

총수담관 결찰이 간의 형태 및 구리대사에 미치는 영향*

연세대학교 의과대학 병리학교실 및 외과학교실**

김경숙 · 박찬일 · 조장환** · 최인준 · 이유복

서 론

구리는 생체에 필수적인 금속의 하나지만¹⁾ 과다하게 축적되면 심한 독성을 일으킨다^{2,3)}. 정상인체에는 구리의 흡수와 배설을 조절하는 기전이 있어서 체내구리의 균형이 유지되며, 간은 이러한 조절기능의 주요 부분을 담당한다.

흡수된 구리는 혈중에서 알부민과 약하게 결합하여 혈중구리의 5~10%를 차지하며 그 60~90%는 수시간내에 간으로 이동한다⁴⁾. 간으로 이동된 구리의 80%는 sulfhydryl기를 함유한 metallothionein (MT), L-6-D (Cu-Lp) 등 세포액내의 단백질과 결합된 상태로 존재하고^{5,6)} 20%는 ceruloplasmin, superoxide dismutase, cytochrome oxidase 등의 합성에 관여하거나 리소솜을 통하여 담즙으로 배설된다⁷⁾. 이 중 체내 구리의 균형 유지에 중요한 것은 ceruloplasmin 상태로 혈중으로 배설되는 기전과 담즙을 통한 배설이다^{8,9)}.

거의 모든 식이에는 충분한 양의 구리가 함유되어 있기 때문에 사람에서는 구리결핍에 의한 질환이 보고된 바 없으며, 구리 대사장애에 의한 인체질환은 모두 배설기능의 장애 때문이다. Wilson 병과 같은 유전적인 구리 대사장애와 Indian childhood cirrhosis¹⁰⁾ 외에도 primary biliary cirrhosis^{11,12)}, 간의 담도폐쇄¹³⁾ 및 기타 담즙울체성 질환들^{14,15)}에서도 구리축적 때문에 기존의 병변이 악화될 수 있으며, 후자들의 경우에는 간내 또는 간의 담도로의 분비 장애가 그 기전으로 생각되고 있다¹⁶⁾.

담도를 통한 구리배설의 장애는 Wilson 병에서 추정되는 바와 같이 간세포의 리소솜결함 때문일 수도 있지만⁷⁾ 담도의 기질적인 폐쇄 때문일 수도 있다. 그러므로 총수담관을 결찰하여 담도로의 구리배설을 차단하면 과다한 구리축적이 초래되어 간손상이 유발될 것으로 기대된다. 이러한 관점에서 Shibuya¹⁷⁾는 흰쥐의 총수담관을 결찰한 바 문맥역 주변부에 소담관이 증식하고, 동시에 구리를 첨가 투여하면 간소엽 가장자리 간세포의 리소솜이 구리-단백복합체로된 구리로 포화되어 파괴되고 결국 간세포의 손상과 섬유화가 초래된다고 보고하였다.

그러므로 본 연구에서는 총수담관 결찰과 다량의 구리 투여시 일어나는 혈중 구리농도, 간의 구리함량, 간내 구리 및 구리결합 단백질의 분포양상을 조사함으로써 간의 구리대사에 관한 일면을 구명하는 한편 총수담관을 장기간 결찰할때 Kountouras 등¹⁸⁾이 주장한 바와 같은 간경변증이 유발되는지를 증명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 체중 200 g내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐 120마리를 사용하였으며, 2주간 동일조건에서 기초 사육한 후 다음과 같이 4군으로 나누었다.

- 제 I 군 : 대조군 (Sham operation) ... 10마리
- 제 II 군 : 총수담관 결찰군 ... 35마리
- 제 III 군 : 총수담관 결찰후 황산구리 투여군 ... 50마리
- 제 IV 군 : 황산구리 투여군 ... 25마리

2. 실험방법

1) 총수담관 결찰 : 실험동물을 seconal로 마취한 후 복부 정중의 linea alba를 따라 3 cm의 절개를 하고 간동맥과 간문맥을 확인하면서 총수담관만 박리하여 6~0

*본 연구는 1988년도 연세의료원 의학학술 연구비로 이루어 졌음.
*본 논문은 1989년 대한 병리학회 제41차 추계학술대회에서 구연으로 발표 되었음.

silk로 이중 결찰하였다. 모든 조작은 무균적으로 시행하였으며 수술후 항생제 투여는 하지 않았다.

2) 황산구리 투여 : 황산구리를 증류수에 용해하여 0.5% 황산구리용액을 만들어서 일일용량 0.3 ml를 매일 오전에 한번씩 복강내로 주사하였다.

3) 도살 및 검사물 채취 : 실험기간중 각 동물의 동태를 관찰하였고 실험도중 사망한 동물은 제외하였다. 시간 경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 실험시작후 3일, 7일, 28일 및 42일째에 각 실험군마다 4마리씩 도살하였으며, 대조군은 28일과 42일째에 5마리씩 도살하였다. 도살시에는 각 동물의 체중을 측정하여 다음 second로 마취하여 개복하고, 혈청 bilirubin, alkaline phosphatase 및 혈중 구리농도 측정을 위하여 복부 동맥에서 15 ml의 혈액을 채취하였다. 도살시 총수담관의 상태와 간의 육안적 변화를 조사한 후 간을 적출하여 무게를 측정하였다.

4) 혈액화학적 검사 : 혈청 bilirubin과 alkaline phosphatase는 chemical analyser (Impact 400E, Gilford)를 이용하여 측정하였고, 혈중 구리농도는 전혈 0.5 ml에 1.4 N HCl 2 ml를 넣어 진탕하고 원심분리한 다음 상층액을 atomic absorption spectrophotometer (원자 흡수분광 광도계, Shimadzu AA-650)를 이용하여 측정하였다.

5) 간조직내 구리함량 측정 : 간 적출시 1.5-3 gm의 간을 절취하여 도가니에 담은채 회화로에 넣어 백색가루가 될때까지 충분히 회화시킨 후 5% HCl 5 ml를 첨가하여 유리막대로 혼합하고 여과하는 과정을 수차례 반복하여 25 ml를 만들어서 원자 흡수분광 광도계 (Shimadzu AA-650)로 측정하였다.

6) 광학 현미경적 검색 : 적출한 간의 일부를 48시간 동안 10% 중성 포르마린에 고정하여 다음 소편을 절취하여 파라핀에 포매하고 4개의 연속절편을 만들어서 다음

과 같은 염색을 시행하여 검정하였다.

- (1) 일반적인 조직변화를 보기 위한 hematoxylin-eosin (H-E) 염색
- (2) 섬유화의 정도를 보기 위한 Masson trichrome 염색
- (3) 구리결합 단백을 보기 위한 Victoria blue 염색
- (4) 구리 침착을 보기 위한 rhodanine-light green 염색

7) 통계적 유의성 검정 : 대조군에 대한 실험군 측정치의 통계적 유의성을 검정하기 위하여 X²-test를 사용하였다.

실 험 성 적

1. 간의 무게 변동

도살시 각 동물의 체중 100 gm당 간 무게를 비교한 바 대조군은 3.00±0.07 gm이었으며, 총수담관을 결찰하였던 제II 및 III군에서는 3일째 이미 각각 5.85±0.03 및 5.73±0.41 gm으로 증가하였다. 제14일째에는 각각 6.00±0.83 및 8.23±1.43 gm으로 대조군의 2배이상 증가하였으며, 42일째에는 9.27±2.11 및 10.70±1.74 gm으로 대조군의 3배이상 증가하였다. 구리만 투여하였던 제IV군은 3일째부터 14일째까지 3.58±0.12-3.70±0.09 gm으로 대조군보다 약간 증가하였다가 제28일째부터는 다시 대조군치에 접근하였다(Table 1).

이러한 간무게 증가는 제II 및 III군의 경우 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의하였으며(p<0.05), 제IV군에서도 42일째를 제외하고는 모두 p<0.05였다. 또한 제II 및 III군의 간은 제IV군보다 유의있게 무거웠으나 제II군과 제III군 사이의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 1. Changes in liver weight (gm/100 gm body weight) of the experimental groups

	3d	7d	14d	28d	42d
I				(3.00 ± 0.07)	
II	5.85 ± 0.03	5.07 ± 0.28	6.00 ± 0.83	7.13 ± 0.72	9.27 ± 2.11
III	5.73 ± 0.41	5.57 ± 0.29	8.23 ± 1.43	8.25 ± 4.35	10.70 ± 1.74
IV	3.70 ± 0.09	3.58 ± 0.12	3.62 ± 0.08	3.28 ± 0.06	3.10 ± 0.01

Values are mean ± standard error.

Table 2. Changes in serum bilirubin (mg/dl) and alkaline phosphatase (IU/L) levels of the experimental groups

	3d	7d	14d	28d	42d
I				(0.14 ± 0.02)	
II	6.38 ± 0.58	13.15 ± 4.46	8.17 ± 3.28	7.40 ± 0.20	4.65 ± 2.69
III	14.95 ± 6.72	11.83 ± 1.93	5.47 ± 1.66	8.55 ± 2.95	10.45 ± 0.72
IV	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01
I				(69.22 ± 16.19)	
II	246.02 ± 23.39	269.33 ± 100.60	213.00 ± 4.93	201.67 ± 50.60	186.33 ± 26.54
III	776.25 ± 166.27	688.06 ± 93.41	586.60 ± 155.33	194.00 ± 21.00	188.10 ± 16.02
IV	83.99 ± 7.75	71.26 ± 18.62	69.80 ± 11.73	65.99 ± 8.28	56.67 ± 2.60

Values are mean ± standard error.

Table 3. Changes in blood copper level (μg/ml) and hepatic copper content (μg/gm wet weight) of the experimental groups

	3d	7d	14d	28d	42d
I				(1.83 ± 0.28)	
II	3.54 ± 0.14	3.09 ± 0.34	3.35 ± 0.23	4.36 ± 0.14	4.12 ± 0.38
III	2.95 ± 0.24	3.12 ± 0.71	3.69 ± 0.38	3.20 ± 0.32	5.73 ± 0.23
IV	3.08 ± 0.28	2.58 ± 0.29	2.24 ± 0.12	2.47 ± 0.20	1.73 ± 0.29
I				(6.37 ± 1.13)	
II	4.76 ± 0.14	9.14 ± 1.51	12.06 ± 0.02	28.78 ± 0.78	38.35 ± 3.27
III	74.62 ± 14.22	36.04 ± 23.21	178.40 ± 35.35	181.46 ± 19.36	171.19 ± 17.15
IV	55.05 ± 2.57	57.80 ± 37.62	19.21 ± 1.22	61.69 ± 7.02	65.97 ± 15.07

Values are mean ± standard error.

2. 혈청 bilirubin 및 alkaline phosphatase치 변동

도살시 대조군의 혈청 bilirubin과 alkaline phosphatase치는 각각 0.14±0.02 mg/dl 및 69.22±16.19 IU/l였으며, 총수담관 결찰군인 제II 및 제III군에서는 실험 3일째부터 심한 증가를 보였다. 제II군의 bilirubin치는 전 기간동안 4.65±2.69-13.15±4.46 mg/dl로 증가하였고 alkaline phosphatase치는 3일째에 246.02±23.39 IU/l로 증가하여 전 기간동안 거의 같은 정도로 유지되었다. 제III군에서도 bilirubin치는 제II군과 비슷하였으나 alkaline phosphatase치는 3~14일까지 776.25±166.27-586.60±155.33 IU/l로 제II군의 약 3배정도 더 증가하였고, 28일 및 42일에는 194.00±21.00 및 188.10±16.02 IU/L로 제II군과 같은 수준이었다.

이러한 제II군 및 제III군의 혈청 bilirubin 및 alkaline phosphatase치 증가는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하였으며(p<0.05), 제II군과 III군사이에는 의의가 없었다. 구리만 투여한 제IV군에서는 혈청 bilirubin과 alkaline phosphatase치가 모두 정상과 비슷하였다. (Table 2).

3. 혈중 구리농도 변동

대조군의 혈중 구리치는 1.83±0.28 μg/ml였으며, 제II군에서는 전실험기간동안 3.09±0.34-4.36±0.14 μg/ml로 증가하였고 제III군에서는 2.95±0.24-5.73±0.23 μg/ml로 증가하였다. 제IV군에서는 3일째에 3.08±0.28 μg/ml로 증가하였다가 점차 감소하여 42일에는 1.73±0.29 μg/ml로 대조군과 같은 수준이었다. 혈중 구리치 변동도 대조군과 비교하면 제IV군의 42

일체만 제외하고는 모두 통계적 의의를 보였으며, 특히 제IV군보다 제II군의 혈중 구리농도가 더 높았다(Table 3).

4. 간조직내 구리함량 변동

대조군 간의 구리함량은 $6.37 \pm 1.13 \mu\text{g/gm wet weight}$ 였던 반면 총수담관 결찰만 시행한 제II군에서는 결찰 3일후에 $4.76 \pm 0.14 \mu\text{g}$ 으로 정상범주였다가 7일에는 $9.14 \pm 1.51 \mu\text{g}$ 으로 증가하기 시작하여 28일과 42일에는 각각 28.78 ± 0.78 및 $38.35 \pm 3.27 \mu\text{g}$ 으로 증가하였다. 구리만 투여한 제IV군에서는 도살시기에 관계없이 대부분의 경우 $55.05 \pm 2.57 - 65.97 \pm 15.07 \mu\text{g}$ 이었으며 총수담관 결찰후 구리를 투여한 제III군에서는 3일에 $74.62 \pm 14.22 \mu\text{g}$ 이었다가 14~42일에는 $171.19 \pm 17.15 - 181.46 \pm 19.36 \mu\text{g}$ 범위로 증가하였다.

제II군의 3일째를 제외한 전 실험군의 간조직내 구리함량은 전 실험기간에 걸쳐 대조군보다 의의있게 높았으며, 특히 제II군보다 제IV군에서 더 높았다(Table 3).

5. 간 및 총수담관의 육안적 변화

총수담관을 결찰하였던 제II 및 제III군에서는 3일째에 이미 결찰상부의 총수담관이 심하게 확장되고 연황색 내지 담황색의 담즙으로 충만되었으며, 7~14일에도 쏘세지모양, 난형 또는 주머니와 같은 모양을 취하였고 낭벽이 몹시 얇아져서 쉽게 파열되었다. 이러한 총수담관의 낭성변화는 대체로 시간경과에 비례하여 28일과 42일에는 직경이 4cm이상되는 경우가 많았고 그 내용물은 점차 담록색으로 변하였다.

간은 제II 및 제III군의 경우 3일 또는 7일째에 이미 비대되고 대조군보다 창백해지면서 흔히 담즙으로 착색된 괴사소견을 보였고 가끔 괴사 주변부가 충혈되어 있었다. 제7일 이후에는 간 언저리의 둔화와 표면의 과립상을 보이기 시작하였고 점차 단단해졌으며, 특히 14일후에는 간엽들이 서로 유착되어 간의 육안적인 구조가 변형된 경우가 많았다. 그러나 28일 이후에는 괴사가 거의 없었다. 이러한 간의 변화는 대체로 총수담관 결찰 후 구리를 투여한 제III군에서 좀 더 심하였다. 구리만 투여한 제IV군에서는 실험 14일째부터 간 언저리가 둔화되기 시작하였고 간엽들이 서로 유착되어 다소의 간구조 변형을 초래하였으나 간표면은 평활하였고 육안적인 괴사소견도 없었으며 색조도 정상이었다.

6. 간의 광학현미경적 소견

1) Hematoxylin-eosin 염색 및 trichrome 염색소

견 : 대조군에서는 각 문맥역에 1~2개의 소엽간 담관이 있으며 담관상피세포의 핵은 난원형 또는 방추형이고 핵소체는 잘 보이지 않았다. 또한 간소엽에 인접한 소담관의 상피세포도 담관상피와 같았다. 제II군의 변화를 보면 3일째에는 문맥역의 가장자리에 소엽간 담관 상피세포보다 핵이 둥글고 크며 세포질이 풍부한 그리고 가끔 핵분열상을 보이는 난원형세포들이 출현하여 매우 작은 내강을 가진 소담관구조를 형성하며, 가끔 이러한 신생소담관 구조는 간소엽을 부분적으로 침습하고 있었다. 신생소담관 세포들은 간세포보다는 세포질이 적고 창백하며 핵질은 간세포보다 섬세하고 핵소체도 덜 뚜렷하였다. 기존의 소엽간 담관은 중등도로 확장되었으나 그 상피는 정상과 같았다. 문맥역이나 간소엽내에서 섬유화는 볼 수 없었으며, 간소엽에서 Kupffer 세포의 증식이 관찰되었으나 담즙 울체는 뚜렷하지 않았다. 제7일째 간은 3일째와 대체적으로 같으나 소엽간 담관의 수가 증가하고 신생소담관의 증식과 이들의 간소엽 침습으로 말미암아 문맥역이 불규칙하게 다소 확장되었다. 간세포와 신생소담관세포의 핵분열상, Kupffer 세포의 증식등도 3일째와 비슷하였으며, 섬유조직증식은 여전히 경미하였다.

제14일째에는 신생소담관의 증식이 더욱 진행하여 문맥역을 채우고 간소엽속으로 깊숙히 침습하여 간세포를 대체하면서 소엽중심부 또는 인근 문맥역으로 연결되었으며, 이러한 신생소담관 증식은 소수의 만성염증세포 침윤을 동반하나 섬유조직증식은 극히 적었으며 담즙울체도 볼 수 없었다. 신생소담관세포의 증식이 진행되는 첨단부에는 가끔 내강이 분명하지 않은 곳도 있었다. 제28일째에는 소담관 증식이 14일째보다 심하여 간소엽이 신생소담관에 의하여 나뉘어졌으며 증식된 소담관 중 오래된 것의 내강은 다소 확장된 것도 보였다. 신생소담관 상피세포들의 세포질은 아직 창백하며 작고 핵도 작아서 기존의 담관상피와 비슷하였다. 제42일째에는 신생소담관이 간소엽의 대부분을 차지하고 있었으며(사진 1) 소담관 상피세포의 모양도 소엽간 담관상피와 가까웠다.

제III군의 H-E 및 trichrome 염색 소견은 제II군과 거의 같았다(사진 2).

제IV군의 변화로서는 3일째에 중심정맥 주변 간세포

Table 4. Hepatocellular copper and copper binding protein demonstrated by rhodanine and Victoria blue stains

		3d	7d	14d	28d	42d
I	Rhodanine	—	—	—	—	—
	Victoria blue	—	—	—	—	—
II	Rhodanine	—	±	—	±	+
	Victoria blue	—	—	—	—	—
III	Rhodanine	±	± - +	±	++ - +++	+ - +++
	Victoria blue	—	±	—	++	± - +
IV	Rhodanine	± - +	± - ++	+	+ - ++	+ - ++
	Victoria blue	—	—	—	+ - ++	+++

— : absent, ± : equivocal, + : few, ++ : many, +++ : Numerous

의 경한 혼탁종창과 Kupffer 세포의 증식을 볼 수 있었으며, 제 7일 이후에는 간세포들이 대조군과 유사하나 Kupffer 세포의 증식은 42일까지 지속되었다. 문맥역의 담관과 소담관은 H-E 염색상 아무런 변화도 보이지 않았으며 담즙울체도 없었다.

2) Rhodanine 염색 및 Victoria blue 염색소견 : Rhodanine 염색과 Victoria blue 염색으로 조직내의 구리 및 구리결합단백을 관찰할 수 있었다. 조직내의 구리와 구리결합단백은 모두 간세포의 세포질내에서 작은 과립으로 발견되었다. 실험군간의 차이를 도살 시기별로 요약하면 Table 4와 같다.

총수담관 결찰후 구리를 투여 하였던 제III군에서는 구리 또는 구리결합단백이 문맥역 주위의 간세포에 먼저 출현하여 실험기간이 길수록 점차 간소엽 중앙으로 퍼졌으며(사진 3) 28일과 42일째에는 중심정맥주변 간세포에서도 소수의 과립이 관찰되었다. 반면에 구리만 투여 하였던 제IV군에서는 구리 또는 구리결합단백이 중심정맥 주변부 간세포에 먼저 출현하여(사진 4 및 5) 간소엽 가장자리로 퍼지는 경향을 보였다. 모든 실험군에서 구리축적이 없으면서 구리결합단백만 출현하는 예는 하나도 없었다.

고 찰

구리는 조혈작용, 에너지대사등의 생리작용에 필수적인 중금속이며 간장은 구리대사에 있어서 중추적 역할을 한다. 간세포에 섭취된 구리의 대부분은 세포액내의 구리결합 단백질과 결합하고^{5,6)}, 나머지는 구리함유 효소의

합성에 참여하거나 apoceruloplasmin과 결합하여 ceruloplasmin이 된다⁷⁾. 간세포액내의 구리결합단백에는 다량의 thiol을 함유한 metallothionein(MT)과 L-6-D가 있으며, 이외에도 쥐에서는 copperchelatin이 알려져 있다. Victoria blue 염색은 간조직내의 HBsAg, lipofuscin, 탄력섬유등과 같이 sulfhydryl기를 함유한 물질을 염색하기 때문에 MT나 L-6-D와 같이 thiol이 풍부한 간세포액내 구리결합단백의 존재를 파악하는데 많은 도움이 된다. 본 연구결과 Victoria blue 염색과 조직내 구리를 증명하는 rhodanine 염색¹⁹⁾에서 양성입자의 출현부위가 일치한 것으로 보아 Victoria blue 양성입자들은 thiol 함유 구리결합단백임이 확실하며, 이러한 구리결합단백은 구리-구리결합단백 복합체로 존재함을 의미한다고 생각된다²⁰⁾.

간으로부터의 구리배설은 ceruloplasmin 상태로서 혈중으로 배설되는 기전과 리소솜을 통한 담관으로의 배설기전이 있으며²¹⁾, 담관을 통한 배설시에는 장에서의 재흡수를 억제하는 특수운반체와 결합되어 배설된다²²⁾. 구리에 의한 간손상에는 사람의 Wilson 병과 Bedlington terrier²³⁾ 및 West Highland White terrier²⁴⁾에서 보는 것과 같이 유전적인 구리대사 장애에 의한 것과 사람의 Indian childhood cirrhosis와 양²⁵⁾에서 보는 것과 같은 후천적 구리부하에 의한 것이 있으며, 그 외에도 primary biliary cirrhosis 나 담도 폐쇄시에 혈중 ceruloplasmin의 증가와 함께 간에 구리가 축적되는 것을 볼 수 있다¹³⁾.

Wilson 병에서 간에 구리가 축적되는 기전에 대하여는 아직 정설이 없다. 간세포의 apoceruloplasmin 합

성에 결함이 있어서 구리의 혈중 배설이 잘 이루어지지 않기 때문이라는 견해와 리소솜에서 모세담관으로 배설되기에 적합하도록 구리가 분리되지 못하기 때문이라는 주장이 있다⁷⁾. 또한 중금속 결합단백인 MT 합성의 증가^{26,27)}가 기본적인 결함이라는 학설이 있다. MT는 중금속과의 친화력이 강하기 때문에 구리-MT 복합체가 형성되고 상대적으로 ceruloplasmin 합성이 감소하며, 이 구리-MT 복합체는 비용성이므로 모세담관으로의 배설에 부적합하다는 것이다. 정상태아의 간에는 MT가 구리결합단백의 대부분을 차지하여 성인보다 많고 구리 함유 효소는 적어 Wilson 병에서와 유사함으로 Wilson 병은 태아형 구리대사가 성인형으로 전환되지 못하는 유전적 결함이라는 견해^{28,29)}도 MT의 중요성을 지적한 것이라 사료된다.

본 연구에서는 실험동물에 구리를 단독으로 투여하거나 담도폐쇄후 구리를 투여하여 후천적인 구리 축적시 일어나는 간의 변화를 검색하였던 바 구리단독 투여시보다 담도폐쇄후 구리투여시 훨씬 많은 양의 구리가 간에 축적되는 것을 확인하였다. 구리 축적시에 간세포들은 어떤 밝혀지지 않은 기전에 의하여 적응할 수도 있고³⁰⁾ 세포손상이 초래될 수도 있다. 구리가 간독성을 일으키는지의 여부는 동물의 종류에 따라 다르며, 쥐는 구리축적에 적응하는 실험동물의 하나로서 구리단독 투여만으로는 간손상을 일으킬 수 없다는 것이 여러 학자들에 의해 밝혀진 바 있다^{30~32)}. 본 연구에서 구리만 투여하였던 경우 전 실험기간동안 간조직내 구리가 거의 같은 정도로 유지되고 혈중 구리 농도도 지속적인 증가를 보이지 않았던 것으로 보아 담관으로의 배설 증가가 구리축적에 대한 쥐의 중요 적응기전이라고 생각되었다. 총수담관 결찰후 구리투여시에 혈중 구리 농도도 증가하지만 간내 구리함량이 더 큰 폭으로 증가한 것도 담관배설의 중요성을 나타내는 증거로 사료된다.

구리축적에 의하여 간세포손상이 초래될 때에도 그러한 세포손상의 기전이 무엇인지는 아직 논란의 대상이 되고 있다. 일찌기 Goldfisher³³⁾는 동물에 구리를 투여해도 간손상이 초래되지 않아서 구리축적 자체가 세포손상을 일으키는 것이 아니고 리소솜의 손상이 관여할 것이라고 하였으며, 그후 최근까지도 리소솜의 파괴가 구리의 간독성에 중요하다는 의견이 지배적이다^{3,34)}. 특히 최³⁵⁾는 흰쥐에 리소솜의 불안정 요소인 비타민 A를 구리와 동시 투여할때 간손상이 초래된다고 보고한 바 있

으나 Haywood 등³²⁾은 구리의 간독성에 리소솜의 역할이 중요하지 않다고 주장하였다. 구리-구리결합 단백질 복합체의 존재하에서도 세포손상이 없었던 본 연구 결과로 보아 세포손상이 구리-MT 복합체로부터 자유구리가 유리되기 때문일 가능성도 별로 없다. 본 연구결과 구리결합단백이 상당량의 구리가 축적된 경우에만 출현한 것은 간세포에 섭취된 구리가 먼저 ceruloplasmin 형성에 관여하고 구리량이 이를 초과할때 비로소 구리-구리결합 단백질복합체가 형성됨을 의미하는 소견으로 간주된다. 그러므로 과량의 구리가 sulfhydryl기를 함유하는 구리결합단백의 중합을 촉진함으로 말미암아³⁶⁾ 상대적으로 tubulin의 중합이 억제되고³⁷⁾ glutathione이 소모되는 것이 세포손상의 기전일 가능성을 배제할 수 없다.

사람의 Wilson 병이나 담도폐쇄시 구리와 구리결합단백은 문맥역 주변부 간세포에 축적되며, 본 연구에서도 총수담관을 결찰하고 구리를 투여한 경우에는 문맥역 주변부 간세포에서부터 축적되었다. 그러나 구리만 투여한 경우에는 구리와 구리결합단백이 예외없이 간소엽 중심부 간세포들에 먼저 축적되었다. 담도와 문맥역 주변부 간세포의 apoceruloplasmin 합성기능이 정상인 상태에서 구리가 부하될때 구리와 구리결합단백이 주로 중심 정맥 주변부 간세포에 침착한 것은 정상적으로 중심 정맥 주변부 간세포들에 apoceruloplasmin 합성이 적어서 구리가 구리결합단백과 복합체를 형성하고 혈중으로의 배설이 지연되기 때문이라고 사료되며, 반대로 총수담관 결찰시에 문맥역 주변부 간세포에 먼저 축적되는 것은 보상작용으로 간소엽 중심부 간세포에서 apoceruloplasmin 합성이 증가한 것을 암시한다고 하겠다. 한편 Wilson 병때 구리와 구리결합단백이 문맥역 주변부 간세포에 침착하는 것은 문맥역 주변부 간세포에 비정상적으로 apoceruloplasmin 합성이 적어서 간세포에 섭취된 구리가 비용성이고 배설에 부적합한 구리-구리결합단백 복합체를 형성한 결과일런지 모른다.

사람에서는 장기간 간의 담도가 폐쇄되면 간문맥역의 소엽간 담관 주변에 섬유화가 초래되고 소담관이 증식되며, 폐쇄 상태가 오래되면 담도 폐쇄성 간 경변증이 발생할 수 있다. 흰쥐를 실험동물로 사용한 경우에서도 Kountouras¹⁸⁾는 총수담관결찰 15일만에 간경변증이 발생하였다고 보고하였고 Shibuya¹⁷⁾도 담도결찰시 소엽간 소담관의 증식과 더불어 간 경변증이 초래된다고 발표하였다. 그러나 오래전 Cameron 및 Oakley³⁸⁾와

Cameron 및 Hasan³⁹⁾은 소엽간 소담관 증식이 점차 진행되고 증식된 소담관들이 간소엽내로 침습하여 결국에는 소엽의 대부분이 담관으로 대체되지만 결찰 후 9주까지도 섬유화는 극히 적었으며, 상행성 감염의 유무가 섬유화 및 간경변증 발생 여부를 좌우한다고 지적한 바 있다.

본 연구에서도 총수담관 결찰시 소담관 증식과 증식된 소담관의 지지에 필요한 이상의 섬유화는 초래되지 않았다. 소담관이 심하게 증식하여 간소엽을 점진적으로 대체함에도 불구하고 섬유화가 거의 없는 것으로 보아 총수담관을 상당기간 결찰하였다가 다시 풀면 간소엽이 정상으로 환원될 가능성이 있으며 이에 관한 후속 연구가 기대된다.

결 론

총수담관 결찰이 간의 형태 및 구리대사에 미치는 영향을 구명하고자 흰쥐에 구리를 장기간 단독 투여하거나 총수담관 결찰 후 구리를 투여하여 시기별로 도살한 다음 혈중 구리농도, 간조직내 구리함량, 간조직의 광학현미경적 변화, 그리고 rhodanine 염색과 Victoria blue 염색에 의한 간조직내 구리 및 구리결합단백의 분포를 조사한 바 그 결과를 요약하면 아래와 같다.

1) 총수담관을 결찰하면 소담관이 증식하여 문맥역을 확장시키고 간소엽내로 침습하여 간소엽이 작게 나뉘어졌으나 신생소담관의 지지에 필요한 이상의 섬유화는 초래되지 않았다.

2) 구리단독 투여와 총수담관 결찰 후 투여는 혈중 구리와 간조직내 구리함량을 증가시켰으며, 특히 결찰 후 투여군에서 훨씬 더 증가하였다.

3) 구리 투여만으로는 전 실험기간동안 간세포 괴사가 초래되지 않았다.

4) 간조직내 구리분포에 있어서 총수담관 결찰 후 구리투여군에서는 구리와 구리결합단백이 문맥역 주변 간세포에 침착한 반면 구리단독 투여군에서는 주로 중심정맥 주변 간세포에 침착하였다.

이상의 결과를 종합하면 총수담관 결찰만으로는 간 경변증이 초래되지 않으며, 총수담관 결찰후 구리를 추가 투여할 때 구리의 분포에 뚜렷한 차이가 초래되는 것으로 보아 총수담관 결찰은 구리대사에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Ulmer DD: *Trace elements. N Engl J Med* 297:318-321, 1977
- 2) Batt RM, Mann LC: *Evaluation of preformed percoll and reorienting sucrose density gradient centrifugation for the analytical subcellular fragmentation of dog liver. Res Vet Sci* 34:273-279, 1983
- 3) Sternlieb I: *Copper and the liver. Gastroenterology* 78:1616-1628, 1980
- 4) Sternlieb I, Scheinberg IH: *The role of radiocopper in the diagnosis of Wilson's disease. Gastroenterology* 77:138-142, 1979
- 5) Evans GW, Wolenetz ML, Grace CI: *Copper-binding proteins in the neonatal and adult rat liver soluble fraction. Nutr Rep Int* 12:261, 1975
- 6) Terao T, Owen CA Jr: *Copper in supernatant fractions of various tissue. Studies with ⁶⁷Cu. Mayo Clin Proc* 49:376-381, 1974
- 7) Sternlieb I, van den Hamer CJA, Morell AG, Alpert S, Gregoriadis G, Scheinberg IH: *Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). Gastroenterology* 64:99-105, 1973
- 8) Frommer DJ: *Defective biliary excretion of copper in Wilson's disease. Gut* 15:125-129, 1974
- 9) Van Berge Henegouwen GP, Tangedahl TN, Hofmann AF, Northfield TC, LaRusso NF, McCall JT: *Biliary excretion of copper in healthy man. Quantitation by an intestinal perfusion technique. Gastroenterology* 72:1228-1231, 1977
- 10) Tanner MS, Portmann B, Mowat AP: *Increased hepatic copper concentration in Indian childhood cirrhosis. Lancet* i:1203-1205, 1979
- 11) Benson GD: *Hepatic copper accumulation in primary biliary cirrhosis. Yale J Biol Med* 52:83-88, 1979
- 12) Jain S, Scheuer PJ, Samourian S, McGee JO'D, Sherlock S: *A controlled trial of D-penicillamine therapy in primary biliary cirrhosis. Lancet* i:831-834, 1977
- 13) Ritland S, Steinnes E, Skrede S: *Hepatic copper content, urinary copper excretion and serum ceruloplasmin in liver disease. Scand J Gastroenterol* 12:81-88, 1977
- 14) Chan CH, Steer CJ, Vergalla J: *Alpha 1-antitrypsin deficiency with cirrhosis associated with the protease*

- inhibitor phenotype* SZ. *Am J Med* 65:978-986, 1978
- 15) Kaplinsky C, Sternlieb I, Javitt N: *Familial cholestatic cirrhosis as associated with Kayser-Fleischer rings*. *Pediatrics* 65:782-788, 1980
- 16) Smallwood RA: *Other liver disease associated with increased liver copper concentration*. In: *Metals and the liver*. Edited by LW Powell, New York, Marcel Dekker, 1978, p 313
- 17) Shibuya H: *Experimental study on rat hepatic injury by copper: Effect of copper overload on the cholestatic liver induced by bile duct ligation*. *Hokkaido Med J* 62:434-441, 1987
- 18) Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ: *Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat*. *Br J Exp Pathol* 65:305-311, 1984
- 19) Fuentealba I, Haywood S, Trafford J: *Evaluation of histochemical methods for the detection of copper overload in the liver of the rat*. *Liver* 7:277-282, 1987
- 20) Salaspuro M, Sipponen P: *Demonstration of an intracellular copper binding protein by orcein staining in longstanding cholestatic liver diseases*. *Gut* 17:787-790, 1976
- 21) Evans J, Newman S, Sherlock S: *Liver copper levels in intrahepatic cholestasis of childhood*. *Gastroenterology* 75:875-878, 1978
- 22) O'Reilly S, Weber PM, Oswald M: *Abnormalities of the physiology of copper in Wilson's disease. III The excretion of copper*. *Arch Neurol* 25:28-32, 1971
- 23) Hardy RM, Stevens JB, Stowe CM: *Chronic progressive hepatitis in Bedlington terriers associated with elevated copper concentration*. *Minn Vet* 15:13, 1975
- 24) Thornburg LP, Shaw D, Dolan M: *Hereditary copper toxicosis in West Highland White Terriers*. *Vet Pathol* 23:148-154, 1986
- 25) Kumaratilake JS: *Pathogenesis of chronic copper poisoning in sheep and the effects of thiomolybdate*. Ph D Thesis, Murdoch University, Western Australia, 1984, pp361-399
- 26) Editorial: *Wilson's disease and copper-associated protein*. *Lancet* i:644-646, 1981
- 27) Evans GW, Dubois RS, Hambidge KM: *Wilson's disease: Identification of an abnormal copper-binding protein*. *Science* 181:1175-1176, 1973
- 28) Epstein O, Sherlock S: *Is Wilson's disease caused by a controller gene mutation resulting in perpetuation of the fetal mode of copper metabolism into childhood?* *Lancet* i:303-305, 1981
- 29) Srai SK, Burroughs AK, Wood B, Epstein O: *The ontogeny of liver copper metabolism in the guinea pig: clues to the etiology of Wilson's disease*. *Hepatology* 6:427-432, 1986
- 30) Fuentealba I, Haywood S: *Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. I Ultrastructural changes in the liver*. *Liver* 8:372-380, 1988
- 31) Haywood S: *Copper toxicosis and tolerance in the rat. I. changes in copper content of liver and kidney*. *J Pathol* 145:149-158, 1985
- 32) Haywood S, Loughran M, Batt RM: *Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. Intracellular localization of copper in the liver and kidney*. *Exp Molec Pathol* 43:209-219, 1985
- 33) Goldfisher S: *Demonstration of copper and acid phosphatase activity in hepatocyte lysosomes in experimental copper toxicity*. *Nature* 215:74-75, 1967
- 34) Helman RG, Adams LG, Pierce KR, Bridges CH, Bailey EM: *The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity: Morphological studies*. *J Comp Pathol* 95:25-35, 1985
- 35) 최홍열 : 황산구리투여 백서에 비타민 A 및 부신적출이 미치는 영향에 관한 형태학적 연구. 연세의대 논문집 5:343-358, 1972
- 36) Wallin M, Larsson H, Edstrom A: *Tubulin sulphhydryl groups and polymerization in vitro. Effects of di- and trivalent cations*. *Exp Cell Res* 107:219-225, 1977
- 37) Roth LE, Shigenaka T: *Microtubules in the heliozoan axopodium. II. Rapid degradation by cupric and nickelous ions*. *J Ultrastruct Res* 31:356-374, 1970
- 38) Cameron GR, Oakley CL: *Ligation of the common bile duct*. *J Pathol Bacteriol* 35:769-798, 1932
- 39) Cameron GR, Hasan SM: *Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction*. *J Pathol Bacteriol* 75:333-349, 1958
- 40) Johnstone JMS, Lee EG: *A quantitative assessment of the structural changes in the rat's liver following obstruction of the common bile duct*. *Br J Exp Pathol* 57:85-94, 1976

— Abstract —

The Effect of Common Bile Duct Ligation on Liver Morphology and Copper Metabolism in Rat

Kyoung Sook Kim, M.D., Chanil Park, M.D.
Jang Whan Cho*, M.D., In Joon Choi, M.D.
and Yoo Bock Lee, M.D.

Department of Pathology and Surgery,
Yonsei University College of Medicine*

To clarify the effect of biliary obliteration on copper metabolism of rat liver and on the hepatic morphology, 0.5% cuppuric sulfate was administered intraperitoneally for 42 days following ligation of the common bile duct (CBD) of Sprague-Dawley rats. The blood copper concentration, the hepatic copper content and the accumulation patterns of copper and copper binding protein in the liver were examined and compared with those of the simple CBD ligation group and the simple copper overloaded group. CBD ligation induced marked prolifera-

tion of bile ductular structures which, after expanding the portal tracts, invaded and divided the hepatic lobules. There was, however, no excess fibrosis beyond what needed to support the new ductules. The blood copper concentration and the hepatic copper content were increased by copper overload with or without CBD ligation, particularly in cases with CBD ligation. Liver cell necrosis did not occur by the overloaded copper alone in rats. The hepatic copper and copper binding protein were accumulated at periportal liver cells in the group of copper overload after CBD ligation, whereas they began to appear at perivenular hepatocytes in the simple copper overloaded group. In conclusion, it is suggested that CBD ligation does not induce excess fibrosis or liver cirrhosis in rat as far as during our experimental period, but affect significantly on copper metabolism by intrahepatic redistribution of the copper and the copper binding proteins.

Key Words: Common bile duct ligation, Copper metabolism, Biliary cirrhosis, Rhodanine stain, Copper binding protein

Legend for Figures

- Fig. 1.** Microphotograph of the rat liver at 42 days after common bile duct ligation (Group II). Most of the hepatic lobule is replaced by the proliferating ductules. Nuclei of the ductular epithelial cells are vesicular and smaller than those of the hepatocytes. Hematoxylin-eosin stain, $\times 200$.
- Fig. 2.** Microphotograph of the rat liver after the administration of copper for 42 days following common bile duct ligation (Group III). Proliferating ductules invade and replace the hepatic lobule without accompanying fibrosis beyond what is needed for supporting themselves. Masson's trichrome stain, $\times 200$.
- Fig. 3.** Rhodanine stained section of the rat liver after the administration of copper for 28 days following common bile duct ligation (Group III). The hepatocytes adjacent to proliferating ductules contain numerous copper granules (arrow). Rhodanine light-green stain, $\times 200$.
- Fig. 4.** Victoria blue stained section of the rat liver after the administration of copper for 28 days (Group IV). The copper binding protein granules are localized in the perivenular hepatocytes. Victoria blue stain, $\times 200$.
- Fig. 5.** Rhodanine stained section of the rat liver after the administration of copper for 42 days (Group IV). The copper granules are localized in the perivenular hepatocytes. Rhodanine lightgreen stain, $\times 200$.

