

부분 간절제술을 시행한 랫드에서 간재생에 관한 이과두주 급성투여에 따른 영향

조진연, 송지예, 안재범, 김현석, 김민수, 임 현, 임준성,
신동석, 김현철*, 정기수*, 신명균**, 이민재¹

강원대학교 동물자원과학대학 수의학과 실험동물의학교실¹ 및 기생충학교실*,
강원도가축위생시험소**

(접수 2005. 12. 20 게재승인 2006. 3. 14.)

Effects of acute LeeKwaDoo administration on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats

Jin-Youn Cho, Ji-Yae Song, Jae-Bum Ahn, Hyun-Seok Kim, Min-Su Kim,
Hyun Im, Jun-Sung Lim, Dong-Seok Shin, Hyun-Chul Kim*, Ki-Soo Jung*,
Myung-Kyun Shin**, Min-Jae Lee¹

¹Department of Veterinary Lab Animal Medicine & Science, and *Department of
Veterinary Parasitology, College of Animal Resource Sciences, Kangwon National
University, Chuncheon, 200-701, Korea;

**Gangwondo Veterinary Service Laboratory, Chuncheon, 200-822, Korea

(Received 20 December 2005, accepted in revised from 14 March 2006)

Abstract

Alcoholism and alcohol abuse are major public health concerns. This is linked to the injury of many organs, especially liver. Experiments were performed to know the acute effects of LeeKwaDoo (LKD) induced by two-third partial hepatectomy (PH) in rats. In liver samples, regeneration parameters and histological assessment were performed. For the blood biochemical study, the blood were assayed with AST, ALT. The portal branch of liver lobes was ligated in the male Sprague-Dowley rats, two-thirds partial hepatectomies were also performed. It was estimated bodyweight and relative liver weight for the index of liver mass.

¹Corresponding author

Phone : 82+33-250-8678, Fax : 82+33-244-8678

E-mail : mjlee@kangwon.ac.kr

For the marker of blood chemistry, we investigate the serum sample of rats and demonstrated the level of AST, ALT. Remaining tissues of liver developed as microscopic structures. Resection of the lobes in PH+LKD group resulted in a marked change of liver weight, blood chemistry and histological changes. The initiation of the proliferative response in PH group stimulated as well as reduction of the liver mass. On the other hands, the initiation of the proliferative response in PH+LKD group delayed. Eventually, both PH group and PH+LKD group was restored relative liver weigh after 7 day. In conclusion, the acute adminstration of LKD seems to inhibit the initial response of liver regeneration through alcohol effects.

Key words : Rat, Partial hepatectomy, LeeKwaDoo, AST, ALT, Histology

서 론

알콜 중독과 잘못된 알콜 습관은 현대 사회의 중요한 건강문제로 대두되고 있다. 지나친 알콜 섭취는 많은 조직의 손상을 일으킬 수 있다¹⁾. 상당히 다양한 생화학적 과정이 ethanol에 의해 변할 수 있다. 대표적인 기관이 간이다.

일반적으로 간은 3대 영양소의 대사는 물론 에너지 대사, 요소 생성 및 암모니아 대사 그리고 조혈작용에 관여할 뿐만 아니라, 외부 환경에서 체내로 유입되는 이물질에 대한 대사 및 해독작용 등 체내에서 여러 가지 중요한 기능을 담당하고 있다.

랫드의 간은 능동적인 DNA합성과 세포증식 등의 과정이 활발하게 일어나는 놀랄만한 재생능력을 가지고 있다^{2,3)}. 그러나, 간은 독소, 바이러스, 또는 수술적 절제 등에 의해 손상을 입을 수 있다. 예로서 ethanol은 간의 재생을 억제한다고 알려져 있다⁴⁾. 간의 재생은 세포분열에 따른 간세포의 능력에 의존하며, 내적·외적 hepatic factor에 의해 통제된다²⁾.

간의 부분적인 제거를 통한 간 재생에 대한 연구는 1880년에 처음으로 보고되었고, 간 재생과 관련한 양적 접근은 1931년 Higgins와 Anderson에 의해 처음으로 시행되었다⁵⁾. 부분 간절제술(partial hepatectomy, PH)은 간 재생에 대한 좋은 모델이다. 간 무게는 수

술 후 48-72시간동안 두 배가 되며, 간 조직은 본래 간의 처음 크기에 달하는 7일에서 10일쯤 성장이 멈추게 된다⁵⁾.

반면에, 여러 가지 화학적 처리로 간엽의 central zone의 간세포 괴사를 통한 간세포 재생을 유도할 수도 있다. Ethanol이 이와 같은 목적으로 흔하게 사용된다⁴⁾.

본 연구에서는 간의 재생능력이 다른 동물들에 비해 월등한 랫드를 실험모델로 하여, 간의 70% 정도를 절제한 후 시중에서 시판중인 Lee Kwa Doo(LKD)를 투여하여 재생을 유도하는 과정에서 나타나는 세포증식의 특징을 관찰하였다. 즉 실험실내에서 성장 중인 랫드를 간절제술과 LKD투여 하에 간이 재생하도록 하였으며, 재생중인 간 조직을 광학현미경을 이용한 형태학적 관찰은 물론 효소활성도 측정을 통해 간 재생에 있어서 LKD에 의한 ethanol의 영향을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

동물

공시된 실험동물로는 4개월간 동물 사육실에서 표준사료와 물로 기초 사육한 45마리 수컷 Sprague-Dowley 계통의 랫드(Orient Co.; 431.83±8.09g)를 사용하였다. 실험을 위해

stainless-steel cage에 케이지당 3마리씩 분배시켜서 관찰하였다.

화학물질

화학물질로서 시중에서 시판중인 56%에탄올이 용해된 Lee Kwa Doo(LKD)를 사용하여 실험하였다.

실험적 설계와 처리

모든 동물은 그룹 당 15마리씩 하여 3그룹으로 나누었다. 이들 그룹은 다음과 같다. 복부 절개만 한 후 어떠한 처리도 하지 않은 Sham

operation control group; PH만을 시행한 PH group; PH후에 LKD를 단회 경구 투여한 PH+LKD group (Fig 1).

PH는 PH group과 PH+LKD group에 한하여 시행하였다. 1931년 Higgins와 Anderson이 시행한 방법에 따라서 ether 마취하에 수술적으로 간의 3분의 2를 제거하였다⁵⁾. PH+LKD group에는 수술 후 LKD를 7 ml/kg으로 하여 투여하였다. 그 후 각 그룹마다 3마리씩 0 시간, 1 시간, 1 일, 3 일, 그리고 7일 간격으로 ether 마취 하에 희생시켜 체중과 간 무게를 측정하였다(Fig 1). 혈액은 부검 시 복대동맥에서 채혈한 후 serum을 채취하여 생화학적 검사에 이용하였다.

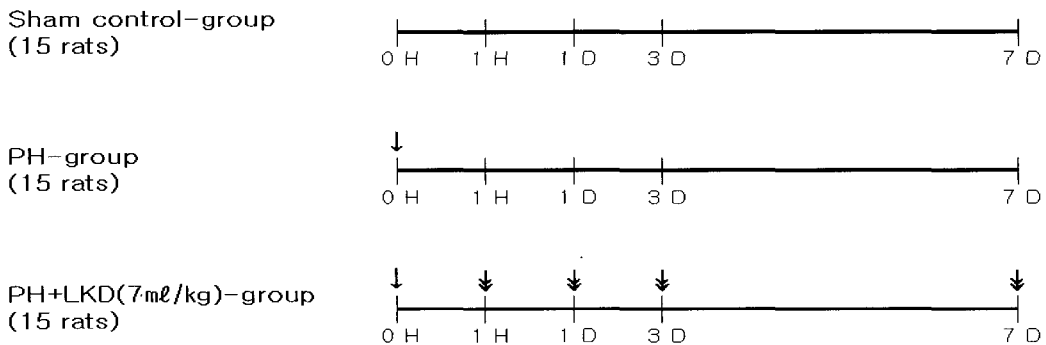


Fig 1. Experimental proceeds

Groups include Sham operation control-group (nontreated; 15 rats), PH-group (2/3 partial hepatectomy; 15 rat), PH+LKD (7 ml/kg)-group (7 ml/kg LKD P.O. after 2/3 partial hepatectomy; 15 rats), 3 rats of each are sacrificed after 0 hour (0H), 1 hour (1H), 1 day (1D), 3 days (3D), 7 days (7D). →; PH or PH+LKD →; sacrificed

간의 조직병리

체중과 간 무게를 기록한 후, 재생중인 흰 쥐 간 조직을 정상 간 조직과 비교하기 위한 방법으로 광학현미경 표본을 제작하였다. 즉 적출해 낸 간 조직을 10% 포르말린에서 고정시킨 뒤, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 50% 알콜부터 무수 알콜까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene

으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 박절기를 사용하여 4 μm 두께로 조직표본을 만들었다. 만든 조직표본은 Hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

간기능 검사

수술 후 간 재생이 일어나는 동안의 간 기

능 상태를 확인하기 위하여 효소활성도를 측정하였다. 복대동맥에서 혈액을 채취하였고 4°C에서 혈액을 응고시킨 후, 3,000 rpm에서 15-20분씩 3회 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, -70°C 냉동고에 보관하였다가 생화학 자동분석기(FUJIFILM; DRI-CHEM 3500i)를 이용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT)의 활성도를 측정하였다.

통계처리

체중과 간 무게의 결과, 그리고 혈청 내 효소분석 결과를 통계학적으로 Student's t-test를 사용하여 분석하였다. 측정결과는 Mean ± SD로 표시하였다.

결 과

체중과 간 무게(비중)의 측정 결과

PH를 시행한 두 그룹의 경우, PH전후의 체중(g)과 체중에 대한 간 무게(%)은 Sham operation control group과 비교하여 상당한 차이를 보였다(Fig 2, Fig 3). PH직후부터 1시간 후까지는 거의 변화를 보이지 않았으나, 시간이 지나면서 체중은 414.17±8.18 g에서 431±5.66 g까지 점차 증가하였고(Fig 2), 체중에 대한 간 무게도 역시 0.92±0.13 %에서 3.68±0.11 %까지 증가하여 일반적인 정상 체중에 대한 간 무게인 4%에 근접하게 나타났다(Fig 3). PH-group과 비교하여 볼 때, 실험 기간동안 PH+LKD-group의 체중은 PH-group보다 낮은 증가 양상을 띠었다(Fig 2). 특히, 1일후 PH-group이 414.67± 12.34 g에서 421±8.54 g로 증가한데 비해, PH+LKD-group의 체중은 413.67± 3.79 g에서 415.33± 3.01 g로 매우 작은 변화폭을 보였다(Fig 2). 체중에 대한 간 무게를 살펴보면, 실험기간동안 꾸준한 증가를 보였고, PH후 7일째 되었

을 때 3.57± 0.13 %로서 거의 수술 전과 근접한 약 98%까지 회복되었다. PH되었던 간 무게의 1일 후 회복에 대해서 PH- group과 비교하여 볼 때, PH-group의 체중에 대한 간 무게는 0.88±0.15 %에서 1.80±0.13 %로 회복된데 비해, PH+LKD-group의 체중에 대한 간 무게는 0.95±0.10 %에서 1.27± 0.15 %회복되었다는 점에서 상당한 지연이 있었음을 알 수 있다(Fig 3).

혈액 생화학적 측정 결과

AST와 ALT의 활성은 PH전후를 비교 할 때 Sham operation control group과 상당한 차이를 보였다(Fig 4, Fig 5). PH를 시행한 두 그룹에서의 효소들의 활성도는 유사한 패턴양상을 띠었다. 실험 1시간 후 Sham operation control group의 AST 139.7±19.4 U*/ℓ, ALT 35±7.21 U/ℓ 인데 비해서, PH를 시행한 두 그룹의 AST는 961.5±46.2 U/ℓ, ALT는 782.4± 37.1 U/ℓ 을 보였다(Fig 4, Fig 5). 또한 1일 후 PH-group의 AST와 ALT와 비교하여 볼 때, PH+LKD-group의 AST 1235.7± 35.1 U/ℓ, ALT 1013.7±34.6 U/ℓ 로서 훨씬 높은 수치에 달하였음을 알 수 있었다. 반면에, PH+LKD-group의 AST와 ALT 활성은 1일 이후 3일에는 AST가 153.3±119.9 U/ℓ, ALT가 209.7±40.4 U/ℓ 까지 급격히 감소하다가 7일후에는 AST가 234±95.4 U/ℓ (Fig. 4), ALT가 62.7±32.3 U/ℓ (Fig 5)로써, Sham operation control group과 비슷한 수준에 도달해 있었다. 전반적으로 PH+LKD-group의 AST와 ALT 활성이 PH-group보다 훨씬 증가되어 있는 양상을 띠고 있음을 알 수 있었다.

조직 병리학적인 소견

PH-group과 PH+LKD-group 을 비교한 결과, 조직 병리학적 소견에서 1 일, 3 일의 간

* Unit

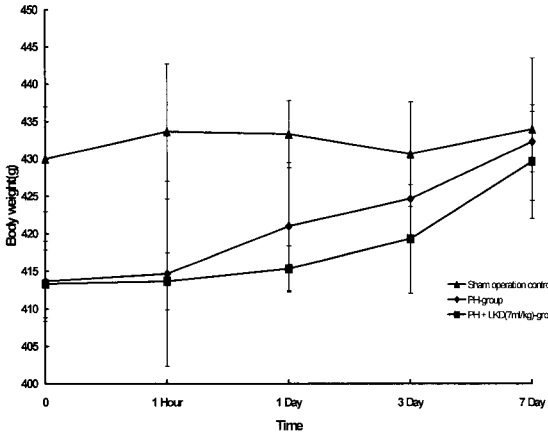


Fig 2. Changes of body weight. Values are expressed as Mean \pm SD, *—** Significantly different from PH—group(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

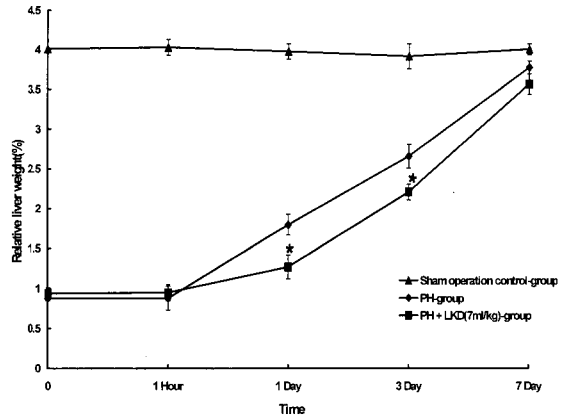


Fig 3. Changes of relative liver weight. Values are expressed as Mean \pm SD, *—** Significantly different from PH—group(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

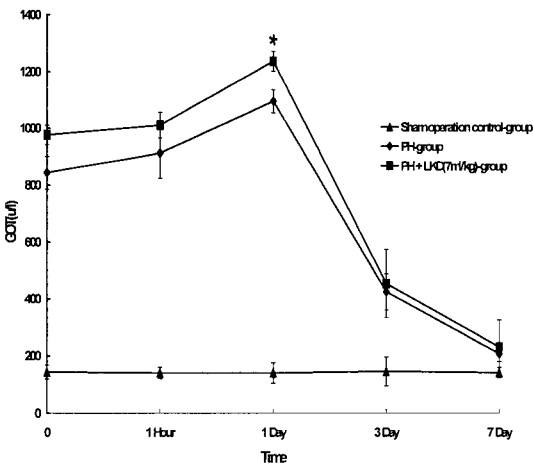


Fig 4. Changes of Blood biochemical AST. Values are expressed as Mean \pm SD, *—** Significantly different from PH—group(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

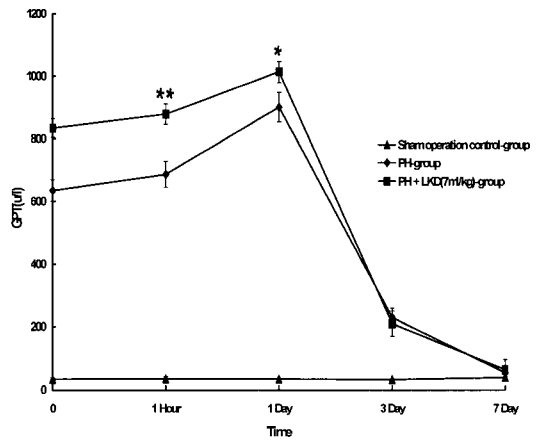


Fig 5. Changes of Blood biochemical ALT. Values are expressed as Mean \pm SD, *—** Significantly different from PH—group(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

중심정맥을 중심으로 간 재생 속도가 LKD 투여군에서 현저히 저하되는 변화가 나타났다(Fig 6). 또한 중심정맥 부근의 간세포 괴사 및 변성이 확연하게 차가 났음을 알 수 있고, macrophage를 비롯한 각종 세포 증식 관련 인자들이 집중되어 나타남을 알 수 있

었다.

고 찰

놀랄만한 재생능력을 지니고 있는 간은 독소, 바이러스, 또는 수술적 절제 등에 의해 손

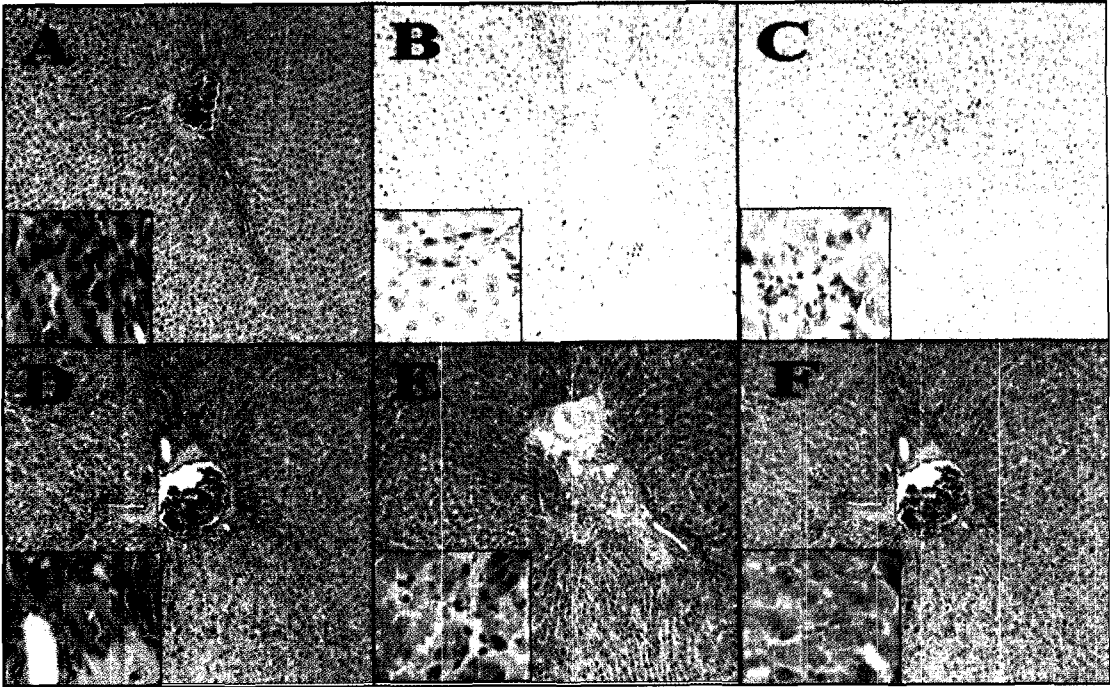


Fig 6. Sections of the livers of LKD-treated rats showing the central vein and hepatic cells (H&E stain, original magnification, 100 x).

A, PH-group after 1 hour; B, PH-group after 1 day; C, PH-group after 3 days; D, PH+LKD (7 ml/kg)-group after 1 hour; E, PH+LKD (7 ml/kg)-group after 1 day; F, PH+LKD (7 ml/kg)-group after 3 days.

상을 입을 수 있다. 간의 재생은 세포분열에 따른 간세포의 능력에 의존한다²⁾. 부분 절제술이나 CCl₄와 같은 toxin에 의한 손상을 받은 간에서의 재생반응은 일반적으로 간조직의 기능이 감소한 만큼에 대한 충분한 보상적 반응으로 나타난다고 알려져 있다. 이와 비슷한 재생반응은 다양한 화학물, 즉 lead nitrate, cytoproterone acetate 또는 ethanol에 의해서도 유도될 수 있다⁶⁾.

본 연구에서는 간세포 재생에 대한 모델로써 랫드를 대상으로 2/3 부분 간절제술(PH)을 사용하여 간세포 재생과 관련한 LKD의 급성 간독성 실험을 시행하였다.

간 재생의 개시인자로는 TNF- α , IL-6, EGF, TGF- α , norepinephrine 그리고 insulin 등 여러 가지가 있으나, 최근 연구 논문에서는 hepatocyte growth factor (HGF)가 가장

유리한 것으로 알려져 있다. HGF는 간충직세포에서 유래한 당단백질로서 헤파린과 결합하고 있으며 간조직의 손상과 같은 자극에 의해 활성화되어지는 것으로 알려져 있다. HGF는 간 절제 후 혈장내 17배 정도 증가하였으며, 이러한 양상은 CCl₄와 같은 화학물질에 의해 간조직이 손상되었을 경우에도 유사하게 나타난다는 보고가 있다. 이와 같이 HGF 등의 개시인자에 의해 시작되어진 재생은 여러 가지 과정을 수행하게 된다⁷⁻¹¹⁾.

정상적인 랫드의 간무게는 체중의 약 4%정도이다. PH후 간의 재생은 남아 있는 간의 90%까지 회복되었다는 보고가 있다⁶⁾. 이러한 과정은 수술 후 24시간 정도 지나면서 DNA 합성이 최고조가 되는 시점에 활발하게 진행되기 시작한다^{3,12,13)}. 실험 기간 동안 PH+LKD-group은 체중과 간 무게의 변화가 PH-

group보다 늦게 진행되었다. 또한, 손실된 간 무게에 대한 회복에 대해서는 PH+ LKD-group은 PH-group에 비해 1일쯤에 현저한 지연이 있음을 알 수 있다. 이것은 LKD의 ethanol 성분이 간 재생을 억제한 것으로 생각된다. 실험 결과를 살펴보면, PH+LKD-group의 간 무게는 초기에는 1%미만이었으나 시간이 지나면서 7일째에는 정상 간의 90%정도의 무게에 근접한 수준($3.57 \pm 0.13\%$)까지 도달해 있었다. 즉 LKD에 의한 급성투여는 간세포재생에 두드러진 변화를 일으키지만, 영구적으로 작용하지 않고 단지 일시적으로만 작용하는 것으로 사료된다. 단순 PH만을 시행한 랫드의 간에서는 DNA합성과 간세포재생이 촉진되지만, 이러한 동물에 ethanol을 투여하면 DNA합성이 최고치에 달하지 못하고 간조직의 회복도 지연된다.³ Ethanol에 의한 간재생에 대한 억제기전은 확실하게 밝혀지지는 않았지만, 탄수화물대사와 관련이 있다고 알려져 있다. 다시 말해서, 랫드에 ethanol을 급성으로 투여할 경우, 절식시킨 랫드에서는 저혈당증이 일어나고, 사료를 먹은 랫드에서는 고혈당증이 일어나며, 후에 이러한 효과는 lactate로부터 glucose의 합성을 차단시킨다고 알려져 있다¹⁴.

재생중인 간 기능의 정상여부를 판단하기 위한 한 가지 방법으로 AST와 ALT를 측정하였다. 실험적 결과를 보면, Sham operation control group과 비교해서 PH를 시행한 두 그룹에서는 AST와 ALT가 유의차 있는 결과로 나타났으며, PH+LKD-group이 보다 높게 측정되었다. AST와 ALT가 24시간까지 현저히 높은 활성도를 보이다가 24시간 이후에는 급격히 감소하여 7일에는 정상수치로 돌아오는 것이 관찰되었다. AST와 ALT의 활성은 간세포변성 또는 괴사에 대한 중요한 indicator로 알려져 있는데, 간기능 장애시 혈중으로 다량 누출되어 그 활성이 증가된다¹⁵⁻¹⁷. 단순 ethanol에 의한 독성실험에서는 간 기능에 크게 영향을 미치지 못하기 때문에 AST, ALT의 활성은 대개 정상이거나 약간 높은 정도이다. PH+LKD-group에서 AST와 ALT

의 활성이 현저히 높게 측정된 것은 PH에 따른 간조직손상이 LKD에 의해 가중된 결과라고 생각된다. 이것은 간의 조직 병리소견과도 일치한다. 특히 AST의 활성이 증가된 것은 실험기간동안 간세포의 변성과 괴사 존재를 반영한 것이라 볼 수 있으며, 또한 간 절제시 일부 남게 되는 간세포가 괴사되어 세포내에 존재하던 AST가 혈액내로 흡수되었기 때문이라 생각된다¹⁸.

결론적으로, LKD가 PH후 간세포재생의 초기 단계에 두드러진 억제를 초래하며, 일시적인 간독성을 일으킨다는 점에서 중요한 의미가 있다고 사료된다. 추가적으로 LKD가 간세포재생의 초기단계에 어떠한 기전으로 억제를 초래하는지 그리고 DNA합성과 관련된 간세포 재생인자와의 상관 관계는 지속적으로 연구해야할 과제로 남아 있다.

결론

간의 재생능력이 다른 동물들에 비해 월등한 랫드를 실험모델로 하여, 간의 70% 정도를 절제한 후 시중에서 시판중인 Lee Kwa Doo (LKD)를 투여하여 재생을 유도하는 과정에서 나타나는 세포증식의 특징을 관찰한 결과 체중은 PH후 7일째 되었을 때 $3.57 \pm 0.13\%$ 로서 거의 수술 전과 근접한 약 98%까지 회복되었고, Sham operation control group과 비슷한 수준에 도달해 있었다. 전반적으로 PH+LKD-group의 AST와 ALT 활성이 PH-group보다 훨씬 증가되어 있는 양상을 띠고 있음을 알 수 있었다. 또한 조직 병리학적 소견에서 1 일, 3 일의 간 중심정맥을 중심으로 간 재생 속도가 LKD 투여군에서 현저히 저하되는 변화가 나타났다. 또한 중심정맥 부근의 간세포 괴사 및 변성이 확연하게 차가 났음을 알 수 있고, macrophage를 비롯한 각종 세포 증식 관련 인자들이 집중되어 나타남을 알 수 있었다. 본 실험의 결과를 통하여 LKD가 PH후 간세포재생의 초기

단계에 두드러진 억제를 초래하며, 일시적인 간독성을 일으킨다는 점에서 중요한 의미가 있다고 사료된다. 추가적으로 LKD가 간세포 재생의 초기단계에 어떠한 기전으로 억제를 초래하는지 그리고 DNA합성과 관련된 간세포 재생인자와의 상관관계는 지속적으로 연구해야할 과제로 남아 있다.

감사의 글

이 연구는 2004년도 강원대학교 학술연구 조성비로 연구하였음.

참 고 문 헌

1. Channareddy S, Nguyen NT, Janes N. 2000. Saturable ethanol binding in rat liver mitochondria. *Bioch Biophys Acta* 1463(2) : 291-300.
2. Jose SG, Luis MG, Elizabeth TI, et al. 1999. Redox state and energy metabolism during liver regeneration. *Biochem Pharmacol* 58 : 1831- 1839.
3. Jose GS, Alberto AF, Rodolfo PD, et al. 1996. A possible model to study ethanol-induced inhibition of liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 28 : 1007-1016.
4. Anna DM. 1999. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin Biochem* 32 : 571-578.
5. Higgins DM, Anderson RM. 1931. Experimental pathology of the liver, restoration of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12 : 186-202.
6. Luc L, Bo L, Isabelle L, et al. 2000. The compensatory hyperplasia (liver regeneration) following ligation of a

- portal branch is initiated before the atrophy of the deprived lobed. *Hepatology J.* 32 : 940-945.
7. Block GD, Locker JL, Bowen WC, et al. 1996. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF α in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 132 : 1133-1149.
8. Appasamy R, Tanabe M, Murase N, et al. 1993. Hepatocyte growth factor, blood clearance, organ uptake, and biliary excretion in normal and partially hepatectomized rats. *J Invest* 68 : 270-276.
9. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373 : 699-702.
10. Gherardi E. 1990. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 346 : 228.
11. Takeshi A, Masahiko M, Takashi N, et al. 2001. Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats. *Hepatology Res* 21 : 228-241.
12. Christian P, Luc L, Peter S, et al. 2002. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *Hepatology J.* 32 : 645- 652.
13. Ralph AB, Malcolm AR, Matthew G, et al. 1998. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 29 : 271-280.
14. Krebs HA, Freedland RA, Hems R, et al. 1969. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem J* 112

- : 117-124.
15. Jin YS, Sa JH, Shim YH, et al. 2005. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Morus bombycis* Koidzumi on CCl₄-induced liver damage. *Biochem Biophys Res Commun* 329 : 991-995.
 16. Zhu W, Fung PCW, 2000. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. *Free Radical Biol Med* 29 : 870-880.
 17. Yoon SH, Jung SY, Ha H. 2001. Hypoglycemic and enzyme effects of the water extract of *Mori Madicis* Cortex in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Hyg Sci* 7 : 119-123.
 18. Limuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, et al. 1998. NFκB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 101 : 802-811.