

# 백서의 실험적 간 섬유증식에서 면역억제 및 증강제에 의한 비장세포 Subset 변화에 관한 연구

부산대학교 의과대학 병리학교실

설 미 영 · 김 준 연 · 이 선 경

## The Effects of Immunosuppressant and Immunostimulant on the Splenic Cell Subset of Rats Having Undergone Experimentally Induced Septal Fibrosis of Liver

Mee Young Sol, M.D., Joon Yeon Kim, M.D. and Sun Kyoung Lee, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Pusan National University

Although there have been many reports about the importance of the spleen's role in hepatic fibrogenesis, the exact mechanism is still uncertain. The author designed this study to evaluate splenic function on hepatic fibrogenesis.

The degree of hepatic fibrosis and the population of splenocyte subsets were studied in the experimental animal model with fibrosis produced by injecting normal swine serum intra-peritoneally into Sprague-Dawley rats. The animals were divided into three groups; group A was subjected to injection of swine serum only, group B swine serum and complete Freund's adjuvant, and group C swine serum and cyclosporin A. The experimental hepatic fibrogenesis by swine serum was augmented by coinjection with the adjuvant and inhibited by cyclosporin A.

The study of the splenocyte subset revealed increased percentages of splenic B cell and CD4+ cell and a decreased percentage of CD8+ cell, and these changes of splenocyte subset were also augmented by the adjuvant and inhibited by cyclosporin A. The percent of monocytes was not significantly altered, although a tendency of early decrease by the adjuvant was noted. (Korean J Pathol 1995; 29: 572~583)

**Key Words:** Hepatic fibrosis, Splenocyte subsets, Freund's adjuvant, Cyclosporin A

### 서 론

Paronetto와 Popper<sup>1</sup>는 동물에 이중혈청(돼지 및 말

접 수:1994년 10월 11일, 게재승인:1995년 6월 23일

주 소:부산시 서구 아미동 1가 10, 우편번호 602-739

부산대학교 의과대학 병리학교실, 설미영

\* 이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

혈청)을 투여하여 면역성 간 섬유화를 일으키는데 성공하고, 이 실험적 모형이 사람에게 생기는 만성 간 질환 또는 간경변증의 발생기전과 매우 유사하다고 하였다. 이것이 계기가 되어 실험적 섬유화의 기전에 관한 연구들<sup>2-4</sup>이 시행되어 간 섬유화의 발생과정에 간의 지방저장세포(Fat Storing Cell, FSC), 섬유모세포 그리고 대식세포가 깊이 관여한다는 사실이 알려졌다. 따라서 간 섬유화에 관여하는 가장 중요한 세포인 FSC의 형태와 기능에 관한 연구<sup>5-11</sup>가

활발하게 진행되어 많은 것이 알려지게 되었다.

근년에 간독성 물질<sup>12,13</sup> 또는 이종혈청<sup>14~16</sup>에 의한 실험적 간 섬유화에 있어서 비장적출이 섬유화를 억제한다는 사실이 보고되었다. Kan등<sup>17</sup>은 활성화된 비장세포에서 T-세포 성장인자가 배출되어 interleukin 2(IL-2) 조절계통에 관여하여 종양의 치료효과를 나타낸다고 하였고, Okoshi등<sup>18</sup>은 실험적 간 손상에 있어서 비장 단핵구 특히 접착세포(adherent cell)가 간세포 독성유발에 중요한 역할을 한다고 하였으며, Holdsworth등<sup>22</sup>은 비장이 세포매개성 면역 뿐 아니고 체액성 면역에도 관련이 깊다고 하였다.

여러가지 원인에 의한 만성 활동성 간염 환자의 간에서 간세포 괴사부위에는 주로 CD8+ 세포들이 침윤되어 있다는 보고들<sup>20~22</sup>과 dimethylnitrosamine에 의한 실험적 간 섬유화에 있어서도 병변이 생긴 간 조직에 대식세포와 CD8+ 세포들이 침윤한다는 보고<sup>23</sup>가 있다.

이러한 보고들에 의하면 만성 간질환들과 간 섬유화에는 세포매개성 면역기전이 관여한다고 인정된다. 그러나 간세포 괴사나 염증이 선행되지 않는 면역성 간 섬유화에 있어서 면역성 자극은 국소조직에 있는 면역능동세포들에서 유래한다고 생각할 수 없고 면역기관인 비장에서 생성하여 혈류를 따라 간에 전달될 것으로 생각된다.

저자는 이러한 점에 착안하여 돼지혈청에 의한 면역성 간 섬유화 모형을 이용하여 면역증강제인 Freund's adjuvant와 면역억제제인 cyclosporine을 흰쥐에 주입하고 간과 비장에 나타나는 조직학적 변화와 아울러 비장세포 subset 비의 변동을 조사하여 비장이 간에 미치는 기전의 일단을 구명할 목적으로 본 연구를 시도하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물

이 연구에 사용한 동물은 체중 약 180 gm 내외의 숫 Sprague-Dawley계 백서 100마리였다. 동물들은 표준 실험사료로써 1주일간 사육하면서 건강상태가 양호하다고 인정되는 것들을 골라서 실험에 사용하였다.

### 2. 간 섬유화 모형

동물들을 4군으로 나누어 한 군은 마리당 생리식염수 0.5 ml를 주2회 복강내 주입한 정상대조군으로 하였다. 나머지 세 군은 실험군으로서 첫째군은 정상 돼지혈청 (Dako, Immunoglobulin & 'S제, Den-

mark)을 마리당 0.5 ml씩 주 2회 복강내에 회생 직전까지 투여하였다. 둘째군은 첫째군의 방식대로 비동화한 돼지혈청에 Freund's adjuvant(Sigma Chemical, St. Louis, U.S.A)를 0.1 ml씩 섞어서 투여하였다. 셋째군은 돼지혈청과 함께 cyclosporin A(Sandos, Sandimun, German)를 20 mg/kg body weight의 용량을 복강내에 투여하였다. 돼지혈청 투여시작 후 4주째 되는 날부터 12주째 되는 날까지 2주 간격으로 각 군 5마리씩 희생시켜 비장과 간을 적출하였다.

### 3. 형태학적 검사법

적출한 간과 비장을 육안적 변화를 관찰한 후 1 cm<sup>3</sup> 크기로 잘라서 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 다음 4 μm의 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin(H-E) 염색, Masson's trichrome 염색 및 Sirius Red 염색을 시행하였다.

### 4. 비장세포 subset 측정법

비장을 적출한 즉시 10 ml 정도의 인산완충식염수 용액(PBS)을 가하면서 구멍이 아주 작은 철사그물 위에 놓고 마쇄하여 비장세포 부유액을 만든 다음 적혈구 용해용액(lysing solution)으로 적혈구를 파괴시키고 비장세포를 분리하였다. 비장세포 subset 검색을 위하여는 단클론항체를 이용한 이중색 면역형광염색법(two-color immunofluorescence stain)을 실시하고, 유세포 분석기 (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)로 분석하였다.

1) 단클론 항체: 이 실험에 사용한 항체들은 다음과 같은 것들이었다.

B cell 단클론 항체 — anti-rat spleen L-CA-(MRC OX-33, MCA 340P, mouse IgG1)-R. phycoerythrin conjugate (Serotec, Oxford, England)

T cell 단클론 항체 — anti-rat thymocytes and T-lymphocytes-(MRC OX-10, MCA 52F, mouse IgG1)-FITC conjugate (Serotec, Oxford, England)

CD8+ 단클론 항체 — anti-rat T suppressor/cytotoxic cell-(MRC OX-8, MCA 48P, mouse anti-IgG1)-R. phycoerythrin conjugate (Serotec, Oxford, England)

CD4+ 단클론 항체 — anti-rat T helper cells and macrophages(W3/25, MCA 55F, mouse IgG1)-FITC conjugate (Serotec, Oxford, England)

Macrophage 단클론 항체 — anti-rat monocyte & macrophages(ED1, MCA341F, mouse IgG1)-FITC conjugate (Serotec, Oxford, England)

Negative control — mouse IgG1 RPE conjugate(C14, MCA 689 PE), mouse IgG1 FITC conjugate(C14, MCA

689 F) (Serotec, Oxford, England)

2) 이중색 면역형광염색: FITC와 PE가 각각 부착된 단클론 항체 20  $\mu$ 씩을 각 시험관에 넣고  $2 \times 10^7$  cell/ml로 조정된 비장세포 부유액을 50  $\mu$ 씩 넣은 후 4°C에서 30분간 반응시킨 다음, sodium azide (NaN<sub>3</sub>)와 bovine serum albumin(BSA)이 섞인 인산완충식염수 용액으로 4°C에서 10분간 3회 세척 후 림프구들을 형광이 부착된 단클론 항체와 반응시킨 다음 유세포분석기로 측정하였다. Simultest Leuco GATE (anti-leucocyte FITC + anti-Leu-M3 PE)로 염색된 세포를 양성대조로, 그리고 위에 기술된 Serotec negative control로 염색된 세포를 음성대조로 하였다.

3) 유세포분석: 2종의 형광 부착 단클론 항체로 염색된 림프구들의 분석은 488 nm의 argon ion laser를

가지고 있는 FAC-Sort analyzer(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)로 실시하였다. 형광발산을 FITC는 530 nm에서, 그리고 PE는 575 nm에서 측정하고 형광의 광도를 log scale로 표시하였다. 각 검체마다 10,000개의 세포를 조사하였다.

결 과

1. 간의 조직학적 변화

돼지혈청 단독 투여군, 돼지혈청과 Freund's adjuvant 투여군, 그리고 돼지혈청과 cyclosporine 투여군 공히 약물투여 시작 후 4주째에는 간소엽의 중심정맥벽과 인접 간조직에 경미한 부종과 소수의 림프구 침윤이 인정되었다. 간소엽에 생긴 섬유화에 관

Table 1-1. Incidence of septal fibrosis of liver induced by administration of swine serum only, and swine serum with Freund's adjuvant or cyclosporine

Group (n=5)	Degree of fibrosis	Weeks after initial administration					Total
		4	6	8	10	12	
Swine serum only	mild	0/5	0/5	2/5	2/5	1/5	5/25
	severe	0/5	3/5	1/5	2/5	4/5	10/25
Swine serum with adjuvant	mild	1/5	3/5	2/5	1/5	1/5	8/25
	severe	0/5	2/5	3/5	4/5	4/5	13/25
Swine serum with cyclosporine	mild	0/5	0/5	2/5	1/5	1/5	3/25
	severe	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25

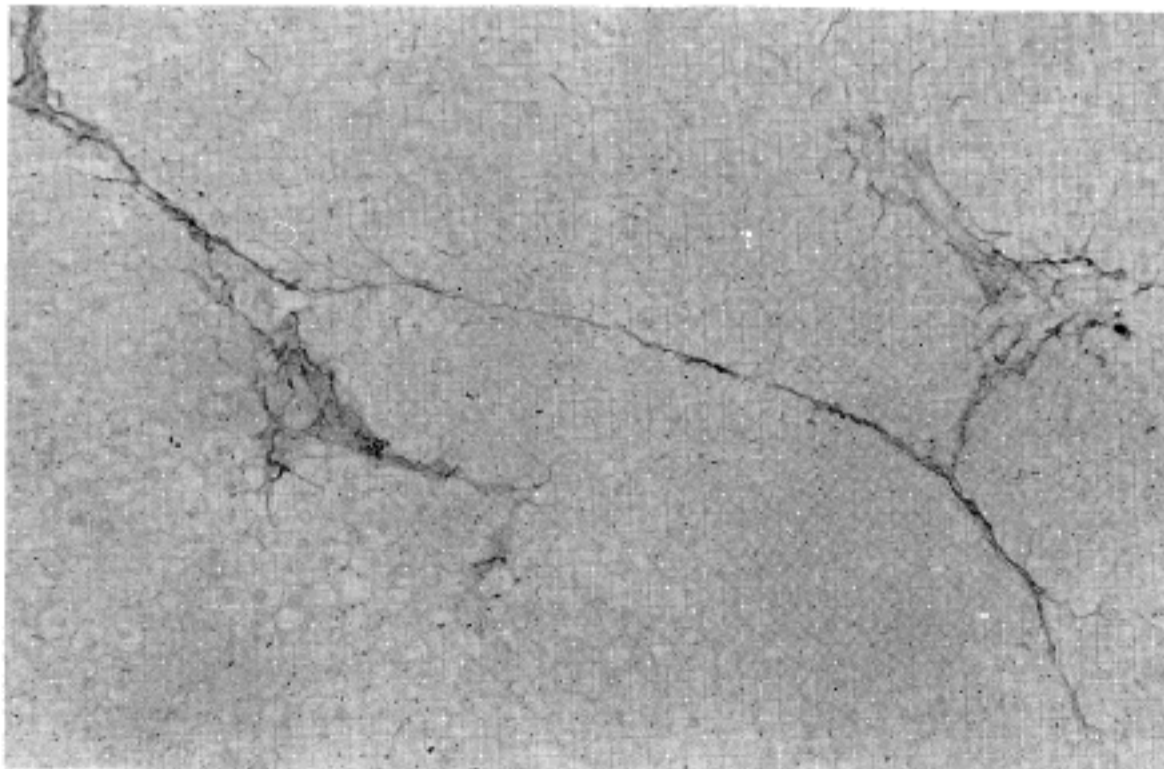


Fig. 1. Mild degree of septal fibrosis of liver. Slender septa link the central veins, but lobular architecture is preserved. (Picrosirius Red Stain,  $\times 100$ ).

한 성적은 Table 1-1에서 보는 바와 같이 돼지혈청 단독군에 있어서 투여시작 후 4주째에는 섬유화가 전 동물에서 인정되지 아니하였고, 6주째에는 5마리 중 3마리에서 심한 섬유화가 보였으며, 8주째에는 5마리 중 2마리에서 경한 섬유화가, 그리고 1마리에서 심한 섬유화가 있었고, 10주째에는 경한 섬유화와 심한 섬유화가 각각 2마리에서, 그리고 12주째에는 1마리에서 경한 섬유화가, 4마리에서 심한 섬유화가 있었다.

돼지혈청과 adjuvant 투여군에 있어서 투여시작 후 4주째에 5마리 중 1마리에서 경한 섬유화가 나타났

고, 6주째에는 5마리 중 3마리에서 경한 섬유화가, 그리고 2마리에서 심한 섬유화가 인정되었으며, 8주째에 5마리 중 2마리에서 섬유화가, 3마리에서 심한 섬유화가 나타나 있었고, 10주째와 12주째에 각각 5마리 중 각 1마리에서 경한 섬유화가, 그리고 각 4마리에서 심한 섬유화가 관찰되었다(Fig. 1, 2). 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에 있어서 투여시작 후 4주째와 6주째에 각각 5마리 전 동물에서 섬유화가 인정되지 아니하였고, 투여시작 후 8주째에 5마리 중 2마리에서 경한 섬유화가, 그리고 10주째와 12주째에 각각 5마리 중 각 1마리에서 경한 섬유화가 인

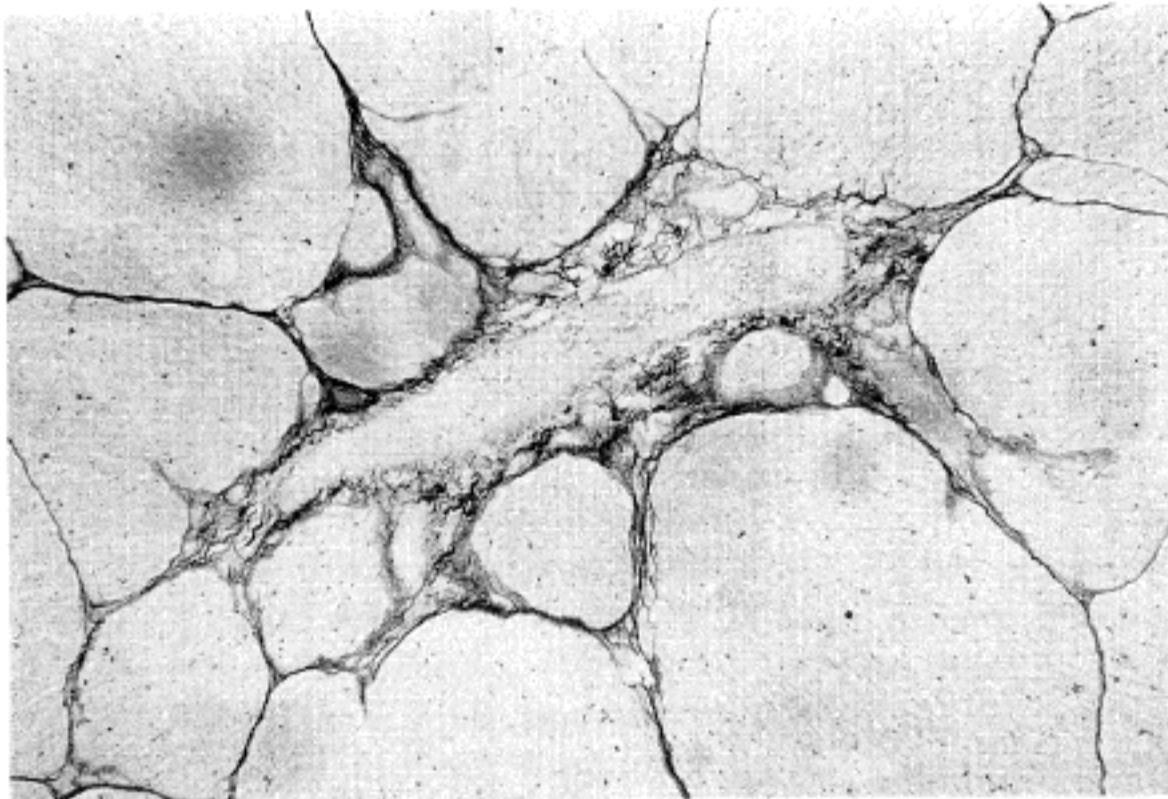


Fig. 2. Moderate to severe degree of septal fibrosis of liver. Parenchyma is subdivided into smaller pseudolobules by thin fibrous septa. (Picrosirius Red Stain,  $\times 100$ ).

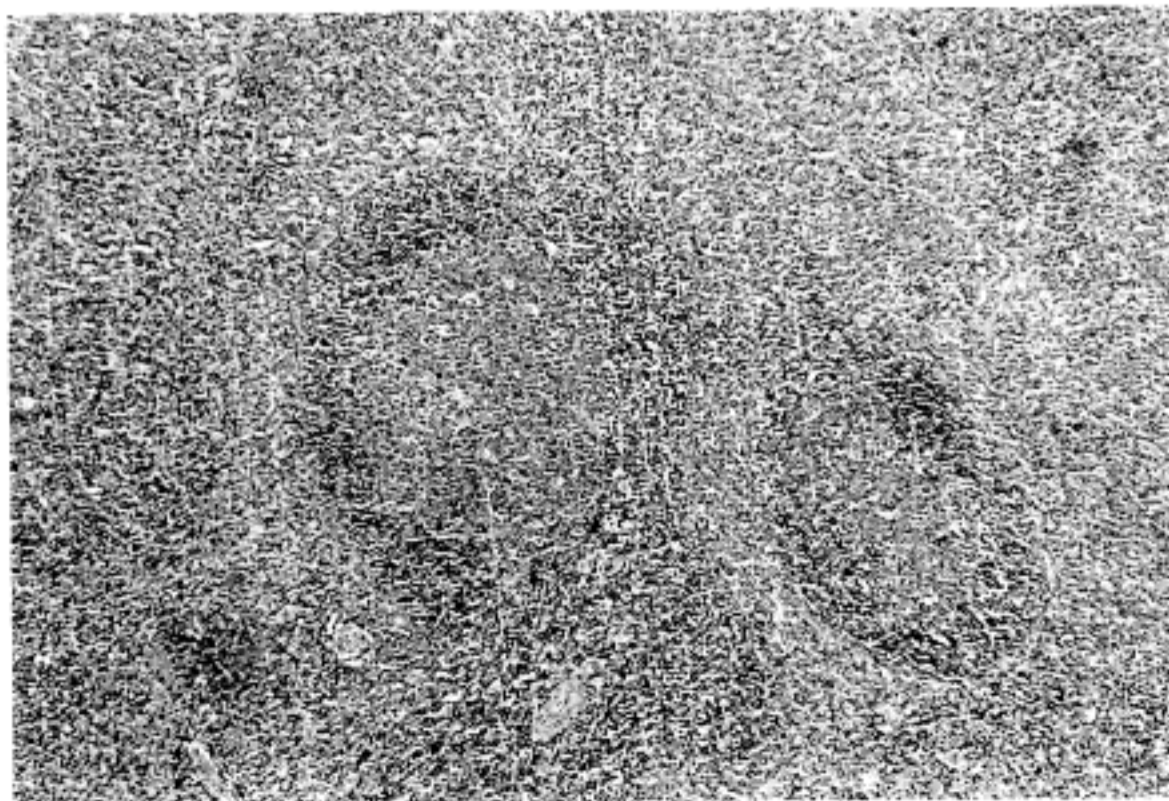


Fig. 3. Spleen shows windening of periarteriolar white pulp with germinal centers. (H-E,  $\times 100$ ).



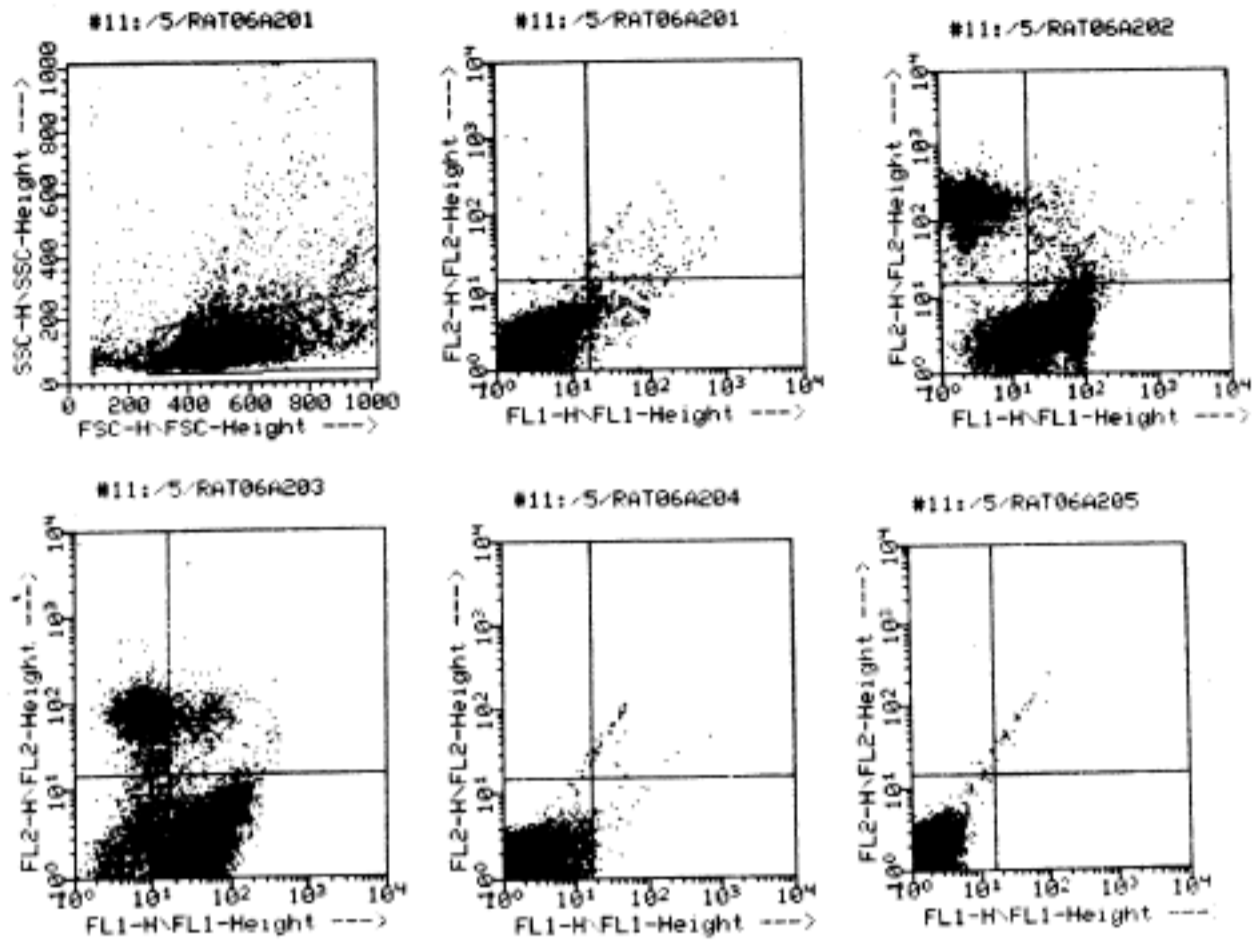


Fig. 4.

정되었다.

이상의 실험성적을 디지털(이진수) 수열로 정리한 성적과 그 성적을 다시 단일분할법에 의한 분산분석을 시행한 결과는 Table 1-2에서 Table 1-5까지에 제시하였다.

Table 1-2는 형태학적 관찰성적을 디지털 수열로 정리한 성적이다. 이 표에서 성적 I은 간소엽들에 심한 섬유화 즉 중격상 섬유화가 생긴 것만을 양성이라고 간주했을 때의 디지털 성적이며, 성적 II는 경한 섬유화 이상의 섬유증을 양성이라고 간주한 디지털 성적이다. 다시 설명하면 성적 I에 있어서 중격상 섬유화가 생겨 있으면 1을, 그렇지 아니한 경우는 0을, 그리고 성적 II에 있어서는 정도의 섬유화 이상의 섬유화가 생겨 있으면 1을, 그렇지 아니하면 0을 대응시킨 것이다.

Table 1-2의 성적 I에 관하여 분산분석을 시행한 결과는 Table 1-3에, 성적 II에 관하여 분산분석을 한 결과는 Table 1-4에, 그리고 성적 I과 성적 II의 종합 분산분석은 Table 1-5에 제시되어 있다. 이 표들 (Table 1-3~Table 1-5)을 보면 처치(A)는 1차 오차 (E<sub>1</sub>)에 대하여, 그리고 경시적 반응(B)은 2차 오차 (E<sub>2</sub>)에 대하여 매우 유의하다. 그러므로 돼지혈청만 투여한 동물, 돼지혈청과 adjuvant를 투여한 동물, 그

리고 돼지혈청과 cyclosporine을 투여한 동물 등 3군들 간에 생기는 섬유화의 빈도에 유의한 차가 있다고 할 수 있다. 즉 간의 섬유화는 돼지혈청만 투여한 동물에 비하여 adjuvant를 첨가한 군에서는 항진되고, cyclosporine을 첨가한 군에서는 억제된다고 할 수 있고, 각 군들에 있어서 경시적으로 간 섬유화가 점차 심하여진다고 할 수 있다.

## 2. 비장의 조직학적 변화 및 비장세포 비율의 변동

돼지혈청 단독 투여군에 있어서 투여시작 후 4주째에는 대조군과 비교하여 별 변동이 인정되지 아니하였으나, 6주째에는 백수 특히 중심동맥 주위 백수가 확대되었고 배중심이 나타났으며 8주째에는 더욱 심하여져서 12주째까지 계속되었다. 돼지혈청과 adjuvant 투여군에 있어서 투여시작 후 4주째에 이미 비장 백수의 확대와 배중심의 출현이 인정되어 경시적으로 조금씩 심하여졌다. 그러나 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에 있어서는 전 관찰시점에서 대조군의 소견과 대동소이하였다.

비장세포들 즉 B-세포, T-세포 subset 및 대식세포의 평균 비율에 관한 성적은 Table 2-1에서 Table 2-5까지 제시되어 있다.

Table 1-2. The digital data of hepatic fibrosis in experimental groups

Block Group		Result I(severe fibrosis)							Result II(mild to severe fibrosis)						
		Weeks after initial administration					Sum	Total	Weeks after initial administration					Sum	Total
		4	6	8	10	12			4	6	8	10	12		
R1	S	0	1	0	1	0	2		0	1	1	0	1	3	
	A	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1	5	8
	C	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
R2	S	0	0	0	1	0	1		0	0	0	1	1	2	
	A	0	0	1	1	1	3	4	0	1	1	1	1	4	7
	C	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	1	
R3	S	0	1	0	1	1	3		0	1	1	1	1	4	
	A	0	1	1	1	1	4	7	0	1	1	1	1	4	8
	C	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0		
R4	S	0	1	1	0	1	3		0	1	1	1	1	4	
	A	0	0	0	1	1	2	5	0	1	1	1	1	4	9
	C	0	0	0	0	0	0		0	0	1	0	0	1	
R5	S	0	0	0	0	1	1		0	0	0	1	1	2	
	A	0	1	1	1	1	4	5	0	1	1	1	1	4	8
	C	0	0	0	0	0	0		0	0	1	1	0	2	
Total		0	5	4	6	8	23		1	8	10	10	11	40	

Note: S, swine group; A, swine with adjuvant group; C, swine with cyclosporine group.

Table 1-3. Variance analysis of result I

Factor	S(I)	f	V	F	F'
R	0.88	4	0.22	0.815	
A	3.707	2	1.854	6.867*	10.906***
E <sub>1</sub>	2.16	8	0.27	2.621	
B	2.347	4	0.587	5.699***	3.453
A×B	1.893	8	0.237	2.301	
E <sub>2</sub>	4.96	48	0.103		
E'	12.24	72	0.17		
T	15.947	74			

Note: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

Table 1-4. Variance analysis of result II

Factor	S(II)	f	V	F	F'
R	0.134	4	0.034	0.197	
A	5.947	2	2.974	17.191**	16.802***
E <sub>1</sub>	1.386	8	0.173	1.573	
B	4.4	4	1.1	10.0***	6.215***
A×B	152	8	0.19	1.727	
E <sub>2</sub>	5.28	48	0.11		
E'	12.72	72	0.177		
T	18.667	74			

Table 2-1은 대조군과 실험군들에 있어서 B-세포의 평균 비율의 변동에 관한 성적이다. B-세포 비율은 돼지혈청 단독군에 있어서 대조군에 비하여 각 관찰 시점에서 감소하는 경향을 보였고, 특히 투여시작

후 8주째에는 유의한 감소를 보였다. 돼지혈청과 adjuvant 군에 있어서 대조군에 비하여 투여시작 후 6주째에 유의있는 감소를 보였고 기타 관찰시점의 비율에 별 변동이 없었으며, 돼지혈청과 cyclosporine

**Table 1-5.** Synthetic variance analysis of result I and II

Factor	W <sub>1</sub> S(I)+ W <sub>2</sub> S(II)	f	V	F	F'
R	4.677	8	0.585	0.595	
A	41.329	4	10.332	10.511***	13.685***
E <sub>1</sub>	15.727	16	0.983	2.119	
B	28.717	8	3.590	7.737***	4.755**
AxB	15.01	16	0.938	2.022	1.242
E <sub>2</sub>	44.542	96	0.464		
E'	108.673	144	0.755		
T	150.002	148			

군에 있어서 8주째를 제외하고 전 관찰시점의 비율이 유의있게 감소하였다.

Table 2-2는 대조군과 실험군들의 CD3+ 세포의 평균 비율에 관한 성적이다. CD3+ 세포 비율은 돼지 혈청 단독군에 있어서 대조군에 비하여 투여시작 후 4주째와 6주째에는 별 변동이 없었으나, 8주째부터 12주째까지는 유의있게 증가되어 있었고, 돼지혈청과 adjuvant 군과 돼지혈청과 cyclosporine 군은 전 관찰시점에서 유의있는 증감이 인정되지 아니하였다.

Table 2-3은 CD4+ 세포의 평균 비율의 변동에 관한 성적이다. CD4+ 세포의 평균 비율은 돼지혈청 단독군에 있어서 투여시작 후 4주째에, 그리고 돼지혈청과 cyclosporine 군에 있어서 투여시작 후 6주째

**Table 2-1.** Mean percentages of B-cells in rat spleen and significant statistical differences

Group	Control	Weeks after initial administration <sup>a</sup>				
		4	6	8	10	12
Swine serum	19.1	17.2	17.5	14.6**	15.6	13.3***
Adjuvant	19.1	20.0	14.6*	20.9	20.0	19.1
Cyclosporine	19.1	13.6*	6.9***	16.9	14.1**	11.9***

Note: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; a, unpaired t-test.

**Table 2-2.** Changes of mean percentages of CD3<sup>+</sup> cell in rat spleen

Group	Control	Weeks after initial administration <sup>a</sup>				
		4	6	8	10	12
Swine serum	53.6	49.2	57.9	65.9**	64.2**	64.7**
Adjuvant	53.6	54.1	60.2*	58.7	60.7	61.7
Cyclosporine	53.6	49.6	56.4	53.4	54.5	58.8

**Table 2-3.** Changes of mean percentages of CD4<sup>+</sup> cell in rat spleen

Group	Control	Weeks after initial administration <sup>a</sup>				
		4	6	8	10	12
Swine serum	46.7	36.3*	50.1	47.4	49.4	48.5
Adjuvant	46.7	44.0	44.7	49.4	46.8	53.4
Cyclosporine	46.7	44.5	39.7*	50.5	43.7	47.3

**Table 2-4.** Changes of mean percentages of CD8<sup>+</sup> cell in rat spleen

Group	Control	Weeks after initial administration <sup>a</sup>				
		4	6	8	10	12
Swine serum	30.5	33.7	31.5	39.6**	39.1*	39.0
Adjuvant	30.5	29.0	34.9	35.1	36.2	32.1
Cyclosporine	30.5	27.3	35.9	37.5	41.6**	39.6*

**Table 2-5.** Changes of mean percentages of macrophages in rat spleen

Group	Control	Weeks after initial administration <sup>a</sup>				
		4	6	8	10	12
Swine serum	2.51	1.82	2.12	7.14	1.98	2.14
Adjuvant	2.51	0.92**	1.10**	2.60	10.24	2.30
Cyclosporine	2.51	2.32	6.50	7.06	20.00	2.72

에 유의있는 감소를 보이고 있다. 돼지혈청과 adjuvant 군에 있어서는 전 관찰시점에서 유의적 변동이 관찰되지 아니하였다.

Table 2-4는 대조군과 실험군들의 CD8<sup>+</sup> 세포 평균 비율의 변동에 관한 성적이다. CD8<sup>+</sup> 세포 평균 비율은 돼지혈청 단독군에 있어서 전 관찰기간 중 증가하는 경향을 보였는데 특히 투여시작 후 8주째와 10주째에는 유의있는 증가를 보였고, 돼지혈청과 adjuvant 군에 있어서 전 관찰기간 동안 별 변동을 보이지 아니하였으며, 돼지혈청과 cyclosporine 군에 있어서도 전반적으로 증가하는 경향을 보였는데 투여시작 후 10주째와 12주째에는 유의있는 증가를 나타내었다.

Table 2-5는 대조군과 실험군들의 비장 대식세포의 평균 비율의 변동에 관한 성적이다. 비장 대식세포의 평균 비율은 돼지혈청 단독군에 있어서 전 관찰시점에 있어서 통계적 유의성은 없었으나 감소하는 경향을 보이고 있었고, 돼지혈청과 adjuvant 군에 있어서도 전 관찰시점에 있어서 감소하는 경향을 보였는데 특히 투여시작 후 4주째와 6주째에는 매우 유의있는 감소를 보이고 있었으며, 돼지혈청과 cyclosporine 군에 있어서는 전 관찰시점에서 통계적 유의는 없으나 증가하는 경향을 보이고 있었다.

## 고 찰

본 연구 성적 중 간의 조직학적 소견을 요약하면 돼지혈청 주입시작 후 6주에 간실질에 중격상 섬유화가 나타나기 시작하여 그 정도와 빈도가 점차 증가되었다. 이와 같은 중격성 섬유화는 adjuvant 투여에 의하여 촉진되었고 cyclosporine 투여에 의하여 억제되었다.

일찌기 Paronetto와 Popper<sup>1</sup>는 이종혈청(돼지혈청과 말혈청)을 복강내 반복 주입하여 간에 섬유화가 생기는 것을 관찰하였다. 그들은 섬세한 섬유성 띠가 문맥부와 중심정맥을 연결하여 간실질에 결절을 형성하지만 간세포의 손상 즉 지방변화, 심한 간세포 괴사 혹은 간세포의 재생 등이 선행되지 않는 것으로 보아 간섬유화가 면역기전에 의한 것이라고 설명하였다. 그 후 이러한 실험 model을 이용하여 간경변증 발생에 있어서 대식세포와 FSC의 역할<sup>2,4</sup> 혹은 FSC와 섬유모세포와의 관계<sup>3,24</sup> 등에 관한 연구들이 시행되어 간의 섬유화에서의 FSC의 역할이 주목의 대상이 되었다.

Ito와 Nemato<sup>25,26</sup>는 FSC를 Kupffer세포와는 다른 특수 지방저장세포라고 소개하였고, 그 후 새앙쥐, 쥐 및 비비(baboon) 등 실험동물에 간독성 물질을 투여하는 실험들에 있어서 FSC의 형태와 기능이 보고되었으며<sup>6,8,10,11</sup>, 사람에게 있어서도 각종 간질환 환자에



서 FSC의 역할이 알려지게 되었다<sup>6,7,9,27</sup>. 이러한 보고들을 종합하면 간질질에 섬유화가 생길 때는 먼저 FSC의 증식과 활성화가 일어나고 이 세포가 근섬유아세포 및 섬유아세포로 이행하는 일련의 변화가 생기는 것으로 이해된다. 따라서 저자가 관찰한 돼지 혈청에 의한 중격성 간 섬유화는 면역기전에 의한 FSC의 증식 및 활성화의 결과라고 생각되었다. 한편 Hashimoto등<sup>13</sup>은 백서 복강내에 사염화탄소를 투여하여 간경변증을 일으키는 실험에서 미리 비장을 적출한 동물에서는 간경변증이 억제되는 것을 관찰하고 비장이 간 병변의 진행에 영향을 미칠 것이라고 시사하였다. 또한 Tanaka등<sup>14</sup>은 쥐의 복강 내에 돼지혈청을 반복 주입하여 중격성 간 섬유화를 일으킬 때 주입 전 비장을 적출한 동물에서는 섬유화가 심하게 억제되고 prolyl hydroxylase의 활성치가 감소하는 것을 관찰하고 Hashimoto의 주장에 동조하였다. Miyazaki<sup>15</sup>와 나등<sup>16</sup>은 돼지혈청 투여에 의한 중격성 간 섬유화에서 비장에 FSC를 조절하는 액체성 인자의 존재를 시사한 바 있다.

저자가 비장에서 관찰한 조직학적 소견을 요약하면 돼지혈청 단독 투여군에서는 투여 시작 후 6주부터 비장의 백수 특히 중심동맥 주위 백수가 확대되고 배 중심이 출현하여 T-세포 영역의 활성화가 인지되었고, 이와 같은 비장의 변동은 adjuvant 투여에 의하여 증강되었으며 cyclosporine 투여에 의하여 억제되었다. 따라서 이 변화는 돼지혈청에 대한 비장의 면역응답을 나타내는 소견이라고 할 수 있다.

저자의 성적 중 비장세포 subset의 비율에 관한 성적을 요약하면 돼지혈청 단독 투여군에서는 B-세포 비율이 주입시작 후 8주부터 감소하였고, CD4+ 세포 비율은 4주와 6주에 일시적으로 감소하였으며, CD8+ 세포 비율은 8주 이후부터 증가하였고, 대식세포 비율은 경향성 있는 변동을 보이지 않았다. 비장세포 중 B-세포 및 CD4+ 세포 비율의 감소와 CD8+ 세포 비율의 상승은 adjuvant에 의하여 억제되었고, cyclosporine 투여에 의하여 촉진되었으며, 대식세포 비율은 adjuvant 투여에 의해서만 감소하였다.

DeJong등<sup>28</sup>에 의하면 BCG는 면역반응에 관여하는 세포들 즉 B-세포, T-세포, 대식세포 및 자연살세포(NK-cell)들을 자극하는 비특이성 면역증강성 작용을 가지며, Doff등<sup>29</sup>은 BCG의 면역증강효과를 보조 T-세포 활성의 증강 때문이라고 하였다. 한편, Borel등<sup>30,31</sup>은 cyclosporine에 항원 생산을 억제하는 효력이 있다고 소개하였고, Borel등<sup>31</sup>, Tosato등<sup>32</sup>, 그리고 Cohen등<sup>33</sup>은 cyclosporine이 보조 T-세포를 선택적으로 억제하여 B-세포 증식에 필요한 성장인자와 세포

독성 T-세포의 분화 및 증식을 방해하며, 억제 T-세포의 증식에는 영향을 미치지 못한다고 하였다. 또한 Bunjes등<sup>34</sup>과 Hess등<sup>35</sup>은 cyclosporine에 의한 세포독성 T-세포의 면역억제 작용은 보조 T-세포에서 유래하는 interleukin 1과 interleukin 2의 작용을 차단하는데 기인한다고 하였다.

상기한 고찰을 정리해 보면 돼지혈청 주입에 의한 흰쥐 간의 중격성 섬유화는 adjuvant에 의하여 촉진되고, cyclosporine에 의하여 억제되며, 이러한 변화는 비장과 깊은 관련이 있다고 추정된다. 또한 비장간에 미치는 영향은 비장세포의 직접적인 영향이거나 혹은 비장세포에서 생성된 액체성 인자의 매개에 의한 것이라고 생각된다.

Postlethwaite등<sup>36</sup>은 시험관내에서 항원 혹은 유사분열 물질로 자극한 말초혈액내 림프구가 섬유모세포를 위한 화학주성 인자를 생성한다는 사실을 소개하면서 이 섬유모세포를 위한 림프구 유래 화학주성 인자는 단핵구 혹은 대식세포를 위한 화학주성인자인 lymphokine과는 다른 것이라고 하였다. 河崎등<sup>37</sup>은 사람에서 섬유모세포의 화학주성인자를 정량적으로 검색한 결과 만성 비활동성 간염 환자보다 만성 활동성 간염 환자에서 유의하게 높은 것을 관찰하면서 만성 활동성 간염에서 관찰되는 간 섬유화 과정에는 세포매개성 면역에 의한 조절이 중요하다고 하였으며, 그 후 T-세포 유래 섬유모세포 성장인자의 특징들이 알려지게 되었다<sup>38,39</sup>. Leibovich와 Ross<sup>40,41</sup>는 기니피그를 대상으로 한 실험적 피부창상에서 대식세포 의존성 섬유모세포 성장인자의 존재를 주장하였고, Glenn과 Ross<sup>42</sup>, DeLustro등<sup>43</sup>은 사람에서도 활성화한 단핵구와 대식세포들이 섬유모세포 성장인자를 분비하여 섬유화를 유발시킨다고 하였다.

간조직내에는 FSC의 증식을 자극하는 여러 종류의 증식인자들<sup>44-47</sup>이 있다고 알려져 있다. 특히 Charlotte등<sup>48</sup>은 사염화탄소에 의한 간 섬유화에 관한 연구에서 초기에는 heparin 결합성 성장인자가 간소엽 중심대에 있는 대식세포내에 존재하나 말기에는 이 인자가 섬유성 띠에 포함되어 있는 FSC 내에 존재하는 것을 관찰하여 FSC 및 섬유모세포의 성장인자의 합성세포와 작용기전을 밝혔다. 본 연구에서도 돼지혈청 투여에 의한 간 섬유화에서 섬유조직이 생기기 이전에 간세포의 괴사 또는 염증성반응이 인정되지 않았으므로 간 섬유화는 비장의 원격조절이 중요하다고 추정되며, 이와 같은 비장의 간 섬유화 조절기능은 비장세포들에서 생성되는 FSC 및 섬유모세포 성장인자에 기인된다고 생각된다.

## 요 약

간 섬유화의 발생에 비장의 역할이 중요하다는 보고들이 있다. 그러나 그 기전에 관하여는 아직 불명한 점이 많다. 저자는 비장이 간 섬유화에 관여하는 기전의 일단을 구명할 목적으로 이 연구를 시도하였다.

정상 흰쥐에 돼지혈청을 복강내에 주사하여 간 섬유화를 일으키는 실험에 있어서 돼지혈청 단독, 이것과 Freund's adjuvant, 또는 cyclosporin A를 함께 투여하여 간 섬유화의 정도 및 비장세포 subset의 비율 변동을 비교 검토하였다. 이렇게 하여 얻은 성적을 요약하면 다음과 같다.

1) 간 섬유화는 돼지혈청 단독 투여에 있어서 주입시작 후 6주째와 8주째에 각각 5마리 중 3마리에서, 10주째에 5마리 중 4마리에서, 그리고 12주째에 5마리 전부에서 경하게 또는 현저하게 나타났고, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에 있어서 4주째에 5마리 중 1마리에서 그리고 6주째에서 12주째까지 5마리 전부에서 경하게 또는 현저하게 나타났으며, 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에 있어서 8주째에 5마리 중 2마리에서 그리고 10주째와 12주째에 5마리 중 1마리에서 경하게 나타났다.

2) 비장의 조직학적 소견에 있어서 돼지혈청 단독 투여군에서는 주입시작 후 6주째에 중심동맥 주위 백수가 확대되었고 배중심이 출현하여 8주 이후에는 점차 조금씩 심하여졌고, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에서는 4주째부터 비슷한 소견이 나타나 점차 심하여졌으며, 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에서는 별 변동이 인정되지 아니하였다.

3) 비장세포 subset 비율의 변동에 있어서 B-세포 비율은 돼지혈청 단독 투여군에서는 주입시작 후 8주째부터 감소하였고, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에서는 별 변동이 없었으며, 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에서는 4주째부터 현저하게 감소하였다.

CD4+ 세포 비율은 돼지혈청 단독 투여군과 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에서는 주입후 4주째와 6주째에 감소하였으나, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에서는 별 변동이 없었다. CD8+ 세포 비율은 돼지혈청 단독 투여군과 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에서는 8주 이후부터 증가하였으나, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에서는 별 변동이 없었다. 비장 대식세포 비율은 돼지혈청 단독 투여군과 돼지혈청과 cyclosporine 투여군에서는 별 변동이 없었으나, 돼지혈청과 adjuvant 투여군에서는 주입시작 후 초기(4주째와

6주째)에 심하게 감소하였다.

이상의 성적에 의거하면 돼지혈청에 의한 간 섬유화는 adjuvant에 의하여 촉진되고 cyclosporine에 의하여 억제되며, 돼지혈청에 의한 비장세포 subset 비율의 변동에 있어서 B-세포와 CD4+ 세포 비율은 감소하고 CD8+ 세포 비율은 증가하는데 이런 변동은 adjuvant에 의하여 촉진되고 cyclosporine에 의하여 억제되며, 대식세포 비율은 유의적 변동이 생기지 아니하나 adjuvant에 의하여 현저하게 감소한다고 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. Paronetto F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. *Am J Pathol* 1966; 49: 1087-101.
2. Cenacchi G, Ballardini G, DeGiorgi LB, Busachi CA, Rosso MD, Bianchi FB, Biagini G, Laschi R. Relationship between connective tissue cells and fibronectin in a sequential model of experimental hepatic fibrosis. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1983; 43: 75-84.
3. Yokoi Y, Namihisa T, Matsuzaki K, Miyazaki A, Yamaguchi Y. Distribution of Ito cells in experimental hepatic fibrosis. *Liver* 1988; 8: 48-52.
4. Andrade ZA. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. *Int J Exp Pathol* 1991; 72: 553-62.
5. Bronfenmajer S, Schaffner F, Popper H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol* 1966; 82: 447-53.
6. Okanoue T, Burbige EJ, French SW. The role of the Ito cells in perivenular and intralobular fibrosis in alcoholic hepatitis. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 107: 459-63.
7. Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J. The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1983; 3: 559-66.
8. Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in Baboons: Transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology* 1984; 87: 188-200.
9. Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: A morphometric study. *Hepatology* 1988; 8: 1027-33.
10. French SW, Miyamoto K, Wong K, Jui L, Briere L. Role of the Ito cell in liver parenchymal fibrosis in rats fed alcohol and a high fat-low protein diet. *Am J Pathol* 1988; 132: 73-85.
11. Weiner FR, Giambrone MA, Czaja et al. Ito cell gene

- expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990; 11: 111-7.
12. Streicher HJ, Harting H, Kunz HW. Milz/Leberziehungen am Model der Experimentellen Thioacetamid Cirrhosis der Ratenleber Die Milz Editores :Karl Lennert. D'eter Harms, Springer-Verlag, Berlin. 1970; 347-51.
  13. Hashimoto H, Taruya E, Yamashita T, Ishigawa T, Taniura M, Umeyama K. The effect of carbon tetrachloride. *Acta Hepatica* 1984; 25: 75-82.
  14. Tanaka H, Ohnishi K, Iida S, Nomura F. Effect of splenectomy on pig serum induced rat liver fibrosis. *Acta Hepatica* 1988; 29: 37-45.
  15. Miyazaki H. Immunological and histochemical analysis on the mechansim of liver fibrosis: relationship between spleen and fat-storing cell. *Tokyo Jikeikai Med J* 1990; 105: 19-33.
  16. 나서희, 설미영, 이선경. 돈혈청 투여에 의한 간 중격상 섬유조직 증식에 있어서 비적출 효과에 관한 연구 (미발표).
  17. Kan N, Ohgaki K, Inamoto T, Kodama H. Antitumor and therapeutic effects of spleen cells from tumor-bearing mice cultured with T cell growth factor and soluble tumor extract. *Cancer Immunol Immunother* 1984; 18: 215-22.
  18. Okoshi H, Zeniya M, Kawabe T, et al. The role of splenic mononuclear cells on experimental liver damage. *Acta Hepatica* 1989; 30: 53-60.
  19. Holdsworth RJ, McKenzie H, Parratt D, Irving AD, Cuschieri A. The role of the spleen in the immune response following naturally acquired exposure to encapsulated bacteria. *Int J Exp Pathol* 1990; 71: 835-43.
  20. Eggink HF, Houthoff HJ, Huitema S, Gips CH, Poppema S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 17-24.
  21. Eggink HF, Houthoff HJ, Huitema S, Wolters G, Poppema S, Gips CH. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. II. Lymphocyte subsets and viral antigens in liver biopsies of patients with acute and chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 121-8.
  22. Si L, Whiteside TL, Van Thiel DH, Rabin BS. Lymphocyte subpopulations at the site of "piecemeal" necrosis in end stage chronic liver diseases and re-jecting liver allografts in cyclosporine-treated patients. *Lab Invest* 1984; 50: 341-347.
  23. Mancini R, Paolucci F, Baroni GS, Jezequel AM, Orlandi F. Phenotypic analysis of inflammatory infiltrate in rats with dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *Int J Exp Pathol* 1991; 72: 119-28.
  24. Fujiwara K, Ogata I, Ohta Y, et al. Decreased collagen accumulation by a prolyl hydroxylase inhibitor in pig serum-induced fibrotic rat liver. *Hepatology* 1988; 8: 804-7.
  25. Ito T, Nemato M. Ueber die Kupfferschen Sternzellen und die "Fettspeicherungszellen"("Fat storing cells") in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber. *Okajima Folia Anat Jap* 1952; 24: 243-58.
  26. Ito T, Nemoto M. Morphlogische Studien ueber die Fettspeicherungszellen der Leber bei verschiedenen Wirbeltieren: I. Ueber die Fettspeicherungszellen der Huftiere. *Okajima Folia Anat Jap* 1956; 28: 521-42.
  27. Jézequel AM, Mancini R, Rinaldesi ML, et al. Dimethylnitrosamine-induced cirrhosis evidence for an immunological mechanism. *J Hepatol* 1989; 8: 42-52.
  28. DeJong WH, Steerenberg FA, Ruitenber BJ. Bacillus Calmette-Guérin(BCG) and its use for cancer immunotherapy. in *Tumor Immunology-Mechanisms, Diagnosis, Therapy*, eds by Den Otter W and Ruitenber BJ, Elsevier Science, Publishers B V, 1987; 283-307.
  29. Doft BH, Marchant B, Johannessen L, Chaparas SD, Sher NA. Contrasting effects of BCG on spleen and lymph node antibody responses in nude and normal mice. *J Immunol* 1976; 117: 1683-94.
  30. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-75.
  31. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 1977; 32: 1017-25.
  32. Tosato G, Pike SE, Koski IR, Blaese RM. Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporin A. *J Immunol* 1982; 128: 1986-91.
  33. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, Tilney L, Carpenter CB, Strom TB. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Int Med* 1984; 101: 667-82.
  34. Bunjes D, Hardt C, Rollinghoff M, Wagner H. Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interlukin 2. *Eur J Immunol* 1981; 11: 657-61.
  35. Hess AD, Tutschka PJ, Pu Z, Santos GW. Effect of

- cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. IV. Production of T cell stimulatory growth factors in CSA-treated primary MLR cultures. *J Immunol* 1982; 128: 360-7.
36. Postlethwaite AE, Synderman R, Kang AH. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *J Exp Med* 1976; 144: 1188-203.
37. 河崎恒久, 瀬古修二, 小東克次, 宮村正美, 福田善弘, 中野博, 井村裕夫. 慢性活動性肝炎の線維化を調節する Lymphokine: 線維芽細胞に対する遊走因子の檢索. *肝臓* 1984; 25: 1188.
38. Neilson EG, Phillips SM, Jimenez S. Lymphokine modulation of fibroblasts proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 1484-6.
39. Wahl SM, Gately CL. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. *J Immunol* 1983; 130: 1226-30.
40. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair: A study with hydrocortisone and anti-macrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100.
41. Leibovich SJ, Ross R. A macrophage-dependant factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am J Pathol* 1976; 84: 501-14.
42. Glenn KC, Ross R. Human monocyte-derived growth factor(s) for mesenchymal cells: activation of secretion by endotoxin and concanavalin A (Con A). *Cell* 1981; 25: 603-15.
43. DeLustro F, Sherer GK, LeRoy EC. Human monocyte stimulation of fibroblast growth by a soluble mediator(s). *J Reticuloendoth Soc* 1980; 28: 519-26.
44. Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buchley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, Davidson JM. Brief communication: Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest* 1989; 61: 571-5.
45. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Aboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide nitrogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989; 84: 1786-93.
46. Presta M, Statuto M, Rusanati M, Dell'Era P, Ragnotti G. Characterization of a Mr 25,000 basic fibroblast growth factor form in adult, regenerating, and fetal rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 164: 1182-9.
47. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia C-C, Marsden E, Thorngerson SS. Cellular distribution of transforming growth factor- $\beta$ 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 1990; 85: 1833-43.
48. Charlotte F, Win KM, Preaux A-M, Mavier P, Dhumeaux D, Zafrani BS, Rosenbaum J. Immunolocalization of heparin-binding growth factors (HBGF) types I and II in rat liver. Selective hyperexpression of HBGF-2 in carbon tetrachloride-induced fibrosis. *J Pathol* 1993; 169: 471-6.