

사염화탄소에 의한 흰쥐의
급성 간손상에서 간성상세포
사멸의 경과와 특성

연세대학교 대학원

의 학 과

김 경 철

사염화탄소에 의한 흰쥐의
급성 간손상에서 간성상세포
사멸의 경과와 특성

지도 문 영 명 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 경 철

김경철의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 격려와 충고로 지도하여 주신 문영명 교수님께 진심으로 감사드리며 본 연구와 논문을 위하여 자상하신 배려와 아낌없는 조언으로 이끌어 주신 박찬일 교수님, 박전한 교수님, 김원호 부교수님, 이관식 부교수님께 깊은 감사를 드립니다.

바쁜 일과 중에도 실험을 도와주신 박영년 조교수님과 박규은 조교수님께도 진심으로 감사를 드리며, 아울러 물심양면으로 성원해 주신 포천중문의대 소화기내과학교실의 모든 교수님들께 감사를 드립니다.

하나님과 항상 사랑으로 보살펴 주시는 부모님께 감사드리며, 결실의 기쁨을 아내와 희진, 태훈이와 함께 나누고자 합니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 방법	5
가. 간성상세포 분리	5
나. [³ H]thymidine uptake 측정	5
다. Annexin-V 결합의 유세포분석	5
라. 면역조직화학 염색	6
(1) TUNEL(Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling) 검사	6
(2) Desmin 염색	6
(3) 판독	6
마. Western blot	6
바. 통계분석	7
III. 결 과	7
1. 간성상세포 증식도의 변화	7
2. 분리한 간성상세포 사멸의 변화	8
3. 조직에서 간성상세포 수 및 사멸의 변화	8
가. 조직에서 간성상세포 수의 변화	8
나. 조직에서 간성상세포 사멸의 변화	11
4. 조직 및 분리 간성상세포 사이에서 세포사멸의 상관관계	11
5. 세포사멸 관련인자의 발현 양상	12
가. Fas 발현의 변화	12
나. p53 및 p21 발현의 변화	12
다. bcl-2 및 bax 발현의 변화	13
VI. 고 찰	14
V. 결 론	18
참고문헌	19
영문요약	21

그 립 차 례

그림 1. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간성상세포 증식도의 시간에 따른 변화	7
그림 2. Annexin-V-FITC 결합의 유세포분석을 이용한 간성상세포 사멸의 평가	8
그림 3. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간성상세포 사멸의 시간에 따른 변화	9
그림 4. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간조직의 desmin에 대한 면역조직화학적 염색 소견	9
그림 5. 사염화탄소에 의한 급성 간손상의 흰쥐 간조직에서 간성상세포 수의 시간에 따른 변화	10
그림 6. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간조직의 TUNEL 및 desmin에 대한 면역조직화학적 이중염색 소견	10
그림 7. 사염화탄소에 의한 급성 간손상의 흰쥐 간조직에서 간성상세포 사멸의 시간에 따른 변화	11
그림 8. 사염화탄소 투여 후 간조직에서 분리한 간성상세포의 annexin-V 양성/PI 음성 세포의 핵분율과 간조직의 desmin 양성/TUNEL 양성 세포수간의 상관관계	12
그림 9. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 Fas 발현의 변화	12
그림 10. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 p53 및 p21 발현의 변화	13
그림 11. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 bcl-2 및 bax 발현의 변화	13
그림 12. 사염화탄소 투여 후 간성상세포의 증식도, 수 및 사멸의 시간에 따른 변화	15

사염화탄소에 의한 흰쥐의 급성 간손상에서 간성상세포 사멸의 경과와 특성

간섬유화(hepatic fibrosis)는 세포외기질의 증가로 특징지워지며, 세포외기질은 활성화된 간성상세포(hepatic stellate cell)에서 주로 생성된다. 따라서 활성화된 간성상세포는 간섬유화 유발에서 핵심적인 역할을 한다. 간섬유화는 간손상에 대한 조직의 복구 과정이며 간경변증과는 달리 가역적인 단계로 실질조직 복구가 완결되면 진행을 멈추거나 소실된다고 알려져 있다. 그러나 이러한 가역적 간섬유화에서 활성화 및 증식되었던 간성상세포가 세포외기질을 생성하는 역할을 마친 후 어떤 운명에 처하는지 또는 어떤 기전으로 제거되는지는 정확히 밝혀지지 않았다. 세포 또는 조직의 항상성을 유지하는 기전 중 세포증식에 대한 보완적 기전으로 세포사멸(apoptosis)이 알려지고 있다. 따라서 급성 간손상 후에도 간섬유화가 멈추거나 소실되는 과정에는 간성상세포 증식과 사멸간 균형의 변화가 관여할 수 있다는 가정을 세울 수 있다.

이에 본 연구에서는 사염화탄소 투여로 유발된 급성 간손상/간섬유화의 생체 모델에서 간성상세포의 증식과 사멸의 관계에 대하여 분석하고자 하였다. 흰쥐에 사염화탄소를 1회 투여하여 급성 간손상 및 가역적인 간섬유화를 유발하고, 그 과정에서 간성상세포의 증식 및 사멸의 정도와 사멸에 관련된 인자들의 발현을 관찰하였다. 사염화탄소 투여 후 일정한 시간(16시간, 32시간, 48시간, 64시간, 80시간, 4일, 7일)에 흰쥐를 희생시킨 후 간조직에서 desmin 염색과 TUNEL 검사를 시행하여 간성상세포 수의 변화와 사멸을 측정하였다. 한편 일부 간조직으로부터 간성상세포를 분리한 후 [³H] thymidine uptake 검사로 간성상세포의 증식을 측정하였고, annexin-V-FITC 결합을 유세포분석하여 간성상세포 사멸을 측정하였으며, Western blot으로 간성상세포에서 사멸 관련인자(Fas, p53, p21, bcl-2 및 bax)의 발현을 측정하였다. 그 측정치를 사염화탄소를 투여하지 않은 대조군과 비교한 결과는 다음과 같다.

1. 간성상세포의 증식도를 반영하는 [³H]thymidine uptake의 정도는 사염화탄소 투여 후 증가하여 32시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다.
2. 유세포분석으로 관찰한 annexin-V-FITC 결합은 사염화탄소 투여 후 16시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다.
3. 조직에서 desmin 양성인 간성상세포 수(400배 10부위의 합)는 사염화탄소 투여 후 증가하여 48시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다. Desmin 양성이면서 TUNEL 양성인 간성상세포 수는 사염화탄소 투여 후 32시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다.

4. 조직에서 TUNEL 양성 간성상세포 수와 분리한 간성상세포의 annexin-V-FITC 양성인 세포의 백분율간 유의한 상관관계가 있었다($r=0.606$, $p<0.01$).

5. 분리한 간성상세포의 Western blot 결과 Fas는 사염화탄소 투여 후 48시간부터 발현되기 시작하여 4일까지 발현되었고, p53는 32시간에서 발현되었으며, p21은 32시간부터 4일까지 지속적으로 발현되었다. Bcl-2는 16시간부터 발현되기 시작하여 80시간까지 발현되었으며 bax는 64시간부터 4일까지 발현되었다.

이상의 결과를 종합하면 사염화탄소에 의한 급성 간손상/간섬유화 과정에서 간손상 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나면서 간성상세포의 수가 증가되고, 이후 간성상세포 사멸이 일어나면서 간성상세포의 수가 감소함을 알 수 있었으며, 사멸 관련인자들이 간손상 이후 시간에 따라 다양하게 간성상세포에서 발현되어 사멸에 관여함을 알 수 있었다. 따라서 간성상세포 사멸은 생체 내에서 활성화된 간성상세포의 수를 조절하는 역할을 하며, 급성 간손상 후의 가역적 간섬유화는 활성화된 간성상세포의 세포사멸 기전에 의해 조절되기 때문이라고 생각한다.

핵심되는 말: 간성상세포, 세포사멸, 간섬유화, 급성 간손상, 사염화탄소

사염화탄소에 의한 흰쥐의 급성 간손상에서 간성상세포 사멸의 경과와 특성

<지도 문 영 명 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 경 철

I. 서 론

전 인구의 5~10% 이상이 B형 간염 바이러스 보유자인 우리 나라에서는 만성 간질환이 성인병 및 사망의 중요한 원인으로 알려져 있다.¹ 간섬유화는 만성 간질환의 진행과정에서 동반될 수 있는 병태생리학적 소견으로 만성 간질환의 진행 및 예후와 깊은 관련이 있다.² 간섬유화가 계속되면 결국 간경변증으로 진행하게 되므로 간섬유화의 정도는 만성 간질환의 경과와 예후의 예측에 있어 매우 중요한 인자이며, 간섬유화의 과정을 이해하고 연구하는 것은 간경변증을 유발할 수 있는 질환을 해결하는데 가장 기본적인 단계라고 할 수 있다.³ 간섬유화는 세포외기질의 증가로 유발되고 세포외기질은 교원질, 당단백질 및 프로테오글라이칸(proteoglycan) 등으로 구성된다.^{4,5} 이 중 특히 교원질의 증가는 간섬유화의 중요한 원인이 되고 교원질은 여러 가지 원인에 의해 활성화된 간성상세포에서 주로 생성된다.^{6,7} 따라서 간성상세포에 대한 연구가 간섬유화 연구의 핵심이 된다고 할 수 있다. 간성상세포는 덧제강(space of Disse)에 위치한 세포로서 여러 가지 원인에 의해 자극이 되면 증식하고 활성화되어 근섬유모세포 형태의 세포로 변화하여 각종 세포외기질을 생성하여 결국 간섬유화를 유발하게 된다.^{8,9}

일반적으로 간섬유화는 간경변증과는 달리 가역적이어서 간손상의 원인이 소실되면 정상 회복이 가능하지만, 이러한 간섬유화의 과정이 반복적으로 지속되면 세포외기질간의 교환결합이 증가하여 비가역적인 간경변증으로 진행하게 된다.^{6,7} 간섬유화는 간손상에 대한 조직의 복구 과정이며, 복구가 완결되면 간섬유화는 종결되고 회복되는 것으로 알려져 있다.^{4,10} 그러나 이에 관여하는 기전에 대해서는 아직 잘 모르는 상태이다. 즉 간섬유화에서 핵심적인 역할을 하는 간성상세포가 증식되고 활성화되어 세포외기질을 생성하는 임무를 마친 후 어떤 운명에 처하는지 또는 어떤 기전으로 제거되는지 알려져 있지 않다. 그

동안 간성상세포의 활성화에 관여하는 인자에 대한 연구는 많이 진행되어 일부 밝혀졌으나, 활성화된 간성상세포의 운명내지는 수명에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 세포 또는 조직의 항상성을 유지하기 위한 기전 및 세포증식에 대한 보완적 기전으로 세포사멸이 알려지고 있고^{11,12} 세포의 수는 세포증식과 세포사의 균형에 의하여 유지된다.¹³ 간섬유화에서도 간섬유화가 종결되고 회복되는 과정에는 간성상세포의 증식과 세포사 사이의 균형 변화가 관여할 수 있다.¹⁴⁻¹⁶

활성화된 간성상세포는 세포외기질을 생성함으로써 간섬유화의 핵심적인 역할을 하므로 활성화된 간성상세포가 제거되는 과정에 대한 연구는 간섬유화 억제에 대한 연구의 중요한 작업이라고 할 수 있다. 간성상세포 수의 균형을 유지하는데 간성상세포의 무한정적인 증식을 견제하기 위해서는 간성상세포의 사멸이 관여할 수 있다는 가정을 세울 수 있다. 따라서 간성상세포 사멸에 대한 연구는 간섬유화가 종결되고 회복되는 과정을 이해하는데 기본적인 지식을 제공할 수 있으며, 결국 이러한 간섬유화가 종결되는 경로의 조절을 통해 간섬유화의 조절 및 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

현재까지 제한적으로 시행된 간성상세포의 사멸에 대한 연구는 주로 생체 외(*in vitro*) 연구^{17,18}가 대부분이고 생체연구는 거의 없으며, 생체연구¹⁹도 주로 조직에서 관찰하였고 간성상세포를 분리하여 시행한 연구는 없다. 일반적으로 간성상세포는 지방소적을 함유하고 있는 특성을 이용하여 부유시켜서 분리하는데 사멸이 진행중인 세포의 분리가 가능한지, 분리한 세포를 이용한 사멸 연구가 가능한 지도 아직 밝혀져 있지 않다. 또한 시간에 따른 자세한 변화를 관찰한 연구도 드물다. 생체 외 배양 간성상세포에서는 일부 사멸 관련인자 [Fas, p53, bcl-2/bax 계(family)]가 주요 인자로 제시되었으나, 생체 내(*in vivo*)에서도 활성화된 간성상세포에서 발현되어 사멸에 관여하는지 아직 확인되지 않았다.

이에 본 연구에서는 사염화탄소 투여로 유발된 급성 간손상/간섬유화의 생체 모델에서 간성상세포의 증식에 대별되는 사멸을 평가하고자 하였다. 흰쥐에서 사염화탄소를 1회 투여하여 급성 간손상 및 가역적인 간섬유화를 유발시킨 후 회복되는 과정에서 간성상세포의 증식도 및 세포사멸도의 시간에 따른 변화와 사멸에 관련된 인자들인 Fas, p53, p21, bcl-2, bax의 시간에 따른 변화를 살펴봄으로써 간섬유화가 종결되고 회복되는 과정을 이해하는 생체 모델을 확립하고 간섬유화에서 간성상세포 사멸의 역할을 알아보며, 사멸 관련 인자들의 생체 내 발현양상을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

체중 100 g 정도의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 사용하였다. 사염화탄소를 광유와 1 : 3 (vol : vol)으로 혼합하여 2 ml/kg를 복강 내에 투여하였고, 사염화탄소 투여 전(대조군) 및

투여 후 16시간, 32시간, 48시간, 64시간, 80시간, 4일 및 7일에 각각의 시기마다 10마리의 흰쥐에서 간장을 적출한 후 간장 조직 일부는 파라핀 고정조직을 만들었고 나머지에서 간성상세포를 분리하였다. 또한 간성상세포의 증식을 측정하기 위해 희생시키기 4시간 전에 30 μCi 의 [^3H]thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 복강 내에 투여하였다.

2. 방법

가. 간성상세포 분리

흰쥐의 간장을 적출한 후 프로나제(pronase)와 콜라게나제(collagenase) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)가 함유된 Hank's 완충액 내에서 잘게 썰고 37°C 진탕 수조에서 30분간 분해시킨 후, 거즈를 이용하여 걸러내고 원심분리하여 세포를 얻었다. 침전된 세포를 Schwartz 완충액으로 3~4회 세척한 후 Nycodenz (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 이용한 밀도 차이법(density gradient)으로 간성상세포를 부유시키고(1000 g, 4°C, 20분), 부유된 세포를 취한 후 원심분리하여 간성상세포를 얻었다.²⁰⁻²³ 간성상세포는 328 nm의 파장에서 전형적인 자가형광을 보이고 oil red로 지질 소적이 염색되는 특징과 desmin에 대한 단클론 항체로 면역조직화학 염색을 이용하여 확인하였는데²⁰ 분리된 세포의 95% 이상이 간성상세포이었다. 분리된 세포의 일부는 즉시 유세포분석을 하였고, 나머지 간성상세포는 -70°C에 냉동 보관하여 이후 [^3H]thymidine uptake 검사와 세포사멸 관련 인자 분석실험에 사용하였다.

나. [^3H]thymidine uptake 측정

분리한 간성상세포를 트리졸(Trizol) 용액(GIBCO BRL Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.) 및 클로로포름(chloroform)으로 처리하고, 원심분리 (12000 g, 4°C, 15분)한 후에 얻은 하층액에 100% 에타놀을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 이 DNA 압착결정(DNA pellet)을 0.1 M 염화구연산(sodium citrate) 및 75% 에타놀로 수 차례 세척한 후 건조시키고 8 mM 수산화나트륨(NaOH)에 녹였으며 OD 260 nm에서 10 μg 을 취하여 베타 측정기(Beta counter)로 방사능을 측정하였다.²⁴

다. Annexin-V 결합의 유세포분석

사멸세포를 정량적으로 측정하고자 간성상세포의 annexin-V 결합을 propidium iodide (PI)를 첨가하는 이중 염색을 이용하여 유세포분석기로 관찰하였다. 분리한 간성상세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 세포부유액 100 μl (2×10^6 세포/ml)에 결합완충액 400 μl 를 첨가한 후 5 μl (1 $\mu\text{g/ml}$) annexin-V-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Pharmin-gen, Becton Dickinson Co., San Diego, CA, U.S.A.) 와 10 μl (2 $\mu\text{g/ml}$) PI (Sigma Chemical Co.)를 첨가하여 실온 암실에서 15분간 반응시킨 후 유세포분석기(EPICS XL, Beckman Coulter Inc., CA, U.S.A.)로 판독하였다. Annexin-V-FITC 형광도를 X축으로 PI 형광도를 Y

축으로 하여 annexin-V-FITC 및 PI에 염색되는 세포의 백분율을 측정하였다. Annexin-V 양성/PI 음성을 세포사멸로, annexin-V 양성/PI 양성을 세포괴사로 판단하였다.²⁵

라. 면역조직화학 염색

(1) TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling) 검사
파라핀 고정 간조직에서 3 μm 절편을 만든 후 자일렌과 에탄올을 이용하여 탈파라핀 한 후 40 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K (Sigma, Chemical Co.)로 37°C에서 10분간 반응시키고 Apotag kit (Oncor, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 사용하여 염색하였다. 즉, 평형 완충액으로 10분간 처리한 뒤 digoxigenin-dUTP와 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소가 포함된 working strength TdT 용액 55 μl 를 섞어 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 정지/세척 용액으로 10분간 효소반응을 중단시키고 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase를 30분 동안 반응시킨 다음 NBT-BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphate: Sigma Chemical Co.)로 10~15분간 발색시켰다.

(2) Desmin 염색

파라핀 고정 간조직에서 3 μm 절편을 만든 후 자일렌과 에탄올을 이용하여 탈파라핀 한 후 peroxidase 차단액 3% 과산화수소를 5분간 처리한 후 단백질 차단액을 5분간 처리하였다. 1차 항체인 desmin (DAKO, Glostrup, Denmark)을 1 : 10000으로 희석하여 15분간 반응시킨 후 Tris-buffered saline (TBS) 완충액으로 10분간 세척하고 biotin이 부착된 2차 항체를 15분간 반응시켰다. 완충액으로 세척한 후 DAKO-CSA (catalyzed signal amplification) kit (DAKO)를 이용하여 streptavidin-biotin-HRP (horseradish peroxidase) complex를 15분간 반응시키고, 증폭시약 biotinyl tyramide를 도포하여 15분간 반응시켰다. 완충액으로 세척한 후 streptavidin-peroxidase (HRP)를 15분간 반응시키고 AEC (3-amino, 9-ethyl-carbazole: DAKO)로 3~5분간 발색시켰다.

(3) 판독

Desmin 염색으로 간성상세포를 확인하고 TUNEL염색으로 사멸세포를 구분하였다. 간성상세포 수의 변화를 보기 위해 400배상에서 desmin 양성 세포의 수를 세었고 각 조직당 10개 부위를 관찰하여 합을 구하였다. 사멸 간성상세포의 변화를 보기 위해서는 400배상에서 desmin 양성이며 TUNEL 양성인 세포를 세었고 각 조직당 10개 부위를 관찰하여 합을 구하였다.

마. Western blot

분리한 간성상세포를 RIPA 완충액 (1×PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, 30 $\mu\text{l/ml}$ aprotinin)을 이용하여 용해시키고 원심분리하여 (10000 g, 4°C, 10분) 상층액을 얻고, Bradford 방법²⁶으로 OD 595 nm에서 단백질을 정량하여 10 μg 씩을 취하여, 10% (Fas, p53) 또는 16% (p21, bax, bcl-2) SDS-폴리아크릴아마이드겔에서 전기 영동하였다. 겔을 나이트로셀룰로오스막(nitrocellulose mem-

brane)에 0.5 A로 2시간 동안 전이한 후 이 막을 4°C에서 5% 탈지 우유(nonfat milk)로 밤새 blocking 시켰다. PBS-T (phosphate-buffered saline-Tween 20) 용액으로 수 차례 세척한 후 Fas, p53, p21, bax bcl-2에 대한 1차 항체(이상 모두 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)와 각각 반응시키고 수 차례 세척한 후 HRP가 부착된 2차 항체(DAKO)를 반응 시켰다. 수 차례 세척한 후 화학발광법(chemiluminescence, NEN™ Life Science, Boston, MA, U.S.A.)으로 감광하였다.

바. 통계분석

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군(시간에 따른)간의 유의차 검정은 일원 분산분석(One-Way ANOVA test)을 이용하였고, 검사 결과간 상관성 검증은 Pearson's correlation test를 이용하였다. 검정시 유의수준은 p값이 0.01 미만인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 간성상세포 증식도의 변화

분열 세포의 핵에 표지됨으로써 간성상세포의 증식도를 반영하는 [³H]thymidine uptake의 정도(cpm)는 사염화탄소 투여 전 및 투여 후 16, 32, 48, 64, 80시간, 4일, 7일에 각각 65.4±13.7, 87.5±21.8, 532.2±211.8, 304.3±141.6, 167.5±61.9, 107.2±42.3, 79.8±15.9, 67.5±14.7

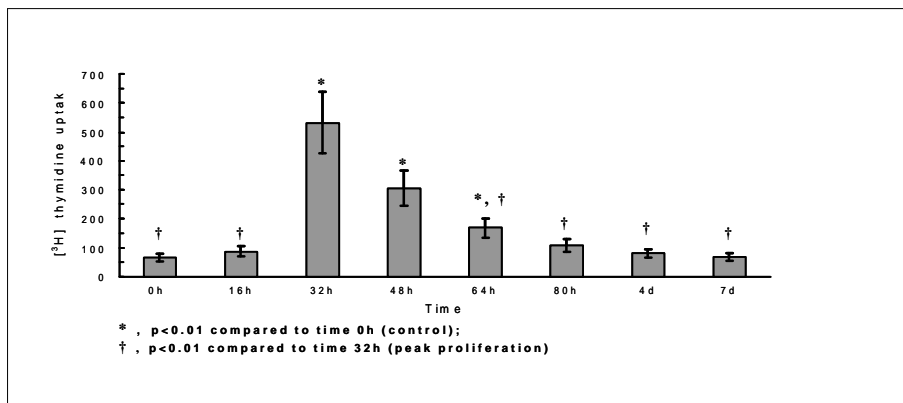


그림 1. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간성상세포 증식도의 시간에 따른 변화. 사염화탄소를 광유와 1 : 3 (vol : vol)으로 혼합하여 2 ml/kg를 흰쥐의 복강 내에 투여하였고, 희생시키기 4시간 전에 30 μ Ci의 [³H]thymidine를 복강 내 투여하고 시간에 따라 10마리씩 희생시킨 후 간성상세포를 분리하여 DNA 10 μ g을 취한 다음 방사능을 측정하였다. 간성상세포의 [³H]thymidine uptake의 정도(cpm)는 사염화탄소 투여 후 증가하여 32시간에서 가장 높았으며(p<0.01), 이후 점차 감소하는 양상을 보여 80시간에 대조군치에 도달하였다. *, p<0.01 compared to time 0h (control); †, p<0.01 compared to time 32h (peak proliferation).

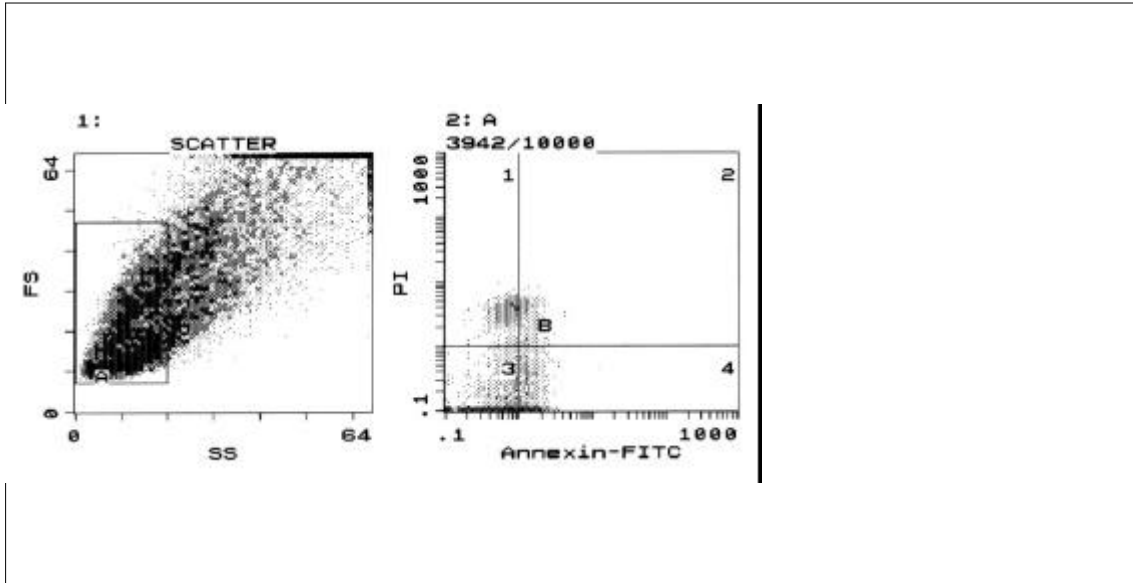


그림 2. Annexin-V-FITC 결합의 유세포분석을 이용한 간성상세포 사멸의 평가. 분리한 간성상세포에 annexin-V-FITC와 PI를 첨가하여 반응시킨 후 유세포분석기로 분석하였다. Scattergram으로 세포파편(cell debris)을 배제한 후(A) annexin-V-FITC 형광도를 X축으로 PI 형광도를 Y축으로 하여 annexin-V-FITC 및 PI에 염색되는 세포의 백분율을 측정하여, annexin-V 양성/PI 음성(그림 B의 4구역)을 세포사멸로 annexin-V 양성/PI 양성(그림 B의 2구역)을 세포괴사로 판단하였다(B).

이었다. 사염화탄소 투여 후 증가하여 32시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 점차 감소하는 양상을 보였다(그림 1).

2. 분리한 간성상세포 사멸의 변화

분리한 간성상세포에서 사멸을 관찰하고자 유세포분석으로 annexin-V-FITC 결합을 본 결과(그림 2) annexin-V-FITC 양성/PI 음성인 사멸세포(%)는 사염화탄소 투여 전 및 투여 후 16, 32, 48, 64, 80시간, 4일, 7일에 각각 7.2 ± 5.1 , 31.8 ± 6.2 , 35.6 ± 12.5 , 39.9 ± 16.0 , 56.5 ± 11.7 , 46.1 ± 16.5 , 41.6 ± 21.0 , 36.0 ± 15.5 이었다. 사염화탄소 투여 후 16시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 점차 감소하는 양상을 보였다(그림 3).

3. 조직에서 간성상세포 수 및 사멸의 변화

조직에서 간성상세포 사멸을 관찰하고자 desmin 염색으로 간성상세포를 확인하고 TUNEL 검사로 사멸세포를 구분하였다.

가. 조직에서 간성상세포 수의 변화

고배율 400배의 광학 현미경하에 desmin 양성 세포를 관찰하여(그림 4) 10개 부위에서 양성세포 수의 합을 구하였다. Desmin 양성인 간성상세포 수는 사염화탄소 투여 전 및 투

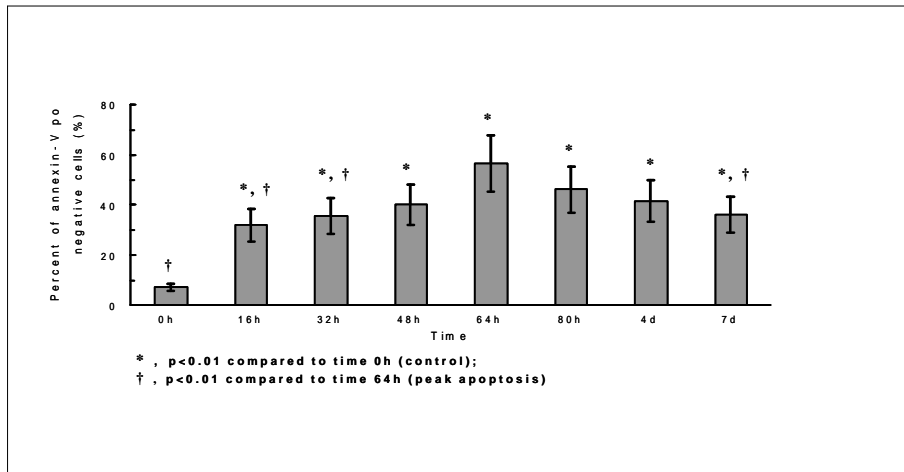


그림 3. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간성상세포 사멸의 시간에 따른 변화. 사염화탄소 투여 후 시간에 따라 분리한 간성상세포를 annexin-V-FITC와 PI로 이중염색하여 유세포분석을 시행하였다. Annexin-V-FITC 양성/PI 음성인 사멸세포(%)는 사염화탄소 투여 후 16시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다. *, $p < 0.01$ compared to time 0h (control); †, $p < 0.01$ compared to time 64h (peak apoptosis).

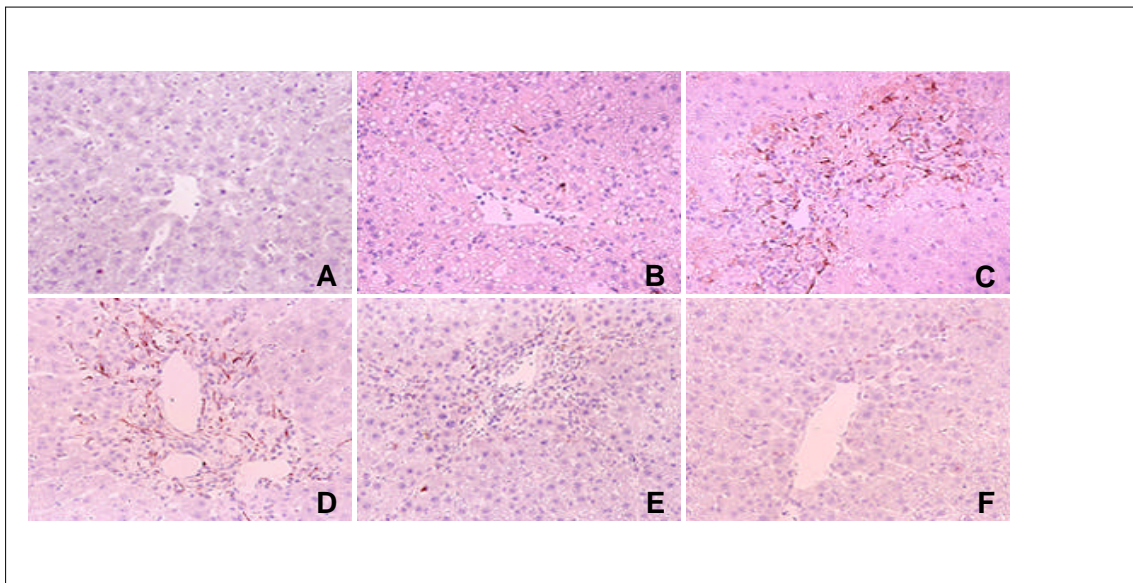


그림 4. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간조직의 desmin에 대한 면역조직화학 염색 소견($\times 200$). 사염화탄소 투여전의 대조군(A)에서는 desmin 양성세포가 관찰되지 않았으나, 사염화탄소 투여 후 16시간(B)부터 일부 관찰되기 시작하여 48시간(C)에 가장 많은 수가 관찰되었으며 그 이후로 감소하여 7일(F)에는 관찰되지 않았다. D, 80시간; E, 4일.

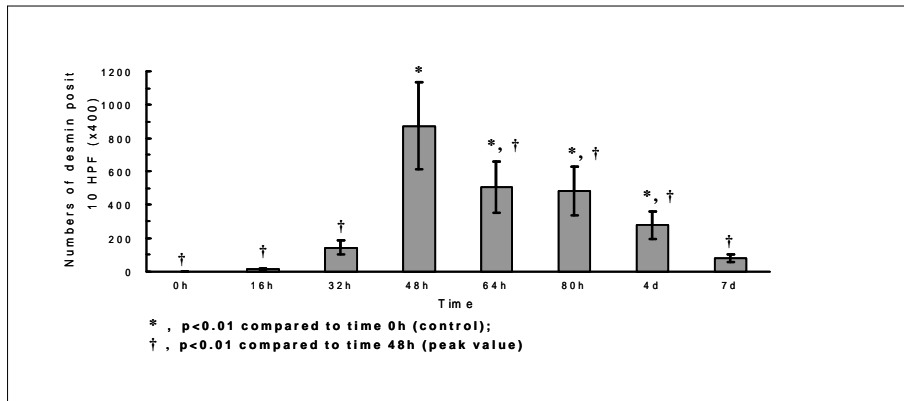


그림 5. 사염화탄소 투여 흰쥐 간조직에서 간성상세포 수의 시간에 따른 변화. Desmin 양성인 간성상세포 수(400배 10개 부위의 합)는 사염화탄소 투여 후 증가하여 48시간에서 가장 높았으며(p<0.01), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다. *, p<0.01 compared to time 0h (control); †, p<0.01 compared to time 48h (peak value).

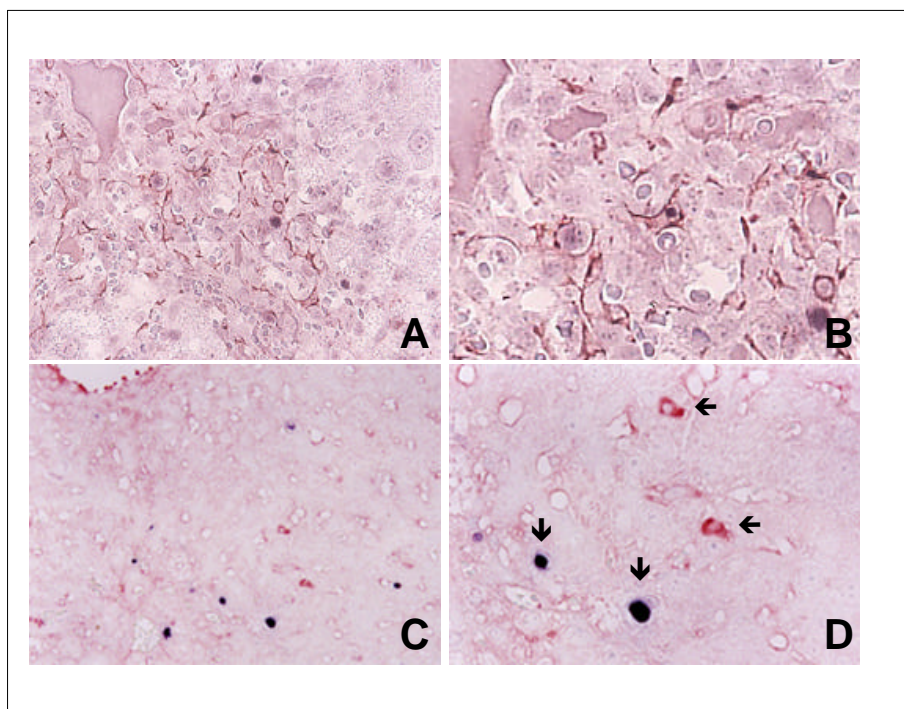


그림 6. 사염화탄소에 의한 급성 간손상에서 흰쥐 간조직의 TUNEL 및 desmin에 대한 면역조직화학적 이중염색 소견. 사염화탄소 투여 후 64시간의 소견으로 desmin 양성/TUNEL 양성인 간성상세포가 다수 관찰되었다[A (×200), B (×400)]. 시간에 따라 각 조직마다 400배의 고배율 10개 부위에서 desmin 양성/TUNEL 양성 세포의 합을 구하였다. 사염화탄소 투여 후 32시간의 소견으로 desmin 양성/TUNEL 음성인 간성상세포(◀)와 desmin 음성/TUNEL 양성인 간세포(↓)가 관찰되는데 이러한 세포들은 합을 구하는데 있어 배제하였다[C (×200), D (×400)].

여 후 16, 32, 48, 64, 80시간, 4일, 7일에 각각 0.0 ± 0.0 , 14.4 ± 11.1 , 143.7 ± 86.8 , 872.7 ± 313.2 , 504.8 ± 88.4 , 481.4 ± 129.9 , 276.0 ± 153.1 , 77.8 ± 37.16 이었다. 사염화탄소 투여 후 증가하여 48시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다(그림 5).

나. 조직에서 간성상세포 사멸의 변화

광학현미경하에 400배의 고배율 10개 부위에서 desmin 양성인면서 TUNEL 양성인 세포의 합을 구하였다(그림 6). Desmin 양성인면서 TUNEL 양성인 간성상세포 수는 사염화탄소 투여 전 및 투여 후 16, 32, 48, 64, 80시간, 4일, 7일에 각각 0.0 ± 0.0 , 3.6 ± 3.5 , 39.5 ± 13.3 , 89.2 ± 19.8 , 163.0 ± 74.98 , 83.8 ± 21.3 , 36.8 ± 7.4 , 26.0 ± 17.9 이었다. 사염화탄소 투여 후 32시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다(그림 7).

4. 조직 및 분리 간성상세포 사이에서 세포사멸의 상관관계

조직에서 desmin 양성/TUNEL 양성 간성상세포 수와 분리된 간성상세포의 annexin-V-FITC 양성/PI 음성인 세포의 핵분율의 상관관계를 분석한 결과 상관관계수(r) 0.606로 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.01$)(그림 8).

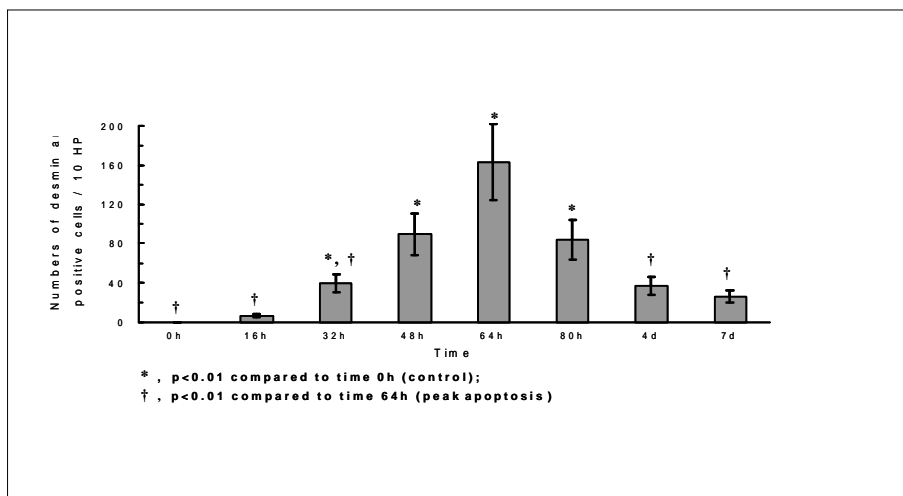


그림 7. 사염화탄소에 의한 급성 간손상의 흰쥐 간조직에서 간성상세포 사멸의 시간에 따른 변화. Desmin 양성인면서 TUNEL 양성인 간성상세포 수(400배 10개 부위의 합)는 사염화탄소 투여 후 32시간부터 유의하게 증가하여 64시간에서 가장 높았으며($p < 0.01$), 이후 시간에 따라 점차 감소하였다. *, $p < 0.01$ compared to time 0h (control); †, $p < 0.01$ compared to time 64h (peak apoptosis).

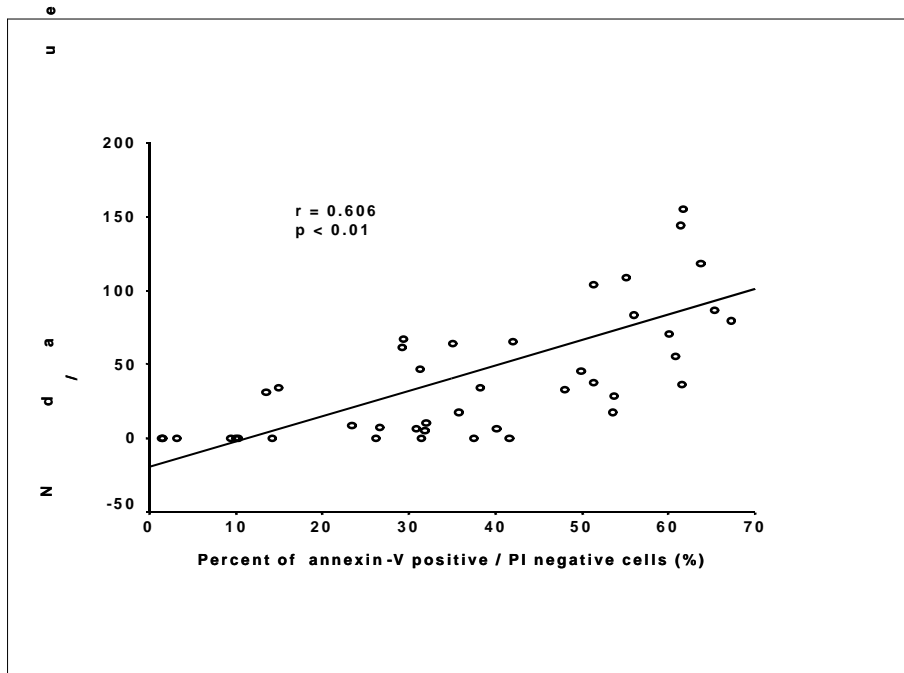


그림 8. 사염화탄소 투여 후 간조직에서 분리한 간성상세포의 annexin-V 양성/PI 음성 세포의 핵분율과 간조직의 desmin 양성/TUNEL 양성 세포 수간의 상관관계. 조직에서 desmin 양성/TUNEL 양성 간성상세포 수와 분리된 간성상세포의 annexin-V-FITC 양성/PI 음성인 세포의 핵분율의 상관관계를 분석한 결과 상관관계수(r) 0.606로 유의한 상관관계가 있었다 ($p < 0.01$).

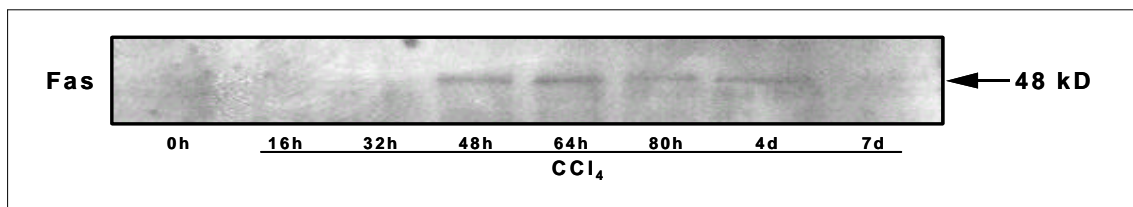


그림 9. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 Fas 발현의 변화. 사염화탄소 투여 후 48시간부터 발현되기 시작하여 4일까지 발현되었으나 7일째는 발현되지 않았다.

5. 세포사멸 관련인자의 발현 양상

가. Fas 발현의 변화

세포사멸의 중요한 사멸 수용체인 Fas의 Western blot 결과, 사염화탄소 투여 후 48시간부터 발현되기 시작하여 4일까지 발현되었으나 7일째는 발현되지 않았다(그림 9).

나. p53 및 p21 발현의 변화

세포사멸에 관여하는 주된 유전자의 하나인 p53의 Western blot 결과 사염화탄소 투여

후 32시간에서 매우 강하게 발현되었으며, 그 외에 다른 시기에서는 발현을 관찰할 수 없었다(그림 10). p53에 의해 전사되고 세포분열을 억제하는 p21는 사염화탄소 투여 후 32시간부터 뚜렷한 띠의 형성이 관찰되어 4일까지 지속적으로 관찰되었다(그림 10).

다. **bcl-2** 및 **bax** 발현의 변화

p53에 의해 전사가 억제되고 bax와의 길항작용으로 세포사멸을 억제하는 bcl-2의 Western blot 결과, 사염화탄소 투여 후 16시간부터 발현되기 시작하여 80시간까지 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 11). p53에 의해 전사가 증가되며 세포사멸에 관여하는 유전자인 bax는 사염화탄소 투여 후 48시간까지는 발현되지 않았으나 64시간부터 4일까지는 뚜렷하게 발현되었으며 7일에는 약하게 발현되었다(그림 11).

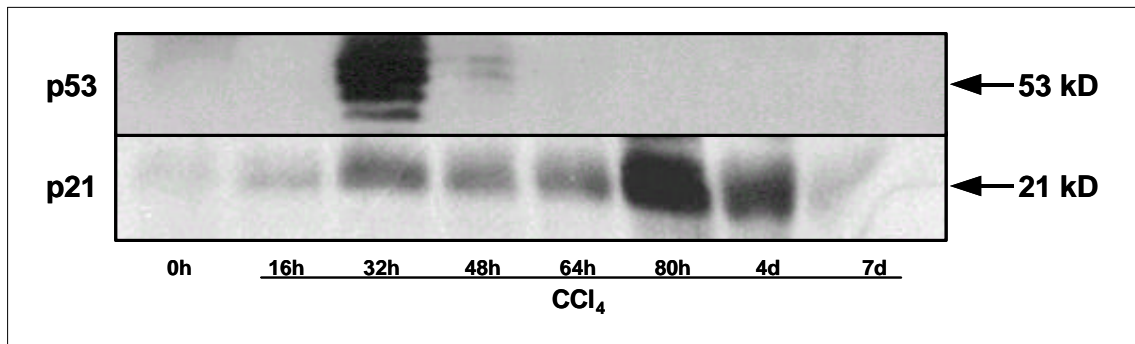


그림 10. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 p53 및 p21 발현의 변화. p53은 사염화탄소 투여 후 32시간에 매우 강하게 발현되었으며, 다른 시기에서는 발현을 관찰할 수 없었다. p21은 사염화탄소 투여 후 32시간부터 발현되기 시작하여 4일까지 지속적으로 발현되었다.

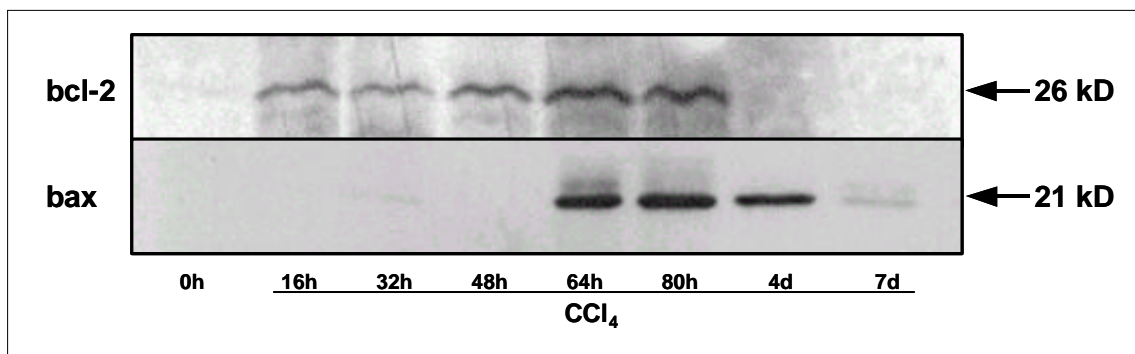


그림 11. 사염화탄소 투여 후 시간에 따른 간성상세포 bcl-2 및 bax 발현의 변화. Bcl-2는 사염화탄소 투여 후 16시간부터 발현되기 시작하여 80시간까지 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며 bax는 사염화탄소 투여 후 48시간까지는 발현되지 않았으나 64시간부터 발현되기 시작하여 4일까지 발현되었다.

IV. 고 찰

여러 가지 원인에 의해 간세포가 손상을 받으면 여러 세포들의 상호작용에 의해 각종 사이토카인(cytokine) 및 산소 유리기(oxygen free radical) 등이 생성되면서 세포외기질이 손상을 받게 되고, 이로 인해 세포외기질의 이상 증식이 유발되면 간섬유화로 진행하게 된다. 세포외기질 중 특히 교원질 생성이 증가하거나, 교원질을 분해시키는 효소가 감소하거나, 교원질을 생성하는 세포의 수가 증가하면 간섬유화가 유발된다.^{4,7}

교원질은 여러 가지 원인에 의해 활성화된 간성상세포에서 주로 생성된다.^{8,9} 간성상세포는 어떠한 원인의 간손상에도 활성화될 수 있으며, 손상을 받은 간세포나 활성화된 쿠퍼세포 등에서 분비된 여러 가지 사이토카인이나 산화성 스트레스 등에 의해 간성상세포가 증식 및 활성화되고 활성화를 억제하고 있던 기저막을 손상시키면 간성상세포가 더욱 활성화된다. 활성화된 간성상세포는 각종 성장인자에 대한 반응이 증가하여 교원질 유전자의 전사율이 증가되며,⁸ 근섬유모세포 형태의 세포로 변화하여 알파 평활근액틴과 같은 세포 골격 세사(cytoskeletal filament) 등이 표현된다. 비타민 A를 함유하고 있는 지방소적이 감소 또는 소실되며 증식성, 수축성, 섬유생성, 사이토카인 분비 및 기질 분해와 같은 기능적 특성을 갖게 된다.⁹

지금까지 간섬유화에 대한 연구는 세포외기질의 구성 요소에 대한 연구, 세포외기질의 축적과 관련된 세포의 규명 및 이들 세포의 활성화 기전에 대한 연구, 각종 사이토카인에 대한 연구, 기질을 분해하는 단백분해효소의 규명과 조절 기전에 대한 연구 및 항섬유화제에 대한 연구 등 여러 가지 방면으로 활발히 진행되어 왔다.^{4,5,8} 그동안 많은 연구에 의하여 간성상세포의 활성화에 관여하는 인자는 일부 밝혀졌으나 활성화된 간성상세포가 제거되는 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 사염화탄소 투여로 유발된 급성 간손상/간섬유화의 생체 모델에서 간성상세포 사멸을 시간에 따라 자세하게 변화를 관찰하였다. 사염화탄소의 단기 투여로 급성 간손상 및 일시적인 I형 교원질의 증가를 유발시킬 수 있고, 이것은 실험적인 간손상 및 간섬유화를 일으키는데 널리 이용되고 있다. 사염화탄소는 세포막의 지질과산화를 유발하여 간세포를 괴사시키며, 간성상세포에서 교원질 유전자의 활성화를 통해 교원질 생성을 증가시켜 간섬유화 및 간경변증을 유발시킬 수 있다.²⁷ 지질과산화에 의해 생성된 활성 알데히드는 교원질 유전자의 발현을 증가시키고,²⁰ 간성상세포의 활성 및 증식에 관여하며,²¹ 쿠퍼세포를 자극하여 TGF- β 와 같은 섬유화성 사이토카인의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.²⁸

간손상이 초래되면 여러 자극에 의해 간성상세포가 활성화되고 증식되어 세포외기질을 생성하여 간섬유화가 유발되는데 간손상이 지속적이지 않은 경우 간섬유화는 가역적이며

회복되는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 가역적 간섬유화에서 활성화 및 증식되었던 간성상세포가 세포외기질을 생성하는 임무를 마친 후 어떤 운명에 처하는지 또는 어떤 기전으로 제거되는지 정확히 밝혀지지 않았다. 본 연구 결과를 통해 활성화된 간성상세포에서 사멸이 활발히 일어나며 결국 사멸을 통해 제거됨을 알 수 있었다. 배양된 간성상세포를 이용한 생체 외 연구에서 활성화되지 않은 휴지기의 간성상세포(quiscent hepatic stellate cell)는 세포사멸에 저항성이 있으나 활성화될수록 세포사멸에 민감하다고 보고하고 있다.^{17,18} 본 연구에서 생체에서도 활성화된 간성상세포에서 세포사멸 과정이 활발히 일어난다는 것을 알 수 있었다.

간섬유화는 간손상에 대한 일종의 조직복구 또는 창상치유(wound healing) 과정으로 이해되고 있다. 따라서 간손상이 회복되고 복구가 종결되려면 무한정적인 간성상세포의 증식을 억제 또는 조절하는 제어 장치가 필요할 것이며 간성상세포의 사멸이 이러한 역할을 한다고 볼 수 있다. 즉, 세포사멸을 통해 간성상세포의 전체적인 수를 조절함으로써 무한정적인 증식을 억제하고 조직복구의 본연의 임무를 마친 후 조직의 항상성을 유지하기 위해 세포사멸을 통해 제거된다고 볼 수 있다. 본 연구에서도 간손상 직후 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나면서 간성상세포의 수가 증가되고, 이후에 간성상세포 사멸이 활발히 일어남에 따라 간성상세포의 수가 감소함을 알 수 있었다(그림 12).

간성상세포의 사멸에 대한 생체 내 연구는 생체 외 연구에 비해 미흡한 실정이며 제한

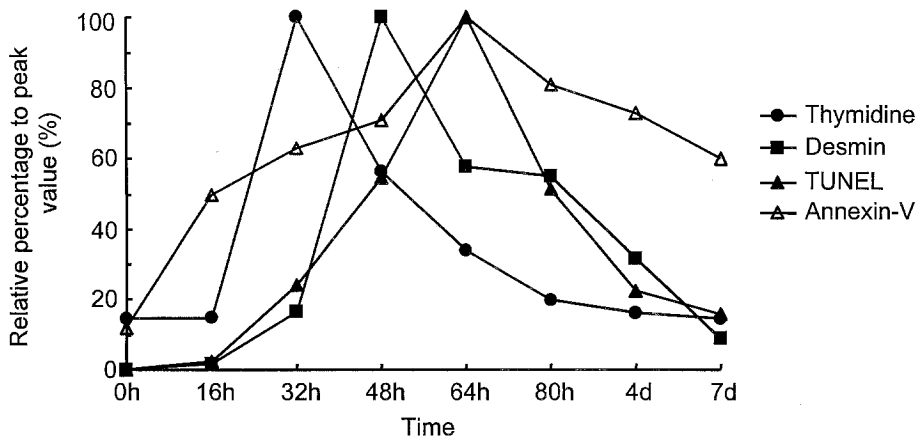


그림 12. 사염화탄소 투여 후 간성상세포의 증식도, 수 및 사멸의 시간에 따른 변화. [³H]thymidine uptake 검사로 간성상세포의 증식을 측정하였고(Thymidine), 간조직에서 desmin에 대한 면역조직화학염색으로 간성상세포의 수의 변화를 측정하였으며(Desmin), desmin과 TUNEL의 면역조직화학적 이중염색으로 조직에서 간성상세포의 사멸을 측정하였고(TUNEL), annexin-V-FITC 결합의 유세포분석을 통해 분리 간성상세포의 사멸을 측정하여(Annexin-V), 각각의 결과를 최고치에 대한 백분율로 표시하였다. 사염화탄소 투여 후 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나면서 간성상세포의 수가 증가되었고, 이후에 간성상세포 사멸이 활발히 일어남에 따라 간성상세포의 수가 감소하였다.

적인 연구가 일부 보고되었을 뿐이다. 시간에 따른 자세한 세포사멸 경과를 관찰한 생체 내 연구는 본 연구가 처음으로 생각된다. 이러한 생체 내 연구를 통해 그동안 일부 생체 외 연구에서 제시되었던 가역적 간손상/간섬유화에서 간성상세포 사멸의 역할을 이해하고 확인할 수 있었다. 그러나 그동안 제한적으로 시행된 간성상세포 사멸의 생체 내 연구는 간성상세포의 사멸을 조직에서만 관찰하였는데¹⁹ 본 연구에서는 조직에서 뿐만 아니라 간성상세포를 분리하여 세포사멸을 관찰하였다.

일반적으로 간성상세포는 지방소적을 함유하고 있는 특성을 이용하여 부유시켜서 분리하는데 세포사멸이 진행중인 세포의 분리가 가능한지가 의문점이었으며, 분리한 세포를 이용한 세포사멸 연구가 가능한 지도 아직 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서 annexin-V-FITC 결합을 통한 분리된 간성상세포 사멸과 조직에서의 TUNEL 검사를 통한 간성상세포 사멸 간 유의한 상관관계를 관찰하였으므로 분리한 세포를 이용한 생체에서의 세포사멸 관련인자에 대한 연구도 가능할 것이다. 전체적인 상관관계와 달리 일부 시간대에서 양 검사간 차이(discrepancy)가 관찰되었는데, 이는 세포사멸을 측정하는 검사 자체의 감수성의 차이를 고려해야 될 것이며, annexin-V 결합 검사의 경우 세포사멸의 초기과정을 측정하므로 이러한 인자들이 관여할 것으로 생각된다.

간성상세포 사멸에 관여하는 관련인자로 생체 외 연구 결과 Fas와 bcl-2/bax 계가 중요한 인자로 제시되었다.^{17,18} 본 연구 결과 이러한 관련인자가 생체 내의 간성상세포에서도 발현되고 세포사멸이 활발한 시기와 일치함을 알 수 있었다. Fas는 세포사멸의 중요한 사멸 수용체로 간질질세포인 간세포의 주된 사멸인자로 알려져 있으나,^{29,30} 간성상세포에서의 발현에 대해서는 생체 내 연구로는 아직 밝혀지지 않았는데 본 연구를 통해 간성상세포에서도 생체 내에서 중요한 사멸인자임을 확인하였다. 생체 외 연구에 의하면 Fas 경로에 의한 세포사멸은 활성화된 간성상세포에서 수용성 Fas 리간드(soluble Fas ligand) 또는 Fas 수용체 작용물질(Fas receptor agonist)에 대한 감수성이 휴지기의 간성상세포에 비해 증가한다고 보고되었다.¹⁷ 본 연구에서 감수성 여부는 확인하지 못하였으나 간손상 초기에는 Fas가 발현되지 않았으나 세포사멸이 활발한 시기에서 발현이 뚜렷함을 관찰할 수 있었다.

간성상세포의 p53 발현은 간손상 초기에 관찰되었는데, p53에 의해 전사되는 것으로 알려진 인자인 p21과 bax의 경우, p21은 p53 발현시기와 같은 시기부터 발현되었으나 bax는 p53이 발현된 시기로부터 일정한 간격 후에 발현되기 시작하였다. p21은 p53에 의해 전사 조절되며 세포분열을 억제하는데,³¹ 본 연구에서 p53 발현과 동시에 발현되며 비교적 지속적으로 세포사멸이 아주 약한 후반기에도 관찰되었다. 이는 간성상세포의 증식의 감소와 관계가 있을 것으로 생각된다. 즉, 본 연구에서 관찰되었듯이 간손상 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나고 직후 감소하였는데 p21이 발현되기 시작하는 시기와 관계가 있었다.

p53에 의해 발현이 억제되고 bax와의 길항작용으로 세포사멸을 억제^{12,13}하는 것으로 알려진 bcl-2는 p53보다 먼저 발현되기 시작하여 p53 발현 이후에도 지속적으로 발현되었다. 세포사멸에서 bcl-2/bax 비(ratio)의 변화가 중요시되고 있는데 비가 감소할수록 세포사멸로의 경향이 증가한다.¹³ 본 연구에서도 정량적으로 측정은 못하였으나, bcl-2는 초기부터 발현되어 지속되었고 후에 bax의 발현이 관찰됨으로써 사멸이 활발한 시기에 bcl-2/bax 비가 감소하는 경향을 알 수 있었다.

일반적으로 간손상시 간성상세포가 활성화되는데 관여하는 인자로는 손상 받은 간세포 또는 쿠퍼세포로부터 유리되는 물질 또는 사이토카인 등이며, 이러한 인자에 의해 간성상세포가 자극되어 활성화되고 증식되는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 간손상이 회복되는 과정에서 이러한 자극이 중단되면 간성상세포 입장에서 이는 일종의 유전자 손상의 스트레스(genotoxic stress)에 해당되며 이러한 스트레스가 p53에 의해 감지된다고 생각할 수 있다. 실제로 Saile 등³²에 의하면 간성상세포의 활성화 및 증식에 관여하는 것으로 알려진 사이토카인 TGF- β 와 TNF- α 가 생체 외에서 활성화된 간성상세포의 사멸을 억제한다고 보고하였으며, 이는 생체 내에서 만성적 간손상에서 활성화된 간성상세포가 지속적으로 생존할 수 있는 기전일 것이라 제시하였다. 본 연구와 같은 급성 간손상에서는 TGF- β 와 TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극이 지속적이지 못할 것이고, 이는 증식되었던 간성상세포에게 사멸을 유도하는 환경을 제공할 것이며, 이러한 스트레스가 p53에 의해 감지되고 p53에 의해 다른 인자들이 전사되어 발현되기 시작한다고 생각할 수 있다. p53 의존성 경로로 p21이 전사되고 세포분열이 억제되고, bcl-2/bax 계가 세포사멸 쪽으로 진행됨을 유추할 수 있다.

이와 같은 생체 외 실험 결과를 종합하면 생체 내에서 간성상세포의 사멸을 시작케 하는 신호로 사이토카인과 같은 생존성 자극의 중단 등을 유추할 수 있으며, 이러한 신호에 의해 Fas, p53, bcl-2/bax 계 등 사멸관련 인자가 발현된다고 생각할 수 있다. 본 연구에서 이런 사멸 관련인자가 생체 내 사멸 중인 간성상세포에서 발현된다는 것은 밝혔으나 이에 대한 정확한 상호관계 및 작용 기전을 이해하기 위해서는 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 급성 간손상시 유발되는 간섬유화의 가역적 회복에 관여하는 기전에 대해 중점을 맞추었다. 만성적 간손상시 유발되는 간섬유화의 회복 기전을 연구하기 위해서는 증식되었던 간성상세포가 제거되는 기전과 더불어 고려해야 될 것으로 이미 과형성된 세포외기질이 분해되는 기전일 것이다. 세포외기질을 생성하고 조절하는 중요한 세포는 물론 간성상세포이며 기질의 조절에 관여하는 주요 물질은 MMP (matrix metalloproteinase)와 같은 기질 프로테아제(matrix protease)와 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)와 같은 프로테아제 억제물질(protease inhibitor)이며 이 또한 간성상세포에서 생성된다.^{5,8} 따라서 만성적 간손상/간섬유화의 회복에서는 이러한 기질 조절 인자에 대해서도 고려해야 될 것이다. 간섬유화 과정에서 이러한 조절인자의 변화를 관찰한 연구¹⁹와 조절인자에 대한 사

이토카인의 영향에 대해 관찰한 연구³³가 최근 보고되었는데, 이러한 기질 조절 인자의 변화와 사이토카인의 영향이 만성 간손상/간섬유화 회복에서 간성상세포의 사멸과 더불어 중요함을 제시하였다.

본 연구를 통해 사염화탄소에 의한 급성 간손상/간섬유화 생체 모델에서 투여 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나면서 간성상세포의 수가 증가되고 이후에 간성상세포 사멸이 일어나면서 간성상세포의 수가 감소함을 알 수 있었으며, 사멸 관련인자들이 간손상 이후 시간에 따라 다양하게 간성상세포에서 발현되어 사멸에 관여함을 알 수 있었다. 따라서 간성상세포 사멸은 생체 내에서 활성화된 간성상세포의 수를 조절하는 역할을 하여 간섬유화를 종결함을 밝혔으며, 생체 외 연구에서 중요시 제시되었던 Fas, p53, bcl-2/bax 계가 생체 내에서도 간성상세포 사멸에 관여함을 제시하였다. 이러한 기초적인 결과를 통하여 향후 이에 대한 지속적인 연구를 통해 간섬유화와 간경변증을 조절하는 기전으로 간성상세포 사멸이 치료면에서도 임상적으로 응용되어야 할 것이다.

V. 결 론

흰쥐에서 사염화탄소 투여로 유발된 급성 간손상에서 간섬유화가 종결되고 회복되는 과정을 이해하는 생체 모델을 확립하고, 간섬유화에서 간성상세포 사멸의 역할을 규명하고, 사멸 관련인자들의 생체 내 발현 양상을 알아보고자, 사염화탄소 투여후 시간에 따른 간성상세포의 증식과 사멸의 변화와 간성상세포의 사멸 관련인자들의 발현양상을 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 사염화탄소에 의한 급성 간손상/간섬유화 생체 모델에서 간손상 초기에 간성상세포의 증식이 활발히 일어나면서 간성상세포의 수가 증가되고 이후에 활성화된 간성상세포에서 세포사멸이 일어나면서 간성상세포의 수가 감소하였다.

2. Annexin-V-FITC 결합을 유세포분석으로 확인한 분리된 간성상세포 사멸과 TUNEL 검사로 확인한 조직에서의 간성상세포 사멸간 유의한 상관관계가 있었다.

3. 세포사멸 관련인자들(Fas, p53, p21, bcl-2, bax)이 간손상 이후 간성상세포 사멸이 관찰되는 시기에 시간에 따라 다양하게 간성상세포에서 발현되었다.

이상의 연구결과로 사염화탄소 1회 투여로 유발된 급성 간손상/간섬유화에서 간성상세포가 증식된 후 세포사멸이 활발히 일어나며 이에 따라 간성상세포의 수가 조절된다는 것을 알 수 있어 간섬유화가 종결되고 회복되는 과정을 이해하는 생체 모델을 확립할 수 있었다. 조직에서의 간성상세포 사멸과 분리된 간성상세포의 사멸이 유의한 상관관계가 있음으로 분리된 간성상세포로 사멸 관련인자에 대한 연구가 가능함을 알 수 있었고, 생체 외 배양 간성상세포에서 주요 사멸관련인자로 제시되었던 인자들이 생체 내에서도 활성화된 간성상세포에서 발현되어 사멸에 관여함을 확인하였다. 따라서 간성상세포 사멸은 생

체 내에서 활성화된 간성상세포의 수를 조절하는 역할을 하며. 급성 간손상 후의 가역적 간섬유화는 활성화된 간성상세포의 세포사멸 기전에 의해 조절되기 때문이라고 생각한다.

참 고 문 헌

1. 최홍재, 김영수, 박계숙, 이상인, 문영명, 강진경, 박인서. 한국인의 B형 간염 바이러스 표지자 양성율에 관한 연구. 대한소화기병학회지 1983;15:163-9.
2. 박찬일. 만성간염의 조직학적 특징. 대한의학협회지 1993;36:227-36.
3. 이관식. 간 섬유생성. 대한간학회지 1996;2:104-15.
4. Friedman SL. Cellular networks in hepatic fibrosis. Digestion 1998;59:368-71.
5. Ramadori G, Knittel T, Saile B. Fibrosis and altered matrix synthesis. Digestion 1998;59:372-5.
6. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med 1993;328:1828-35.
7. Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. J Pathol 1993;170:105-14.
8. Friedman SL. Hepatic stellate cells. Prog Liver Dis 1996;14:101-30.
9. Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. Pharmacol Ther 1995;66:387-412.
10. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clement B, Rissel M, Deugnier Y, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. Am J Pathol 1990;137:1333-42.
11. 김원호. 세포 사멸과 질병. Medical Postgraduates 1996;24:275-88.
12. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. Annu Rev Med 1997;48:267-81.
13. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:2239-44.
14. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. Semin Liver Dis 1998;18:105-14.
15. Galle PR. Apoptosis in liver disease. J Hepatol 1997;37:405-12.
16. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis-an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. Cell Tissue Res 1998;102:447-52.
17. Gong W, Pecci A, Roth S, Lahme B, Beato M, Gressner AM. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand. Hepatology 1998;102:492-502.
18. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. Am J Pathol 1997;151:1265-72.
19. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. J Clin Invest 1998;102:538-49.
20. Bedosa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen $\alpha_1(I)$ gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: A link to tissue fibrosis. Hepatology 1994;19:1262-71.

21. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest* 1995;96:2461-8.
22. Lee KS, Buck M, Houglum K, Watson DB, Carson D, Chojkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *Am J Physiol* 1997;273:G1094-100.
23. Houglum K, Buck M, Alcorn J, Contreras S, Pornstein P, Chojkier M. Two different *cis*-acting regulatory regions direct cell-specific transcription of the collagen $\alpha_1(I)$ gene in hepatic stellate cells and in skin and tendon fibroblasts. *J Clin Invest* 1995;96:2269-76.
24. Buck M, Turler H, Chojkier M. LAP, a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *EMBO J* 1994;13:851-60.
25. Vermes I, Haanen C, Steffen-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flowcytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1984;184:709-14.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
27. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992;16:992-6.
28. Kamimura S, Gaal K, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1995;16:448-53.
29. Galle PR, Krammer PH. CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis* 1998;18:141-51.
30. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-41.
31. Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:825-34.
32. Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor β and tumor necrosis factor α inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:196-202.
33. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β . *J Hepatol* 1999;30:48-60.

Abstract

Apoptosis of hepatic stellate cell in acute carbon tetrachloride induced liver injury

Kyung Chul Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Myoung Moon)

Hepatic fibrosis is characterized by an increase in extracellular matrix. Activated hepatic stellate cells (HSC) are central to the process of fibrosis as the major source of matrix. Hepatic fibrosis, a common response to liver injury from many causes, is a reversible process, when the insult is acute self-limiting. But the fate of the expanded population of the activated HSC and the mode of their elimination during the resolution of liver injury are uncertain, up to now. We hypothesized that apoptosis, which plays an opposite and complementary role to cellular proliferation in the maintenance of tissue homeostasis, could be one potential fate of the activated HSC during the resolution of liver injury.

Therefore we studied serial changes (before and up to 7 day after CCl₄ injection) of HSC apoptosis over proliferation in an *in vivo* model of carbon tetrachloride (CCl₄) induced acute liver injury. We studied apoptosis of HSC in liver tissue by desmin/TUNEL dual immunostain. Isolated HSCs were studied for apoptosis by flow-cytometric analysis of annexin-V-FITC binding, for proliferation by [³H]thymidine uptake, and for apoptotic mediators (Fas, p53, p21, bcl-2, bax) by Western blot. The results were as follows.

1. The [³H]thymidine uptake (proliferation) of isolated HSC increased after CCl₄ injection, showing maximal increase at 32hr (p<0.01) and decreased gradually thereafter.
2. The annexin-V-FITC binding (apoptosis) of isolated HSC increased after CCl₄ injection, showing maximal increase at 64hr (p<0.01) and decreased gradually thereafter.
3. The number of desmin positive cells (sum of 10 HPF, ×400) in liver tissue increased after CCl₄ injection, showing maximal increase at 48hr (p<0.01) and decreased gradually thereafter. The number of desmin and TUNEL positive cells increased after CCl₄ injection, showing maximal increase at 64hr (p<0.01) and decreased gradually thereafter.

4. The number of TUNEL positive HSCs in liver tissue correlated significantly with annexin-V-FITC binding of isolated HSCs ($r=0.606$, $p<0.01$).

5. From Western blot of isolated HSCs, Fas expression was detected from 48hr to 4 day, p53 at 32hr, p21 from 32hr to 4 day, bcl-2 from 16hr to 80hr and bax from 64hr to 4 day, after CCl₄ injection.

From these results, it is identified that acute liver injury was first accompanied by proliferation of HSCs and followed by apoptosis of HSCs with the reduction in the total number of HSCs during the resolution of injury. Expression of Fas, p53, p21, bcl-2, bax was identified *in vivo* in activated HSCs undergoing apoptosis. It is concluded that apoptosis of HSC played a role in the regulation of the numbers of activated HSCs and may represent an important mechanism to the resolution of fibrosis in the acute liver injury model.

Key Words: hepatic stellate cell, apoptosis, hepatic fibrosis, acute liver injury, carbon tetrachloride