

## 흰쥐 부분 간 절제 후 재생 중인 간 조직의 구조와 metallothionein 분포

문승훈, 정진주, 이용문<sup>1</sup>, 신길상, 김완중\*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>1</sup>충북대학교 약학대학 제약학과

## Structure and Metallothionein Expression during Rat Liver Regeneration Induced by Partial Hepatectomy

Seung Hoon Mun, Jin Joo Jeong, Yong Moon Lee<sup>1</sup>,  
Kil Sang Shin and Wan Jong Kim\*

Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University,  
Asan 336-745, Korea

<sup>1</sup>Department of Manufacturing Pharmacy, College of Pharmacy, Chungbuk National University,  
Cheongju 361-763, Korea

(Received July 18, 2008; Accepted September 18, 2008)

### ABSTRACT

Liver regeneration is a result of highly coordinated proliferation of hepatocytes and non-parenchymal liver cells. At this process, induction of metallothionein (MT), which is low molecular and cysteine rich, has been reported. The present study was carried to find the ultrastructure of hepatocytes and determine the expression of MT in regenerating rat liver after partial hepatectomy. As a result, the remnant liver after PH grew fast from 1 day until 7 days. Various changes were morphologically observed. Disintegration of cell plates and liver lobule appeared shortly after PH. And hepatocytes showed the rapid proliferation, characterized by high nuclear cytoplasmic ratio, weak intercellular junctional complexes, chromatin condensation, increase of ribosomes and mitochondria, and temporary increase of lipid droplets. Finally, remodeling of the liver lobule was completed through the rearrangement of blood vessels and cell plates by 7 days after PH. On histochemistry, immunoreactivity indicating the presence of MT appeared moderately throughout the cytoplasm of control rat hepatocyte. After PH, positive reactions for MT increased at the cytoplasm and the nucleus. These results suggest that the remnant liver cells immediately entered cell proliferation and increase of MT expression after PH. It is thought that MT protein might be associated with transfer of some factors needed to cell division from the cytoplasm to the nucleus for regeneration of the liver after PH.

**Keywords** : Rat, Liver regeneration, Metallothionein, Partial hepatectomy, Ultrastructure

### 서 론

간의 주요 기능을 수행하는 간세포는 정상 상태일 때는

분열하지 않으나, 화학적 혹은 물리적 자극에 의해 손상을 받게 되면 빠른 시간 내에 세포분열을 시작하여 원래 상태로 돌아가려는 재생 능력을 지닌다(Thorgeirsson, 1996). 간 세포가 손상을 받으면 흰쥐에서는 24시간 후에 DNA 합성

\* Correspondence should be addressed to Dr. Wan Jong Kim, Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea. Ph.: (041) 530-1251, Fax: (041) 530-1256, E-mail: wjkim56@sch.ac.kr

이 최대에 이르러 약 7일경에 간 재생이 완료되며, 생쥐에서는 그 시간이 더 소요되는 것으로 알려져 있다(Tarl et al., 2006). 이러한 간세포의 세포분열에는 많은 단백질 분해효소(protease)들이 관여하게 되고 세포간 상호작용과 신호과정을 통하여 빠른 시간 내에 최대의 분열을 한다. 간세포의 세포분열에 관여하는 인자들로서는 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF), 형질전환성장인자- $\alpha$ (transforming growth factor, TGF- $\alpha$ ) 등이 있다(Mohammed & Khokha, 2005).

모든 세포의 분열에 관여하는 전사인자들 중의 하나로 알려진 metallothionein(MT)은 말의 신장 피질부에서 금속과 결합하고 있는 단백질을 발견함으로써 알려지게 되었다(Margoshe & Valle, 1957). MT는 약 60개의 아미노산들로 이루어진 저분자량(6~7 kDa)의 단백질로 주로 간, 비장, 폐, 신장 등에 분포하며 세포질 내 아연(zinc)이나 구리, 카드뮴 같은 중금속 이온과 황화결합(sulphide-sulphide bond)을 형성하고 있다(Banerjee et al., 1982; Powell, 2000). 이 단백질이 가지고 있는 전체 아미노산 중에서 약 30%가 시스테인(cysteine)이며, 방향족 아미노산과 히스티딘(histidine)은 거의 존재하지 않는다(Clough et al., 1986; Duna et al., 1987). 이러한 MT는 금속독성, 자유기(free radical), 방사선에 의한 DNA 손상, 산화적 스트레스 등에 대한 방어작용의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포 간기(interphase)의 G1 및 S기에 구리나 아연 이온을 세포질에서 핵 내로 이동시킴으로써 DNA 합성 및 세포분열에 관여하는 것으로 알려져 있다(Klaassen et al., 1999; Oliver et al., 2005).

본 연구에서는 간 재생 능력이 다른 동물들에 비해 뛰어난 것으로 잘 알려진 흰쥐를 실험모델로 하여 여러 간염들 중, 약 70%에 해당하는 중엽과 좌엽을 절제한 후 재생을 유도하는 과정에서 나타나는 세포학적 특징을 알아보고자 하였다. 즉, 간 절제 후 재생 중인 간을 특정 시간별로 적출하고 광학현미경을 이용하여 증식중인 간세포 및 조직 구성에 대한 형태학적 특징을 관찰하며 세포분열에 관여하는 단백질로 알려진 MT에 대한 면역조직화학적 관찰을 통하여 단백질이 간 재생에 어떠한 효과를 나타내는지에 대해 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

실험동물로서는 일정하게 조정된 실내 환경에서 3일간 기초사육한 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley 계통의 웅성 흰쥐를 사용하였다. 실험대조군과 정상대조군은 각각 3마리

씩, 실험군은 5마리를 실험에 사용하였다.

### 2. 부분 간 절제술

흰쥐의 부분 간 절제는 에테르로 약하게 마취를 시킨 후, 절개할 부위의 털을 제거하고 70% 알코올로 소독하여 개복하였다. 절제할 중엽과 좌엽의 인대를 조심스럽게 제거한 후, 수술용 봉합사로 결찰하고 간을 절단하였다. 이어서 근육과 피부를 봉합하고 소독하였다. 실험군으로서 부분 간 절제후 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 10일째 희생시켜 간조직을 적출하여 무게를 측정하고, 단백질 분석 및 현미경 표본제작에 사용하였다. 대조군은 아무런 수술도 하지 않은 흰쥐(정상대조군)와 개복수술만을 시행한 흰쥐(실험대조군)로 설정하여 비교하였다.

### 3. Hematoxylin-esosin (H-E) 표본제작

적출한 간 조직을 10% neutral buffered formalin에서 고정시킨 뒤, 흐르는 물에 수세하고, 60% 에탄올에서부터 무수에탄올까지 농도 상승 순으로 각각 1시간씩 탈수하였다. 그 후, 같은 비율의 에탄올과 자일렌(xylene) 용액에서 1시간, 자일렌으로 1시간씩 2회 치환하였고 파라핀(paraffin) 침투 과정을 거쳐, 동일 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 회전형 박절기(microtome, Leica Co.)를 사용하여 4~5  $\mu$ m 두께로 자르고, 합수과정을 거친 절편을 헤마톡실린과 에오신으로 이중염색하고 canada balsam을 이용하여 봉입한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

### 4. 면역조직화학 표본제작

세포분열에 관여하는 것으로 알려진 MT 단백질의 발현 양상을 조사하기 위하여 면역조직화학 표본을 제작하였다. 파라핀에 포매된 간 조직을 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m의 두께로 자른 후, 자일렌에 각 5분씩 2회 처리하여 파라핀을 제거하고, 무수에탄올에서부터 60% 에탄올까지 각 2분씩 합수 처리했다. 합수된 조직을 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 처리하고 Immunotech kit (Immunotech Co.)를 이용하여 blocking 용액 및 MT에 대한 100배 희석된 1차 항체(monoclonal mouse anti-horse MT, DAKO Co.)를 10분씩 처리하였다. 습기상자 안에서 2차 항체(biotinylated secondary antibody)와 streptavidin peroxidase를 10분씩 처리한 후, DAB로 발색시키고, 헤마톡실린으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5. 전자현미경 표본제작

재생 중인 흰쥐 간세포의 미세구조 변화를 관찰하고자 전자현미경 표본을 제작하였다. 0.5% glutaraldehyde, 2%

paraformaldehyde 및 0.1 M sucrose 혼합용액에 3시간 동안 고정된 조직을 vibratome을 사용하여 500  $\mu\text{m}$  두께로 자른 뒤, 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.2)으로 조정된 4% glutaraldehyde 고정액에 전고정하였다. 전고정한 조직을 0.1 M 인산완충용액을 이용하여 20분씩 3회에 걸쳐 수세 후, 1%  $\text{OsO}_4$  고정액으로 1시간 동안 후고정하고 마찰가지로 0.1 M 인산완충용액으로 수세하였다. 60% 에탄올부터 무수에탄올까지 농도 상승 순으로 각 20분씩 탈수한 후, propylene oxide를 이용하여 10분씩 2회 치환하였다. NMA (nadiac methyl anhydride), DDSA (dodecanyl succinic anhydride), Poly/Bed 812 Resin (Epon)과 DMP-30 (dimethyl amino-methyl)로 구성된 Epon 혼합액을 이용하여 포매하고 60°C dry oven에서 72시간 중합하였다. 포매된 간 조직은 초박절편기(Reichert supernova ultramicrotome, Leica Co.)를 이용하여 80 nm 두께로 초박절편하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색한 후, 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL Co.)으로 80 kV하에서 검경하고, 사진촬영을 실시하였다.

## 결 과

본 실험에서 육안적 관찰과 특정시간대별로 적출한 간 무게를 측정된 결과 부분 간 절제 후 12시간까지는 변화가 뚜렷하지 않았으나, 1일 경과한 실험군에서부터 뚜렷한 변화를 보이는 것으로 나타났다. 즉 부분 간 절제 후 1시간부터 12시간까지의 간 무게 증가폭은 0.1%인데 비해 1일과 3일 경과한 실험군에서는 1% 정도의 차이가 나는 것으로 조사되었다(Data not shown). 재생 중인 간을 광학현미경하에서 관찰한 결과로는, 간 절제 후 1시간이 경과한 실험군에서부터 세포 내에 지방방울(lipid droplet)으로 보이는 소포들이 관찰되기 시작하였는데 이 소포들은 시간이 경과할수록 점차 증가하는 양상을 나타내어 12시간이 경과한 실험군에서 최대에 이르는 것으로 관찰되었다. 이 지방방울들은 간 절제 후 3일이 경과한 실험군에서부터 감소하기 시작하여 7일째에는 눈에 띄게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이후 시간이 경과하면서 지방방울들의 수나 분포가 크게 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 간 절제 후 12시간 실험군에서부터 간 세포판이 붕괴되어 3, 4개의 세포들이 군집을 이루는 모습을 볼 수 있었다. 3일이 경과한 실험군에서부터는 간세포들이 간 세포판을 재형성하는 것이 관찰되었으며 7일이 경과한 실험군은 정상대조군과 흡사한 형태가 관찰되었다(Fig. 1).

재생 중인 간 조직의 전자현미경을 이용하여 미세구조적 특징을 관찰한 결과, 분열 중인 간세포들의 핵/세포질 비(nuclear cytoplasmic ratio)가 높게 나타났다. 다면체의 세포들이 세포판을 형성하고 동양혈관(sinusoid)들이 세포판 사

이에 존재하며 세포판을 구성하는 간 실질세포(hepatic parenchymal cell) 사이에는 미세용모가 형성되어 있고, 세포연접 복합체들이 발달하고 있는 담세관(bile canaliculus)이 관찰되었다. 간 절제 후 3시간이 경과한 실험군에서는 당원과립이 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 세포 내의 핵소체(nucleolus)의 관찰이 어려웠으며 이질염색질(heterochromatin)이 많이 관찰되었다. 12시간 실험군에서는 지방방울들이 크게 증가한 모습을 볼 수 있었으며, 세포판이 붕괴되고 미토콘드리아의 수가 증가하는 모습이 관찰되었다. 1일이 경과한 실험군에서도 세포판이 붕괴되어 있었고, 세포간 연결인 부착반(desmosome)을 구성하는 장원세사(tonofilament)들의 분포가 변화하는 특징도 관찰되었으며, 세포간 공간이 확장되는 모습도 나타났다. 간 절제 후 7일이 경과한 실험군에서는 증가되었던 지질과 당원과립이 감소되는 모습과 전염색질이 풍부한 것으로 관찰되었으며 정상대조군과 흡사한 세포간 연결장치의 분포 및 미세구조적 특징들을 볼 수 있었다(Fig. 2).

PH 후, MT의 분포를 확인하기 위하여 면역조직화학적 방법을 이용하였다. 먼저 면역조직화학 실험 결과에 의하면 실험적 대조군으로 1차 항체를 처리하지 않은 군에서는 MT에 대한 양성반응이 일어나지 않았으며, 1차 항체를 처리한 모든 실험군에서는 MT반응이 일어났다. 정상대조군에서의 MT를 확인한 결과 아주 미약하게 부분적으로 세포질에서 반응이 확인되었다. 본 실험의 주된 목적인 간 절제 후 MT발현의 위치를 확인해 본 결과 간 절제 후 3시간이 경과한 실험군에서는 주로 세포질에서 반응이 일어나는 것을 볼 수 있었으며 6시간 실험군에서부터 점차 핵에서의 반응이 나타나기 시작하여 12시간 및 1일 경과한 실험군에서 핵 내에서의 최대 발현이 관찰되었다. 이러한 반응은 1일째에도 계속되고 3일 실험군에서는 부분적으로 미약하게 세포질에서 반응이 나타나다가 7일이 경과한 실험군에서는 정상대조군과 같은 양상의 반응이 관찰되었다(Fig. 3).

## 고 찰

간 재생에 관한 일반적인 연구는 부분 간 절제술(PH) 같은 물리적 자극이나, 사염화탄소( $\text{CCl}_4$ )와 같은 화학물질을 투여하여 간의 기능을 손상시키거나 제거함으로써 재생을 유도하는 과정에서 이루어지고 있다. 화학물질을 투여하는 방법은 전체 간 조직에 독성효과를 주는 단점이 있는 반면, PH 방법은 간의 4엽 중에서 좌엽과 중엽을 절제하여 남은 간에 아무런 영향을 미치지 않고 간 증식을 유도하는 방법으로 정상 상태의 간 조직의 증식을 연구한다는 점에서 장점을 지니고 있다(Yoo et al., 2001).

본 실험은 간 재생능력이 뛰어난 흰쥐 간의 중엽과 좌엽

을 외과적으로 제거하여 재생과정 중에 나타나는 간 조직 및 세포를 형태학적으로 관찰하고, 세포분열에 관여하는 것으로 알려진 metallothionein (MT) 단백질에 대한 분석을 통하여 간 재생에 대한 세포학적 특징을 알아보고자 하였다.

본 실험에서 육안적 관찰과 특정시간별로 적출한 간 무게를 측정된 결과 부분 간 절제 후 1일 경과한 실험군에서부터 간의 무게 증가폭이 점차 증가하였는데, 이 결과는 DNA의 합성이 최대에 이르는 1일째부터 간세포의 분열이 활발히 진행되어 간 재생력이 크게 증가한 것과 연관이 있는 것으로 생각되고, 다른 연구자들의 보고와도 유사한 결과로 나타났다(Xu et al., 2005). 재생 중인 간에서 세포 내에 지방방울(lipid droplet)들로 보이는 소포들이 관찰되기 시작하여 시간이 경과할수록 점차 증가하는 양상을 나타내어 12시간이 경과한 실험군에서 최대에 이르는 것으로 관찰되었다. 이 구조는 유사분열 정도를 결정하는 것으로 일반적으로 세포분열이 활발한 종양세포 등에서는 감소되는 것으로 알려져 있으며(Cheeseman et al., 1988; Masotti et al., 1988), 부분 간 절제에 의한 세포증식에서는 그와 반대로 증가되는 양상을 나타낸다(Carnovale et al., 2000). 이후 시간이 경과하면서 지방방울들의 수나 분포가 크게 감소되는 것으로 확인되었으며, 이에 대한 깊이 있는 연구가 필요한 것으로 생각된다. 또한, 부분 간 절제 후 세포판(cell plate)이 붕괴된 후, 3일이 경과한 실험군에서부터는 간세포들이 간 세포판을 재형성하는 것이 관찰되었으며 7일이 경과한 실험군은 정상대조군과 흡사한 형태가 관찰되었는데, 이러한 결과는 간 재생시 간소엽의 구조가 먼저 해체된 후 세포 증식이 이루어지고, 이어서 전형적인 간소엽의 구조로 재배열되는 특징으로 판단된다.

재생 중인 간에서 세포의 미세구조적 특징을 관찰한 결과, 분열 중인 간세포들에서는 간기 중의 세포들에 비해 핵/세포질 비가 비교적 높은 것으로 관찰되었다. 간 절제 후 3시간이 경과한 실험군에서는 당원과립이 감소하고, 핵소체(nucleolus)도 잘 관찰되지 않았고 이질염색질(heterochromatin)이 많이 관찰된 것으로 보아 세포분열 전기단계에 있는 세포들이 많은 것으로 생각된다. 12시간 실험군에서는 지방방울들이 크게 증가한 모습을 볼 수 있었으며, 세포판이 붕괴되고 미토콘드리아의 수가 증가하는 모습이 관찰되었는데 이것은 재생 중인 간세포에서 필요한 에너지 대사와 연관된 것으로 판단된다. 1일이 경과한 실험군에서도 마찬가지로 세포판이 붕괴되어 있는 모습이 관찰되었으며 염색질이 염색체로 전환되는 과정에 있는 세포들이 많이 관찰된 것으로 보아 세포분열을 위한 상태라고 생각된다. 또한, 세포간 연결인 부착반(desmosome)이 약화되어 있는 모습도 관찰되었으며 세포간 공간이 확장되는 모습도 관찰되었다. 이것은 세포분열을 위한 공간 마련과 새로운 혈관생성 등을 위한 과정이라 생각된다. 간 절제 후 7일이 경과한

실험군에서는 증가되었던 지질과 당원과립이 감소되는 모습과 진염색질이 풍부한 것으로 관찰되었으며 정상대조군과 흡사한 세포간 연결장치의 분포 및 미세구조적 특징들을 볼 수 있었다.

PH 후, MT의 분포를 확인하기 위하여 면역조직화학적 방법을 이용하였다. 먼저 면역조직화학 실험 결과에 의하면 실험적 대조군으로 1차 항체를 처리하지 않은 군에서는 MT에 대한 양성반응이 일어나지 않았으며, 1차 항체를 처리한 모든 실험군에서는 MT반응이 일어났다. 정상대조군에서의 MT를 확인한 결과 아주 미약하게 부분적으로 세포질에서 반응이 확인되었으나 이것은 MT의 기능적 측면에서 보았을 때 독성물질 분해 등의 역할을 하기 위한 소량의 MT로 생각된다. 본 실험의 주된 목적인 간 절제 후 MT 발현의 위치를 확인해 본 결과 간 절제 후 3시간이 경과한 실험군에서는 주로 세포질에서 반응이 일어나는 것을 볼 수 있었으며 6시간 실험군에서부터 점차 핵에서의 반응이 나타나기 시작하여 12시간 및 1일 경과한 실험군에서 핵 내에서의 최대 발현이 관찰되었다. 이것은 부분 간 절제로 인한 MT 단백질이 합성되어 세포질에서 핵으로 이동하는 것을 확인할 수 있는 결과라 할 수 있으며, MT 단백질에 금 입자를 표지하여 전자현미경으로 관찰한 이전 연구와 유사한 결과이다(Kim & Shin, 2001; Ahn et al., 2005; Michalopoulos, 2007). 배양 중인 세포의 경우 G0와 G1기에서는 세포질에 분포하다가 S기 초기에 핵내에 위치하고 12시간째 가장 강하게 분포한다는 보고가 있다(Tsujikawa et al., 1991).

위의 결과들을 종합해 볼 때, 흰쥐를 실험모델로 하여 70% 정도의 부분 간 절제술을 실시하였을 경우, 구조 및 기능 손상에 대한 보상작용으로 간세포들이 새롭게 분열능력을 얻게 되는 것으로 생각되며, 간 재생과정은 간소엽의 체제가 붕괴되고 세포 증식과 더불어 조직의 재구성과정을 거치는 것으로 요약될 수 있다. 이 과정에서 MT 단백질의 발현이 증가하는데, 그에 대한 세포생물학적 기전은 앞으로 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Ahn YM, Oh SH, Kim HJ, Lee MY, Lee JH, Shin KS, Kim WJ: Immunogold labellings and expression of metallothionein in regenerating rat liver. *Korean J Electron Microscopy* 35 : 15-22, 2005.
- Banerjee D, Onosaka S, Cherian MG: Immuno-histochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology* 24 : 95-105, 1982.
- Carnovale CE, Scapini C, Alvarez ML, Favre C, Monti J, Carrillo MC: Nitric oxide release and enhancement of lipid in regenerating rat liver peroxidation. *J Hepatol* 32 : 798-804, 2000.
- Cheeseman KH, Emery S, Maddix SP, Slater TF, Burton GW, In-

- gold KU: Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissue. *Biochem J* 250 : 247-252, 1988.
- Clough SR, Mitra RS, Kulkarni AP: Qualitative and quantitative aspects of human fetal liver metallothioneins. *Biol Neonate* 49 : 241-254, 1986
- Duna MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med* 185 : 107-119, 1987.
- Kim WJ, Shin KS: Metallothionein induction in liver regeneration stimulated by partial hepatectomy. *Korean J Biol Sci* 5 : 263-266, 2001.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S: Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39 : 267-294, 1999.
- Margoshe M, Valle BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79 : 4813-4814, 1957.
- Masotti L, Casali E, Galeotti T: Lipid peroxidation in tumor cells. *Free Radic Biol Med* 4 : 377-386, 1988.
- Michalopoulos GK: Liver regeneration (Mini review). *J Cell Physiol* 213 : 286-300, 2007.
- Mohammed FF, Khokha R: Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 15 : 555-563, 2005.
- Oliver JR, Mara TW, Cherian MG: Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy. *Exp Biol Med* 230 : 61-67, 2005.
- Powell SR: The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 130 : 1447-1454, 2000.
- Tari MR, Ramalho F, Ramalho LNZ, Silva TC, Brandao DF, Ferreira J, Silva OC, Zucoloto S: Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras* 21 : 63-66, 2006.
- Thorgeirsson SS: Hepatic stem cell in liver regeneration. *FASEB J* 10 : 1249-1256, 1996.
- Tsujikawa K, Imai T, Kakutani M, Kayamori Y, Mimura T, Otaki N, Kimura M, Fukuyama R, Shimizu N: Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett* 283 : 239-242, 1991.
- Xu CS, Chang CF, Yuan JY, Li WQ, Han HP, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB: Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 11 : 2932-2940, 2005.
- Yoo SJ, Jung SM, Kim JG, Lee JO, Song YW, Han CJ, Jung SH,

Kim YC, Kim CM, Lee JO, Hong YJ, Hong SI: Implications of serum levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 7 : 47-54, 2001.

#### < 국문 초록 >

흰쥐 간의 약 70% 정도를 외과적으로 제거한 후, 시간 경과에 따라 간세포들의 증식과 간조직의 재구성 과정에서 나타나는 변화를 관찰하였고, 세포분열과 연관되어 있는 것으로 알려져 있는 metallothionein (MT)의 발현양상 및 세포내 분포 위치를 알아보고자 하였다.

간 절제 후 광학현미경 관찰 결과, 초기부터 소엽의 중심 정맥 주변 세포판이 붕괴되고 균집이 형성되는 모습이 관찰되었으며 간 절제 후 1일째 이미 세포들의 증식이 뚜렷이 증가하여 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 이후 활발한 세포분열이 계속되어 재생이 이루어지게 되며 남아 있던 간조직은 약 7일이 경과하면 원 상태의 수준으로 회복되고, 재구성이 완료되는 것으로 조사되었다. 투과전자현미경을 이용하여 증식중인 간세포들의 미세구조 변화를 관찰하였던 결과, 간 절제 후 3시간 경과한 흰쥐 간세포들에서 핵/세포질 비가 비교적 높게 나타났고, 미토콘드리아의 수가 증가하였으며, 유리리보솜이나 폴리솜들의 분포도 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 간 절제 후 24시간 전후 실험군에서는 세포질내 지방방울이 극단적으로 증가된 것이 확인되었으며 간세포들 사이의 세포연접이 사라지거나 약화된 모습을 나타내었다. 7일째 실험군에서는 세포간 연결장치나 세포내 핵과 소기관들의 분포, 담세관의 미세구조 등이 정상대조군과 유사하게 나타났다. MT의 발현 및 위치를 알아보기 위한 면역조직화학결과 정상대조군 간세포에서는 MT에 대한 양성반응이 세포질과 핵에서 약하게 관찰되었으나, 간 절제 후 3시간이 경과한 실험군에서부터 MT에 대한 양성반응이 증가하기 시작하였으며, 일부 세포들에서는 핵에서도 더욱 뚜렷하였다. 시간 경과에 따라 핵에서의 양성반응은 지속되다가 3일이 경과한 실험군에서부터 핵과 세포질에서의 반응이 약하게 나타나며, 7일이 경과한 실험군에서는 정상대조군과 같은 미약한 반응을 나타냈다.

결론적으로, 부분 간 절제 후 재생과정은 간소엽의 체제가 붕괴되고 세포 증식이 이루어지며, 조직의 재구성과정을 거치는 것으로 요약될 수 있다. 또한 MT 단백질은 간세포들의 세포분열에 연관이 있는 것으로 판단된다.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Light micrographs of rat liver tissues of intact and regenerating process after PH. The normal (1a) and sham control (1b) rat liver lobule showing a large central vein and radial sinusoids between cell plates. The liver plates are partially disintegrated at 1 hr (1c) and mitotic feature of hepatocytes is obviously observed at 12 hrs (1d) after PH. Reconstruction of the lobule appears at 1 day (1e) and typical lobules are present at 7 days (1f) after PH. Hematoxylin-eosin stain.  $\times 400$

**Fig. 2.** Electron micrographs of hepatic parenchymal cells in regenerating rat liver. Typical hepatocytes showing oval nucleus (Nu), numerous mitochondria (Mi) and developed rough endoplasmic reticulum (RER) are observed in normal control group (2a). At 12 hrs (2b) after PH, many lipid droplets (Li) are distributed throughout the cytoplasm. The lipid droplets are still present at 1 day (2c) and the hepatocyte shows normal shape at 7 days (2d) after PH. BC: bile canaliculus, No: nucleolus. Scale bar on each figure represents  $2\ \mu\text{m}$ .

**Fig. 3.** Immunohistochemical reaction of metallothionein in regenerating rat liver tissues. Immunoreactivity indicating the presence of MT appears moderately throughout the cytoplasm of normal control (3a). At 3 hrs (3b) after PH, positive reactions for MT are prominent and increase at 6 hrs (3c) and 12 hrs (3d). The peak of immunoreactivity reaches by 1 day (3e) and then become similar with control at 7 days (3f).  $\times 400$







