

간 재생 과정 중 흑스 유전자 및  
단백질의 발현 패턴 분석

연세대학교 대학원

의과학 사업단

윤 보 연

간 재생 과정 중 후스 유전자 및  
단백질의 발현 패턴 분석

지도교수 김 명 희

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학 사업단

윤 보 연

윤보연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2002 년 12 월 일

## 감사의 글

늘 저와 함께 해주시고, 감사하는 마음으로 살게 인도해 주신 하나님께 감사드립니다.

부족한 저를 인도해 주신 김명희 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 자주 뵙지는 못했지만 제 논문 심사 해주시면서 많은 조언을 해 주신 허만옥 교수님과 실험 및 여러 가지 조언을 아끼지 않으신 박성구 박사님께 감사의 말씀을 전합니다. 늘 자상하게 대해 주신 유 민 교수님 정말 감사드립니다. 또 실험실 생활의 여러 가지를 많이 가르쳐 주신 박형우 교수님 감사드립니다.

실험실 선생님들 모두 고맙습니다. 언제나 따뜻하게 대해 주신 유병기 선생님, 김병규 선생님, 늘 한결 같이 대해 주신 박성도 선생님, 권윤정 선생님 그리고 옆에서 저 많이 도와주신 공경아 선생님 정말 고맙습니다. 씩씩한 정명섭 선생님도 고맙습니다. 그 외 제 실험 도와주신 여러 선생님들께도 감사의 말씀을 전합니다.

그리고 늘 든든한 친구들 모두 고맙습니다..

마지막으로 하늘나라에서 보고 계실 외할머니, 저 믿고 지켜봐 주신 아빠, 엄마, 늘 친구 같은 동생 체연이, 그리고 우리 집 막내 태현이 모두들 사랑합니다.

윤보연 씬

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 재생 과정 중 간의 해부학적 변화 분석 .....	8
가. 실험 동물 .....	8
나. 간 부분 절제 기술 .....	8
2. <i>Hox</i> 유전자의 RNA 수준에서의 발현 양상 분석 .....	8
가. 총 RNA 분리 .....	8
나. RT-PCR(reverse transcription-PCR) .....	9
(1) degenerate primer를 이용한 RT-PCR .....	9
(2) <i>Hex</i> specific primer를 이용한 RT-PCR .....	10
다. 클로닝 .....	10
(1) ligation .....	10
(2) competent cell 제조 및 형질전환 .....	11
(3) plasmid DNA 정제 .....	11
라. DNA 염기서열 결정 및 분석 .....	12
3. 2-DE 와 MALDI-TOF 분석 .....	12
가. 2-DE gel 분석 .....	12
나. MALDI-TOF 분석 .....	13
다. data 분석 .....	14
III. 결과 .....	15
1. 재생 과정 중 간의 해부학적 변화 .....	15

2. 간 재생 과정 중 <i>Hox</i> 유전자의 발현 패턴 .....	18
3. 간 재생 과정에서 발현하는 단백질 : 프로테옴 분석 .....	24
IV. 고찰 .....	35
V. 결론 .....	39
참고문헌 .....	40
Abstract .....	47

## 그림 차례

그림 1. <i>Hox</i> 유전자의 위치와 발현 패턴. ....	6
그림 2. 재생 과정 중 생쥐 간의 해부학적 변화. ....	16
그림 3. RT-PCR에 사용된 primer 서열. ....	19
그림 4. 제한 효소를 처리하여 클론 확인. ....	20
그림 5. RT-PCR을 통한 재생 단계별 <i>Hex</i> 유전자의 발현. ....	23
그림 6. silver-stain 한 2-DE gel image. ....	26
그림 7. 재생 단계별 발현이 증가하는 spot. ....	27
그림 8. 재생 단계별 발현이 감소하는 spot. ....	28
그림 9. 간 부분 절제 후 재생 4시간째에 과 발현된 spot. ....	29
그림 10. 간 부분 절제 후 재생 3일째에 과 발현된 spot. ....	30
그림 11. spot number(sn) 8의 분석 예. ....	34

## 표 차례

표 1. 재생 단계에 따른 간 무게. ....	17
표 2. 염기서열 분석 결과. ....	21
표 3. 재생 단계별 <i>Hox</i> 유전자의 발현 패턴. ....	22
표 4. 간 재생 과정 중 발현이 증감하는 단백질 spot 분석. ....	31
표 5. 간 재생 과정 중 재생 4시간째에 과 발현하는 단백질 spot 분석. ....	32
표 6. 간 재생 과정 중 재생 3일째에 과 발현하는 단백질 spot 분석. ....	33



## 국문요약

### 간 재생 과정 중 *Hox* 유전자 및 단백질의 발현 패턴 분석

간은 비교적 세포교체가 느리게 이루어지는 기관이지만 손상을 입거나 제거될 경우 스스로 재생하는 능력이 있다고 알려져 있다. 과학적인 간 재생에 대한 실험 모델은 1931년 Higgins와 Enderson이 흰쥐간의 2/3정도를 부분 절제한 후 재생 과정을 확인한 보고가 있다. 재생이란 단순한 세포증식을 의미하는 것이 아니라 손상된 부분이 손상 전과 같은 형태를 형성하며 회복되는 것으로써 성체에서 일어나는 또 다른 형태의 발생이라고 볼 수 있다. *Hox* 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중 하나로 척추동물과 무척추동물에 있어서 초기 배 발생 시 특정한 시기에 특정한 장소에서 발현하며, 몸통 전·후 축의 형태를 형성하는데 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

이제까지의 간 재생에 관한 연구들은 모두 세포 증식과 관련된 연구이고, 간 재생 과정 중 그 형태가 형성되는 것에 대한 연구는 미약하다. 따라서 본 연구에서는 간 재생 과정동안 *Hox* 유전자의 발현 패턴을 분석하여 *Hox* 코드를 유추해보고 또 2-Dimensional Electrophoresis(2-DE)와 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight(MALDI-TOF)를 수행하여 재생에 관여하는 단백질을 분석하고자 하였다.

간을 부분 절제하고 봉합한 후 0시간, 4시간, 3일이 경과한 간 조직에서 총 RNA를 분리하였다. PCR과 cloning을 수행하여 얻은 클론들의 염기서열을 분석한 후 BLAST search를 통해 상동성이 있는 유전자를 찾았다. ① 재생 0시간, 4시간, 3일 별로 발현이 증가하는 유전자는 *Hoxb1*, 그리고 *Hoxd3*, ② 발현이 감소하는 유전자는 *Hoxa1*, 그리고 *b8*, ③ 재생 4시간과 3일에서만 발현하는 유전자는 *Hoxa9*, *a10*, *b2*, *b5*, *d1*, 그리고 *d4*, ④ 재생 4시간에서만 발현하는 유전자는 *Hoxb4*, *c5*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*, ⑤ 재생 3일에서만 발현하는 유전자는 *Hoxb3*, *b9*, 그리고 *d12*로 분석되었다. 여기에서 paralogous group 9와 10에 속하는 유전자(*Hoxa9*, *a10*, *b9*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*)가 stage specific 하게 재생 과정 중 특이적으로 발현하는 것을 알 수 있었다. 그리고 paralogous group 1에 속하는 *Hoxa1*과 *b1*의 경우 재생 전·후에 계속 발현하는 것으로 관찰되었다. 이것으로부터, paralogous group 9와 10은 재생 단계에 특이적으

로 발현하는 유전자들로, 또 *Hoxa1*과 *b1*은 일반적인 간 특이적 유전자들로 유추할 수 있다.

단백질을 분석한 결과 재생 4시간째에 과 발현하는 단백질 중 Hoxd10이 그리고 3일째 과 발현하는 단백질로서 Hoxa10과 d3이 분석되었다. 이들의 발현 패턴은 흥미롭게도 RNA 수준에서의 분석 결과와 일치함을 확인하였다.

이상의 결과를 바탕으로 *Hoxa10*과 *d10*을 포함하는 paralogous group 9와 10의 유전자와 *Hoxd3*가 재생 단계에 특이적으로 발현하는 유전자들임을 추측할 수 있었다.

---

핵심되는 말 : 간, 재생, 형태형성, *Hox* 유전자, 간 부분 절제, 2-Dimensional Electrophoresis

# 간 재생 과정 중 흑스 유전자 및 단백질의 발현 패턴 분석

<지도교수 김 명 희>

연세대학교 대학원 의과학사업단

윤보연

## I. 서론

간은 손상을 입거나 제거될 경우 스스로 재생하는 능력이 있다고 알려져 있다<sup>1-3</sup>. 간 재생은 오래 전부터 진화되어 온 동물의 보호작용의 하나로서<sup>4</sup>, 야생환경에서 독성물질 등에 의해 손상된 간 조직을 회복하는 일은 매우 중요한 생존전략이라 할 수 있다. 과학적인 간 재생에 대한 실험 모델로는 1931년 Higgins 와 Enderson이 흰쥐간의 2/3정도를 부분 절제한 후 재생 과정을 확인한 보고가 있다<sup>5</sup>. 간 재생 과정을 연구하기 위해 carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>), Galactosamine 및 바이러스 등과 같은 독성 물질을 처리하여 간 손상을 유발하기도 하지만, 이 방법은 조직 손상이나 염증을 동반할 수 있다. 반면에 간 부분 절제술은 제거되지 않고 남아 있는 다른 간엽들에는 별다른 손상을 주지 않으며 재생이 시작되는 시기를 정확히 알 수 있기 때문에 이 분야 실험에 많이 사용되고 있는 방법이다<sup>4,6</sup>.

생쥐에서 간 조직은 체중의 4-5% 무게를 차지하고 있으며, 정중엽, 우엽, 좌엽 그리고 작은 미상엽의 네 엽으로 구성되어 있다. 각 엽들은 육각형 형태의 구조를 나타내는 간소엽(hepatic lobule)이며, 이것은 간의 구조적 단위로서, 2개의 주요한 구성 요소로 이루어져 있다. 첫째는 상피성 실질(liver parenchymal cell, hepatocyte)이고, 둘째는 동 모양혈관계(sinusoid)이다<sup>7</sup>. 상피

성 실질은 서로 합하고 분지하면서 한 개 세포 두개의 판상으로 배열된 간세포들로 되어 있으며, 동 모양혈관은 이들 간 세포판 사이에 위치한다. 간세포는 밭 이랑처럼 길게 배열되어 있는데 이랑과 이랑사이에 골이 패여 있듯이 길게 배열된 간세포들 사이로 동 모양혈관이 지나면서 산소와 영양분이 간세포에 공급되고 이산화탄소와 각종 대사 산물, 노폐물 등이 혈류로 나와 물질교환이 일어나게 된다<sup>6</sup>. 동 모양혈관은 작은 정맥으로 유입되고, 중심정맥들이 모여 결국은 간정맥이라는 큰 강을 형성하여 간에서 혈류가 빠져나가게 한다. 간세포는 직경이 12~25  $\mu\text{m}$ 인 다면체이며, 간의 80%를 차지한다<sup>6,8</sup>.

간은 혈류 공급을 이중으로 받는다. 즉, '간동맥'을 통하여 혈류를 공급받는 외에 '문맥'이라는 일종의 정맥을 통해서도 혈류를 공급받고 있다. 간동맥을 통해서만 산소가 풍부한 동맥혈이 유입되고, 문맥을 통해서만 위나 장에서 흡수된 영양분을 가진 정맥혈이 유입된다<sup>9</sup>. 간이 이와 같이 독특한 혈류 공급 체계를 갖고 있는 것은 고유한 기능에서 기인된다고 하겠다. 간의 기능은 (1) 영양소의 가공 처리, (2) 단백질이나 화합물들을 합성, (3) 각종 약물들을 대사하여 배출, (4) 해로운 물질을 해독, (5) 당 대사를 조절하여 신체에 필요한 에너지를 공급, (6) 체내 호르몬의 균형 유지, (7) 비타민, 철분 등을 저장, (8) 혈액의 저장, 그리고 (9) 인체의 방어선 등이 있다<sup>8</sup>. 간이 이처럼 생존을 위하여 많은 대사적 기능을 수행하는 기관임을 고려해 볼 때 간 손상으로 인한 질병은 생존에 위협적이라고 볼 수 있다. 2001년도 통계청 조사에 따르면 우리나라 40대 남성의 간 질환이 여성의 9배로 나타났다. 간 질환은 전체 사망 원인 5위로 40대 남성에서는 사망 원인 2위를 차지하는 것으로 조사되었다. 이처럼 위협적인 간 질환은 대부분의 경우 간 기능 검사를 하면 심한 변화를 볼 수 없는데, 이것은 손상되지 않은 건강한 부분이 증식되면서 간 기능을 정상으로 유지하려는 작용을 하기 때문인 것으로 알려져 있다. 점차 증가하고 있는 간 질환의 조기 진단을 위해 많은 연구가 되고 있으나, 아직까지 간 질환으로 인한 사망률을 낮추기에는 미흡한 실정이다.

재생 능력은 체제가 간단하고, 계통적으로 진화의 정도가 낮은 것일수록 강하다. 지렁이의 몸을 절단하면, 절단면으로부터 상실한 부분을 만들어 내어 원래와 같은 몸이 된다. 이와 같이 재생이란 개체의 일부분이 상실되었을 때 그

것에 해당되는 부분이 보충되고 개체성을 유지하는 현상을 말한다<sup>10</sup>. 재생은 크게 2가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 병리적(病理的)인 재생으로, 앞에서 예를 든 것처럼 우발적인 원인에 의하여 생긴 손상에 대한 보상이며, 둘째는 생리적 재생으로, 사람의 이가 나이에 따라 유치(乳齒)에서 영구치(永久齒)로 바뀌는 것 등이 있다. 포유류에서의 병리적인 재생은 간에서만 일어난다<sup>11,12</sup>. 설치류의 경우 간의 4엽 중 2엽을 절제하면 나머지 2엽의 간세포들이 빠르게 증식되어 절제 전 간의 무게만큼 성장하며, 그 모양도 유지됨을 관찰 할 수 있다<sup>13</sup>. 특히, 이식의 경우는 숙주의 체구에 적합하게 재생할 수 있는 능력이 있는데, 예를 들면, 덩치가 큰 개의간을 작은 개에 이식하면 작은 개의 크기에 알맞은 간으로 재생된다<sup>14</sup>. 재생이란 단순한 세포증식을 의미하는 것이 아니라 손상된 부분이 손상 전과 같은 형태를 형성하며 회복되는 것으로써 성체에서 일어나는 또 다른 형태의 발생이라고 볼 수 있다<sup>15</sup>. 발생과정 중 다세포 생물체의 신체는 분화된 세포들이 무질서하게 뒤섞여서 형성되는 것이 아니라 분화된 다양한 세포들이 체계적인 질서를 갖추어 복잡한 조직과 기관이 된다. 또한 조직이나 기관도 일정한 방식으로 배열되어 있다. 이와 같이 체형이 질서정연하게 만들어지는 과정을 형태형성(morphogenesis)이라고 한다<sup>16</sup>.

*Hox* 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중 하나로 척추동물과 무척추동물에 있어서 초기 배 발생 시 특정 시기 및 특정 위치에서 발현하며, 몸통 전·후 축의 형태를 형성하는데 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>17-19</sup>. 초파리에서 처음 발견된 *Hox* 유전자는 helix-loop-helix 형태의 DNA 결합 부위(homeodomain)를 공유하고 있는 전사조절인자(transcription factor)로 보고되어 있다<sup>17,18,20</sup>. 발생과정 중 몸체 형성 과정은 초파리와 생쥐가 동일한 종류의 유전자를 사용한다. 초파리에서의 homeotic 선택유전자로 구성된 유전자 복합체는 *Bithorax*와 *Antenapedia* 복합체가, 생쥐에서는 39개의 *Hox* 유전자가 밝혀져 있다. 각각의 유전자들은 서로 다른 염색체 상에 위치해 있는 4개의 cluster(*HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, 그리고 *HoxD*)에 존재하며, 13의 paralogous group에 정렬되어 있다<sup>21,22</sup>(그림 1).

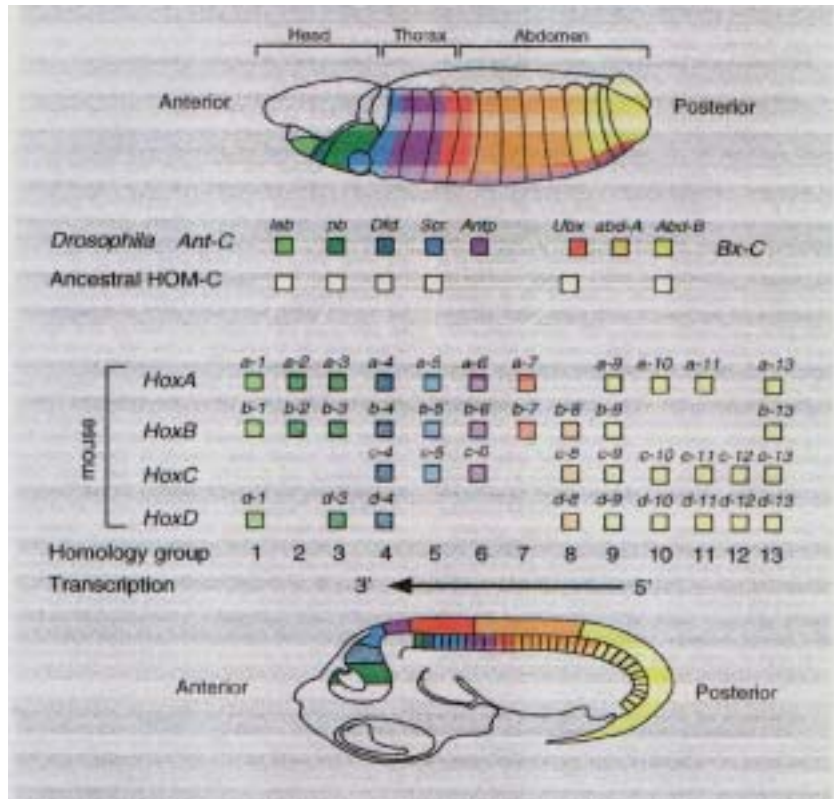


그림 1. *Hox* 유전자의 위치와 발현 패턴. 초파리와 생쥐에서 염색체 상의 *Hox* 유전자의 위치와 발현 패턴의 유사성을 보여준다. 초파리의 염색체에 존재하는 *Hox* 유전자의 순서가 생쥐의 각 염색체 상에 위치하는 *Hox* 유전자 차례와 일치함을 보이고 있다. 또, 각각의 *Hox* 유전자가 발현되는 위치를 embryo에서 동일한 색으로 나타냈으며, 생쥐에서의 유전자는 초파리와 같이 머리-꼬리 축을 따라 구간을 이루어 발현함을 보여준다(Favier B. 등, 1997).

간의 재생은 매우 역동적으로 일어난다. 간 부분 절제는 간세포(hepatocyte), 담상피세포(biliary epithelial cell), 내피세포(endothelial cell), 쿠퍼세포(kupffer cell) 및 지방을 합성, 저장하는 이토세포(Ito cell)의 증식을 포함하여 간을 구성하는 모든 종류의 세포 증식을 유발한다<sup>3</sup>. DNA 합성은 수술 후 10~12시간 내에 시작되어 약 3일이 지나면 끝난다<sup>22,23,24</sup>. 지금까지 대부분의 간 재생과 관련된 연구는 간 재생을 유도하는 물질이 무엇인가에 초점이 맞추어져 있었다. 간 재생의 개시인자로는 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)가 가장 유력한 것으로 알려져 있다<sup>14,23-25</sup>. 간 재생은 2 단계로 이루어진다<sup>25-27</sup>. 첫 번째 단계는 분열이 멈춘 간세포가 세포 주기(cell cycle)과정을 시작하는 단계(priming)로 tumor necrosis factor(TNF)와 interleukin-6(IL-6)에 의해 조절된다. 이때 간세포들은 세포 주기의 시작을 위한 competence를 가지게 된다. 두 번째 단계는 HGF와 TGF- $\alpha$ 에 의해 세포 주기 과정이 진행되어 DNA합성이 이루어지는 단계이다. priming 단계는 부분 절제 후 4시간에 처음 시작된다. 70개의 immediate early gene<sup>28,29</sup>(c-fos, c-jun, c-myc<sup>30</sup> 등)이 관여하며, 적어도 4개의 전사조절인자[nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B), signal transducer and activator of transcription-3(STAT3), activation protein-1(AP-1), 그리고 CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ (C/EBP $\beta$ )]가 부분 절제 후 활성화되어 간 재생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>31-35</sup>.

요약해보면 이제까지의 간 재생에 관한 연구들은 모두 세포 증식과 관련된 연구이고 형태 형성에 대한 연구는 미약하다. 따라서 본 논문에서는 생쥐의 간 조직을 이용하여 재생 과정 중 *Hox* 유전자들의 발현 패턴을 분석하여 간 재생 과정에 관여하는 *Hox* 코드를 유추해 보고자 한다. 한편 2-Dimensional Electrophoresis(2-DE)와 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight(MALDI-TOF)를 함께 수행하여 단백질 수준에서의 발현 양상을 분석하고, 나아가 미래 여러 장기 재생 연구를 위한 기초 지식을 얻고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재생 과정 중 간의 해부학적 변화 분석

#### 가. 실험 동물

실험 동물로서는 동물 사육실에서 표준사료와 물로 3일 동안 기초 사육한 체중 21~23 g의 C57BL/6계통의 8 주령 음성 검정 쥐를 사용하였다.

#### 나. 간 부분 절제 시술

간 절제는 Higgins와 Enderson(1931)의 방법으로 시술하였다. 간 절제를 위해 Kefamin 0.425 ml, Rompum 0.25 ml, 생리 식염수 5 ml을 섞어서 만든 마취제를 0.1 ml복강주사 하였다. 쥐의 털을 일부 제거한 후 왼쪽 상 복부를 2 cm 정도 절제하여 간의 4엽 중 2엽을 2/3정도를 잘라 내고 혈관을 끈으로 묶어 주었다. 수술을 마치고 생리 식염수를 조금 부어 준 다음 연속봉합하고 소독해 주었다. 수술 후 약 30분 동안은 체온유지를 위해 따뜻하게 해주었다. 수술 후 4시간, 3일 간격으로 실험 동물을 희생하여 간을 꺼내 실험에 사용하였다. 대조군으로는 아무 처지도 하지 않은 동종의 생쥐 간을 이용하였다. 또 절제 후 바로 실험에 사용하지 않을 경우의 생쥐 간은 액체 질소에 보관하였다.

### 2. *Hox* 유전자의 RNA 수준에서의 발현 양상 분석

#### 가. 총 RNA 분리

액체 질소에 보관되었던 절제된 간 조직을 사용하여 Guanidium Isothiocyanate Technique(GIT) 방법을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 조직을 분쇄용 튜브에 넣고, denaturing 용액(4 M guanidium isothiocyanate, 25 Mm



sodium citrate, 0.5% *N*-lauroylsarcosine, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol)을 1.4 ml 첨가한 후, pestle로 잘게 파쇄시켰다. 조직을 15 ml 튜브로 옮긴 후, 2 M NaOAC를 140  $\mu$ l 넣고 잠깐 동안 섞어주었다. chloroform-isoamylalcohol (49:1) 혼합물을 588  $\mu$ l 넣고 15초간 강하게 혼합한 후 얼음에 15분간 방치했다. 4°C 4,500 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 새로운 1.5 ml 용량의 microfuge 튜브로 옮긴 후, 동량의 chloroform-isoamylalcohol(49:1)을 처리하고 혼합했다. 4°C 4,500 rpm으로 20분간 원심분리 한 후 상층액을 취해서 새로운 1.5 ml microfuge 튜브로 옮겼다. 상층액과 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 °C freezer에서 2시간 반응시킨 다음, 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 건조시켰다. 침전된 RNA는 DEPC 처리한 증류수에 녹이고 UV-spectrophotometer를 이용해서 정량했다.

나. RT-PCR(reverse transcription-PCR)

(1) degenerate primer를 이용한 RT-PCR

First strand cDNA는 RNA image<sup>TM</sup>kit(GenHunter, Nashville, TN)를 이용하여 다음과 같이 제조하였다. RNA를 17  $\mu$ g씩 취해 PCR 튜브에 넣고, 튜브에 anchoring primer(H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C, H-T<sub>11</sub>G, 최종농도=2  $\mu$ M), 5× Reverse Transcriptase(RT) buffer 4  $\mu$ l, dNTP(250  $\mu$ M) 1.6  $\mu$ l를 첨가한 뒤 RNase free dH<sub>2</sub>O로 최종 용적이 19  $\mu$ l로 되게 하였다. Thermal cycler의 program을 65°C에서 5분, 37°C에서 60분, 75°C에서 5분, 이어 4°C로 셋팅하였다. PCR 튜브를 cycler에 넣고 65°C에서 RNA를 변성시킨 후, 37°C에서 5분 동안 annealing 시킨 뒤 200 units의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV reverse transcriptase, Promega Co., Madison, WI, USA)를 첨가하여 반응시킴으로써 first strand cDNA를 합성하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 하고, primer A와 primer B를 이용하여 PCR 반응을 진행시켰다. 합성된 first strand cDNA 2  $\mu$ l, 10×PCR buffer 2.5  $\mu$ l, 50% glycerol 2.5  $\mu$ l, DMSO 2.5  $\mu$ l 및 Taq DNA polymerase 1.25 units를 첨

가하여 반응물을 만들었다. Thermal cycler의 program을 94℃에서 1분, 44℃에서 1분, 72℃에서 1분 동안 45회 반복하고 72℃에서 5분 이어 4℃로 입력한 후 PCR 튜브를 넣고 반응을 진행한 후 agarose gel에서 확인하였다. degenerate prime A, 5'-CTg/c GAg/a CTg/c GAg/a AAg/a GAg/a TTc/t-3'와 primer B, 5'-Cg/tg/a TTc/t TGg/a AAC CAg/a ATc/t TT-3'는 Bionia(대전, 한국)에서 제작, 구입하였다. 각각의 primer는 forward primer 128조합, reverse primer 64조합이 가능한 degenerate primer로서 이 primer는 약 110 bp를 증폭하였다.

## (2) *Hex* specific primer를 이용한 RT-PCR

상기한 방법과 동일한 방법으로 재생 단계별 간조직으로부터 RNA를 분리하여, cDNA를 준비한 후 *Hex* specific primer를 이용하여 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분 동안 40회 반복한 후 agarose gel에서 확인하였다. 또한  $\beta$ -actin을 대조군으로 PCR에 사용하였다. *Hex* specific primer(sense, 5'-GTC AAG TGA GGT TCT CCA A-3'; antisense, 5'-CAT CCA GCA TTA AAG TAG AAG TAG CC-3')와  $\beta$ -actin primer (sense, 5'-CAT GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC-3'; antisense, 5'-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TCT AG-3')는 Bionia(대전, 한국)에서 구입하였다.

## 다. 클로닝

### (1) ligation

jetsorb gel extraction kit(GENOMED, Patent 5,262,311, U.S)을 사용하여 gel에서 원하는 크기의 band를 elution 했다. 3'-T overhang을 갖는 pT7Blue vector(Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)와 TOPO vector(Invitrogen, Carlsbad, California)를 사용하여 클로닝하였다. elution한 DNA를 T4 DNA ligase를 이용하여 vector와 실온에서 1시간, 4℃에서 하룻밤 ligation 시

켰다.

### (2) competent cell 제조 및 형질전환

competent cell 제조를 위한 숙주 박테리아는 *E. coli* 균주 DH5 $\alpha$ 를 사용하였으며, 사용전날 colony 하나를 취해 5 ml의 LB 배지에 접종하고 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 다음날 이것을 200 ml LB배지에 희석하고 O.D.<sub>600</sub>=0.4~0.6이 될 때까지 37°C에서 배양한 다음 4°C에서 10분간 4,000 rpm에서 원심분리하였다. 침전물의 0.5배 부피의 transformation buffer(60 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM PIPES, 15% glycerol)를 첨가한 후 얼음에 30분간 방치하였다가 10분간 4°C에서 4,000 rpm으로 원심분리하였다. 침전물을 다시 1/25배 부피 transformation buffer에 현탁하고 얼음에 30분간 방치한 다음 100  $\mu$ l 씩 microfuge 튜브에 분주하고 얼음에 박고 -70°C freezer로 옮긴 후 사용할 때까지 보관하였다. 형질전환을 하기 위하여 일차로 competent cell 현탁액이 들어 있는 microfuge 튜브를 -70°C freezer로부터 꺼내 얼음에 방치하면서 녹였다. ligation 혼합물이 포함된 microfuge 튜브에 competent cell 현탁액 100  $\mu$ l를 가하고, 20분간 얼음에 방치하였다. 그 다음 42°C에서 45초간 열 충격을 가하고 LB 배지를 1 ml 넣고 다시 37°C에서 1시간 배양한 후 X-Gal 40  $\mu$ l(50 mg/ml) 그리고 ampicillin(50 mg/ml)이 포함된 LB 고체 배지(1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, 1.5% Bacto-agar)의 표면에 도말하여 37°C 배양기에서 밤새 배양하였다. 멸균된 이쭉시개를 이용하여 white colony를 선택하여 LB 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다.

### (3) plasmid DNA 정제

plasmid DNA를 분리하기 위해 alkaline lysis 방법을 사용하였다. 원하는 plasmid를 포함하는 대장균 균주를 LB 배지에서 밤새 배양한 후 4,500 rpm에서 3분 동안 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다. 침전물에 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0)을 100  $\mu$ l를

첨가하고 혼합한 후 여기에 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 200  $\mu$ l 첨가하여 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 150  $\mu$ l의 solution III (60 ml 5 M potassium acetate, 11.5 ml glacial acetic acid, 28.5 ml dH<sub>2</sub>O)를 첨가하고 혼합한 후 4°C 4,500 rpm에서 5분간 원심분리하고 plasmid DNA를 포함하고 있는 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 여기에 1부피의 chloroform-isoamylalcohol (24:1) 혼합액을 넣고 섞어서 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 100% ethanol을 1 ml 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 2분간 방치하고 5분간 4°C에서 4,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. DNA 침전물을 70% ethanol로 세척한 후 다시 한 번 원심분리를 하여 DNA를 침전시켰고, DNA 침전물은 SpeedVac을 이용하여 건조한 후 RNase (10 mg/ml)가 첨가된 적당량의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 -20°C에 보관 또는 제한효소 반응에 이용하였다.

#### 라. DNA 염기서열 결정 및 분석

agarose gel을 이용하여 농도를 유추한 후 염기서열 결정은 MacroGen(서울, 한국)에 의뢰하여 수행하였다. 염기서열이 결정된 유전자는 NCBI의 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>)을 이용하여 분석하였다.

### 3. 2-DE 와 MALDI-TOF 분석

#### 가. 2-DE gel 분석

간 조직을 파쇄한 후 원심분리(4°C, 12,000 rpm)하고 상층액에 20% Trichloroacetic acid(TCA)/Acetone에 넣어 -20°C에서 45분 이상 단백질을 침전시킨 후 다시 원심분리(4°C, 12,000 rpm)하고 TCA와 salt를 제거하기 위하여 pH indicator가 7을 나타낼 때까지 acetone으로 반복 세척하였다. salt를 모두 없앤 후 sample을 건조시켜 pellet을 lysis buffer[(9.5 M urea, 2% Triton

X-100, 2% DTT(w/v), 2% IPG buffer(Amersham pharmacia, Piscataway, NJ, USA)]에 녹여 Immunobiline Drystrip reswellingtray (Amersham pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 단백질 농도가 1~1.5 mg정도 되도록 lysis buffer로 희석시킨 시료로 IPG(immobilized pH gradient gel) strip(BIO-RAD, Hercules, California, USA)을 18시간 이상 rehydration 시킨 후 multiphor II electrophoresis unit(Amersham pharmacia, Piscataway, NJ, USA)으로 옮긴 후 회사에서 제시한 시간과 전압으로 first-dimension isoelectric focusing을 수행하였다. 이 과정이 끝나면 IPG strip을 equilibration solution에 15분간 방치한 후 SDS-polyacrylamide gel로 옮겨 second-dimension SDS-PAGE를 수행하고 bromophenol blue가 바닥에 올 때쯤 정지시킨 후 gel을 5분씩 3회 증류수로 세척한 후 silver stain용액에서 1시간 이상 교반기에 방치시키고 다시 증류수로 30분씩 3회 정도 세척하였다.

#### 나. MALDI-TOF 분석

gel을 scan 한 후 PDQuest™ software(Huntington Station, NY, USA)를 이용하여 spot의 진하기 정도를 측정하였다. 원하는 spot을 gel에서 오려 내어 siliconized E-tube에 넣고, 30 mM potassium ferricyanide과 100 mM sodium thiosulphate을 1:1로 섞은 용액 1 ml를 첨가 한 후, 멸균된 막대기로 으깨 주고, 37°C 교반기에서 10분간 방치했다. 그 후 증류수로 2번 세척한 후 증류수를 완전히 제거했다. 이 튜브에 100% Acetonitrile(ACN)을 500  $\mu$ l 첨가하여 천천히 섞어 주면서 gel이 뭉쳐지는 것을 확인한 후 원심분리기로 침전시키고, 상층액을 제거한 후 다시 한번 반복하고, SpeedVac으로 20~30분 정도 완전히 건조시켰다. 침전물에 10 mM DTT를 25  $\mu$ l 첨가하고 섞어 준 후 56°C에서 섞어 주면서 30분간 방치했다. 상층액을 제거 한 후 55 mM Iodoacetamide를 25  $\mu$ l 첨가한 후 섞어주고 호일을 싸서 상온에서 25분간 방치했다. 상층액을 제거한 후 100 mM Ammonium Bicarbonate(ABC)를 30  $\mu$ l 첨가한 후 세척하고 다시 한 번 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 100% ACN을 100  $\mu$ l 첨가하여 혼합한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 이 과정을 다시 한 번 더

반복한 다음 20~30분 정도 건조시켰다. rehydrated gel 조각에 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  trypsin 4  $\mu\text{l}$ 와 50 mM ABC buffer(pH 8.0) 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 얼음에서 40분 간 방치하고, 37°C에서 12~16시간 교반기에 방치시켰다. 다음날 상층액을 제거하지 않고 50 mM ABC 50  $\mu\text{l}$ 를 2번, 100% ACN 50  $\mu\text{l}$ 을 첨가한 후 원심 분리 후 각각의 상층액을 한 튜브에 옮겨 담는다. 모아진 상층액을 SpeedVac 에서 3시간 동안 건조시킨 후 ziptip을 이용하여 70% ACN, 1% TFA, matrix 가 혼합된 용액으로 gel 조각을 녹인 후 plate에 loading한 후 MALDI-TOF로 분석하였다.

#### 다. data 분석

MALDI-TOF로 분석된 펩타이드 분자량을 이용하여 ProFound-peptide mapping([http://129.85.19.192/profound\\_bin/webProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/webProFound.exe))분석시스템과 SWISS-PROT 단백질 database를 이용하여 각 단백질 spot의 형태를 분석하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. 재생 과정 중 간의 해부학적 변화

간 재생 과정 중 DNA 합성은 손상 후 3~6시간 사이에서 유도되기 시작하여 10~12시간 사이에 시작하며, DNA 합성의 종료는 72시간 즉, 3일 후까지로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 재료 및 방법에서와 같이 4엽(정중엽, 우엽, 좌엽, 미상엽)의 간 중 2엽(우엽과 좌엽)을 부분 절제 한 후 봉합하고, 각각 4시간, 3일 그리고 3주 경과한 후 간 조직을 적출하여 재생 과정 중 간의 해부학적 변화를 관찰하였다.

부분 절제 후 재생 3일까지는 그 크기의 변화를 눈으로 확인하기는 어려웠으나, 3주가 지난 간 조직에서는 그 크기의 변화를 확인할 수 있었으며, 원래 간 크기로 재생되었다(그림 2).

전체 무게가 1.118 g인 생쥐 간을 이용하여 평균 0.363 g의 간을 제거하였다. 부분 절제 후 재생 4시간에서의 전체 간 무게는 0.729 g, 재생 3일에서는 0.812 g 이었다. 절제 직후의 간 무게인 0.755 g[(대조군에서 전체 간 무게 1.118 g) - (제거된 간 무게 0.363 g)]에 비해 부분 절제 후 재생 4시간에는 오히려 무게가 감소하였다. 이것은 4시간이 수술 후 회복하기에는 너무 짧은 시간이었으며, 또한 절제 할 때 혈액의 손실 등으로 인한 결과로 유추된다. 그러나 짧은 시간이라도 정상적인 간 기능을 위해 정중엽과 미상엽이 각각 8.0%, 1.6% 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. 또 부분 절제 후 재생 3일에는 0.812 g으로 절제 직후 0.755 g에 비해 7.5% 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 정중엽과 미상엽은 36%, 25% 증가한 것을 볼 수 있었다(표 1).

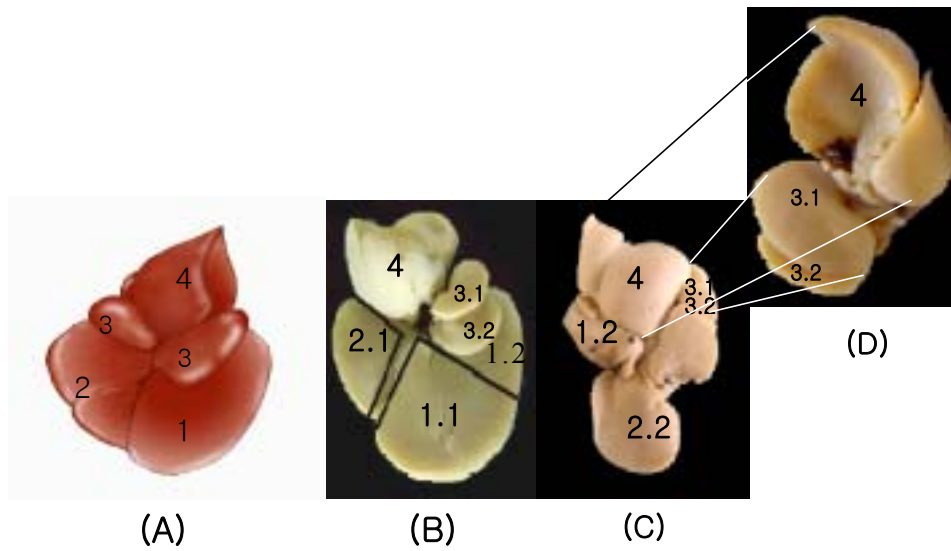


그림 2. 재생 과정 중 생취 간의 해부학적 변화. 생취 간을 도식화 한 그림 (A), 정상 간(B), 부분 절제 직후의 간(C), 그리고 부분 절제 후 재생 3주 된 간(D)을 나타낸 사진이다. 그림 A에서 1번은 우엽, 2번은 좌엽, 3번은 정중엽을 나타내며, 이들 엽들은 각각 1.1/1.2, 2.1/2.2 그리고 3.1/3.2로 나뉘어져 있다. 마지막으로 4번은 미상엽을 나타낸다.



표 1. 재생 단계에 따른 간 무게.

부분 절제 후 경과시간	No.	체중(g)	우엽	좌엽	정중엽	미상엽	전체 간 무게
0시간	1	23.0	0.293	0.342	0.038	0.281	
	2	23.0	0.379	0.355	0.084	0.297	
	3	23.0	0.376	0.403	0.086	0.284	
	4	23.0	0.382	0.428	0.088	0.354	
	평균	23.0	<b>0.358</b>	<b>0.382</b>	<b>0.074</b>	<b>0.304</b>	<b>1.118</b>
4시간	5	22.9	0.098	0.242	0.077	0.294	
	6	22.8	0.138	0.211	0.080	0.313	
	7	22.8	0.117	0.212	0.083	0.319	
	평균	22.8	<b>0.118</b>	<b>0.222</b>	<b>0.080</b>	<b>0.309</b>	<b>0.729</b>
3일	8	21.6	0.043	0.215	0.121	0.426	
	9	21.3	0.106	0.267	0.106	0.361	
	10	20.8	0.124	0.236	0.076	0.357	
	평균	21.2	<b>0.091</b>	<b>0.239</b>	<b>0.101</b>	<b>0.381</b>	<b>0.812</b>

우엽의 일부(1.1)와 좌엽의 일부(2.1)를 각각 절제(평균 0.363 g의 간 조직을 제거)한 후 4시간과 3일이 경과한 간의 무게를 측정된 도표이다. No.는 생쥐개체번호를 나타낸다.

## 2. 간 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 패턴

간 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 RT-PCR 및 클로닝을 수행한 후 각 클론들의 염기서열을 결정, 분석하였다. primer는 척추동물의 *Hox* 유전자 중 가장 잘 보존된 60개의 아미노산을 포함하는 homeodomain의 아미노산서열을 바탕으로 제작하였다. 그 중에서도 아미노산서열이 가장 잘 보존된 서열을 5'쪽(LELEKEF)과 3'쪽(KIWFQNR)에서 취해서 이 아미노산들을 코드하는 코돈을 모두 고려하여 디자인하였다. 이 때 생쥐 *Hox* 유전자에서의 각 아미노산들이 차지하는 비율을 %로 계산하고(ⓧ), murine codon usage에서 각 코돈의 빈도 값을 찾았다(Ⓨ). ⓧ×Ⓨ=Ⓩ라는 공식을 적용하여 각 코돈에 대한 Ⓩ값을 계산한다. 이렇게 계산된 Ⓩ값 중 가장 높은 확률을 보인 염기를 선택하여 primer로 제작하였다(그림 3). 재생 단계별로(부분 절제 후 재생 0시간, 4시간, 3일) 간 조직을 취하여 재료 및 방법에서와 같이 GIT 방법으로 총 RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하였고, 다시 degenerate primer를 사용하여 약 110 bp 짜리 DNA를 증폭 한 후 이를 pT7Blue 또는 TOPO vector에 클로닝하였다. 클론들을 분리하고 *Pvu*II와 *Eco*R I를 각각 처리하여 insert를 확인하였다(그림 4).

총 228개의 클론(재생 0시간, 64개; 4시간, 58개; 3일, 106개)을 분리하여 염기서열을 결정한 다음 BLAST program으로 기존의 알려진 *Hox* 유전자들과의 유사성을 분석하였다(표 2). 총 228개 클론 중 class I *Hox* 유전자는 재생 0시간 38개, 4시간 53개, 3일 34개였으며, class II *Hox* 유전자는 0시간 26개, 4시간 5개, 3일 72개였다. class I *Hox* 유전자들을 이용하여 각 재생 단계별 발현 빈도를 분석해 본 결과(표 3) *Hoxb1*, 그리고 *Hoxd3*은 재생 0시간, 4시간, 3일에서 차츰 발현이 증가하였으며, *Hoxa1*, 그리고 *Hoxb8*은 재생 과정 중 차츰 발현이 감소하였다. 그외에도 *Hoxa5*, *a7*, *b6*, 그리고 *d10*은 재생 0시간과 4시간에서만 발현하였으며, *Hoxa9*, *a10*, *b2*, *b5*, *d1*, 그리고 *d4*은 4시간과 3일에서만 발현되었다. 또 재생 0시간 3일에서만 발현(*Hoxb7*), 0시간, 4시간, 3일 중 4시간에서만 과 발현(*Hoxc6*)되는 유전자들과, 0시간(*Hoxa3*, *c8*, 그리고 *d8*), 4시간(*Hoxb4*, *c5*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*), 3일(*Hoxb3*, *b9*, 그리고 *d12*)에서만 발현하는 유전자들이 관찰되었다(표 3).

*Hox* 유전자 외에도 homeodomain을 가진 여러 유전자(*Pdx*, *En2*, *Hex*, *Gbx*)들이 클론 되었다. 그 중 특히 *Hex* 클론들을 많이 얻을 수 있었으므로, *Hex* specific primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과, 재생 0시간, 4시간, 3일 모두에서 발현하였으나, 특히 3일에 가장 많이 발현하였다(그림 5). 이러한 *Hex* 유전자의 발현 양상은 얻은 *Hex* 클론 숫자와 그 패턴이 유사하였다.

```

      Antp LELEKEFHFNRYLTRRRRIELAHSLNLTERQVKIWFQNR
mHoxa10 T-----L--M----E--L-ISR-VH--D-----
mHoxc10 T-----L--M----E--L-ISKTI---D-----
mHoxa1  T-----K----A--V-I-A--Q-N-T-----
mHoxc8  T-----L--P----K----VS-A-G-----

primer A
5'CTg/c GAg/a CTg/c GAg/a AAg/a GAg/a TTc/t3'
                                     primer B
                                     3'TTc/t TAg/a ACC AAg/a GTc/t TTg/a g/tC5'

```

그림 3. RT-PCR에 사용된 primer 서열. murine homeodomain 서열을 *Antp*의 서열과 같이 배열시켰다. 같은 아미노산들은 - 으로 표시하였다. 5'쪽과 3'쪽에서 가장 잘 보존된 2부분(음영부분)을 선택하여 degenerate primer A(sense)와 primer B(antisense)를 제작하였다. primer서열은 아랫부분에 나타내었다.

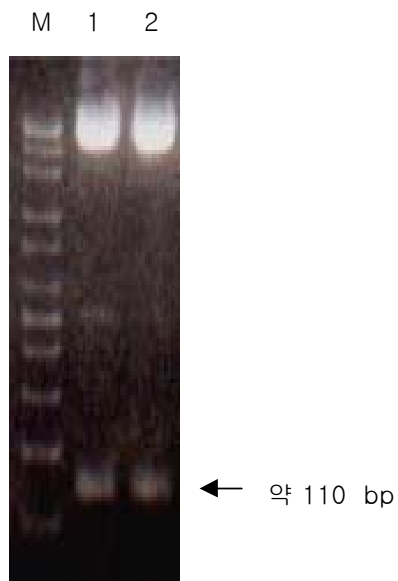


그림 4. 제한 효소를 처리하여 클론 확인. TOPO 벡터를 가지고 클로닝한 클론 No. 3-372(1), 3-373(2)에 *EcoRI*를 처리하여 insert size를 확인하였다. M은 100 bp marker이고, 화살표는 증폭되고 클론된 *Hox* 유전자 단편(약 110 bp)의 위치이다.



표 3. 재생 단계별 *Hox* 유전자의 발현 패턴.

paralogous group	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
<b><i>HoxA</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>		<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>		<b>13</b>
0시간	5		1		4		4						
4시간	5				4		1		1	7			
3일	1								3	8			
<b><i>HoxB</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>				<b>13</b>
0시간	1					2	1	6					
4시간	4	2		1	2	6		2					
3일	4	1	1		2		3	1	2				
<b><i>HoxC</i></b>				<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>		<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
0시간						2		9					
4시간					1	4			2	2			
3일						1							
<b><i>HoxD</i></b>	<b>1</b>		<b>3</b>	<b>4</b>				<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
0시간			1					1		1			
4시간	1		1	2					2	3			
3일	2		2	2								1	

클로닝 방법을 이용하여 분석된 *Hox* 유전자 클론 수를 재생 단계별로 나타냈다. 맨 윗줄은 paralogous group을 나타내며, 음영부분은 *Hox* 유전자의 4개 cluster들을 나타낸 것이다.

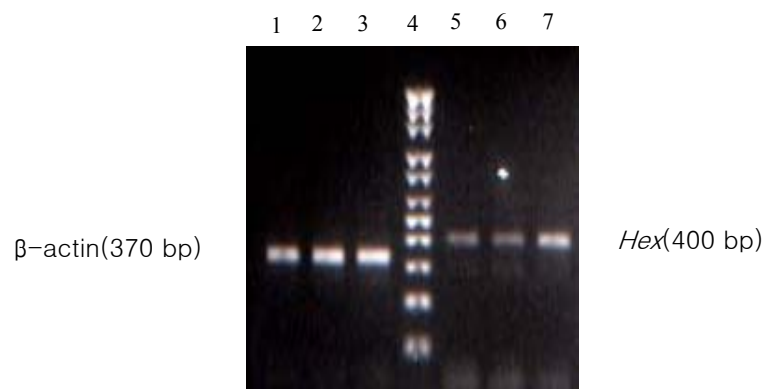


그림 5. RT-PCR을 통한 재생 단계별 *Hex* 유전자의 발현. 각 lane은 부분 절제 후 재생 0시간(lanes 1, 5), 4시간(lanes 2, 6), 3일(lanes 3, 7)후의 간 조직에서 분리한 총 RNA를 이용하여  $\beta$ -actin primer 와 *Hex* specific primer를 이용하여 RT-PCR한 결과이다. 40회 증폭 후 1.0% agarose gel에서 확인하였으며, lane 4는 100 bp marker 이다.

### 3. 간 재생 과정에서 발현하는 단백질 : 프로테옴 분석

재생 단계별로(0시간, 4시간, 3일) 간 조직에서 전체 단백질을 얻어 2-DE gel(그림 6)과 MALDI-TOF 분석을 실행하였다. gel상에서 pI와 분자량 별로 분리된 spot들을 PDQuest<sup>TM</sup> software(Huntington station, NY, USA)를 이용하여 분리된 0시간의 간 sample과 비교하여 spot의 진하기 정도가 2-3배 이상 되는 spot과 2~3배 이하 되는 spot들을 선택하였다. 재생 단계별로 그 발현 정도가 점차 증가하는 spot 8개(spot number, sn 1-8, 그림 7), 점차 감소하는 spot 3개(sn 9-11, 그림 8), 재생 4시간째에 과 발현하는 spot 9개(sn 12-20, 그림 9), 재생 3일째에서 과 발현되는 spot 9개(sn 21-29, 그림 10)를 선택하여 MALDI-TOF를 이용하여 분자량을 결정한 후 ProFound 단백질 identification 프로그램을 이용하여 분석하였다<sup>36-38</sup>. sn 5와 8등 몇몇 spot의 경우 Hox 단백질을 포함하여 1개 이상의 단백질로 분석되었다(그림 11).

분석 결과, 전체 단백질 가운데 분석된 아미노산 서열이 가장 높은 비율로 일치하는 단백질 중, 발현이 증가하는 단백질은(그림 7)(표 4)- Aldehyde dehydrogenase, cytosolic (ALDH class 1, sn 1), Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor(sn 2), G/T mismatch -specific thymine DNA Glycosylase(sn 3), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, sn 4), Short chain 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase precursor(HCDH, sn 5), Hoxa1(sn 5), Malate dehydrogenase(MDH, sn 6), 3-hydroxylacyl-coA dehydrogenase type II(sn 7), 3-hydroxylacyl-coA dehydrogenase type II(sn 8), Hoxb9(sn 8)-, 발현이 감소하는 단백질은(그림 8)(표 4)- Serum albumin precursor(sn 9),  $\alpha$ -enolase(sn 10), Glutamate dehydrogenase precursor(GDH, sn 11), Pbx(sn 11)-, 재생 4시간째에 과 발현하는 단백질은(그림 9)(표 5)- Aldehyde-dehydrogenase, Cytosolic(sn 12), Creatine kinase, M chain(sn 13), Zinc-finger protein UBI-D4(sn 14), Hoxd10(sn 14), Developmentally regulated GTP-binding protein 2(DRG 2, sn 15), Homeobox protein LHX8(LIM, sn 15), Homeobox protein CHX10(sn 16), Kalikrein-binding protein precursor(KBP, sn 17), Homeobox protein MOX2(sn 17),  $\beta$ -1,4-N acetylgalactosaminyl transferase(sn 18), Homeobox protein LHX8(LIM, sn 18), Cytochrome P450 3A13(sn 19), Hoxd10(sn 19), Myoglobin(sn



20), Homeobox protein Hex(sn 20)-, 재생 3일째에 과 발현하는 단백질은(그림 10)(표 6)-  
γ-aminobutyric-acid receptor α-6-subunit precursor(sn 21), Hoxa1(sn 21), Betain-hom  
ocysteine S-methyltransferase (BHMT, sn 22), Interleukin-5-receptor α chain precursor  
(sn 23), Homeobox protein CHX10(sn 23), 5-hydroxytryptamine 2C receptor(sn 24),  
Keratin, typeII cytoskeletal 4(sn 25), Sonic hedgehog protein precursor(SHH, sn 26),  
Hoxd10(sn 26), Short chain 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase precursor (HCDH, sn  
27), DNA primase small subunit(sn 28), Homeobox protein engrailed-2(EN2, sn 28),  
Hemoglobin zeta chain(sn 29)- 들이 분석되었다(표 4). sn 5와 sn 27은 HCDH로, sn 14,  
19, 26은 Hoxd10으로, 그리고 sn 15와 18은 LIM으로 각각 분석되었다. 이렇게 한 단백질  
이 여러 군데의 spot으로 분석되는 것은 아마도 이들 단백질들의 modification에 기인하는  
것으로 생각된다.

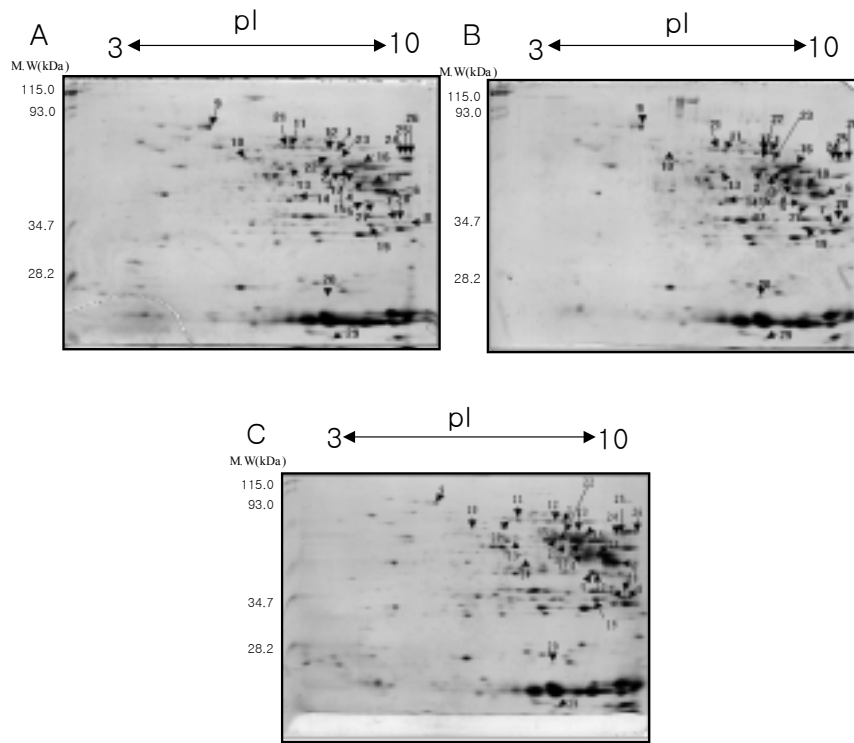


그림 6. silver-stain 한 2-DE gel image. 부분 절제 후 재생 0시간(A), 4시간 (B), 3일(C)된 간 조직에서 분리된 단백질을 이용하여 2-DE gel 상에서 pI와 분자량(M.W.)에 따라 분리했다. 각각의 gel사진에서 1~8번까지는 그 발현이 증가하는 spot들, 9~11번까지는 발현이 점차 감소하는 spot들, 12~20번까지는 재생 4시간에서 과 발현하는 spot들, 21~29번까지는 재생 3일에서 과 발현하는 spot을 나타냈다.

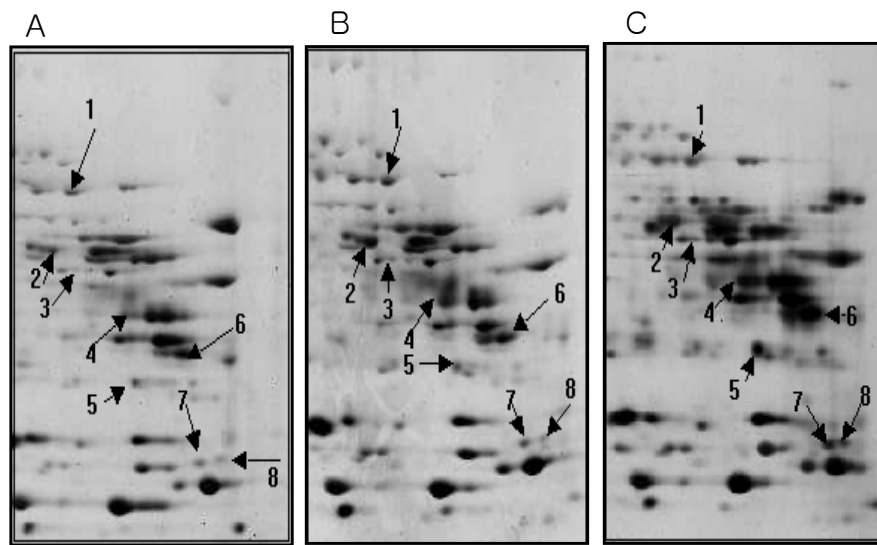


그림 7. 재생 단계별 발현이 증가하는 spot. 각 단계별- 재생 0시간(A), 4시간(B), 3일(C)- 간 조직에서 얻은 단백질을 2-DE으로 분리하였을 때, 0시간에 비해 그 발현 정도가 점차 증가하는 spot들을 나타냈다. 1~8까지 숫자는 spot number을 나타낸다.

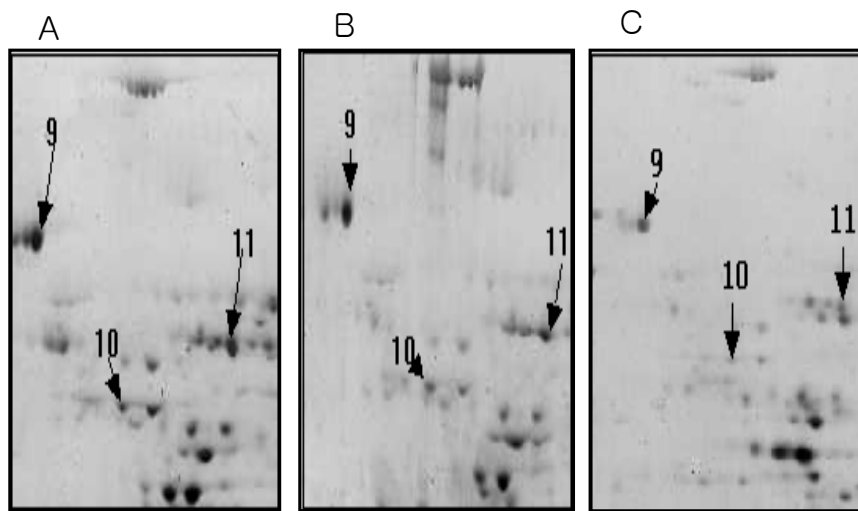


그림 8. 재생 단계별 발현이 감소하는 spot. 부분 절제 후 재생 0시간(A), 4시간 (B), 3일(C)경과 후의 간 조직의 단백질을 pI, 분자량(M.W.)별로 분리 시 0시간에 비해 그 발현이 감소하는 spot들을 나타냈다. 9~11은 spot number를 나타낸다.

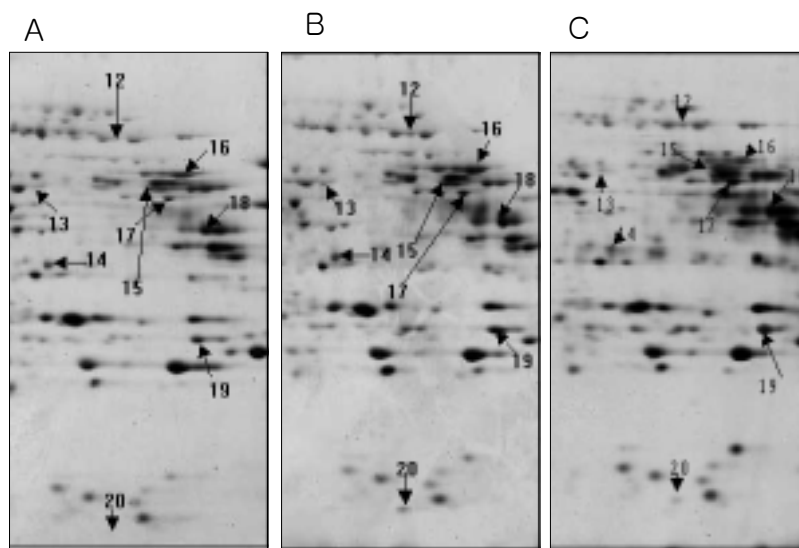


그림 9. 간 부분 절제 후 재생 4시간째에 과 발현된 spot. 재생 0시간(A)과 3일(C)에 비해서 4시간(B)에 과 발현하는 spot들을 나타냈다. 12~20까지는 spot number이다.

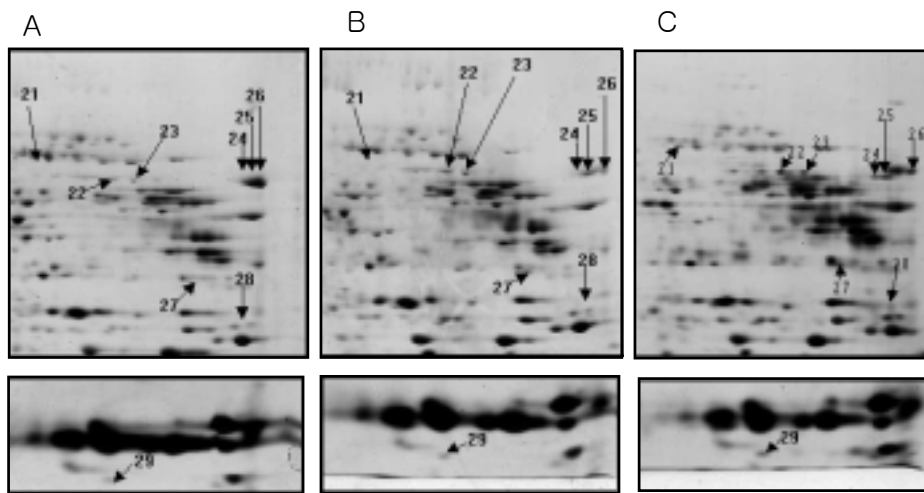


그림 10. 간 부분 절제 후 재생 3일째에 과 발현된 spot. 재생 0시간(A)과 4시간(B)에 비해 3일(C)에서 과 발현하는 spot들을 나타냈다. 21~29는 spot number 이다.

표 4. 간 재생 과정 중 발현이 증감하는 단백질 spot 분석.

spot No.	Protein name	%	Access No.	pI	M.W.
1	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic (ALDH class 1)	25	P24549	7.8	54.38
2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	18	P47738	7.7	56.52
3	G/T mismatch-specific thymine DNA Glycosylase	10	P56581	7.7	44.07
4	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) <sup>39,40</sup>	38	P16858	8.7	35.79
5	Short chain 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase precursor(HCDH)	14	Q61425	8.8	34.41
	Hoxa1 <sup>41</sup>	11	P09022	8.0	36.02
6	Malate dehydrogenase(MDH) <sup>42</sup>	30	P08249	9.3	35.58
7	3-hydroxylacyl-coA dehydrogenase type II	14	O08756	8.8	27.40
8	3-hydroxylacyl-coA dehydrogenase type II (HADH)	36	O08756	8.8	27.40
	Hoxb9	16	P20615	9.3	27.95
9	Serum albumin precursor	28	P07724	5.8	68.67
10	$\alpha$ -enolase	35	P17182	6.4	47.11
11	Glutamate dehydrogenase precursor (GDH)	39	P26443	8.3	61.32
	Pre-B cell Homeobox (Pbx2) <sup>43</sup>	16	O35984	7.2	45.79

MALDI-TOF로 분석된 펩타이드를 ProFound 단백질 identification 프로그램으로 분석하였으며 단백질 data는 SWISS-PROT database를 활용하였다. %는 전체 단백질 중 분석된 아미노산 서열이 차지하는 비율을 나타낸다. spot No. 1~8까지는 발현이 증가하는 spot, 9~11까지는 발현이 감소하는 spot들을 나타냈다.

표 5. 간 재생 과정 중 재생 4시간째에 과 발현하는 단백질 spot 분석.

spot No.	protein name	%	Access No.	pI	M.W.
12	Aldehyde-dehydrogenase,cytosolic (ALDH)	25	P24549	7.8	54.38
13	Creatine kinase, M chain	44	P07310	6.6	43.03
14	Zinc-finger protein UBI-D4	11	Q61103	6.1	44.21
	Hoxd10	10	P28359	8.4	38.34
15	Developmentally regulated GTP-binding protein 2(DRG 2)	17	Q9QXB9	9.3	40.70
	Homeobox protein LHX8(LIM) <sup>44,45</sup>	12	Q9WUH2	9.6	42.97
16	Homeobox protein CHX10	16	Q61412	7.1	39.42
17	Kalikrein-binding protein precursor(KBP)	13	P29621	7.8	46.75
	Homeodomain protein MOX2 <sup>46</sup>	14	P32443	8.6	33.49
18	β-1,4-N acetylgalactosaminyl transferase	17	Q09200	9.1	59.19
	Homeobox protein LHX8(LIM)	16	O35652	9.1	40.69
19	Cytochrome P450 3A13	21	Q64464	9.0	57.47
	Hoxd10	19	P28359	8.4	38.34
20	Myoglobin	28	P04247	7.1	17.05
	Homeobox protein Hex <sup>47-51</sup>	14	P43120	7.1	29.97

MALDI-TOF로 분석된 펩타이드를 ProFound 단백질 identification 프로그램으로 분석하였으며 단백질 data는 SWISS-PROT database를 활용하였다. %는 전체 단백질 중 분석된 아미노산 서열이 차지하는 비율을 나타낸다.

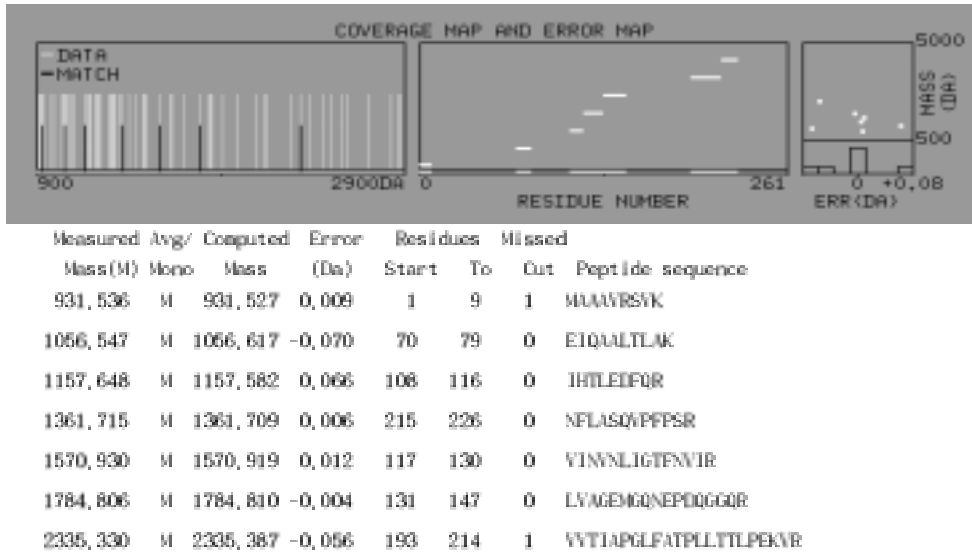


표 6. 간 재생 과정 중 재생 3일째에 과 발현하는 단백질 spot 분석.

spot No.	protein name	%	Access No.	pI	M.W.
21	$\gamma$ -aminobutyric-acid receptor $\alpha$ -6-subunit precursor	13	P16305	8.4	49.77
	Hoxa10	11	P31310	7.8	41.40
22	Betain-homocysteine S-methyltransferase(BHMT) <sup>52</sup>	25	O35490	8.4	45.00
23	Interleukin-5-receptor $\alpha$ chain precursor	7	P21183	8.4	46.97
	Homeobox protein CHX10	9	Q61412	7.1	39.42
24	5-hydroxytryptamine 2C receptor	16	P34968	9.8	51.86
25	Keratin, type II cytoskeletal 4	20	P07744	8.6	56.43
26	Sonic hedgehog protein precursor(SHH)	16	Q62226	8.7	47.76
	Hoxd10	9	P28359	8.4	38.34
27	Short chain 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase precursor(HCDH)	18	Q61425	8.8	34.41
	Hoxd3 <sup>53</sup>	14	P09027	9.6	44.12
28	DNA primase small subunit	24	P20664	9.1	49.28
	Homeobox protein engrailed-2 (EN2)	19	P09066	9.7	33.80
29	Hemoglobin zeta chain	40	P06467	7.1	16.22

MALDI-TOF로 분석된 펩타이드를 ProFound 단백질 identification 프로그램으로 분석하였으며 단백질 data는 SWISS-PROT database를 활용하였다. %는 전체 단백질 중 분석된 아미노산서열이 차지하는 비율을 나타낸다.

A. 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase type II(HADH)



B. Homeobox Protein Hoxb9

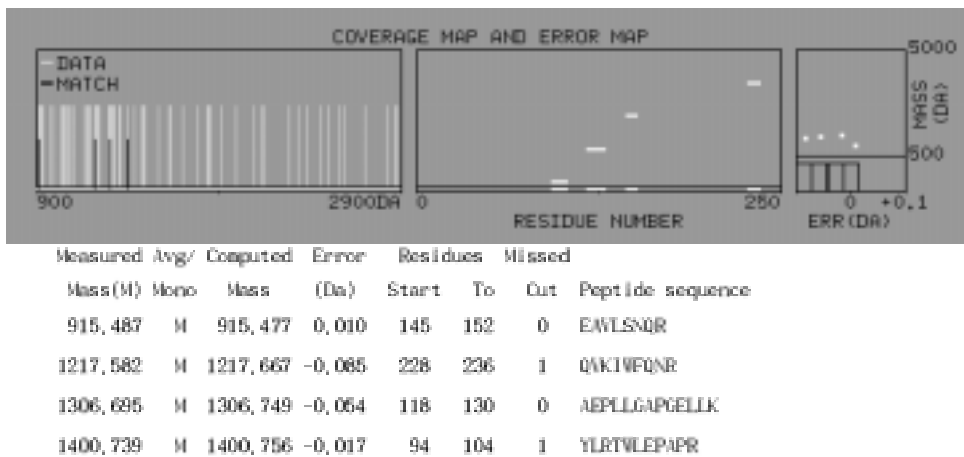


그림 11. spot number(sn) 8의 분석 예. sn 8 spot을 분석한 결과, 일치비율이 10% 이상인 단백질 중 가장 높은 비율로 일치된 단백질 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase typeII(HADH)(A)-36%-과, 분석된 단백질 중 Homeobox 단백질인 Hoxb9(B)-16%-의 일치비율을 그래프로 나타낸 것이다. 검정색 막대는 일치하는 연속된 아미노산서열을 나타낸 것이다.

## IV. 고찰

간은 신체에서 유일하게 재생이 가능한 기관이다. 재생은 손상 부위가 완전한 형태를 유지하면서 회복된다는 점에서 성체에서 일어나는 또 다른 형태의 발생이라고 볼 수 있다. *Hox* 유전자는 발생과정 중 시·공간 특이적으로 발현하여 개체의 형태를 만드는데 관여하는 유전자로 알려져 있으며, 초파리와 같은 하등 동물에서부터 사람, 생쥐를 포함하는 고등 포유류에서 잘 보존되어 있다. 현재 사람과 생쥐에서 39개의 *Hox* 유전자가 존재함이 밝혀졌으며 발생과정 중 배아의 전·후 축을 따라 각 체 분절에 위치 정보를 준다고 보고되어 있다<sup>16-18</sup>. 간 재생을 연구하기 위한 손상으로는 간에 독성 물질을 처리하는 방법과 부분 절제 방법이 있다<sup>1,3</sup>. 본 연구에서는 다른 간세포에는 영향을 주지 않으며 재생 과정의 관찰이 용이한 부분 절제 방법을 이용하여 간 재생 과정 중 발현하는 *Hox* 유전자의 발현 패턴을 분석하였으며 또 프로테옴 분석기법을 이용하여 재생 과정에서 특이적으로 발현이 증가하거나 감소하는 단백질을 분석하였다.

부분 절제술을 수행하고 3주 경과 후 간은 원래 크기로 재생이 되었다. 절제 후 재생 4시간에서는 절제 직후 남아있던 간 무게보다 오히려 감소하였는데 이것은 4시간이 수술 후 회복하기에는 너무 짧은 시간이며, 또한 절제 할 때 혈액의 손실 등으로 인한 결과로 유추된다. 그러나 짧은 시간이라도 정상적인 간 기능 유지를 위해 정중엽과 미상엽이 각각 8.0%, 1.6% 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. 또 부분 절제 3일 후에는 절제 직 후 무게에 비해 7.5% 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 정중엽과 미상엽은 36%, 25% 증가한 것을 볼 수 있었다. 이상의 결과는 이전의 보고들과<sup>1-5</sup> 유사한 것으로, 절제된 부분의 엽들이 재생 과정에서 증식하는 것이 아니라 절제하지 않은 엽들의 크기가 증가하여 재생되는 것임을 알 수 있었다. 흥미 있는 점은 재생 과정 중 절제하지 않은 엽의 크기가 증가 할 때 그 3차원적 형태가 그대로 유지되면서 재생된다는 것이다.

형태의 유지를 위해서는 *Hox* 유전자들의 발현이 관여할 것으로 유추되어

재생 단계별로 *Hox* 유전자의 발현 패턴을 분석하였으며, 그 결과 paralogous group 9와 10에 속하는(*Hoxa9*, *a10*, *b9*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*) 유전자들이 stage specific하게 재생 과정 중(즉, 재생 4시간 3일에서) 발현하는 것을 관찰 할 수 있었다. 특히 *Hoxa10*의 경우 0시간에서는 발현하지 않았으나, 4시간과 3일에서는 각각 7개, 8개의 *Hox* 클론을 관찰할 수 있었다. 반면에 paralogous group 8에 속하는 *Hoxc8*의 경우는 0시간에서는 9개의 *Hox* 클론을 관찰하였으나, 4시간과 3일에서는 발현을 관찰할 수 없었다. 그 외에도 *Hoxa1*과 *b1*은 재생 전·후에 발현을 지속하는 것으로 관찰되었다. 비록 PCR과 클로닝을 통한 RNA 분석이 세포내의 RNA 양을 정확하게 정량적으로 나타내주는 것이라고 보기는 어려우나 본 결과에서는, *Hox* 유전자의 paralogous group 9와 10이 재생 단계에 특이적으로 발현하는 유전자들로, *Hoxa1*과 *b1*은 일반적인 간 특이적 유전자들로 분석되었다.

단백질 분석 결과, 재생 단계별로 발현이 증가하는 단백질 중 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 최근 DNA repair, DNA 합성의 조절, apoptosis의 조절 등에 관여한다는 보고<sup>39,40</sup>들을 참고해 볼 때 재생 후 3일까지 지속되는 간세포들의 DNA 합성의 조절에 관여할 것으로 유추된다. MALDI-TOF로 분석된 펩타이드 서열이 단백질 서열의 10%이상을 차지하는 것 중 homeobox 단백질들의 발현 패턴은 다음과 같다. 점차 증가하는 단백질들은 *Hoxa1*, *b9*이며, 감소하는 단백질은 *Pbx*이고, *Hoxd10*, *LIM*, *CHX10*, *MOX2*, 그리고 *Hex*는 재생 4시간째에 과 발현하였다. 또한 *Hoxa10*, *d3*, *d10*, *CHX10*, 그리고 *EN2*는 재생 3일에서 과 발현하는 것으로 관찰되었다. 주목할 만한 것은 이 결과들이 RNA 수준에서의 *Hox* 유전자 발현 패턴과 유사성을 보인다는 것이다. *Hoxa10*의 RNA 수준은 재생 4시간, 3일에서 모두 발현되며, 단백질 수준은 4시간에서 발현을 시작하여 3일에서 과 발현하는 패턴을 보였다. 그리고 *Hoxd10*의 경우도 RNA 수준에서 재생 4시간까지만 발현되는 것으로 관찰되었으며, 단백질 수준에서도 재생 4시간까지 과 발현되다가 재생 3일에는 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 한편, *Hoxd3*의 경우는 재생 0시간과 4시간에서는 약하게 그리고 재생 3일에서 과 발현하였는데, 단백질 수준에서는 모두 재생 3일에서 과 발현되었다. 이것은 아마도 단백질이나 RNA의 안정성차이에 의한 것으로 유추된다.

요약하면 *Hoxa10*, *d10*, 그리고 *d3*유전자의 RNA와 단백질 수준에서의 발현 패

턴이 유사함을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 paralogous group 9와 10의 유전자(*Hoxa10*과 *d10*)와 *Hoxd3*가 재생 단계에 특이적으로 발현하는 유전자들임을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 앞으로는 이들 세 유전자들(*Hoxa10*, *d10*, 그리고 *d3*)의 재생 단계별 발현 패턴 분석을 위해 Northern blotting 이나 *in situ* hybridization 등의 연구를 수행하여 재생 과정에 특이적으로 발현하는 유전자임을 증명하는 연구를 수행해야 할 것으로 생각한다. 그리고 class II에 속하는 homeobox 단백질인 Hex의 발현은 RNA와 단백질 수준에서의 분석 결과에서 차이를 보였다. RNA 분석의 결과 재생 0시간, 4시간, 3일 모두에서 발현되지만, 3일에서 과 발현되었다. 반면에 단백질 분석에서는 재생 4시간에서 과 발현하는 것으로 나타났다. 이것은 재생 3일에서 RNA의 degradation이 일어났거나, 4시간에서 단백질의 modification으로 인해 안정성이 증가했을 것으로 유추되는데 이것은 앞으로 RNA나 단백질의 half life를 측정해 봄으로써 그 정확한 기작을 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

간 발생은 배 발생시기 8.5일부터 심장막낭(pericardial cavity)과 난황낭(yolk sac) 사이에 위치한 횡중격(septum transversum)의 내장 중배엽(visceral splanchnic layer)에서만 발생하는 것으로 보고되어있다<sup>14,54</sup>. 이 부분은 6체절 단계의 내배엽의 복측 장간막(ventral mesentery)으로 생각된다. 이것은 cardiac signal이나 hepatic program을 발현하는 신호등을 받는 복측 장간막의 pre-pattern 또는 competence가 있는 것으로 보고되어있다<sup>9</sup>. 복측 장간막의 competence는 알려져 있는 여러 가지 신호조절인자(signal factor)들뿐만 아니라 형태 형성에 관여하는 *Hox* 유전자들이 관여할 것으로 생각된다. *Hox* 유전자는 일반적으로 머리에서부터 꼬리쪽으로 발현이 일어난다. 한 cluster 내에서 보면 3'쪽에 위치한 유전자가 5'쪽에 위치한 유전자보다 먼저, 그리고 좀더 머리(anterior)쪽으로 발현되며<sup>13</sup>, 발현시기는 중배엽이 형성되기 시작하는 낭배 형성 초기부터 시작하여 기관의 형성이 끝나는 후기 낭배 형성기까지 지속되는데, 각 유전자들은 시·공간 특이적으로 발현됨으로써 개체 각 부분들의 특성이 결정된다고 알려져 있다. 관찰 결과 stage specific하게 발현하는 유전자 중 *Hoxc9*, *c10*, 그리고 *d10*은 *in situ* hybridization 실험을 통해서 *Hoxc9*은 8.5~14.5일 사이, *Hoxc10*은 12.5일, *Hoxd10*은 8일에 발현하는 것으로 알려져

있다<sup>18</sup>. 따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 유추해 볼 때 paralogous group 9와 10의 *Hox* 유전자들이 간싯이 유도되는 과정과 재생 과정의 초기(부분 절제 후 4시간, 3일)에 일어나는 간의 형태 형성 및 유지에 관여할 것으로 유추되어 진다. 이것은 앞으로 *in situ* hybridization 방법을 통해서 특정 *Hox* 유전자(paralogous group 9와 10의 유전자 등)의 발현을 embryo를 이용하여 확인하고, 또 재생 과정 중 RNA수준에서의 발현 역시 Northern blotting을 이용하여 다시 한 번 확인이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결론

신체에서 유일하게 재생되는 간을 이용하여 재생 과정에서 *Hox* 유전자의 발현 패턴을 분석하고, 프로테옴 분석을 통하여 간 재생에 관여하는 단백질을 알아보고자 하였다.

분석 결과, stage specific하게 발현하는 2개의 *Hox* paralogous group과 재생 전·후 지속적으로 발현하는 2개의 유전자들을 관찰 할 수 있었다. stage specific한 발현은 paralogous group 9와 10에 속하는 유전자(*Hoxa9*, *a10*, *b9*, *c9*, *c10*, *d9*, 그리고 *d10*)들이며, 지속적인 발현을 보이는 유전자는 *Hoxa1*과 *b1*이었다.

단백질을 분석한 결과, 재생 4시간째에 과 발현하는 단백질 중 *Hoxd10*이 그리고 3일째 과 발현하는 단백질로서 *Hoxa10*과 *d3*이 분석되었다. 이들의 발현 패턴은 흥미롭게도 RNA 수준에서의 분석 결과와 일치함을 확인하였다.

이상의 결과를 바탕으로 *Hoxa10*과 *d10*을 포함하는 paralogous group 9와 10의 유전자와 *Hoxd3*가 재생 단계에 특이적으로 발현하는 유전자들임을 추측할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996;132:1133-49.
2. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1990;10:1249-56.
3. Mizuta I, Ogasawara N, Yoshikawa H, Sakoyama Y. Identification of homeobox genes expressed during the process of rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Genet* 1996;34:1-15.
4. Taub R. Liver regeneration in health and disease. *Clin Lab Med* 1996;16:341-60.
5. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.
6. Han S-C, Kil Y-C, Kim W-J. Cytochemistry on Regeneration of Rat Liver. *Soonchunhyang J Nat Sci* 1992;4:285-91.
7. Sell S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen* 2001;9:467-82.
8. Duncan SA. Transcriptional regulation of liver development. *Dev Dyn* 2000;219:131-42.



9. Anantharaju A, Feller A, Chedid A. Aging Liver. a review. *Gerontology* 2002;48:343-53.
10. Odelberg S. Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:335-43.
11. Carlson MR, Komine Y, Bryant SV, Gardiner DM. Expression of Hoxb13 and Hoxc10 in developing and regenerating Axolotl limbs and tails. *Dev Biol* 2001;229:396-406.
12. Gardiner DM, Carlson MR, Roy S. Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:385-93.
13. Sell S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen* 2001;9:467-82.
14. George KM, Marie CD. Liver regeneration *Sci* 1997;276:60-65.
15. Zorn AM, Mason J. Gene expression in the embryonic *Xenopus* liver. *Mech Dev* 2001;103:153-7.
16. Calleja M, Renaud O, Usui K, Pistillo D, Morata G, Simpson P. How to pattern an epithelium: lessons from achaete-scute regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene* 2002;292:1-12.
17. Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Info* 1993;5:301-308.
18. Sharkey M, Graba Y, Scott MP. Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends Genet* 1997;13:145-51.

19. Dubouls D. Guidebook to the Homeobox Genes. New York: Oxford University Press Inc; 1994.
20. Thattaliyath BD, Firulli BA, Firulli AB. The Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor HAND2 Directly Regulates Transcription of the Atrial Naturetic Peptide Gene. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1335-44.
21. Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* 2000;69:85-100.
22. Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod* 1997;3:115-31.
23. Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit* 2002;8:RA53-63.
24. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992;119:629-41.
25. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-36.
26. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2001;48:556-62.
27. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32 Suppl 1:19-31.
28. Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of

- liver regeneration. *J Clin Invest* 1993;91:1319-26.
29. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. New concepts of molecular biology for colon carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1291-7.
  30. Sargent LM, Sanderson ND, Thorgeirsson SS. Ploidy and karyotypic alterations associated with early events in the development of hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring c-myc and transforming growth factor alpha transgenes. *Cancer Res* 1996;56:2137-42.
  31. Tewari M, Dobrzanski P, Mohn KL, Cressman DE, Hsu JC, Bravo R, et al. Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I kappa B that inhibits NF-kappa B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel kappa B site-binding complex. *Mol Cell Biol* 1992;12:2898-908.
  32. FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* 1995;6:417-27.
  33. Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995;21:1443-9.
  34. Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, et al. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998;102:996-1007.
  35. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin -6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334:297-314.

36. Zhang W, Chait BT. ProFound - An expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 2000;72:2482-89.
37. Zhang W, Chait BT. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 2000;72:2482-9.
38. Niu S, Zhang W, Chait BT. Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins. *J Am Soc Mass Spectrom* 1998;9:1-7.
39. Guerrieri F, Pellicchia G, Lopriore B, Papa S, Esterina Liquori G, Ferri D, et al. Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration. *Eur J Biochem* 2002;269:3304-12.
40. Corbin IR, Gong Y, Zhang M, Minuk GY. Proliferative and nutritional dependent regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in the rat liver. *Cell Prolif* 2002;35:173-82.
41. Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:292-7.
42. Greco M, Moro L, Pellicchia G, Di Pede S, Guerrieri F. Release of matrix proteins from mitochondria to cytosol during the prereplicative phase of liver regeneration. *FEBS Lett* 1998;427:179-82.
43. Gregory PA, Mackenzie PI. The homeodomain Pbx2-Prep1 complex modulates hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of the UDP-glucuronosyl-transferase 2B17 gene. *Mol Pharmacol* 2002;62:154-61.

44. Pinto do O P, Kolterud A, Carlsson L. Expression of the LIM-homeobox gene Lhx2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. *EMBO J* 1998;17:5744-56.
45. Yamashita T, Moriyama K, Sheng HZ, Westphal H. Lhx4, a LIM homeobox gene. *Genomics* 1997;44:144-6.
46. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.
47. Bedford FK, Ashworth A, Enver T, Wiedemann LM. HEX : a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1245-9.
48. Ghosh B, Jacobs HC, Wiedemann LM, Brown A, Bedford FK, Nimmakayalu MA, et al. Genomic structure, cDNA mapping, and chromosomal localization of the mouse homeobox gene, Hex. *Mamm Genome* 1999;10:1023-5.
49. Thomas PQ, Brown A, Beddington RS. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 1998;125:85-94.
50. Keng VW, Yagi H, Ikawa M, Nagano T, Myint Z, Yamada K, et al. Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1155-61.
51. Ghosh B, Jacobs HC, Wiedemann LM, Brown A, Bedford FK, Nimmakayalu MA, et al. Genomic structure, cDNA mapping, and

chromosomal localization of the mouse homeobox gene, Hex. *Mamm Genome* 1999;10:1023-5.

52. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Betaine, ethanol, and the liver: a review. *Alcohol* 1996;13:395-8.
53. Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, Hunt TK, Young DM, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res* 2001;100:46-56.
54. Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:83-8.

Abstract

A study on *Hox* gene and protein expression profile  
during murine liver regeneration

Boyeon Youn

*Department of Medical Science*  
*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Myoung Hee Kim)

Liver is an organ with relatively slow cell replacement, but it is known to have an ability to regenerate by itself when it is damaged or removed. For a scientific experiment model regarding liver regeneration, there is a report by Higgins and Enderson in 1931 investigating the regeneration process after 2/3 of a rat liver was removed. Regeneration means recovering the shape prior to the damage, not just the simple multiplication of cells and can be regarded as another form of generation occurring in an adult organism. *Hox* gene is one of the genes controlling generation and manifests itself at a certain time at a certain place during early embryonic stage. It is known to have an important role in forming the axis of the body distinguishing the front and the back. Research on the liver regeneration so far was regarding cellular multiplications, and the research on the formation of the shape during liver regeneration process has been scarce. This research intends to infer the *Hox* code by analyzing the expression patterns of the *Hox* genes during liver regeneration and to analyze the proteins involved in regeneration by performing 2-Dimensional Electrophoresis (2-DE) and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF). RNA has been separated from the liver tissue at the time of partial hepatectomy, 4 hours later and 3 days later. Gene sequence obtained by performing PCR and cloning has been

analyzed, and homologous genes were sought through BLAST search.

Genes belonging to paralogous group 9 and 10 (*Hoxa9*, *a10*, *b9*, *c9*, *c10*, and *d9*) manifested themselves in a peculiar way during regeneration process with stage specific characteristics. Also, the *Hoxa1* and *b1* of paralogous group 1 manifested themselves continuously before and after regeneration.

The result of the protein analysis showed Hoxd10 overexpressing at 4 hours of regeneration and Hoxa10 and d3 overexpressing at 3 days of regeneration. Interestingly, the pattern of protein expression matched the result of RNA level analysis.

Based on the above results, *Hoxd3* and paralogous group 9 and 10 genes including *Hoxa10* and *d10* seemed to be a related genes during regeneration steps.

---

Key Words : liver, regeneration, *Hox* gene, partial hepatectomy, 2-Dimensional Electrophoresis