

재생 중인 흰쥐 간의 형태학적 변화 및 PCNA 발현에 미치는 rrhGM-CSF의 영향

정진주, 허시현, 김지현, 윤광호, 이영준¹, 한규범¹, 김완중*
순천향대학교 생명과학과, ¹차바이오펜디오스텍(주)

Effects of rrhGM-CSF on Morphology and Expression of PCNA in Regenerating Rat Liver

Jin Ju Jeong, Si Hyun Heo, Ji Hyun Kim, Kwang Ho Yoon, Young Jun Lee¹,
Kyu Boem Han¹ and Wan Jong Kim*

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

¹CHA Bio & Diotech Co., Ltd., Seoul 135-080, Korea

(Received April 20, 2010; Revised June 15, 2010; Accepted June 16, 2010)

ABSTRACT

Liver regeneration is a result of highly coordinated proliferation of hepatocytes and nonparenchymal liver cells. Partial hepatectomy (PH) is the most often used stimulus to study liver regeneration because, compared with other methods that use hepatic toxins, it is not associated with the tissue injury and inflammation, and the initiation of the regenerative stimulus is precisely defined. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), which is a cytokine able to regulate the proliferation and differentiation of epithelial cells, was first identified as the most potent mitogen for bone marrow. Particularly, rrhGM-CSF, which is highly glycosylated and sustained longer than any other types of GM-CSF in the blood circulation, was specifically produced from rice cell culture. In this experiment, effects of rrhGM-CSF administration were evaluated in the regenerating liver after 78% PH of rats. Morphological changes induced by PH were characterized by destroyed hepatocyte plate around the central vein and enlarged nuclear cytoplasmic ratio and increased hepatocytes with two nuclei. And then, proliferation of liver cells (parenchymal and nonparenchymal) and rearrangement of plates and lobules seemed to be carried out during liver regeneration. These alterations in the experimental group preceded those of the control. Since proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is known to be a nuclear protein maximally elevated in the S phase of proliferating cells, the protein was used as a marker of liver regeneration after PH in rats. PCNA levels by western blot analysis and immunohistology were compared between the two groups. PCNA protein expression of two groups at 12 hr and 24 hr after injury showed similar pattern. The protein expression showed the peak at 3 days in both groups, however, the protein level of the experimental group was higher than that of the control. On immunohistochemical observations, the reaction product of PCNA was localized at the nuclei of proliferating cells and the positive reaction in experimental group at 3 days was clearly stronger than that in control group. The results by Western blotting and immunohistology for PCNA showed similar pattern in terms of the protein levels. In conclusion, rrhGM-CSF administration during liver regeneration after 78% PH accelerated breakdown and restoration of the hepatic plate and expression of PCNA. These results suggest that rrhGM-CSF might play an important role during liver regeneration in rats.

Keywords : Liver regeneration, Partial hepatectomy, PCNA, rrhGM-CSF

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

서 론

체내 대부분의 물질대사를 수행하며 체중의 4~5% 정도를 차지하는 간은 비교적 세포교체가 느리게 이루어지는 기관이다. 이 기관은 독성물질 혹은 외과적 수술과 같은 외부 자극에 의해 손상을 입거나 부분적으로 제거될 경우 빠르게 세포분열 과정이 진행되며, 일정시간이 경과하면 간세포의 수와 간 조직의 크기가 원래대로 회복되는 것으로 잘 알려져 있다(Bucher, 1963; Fausto et al., 1995; Michalopoulos, 2007). 과학적인 간 재생에 대한 실험모델로서는 Higgins와 Anderson이 최초로 흰쥐 간의 일부를 절제한 후 재생과정을 확인한 이후, 세포증식 혹은 재생과정과 관련하여 많은 실험들이 수행되어져 왔다(Higgins & Anderson, 1931). 특히 부분 간절제술은 제거되지 않고 남아있는 다른 간엽들에는 별다른 손상을 주지 않고 재생과정이 시작되는 시점들을 정확하게 알 수 있기 때문에 이 분야의 실험에 많이 사용되고 있는 방법이며, 간의 재생정도는 수술에 의해 제거된 양에 비례하는 것으로 알려져 있다(Theocharis et al., 2003). 간 절제에 의한 재생과정이 일어나는 시점은 수술 10~12시간이 지난 이후로서 24~48시간 후에는 DNA 합성이 최고조에 달하며 간실질세포가 먼저 증식하고, 이어서 담세관 상피세포, 내피세포, Kupffer 세포 그리고 Ito 세포 등 비실질세포들이 증식하여, 제거된 부분의 양만큼 재생이 되면 분열을 멈추는 것으로 알려져 있다(Mourella & Rubalcava, 1981; Thorgeirsson, 1996).

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)는 과립백혈구들의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, 127개의 아미노산과 당쇄로 구성된 당단백질로서 당쇄화 정도에 따라 분자량은 약 23 kDa 내외이다(Clark, 1988). 이 단백질은 골수전구세포에서 호중구, 호산구 및 대식세포를 분화·증식시키며 조혈줄기세포의 활성화 및 면역조절에 중요한 역할을 한다(Barreda et al., 2004). 주로 골수 이식 후의 백혈구 감소를 예방하기 위해 사용되었으며, 최근에는 상피세포의 증식을 자극하는 것으로도 보고되어져 있다(Choi et al., 2006). 한편 rrhGM-CSF (rice cell origin recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor)는 배양중인 벼세포에서 만들어진 재조합 단백질로서, 일반적으로 GM-CSF는 대장균이나 효모, 동·식물세포에서 재조합되어 만들어지는 반면에 rrhGM-CSF는 현탁 배양 중인 벼세포로부터 유래되어 만들어졌기 때문에 안전성과 유효성에서 뛰어나다. 식물세포를 숙주로 하여 단백질을 생산하는 과정은 상대적으로 생산비용이 저렴하고, 바이러스와 같은 감염원으로부터 안전하며, 현탁배양이 가능한 장점들이 있다. 또한 대장균 유래 GM-CSF에 비해 당사슬이 매우 풍부한 것으로 분석되었으며, 당단백질에서 당화

(glycosylation)의 정도는 물질의 안정성 혹은 효과의 지속성과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2008).

증식 중인 세포의 핵 내에서 뚜렷하게 증가하는 것으로 알려져 있는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)는 DNA polymerase δ 의 보조인자이며 분자량 36 kDa의 핵단백질로서 세포의 증식 시 DNA 합성에 필수적인 역할을 하고 있다(Miyachi et al., 1978; Ogata et al., 1987; Assy et al., 1998; Tanno & Taguchi, 1999). 또한 PCNA 면역조직화학법은 배양된 세포주나 신선조직, 파라핀 포매된 조직 등에서 시행하여 세포증식의 지침으로 유용하다는 것이 밝혀진 바 있다(Garcia et al., 1989).

현재까지 간 절제에 의한 재생기작이나 이에 관여하는 인자 등에 관해서 많은 연구들이 이루어져 왔으나, 부분 간 절제 전후에 식물세포에서 유래한 GM-CSF를 처리하여 재생 중인 간 조직의 형태형성 및 세포증식의 정도를 조사한 연구는 전혀 이루어져 있지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 상기 보고들을 토대로 간의 재생능력이 우수한 흰쥐를 실험모델로 하여 간의 78% 정도를 제거한 후 재생을 유도하는 과정에서 재조합기술을 응용하여 벼세포에서 생성된 rrhGM-CSF가 간 재생에 미치는 영향을 형태학적인 측면과 PCNA 발현양상을 통해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로서 7주령, 200 g 내외의 Sprague-Dawley 계통의 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 일정하게 조정된 실내 환경에서 물과 고형사료를 정상적으로 공급하면서, 5일간의 적응기간을 거친 후 대조군과 실험군으로 나누어 조사하였다. 실험군은 간절제술을 하기 3일 전부터 500 μ g/kg/day의 rrhGM-CSF (CHA Bio & Diostech Co., Ltd)를 생리식염수에 용해시켜 희생하기 전까지 피하주사(subcutaneous injection)하였고, 대조군은 동일량의 생리식염수만 투여하여 각각 비교하였다.

2. 78% 부분 간절제술

흰쥐의 부분 간 절제는 에테르로 약하게 마취를 시킨 후, 절개할 부위의 털을 제거하고 70% 알코올로 소독하여 개복하였다. 절제할 중엽 및 좌엽과 우하엽의 인대를 조심스럽게 제거한 후, 수술용 봉합사로 결찰하고 간을 절단하였다. 이어서 근육과 피부를 봉합하고 소독하였다. 수술 직후에 10% 포도당 용액을 1 mL씩 복강주사(intraperitoneal injection)하였으며, 20% 포도당 용액을 표준 사료와 함께 자유섭식하도록 하였다. 수술 후 12시간, 24시간, 3일, 4일, 5일, 7일에 대조군 및 실험군 흰쥐를 희생시켜 간조직을 적출하

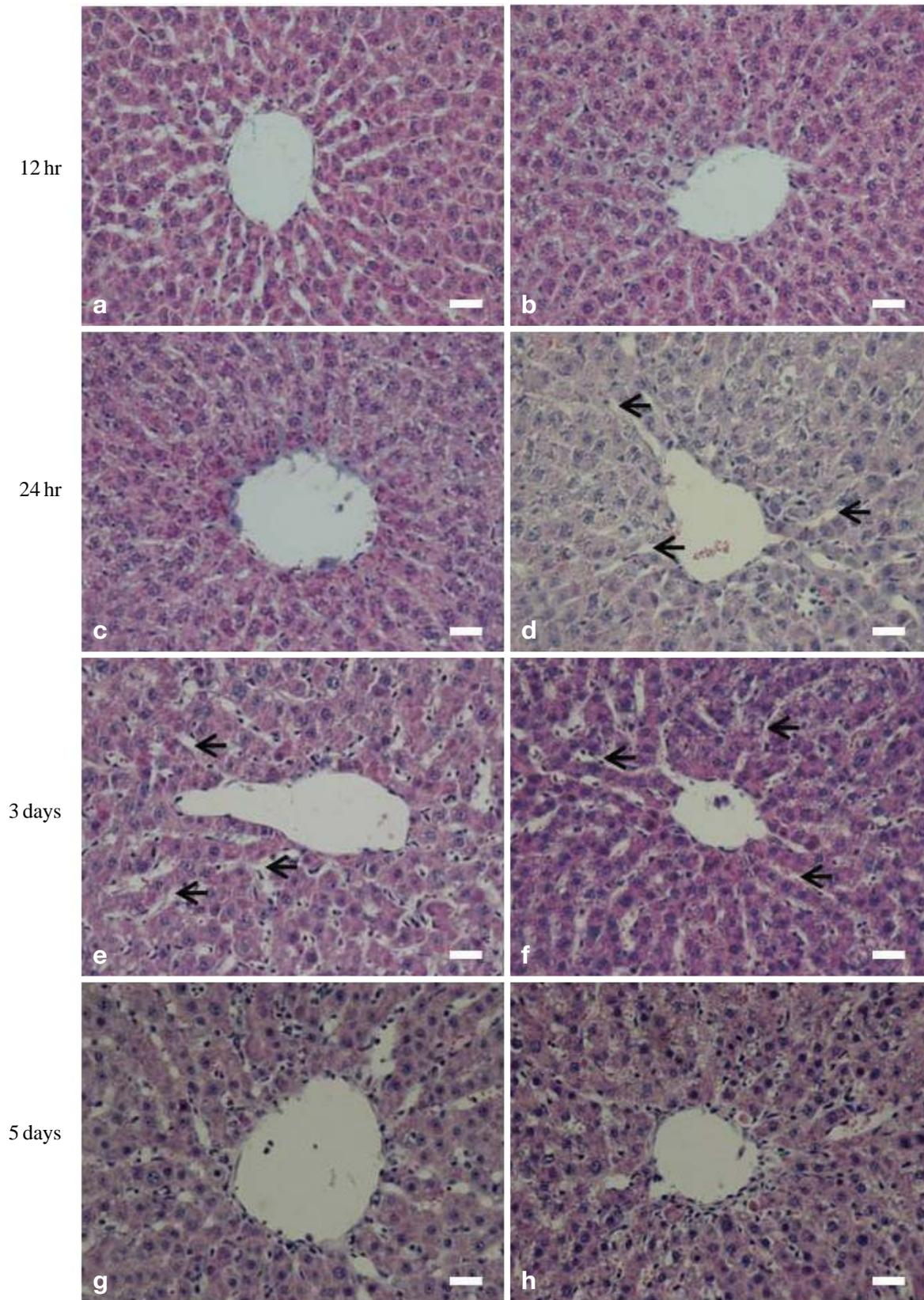


Fig. 1. Histology of the liver at various times after 78% PH with (a, c, e and g) and without (b, d, f and h) rrhGM-CSF treatment showing an earlier disintegration and reestablishment of hepatic plate in the treated group compared to the untreated group. CV: central vein. H-E stain. (Scale bar: 50 μ m)

여 현미경 표본제작 및 PCNA 단백질 분석에 사용하였다.

3. 광학현미경 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 용액에서 1시간, 자일렌으로 1시간씩 2회 치환하였고 파라핀 침투과정을 거쳐, 동일 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 회전형 박절기(microtome, Leica Co.)를 사용하여 4~5 μm 두께로 자르고, 함수과정을 거친 절편을 헤마톡실린과 에오신으로 이중염색하고 Canada balsam을 이용하여 봉입한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

4. PCNA Western blotting

적출한 간 조직을 단백질 추출 시약인 Pro-prep (Intron Co., Korea)과 함께 균질 분쇄하고 -20°C 에서 30분간 처리한 후, 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 μg 씩 정량하여 변성시킨 후 10% acrylamide gel을 사용하여 100V에서 2시간 동안 전기영동 하였고, 소수성 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 2시간 동안 이동시켰다. 이동이 완료된 membrane은 비특이적 반응을 억제하기 위하여 blocking 용액에서 1시간 동안 처리하고 TBST로 15분씩 4회 세척한 후, blocking 용액으로 3,000배 희석시킨 1차 항체(monoclonal mouse anti-PCNA, Millipore Co.)에 overnight 하였다. 그 후 TBST로 10분씩 3회 세척하고 blocking 용액으로 500배 희석시킨 2차 항체(ZyMax Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate, ZYMED Co.)를 상온에서 1시간 동안 처리하고 동일한 방식으로 세척하였다. Signal 검출은 enhanced chemiluminescence (ECL)법을 이용하였으며, 감광된 X-ray 필름을 Labworks analysis software (UVP Co.)를 사용하여 정량하였다.

5. PCNA 면역조직화학 표본제작

증식 중인 세포에서 뚜렷하게 증가하는 것으로 알려져 있는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 발현 양상을 조사하기 위해 제작된 조직을 DAB chromogen kit와 anti-PCNA를 사용하여 면역조직화학적 방법으로 조사하였다 (Hall et al., 1990). 즉 자일렌과 무수에탄올로 함수시킨 조직을 실온에서 3% H_2O_2 에 5분간 처리하고 Immunotech kit를 이용하여 blocking 용액 및 PCNA에 대한 300배 희석된 1차 항체를 10분씩 처리하였다. 습기상자 안에서 2차 항체(biotinylated secondary antibody)와 streptavidin peroxidase를 10분씩 처리한 후, DAB로 발색시키고 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

본 실험에서 육안적 관찰과 특정시간대별로 적출한 간 무게를 측정한 결과에 따르면, 간 절제 후 24시간까지 육안적으로 큰 변화가 없었으나 24시간 이후 잔존하던 간의 크기가 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 7일 전후에 재생과정이 완료되는 것으로 확인되었다(Data not shown). 흰 쥐 간 조직을 광학현미경으로 관찰하였던 바, 정상 대조군의 간소엽(hepatic lobule)은 전형적인 5면체를 보이고, 중앙 부위에 중심정맥이 위치하며 세포판 사이에 동양혈관(sinusoid)이 방사상으로 배열되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. rrhGM-CSF를 주사한 실험군의 경우 부분 간 절제 후 12시간 이후부터 형태학적인 변화를 살펴볼 수 있었는데, 중심정맥을 중심으로 방사상으로 배열되어 있던 세포판이 붕괴됨으로써 동양혈관의 전형적인 모습을 찾아볼 수 없었다(Fig. 1b). 한편 이 시점의 대조군에서는 정상 간 조직의 세포판과 형태가 비슷하였으며 대조군의 세포판의 붕괴는 부분 간절제 후 24시간째에 나타났다(Fig. 1a, c). 부분 간절제 하루가 경과한 실험군에서는 동양혈관이 서서히 형성되고 있는 것을 관찰할 수 있었고, 이러한 동양혈관의 형성은 대조군의 경우에는 3일째에서 관찰되었다(Fig. 1d, e). 3일째 실험군에서는 정상 세포의 형태를 갖추어 동양혈관이 중심정맥 쪽으로 향해 있었고, 세포판도 잘 형성되었다(Fig. 1f).

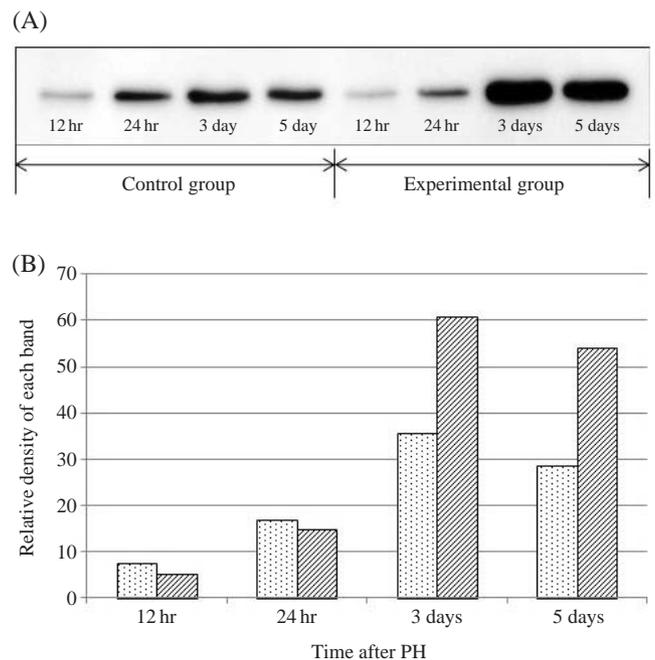


Fig. 2. PCNA expression patterns (by Western blot analysis) in regenerating rat livers at various times after 78% PH with and without rrhGM-CSF treatment. Expression of PCNA is higher in the experimental group than control group at 3 and 5 days after PH.

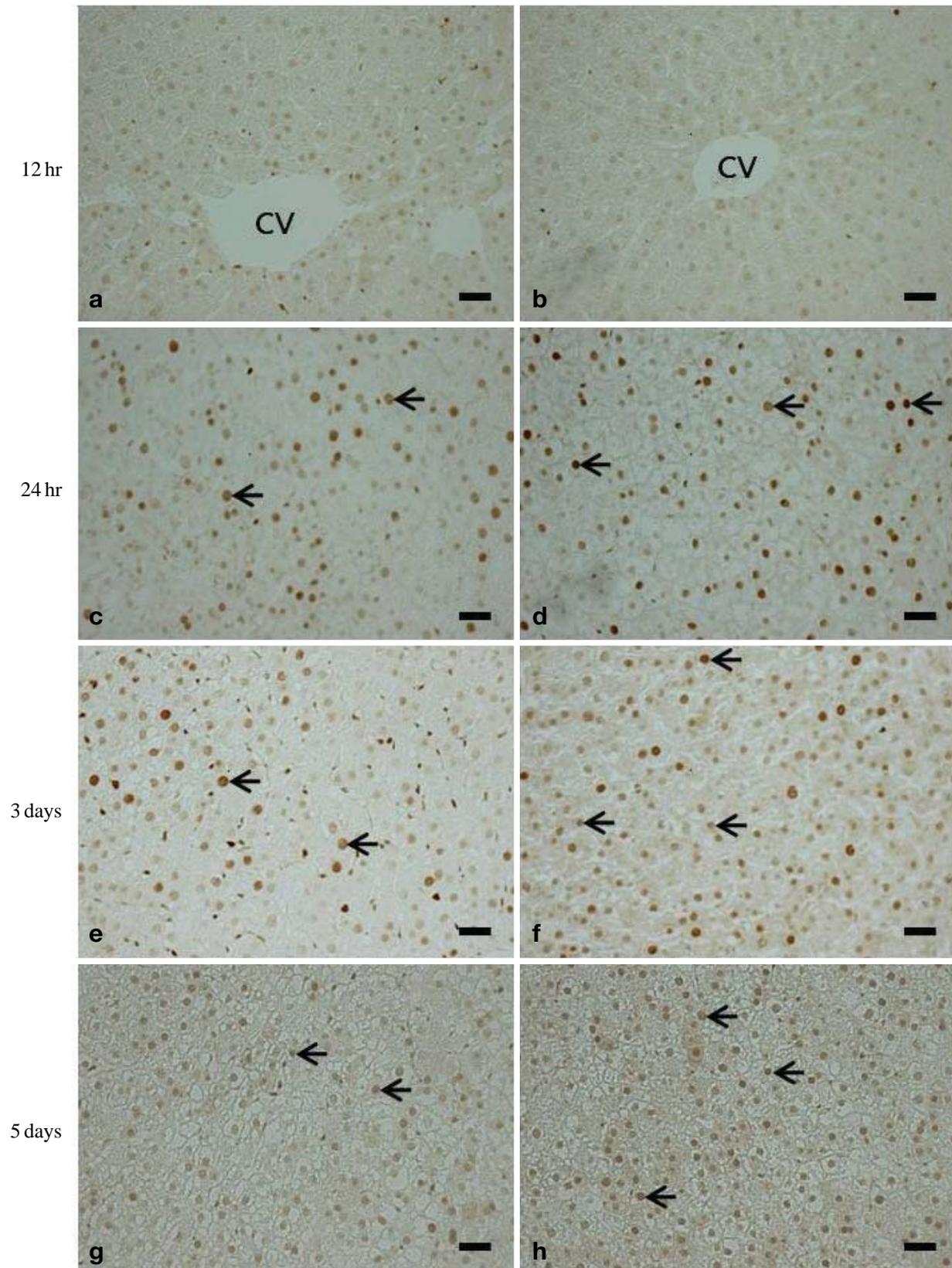


Fig. 3. Immunohistochemical staining for PCNA of the liver at various times after 78% PH with (a, c, e and g) and without (b, d, f and h) rrhGM-CSF treatment showing an stronger intensity of PCNA staining in regenerating liver tissues in the treated group compared to the untreated group. CV: central vein. (Scale bar: 50 μ m)

5일째에는 두 그룹에서 모두 간세포판이 재구성되어 전형적인 간소엽의 구조를 보이고 있었으며, 실험군에서는 대조군에 비해 간세포판을 구성하는 간 실질세포들의 핵세포질비(N/C ratio)가 높게 관찰되었다(Fig. 1g, h).

간 재생과정에서의 세포증식 정도를 알아보기 위하여 PCNA 발현을 Western blotting법으로 조사하였던 바, 실험기간 중 부분 간절제 후 시간이 경과함에 따라 PCNA 단백질의 발현이 점차 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 간 절제 후 12시간 및 24시간이 경과한 군에서는 약간의 PCNA 단백질 발현을 보이다가 3일째에서 최고치에 이르는 것을 관찰할 수 있었고, 5일째에는 오히려 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2A). PCNA 발현양상을 정상대조군과 rrhGM-CSF를 처리한 실험군에서 비교해보면, 간 절제 후 24시간까지는 대조군보다는 실험군에서 PCNA 단백질 발현이 큰 차이를 보이지 않았지만, 부분 간절제 후 3일째에는 실험군의 PCNA 단백질 발현양이 대조군에 비해 크게 높은 것으로 나타났고, 5일째 경우에서도 대조군에 비해 실험군의 PCNA 단백질 발현양이 높은 것으로 조사되었다(Fig. 2B).

부분 간절제 후 재생 중인 간조직 내 PCNA 단백질의 분포위치와 간 조직 내 발현정도를 비교하기 위해 면역조직화학법을 사용하였다. 면역반응의 특이성을 알아보기 위하여 일차 항체를 처리하지 않은 그룹에서는 면역 반응이 나타나지 않았으나, 일차 항체를 처리한 모든 그룹에서는 PCNA의 존재를 나타내는 양성 반응이 나타났다. 재생시간대별로 적출한 조직에서의 단백질 발현정도를 알아본 결과, PCNA의 위치를 나타내는 반응산물들은 부분절제 후 12시간에서는 대조군과 실험군에서 큰 차이를 보이지 않았으나 그 이후 24시간째부터 5일째까지의 조직에서 증식을 하는 세포들이 실험군에서 많은 것으로 관찰되었다. 또한 간 절제 후 3일째 대조군에서는 세포질이 비어있는 세포들이 자주 관찰되었고 이런 현상은 5일째까지 지속되었다(Fig. 3).

고 찰

GM-CSF는 조혈세포의 증식, 성숙 및 분화과정에 작용하는 다면발현성의 사이토카인으로, 섬유아세포, 내피세포, 비만세포, 대식세포, T 세포 및 B 세포 등에서 생성되는 것으로 알려져 있다(Gasson et al., 1990). rrhGM-CSF는 배양중인 비세포로부터 만들어진 재조합 단백질로서 대장균에서 유래한 rhGM-CSF에 비해 당사슬이 매우 풍부한 것으로 분석되었고, 단백질의 안정성이 높고 효과의 지속성이 오래 유지되는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2008).

본 실험에서는 간 재생능력이 다른 동물들에 비해 우수한 흰쥐를 이용하여 부분 간절제 후 재생을 유도하는 과정에서 나타나는 일련의 조직학적 변화과정을 관찰하고, rrhGM-

CSF의 영향에 대해 특정 시간대 별로 PCNA 단백질 발현과 면역조직화학적 특징들을 관찰하였다. 부분 간절제 과정에서 중엽, 좌엽 및 우하엽을 제거하였는데 흰쥐 22마리를 대상으로 하여 전체 간 적출술을 하고 분엽의 무게를 산출하여 남아있는 미상엽과 수상엽이 차지하는 백분율(22%)을 구함으로써 78% 부분 간절제술로 기술하였다(Kubota et al., 1997).

부분 간절제 후 재생과정에서 나타나는 간 무게의 증가량을 비롯한 육안적 관찰 결과는 대조군과 실험군에서 크게 다르지 않았는데, 이는 간 재생에는 HGF (hepatocyte growth factor), TGF α (transforming growth factor alpha), EGF (epidermal growth factor) 그리고 TNF (tumor necrosis factor)와 같은 많은 인자들이 관여하기 때문에 (Fausto, 2000), rrhGM-CSF 단독 투여만으로는 간 재생의 속도를 뚜렷이 증가시킬 수 없음을 보여주는 결과로 생각된다(Xu et al., 2005).

부분 간절제 후 재생과정에서 나타나는 형태학적 변화를 보면, 부분 간절제 후 중심정맥을 중심으로 세포판이 붕괴되다가 시간이 경과함에 따라 세포판이 재배열되는 것을 관찰할 수 있는데 실험군의 경우 부분 간절제 후 12시간에서 세포판이 붕괴됨으로써 동양혈관을 찾아볼 수 없었고, 대조군에서는 정상 간 조직의 세포판과 형태가 비슷하였으며 대조군의 세포판의 붕괴는 부분 간절제 후 24시간에서 나타났다. 24시간째 실험군에서는 동양혈관이 서서히 형성되는 것을 관찰할 수 있었고, 이러한 동양혈관의 형성은 대조군의 경우 3일째에서 관찰되었다. 3일째 실험군에서는 정상 간 조직의 형태를 갖추어 동양혈관이 중심정맥 쪽으로 향해 있었고, 세포판도 잘 형성되었다. 5일째에는 두 그룹 모두 정상 간세포판의 형태가 구조화되어 있는 것으로 관찰되었다. 부분 간절제 후 재생 중인 흰쥐 간조직에서 대조군에 비해 rrhGM-CSF를 주사한 실험군 세포판의 붕괴와 재배열 과정이 시기적으로 좀 더 빠르게 관찰되는 것으로 이 단백질이 간 소엽의 형태형성과정을 촉진하였기 때문인 것으로 생각된다(Fausto et al., 1995).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 DNA polymerase δ 의 보조인자인 36 kDa의 핵단백질로서 세포 증식과정에서 DNA 합성에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ogata et al., 1987). PCNA는 핵 단백질로 발견되었고 이 단백질의 출현은 세포의 증식과 관련되어 있다(Miyachi et al., 1978). 본 실험에서는 초기 PCNA의 발현양은 큰 차이가 없었으나 3일과 5일째의 경우, 대조군보다 실험군의 단백질 발현양이 월등히 높았던 것으로 보아 대조군에 비해 실험군에서 증식중인 세포가 많음을 확인하였으며, 이러한 결과는 rrhGM-CSF가 간 재생 과정에서 세포의 분열을 자극하여 재생에 영향을 미치는 요인들 중 하나인 것으로 판단된다(Ji et al., 2009).

부분 간절제 후 PCNA의 발현위치를 확인하기 위해 면역조직화학법을 이용하였다. PCNA 면역조직화학법은 배양된 세포주나 파라핀에 포매된 조직 등에서 시행하여 세포증식의 지침으로 유용하다는 것이 밝혀졌다(Garcia et al., 1989; Hall et al., 1990). 주로 중심정맥 부분에서 PCNA 단백질이 많이 발현되었는데 부분 간절제 후 12시간과 24시간에서 조금씩 발현되어지다가 3일에서는 거의 모든 세포에서 발현되었다. 부분 간절제 후 3일에서는 대조군과 비교하여 실험군의 PCNA 발현양이 매우 큰 차이를 보였다. 분열하는 세포가 대조군에 비해 많이 관찰되는 것으로 보아 rrhGM-CSF가 간 재생 동안에 세포의 분열을 자극함으로써 재생을 촉진하는 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한, 분열중인 세포의 핵에서 발현하는 PCNA의 비특이적인 반응을 고려하여 면역형광법을 사용하여 확인한 바도 있는데, 발현 양상이 면역조직화학적 결과와 비슷하였고 간 절제 후 3일과 5일이 경과한 실험군에서 PCNA 발현이 가장 뚜렷한 것으로 보아 간 재생을 위한 세포증식이 활발한 것으로 판단된다.

이러한 결과들로 보아 흰쥐를 실험모델로 설정하여 부분 간절제 후, 간 재생이 유도되는 과정에서 rrhGM-CSF는 간 세포판의 붕괴와 재배열, 세포형태의 변화, PCNA 발현시기에 영향을 주는 것으로 생각되며, 이러한 변화를 일으키는 기작 등에 관해서는 이후 더 깊이 있는 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY: Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 131 : 251-256, 1998.
- Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M: Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28 : 509-554, 2004.
- Bucher NLR: Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 15 : 245-300, 1963.
- Choi BH, Ha Y, Park HS, Yoon SH, Park HC, Min BH, Park SR: Application of GM-CSF for the repair of spinal cord injury. *Tissue Eng Regen Med* 3 : 21-26, 2006. (Korean)
- Clark SC: Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cell Cloning* 6 : 365-377, 1988.
- Fausto N: Liver regeneration. *J Hepatol* 32 : 19-31, 2000.
- Fausto N, Laird AD, Webber EM: Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 9 : 1527-1536, 1995.
- Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM: Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* 134 : 733-739, 1989.
- Gasson JC, Fraser JK, Nimer SD: Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): regulation of expression. *Prog Clin Biol Res* 338 : 27-41, 1990.
- Hall P, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162 : 285-294, 1990.
- Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following surgical removal. *Arch Pathol* 12 : 186-202, 1931.
- Ji Y, Dahmen U, Madrahimov N, Madrahimova F, Xing W, Dirsch O: G-CSF administration in a small-for-size liver model. *J Invest Surg* 22 : 167-177, 2009.
- Kim HJ, Lee DH, Kim DK, Han GB, Kim HJ: The glycosylation and *in vivo* stability of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced in rice cell. *Biol Pharm Bull* 31 : 290-294, 2008.
- Kubota T, Takabe K, Yang M, Sekido H, Endo I, Ichikawa Y, Togo S, Shimada H: Minimum sizes for remnant and trasplanted livers in rats. *J Hep Bil Pancr Surg* 4 : 398-404, 1997.
- Michalopoulos GK: Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213 : 286-300, 2007.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121 : 2228-2234, 1978.
- Mourella M, Rubalcava B: Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. *J Biol Chem* 256 : 1656-1660, 1981.
- Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan E: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 168 : 475-486, 1987.
- Tanno M, Taguchi T: Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. *Exp Mol Pathol* 67 : 192-200, 1999.
- Theocharis SE, Papadimitriou LJ, Retsou ZP, Margeli AP, Ninos SS, Papadimitriou JD: Granulocyte-colony stimulating factor administration ameliorates liver regeneration in animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Dig Dis Sci* 48 : 1797-1803, 2003.
- Thorgeirsson SS: Hepatic stem cell in liver regeneration. *FASEB J* 10 : 1249-1256, 1996.
- 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.

< 국문 초록 >

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)는 과립구 및 대식세포뿐만 아니라 상피세포의 증식과 분화를 자극하는 당단백질이며, 최근 생산된 벼세포 유래 재조합 GM-CSF (rrhGM-CSF)는 감염원으로부터 안전하고 당사슬이 매우 풍부하여 물질의 안정성 혹은 효과의 지속성을 높여 주는 것으

로 알려졌다. 본 실험에서는 간 재생 능력이 우수한 흰쥐를 실험 모델로 하여 간의 78%를 제거한 후, 간 재생을 유도하는 과정에서 rrhGM-CSF를 처리하고, 시간 경과에 따라 형태변화의 차이와 더불어 단백질 발현 분석법과 면역조직화학법을 이용하여 PCNA 발현에 미치는 효과에 대해서 알아보고자 하였다. rrhGM-CSF는 간 재생 속도를 뚜렷이 증가시키지는 못하였으나, 대조군에 비해 실험군에서는 재생 초기에 간 세포판의 붕괴와 재구성 시기를 다소 앞당기는 것으로 관찰되었다. 증식 중인 세포에서 증가하는 것으로 알려져 있는 핵단백질인 proliferating cell nuclear

antigen (PCNA)의 간 조직에서의 분포와 발현 정도를 보면 부분 간절제 후 12시간과 24시간에서는 PCNA 단백질이 두 그룹에서 조금씩 발현되다가 간 절제 3일과 5일이 경과한 실험군에서 단백질이 높게 발현되었다. 간 재생이 진행될수록 간 조직 전체에서 고르게 PCNA 양성반응이 나타났으며, 대조군 보다 실험군에서 반응성이 더 뚜렷한 것으로 나타났다. 이러한 결과들로 보아 부분 간절제 후 간 재생을 유도하는 과정에서 rrhGM-CSF가 세포분열을 촉진시키는 인자들 중의 하나로 작용하여 간 재생에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.