

## 실험적 간경변증에서 간내 미세혈관계의 변화

경북대학교 의과대학 병리학교실

이상한 · 김지화 · 김익수 · 채종민

### Morphological Changes of Hepatic Microcirculation in N-diethylnitrosamine Induced Cirrhotic Rat Liver

Sang Han Lee, M.D., Ji Hwa Kim, M.D., Ik Su Kim, M.D. and Jong Min Chae, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine

Morphological changes of hepatic microcirculation, especially in the peribiliary plexus, in cirrhotic livers of rats induced by repeated intraperitoneal injections of N-diethylnitrosamine(DEN) (100 mg/kg/week) were studied by scanning electron microscopy. Control rats were treated with saline. The livers were perfused with saline and injected with methyl-methacrylated resin (Mercox CL-2B) through the thoracic aorta. Diffuse nodular changes mimicking human cirrhosis were seen in the livers six weeks after injections of DEN. The cirrhotic livers showed an increase of vascular channels composed mainly of venous branches around the regenerating nodules and increased arterioloportal anastomoses. Peribiliary plexi of the cirrhotic livers had more vessels than those of the controls. Many dilated veins and ramificating portal vein branches were also present. Direct connections between peribiliary plexi and sinusoids or between peribiliary plexi and portal veins were increased in the cirrhotic liver. These results suggest that the peribiliary plexi in experimentally induced cirrhotic liver might play a role in a collateral circulation under a state of portal hypertension. (**Korean J Pathol 1995; 29: 197~204**)

**Key Words:** N-diethylnitrosamine, Cirrhosis, Microcirculation, Peribiliary plexus, Scanning electron microscopy

### 서 론

간경변증은 만성 간질환의 말기 병변으로 그 원인, 발생기전 및 형태학적 소견이 매우 다양하다. 세계보건기구는 간경변증을 지속적이고 반복적인 미만성 간손상과 그 결과로 인한 섬유화 및 간세포의 재생결절이 형성되는 것으로 정의하고 있다<sup>1)</sup>. 간경변증의 원인으로서는 우리나라에 많은 바이러스성 간염을 포함하여 만성 과다 음주, 간내외 담도 폐쇄성 질환 및 만성 활

동성 간염을 일으킬 수 있는 약물 및 독소 등 여러 가지가 있다. 그러나 적절한 실험 모델의 개발이 이루어지지 않아 아직까지도 간경변증의 치료나 병태생리학적 측면에 대한 연구는 제한을 받아오고 있다. 한편 간경변증시 기질의 섬유화와 함께 재생결절 형성으로 초래되는 간내 미세혈관계의 변화가 간기능과 밀접한 관계가 있을 것으로 추정된다<sup>2~4)</sup>. 그러나 간경변증에서 혈관계의 변화에 따른 간문맥압 항진이 일어나는 정확한 기전에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않으며 그 중에서도 동맥-문맥간 문합의 변화에 대하여 이견들이 많다. 최근 주사전자현미경을 이용한 미세순환계의 혈관주형술의 개발은 간내 순환계의 미세구조를 연구하는데 상당한 도움이 되고 있다. 이러한 방법을 이용한 미세혈관계의 관찰에서 간경변증의 재생결절 주위에는

접 수: 1994년 9월 12일, 게재승인: 1994년 11월 25일  
주 소: 대구직할시 중구 동인 2가 101, 우편번호 700-422  
경북대학교 의과대학 병리학교실, 이상한

복잡하게 연결된 혈관 통로가 형성된다는 것이 인정되고 있다. Yamamoto등<sup>5)</sup>과 Hirooka등<sup>6)</sup>은 이러한 혈관 통로가 간동맥으로부터 분지하여 이루어진다고 하였으며, 다른 보고<sup>7)</sup>에 의하면 문정맥도 여기에 참여한다고 한다. 담관은 두터운 그물 형태의 혈관으로 둘러싸여 있는데 이를 주위담세총이라고 하며 안쪽의 수입혈관과 바깥쪽의 수출혈관의 두층으로 구성되어 있다. 수출혈관은 동모양혈관이나 종말 문정맥으로 유출된다. 이러한 주위담세총의 정확한 기능은 알 수 없지만 아마도 담즙과 혈액 사이의 용질의 교환이나 담즙 분비 혹은 담즙의 재흡수에 관여하리라고 생각되고 있다<sup>8)</sup>. 간경변증으로 초래된 문맥성 고혈압 환자에서 주위담세총 주변에는 비정상적인 혈관 통로가 형성된다고 하며 이러한 혈관계의 변화가 문맥성 고혈압의 원인과 관계가 있을 것으로 추측되고 있다<sup>9)</sup>. 그러나 재생결절 주위에 만들어지는 비정상적인 혈관 통로의 기능, 형성과정 및 문맥성 고혈압과의 관계등에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

이에 저자들은 N-diethylnitrosamine(DEN)으로 유도된 흰쥐의 간경변증에서 혈관주형술을 이용하여 주위담세총을 포함한 미세혈관계의 형태학적인 변화를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

체중 200 g 정도의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 일정 기간 사육한 후 건강이 양호한 것을 실험에 사용하였다. 간경변증을 유발하기 위해서는 N-diethylnitrosamine(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 사용하였으며 혈관주형제로 methacrylated resin(mercox CL-2B; Dainippon Ink & chemicals, Tokyo)을 사용하였다.

### 2. 방 법

실험은 DEN 100 mg/kg/week을 실험동물의 복강내로 주사하여 6주, 9주 및 12주 관찰 군으로 나누었다. 각 군마다 실험동물은 5마리씩 배정하였다. 대조군에는 생리식염수 0.5 ml를 실험군과 동일한 기간으로 주사하였으며 사용한 동물은 2마리였다.

미세순환계의 혈관주형을 위해서는 Murakami등<sup>10)</sup>과 Haratake등<sup>11)</sup>의 방법을 응용하였다. 최종 주사후 2주간의 회복기를 거친 후 ether마취 하에 복강 및 흉강을 열고 처치하는 동안에 혈액 응고를 방지하기 위하여 heparin 0.3 ml를 심장내로 주사하였다. 흉부 대동맥으로 23 gauge 폴리테틸렌관을 삽입한 후 생리식염수를 주입하여 혈관내의 유동혈을 제거한 다음 0.5% glutaldehyde와 0.5% paraformaldehyde 혼합액을 관류하여 10분간 고정하였다. 혈관주형을 만

들기 위하여는 주사기를 이용하여 0.5 ml/sec의 압력으로 methacrylated resin을 혈관내로 밀어 넣고 대동맥 및 정맥을 절찰하여 실온에서 30분간 방치하였다. 간을 절제한 후 60°C의 증류수에 담구어 완전히 중합이 끝난 것을 확인한 후 조직을 세절하고 60°C의 20% NaOH용액에 담구어 조직을 부식시켰다. 어느 정도 부식이 진행되면 증류수로 세척하고 다시 20% NaOH용액에 담구는 방법으로 조직을 완전히 부식시켰다. 부식이 끝난 혈관주형을 증류수로 세척하고 100%에탄올로 탈수하였다. 탈수한 혈관주형의 절편을 공기중에서 완전히 말린 다음 O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가스로 2일간 증착하였다. 시료를 metal stub에 봉입한 다음 Eiko사 제품인 VX-10A형 ion coater를 사용하여 약 5 nm의 두께로 백금을 증착한 후 Hitachi S-800 냉전계 방사형 주사전자현미경으로 20 kv의 가속전압에서 관찰하였다. 혈관주형의 각 분지들이 동맥, 정맥 및 문정맥 인지를 확인하기 위해서는 더 큰 분지를 따라 가면서 확인하였고 그 기준은 다음과 같다<sup>6)</sup>. 간동맥의 분지는 혈관의 장축을 따라 내피세포의 함입이 뚜렷하며, 내강의 평탄화는 간정맥 분지들에서 더욱 뚜렷하고 문정맥의 분지들은 동모양혈관으로 연결될 때 inlet venule을 가지는 것이 특징적이다. 또한 간정맥의 분지들은 주로 두가닥으로 분지하는 반면 문정맥의 분지들은 세가닥으로 분지하며 그 분지되는 각이 훨씬 더 무디다.

혈관주형 직전 간조직의 일부를 절제하여 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 후 통상적인 방법에 의해 광학현미경적 검사를 함께 시행하였다.

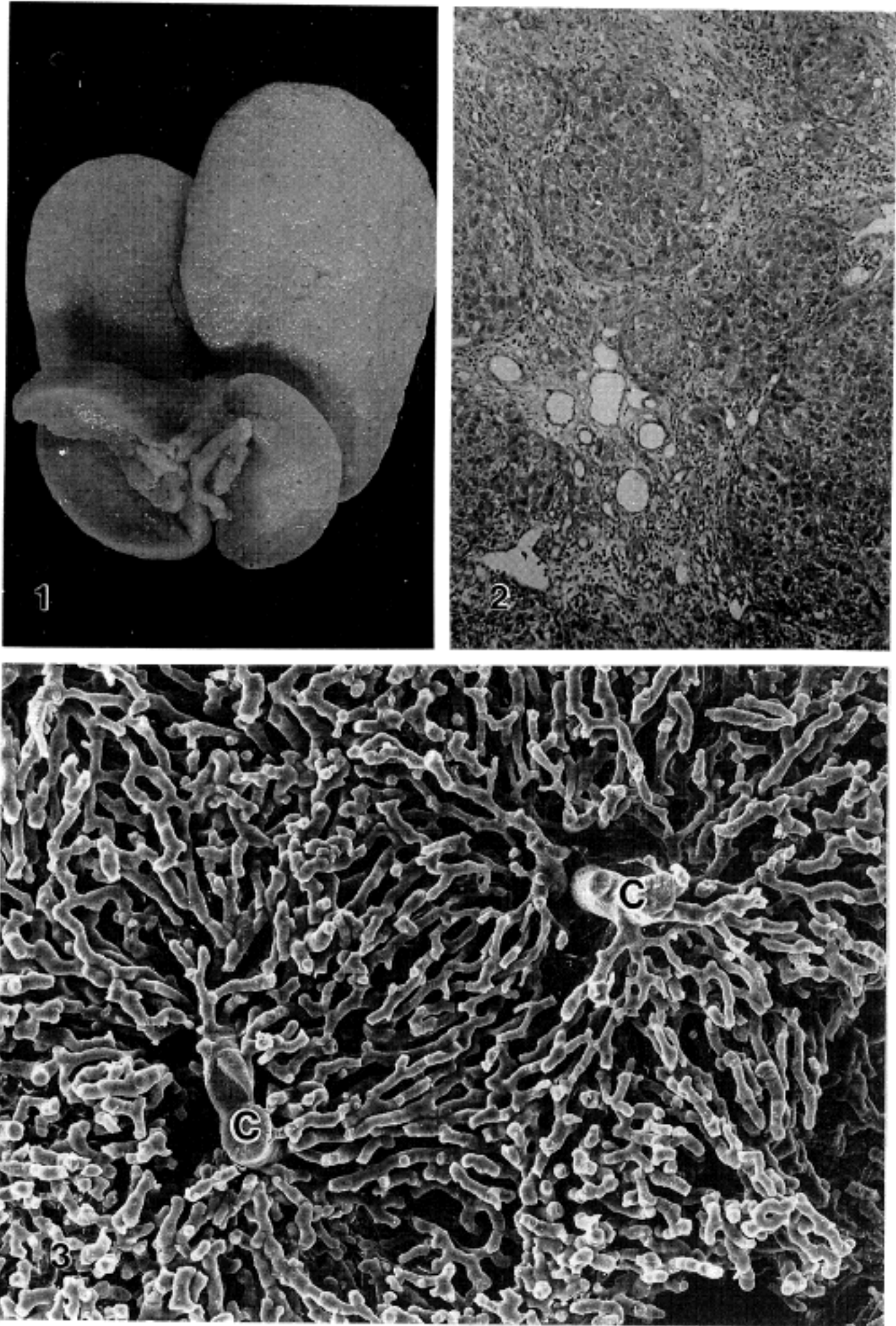
## 성 적

### 1. 육안 및 조직학적 소견

실험군 6주부터 간의 전 표면에서 크고 작은 결절들이 관찰되었으며(Fig. 1). 그 후 점차 결절 형성이 뚜렷하여졌다. 전 실험군에서 북부정맥 및 식도정맥이 중등도로 확장되어 있었고 울혈의 소견을 보였으며, 비장도 커져 문맥성 고혈압 상태를 보여 주었다. 조직학적으로 미만성으로 크고 작은 재생결절이 형성되었고(Fig. 2), 결절 주위에는 만성 염증세포의 침윤이 있었으며 간실질에서는 간세포의 풍선양 변성과 가교상 혹은 조각 괴사가 관찰되었다. 이차적인 담소관의 증식도 있었다. 대조군에서는 간 표면이 평활하였으며 조직학적으로도 특징적인 변화가 없었다. 실험기간중 4~7주에서 3마리가 죽었으며 전 실험군에서 간세포암으로 진단된 예는 없었다.

### 2. 주사전자현미경적 소견

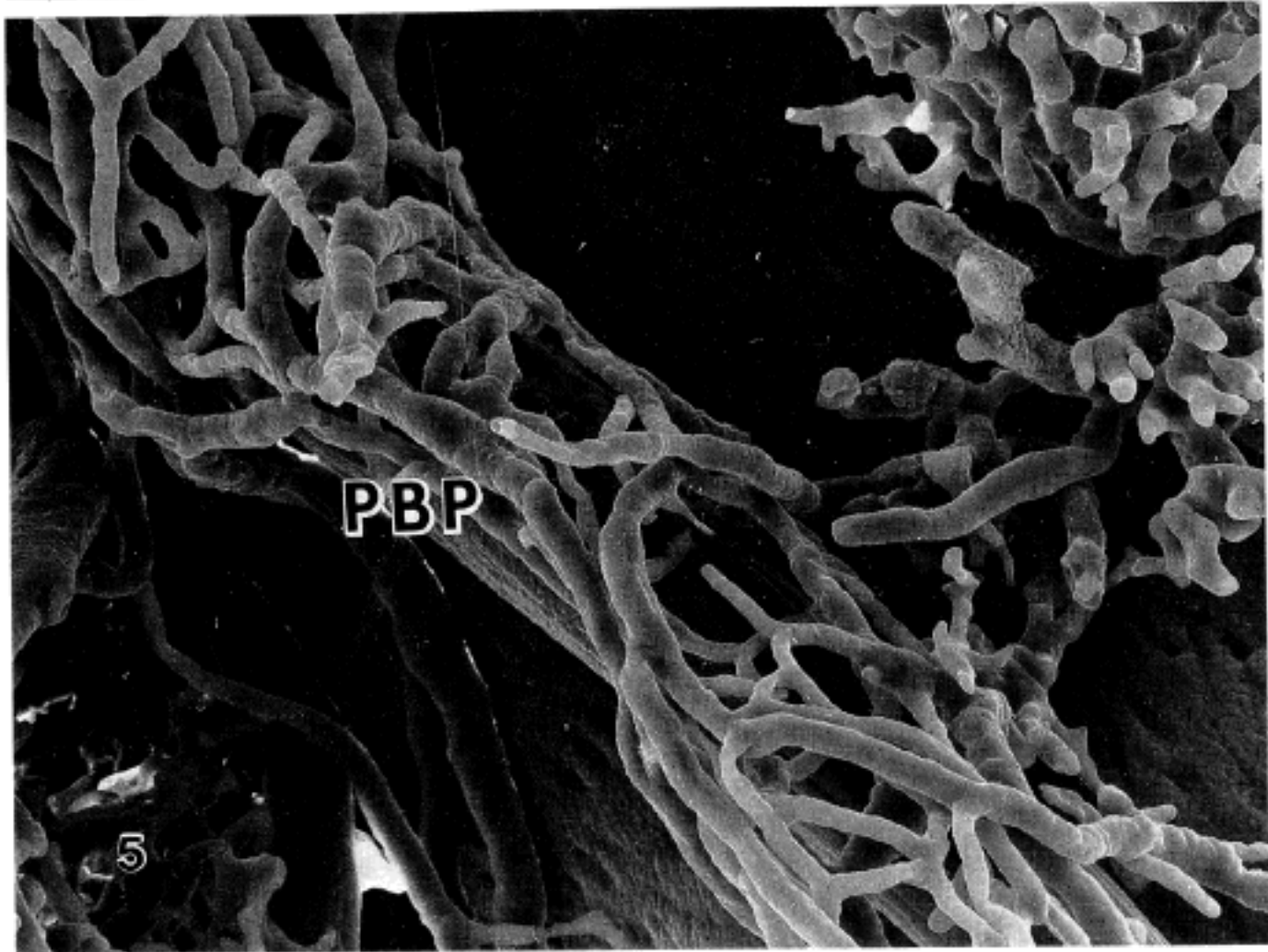
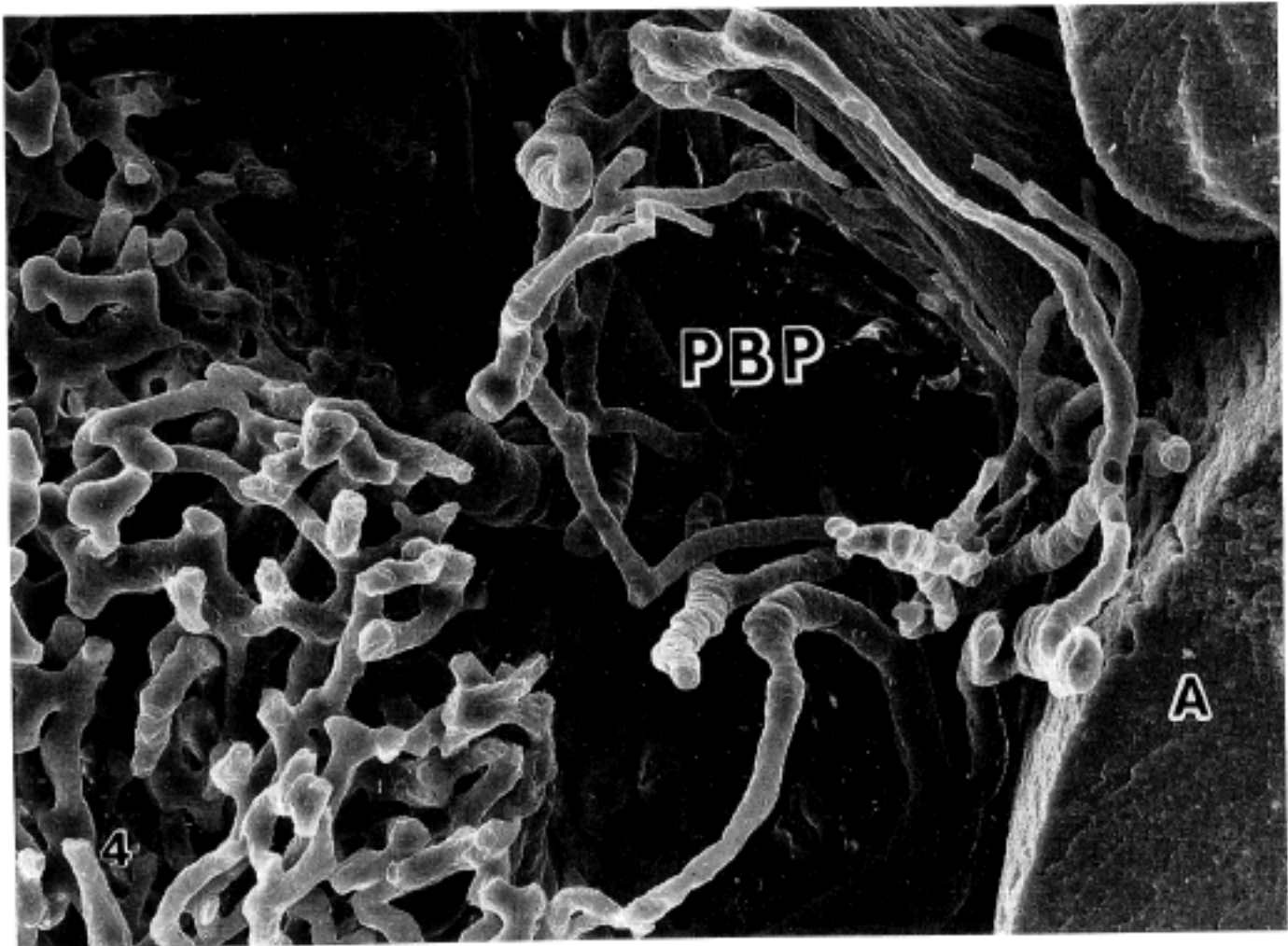
대조군에서는 문정맥과 간동맥이 규칙적인 분지를 가지며 분지가 계속될수록 직경이 줄었고 방사상으로



**Fig. 1.** Gross features of cirrhotic liver of rat induced by administration of N-diethylnitrosamine(DEN) for 6 weeks. Note irregular and nodular appearance of surface due to variable sized nodules.

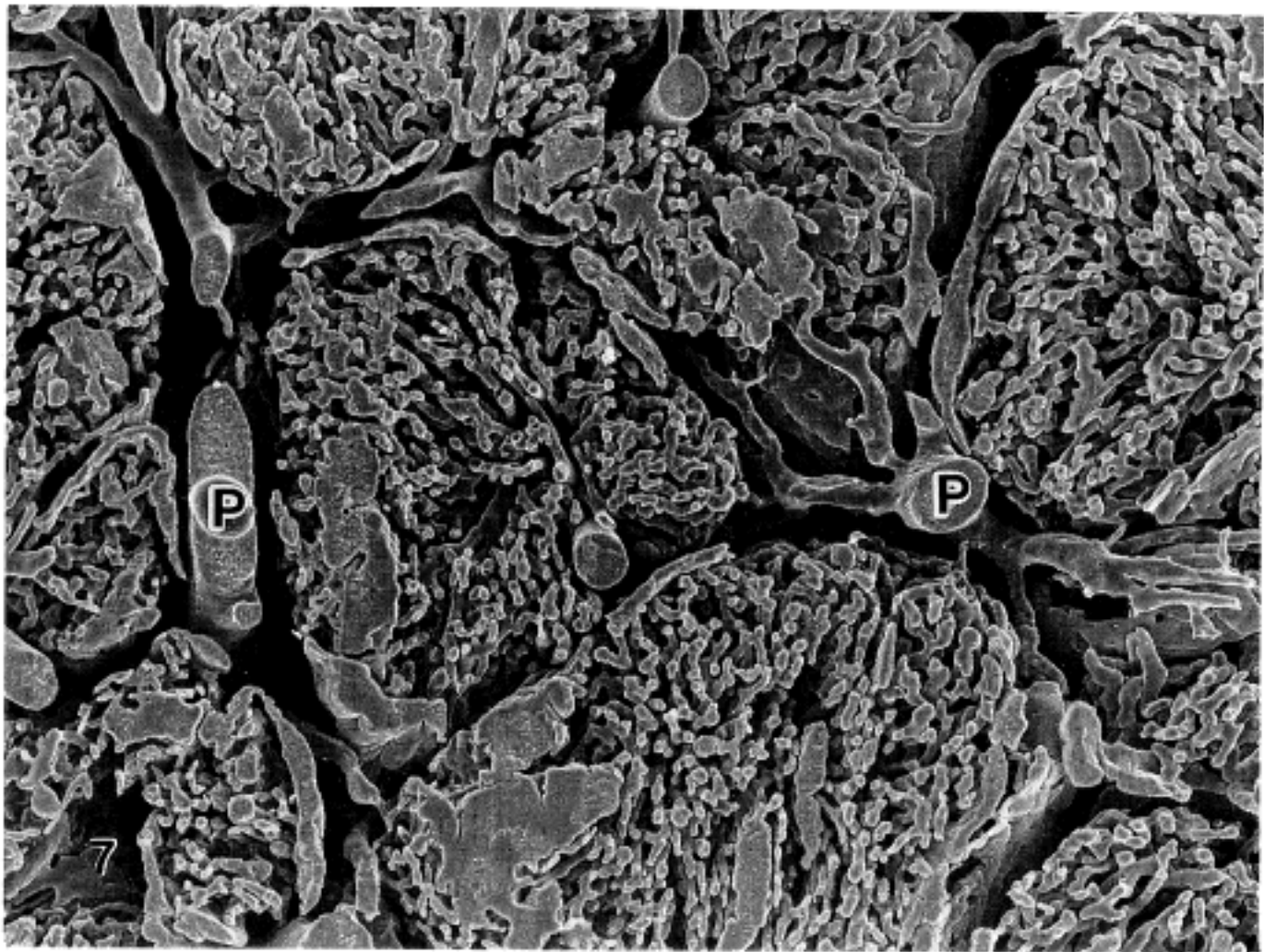
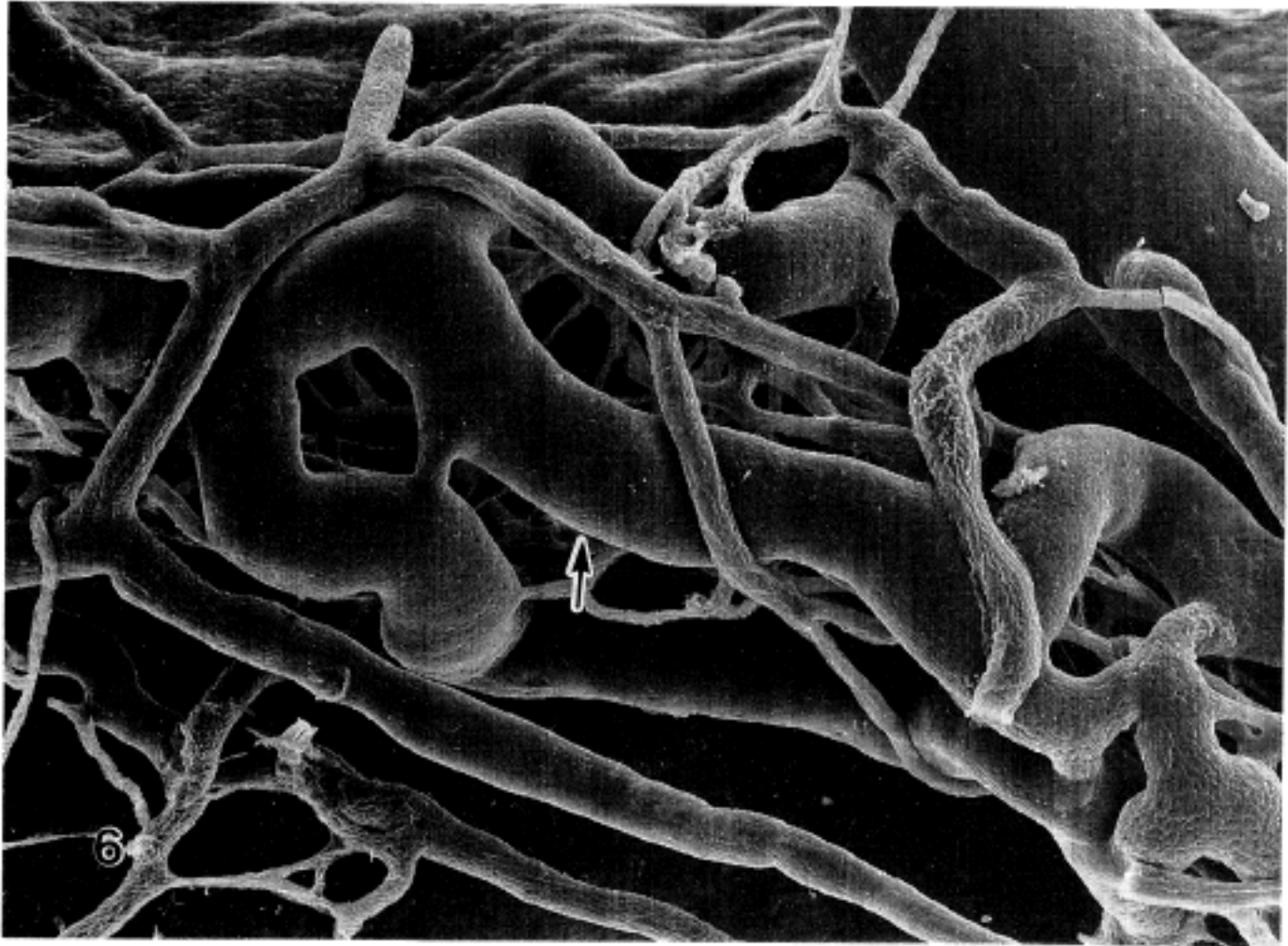
**Fig. 2.** Histologic features of cirrhotic liver of rat induced by DEN for 6 weeks. Note diffuse nodular transformation of hepatic lobules with fibrosis.  $\times 100$ .

**Fig. 3.** Microvascular cast of control rat liver. Note regular and radial ramification of the central vein(C) into the hepatic parenchyme.  $\times 120$ .



**Fig. 4.** Microvascular cast of peribiliary plexus(PBP) in control rat. Occasionally, PBP is a single layer composed of sparse capillary vessels in peripheral portal tract near hepatic artery(A).  $\times 300$ .

**Fig. 5.** Microvascular cast of PBP in rat liver 6 weeks after injection of DEN. PBP is more complicated and increased vascular anastomosis.  $\times 300$ .



**Fig. 6.** Abnormally dilated veins(arrow) in a PBP of DEN 9-week injected group.  $\times 174$ .

**Fig. 7.** Microvascular cast of liver 12 weeks after injection of DNE. Note nodular appearance and irregular ramification of portal veins(P) around the nodules.  $\times 70$ .

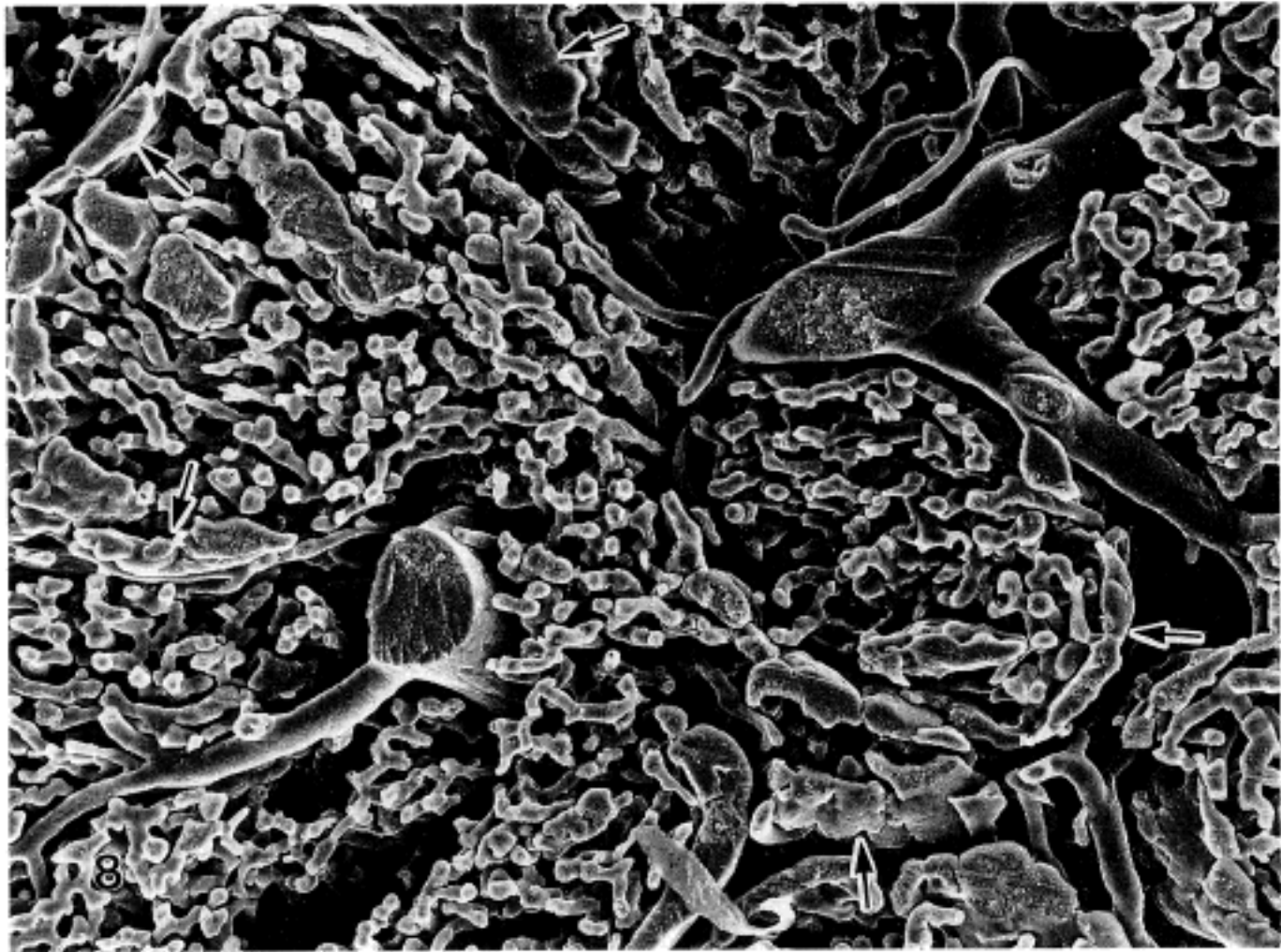


Fig. 8. Abnormal vascular plates(arrow) surround the nodule of DEN 12-week injected group. ×120.

분지되는 경향을 보였다. 동모양혈관들은 규칙적으로 종말간세정맥을 중심으로 방사상으로 배열하여 있었으며, 굵기가 일정하였다(Fig. 3). 문맥역에는 문정맥과 간동맥이 주행하고 있었으며, 주위담세총은 다소 성근한층의 모세혈관으로 구성되어 있었고(Fig. 4) 때로는 주위담세총과 inlet venule 사이 혹은 주위담세총과 동모양혈관 사이에서 문합도 관찰되었다. 문맥로의 대부분에서는 문정맥의 분지들이 동맥분지의 동반없이 많은 측분지들을 가지고 있었는데 이들은 바로 동모양혈관으로 통하여 있었다. 그러나 대부분의 주위담세총은 두층으로 이루어져 있었는데 외층은 비교적 느슨한 동맥과 정맥의 네트워크로, 그리고 내층은 조밀한 모세혈관들로 이루어져 있었다. DEN 투여 후 6주 군에서는 간실질이 결절형으로 나타났으며, 주로 문정맥의 분지들이 결절내로 가지들 치는 양상이었다. 문정맥의 소분지와 간정맥 분지 사이의 직접적인 연결도 있었다. 주위담세총의 정맥 네트워크와 주위담세총과 문정맥 혹은 주위 담세총과 동모양혈관과의 문합은 대조군에 비하여 증가되어 있었다. 실험 9주 군에서는 각 결절 주위로 혈관의 네트워크가 저명하였으며 이들은 주로 문정맥의 분지들로부터 분지되었다. 주위담세총은 훨씬 더 복잡하게 얽혀 있었으며 비틀림도 심하였다. 주위담세총내 그리고 그 주위에는 많은 확장된 정맥들이 문정맥의 분지들과 직접 연결되어 있었다(Fig. 6).

문정맥 분지의 종말 부위에서의 동맥-문맥간 문합은 역시 증가되어 있었다. DEN 투여 12주 후에는 간경변증의 재생결절 형성과 일치하여 간내 미세혈관계가 배치되어 있었고 섬유성 격벽이 위치한 곳에는 빈 공간으로 혈관 구조물이 결여되어 있었다. 섬유성 격벽 부위에는 비교적 큰 문정맥이 격벽을 따라 주행하여 서로 연결되어 있었다(Fig. 7). 그리고 결절내의 동모양혈관들은 크기가 불규칙하였고, 내강이 협착된 곳과 팽대된 곳이 관찰되었다. 전체적으로 동모양혈관의 부피는 상당히 감소되어 있었다. 주위담세총에 해당하는 혈관들은 서로 유합이 일어나 재생결절을 둘러싸는 판상의 혈관벽을 만들고 있었다. 두꺼운 혈관벽은 간동맥의 분지와 문정맥의 분지가 연결되어 공급하고 있었다(Fig. 8).

### 고 찰

실험적인 간경변증은 사염화탄소를 비롯하여 여러 가지 약제에 의하여 유발될 수 있다<sup>3,12</sup>. DEN을 포함한 니트로자민류는 간세포암을 일으킬 수 있는 발암물질로 잘 알려져 있는데 쥐<sup>13</sup>와 개<sup>14</sup>에서는 실험적으로 간경변증을 일으키기도 한다. 니트로자민류는 그 자체로는 독성이 없으나 그 중간 대사산물이 단백질 합성을 억제시키고 리보솜의 형태를 변화시켜 결국 세포의 괴

사를 초래하게 된다. 그 대사는 간에서 이루어지기 때문에 전신적인 투여는 선택적인 간세포 괴사를 유발할 수가 있다. 본 실험에서는 DEN을 쥐에 반복 주사하였는데 섬유화와 함께 현저한 재생결절 형성이 일어났으며 간세포암으로 진전된 예는 없었다. 이러한 조직학적 양상들은 사람에서의 간경변증과 유사하였다.

혈관주형을 이용한 초기의 연구들은 간경변증에서 현저한 동모양혈관의 부피 감소와 모든 혈관들의 비틀림, 그리고 규칙적인 분지의 소실을 관찰하였다<sup>3,4,15</sup>. 본 실험에서도 이러한 동모양혈관의 부피 감소와 불규칙한 협착 및 팽대, 그리고 심한 비틀림을 관찰할 수 있었는데 이러한 동모양혈관의 부피의 감소는 기질 확장에 의한 상대적인 간실질 부피의 감소 뿐만 아니라 섬유화에 의한 불규칙한 협착에 의한 것이라 생각된다. 주사전자현미경을 이용한 혈관주형술의 발전으로 간경변증에서 재생결절 주변부의 순환계를 보다 상세하게 관찰할 수 있게 되었다. Yamamoto등<sup>5</sup>은 사람의 간경변증의 재생결절 주위에는 복잡하게 연결되는 동맥총이 형성된다고 하였다. Hirooka등<sup>6</sup>은 이러한 결절주위 동맥총이 동맥 모세혈관 뿐만 아니라 문정맥의 세분지와도 연결된다고 보고하였다. 또 간경변증의 재생결절 주변에서 간동맥의 세분지와 문정맥의 세분지의 직접적인 연결이 증가된다는 관찰도 있다<sup>4,16</sup>. 본 실험에서도 간동맥과 문정맥 사이에 비교적 작은 분지들에서 직접적인 연결이 인정되었으나 보다 큰 동맥 분지나 문정맥의 분지간에는 연결이 전혀 없었으며 실험적 간경변증이 상당히 진행된 12주 후에도 전체적으로 혈류에 영향을 미칠 정도의 간동맥과 문정맥 사이에 직접적인 연결은 없었다.

문맥역의 담관은 두터운 그물 형태의 혈관으로 둘러싸여 있는데 이를 주위 담세총이라고 하며 안쪽의 수입혈관과 바깥쪽의 수출혈관의 두층으로 구성되어 있다. 생리학적으로 주위담세총의 혈류는 간동맥의 분지에서 나와서 대부분 문정맥의 분지로 바로 들어가고 일부만이 동모양혈관으로 유입된다고 한다<sup>18</sup>. 그러나 Andrew등<sup>19</sup>은 그 역방향 즉 주위담세총은 간동맥과 문정맥의 이중 혈류 공급을 받는다고 주장하고 있으며 실제로 간세포 암을 치료하는 목적으로 간동맥을 막는 경우(간동맥 색전술) 통상적인 조직소견상 담관이 생존하는 경우를 흔히 접하게 된다. 사람의 만성 간질환에서는 주위담세총의 형태학적인 변화에 대한 보고가 있으나<sup>9,17</sup> 실험동물에서는 이러한 미세순환계의 변화에 대한 보고는 거의 없다. 본 실험에서는 비교적 초기의 간경변증이라고 생각되는 6주 군에서 주위담세총의 네트워크의 증가가 일어났으며, 실험 9주 후에는 문정맥과 연결된 비정상적으로 확장된 정맥이 관찰되었다. DEN 투여 12주 후에는 재생결절 주위로 서로 유합이 일어난 두꺼운 혈관벽을 형성하면서 문정맥과의 비교적 큰 혈관으로 연결이 일어난 주위담세총의 변화가 관찰되었다. 따라서 만성 간경변증의 재생결절

주위에서 주위담세총을 통하여 간동맥과 문정맥간의 연결의 증가가 일어나는 것으로 추정된다. 문맥 고혈압의 발생기전에 있어 동맥-문맥간 연결의 정확한 병태생리학적 의미는 잘 알려져 있지 않다. 오래전부터 이러한 연결을 통하여 동맥압이 문정맥으로 전하여져 문맥 고혈압이 생긴다고 추측하여 왔으나, 동맥-문맥간 연결이 일어나는 혈관의 구조에 관하여는 분명하게 밝혀지지 않았다. 혈관주형의 관찰을 통하여 혈류의 방향은 알 수 없기 때문에 본 실험에서 관찰한 비정상적 주위담세총의 혈류 방향도 알 수가 없다. 그러나 주위담세총을 통하여 간동맥 혈류와 간문맥 혈류의 연결이 증가하는 것은 분명하기 때문에 간경변증시 문맥 고혈압에서 주위담세총이 측부순환로의 역할을 하리라 생각한다.

## 결 론

간경변증에서의 간내 미세순환계의 형태학적인 변화, 특히 주위담세총의 변화를 규명하기 위하여 흰쥐에 DEN 100 mg/kg를 주 1회씩 복강내로 주사하여 실험적인 간경변증을 유발하고 흉부 대동맥을 통하여 생리식염수로 관류한 후 methacrylated resin으로 혈관주형을 뜬 후 주사전자현미경으로 관찰하였다. 실험 6주군부터 간표면에는 다발성의 결절들이 생겼으며, 사람에서의 간경변증과 유사한 미만성의 결절 변화가 생겼다. 전 실험군에서 결절 주위에는 주로 정맥 분지로 구성된 많은 혈관 통로가 형성되었으며 동맥-문맥간 문합의 증가가 관찰되었다. 주위담세총은 매우 발달되었으며 문정맥에서 분지된 확장된 정맥분지와 연결과 동모양혈관과의 연결이 많이 일어났다. 이상의 결과는 실험적인 간경변증에서 재생결절 주위의 비정상적인 주위담세총이 간동맥과 문정맥 간의 측부순환로의 역할을 한다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC. *The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification.* Bull WHO 1977; 55: 521.
- 2) Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. *The scarring of the liver acini(cirrhosis): tridimensional and microcirculatory considerations.* Virchows Arch Anat Pathol[A] 1983; 402: 107-37.
- 3) Daniel PM, Prichard MML, Reynell PC. *The portal circulation in experimental cirrhosis of the liver.* J Pathol Bacteriol 1952; 64: 53-60.
- 4) Popper H, Elias H, Petty D. *Vascular pattern of the cirrhotic liver.* Am J Clin Pathol 1952; 22: 717-29.
- 5) Yamamoto T, Kobayashi T, Phillips MJ. *Perinodal arteriolar plexus in liver cirrhosis: scanning electron microscopy of microvascular cases.* Liver 1984;

- 4: 50-4.
- 6) Hirooka N, Iwasaki I, Horie H, Ide G. *Hepatic microcirculation of liver cirrhosis studied by corrosion cast/scanning electron microscopic examination. Acta Pathol Jpn* 1986; 36: 375-87.
  - 7) Hayashi H. *Angioarchitectural changes in a mixed nodular cirrhotic liver. Acta Hepatol Jpn* 1989; 30: 1687-97.
  - 8) Yamamoto K, Itoshima T, Tsuji T, Murakami T. *Three-dimensional fine structure of the biliary tract: scanning electron microscopy of biliary casts. J Elect Micro Tech* 1990; 14: 208-17.
  - 9) Terada T, Hosono M, Nakanuma Y. *Microvasculature in the small portal tracts in idiopathic portal hypertension. Virchows Arch Anat Pathol [A]* 1989; 415: 61-7.
  - 10) Murakami T, Itoshima T, Shimada Y. *Peribiliary portal system in the monkey liver as evidenced by the injection replica scanning electron microscope. Acta Histol Jpn* 1974; 37: 245-60.
  - 11) Haratake J, Yamamoto O, hisaoka M, Horie A. *Scanning electron microscopic examinations of microvascular casts of the rat liver and bile duct. JJOEH* 1990; 12: 19-28.
  - 12) Conn HO, Atterbury CE. *Cirrhosis. In: Schiff L, Schiff ER, eds. Diseases of the liver. 6th ed. Philadelphia: Lippincott, 1987; 725-864.*
  - 13) Ogawa H. *Scanning electron microscopy of rat liver hyperplastic nodules induced by diethylnitrosamine. Scanning Electron Microsc* 1982; 4: 1793-8.
  - 14) madden JW, Gertman PM, Peacock Jr EE. *Dimethylnitrosamine induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease. Surgery* 1970; 68: 260-8.
  - 15) Mann JD, Wakim KG, Baggenstoss AH. *Alteration in the vasculature of the diseased liver. Gastroenterology* 1953; 25: 540-6.
  - 16) Hales MR, Allan JS, Hall EM. *Injection-corrosion studies of normal and cirrhotic livers. Am J Pathol* 1959; 35: 909-41.
  - 17) Terada T, Ishida F, Nakanuma Y. *Vascular plexus around intrahepatic bile ducts in normal livers and portal hypertension. J Hepatol* 1989; 8: 139-49.
  - 18) Rappaport AM. *hepatic blood flow: morphological aspects and physiological regulation. Int Rev Physiol* 1980; 21: 1-63.
  - 19) Andrews WHH, Macgrath BG, Wenyon CEM. *Studies on the liver circulation. II. The micro-anatomy of the hepatic circulation. Ann Trop Med Parasitol* 1949; 43: 229-37.