

화학적 손상에 따른 간 재생의 '간 조상세포' 동태에 관한 연구

허방, 박명선, 윤명희*, 이충한*

고신대학교 의과대학 병리학교실, 외과학교실*

Investigation for the Alterations of 'Hepatic Progenitor Cells' during Hepatic Regeneration after Chemical Injury

Bang Hur, Myung Sun Park, Myung Hee Yoon*, Chung Han Lee*

Department of Pathology, General Surgery*
Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: Oval (OV) cells had been described as an uncertain type of cells in early neoplastic process of animal hepatocarcinogenesis model. Although biological significance of OV cells is not elucidated in human, they showed cholangiolar and hepatocytic bipotential differentiation in animals, especially rodents. With recent studies emphasizing on a possible target of gene therapy and cell transplantation of hepatic stem cells, biological investigation of OV cells become to be an important issue. In present study, the authors pursue the fate of hepatic stem cell progenitor cells such as OV cells using 2-acetylaminofluorene (AAF)/partial hepatectomy (PH) of resistant hepatocyte (RH) model. **Materials & Methods:** Through gastrotomy tube, 2-AAF (10 mg/kg) was administrated daily for 10 days in SD rats. Seventy percent PH was performed at 5th day of 2-AAF treatment. Animals were killed 1, 3, 5, 7, 9 and 14 days following the last day of 2-AAF. Bromodeoxyuridine (BrdU) (100 mg/kg) was given intraperitoneally 1 hour before killing in each experiment. Hematoxylin eosin-stained histological sections and morphometric changes were analysed by microscope (Americal Optical microStar) with right angle section of portal regions by means of unit areas of high power view. For BrdU incorporation, the sections were immunostained by an anti-BrdU antibody and labelled nuclei were counted. For electron microscopy, fresh liver tissues fixed with 2% glutaraldehyde were processed by routine method. **Results:** 1) It was confirmed that periportal OV cells are a major component of AAF/PH-induced hepatic regeneration based on OV cell proliferation in concord with restoration of liver weight. 2) With BrdU incorporation, OV cell proliferative activity migrates toward pericentral zone from periportal zone. 3) OV cells show bile ductular differentiation with progressive regression and later hepatocytic differentiation through basophilic small hepatocytic transition. 4) In contrast to OV cells, basophilic small hepatocytes emerged from periphery of OV cell proliferative zone in late period of regeneration, inspite of independent pericentral localization of small proportion. 5) Ultrastructurally 3 type of OV cells, at least, were noted in periportal proliferative zone: predominant biliary differentiated cells, sparse undifferentiated small cells and hepatocytic transitional cells. 6) Colonized hematopoietic cells with a few blast-like cells were noted following OV cell proliferation chiefly in areas of periphery of OV cell proliferative zone. **Conclusions:** It was confirmed that AAF/PH is a hepatic regeneration model through OV cell proliferation. In this model, hepatic regeneration could be accomplished with periportal OV cell proliferation and subsequent hepatocytic differentiation via small basophilic hepatocytic transition, in addition to a possible role of extramedullary hematopoietic cells.

Key words : Liver, Regeneration, Oval cell, Bromodeoxyuridine (BrdU), Acetylaminofluorene (AAF), Partial hepatectomy

서론

간은 정상적으로 부분 절제와 같은 간세포 수의 감소에 대하여 G₀ 상태에 있던 간세포가 세포 주기로 들어감으로써 재생성 반응을 하나, 병적 상태에서는 정상 간세포

교신저자 : 허 방
Tel: (051-990-6321, Fax: (051-241-7420)
E-mail: hurbang@ns.kosinmed.or.kr

* 이 연구 일부는 2003년 고신대학교 의과대학 장기려 기념 간연구소 연구비의 지원을 받았음

포의 세포 주기 진입과는 다르게 분화가 안된 세포가 재생성 역할을 대신 담당한다.¹⁾ 이들 미분화 세포는 문맥 역 주위에서 잠재적 존재로서 알려져 있으며, 조건부적 또는 잠재성 줄기세포(facultative stem cell)라 칭한다.¹⁾ 동물 실험에서는 galactosamine 중독²⁾, acetylaminofluorene³⁾와 같은 세포독성 발암물질에 노출된 경우를 비롯한 여러 종류의 간 손상에서, 그리고 인체에서는 만성적 간 손상이나 또는 간세포 암종의 괴사에 수반하여 재생성 세포반응이 뚜렷하게 관찰된다.

난원 세포(oval cell)는 Farber 등⁴⁾에 의해 처음으로 기술되었으며, 실험적 간암 발암 단계의 초기에 출현하는 잠재성 줄기 세포로 대표되고 있으나, 인체에서는 이 세포에 대응하는 세포나 그 의의에 대해서는 많이 연구되지 못하고 있다. 최근 유전자 치료의 표적 세포로서의 줄기세포(stem cell)의 부각과 급성 간 부전의 간세포 이식술의 한 방편으로 연구되고 있다. 현재까지도 간의 "줄기 세포"는 그 존재나 의의에 대해 많은 의문이 제기되어 왔으며, 1990년대 초까지만 하더라도 간의 발생기 전으로서 비록 세대교체가 느리지만 "줄기 세포"가 문맥의 간판(hepatic plate)에 존재하며 중심 정맥 쪽으로 향하여 이동 성장한다는 "stream liver" 설로 설명되고 있다.^{5,6)} 이는 "stem cell"의 후대 세포라고 생각되는 난원 세포가 병적 상태의 간의 문맥 변연부에 존재하는 점과도 부합하고 있다. 그러나 beta-galactosidase 유전자 전달 실험을 통해 Bralet 등⁷⁾은 간의 재생은 "줄기세포"의 이동에 의한 것이라기보다는 일단의 간세포 집단들이 융합하고 성장하는 "mosaic liver" 설로 이를 반박하고 있다. 이와 같은 상반된 간의 재생과 성장 방법에도 불구하고 간에서는 장점막 상피세포와 같이 고전적 의미의 줄기세포와는 다른 개념의 "줄기세포"가 존재한다는 것은 이미 정당하게 받아들여지고 있다.

난원세포 외에 간의 재생에 관계하는 세포들로는 작은 간세포(small hepatocyte)와 골수기원성 줄기세포가 거론되고 있다.^{8,9)} 작은 간세포는 난원세포나 간모세포(hepatoblast)와는 다른 특성을 가지고 있으나 이들 세포들의 특성, 특히 골수 기원의 세포의 생물학적 성상이나 동태에 관하여는 아직도 불분명한 점이 많은 것으로 남아있다.^{10,11)}

간의 "줄기세포"에 관한 대부분의 실험적 연구는 화학

적 발암제의 항 증식성 효과를 이용하는 저항성 간세포(resistant hepatocyte; RH) 모델을 근거로 하여 시행되고 있다.¹²⁾

이에 연구자는 2-acetylaminofluorene (AAF)/부분 간 절제술(partial hepatectomy; PH)로 간의 재생 과정에 수반되는 병리조직학적 소견, 특히 재생을 담당하는 줄기세포의 후대세포에 해당하는 "hepatic progenitor cells"를 광학 및 전자 현미경으로 일차적으로 확인하고, 이들의 재생 실험 기간에 따른 연대적인 변화, 특히 간소염 내에서의 세포 변동과 bromodeoxyuridine incorporation을 이용한 증식능의 변동을 조사하여 간 재생 과정의 동태를 파악하고자 본 실험을 시작하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 처치

1) AAF 시약의 제조

소량의 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma chemicals, St Louis, MS, USA)에 2-acetylaminofluorene (AAF; Sigma chemicals, St Louis, MS, USA)을 용해시켜 1% carboxymethyl cellulose (Sigma chemicals, St Louis, MS, USA)에 희석하여 용액 1 ml 당 AAF가 1.5 mg이 되도록 만들었다.

2) 동물 실험 design

몸무게 200-220 gm 의 수컷 Sprague-Dawley 백서를 이용하였다. 모든 시술은 ethyl ether 흡입 마취 하에 시행하였으며, 시술 12시간 전에 금식시켰다. 실험은 분화를 억제시킨 간 재생군 18 마리를 대상으로하였으며, 실험 도중 위 도관 소실, 간 절제술로 인한 사망 쥐는 제외하였다. 실험동물을 양와위 자세에서 좌측 상복부에 절개를 가하여 위 내에 23 gauge 나비바늘을 이용하여 도관을 설치하였다. 이 도관을 통해 연속 4일 동안 AAF 10 mg/kg을 주입하였다. 5일째 되는 날 70% 간 절제술을 시행하였으며, 이 후 연속 5일 동안 다시 AAF 동량을 매일 주입하였다. 70% 간 절제술은 상복부 중앙 절개 후 간의 중엽과 좌측엽을 각각의 혈관과 담관을 절찰한 후 절제하였다.

마지막 투약 1일(POD 1), 3일(POD 3), 5일(POD 5), 7

일(POD 7), 9일(POD 9), 14일(POD 14)째 되는 날, 동물을 희생시키기 1시간 전 복강 내로 BrdU 100 mg/kg 를 주입하였으며, 1시간 뒤 개복하여 문맥을 통해 생리 식염수 10 ml를 관류시킨 후 간 조직을 얻었다.

2. 조직학적 검색

각 실험군의 동물을 생리식염수로 순환 혈액을 관류하고 10% 중성 포르말린 용액으로 관류 고정을 시킨 뒤 대표적인 간엽을 선택하여 평균 3 절편씩 제작하였다. 통상적인 조직 제작과정을 거쳐 헤마톡실린-에오진 염색을 실시하였으며, 저배율 시야에서 탐색한 후 문맥역의 절단면이 직각으로 잘 횡단된 부위를 선정하여 검색하였고, 재생에 관련한 조직학적 제 요소, 즉, 문맥역 주변의 난원세포의 증식, 증식성 난원 세포의 세담관성 분화, 증식 영역에서의 핵분열 세포, 호염기성의 작은 간세포 그리고 골수의 조혈 세포 집락등을 아래의 기준에 따라 준 정량적으로 평가하였다. 난원 세포의 증식 영역은 400 배 시야의 단위 면적($\times 40$ objective and $\times 10$ ocular, American Optical microStar, $28.26 \mu\text{m}^2$, $r=3 \mu\text{m}$) 당 차지하는 증식 영역의 직경과 증식 세포의 구성 비율을 측정하여 준 정량적 분석을 시행하였으며(Table 1), 호염기성 작은 간세포의 출현은 세포 집단의 크기와 위치에 따라 점수화하여 평가하였다(Table 2).

Table 1. Criteria of semiquantitative analysis of histologic components

Components	Criteria
Oval cell	Proliferative zone diameter (μm)/HPF
Bile ductule	No of luminal ductule in proliferative zone
Mitotic activity	No of mitosis in proliferative zone/10 HPF
Extrahematopoiesis	No of clusters in hepatic lobule/10 MPF

HPF; high power field($\times 400$), MPF; medium power field($\times 200$) unit area(HPF); $28.26 \mu\text{m}^2$ ($r=3 \mu\text{m}$)

Table 2. Scoring system of small basophilic hepatocytes

	zone 1	zone 2	zone 3
Small clusters ($\leq 1\mu\text{m}$)	1	2	3
Scattered clusters ($1\mu\text{m}-3\mu\text{m}$)	2	4	6
Confluent masses ($\geq 3\mu\text{m}$)	3	6	9

3. BrdU incorporation

실험 동물을 희생시키기 1시간 전에 복강 투여(100 mg/kg) 한 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma chemicals, St Louis, MO, USA)에 대한 incorporation은 각 파라핀 절편을 대상으로 BrdU 단클론 항체 (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 이용하였으며, 그 발현 방법은 항 BrdU 일차항체가 포함된 kit (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 avidin-biotin complex 법으로 염색하였다. 파라핀에 포매된 조직을 $4 \mu\text{m}$ 로 박절하여 probe-on 슬라이드 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착시켜 탈파라핀 과정과 함수 과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 내인성 peroxidase를 억제하기 위해 30% 과산화수소를 100% 메탄올에 잘 혼합하여 반응(10분, 실온)시킨 다음 인산 완충액으로 3차례 (각 2분) 세척한 다음 트립신을 처리(5분, 실온)하고 세척하였다. denaturing (20분)과 blocking (10분)은 kit내 준비된 시약으로 시행한 다음 biotin이 부착된 항 BrdU 항체를 반응(1시간, 실온) 시킨 후 인산 완충액으로 2-3회 세척하고, streptavidin-peroxidase를 반응(10분, 실온)시킨 후 2-3회 인산 완충액으로 세척하였다. DAB 혼합액으로 약 5분간 반응시키고 D/W로 수세한 다음 헤마톡실린으로 대조 염색한 후 histomount로 봉입하였다.

평가 방법으로서 간 구성 세포의 핵에서 갈색과립으로 발현한 것을 양성으로 판독하였으며, 복강 내 투여로 인한 확산에 의해 간 표면에서의 반응을 제외하였다. 각 절편에서 문맥역이 거의 원형에 가까운 모습을 한 대표적인 문맥 주변영역을 중심으로 양성 세포의 수를 400 배 시야에서 실 계수 하여 평균치를 구하였다.

4. 전자 현미경적 검색

실험 동물을 희생시키고 간을 절제 고정하기 전에 인산 완충액으로 간 혈관을 약 10분간 관류한 다음 2.5% glutaraldehyde (0.05 mol/L Na-cacodylate, pH 7.2) 로 관류 고정하고 실온에 약 15분 정도 방치한 다음 간 조직을 $1 \times 2 \text{ mm}$ 크기로 세절 하였다. 이를 다시 2.5% glutaraldehyde에 2시간 정도 전 고정하고 1% OsO_4 (0.5% K-ferrocyanide in 0.05 mol/L Na-cacodylate)에 1시간 동안 후 고정 한 다음 계열 알코올과 아세톤에서 탈

수한 후 2% uranyl acetate로서 전자 염색을 실시하고 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

5. 통계 분석

조직학적 검사 상 준정량적 측정치의 통계학적 분석은 윈도우용 SPSS 통계 프로그램(Version 10.0, 1999, USA)을 이용하였고, 각각의 자료 분석은 repeated measured ANOVA, correlations (Spearman coefficient), paired sample t-test 등을 이용하여 구하였다.

결 과

1. 간의 무게 측정

절제된 간의 무게와 체중에 대한 비율을 구하여 reference data와 비교하면 다음과 같다.

Table 3. Rat liver weight and ratio of liver/body weight

Date	Liver		Ratio Liver/Body Wt	Ref ratio (lapse time)
	Weight(gm)	Mean(gm)		
POD 1	5.0/6.9/4.3	3.40	1.54 - 1.70	1.989 (16-24 hrs)
POD 3	3.8/4.7/4.0	4.17	1.90 - 2.09	2.795 (48-72 hrs)
POD 5	7.4/3.8/3.7	4.97	2.26 - 2.49	3.072 (4 - 7 ds)
POD 7	3.6/3.7/4.7	4.00	1.82 - 2.00	3.532 (7 -14 ds)
POD 9	5.5/8.6/7.0	7.03	3.20 - 3.52	3.532 (7 -14 ds)
POD14	11.1/9.8/9.3	10.01	4.55 - 5.01	3.624 (14 -21 ds)

*Ref ratio; GM Higgins, RM Anderson. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Chicago, Am Med Assoc, Archives Pathol 1931, pp 191-195(ref 9)

AAF의 투여에 의해 간의 용적은 시간이 경과함에 따라 증가되지 않았으나 9일째부터 정상적인 간의 무게로 회복되었다.

2. 간의 조직학적 검색

1) 형태학적 소견과 준 정량적 평가

(1) 난원 세포의 증식 및 담세포성 분화

광학 현미경적 검사상 문맥역을 중심으로 정상 간세포보다 작고, 핵/세포질의 비가 높은 난원형의 세포가 관찰되며 이러한 세포들은 문맥 주변의 간 실질 내로 미입하면서 증식하는 모습을 보였다. 동시에 일부의 세포들은 관강을 가지는 미숙한 담세포성 분화를 보였다(Fig 1). 이들 난원형 세포의 증식과 담세포성 분화정도를 비

교하기 위해 난원세포의 출현 영역의 절대 크기(면적)와 단위면적(400배 시야)당 비율(백분율), 담세포의 수는 다음 표4와 같다.

Table 4. Analysis of proliferating components

Date	Oval cell proliferation		Numbers luminal ductule
	size (μm) ¹	ratio(%) ²	
POD 1	5.0/6.9/4.3	3.40	4.89±1.90
POD 3	3.8/4.7/4.0	4.17	10.67±4.41 ^{*3}
POD 5	7.4/3.8/3.7	4.97	5.89±2.93
POD 7	3.6/3.7/4.7	4.00	5.33±2.92 ^{*4}
POD 9	5.5/8.6/7.0	7.03	5.11±3.76 ^{*5}
POD14	11.1/9.8/9.3	10.01	1.33±0.87 ^{*6}

numerical scores are Mean±SD

unit area(AO, x400); 28.26 μm^2

^{*1-2} p<0.05(repeated measured ANOVA test)

^{*3-6} p<0.05(paired t test)

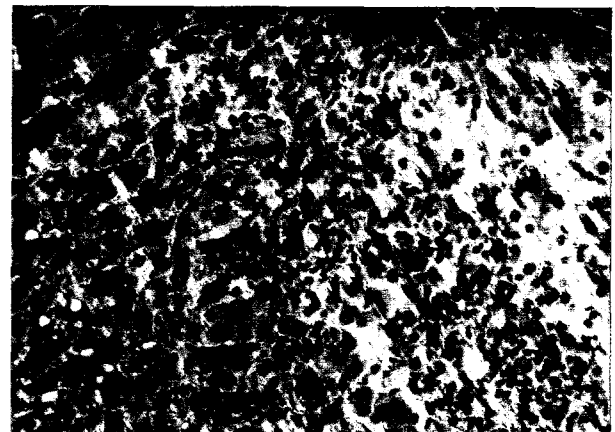


Fig. 1 Oval cell proliferation with ductular differentiation with lobular expansion at POD 5th day (H-E, x200).

단위 고배율(x400) 시야에서 관찰되는 간세포에 대한 증식성 난원 세포의 영역과 간세포에 대한 영역 비율은 실험 1일째부터 점차 증가하여 9일째 현저하게 지속적으로 증가되어 있으나 14일째에는 감소되었다. 반면에 관강을 가지는 담세포는 3일째 가장 많이 관찰되다가 점차 감소하는 경향을 보이며, 실험 5일째부터 9일째 까지 비정형성 핵을 가지는 담세포도 간혹 관찰되었으나 14일째에 이르러서는 담세포성 분화의 소견은 거의 관찰되지 않았다(Table 4).

(2) 호염기성 소 간세포와 간세포성 분화

난원 세포들의 간 실질 내로의 영역 확장과 함께 실험 5일째부터 그 중 일부의 세포가 호염기성 세포질을 가

지면서 크기가 약간 커져 보이나 주변의 정상 간세포보다는 작은 일단의 세포들이 출현하였다. 이와 같은 세포는 zone 1에서 소수의 세포 집단으로 시작하여 점차 그룹을 지어 영역이 확대되면서 집단적인 증식을 보였다(Fig 2). 이들 세포는 정상 간세포와 자연스럽게 이행하여 간세포로 분화하는 양상을 보였다. 그 출현 정도를 세포 집단의 크기와 출현 영역을 표 2에서 제시한 기준에 따라 고배율 시야(x400)에서 점수화하면 표 5와 같다.

Table 5 Basophilic small hepatocyte scores

Date	Basophilic Cell			Mean±SD
POD 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.0±0.0
POD 3	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.0±0.0
POD 5	0/0/0	1/0/1	0/1/0	0.3±0.5 ^{*1}
POD 7	1/2/1	1/2/2	2/4/6	2.3±1.7 ^{*2}
POD 9	6/12/12	6/15/15	12/9/12	11.0±3.4 ^{*3}
POD 14	8/9/9	6/9/8	8/8/6	7.9±1.2 ^{*4}

^{*1-4}p<0.05 (paired t test)

이들 세포들은 5일째 소수의 세포 집단으로 출발하고 9일째까지 세포의 영역이 가장 넓게 확대되었다. 난원 세포 증식성 영역의 변연부에 해당하는 zone 2에서 난원 세포와 이행하는 소견을 보이나 난원 세포가 거의 관찰되지 않는 14일째에서는 난원 세포와 이행하는 소견 없이 독립적으로 존재하였으며 그 위치는 주로 zone 3에서 흔히 관찰되었다(Table 5).

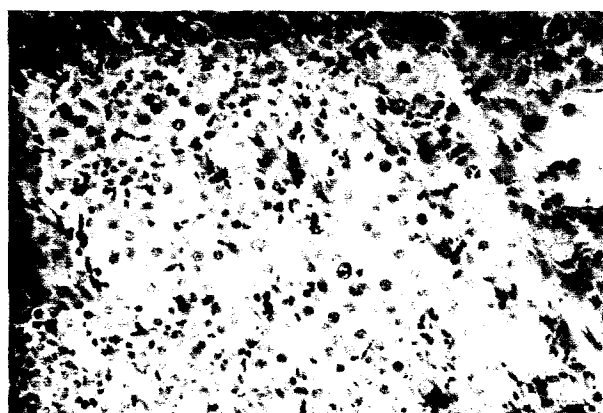


Fig 2. Transition to small basophilic hepatocytes from oval cell proliferation in the peripheral zone and propagation of pericentral confluent cellular masses at POD 9th day (H-E).

x200).

(3) 골수의 조혈세포 집락

정상 대조군과는 달리 실험 5일째부터 골수의 조혈 세포가 OV cell의 증식 변연부에 해당하는 주로 zone 2나 zone 3의 간실질 내의 동양혈관에서 불규칙하게 집락을 이루면서 출현하였다(Fig 3). 대부분의 세포 집락은 적혈구계의 다소 분화된 세포로 나타났으나 소수의 세포 집락은 핵소체가 분명하고 미분화된 모습을 보여 주었다. 이들 세포의 출현 정도는 실험 7일과 9일째 가장 현저하게 나타났으며 단위 기본 면적 당(x200 시야) 출현 빈도는 다음과 같다(Table 6).

Table 6. Frequency of extramedullary hematopoiesis

Date	Foci of cluster/10 MPF			Mean±SD*
POD 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0.0± 0.0
POD 3	1/2/1	1/1/2	12/10/8	4.2± 4.5
POD 5	11/4/2	9/4/3	4/14/10	6.8± 4.3
POD 7	25/21/23	33/35/53	54/52/44	37.8±13.4
POD 9	22/20/27	36/17/18	15/12/20	20.8± 7.1
POD 14	7/5/8	25/14/13	20/10/18	13.3± 6.6

*p<0.05 (repeated measured ANOVA test)

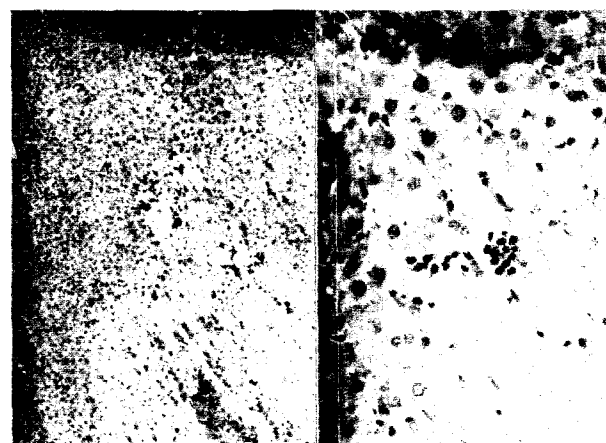


Fig 3. Clusters of hematopoietic cells in peripheral area of OV cell proliferation in liver parenchyma at POD 5th day (H-E, Lt: x100, Rt: x400).

2) BrdU incorporation과 mitotic activity

BrdU 양성 세포는 핵에 진한 갈색의 과립으로 표현되었으며, 문맥역의 담관을 피복하는 세포에도 양성을 보이나 대부분은 문맥 주변에 분포하는 증식성 세포에 나타났으며, 일부에서는 perisinusoidal stellate cell에서도 미약한 양성 반응을 보였다. 그러나 간세포에서는 반응을

나타내지는 않았다(Fig 4).

BrdU uptake를 각 실험군 당 1개의 문맥역을 기준하여 간 소엽의 영역에 따라 zone 1과 zone 2로 분리하여 실험수 한 다음 평균치를 구하였고, 이와 비교하기 위하여 핵 분열하는 세포의 수를 간 소엽의 영역을 구분지어 10 HPF 평균치를 구하였다.

Table 7. Incorporation of BrdU and mitotic activity (Mean±SD)

	Mitotic activity		BrdU incorporation		P value ^b
	zone 1	zone 2	zone 1	zone 2	
POD 1	2.3±2.4	0.1±0.3	24.7±22.2	0.3±0.5	
POD 3	7.4±3.1	1.6±1.0	62.8±15.4	6.4±3.7	p<0.05
POD 5	9.2±2.8	3.8±2.5	58.6±28.7	11.7±6.5	
POD 7	14.2±7.0	3.4±2.7	48.3±16.6	12.7±4.4	p<0.05
POD 9	9.8±1.9	4.0±2.4	33.7±11.3	23.6±6.4	
POD 14	4.2±1.1	3.1±2.5	10.2± 3.1	4.7±1.3	

*1-2 p<0.05 (repeated measured ANOVA test)

^b correlation test (Sperman coefficient)

BrdU uptake는 주로 문맥역을 중심으로 실험 1일째부터 일어나고 있으며, 점차 증가하기 시작하여 7일째 최고치에 다다랐다가 9일째부터는 감소하는 양상을 보였다. 이와 동시에 실험 1일째에는 합성기 세포의 약 1/10에 해당하는 세포가 핵분열을 보이다가 7일째에는 약 1/3의 세포가 활발하게 분열하는 양상을 보였다. BrdU uptake나 핵 분열상은 실험 기간이 경과할수록 zone 1에서 zone 2로 이동하는 경향을 보이는 바 zone 1은 7일을 기점으로 감소하기 시작하나 zone 2에서는 BrdU uptake 증가 양상이 9일째까지 지속되었다(Table 7).



Fig 4. BrdU uptake with numerous positive nuclei in OV cell

proliferative zone with scattered signals in peripheral area at POD 9th day (ABC method, anti BrdU incorporation).

4. 미세구조의 형태학적 분석

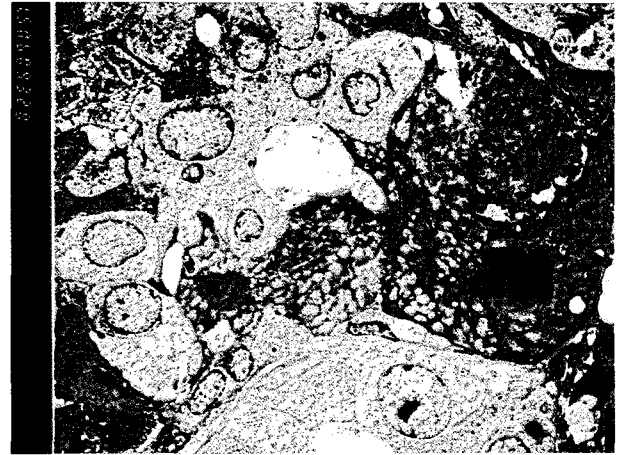


Fig 5. Ultrastructural features of oval cells with ductular differentiation, and with merging into hepatocytic cells at POD 9th day (x15,000).

문맥 주변의 증식성 세포는 미세 구조적으로 세포내 소기관의 발달이 거의 없었으며 원형 또는 난원형의 수포성 핵으로 특징지워졌다(Fig 5). 전체 실험 기간을 출현하는 빈도에는 다소의 차이가 있으나 정상 간세포나 담관 세포와는 분명한 차이가 나는 적어도 3 종류의 세포가 확인되었다. 가장 흔히 보이는 세포는 핵/세포질의 비가 정 세포에 비해 높으며, 둥글거나 난원형 모양의 euchromatin의 핵과 비교적 세포 소기관들이 충분히 발달해 있지 않지만 인접한 담관 상피세포와 유사하여 쉽게 그 세포임을 인지할 수 있었다. 이 세포들은 전 실험 기간에 걸쳐 고르게 관찰되었다. 두 번째의 세포로는 실험 후반에 주로 관찰되는 세포로서 첫 번째 세포와 인접해 있으면서 주변의 정상 간세포와 유사한 세포 소기관을 다소 가지나 여전히 인접 세포와의 사이에 미세 융모를 보이는 표면 구조를 갖는 특징을 지녀 간세포와 담관 세포의 중간 이행 세포로 생각되었으며, 마지막으로 실험 5일째까지 아주 드물게 관찰되는 것으로서 흔히 첫 번째 세포들 사이에 끼어 있는 모습을 하며, 가장 작고 둥근 핵을 가지면서 핵/세포질의 비가 아주 높은 미분화 세포의 특징을 가지고 있었다. 이들 세 종류의 세포들은 Disse 강에서도 관찰되고, 동시에 방추형 세포와 혼재되어 있었으며, 이들 방추형 세포는 소수의 지방 방울을

가지는 것으로 보아 변환된 Ito 세포로 추정되었다.

Table 8. Ultrastructural analysis of periportal component cells

Cell type	Cellular features	Note
Type 1	Typical OV cell with biliary cell features	Predominant in all stage
Type 2	OV cell with hepatocytic transitional features	Increased in late stage
Type 3	OV cell with undifferentiated feature	Sparse in early stage

고찰

일반적으로 줄기 세포라 함은 일종의 미분화된 세포로서 증식능, 자가 유지능(self maintenance), 다양한 분화능, 조직 재생능, 그리고 이와 같은 조건들에 있어서의 유연성(plasticity)이 있는 세포로 정의하고 있다.¹³⁾ 그러나 대부분의 말초 장기와 조직에는 각 장기와 조직에 고유한 기능을 가지는 한가지 방향으로 분화하는 "줄기세포"로서 존재하는데 이를 "committed stem cell" 또는 "tissue determined stem cell (TDSC)" 이라고 한다.¹⁴⁾

간 조직에서는 "줄기 세포"의 존재와 생물학적 성상에 대해서는 간의 발생과 관련지어 진행되어 왔다. 즉 간은 태생 3주쯤 간 모세포(hepatoblast)로 구성된 ductal plate의 때가 만들어지고 그 사이로 중배엽성 세포가 들어오게 됨으로서 간 발생이 시작되는데, 이 간 모세포는 alpha-fetoprotein을 발현하지만 후에는 biliary marker를 발현하는 "bipotential" cell로서 태생기 간의 담관을 만들어 내기 때문에¹⁵⁾ 많은 연구자들은 간 "줄기 세포"의 생물학적인 성상을 간 모세포로부터 찾으려고 하였으며, 또한 간 "줄기 세포"들의 동태는 간 발생의 "stream liver"설^{5,16)} 또는 "mosaic liver"설^{7,17)}에 근거하여 이해하였다.

메치오닌이 풍부한 식이 요법을 이용한 간의 재생 과정¹⁸⁾이나 "Solt-Farber resistant hepatocyte" 모델을 이용한 실험적 간암 과정¹²⁾에서 공통적으로 지적되는 점은 "난원형 세포"로 이루어진 세포의 결절성 증식인데, 난원형의 이 세포는 그 크기가 12-15 μm 이며, 핵/세포질의 비가 높으며 수포성 핵과 적은 세포질을 특징으로 한다. 또한 이 세포는 독성 간손상 후에도 문맥내 담관이 돌출한 곳에서 나타나며, 불분명하거나 꾸불꾸불한 관강 구조로서 간 실질 내로 확산되기도 하고, terminal cholan-

giole에 위치하여 문맥내 담관과 연결되는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁻²⁰⁾ 최근의 연구에 의하면 intrahepatic biliary system 전체에 걸쳐 존재하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 본 실험 과정에서도 이들 세포와 유사한 난원세포가 실험 기간이 진행됨에 따라 소엽내로 가지를 치면서 미입하는 소견과 관강이 존재하는 담관성 분화를 분명히 보이는 점은 유사하였으나, 증식의 초기 단계부터 담관성 분화가 현저한 점은 특이할만하였다.

형태학적인 연구에 따르면 난원 세포는 cholangiolar epithelial cell에서 기원하는 것으로 알려져 있고^{22,23)}, 주변에 이행 간세포(transitional hepatocyte)가 관찰되고, 이행 간세포는 가끔 담관 구조물에서도 관찰되기도 하고,¹⁹⁾ 난원 세포와 간세포의 중간에 해당하는 미세구조적 특징을 가지는 것으로 보아 미분화된 간세포성 또는 담관 상피성 세포를 난원 세포의 전구세포인 것으로 해석하고 있다. 본 실험에서 난원세포 증식 영역에서도 간 세포와 유사한 세포가 분명히 존재하였고, 간 재생이 거의 이루어진 실험 후기에는 난원 세포와 간세포가 함께 담세관의 일부를 구성하기도 하였다. 난원 세포를 비롯한 전구세포들을 세포학적본태를 확인하기위해서 여러 가지의 면역화학적 표식자를 사용하고 있으며, 여기에는 OV-6가 대표적으로 사용되고 있다. 그러나 이 표식자는 간 세포도 같이 표지되어 세포 구별을 위한 것 보다는 세포 기원을 알아보는 데 더 유용하게 이용되고 있는 실정이다.^{24,25)} 그 외에 pyruvate kinase isoenzyme, L-PK, albumin, AFP, cytokeratin-7, 8, 18, 19 등이 간 세포성 표지로 이용되고 있다.²⁶⁻²⁹⁾ 본 연구를 수행하기 전의 예비 실험에서 수종의 cytokeratin과 AFP등을 이용한 면역조직화학적 염색을 몇 차례 시도하였으나 그 표현이 너무 미약하여 그 실체를 정확히 평가하기 힘들었다.

발암 물질에 반응하여 증식하는 세포는 시기에 따라 그 증식 지수의 차이가 있으며, BrdU index가 5-20%인 것으로 보고되어 있기는 하나³⁰⁾, 그 정도는 실험 동물의 종류나 발암 물질의 투여 regimen에 따라 상당히 다른 것으로 보고 되고 있다. 본 실험에서는 BrdU incorporation으로 양성 세포의 수를 실험 기간에 따라 계수해 본 결과 주변의 정상 간세포는 발현되지 않고, 증식성 난원세포에서 제한되어 있어 간의 재생에는 이들 세포의 증식이 필수적임을 알 수 있었다. 또한 난원 세포의

수가 실험 기간에 따라 증가되어 최고치에 이른 9일째부터 BrdU incorporation은 오히려 감소하고 증식영역의 주변부에 국한된 점은 세포의 증식 위치가 초기의 문맥역에서 후기로 올수록 중심 정맥쪽으로 이동하는 것으로 해석되었다. 이러한 추정은 간 발생의 "stream liver"의 설과 일맥 상통해 보였다.

난원 세포의 동태에 관한 연구로서 ^3H -TdR이나 BrdU를 이용한 증식세포의 DNA의 in vivo "pulse-chase" 표지 검사로서 난원 세포의 추적에 쓰이는데, 이론적으로 이러한 방법은 later generation까지 표지가 지속될 수 있기 때문에 난원 세포의 후대 세포를 알아 볼 수 있는 방법이다. 이런 방법을 이용한 몇몇 연구^{26,30,31)}에서 수일-1주일 이내에 문맥역 주변에서 표지되며, 1주에서 수주 이내에 간 실질 내로 관류를 가지는 세포에서 표지되고, 그 이후에는 간 세포가 산발적으로 또는 집단적으로 표지되면서 난원 세포에서의 표지는 감소하는 현상을 보고하고 있다. 본 실험에서 BrdU 표지를 추적하지는 않았으나 난원 세포의 수와 표지되는 정도를 분석 해 본 결과 시기적으로 BrdU 표지가 감소할 때 난원세포를 대체하는 염기성 소 간세포의 출현이 증가하는 현상은 앞선 보고의 내용과 상응하는 것으로 해석하였다. 그러나 달리 해석될 수 있는 부분은 실험 후기, 특히 실험 9일째와 14일째에 두드러진 현상으로 염기성의 작은 간세포가 난원세포의 증식이 현저하지 않았거나 거의 관찰되지 않았던 zone2와 zone3에서 그 세포 집단의 크기가 커지는 소견을 보여 이는 mosaic animal model에서 설명되고 있는 patch 형식의 간세포 집단이 문맥역외의 영역에서 생겨 간을 만들거나 재생해 간다는 설과 그 궤를 같이 하는 것으로 생각되었다.

난원세포와 함께 간 재생을 담당하는 또 다른 한 축으로 설명되는 small hepatocyte는 일반적으로 정상 간세포에 비해 크기가 작은 세포들로서 in vitro에서 clonogenic potential을 가지는 세포이며, Tatenko 등⁸⁾에 의하면 in vitro에서 난원세포와 같이 간세포 또는 담관세포로 분화하는 양상을 보인다고 한다. Gordon 등⁹⁾도 성숙 간세포나 난원 세포 양쪽의 세포 분열을 모두 억제시킬 수 있는 pyrrolizidine alkaloid 투여에 의하면 간 모세포나 성숙 간세포와는 다른 특성을 갖는 소위 "small hepatocyte-like progenitor cell"이 간을 재구성하는 것을

보여 준 바 있다. 반면에 Overturf 등¹⁴⁾은 centrifugal elutriation 방법으로 크기가 다른 세 종류의 간세포를 분리하고 이를 fumarylacetoacetate hydrolase가 결핍된 마우스에 이식하여 공여 간세포가 수여 간에서 자라는 것을 관찰하였으며 각각의 세포의 분열능을 비교한 결과 small size(16 μm)의 간세포가 medium(21 μm) 혹은 large size(27 μm)의 간세포에 비해 분열능이 현저히 떨어진다 는 결과를 얻었다. 이처럼 각 실험자들의 결과가 상이한 것은 소위 "small hepatocyte"가 다만 그 크기에 의해 구분된, 아직은 완전히 규명되지 않은 상태의 세포이기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같이 실험들에서도 regimen에 따라 출현 세포의 시간이 다르기는 하나 간세포성 분화가 문맥 주변의 난원세포에서 출발한다는 점은 동일하다. 근래에는 genetic labelling과 oval cell injection 방법을 이용한 실험에서 간 손상의 부위와 범위가 난원 세포의 출현 부위와 반응 정도를 결정한다고 보고하고 있다.³²⁾ 본 실험에서는 난원 세포의 출현에 이어 담관성 상피세포의 출현과 소퇴로 이어지고 크기가 적은 염기성의 간세포를 거쳐 간 큰 간세포성 분화를 보여주었고, 일련의 세포변동과 함께 BrdU incorporation은 점차 감소하는 것으로 보아 Overturf 등의 기술과는 배치되고 있다.

인체에서의 간 손상의 반응은 3가지 유형으로 구분하여 설명되어 왔으나 최근의 분류는 4가지로 세분되고 있는 바^{33,34)}, 즉, 전형적 증식, 담관관성 증식, 난원 세포성 증식에 더하여 비 전형적 증식을 포함시키고 있다. 이와 같은 분류가 실험 동물에서도 어느 정도 가능한 것으로 본 실험에서도 반증되었다. 즉 어떤 담관성 세포는 선종성 병변에서 보는 핵의 농염과 위중층 현상을 보여 발암성 진행의 가능성을 시사하였으나 실험 14일째 이러한 소견이 전혀 보이지 않아 이러한 비전형적인 담관 분화가 가역적인 것으로 추정되었다. 이러한 비전형적인 세포가역적 변화는 담관성 분화를 보이는 세포에 국한되어 있지 않고 실험 9일째 관찰된 선종성 간세포로 구성된 소 결절(9 μm)이 출현한 간세포성 분화를 보이는 세포에도 적용되는 것이었다. 이와 같은 재생의 한계를 벗어난 소견은 실험 방법의 regimen의 영향으로 사료되었다.

앞으로의 간의 줄기 세포에 관한 실험 방향으로는 이들 세포의 후손에 해당하는 난원 세포의 형태학적인 연

구와 동시에 각 분화 단계를 표지 할 수 있는 몇몇 가지의 단백 및 이들의 mRNA 발현과 이런 세포의 분화 능력을 결정하는 인자에 대한 연구가 필요하며 일부에서는 진행되고 있다.³⁵⁻³⁷⁾ 아울러 본 연구에서 우연히 관찰된 것이기는 하나 골수와 조혈세포의 출현이다. 이 세포들은 한 때 염증 세포로 이해되어 왔으나, 본 실험에서는 염증 반응을 동반하지 않기 때문에 그 가능성이 없다고 생각된다. 또한 본 실험의 테마는 아니나 CD 34와 myeloperoxidase를 이용한 면역조직화학적 추가 조사에서 이들 세포 집단은 CD 34 음성, myeloperoxidase 양성을 보였던 점은 주시할만 하고, 이러한 점은 최근 골수에서 기원하는 줄기 세포가 간의 재생을 담당하는 한 축으로 설명되고 있는 점과 연관하여 추가 연구가 필요하다고 생각되었다.

결론

2-aminoacetylfluorene/partial hepatectomy (AAF/PH) 술식으로 유도된 간 재생과정에서의 관찰 결과를 요약하면,

- 1) 난원 세포의 증식은 POD 1일부터 시작되어 간의 무게가 정상으로 회복되는 POD 9일에 정점을 이루다가 14일에 감소함을 보여 간 재생의 주된 구성 세포임이 확인되었다.
- 2) BrdU incorporation으로 확인된 난원 세포의 증식 양상은 문맥 주변부로부터 소엽중심성으로 이행하는 소견을 보였다.
- 3) 난원 세포는 실험 초기에 담세관성 상피세포로의 분화가 우세한 반면에 후기로 갈수록 호염기성의 작은 간세포를 경유하는 간세포성 분화를 보이는 이중성 분화 양상을 보였다.
- 4) 호염기성의 작은 간세포는 문맥 주위의 난원세포의 증식과 무관하게 중심정맥 영역에서도 관찰되기도 하나 대부분 난원세포 증식의 변연부에서 주로 출현하였고 난원 세포에 비해 시기적으로 실험 후기에 우세하게 나타났다.
- 5) 전자현미경적으로 문맥주변의 증식영역을 구성하는 세포는 시기에 따라 그 구성의 차이는 있으나

미분화성 세포, 담관 분화성 세포, 간세포성 분화를 보였다.

- 6) 골수와 조혈세포는 난원 세포 증식의 변연부에서 집락을 이루고 있으며, 난원세포의 증식이 현저한 시기에 속발하여 출현하였다.

결론적으로 본 실험에 사용된 AAF/PH 술식은 난원 세포로 대표되는 잠재성 줄기세포를 통한 간 재생 모델임이 확인되었으며, 이 모델에 의한 간의 재생은 난원 세포의 소엽중심 성향의 증식과 간세포성 분화에 주로 기인하고 있으며, 호염기성의 작은 간세포외에 골수와 조혈 세포가 재생과정에 관여하는 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Grisham JW, Thoreirsson SS. Liver stem cell. Stem cells. In: Stem cells, CS Potten editor. New York, Academic press, 1997, pp 233-282
2. Koukoulis G, Rayner A, Tan KC, Williams R, Portman B. Immunolocalization of regenerating cells after submassive liver necrosis using PCNA staining. J Pathol 166: 359-366, 1992
3. Matsusaka S, Tsujimura T, Toyosaka A, Nakasho K, Sugihara A, Okamoto E, Uematsu K, Terada N. A role of c-kit receptor tyrosine kinase in development of oval cells in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model. Hepatology 29: 670-676, 1999
4. Farber E. Similarities in the sequence of early histologic changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res 16: 142-149, 1956
5. Zajicek G, Oren J, Weinreb M. The streaming liver. Liver 5: 293-300, 1985
6. Zajicek G, Schwartz-Arad D, Bartfeld E. The streaming liver V. Time and age-dependent changes in hepatocyte DNA content following partial hepatectomy. Liver 9: 164-171, 1989
7. Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. Am J Pathol 144: 895-905, 1994
8. Tateno C, Yoshizato K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. Am J Pathol 149: 1593-1605, 1996
9. Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. Am J Pathol 156: 607-619, 2000

10. Peterson BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170, 1999
11. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine* 6: 1229-1234, 2000
12. Solt DB, Farber E. Rapid emergence of carcinogen induced lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 88: 595-609, 1977
13. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. *Development* 110: 1001-1020, 1990
14. Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol* 155: 2135-2143, 1999
15. Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 51: 2611-2620, 1991
16. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 50: 3811-3815, 1990
17. Kennedy R, Rettinger S, Flye MW, Parker PK. Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream. *Hepatology* 22: 160-168, 1995
18. Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 76: 441-449, 1958
19. Saraf C, Lalani E, Golding M, Anikumar TV, Poulson R, Alison M. Oval cell activation in the rat liver. *Am J Pathol* 145: 1114-1126, 1994
20. Van Eyken P, De Vos R, Desmet VJ. Progenitor ("stem") cells in the alcoholic liver diseases? In: Hall P editor. *Alcoholic liver disease: Pathology and pathogenesis*. 2nd ed, London: Edward Arnold 1995: pp 160-171
21. Lenzi R, Liu MH, Slott PA. Histogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. Evidence for a biliary epithelial nature of oval cells. *Lab Invest* 66: 390-401, 1992
22. Solt DB, Farber E. Rapid emergence of carcinogen induced lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 88: 595-609, 1977
23. Grisham JW, Porta EA. Origin and fate of proliferated ductal cells in the rat. Electron microscopic, and autoradiographic studies. *Exptl Molel Pathol* 3: 242-261, 1964
24. Crosby AF, Hubscher S, Fabris L. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in the liver from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* 152: 771-779, 1998
25. Roskman T, De Vos R, Eyken P, Miyajaki H, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver diseases and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 29: 455-463, 1998
26. Tee LB, Kirilak Y, Huang WH, Smith PG, Morgan RH, Yeoh GC. Ductal phenotype expression of hepatocyte and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 17: 251-259, 1996
27. Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143: 1606-1620, 1993
28. Golding M, Saraf C, Lalani E. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* 22: 1243-1253, 1995
29. Bisgaard HC, Nagy P, Ton PT, Hu Z, Thorgeirsson SS. Modulation of keratin 14 and alpha-fetoprotein expression during hepatic oval cell proliferation and liver regeneration. *J Cell Physiol* 159: 474-484, 1994
30. Sell S, Osborn K, Leffert HL. Autoradiography of "oval cells" appearing rapidly in the livers of rats fed N-2-fluorenylacetamide in a choline devoid diet. *Carcinogenesis* 2: 7-14, 1981
31. Evarts RP, Hu Z, Omori N, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes; comparison between titrated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 17: 2143-2151, 1996
32. Peterson BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage. *Hepatology* 27: 1030-1038, 1998
33. Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial cell system. *Prog Liver Dis* 9: 27-38, 1990
34. Sirica AE. "Ductular hepatocytes". *Histol Histopathol* 10: 433-456, 1995
35. van den Heuvel MC, Slooff MJH, Visser L, Muller M, De Jong KP, Poppema S, Gouw ASH. Expression of anti-OV 6 antibody and anti N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* 33: 1387-1393, 2001
36. Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterol* 120: 534-544, 2001
37. Kiss A, Schnur J, Szabo S, Nagy P. Immunohistochemical analysis of atypical ductular reaction in the human liver, with special emphasis on the presence of growth factors and their receptors. *Liver* 21: 237-246, 2001