:** Male Wistar rats were treated with 0.3 g/L TAA in their drinking water. The animals were then sacrificed at 9 and 30 weeks after TAA administration. The development of liver cirrhosis was observed with histological study. The livers were processed for proteins extraction and the proteins were analyzed by 2-dimensional electrophoresis. The proteins were identified by matrix-assisted laser desorption ionizing time-of-flight mass spectrometry and this was validated by immunohistochemical staining. **Results:** On the proteomics analysis of the liver tissues, a total of 88 proteins showed significant change in their expression between the controls and the cirrhotic rats. When the proteins were categorized by their function, they included ECM/cellular skeleton, cell proliferation/death signal, metabolism, DNA damage/stress and immune response related proteins. The level of expression gradually increased up to 30 weeks for interleukin-6 (IL-6) precursor, transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) induced protein, TIMP-1 and MMP-9. Cytochrome P450 2B, which is required for the metabolic activation of TAA, also showed the same increasing pattern. In contrast, the expression level of the proteins did not show a significant change at 9 weeks, but this increased to 3-fold at 30 weeks for carbonic anhydrase VII, ras related protein Rab 6, Annexin A2, neurofibromatosis type 2 and aldehyde dehydrogenase. **Conclusions:** This study showed that there is a repertoire of proteins during the development of liver cirrhosis via TAA. In this model, IL-6, TGF- $\beta$ , MMP-9 and TIMP-1 were reconfirmed as the molecular signatures during the development of TAA-induced liver cirrhosis. (Korean J Hepatol 2006;12:93-102)

**Key Words:** Proteomics, Cirrhosis, Thioacetamide, Rats

◇ Received September 28, 2005; revised October 25, 2005; accepted October 25, 2005

◇ Abbreviations:  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -Smooth muscle actin; AAALAC, Association of Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International; 2DE, 2-dimensional electrophoresis; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; ECM, Extracellular matrix; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)ethylammonium]-1-propanesulfonate; DTT, Dithiothreitol; IL-6, Interlukin-6; MALDI-TOFMS, Matrix-assisted laser desorption ionizing time-of-flight mass spectrometry; MMP-9, Matrix metalloproteinase-9; PBS, Phosphate Buffered Saline; TGF- $\beta$ , Transforming growth factor-beta; TAA, Thioacetamide; TIMP-1, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

◇ Corresponding author : Jinsil Seong, E-mail: jsseong@yumc.yonsei.ac.kr; Phone: 02) 2228-2810; Fax: 02) 312-9033

주소: 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실 (우) 120-752

## 서 론

간경변증은 간 전반에 섬유화와 재생 결절들이 형성되며, 이로 인해 식도정맥류 출혈, 복수, 간성 혼수 및 간부전증, 간암으로 진행되기도 한다.<sup>1,2</sup> 특히 간경변은 합병증을 동반하게 되면 치료가 어려우므로 합병증이 없는 초기 간경변에서 간의 상태를 파악함으로써 예후 인자와 그에 따른 적절한 치료를 결정하는 것이 매우 중요하다. 간경변의 예후 인자를 확인하기 위해 다양한 임상적 접근 방법이<sup>3,4</sup> 이루어지고 있으며 간경변 표적 인자에 대한 연구가 다양한 실험 동물 모델을 통해서 시행되고 있다.<sup>5-11</sup>

일반적으로 사염화탄소( $\text{CCl}_4$ ),<sup>5</sup> dimethylnitrosamine,<sup>6</sup> 담도 결찰,<sup>7</sup> alcohol<sup>8</sup> 및 식이 유도법,<sup>9</sup> 면역 유도법,<sup>10</sup> thioacetamide (TAA)<sup>11,12</sup> 등을 이용한 간 경변 모델이 제시되어 왔다. 그 중에서 TAA는 활성 산소종을 매개로 하여 간손상을 유도하며, 이로 인한 랫드의 간경변 모델은 사람의 경우와 형태학적, 생화학적 특징이 유사하여 재시행시 동일한 병변을 얻을 수 있으며 사망률이 낮은 것으로 보고되고 있다.<sup>12,13</sup> 따라서 TAA에 의한 간경변 실험 동물 모델에서 간경변의 진행에 관여하는 표적 단백질을 발굴하고자 하는 연구가 시행되어 왔다. 최근 high-throughput 기술의 발달로 인해 분자 표적인자의 탐색이 더욱 용이하게 되었다.

본 연구에서는 TAA에 의해서 유도된 간경변에 proteomics 기술을 적용하여 초기 간경변 조직과 간경변이 완연하게 나타나는 후기 간경변 조직에서 변화되는 다양한 단백질의 양상을 확인하고 간경변 관련 단백질을 탐색하고자 한다.

## 대상과 방법

### 1. 실험 대상

실험 동물은 Wistar 웅성 흰쥐( $200 \pm 25$  g)로 연세대학교 실험 동물부에서 사육 상자 당 5마리씩 AAALAC (Association of Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care

International) 기준에 의해서 사육하였다. 이들은 연세대학교 실험동물부의 지침에 따라 온도(22°C), 습도(55%)가 일정하게 유지된 환경에서 무균음수와 멸균사료로 사육되었다.

### 2. 방법

#### 1) 실험군의 설정

간경변을 유도하기 위하여 TAA (Sigma, St Louis, MO, USA)를 0.3 g/L의 농도로 음용수에 희석하여 자유 급수하였다. 9주와 30주에 랫드를 희생시켰고 간의 각 엽에서 조직절편을 채취하였다.

#### 2) 병리 검사

실험 동물은 방혈 치사시켜 간을 적출하여 간의 무게를 측정하고 간의 육안적인 소견을 관찰하였다. 모든 군의 간은 10% 중성 완충포르말린액에 고정 후 파라핀으로 포매 과정을 거쳐 4  $\mu\text{m}$  두께의 조직절편을 제작한 후 Masson's trichrome 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 3) 면역조직화학염색

포르말린 고정 파라핀 조직을 4  $\mu\text{m}$  두께로 절편한 후 60°C에서 1시간 전조시켜 xylene으로 탈파라핀하고 일련의 등급화된 에탄올을 이용하여 재함수시켰다. 내인성 과산화효소를 억제하기 위하여 3% 과산화수소용액에서 10분간 처리하고 0.1% PBS (phosphate buffered saline, pH 7.6) 용액으로 10분간 세척한 후 절편을 10 mM 구연산 완충액(citrate buffer, pH 6.0)에 넣고 10분간 끓인 후 꺼내어 실온에서 식혔다. 이 절편을 PBS로 수세 후 일차 항체를 처리한 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 각 일차 항체는 다음과 같다.  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA, 1:50, DAKO, Co., Santa Barbara), TGF- $\beta$ 1과 TIMP-1 (polyclonal, 1:100, Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), cytochrome P450 2B (polyclonal, 1:50, US Biological, Massachusetts), MMP-9 (1:100, Abcam Ltd., Cambridge, UK)을 사용하였다. PBS로 세척 후 biotin이 부착된 2차 항체를 30분 적용하

고 PBS로 세척하였다. 그리고 streptavidin 복합체(DAKO)를 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB)를 사용하여 5분간 반응시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색을 2분간 시행한 후 다시 탈수 후 봉입하였다.

#### 4) 2D 전기영동

조직을 homogenizer로 분쇄하여 sample buffer 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT (Sigma), 2% bio-ltate ampholytes (pH 3-10, Bio rad), 0.01% bromphenol blue에 반응시킨 후 조직에서 단백질을 추출하고, 100,000 g으로 1시간 원심분리하여 상층액을 모았다. 혼산을 제거하기 위해서 실온에서 endonuclease 처리, 12,000 g에서의 원심분리, 상층액 회수 과정을 거쳤고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 사용하여 단백질 정량을 하였다. 단백질 1 mg을 nonlinear immobilized Dry strip, pI 3-10 (Bio Rad)에 넣고 재수화(rehydration)시켰다. 20°C에서 100,000 Vh로 first dimension 전기영동을 하였다. 9–18% gradient polyacrylamide gel을 사용하여 2D 전기영동을 한 후 gel을 40% 메탄올과 5% phosphoric acid를 함유한 고정액에 넣어 단백질을 고정시켰으며, 37% 메탄올, 17% ammonium sulfate, 5% phosphoric acid, 0.1% Coomassie brilliant blue G-250 (Bio rad)을 함유한 stain 용액에 넣어 단백질을 염색하였다. 겔을 스캐너로 영상분석 후 PD Quest 2-D software (Bio rad)를 이용하여 영상을 분석하였다.

5) In gel digestion 및 MALDI-TOF에 의한 분석  
발현 차이를 보이는 gel의 spot를 trypsin digestion 처리 후 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, UK)에서 측정하였다. MALDI-TOF MS에서 측정된 peptide의 monoisotopic peak data는 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>)의 Swiss-prot database 또

는 NCBI database를 이용하여 단백질을 동정하였다.<sup>14</sup> 이 때 mass tolerance는 50 ppm 이내로 하였다.

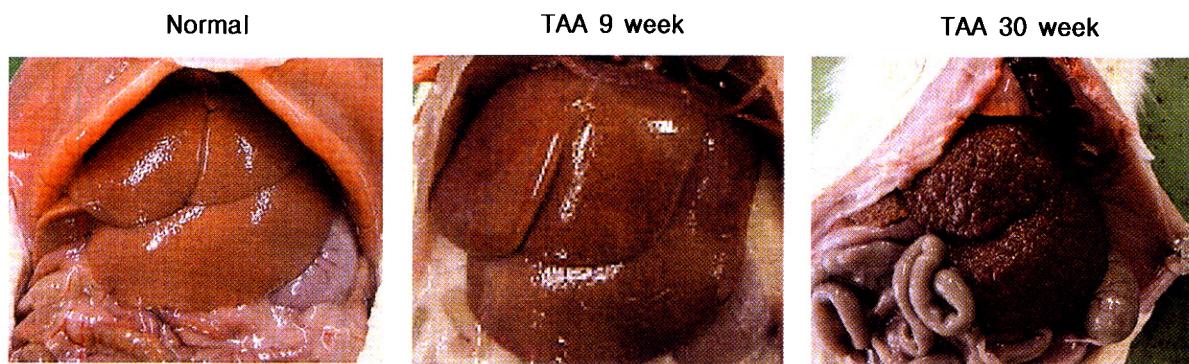
## 결과

### 1. 간경변의 평가

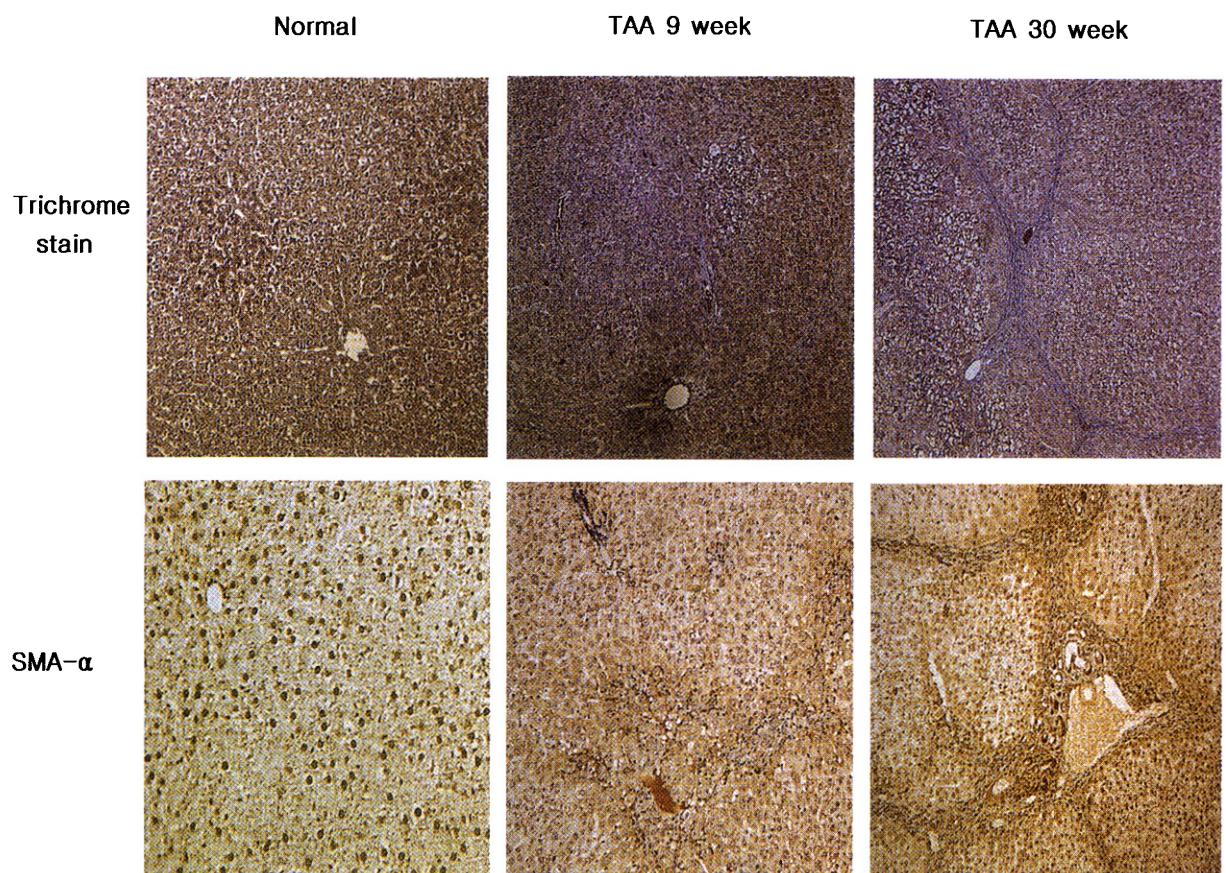
간을 적출하여 육안으로 관찰시 TAA 9주에서는 정상 대조군과 비교하여 변화가 보이지 않았으나 30주에서는 간경변이 뚜렷하게 진행됨을 확인하였다(그림 1). Trichrome 염색 소견에서 TAA를 투여한 기간이 길수록 세포의 기질이 푸른색으로 염색이 된 것으로 보아 TAA에 의한 간경변이 진행될 수록 세포의 기질이 증가함을 보여 주고 있다. 9주 동안 TAA를 투여한 군에서는 정상 대조군에 비해 문맥 주변에 부분적인 선상의 섬유화가 관찰되었으나 섬유성 격막은 형성되지 않았다. 30주 동안 TAA를 투여한 군에서는 완전한 섬유성 격막을 형성하면서 결절이 형성된 확연한 간경변을 보여 주었다(그림 2). 또한 TAA 처리 후 간경변이 진행되면서 세포의 기질을 생성하는  $\alpha$ -SMA 양성 세포들은 진한 갈색으로 염색되었다(그림 2). 이 양성 세포들은 30주 동안 TAA를 투여한 군(N=5)의 간조직 모두에서 문맥 주위의 영역으로부터 섬유성 격막과 소엽의 중심부로 점점 분포의 범위가 확대되는 양상을 보여 주었다.

### 2. 2차 전기영동에서 보여진 간경변 관련 단백질의 변화

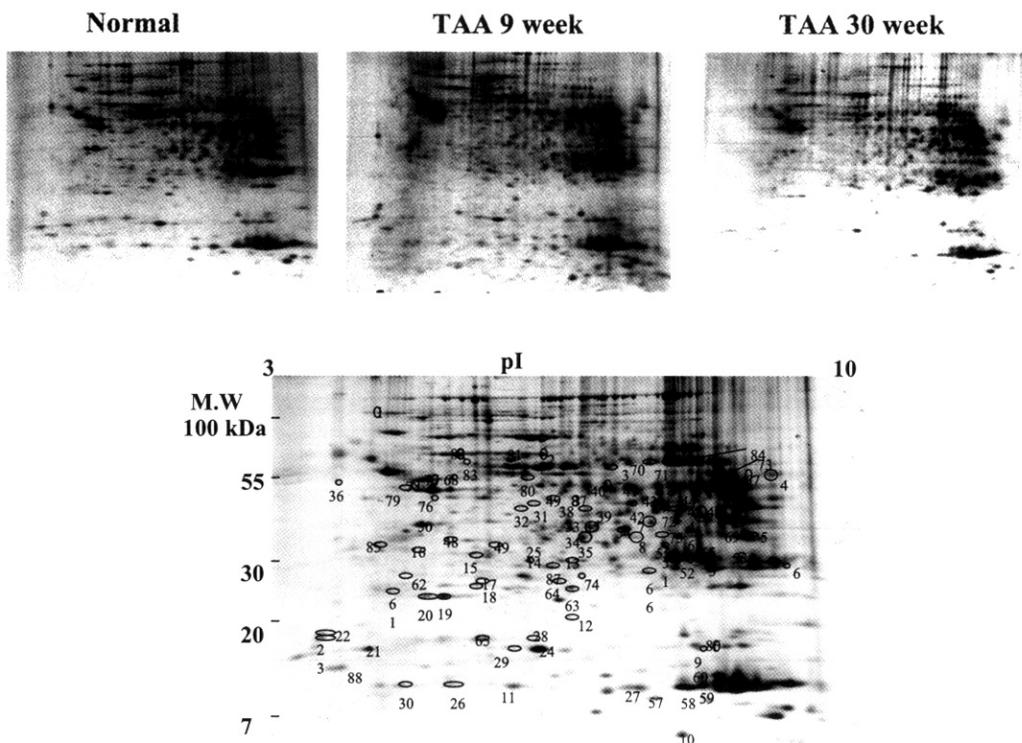
이차 전기영동 후 Coomassie blue로 염색된 gel에서 각각 1000–1300개의 spot가 검출되었다. 정상 대조군과 간경변군 간에 발현의 차이를 보이는 spot 중 3배 이상 차이가 나는 단백질은 총 88개인 것으로 나타났다(그림 3). 이를 기능별로 구별한 결과 ECM/cellular skeleton, cell proliferation/death에 관여되는 단백질, 대사 및 DNA damage/stress에 관여되는 단백질과 면역 반응에 관여되는 단백질들인 것으로 나타났다.



**Figure 1.** Rat liver with TAA-induced cirrhosis. Male Wistar rats were treated with 0.3 g/L TAA in their drinking water for 30 weeks. A gross photograph of the liver with a macronodular surface is shown.



**Figure 2.** Histological analysis of liver by Massons trichrome and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA- $\alpha$ ) staining after 9 or 30 weeks of administration of thioacetamide.



**Figure 3.** 2-D gel electrophoresis of different expression between normal and cirrhotic liver tissues in Wistar rat. Proteins from the whole liver were extracted and separated on pI 3-10 nonlinear immobilized pH gradient strips, followed by 9% to 18% polyacrylamide gels. The gel obtained for each of five rat liver tissues was stained with Coomassie brilliant blue G-250.

### 3. 초기 간경변에서 발현의 변화를 보이는 단백질의 탐색

Trichrome 염색 결과에서는 TAA를 9주 동안 투여한 군에서 간경변에 의한 조직학적 변화가 거의 없었으나, proteomics 결과에서는 정상 대조군의 간에 비해 단백질의 발현이 3배 이상 증가되는 뚜렷한 변화를 보여 주었다. 이들 단백질은 MHC class II antigen, mitogen-activated protein kinase 8 (JNK1), lamin A, cytochrome c oxidase, phosphatidylinositol 4-kinase, calcipressin 3, NADH ubiquinone oxidoreductase, 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, cytochrome P450 2B3, gelatinase B precursor (MMP-9), transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) induced protein, interleukin-6 precursor (IL-6), glycosyl transferase, glutathione-S-transferase omega 1, zinc finger

protein 148, MHC class II histocompatibility antigen, TIMP-1 등을 포함하고 있다(표 1). 또한 초기 9주 투여군에서 3배 이상 발현의 감소를 보인 단백질은 H-Ras, sulfotransferase family 1A2, liver fatty acid binding protein이었고 이들은 30주 투여군에서도 역시 발현이 감소되는 것으로 나타났다(표 1).

특히 간경변 초기인 9주에 변화를 보이는 단백질 중 cytochrome P450 2B3, TIMP-1, MMP-9과 TGF- $\beta$  induced protein 발현의 증가를 부분적 image gel로써 확인할 수 있었다(그림 4). 면역조직화학염색법으로 확인한 결과 cytochrome P450 2B, TGF- $\beta$  1, TIMP-1, MMP-9 등은 간경변이 진행됨에 따라 발현이 증가되어 proteomics 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다(그림 5).

**Table 1.** A Detailed List of Protein Undergoing Quantitative Changes with TAA Treatment

Pattern		Protein Name
Normal vs. 9 Weeks 9 Weeks	9 Weeks vs. 30 Weeks	
Up	Down	MHC class II antigen, Cytochrome c oxidase, Lamin A, Mitogen-activated protein kinase, TIMP-1 Phosphatidylinositol 4-kinase, Calcipressin 3, NADH ubiquinone oxidoreductase, 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, Cytochrome P450 2B3, gelatinase B precursor, Transforming growth factor-beta induced protein, Interlukin-6 precursor, Glycosyl tranferase, Glutathione-S-transferase omega 1, MHC class II Histocompatibility antigen, Zinc finger protein 48
Up	Up	Carbonic anhydrase VII, Ras related protein Rab 6, Annexin A2, Neurofibromatosis type 2, Rab 3A interacting protein-like 1, Aldehyde dehydrogenase 1A1, Proteasome activator complex subunit 3
Down	Down	H-Ras IDX, Sulfotranferase family 1A2, Liver fatty acid binding protein

Up and Down: approximate 3 fold changes of protein expression was derived from the ratio of normalized average optical densities of normal to the experimental proteins.

#### 4. 간경변 후기에 변화를 보이는 단백질

간경변 초기 9주에서 단백질 발현의 변화가 거의 없다가 완연한 간경변증을 보이는 30주 투여군의 간조직에서 특이적으로 변화를 보이는 단백질은 carbonic anhydrase VII, ras related protein Rab 6, annexin A2, neurofibromatosis type 2, rab 3A interacting protein-like 1, aldehyde dehydrogenase 1A1, proteasome activator complex subunit 3 등이었다.

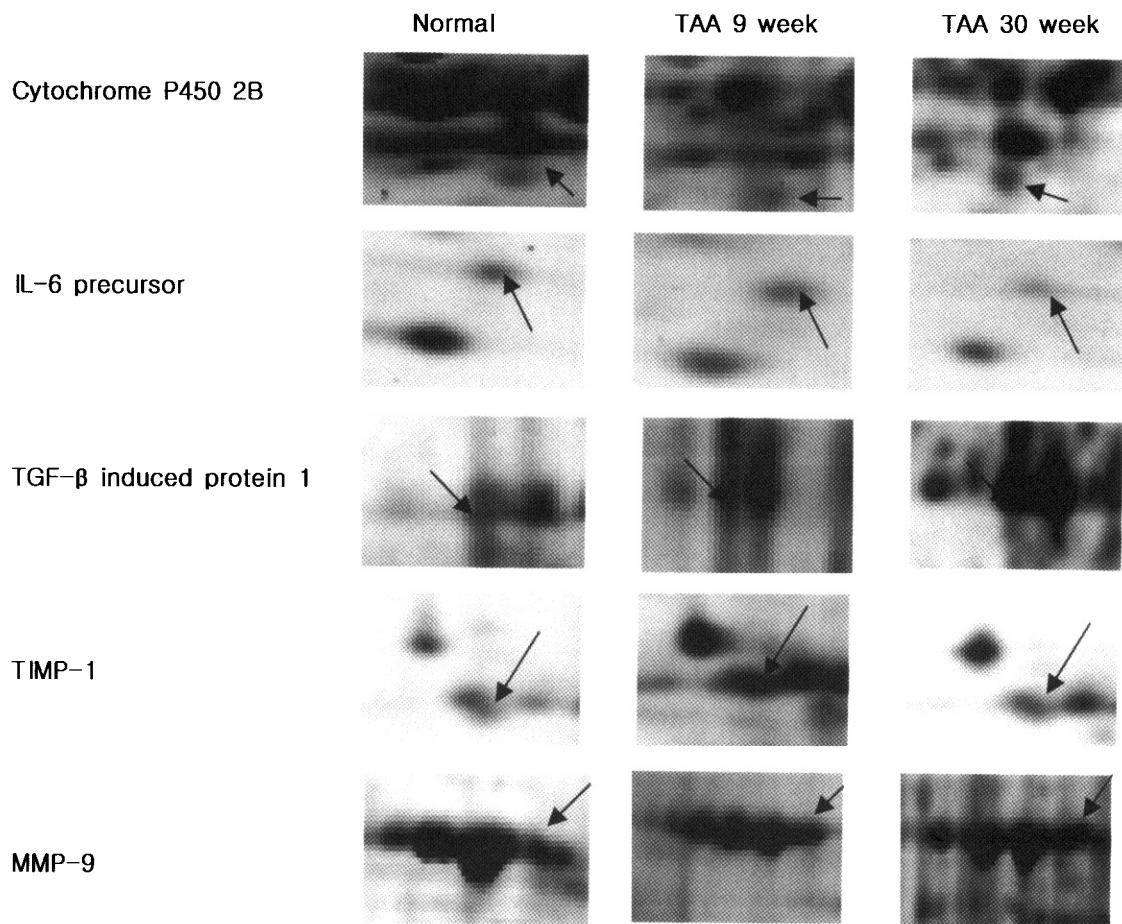
#### 고 찰

본 연구에서 TAA 경구 투여로 인한 간손상으로 유도되는 간경변 동물 모델에서 proteomics 방법을 적용하여 간경변이 진행됨에 따라 발현의 변화를 보이는 단백질을 확인하고 그들의 역할을 확인하였다. 또한 TAA 투여 후 30주 된 간조직에서 간경변이 완연하게 형성되었고, 문맥 주변의 염증 반응과 섬유화 진행이 사람의 간경변과 유사한 경향을 지니고 있음을 확인하였다. 일반적으로 초기 간경변에서 간의 상태를 파악하고 예후 인자를 확인할 수 있다면 간경변 치료의 효율을 증가시키기 때문에 본 연구에서는 간경변 초기에서 발현의 변화를 보인

단백질의 역할에 중점을 두고 고찰하고자 하였다.

간경변 초기인 9주의 간조직을 정상 대조군의 간조직과 비교한 결과 3배 이상 발현의 변화를 보이는 88개의 단백질을 proteomics를 통해서 확인하였고, 특히 TIMP-1, MMP-9, IL-6과 TGF- $\beta$ 1의 변화는 매우 의미 있는 결과를 보여 주었다.

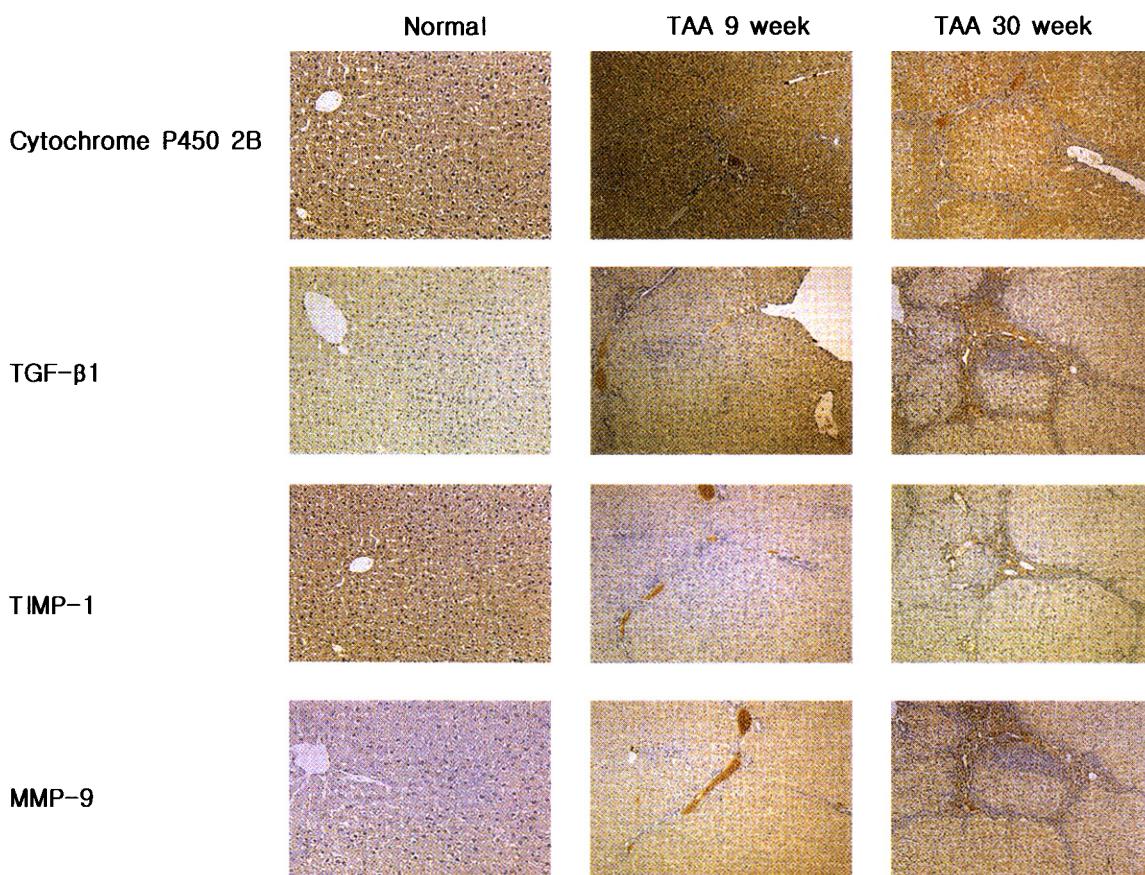
Masson's trichrome 염색 결과에서도 정상 대조군에 비해 9주에서 문맥 주변에 부분적인 선상의 섬유화가 관찰되었으나 섬유성 격막은 형성되지 않았다. 30주에서는 뚜렷한 섬유성 격막을 형성하면서 결절이 형성된 양상을 보여 주고 있다. 앞선 연구 결과<sup>15</sup>에서도 21주부터 간경변이 유도되는 것으로 보고되었으며, 또한 정 등<sup>16</sup>의 TAA 0.03%의 음용 수로 유도된 간경변 모델과 같은 정도의 섬유화 결과를 보여 주었다. 또한 간 성상세포의 활성화 과정에서  $\alpha$ -SMA의 발현이 증가하게 되는데 이것은 간 성상세포의 활성화의 표지자인 cytoskeletal filament로 간 성상세포의 수축에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>17</sup> 본 실험에서는 9주째에서  $\alpha$ -SMA 발현이 관찰되고 있다. 이 결과를 통해서 간 성상세포의 활성이 섬유화 증가보다 먼저 일어났음을 보여주었다.



**Figure 4.** Partial 2-DE images for Cytochrome P450 2B, IL-6 precursor, TGF- $\beta$  induced protein 1, TIMP-1 and MMP-9. Protein extracts from normal liver, 9 weeks and 30 weeks liver tissues were separated by 2DE. The gel obtained for each of five rat liver tissues was stained with Coomassie brilliant blue G-250 and the image gels was obtained from the GS-800 densitometry scanner.

TAA에 의해 유도되는 간경변은 약물의 작용을 매개하는 활성 산소종이 주요인인 것으로 알려져 있으며, 시간이 경과함에 따라 TAA 그 자체에 의한 독성보다는 cytochrome P450 효소에 의하여 생성되는 thioacetamide S-oxide에 의한 독성으로 인해 대사활성화 과정이 요구되는 것으로 알려져 있다.<sup>18,19</sup> TAA 투여 전에 cytochrome P450 2B 유도 효과가 있는  $\beta$ -ionone를 투여할 때 TAA에 의해 혈청 AST 및 ALT 효소 활성이 의미 있게 증가되며 간 피사가 심해진다고 보고되고 있다.<sup>19</sup> 본 연구는 면역조직화학 소견상 간섬유화가 진행됨에 따라

cytochrome P450 2B 단백질의 발현이 증가되었다. 이것은 음용수로 섭취된 TAA 화합물이 간조직에서 장기간 축적됨에 따라 체내의 cytochrome P450 가 TAA를 외인성 오염물질(xenobiotic)로 인식하고 대사함으로써 cytochrome P450 2B의 발현이 증가되는 것으로 보여진다. 한편 다른 약물에 의해 유도된 간경변 모델에서는 cytochrome P450의 isoform 발현의 양상이 다양하므로 TAA에 의해 유도된 간경변에서 cytochrome P450 2B의 역할에 대한 연구가 앞으로 더욱 요구된다.



**Figure 5.** Immunohistochemical stain of cytochrome P450 2B, transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1), TIMP-1 and MMP-9 in cirrhosis rat induced by thioacetamide ( $\times 100$ ).

IL-6은 pro-inflammatory 사이토카인으로 섬유모세포와 림프구 및 활성화된 단핵구에 의해 생성된다.<sup>20</sup> 간섬유화 과정에서 IL- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 와 함께 섬유모세포에서 염증 반응에 작용하는 대식구의 수를 증가시키는 데 필요한 단핵구 성장 촉진 인자의 유전자를 발현시킨다고 보고되고 있다.<sup>21</sup> proteomics 결과에서 IL-6의 발현은 간경변 초기 9주에서 변화를 보이다가 간경변 후기서는 감소되는 양상을 보였다.

TGF- $\beta$ 는 다양한 기능을 갖고 있는 사이토카인으로 세포의 분열, 배아 발생, 상처의 치유와 혈관의 발달에 영향을 미치며 TGF- $\beta$ 1, 2, 3의 세 종류가 보고되고 있다.<sup>22-24</sup> 그 중에서 TGF- $\beta$ 1은 간에 많이 존재하며 활성화된 성상세포를 생성하고 성상세포를 자극하여 세포의 기질을 생성하여 간섬유화

또는 간경변을 유발하는 것으로 보고되고 있다.<sup>24</sup> 본 실험에서 TGF- $\beta$ 1의 면역조직화학검사 결과 9주에서 문맥 주변의 염증 반응과 섬유화의 진행이 간문맥 주변에서 다소 보였으나 30주에서는 발현이 뚜렷하게 증가됨이 관찰되었다.

또한 교원질을 분해하는 4형 collagenase (MMP-2, 9)은 주로 간 성상세포 및 쿠퍼세포에서 생성된다.<sup>25</sup> 이것은 neutral proteinase로서 정상 subendothelial space에 있는 기저막 기질을 분해시켜 scar collagen으로 정상 기저막을 대체하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>26</sup> 특히 젤라틴과 교원질을 분해하여 염증세포들의 이동과 침윤을 촉진시킨다.<sup>27</sup> 또한 TIMP-1은 MMP-9과 1:1로 비공유적으로 결합하여 MMP-9 작용을 억제하고 있어 조직의 통합성(integrity)을 유지하고 있다. 이

상태에서 과도한 MMP-9는 조직의 구조적인 퇴행을 일으키고, 반면에 과도한 TIMP의 분비는 조직 재생 과정에서 섬유화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup> 본 연구에서도 MMP-9와 TIMP-1가 같이 간경변 초기에서 발현이 증가되었으며 30주까지 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 ECM/cellular skeleton, cell proliferation/death에 관여되는 단백질, 대사 및 DNA damage/stress에 관여되는 단백질과 면역 반응에 관여하는 단백질 등에서 간경변이 진행됨에 따라 다양한 발현 양상을 확인할 수 있었다. 따라서 간경변 초기에 증가된 단백질 중에서 IL-6, TGF- $\beta$ 1, TIMP-1과 MMP-9 이외에 다양한 단백질에 대해 간경변에 관련한 중요성에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 proteomics 방법을 통해서 이들 간의 상호작용을 확인할 수 있었고 간경변의 유도 기전을 알 수 있었다. 즉 TAA에 의한 간경변에서 TAA sulfoxide라는 독성 물질로 전환하여 간세포 또는 쿠퍼세포 등을 손상시키며, 이 때 IL-6 같은 다양한 사이토카인의 증가가 유도되고 또한 다양한 oxidative stress에 관여되는 단백질의 증가도 유도된다. 이것으로 인해 initiation phase에서 TGF- $\beta$ 1의 수용체가 발현되어 MMP-9의 분비를 촉진하여 세포막을 둘러싸고 있는 기저막을 손상시킴으로써 간 성상세포를 활성화시킨다. 이후 perpetuation phase에서 활성화된 간 성상세포는 각종 성장 인자 반응을 증가하고 I형 교원질 등의 ECM생성을 증가시킴으로써 간경변이 진행하는 것으로 보인다. 또한 TIMP-1 역시 초기 간경변에서 증가함으로써 간경변 유도에 관여하는 인자로 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 보인다. 본 연구 결과 TAA에 의해서 유도된 간경변 모델에서 간경변이 진행함에 따라 발현의 증가를 보인 IL-6, TGF- $\beta$ 1, TIMP-1과 MMP-9의 역할과 그 중요성을 proteomics 통해서 다시금 확인할 수 있었다.

경변 모델은 사람의 간질환과 형태학적, 생화학적 특징이 유사하기 때문에 매우 적당한 간경변 실험 연구 모델이다. TAA에 의한 간경변 모델에서 proteomics 방법을 이용하여 간경변 조직에서 변화되는 다양한 단백질의 양상을 확인하고 간경변 관련 단백질을 탐색하고자 하였다. **대상과 방법:** 웅성 Wistar 랫드에 0.3 g/L TAA를 음용수와 같이 복용시켜 간경변을 유발하였고 이를 조직학적으로 확인하였다. TAA 섭취 후 9, 30주 후에 간을 적출하여 단백질을 추출하였고 2차 전기영동 및 matrix-assisted laser desorption ionizing time-of-flight 질량 분석하였다. Proteomics 결과에서 보인 단백질의 확인은 면역조직화학염색법으로 실시하였다. **결과:** 간경변이 진행됨에 따라 총 88개의 단백질이 발현의 변화를 보였다. 기능별로 볼 때 ECM/cellular skeleton, cell proliferation/death signal, 대사, DNA 손상/stress 또는 면역 반응에 관여되는 단백질로 구별되었다. 간경변 초기인 9주에서 변화를 보이는 단백질 중에서 TIMP-1, MMP-9과 TGF- $\beta$  induced protein의 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한 TAA의 약물 대사에 관련하는 cytochrome P450 2B3도 간경변이 진행됨에 따라 증가되는 양상을 보였다. 한편 간경변 초기 9주에서 변화가 거의 없다가 30주에 3배 이상 유의한 증가를 보이는 단백질은 carbonic anhydrase VII, ras related protein Rab 6, annexin A2, neurofibromatosis type 2, aldehyde dehydrogenase 1A1들이었다. **결론:** 본 연구에서는 간경변 동물 모델에서 다양한 단백질의 변화를 확인할 수 있었다. TAA로 유도된 간경변 모델에서 TIMP-1, MMP-9, IL-6 및 TGF- $\beta$ 1가 간경변의 진행에 중요한 역할을 수행하는 것을 proteomics 방법에 의해 재확인 할 수 있었다.

---

**색인단어:** Proteomics, 간경변, Thioacetamide

## 요 약

**목적:** Thioacetamide (TAA)에 의한 랫드의 간

## 감사의 글

본 연구는 원자력중장기연구개발사업의 지원으

로 수행되었으며 이에 감사를 표합니다.

### 참 고 문 헌

1. Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *J Hepatology* 2003;38(Suppl 1):38–53.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209–218.
3. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160–1174.
4. Kim DU, Park GT, Koh DH, Cho HS, Kim YH, Shim SG, et al. Five-year follow-up of clinical and laboratory data of early liver cirrhosis patients confirmed by liver biopsy. *Korean J Hepatol* 2002;8:256–263.
5. Jeong DH, Jang JJ, Lee SJ, Lee JH, Lim IK, Lee MJ, et al. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl<sub>4</sub> or thioacetamide. *J Gastroenterol* 2001;36:24–32.
6. Kim WH, Lee JH, Jin YM, Cho H, Park HL, Jung MK, et al. Dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis and expression of hepatocyte growth factor (HGF), its receptor c-Met, and the transforming growth factor (TGF)-beta1 in Sprague-Dawley rats. *J Korean Surg Soc* 1998;55:453–468.
7. Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, et al. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest* 2004;34:290–296.
8. Giavarotti L, D'Almeida V, Giavarotti KA, Azzalis LA, Rodrigues L, Cravero AA, et al. Liver necrosis induced by acute intraperitoneal ethanol administration in aged rats. *Free Radic Res* 2002;36:269–275.
9. Nakano M. Morphogenesis of septa in hepatic fibrosis induced by choline deficiency in rats. Correlation between ito cells pericellular fibrosis, and septa. *Acta Pathol Jpn* 1986;36:1643–1652.
10. Kimura K, Ando K, Ohnishi H, Ishilawa T, Kakumu S, Takemura M, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A. *Int Immunol* 1999;11:1491–1500.
11. Hori N, Okanoue T, Sawa Y, Mori T, Kashima K. Hemodynamic characterization in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide administration. *Dig Dis Sci* 1993;38:2195–2202.
12. Muller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats—usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 1988;34:229–236.
13. Jang KT, Lee MS, Jung IP, Kim MR, Jang JJ. Effect of pentoxifylline on liver fibrosis and cell cycle related proteins in thioacetamide-induced rat cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2001;7:281–291.
14. An JH, Kim J, Seong J. Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030: 86–94.
15. Seong J, Han KH, Park YN, Nam SH, Kim SH, Keum WS, et al. Lethal hepatic injury by combined treatment of radiation plus chemotherapy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57:282–288.
16. Jung YM, Jang KT, Lee YS, Lim IK, Kim MR, Lee MJ, et al. The relevance of degree of liver fibrosis, Ito cell, and PKC activity in hepatic fibrogenesis. *Korean J Hepatol* 1998;4:381–392.
17. Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, et al. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001;42:1–8.
18. Kim KH, Bae JH, Cha SW, Han SS, Park KH, Jeong TC. Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. *Toxicol Lett* 2000;114:225–235.
19. Jeong TC, Gu HK, Park JI, Yun HI, Kim HC, Ha CS, et al. Pretreatment of male BALB/c mice with beta-ionone potentiates thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 1999;105:39–46.
20. Alkira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990;4:2860–2867.
21. Mantovani L, Henschler R, Brach MA, Mertelsmann RH, Herrmann F. Regulation of gene expression of macrophage-colony stimulating factor in human fibroblasts by the acute phase response mediators interleukin (IL)-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and IL-6. *FEBS Letter* 1991;280:97–102.
22. Blobe GC, Schiermann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Eng J Med* 2000; 342:1350–1358.
23. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Role of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793–807.
24. Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:123–126.
25. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human Type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265: 11077–11082.
26. Mastrianni CM, Liuzzi GM, D'Ettorre G, Lichtner M, Forcina G, Di Campli NF, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients co-infected with HCV and HIV. *HIV Clin Trials* 2002;3:310–315.
27. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14:163–176.
28. Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, et al. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285: L1026–1036.