

## 실험적 간경변증에 있어서 동양혈관 내피세포의 변화

왈레스기념침례병원 해부병리과<sup>1</sup>  
경북대학교 치과대학 구강병리학교실<sup>2</sup> 및 의과대학 병리학교실<sup>3</sup>

백옥지<sup>1</sup> · 박희경<sup>2</sup> · 채종민<sup>3</sup> ·곽정식<sup>3</sup> · 손태중<sup>3</sup>

### The Morphologic Changes of the Sinusoidal Endothelial Cells in N-diethylnitrosamine Induced Cirrhotic Rat Liver\*

Ok Ji Paik, M.D.<sup>1</sup>, Hee Kyung Park, D.D.S.<sup>2</sup>, Jong Min Chae, M.D.<sup>3</sup>  
Jyung Sik Kwak, M.D.<sup>3</sup> and Tae Joong Sohn, M.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Wallace Memorial Baptist Hospital,

<sup>2</sup>Department of Oral Pathology, School of Dentistry and

<sup>3</sup>Department of Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University

The purpose of this study is to investigate the morphologic changes of the sinusoidal endothelial cells and the associated structures of the cirrhotic rat liver induced by repeat intraperitoneal injections of N-diethylnitrosamine (DEN) (100 mg/kg/week). One day to 6 weeks later, rat livers were observed under the light, transmission and scanning electron microscopy, and immunostained with laminin antibody. Two weeks after DEN treatment, the fibrillar material in Disse's space was noted, and then a basement membrane-like structure was found at 4 weeks after treatment. Laminin was detected in perisinusoidal areas after 4 weeks. Laminin was strongly positive on the fibrous septum and in the sinusoidal wall of cirrhotic nodules after 6 weeks of treatment. The diameters and numbers of sinusoidal endothelial fenestrations did not change significantly until 2 weeks. They decreased within 4 weeks, and then the sinusoidal endothelium was poorly fenestrated at 6 weeks after DEN treatment. These results suggest that as fibrosis develops in cirrhosis, the deposit of extracellular matrix such as laminin within Disse's space is a major contributing factor in the structural alteration of sinusoidal endothelial cells, and the capillarization of the sinusoidal endothelial cells may be a contributor to impairment of the hepatic function in cirrhosis. (*Korean J Pathol* 1996; 30: 604~615)

**Key Words:** Rat liver, Cirrhosis, Sinusoidal endothelial cell, Laminin, Scanning electron microscopy

## 서 론

간경변증은 지속적이고 반복적인 미만성 간손상으로 간내 섬유화 및 재생 결절이 형성되는 것이다. 그러나 간섬유화가 일어나는 정확한 기전이나 이로 인한 간 기능의 장애가 초래되는 기전에 대하여서는 명확하지가 않다. 현재까지의 보편적인 관점은 반복적인 간손상으로 간실질 세포의 상해 또는 괴사가 간내 섬유질 생산을 유발하게 하며, 이에는 Ito 세포가 myofibroblastic 세포로 바뀌어 세포외 기질을 생산하게 되는 것으로 알려져 있다<sup>1-2</sup>. 그러나 폐쇄성 담즙성 간경변증의 경우에는 일반적으로 괴사나 염증성 변화가 광범위하지 않으면서도 섬유화가 많이 일어나며, 간세포의 상해가 일어난 부위와 섬유화가 초래되는 부위가 반드시 일치하지도 않는다<sup>3</sup>. 또 어떤 만성 간질환에서는 뚜렷한 간세포의 괴사 없이도 간의 섬유화가 진행될 수도 있다<sup>4</sup>. 그러므로 세포외 기질 단백 생산을 촉발시키는 요인이 질병에 따라 여러 가지 다른 기전에 의하여 일어난다고 추측할 수 있으나 이에 대하여는 아직도 명확한 해답을 내릴 수는 없다.

많은 만성 간질환에서 세포외 기질의 변화가 초래된다. 간섬유화의 진행에서 기저막 성분의 교원질과 그와 연관된 단백 물질이 많이 증가된다<sup>5,6</sup>. 정상적으로는 성숙 흰쥐 및 사람의 간의 동양혈관 주위에는 매우 적은 양의 세포외 기질만이 관찰된다<sup>7</sup>. 간의 동양혈관 내피세포에는 다른 상피세포나 혈관 주위와는 달리 연속적인 기저막이 결핍되어 있다<sup>8</sup>. 그러나 만성 간질환에서 섬유화 및 동양혈관이 모세혈관화(capillarization)하는 동안에 혈관 주위에 세포외 기질의 침착을 보인다. 전자현미경 관찰에서 간경변증이 진행함에 따라 간의 동양혈관 주위의 변화로 Disse 강에 섬유성 물질이 증가하고 나아가 내피세포 아래에는 점차 연속적인 기저막을 형성한다. 경우에 따라서는 혈관 외피세포까지도 만들게 된다. 그리고 동양혈관 주위 세포인 Ito 세포나 Kupffer 세포의 숫적 감소도 인정된다<sup>8,9</sup>. 최근 면역조직화학적 기법의 발달로 간의 동양혈관 주위에 축적되는 세포외 기질의 성분에 대하여 많이 알려졌는데 기저막의 주요 성분인 laminin, 4형의 collagen, perlecan 등의 분포와 기저막 성분 단백을 만들어 내는 세포들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

간경변증에서 간세포의 기능 저하 나아가 간기능 부전증을 초래하는 정확한 기전에 대하여 아직도 많은 논란이 있다. 물론 간경변증의 원발 원인에 따

른 개개의 간세포의 대사 능력의 장애를 중요시하는 학자<sup>10,11</sup>가 있는가 하면, 간경변증에서 실제로 간세포의 숫적 감소나 용적의 감소는 미미하기<sup>12</sup> 때문에 간세포 자체는 거의 정상 기능을 갖고 있지만 간 섬유화에 따른 간내 혈액의 순환 장애를 근본적인 원인으로 보고 간경변증에 있어서 간실질내의 구조적 변형에 관심을 갖는 학자들<sup>13-15</sup>도 많다. 정상적으로 간의 동양혈관을 둘러싸고 있는 내피세포는 연속적으로 연결된 기저막이 없고 그 세포막에는 작은 창을 많이 갖고 있기 때문에 간세포와 동양혈관 내의 혈액과의 사이에 비교적 분자량이 많은 물질까지도 매우 용이하게 물질 교환이 이루어지고 있다<sup>13</sup>. 그러나 간경변증이 일어나면 이러한 내피세포의 창이 소실되어 막히게 된다<sup>8,14,15</sup>. 그렇게 되면 혈액과 간세포 사이에 물질 교환이 쉽지 않게 되어, 결국 영양 및 산소의 통과를 어렵게 하여 간기능의 부전에 직접적인 원인이 될 것으로 추측된다. 실험적인 간경변증은 가장 널리 알려진 사염화탄소를 비롯한 여러 가지 약제에 의해 유발될 수 있다<sup>16,17</sup>. N-diethylnitrosamine(DEN)을 포함한 니트로자민류는 간세포암종을 일으킬 수 있는 발암 물질로 잘 알려져 있는데 니트로자민류는 그 자체로는 독성이 없으나 그 중간 대사 산물이 단백 합성을 억제시키고 리보솜의 형태를 변화시켜 결국에는 세포의 괴사를 초래하게 한다. 그 대사는 간에서 전적으로 이루어지기 때문에 전신적인 투여를 하여도 선택적으로 간세포에만 독성 작용을 일으킨다고 한다<sup>18</sup>. 니트로자민류는 쥐<sup>19</sup>와 개<sup>20</sup>에서 일정 기간 간격으로 반복 투여를 하면 간경변증을 일으키고, 그 조직학적 양상과 임상적 증상이 사람에서의 간경변증과 유사하기 때문에 간경변증의 좋은 실험 모델로 이용되고 있다. 이에 저자들은 DEN을 흰쥐에 주사함으로써 사람에서와 유사한 간경변증을 유발시키고 간 동양혈관 내피세포의 변화와 Disse 강의 세포외 기질 물질의 침착과의 관련성을 알아 보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 처치

체중 약 200 g 정도의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 일정기간 사육한 후 건강이 양호하다고 인정되는 것을 실험에 사용하였다. 실험은 N-Diethylnitrosamine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 100 mg/Kg/week을 복강 내로 주사하여 1일, 3일, 1, 2, 3,

4, 5 및 6주 후 관찰 군으로 나누었다. 각 군마다 실험에 사용한 동물은 3 마리였다. 대조군으로는 생리식염수 0.5 ml를 실험군과 동일한 기간 주사하였으며 사용한 동물은 3 마리였다. 실험 동물은 에테르 마취하에 흉강을 열고 흉부 대동맥을 통해 23 gauge 폴리에틸렌관을 삽입한 후 0.5% sodium chloride와 0.4% sodium citrate를 혼합한 용액으로 혈관 내를 관류하여 유동혈을 제거한 다음 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 액을 관류하여 20분간 고정하였다. 그 후 간조직을 채취하여 광학현미경, 면역조직화학적, 투과전자현미경 및 주사전자현미경 관찰에 이용하였다.

## 2. 광학현미경 관찰

채취한 조직을 세절하여 10% formaldehyde에 4시간 더 고정을 하였다. 그 후 탈수 및 파라핀으로 포매를 하고 hematoxylin-eosin 염색을 하여 관찰하였다.

면역조직화학 관찰: 파라핀 포매로 만든 블록을 5~7  $\mu$ m 두께로 박절한 다음 탈파라핀 및 합수 과정을 거쳐 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 30분간 내재성 peroxidase의 활성을 억제시킨 후에 0.1 M phosphate buffer saline (PBS)으로 세척하였다. 0.2% pepsin (0.01 N HCl)으로 1시간 동안 항원성을 노출시킨 후 PBS으로 세척하였다. 정상 말 혈청으로 비특이 반응을 봉쇄한 후 mouse의 EHS 육종에서 분리한 laminin에 대한 항체(Rabbit anti-mouse laminin, ICN Biomedicals Inc., USA)로 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 이 항체는 사람과 흰쥐의 laminin에도 교차반응이 일어나는 것이 확인되어 있다<sup>4</sup>. 그 후 biotin 결합한 항 토끼 면역 글로블린(Vector laboratories Inc., USA)으로 30분간 반응하였다. 세척 후 avidin-biotin-peroxidase-complex (Vector laboratories Inc., USA)로 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 발색을 하고, 수세 후 hematoxylin으로 대비염색을 하여 관찰하였다.

## 3. 투과전자현미경 관찰

간조직을 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 자른 후 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 0~4°C)에 2시간 동안 전고정을 하고 완충액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정을 하고 완충액으로 세척하였다. 세척한 조직은 계열 알콜로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 epon mixture에 포매하였다. 중합이 끝난 조직을 1  $\mu$ m

의 두께로 박절하여 alkaline toluidine blue 염색을 하여 관찰 대상을 선정하였다. 선정된 부위를 40~60 nm로 초박절하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 가속전압 75 kV에서 Hitachi H-7000 전자현미경으로 관찰하였다.

## 4. 주사전자현미경 관찰

동양혈관 내피세포를 관찰하기 위하여 간조직을 1×1×6 mm의 크기로 세절한 다음 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde의 혼합액에 24시간 더 고정하고, 완충액으로 수세한 다음 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정을 하였다. 그 후 시료는 2% tannic acid에 2시간 동안 침투시킨 후 완충액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide 용액에 2시간 동안 도전 염색을 한 후 Hitachi HCP-2형 임계점 건조기에서 액체 이산화탄소를 사용하여 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료는 forceps를 이용하여 부러뜨렸다. 절단된 시료를 시료판에 부착하여 Eiko사제 VX-10A형 ion coater로 백금을 약 8 nm의 두께로 증착한 후 가속 전압 20 kV에서 Hitachi S-800 냉전계 방사형의 주사전자현미경으로 관찰하였다. 세포내 소기관을 주사전자현미경으로 관찰하기 위한 재료는 1×1×3 mm의 크기로 세절한 다음 완충액에 수세를 하고 1% osmium tetroxide 용액에 2시간 동안 후고정을 하였다. 그 후 다시 완충액으로 수세한 다음 25% 및 50% dimethyl sulfoxide 용액에 각각 30분간 침투시킨 후 액체 질소를 이용하여 동결 할당하였다. 할당된 조직을 50% dimethyl sulfoxide 용액에서 녹인 후 완충액으로 수세하였다. 시료는 1% osmium tetroxide 용액에 1시간 동안 incubation시킨 후 0.1% osmium tetroxide 용액으로 20°C에서 2~5일간 maceration을 시행하였다<sup>21</sup>. 그 후 시료를 2% tannic acid에 2시간 동안 침투시킨 다음 완충액으로 세척하고 1% osmium tetroxide 용액에 1시간 동안 도전 염색을 하여 Hitachi HCP-2형 임계점 건조기에서 액체 이산화탄소를 사용하여 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료를 시료판에 부착하여 Eiko사제 VX-10A형 ion coater로 백금을 약 3 nm의 두께로 증착한 후 가속 전압 20 kV에서 Hitachi S-800 냉전계 방사형의 주사전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 광학현미경 소견

DEN 투여 1일 후 간세포들은 조금씩 팽대되어

있었고 소엽내에 군데군데 염증세포의 침윤과 간세포 개개의 호염기성 퇴행성 변화가 초래되어 있었다. 소엽의 간세포삭은 다소 불규칙하여졌다. 동양혈관 내의 Kupffer 세포도 뚜렷하게 인지되었다. DEN 투여 3일 후에는 염증이 많이 소실되고 간세포의 팽대도 줄어들어서 비교적 간소엽의 형태를 잘 유지하고 있었다. 간문맥에서는 별 변화가 관찰되지 않았다. 실험 1주일 후에는 소엽 내의 간세포들이 비교적 정상이었으나 문맥역은 넓어졌으며 중심정맥 주위와 간문맥 주위에 경도의 염증이 남아 있었다. 실험 2주 및 3주 후에는 소엽내의 염증변화가 증가하였고 간세포의 퇴행성 변화와 호산성 변화도 자주 관찰되었다. 개개의 간세포들도 팽대되어 있었고 간세포삭이 다소 불규칙적이었다. 문맥정맥과 중심정맥은 확장되었고 문맥역은 매우 넓어지고 세담관의 증식이 관찰되기 시작하였다. DEN 투여 4주 후부터 저배율 관찰에서 뚜렷한 결절성 변화를 보이고 결절의 크기가 다양하였다. 간소엽 주위로 섬유화가 증가되었으며 세담관의 증식도 많이 관찰되었다. DEN 투여 6주 후에는 간의 전체가 크고 작은 결절들로 구성되어 있었으며 섬유 조직으로 구성된 격벽이 매우 두꺼워졌다. 재생결절 형성과 만성 염증세포의 침윤도 관찰되었으며 개개의 간세포는 풍선양 변성 및 국소 괴사를 보였다(Fig. 1).

## 2. 면역조직화학적 소견

정상 대조군의 간조직에서 laminin에 대한 반응은 문맥역의 혈관과 담세관 주위에 선상으로 강하게 염색되었으며 중심정맥 주위에도 환상으로 염색되었다. 그러나 동양혈관 주위에는 Ito 세포의 세포질 외에는 전혀 반응하지 않았다(Fig. 2). 실험군에서는 DEN 투여 2주 후까지 laminin에 대한 반응의 증가를 인정할 수가 없었다. 그러나 DEN 투여 3주에는 문맥역이 넓어지면서 laminin에 대한 반응이 증가되었고, 소엽내의 동양혈관 주위에는 문맥역 가까이에서 불연속적으로 관찰되기 시작하였다. 실험 4주 후에는 간소엽의 동양혈관 벽을 따라서 laminin의 염색이 부분적으로 연속된 선상으로 나타났으며(Fig. 3), 그 후 점차 증가하여 DEN 투여 6주 후에는 간소엽의 결절 사이로 두꺼운 섬유성 격벽과 전 간소엽 또는 재생결절내의 동양혈관 주변에 연속적으로 강 양성 반응이 일어났다(Fig. 4).

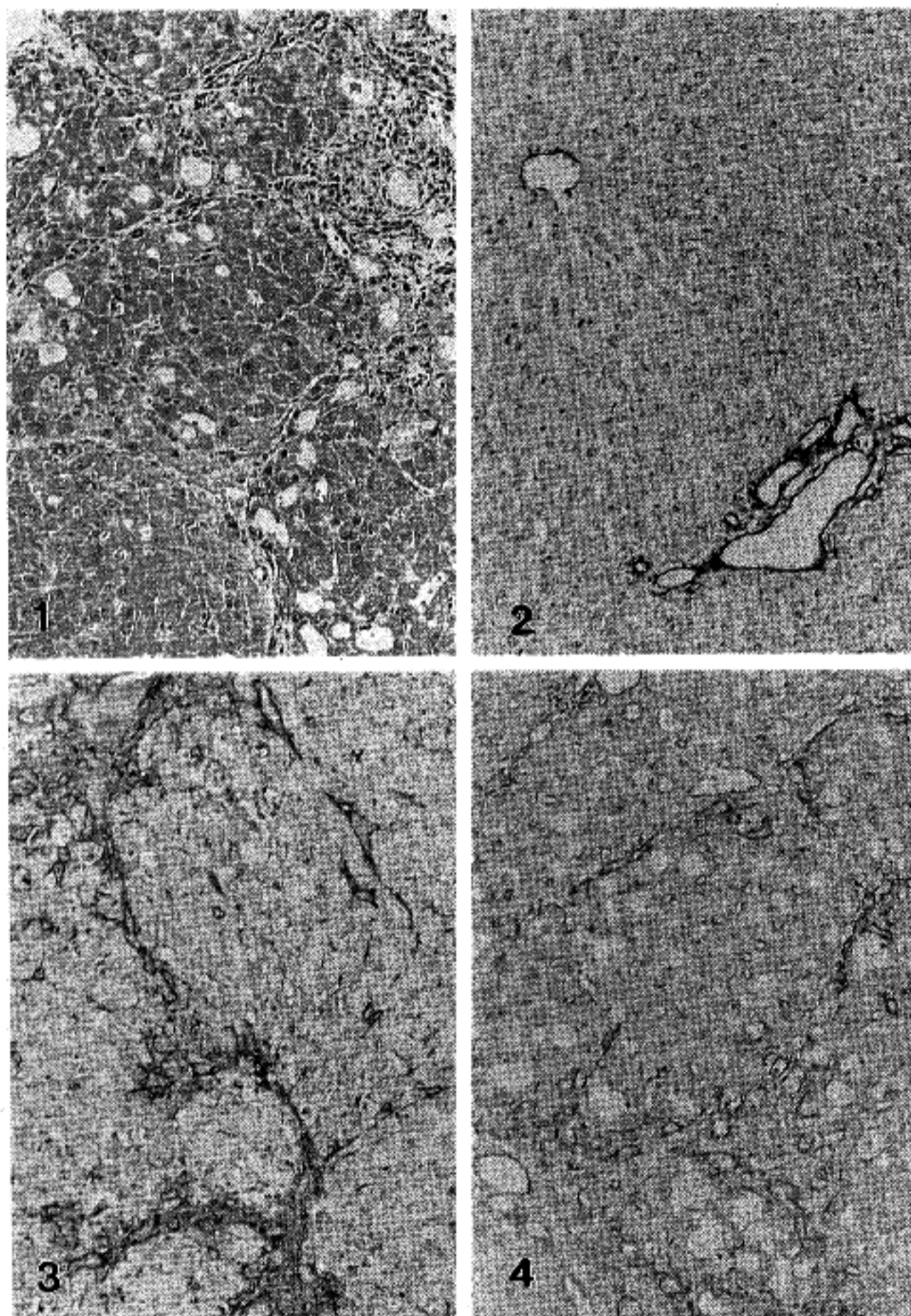
## 3. 투과전자현미경 소견

DEN 투여 1일과 3일 후 관찰에서 간세포는 전반적으로 부풀어 있었고 군데군데 심한 상해를 입은

간세포가 관찰되었다. 세포질에는 미토콘드리아의 기질의 밀도가 전반적으로 낮아졌으며 모양도 아주 불규칙하였다. 이차 리소솜도 많이 관찰되었다. 그러나 동양혈관 쪽 간세포의 세포질에는 매우 발달된 미세용모가 잘 유지되고 있었고, 동양혈관 주위에서는 내피세포가 경도의 종창을 보이는 것 이외는 별다른 소견이 없었다. Disse 강의 물질 침착도 관찰할 수가 없었다. DEN 투여 2주일 후부터는 간세포의 크기가 점차 불규칙하였고 간세포 세포질의 전자밀도도 다양하였다. 세포질내에서는 미토콘드리아의 변형이 많이 관찰되었고 RER이 적어지는 반면 SER이 많이 발달하여 파리 모양으로 서로 연결되어 있었다. 간세포의 퇴행성 변화도 관찰되었다. 동양혈관 쪽의 미용모는 많이 소실되었고 부분적으로 완전히 평탄화된 곳도 있었다. 그리고 Disse 강은 팽창되어 있었고 그 안에는 여러 가지 물질이 들어 있었으며 간혹 전자 밀도가 높은 물질의 축적도 관찰되었다. 동양혈관 내피세포는 팽창되어 있었고 때때로 세포내 소기관이 발달되어 있는 세포와 소실되어 있는 세포, 또 괴사에 빠진 세포들도 관찰되었다. DEN 투여 4주 후에는 간세포의 크기가 매우 불규칙하였고, 간세포 사이에 동양혈관의 주행이 관찰되지 않는 곳이 많았다(Fig. 5A). 대부분의 간세포 표면에 미용모가 소실되었고 Disse 강은 매우 불규칙하게 확장되어 있었다. Disse 강내에는 잔물결 모양의 전자밀도가 높은 물질의 침착이 보였으며 군데군데에서 잘 발달된 교원 섬유와 탄력 섬유질의 양상도 많이 관찰되었다. 동양혈관 내피세포 아래 또는 동양혈관 쪽의 간세포막에는 불연속적인 기저막 유사 물질이 관찰되었다(Fig. 5B). 동양혈관 내피세포의 세포질은 매우 가늘어져 있었고 불규칙적인 양상이었다. DEN 투여 6주 후에는 간세포들의 크기가 더욱 불규칙하였고 섬유질의 증식이 많았다. 동양혈관들은 대단히 팽창되거나 부분적으로 파괴되어 무질서한 양상을 띠었다. 동양혈관 주위의 Disse 강에는 여러 가지 무정형 물질의 축적이 있었으며 군데 군데에서 잘 발달된 연속적인 기저막이 형성되어 있었다(Fig. 6).

## 4. 주사전자현미경 소견

정상 대조군 간세포의 세포질에는 매우 발달된 RER 및 SER이 분포되어 있었고, 매우 규칙적인 원형내지 타원형의 미토콘드리아가 차 있었다(Fig. 7). 시료를 건조한 후 절단하여 관찰한 간조직에서 간세포삭이 규칙적으로 배열되어 있었고 간세포삭과 간세포삭 사이에는 동양혈관이 주행하고 있었다. 동

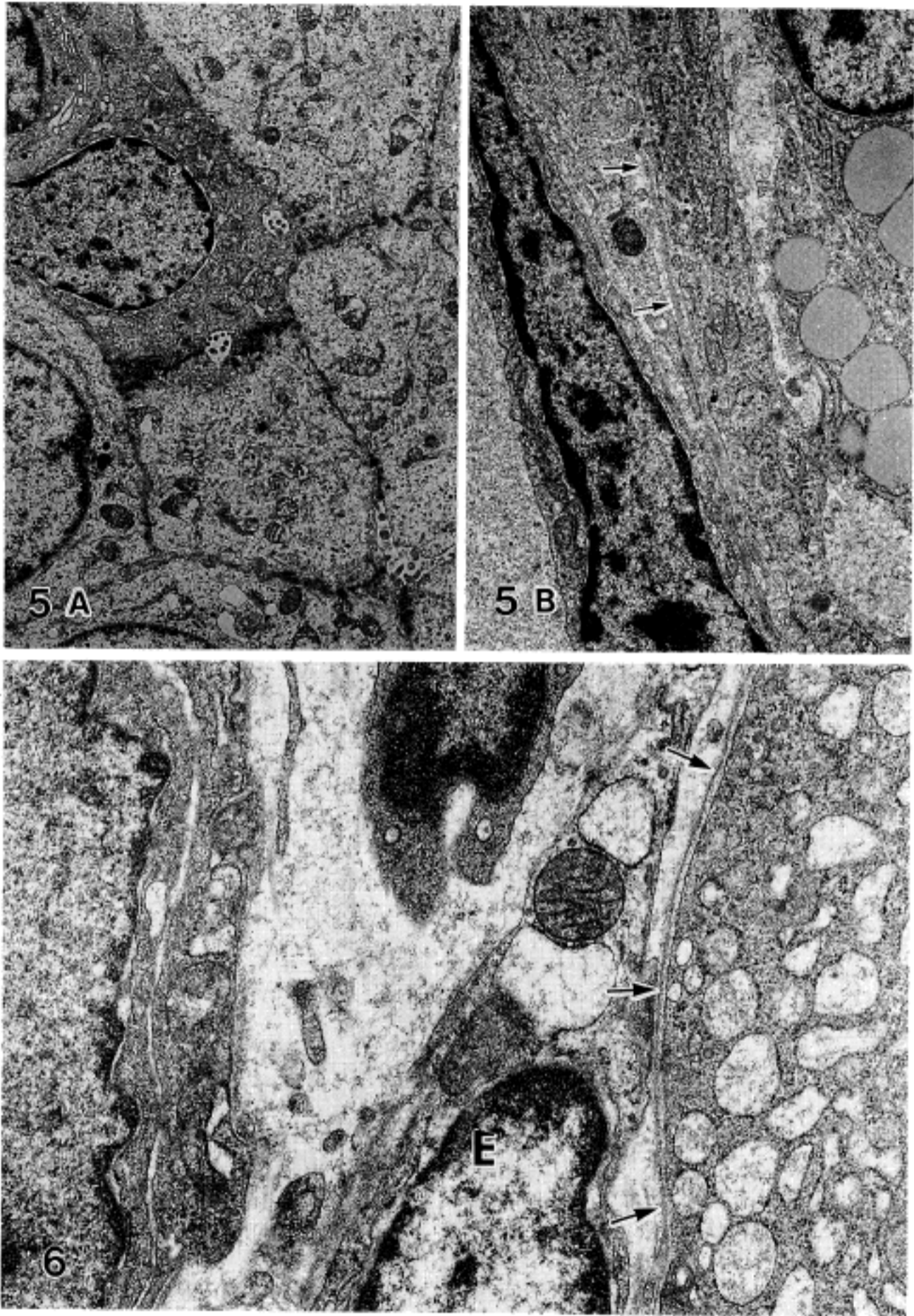


**Fig. 1.** Light microscopy of the cirrhotic rat liver after 6 weeks of diethylnitrosamine treatment. Note diffuse nodular transformation of lobules with fibrosis.  $\times 300$ .

**Fig. 2.** Light microscopy. Immunolocalization of laminin in normal control rat liver. No staining is noted in the space of Disse, but staining is seen in the surrounding of the portal veins, bile ductules and central vein.  $\times 300$ .

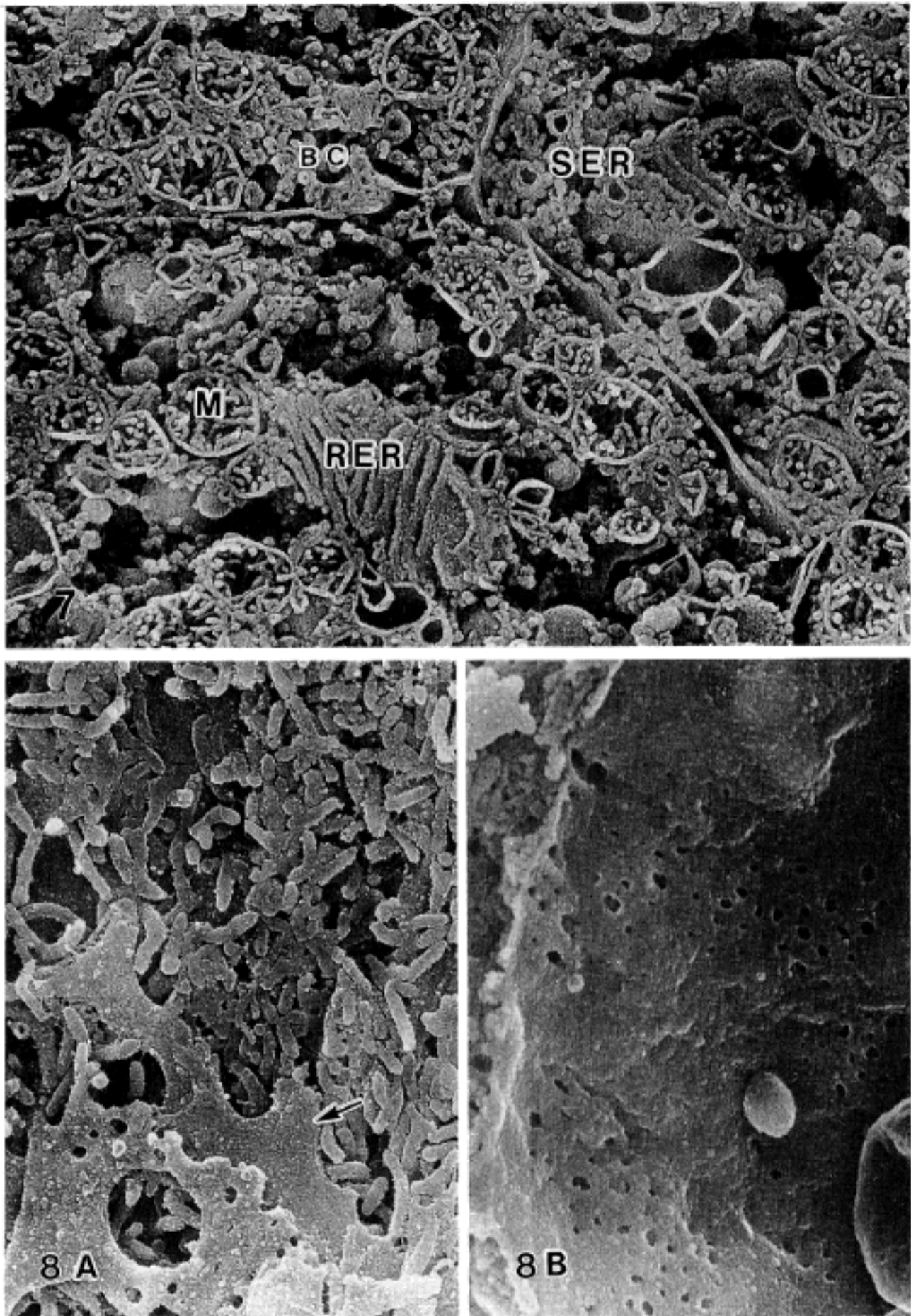
**Fig. 3.** Immunolocalization of laminin in rat liver after 4 weeks of diethylnitrosamine treatment. Laminin is present as intermittent linear pattern in the sinusoids.  $\times 300$ .

**Fig. 4.** Immunolocalization of laminin in rat liver after 6 weeks of diethylnitrosamine treatment. Laminin is strongly positive on the fibrous septa and in the sinusoids. Also, note the extensive proliferation of bile ducts surrounded by laminin.  $\times 300$ .



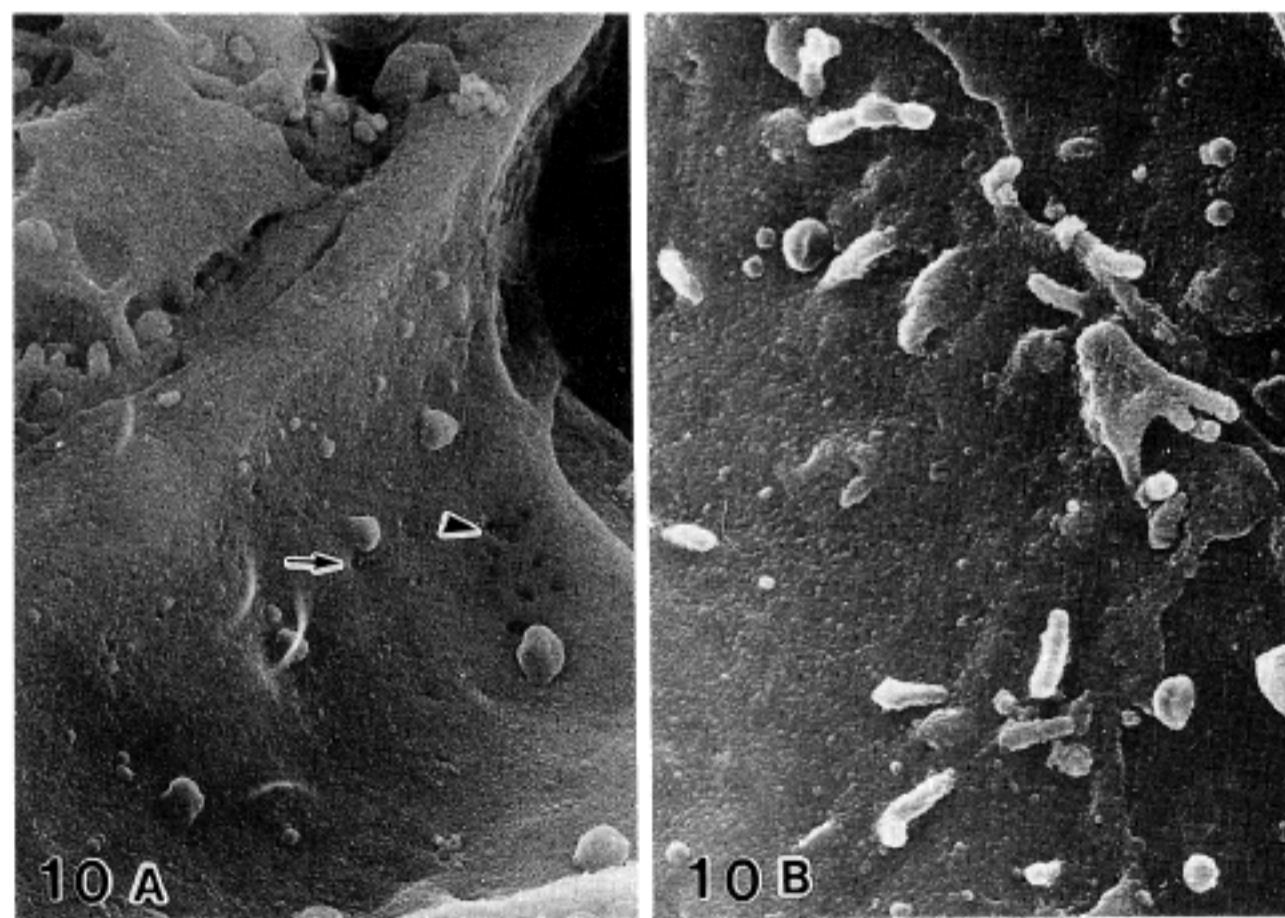
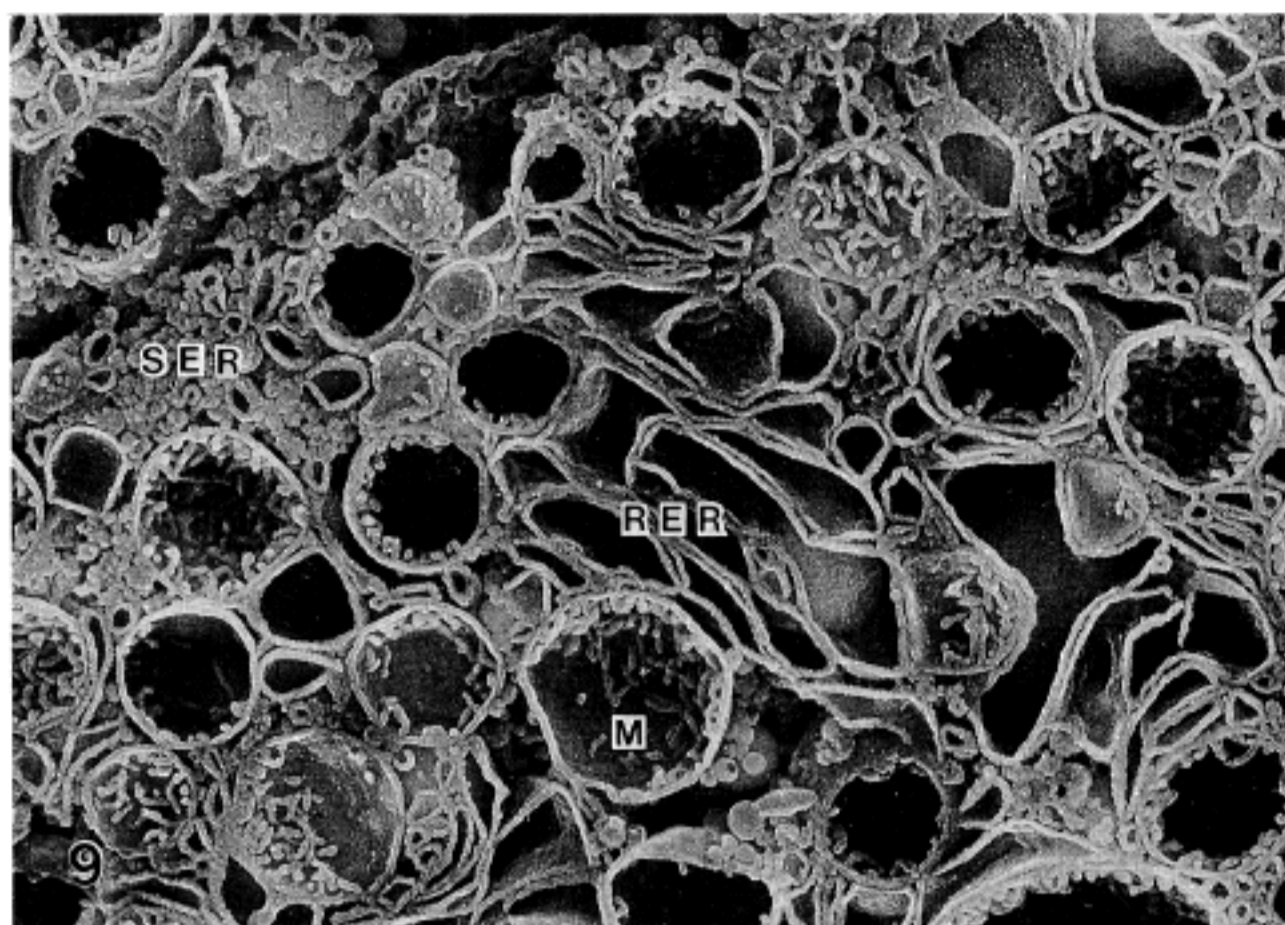
**Fig. 5.** Transmission electron micrographs of the rat liver after 4 weeks of diethylnitrosamine treatment. A: The hepatocytes are irregular in size and shape. Note loss of the normal sinusoidal arrangement.  $\times 14,000$ . B: Basement membrane-like structures (arrows) are visible in Disse's space.  $\times 14,000$ .

**Fig. 6.** Transmission electron micrograph of the rat liver after 6 weeks of diethylnitrosamine treatment. Well-formed, continuous basement membrane structures (arrows) are present along the sinusoidal surface of hepatocyte. E: Endothelial cell.  $\times 16,000$ .



**Fig. 7.** Scanning electron micrograph of the normal rat liver. The intracellular organelles of three hepatocytes are revealed. M: Mitochondria, RER: Rough endoplasmic reticulum, SER: Smooth endoplasmic reticulum, BC: Bile canaliculus.  $\times 10,000$ .

**Fig. 8.** Scanning electron micrographs of the normal rat liver. A: Numerous regular arranged microvilli are present on the sinusoidal surface of hepatocyte. A sheet of thin sinusoidal lining cell possesses fenestrae. Underneath the endothelium is identified a cytoplasmic process of the Ito cell (arrow).  $\times 14,000$ . B: Note numerous fenestrae in sieve plate of sinusoidal endothelium.  $\times 16,000$ .



**Fig. 9.** Scanning electron micrograph of the degenerated hepatocytes from the rat liver after 3 weeks of diethylnitrosamine treatment. The round mitochondria (M) have short cristae. The rough endoplasmic reticulum (RER) are dilated and loss their ribosomes. The smooth endoplasmic reticulum (SER) appear vesicular form.  $\times 10,000$ .

**Fig. 10.** Scanning electron micrographs of the endothelial cells from the cirrhotic rat liver after diethylnitrosamine treatment. A: The inner surface of the endothelium shows smooth and flat appearance. Small-sized fenestrae are sparse and occur either singly (arrow) or arranged in sieve plate (arrow head). (at 4 weeks treatment).  $\times 12,000$ . B: Three plates of the sinusoidal endothelium are revealed. These endothelium are poorly fenestrated. (at 6 weeks treatment).  $\times 13,000$ .



양혈관 쪽의 간세포막은 매우 많은 미세융모로 구성되어 있었고 때때로 Ito세포의 세포질 돌기가 관찰되었다(Fig. 8A). 동양혈관 내피세포에는 많은 창들이 일정하게 배열되어 열려 있었다. 크기는 대략 80~200 nm 정도였다. 창들은 무리를 지어 있기도 하고 때로는 개개로 떨어져 단독으로 존재하였다. 내피세포의 표면은 비교적 평활하였다(Fig. 8B). 그러나 실험군의 경우에는 DEN 투여 후 군데 군데에서 퇴행성 변화를 보이는 간세포들이 관찰되었다. 퇴행성 변화가 일어난 간세포에서는 미토콘드리아가 팽대되거나 cristae가 짧아지는 등 다양한 형태로 변형이 일어나 있었다. 전반적으로 팽창된 RER에서는 리보솜이 탈락되었고 SER도 팽창되어 작은 파리모양으로 구성되어 있었다(Fig. 9). 건조 후 절단된 간조직에서는 간세포삭이 매우 불규칙하였고 간세포 주위로 많은 섬유질이 엉키어 있기 때문에 동양혈관을 인지하기가 어려웠다. 노출된 동양혈관 내피세포에는 창들의 숫적 감소를 보였고 남아 있는 창들의 크기는 매우 작았다. DEN 투여 3주 후부터 창들이 감소하기 시작하였고(Fig. 10A), 실험 5 및 6주 후에는 내피세포의 창이 거의 폐쇄되어 있었다. 내면은 울퉁불퉁하였고 곳곳에 작은 돌기를 갖고 있었으며 때로는 유두 모양으로 돌출된 곳도 관찰되었다. 동양혈관의 창은 매우 작아져 있었고, 드물게 함몰된 점상의 흔적만 관찰되었다(Fig. 10B).

## 고 찰

간의 동양혈관은 특별한 형태의 모세혈관이다. 동양혈관을 둘러싸고 있는 내피세포는 일반적으로 다른 장기에서 관찰되는 모세혈관의 내피세포와는 달리 바깥 쪽으로 일정하게 연속된 기저막이나 혈관 외피세포가 없으면서 세포질에는 많은 창이 있다. 그리고 그 주위에는 Ito 세포, Kupffer 세포, pit 세포, 상주 대식구 등의 세포들이 있다<sup>8,13</sup>. 그리고 Disse 강은 동양혈관 벽과 간세포 사이의 좁은 영역으로 그 강에는 적은 양의 1, 3, 4, 및 5형의 collagen, laminin, fibronectin, proteoglycans 등의 세포외 기질의 성분을 함유하고 있고 간세포의 세포막에는 미융모가 잘 발달되어 있다<sup>7</sup>. 따라서 동양혈관 내피세포는 연속적으로 연결된 기저막이 없고, 세포질에 작은 창들이 많이 있는 구조적 특성을 갖고 있으면서 또 endocytosis의 능력이 높기 때문에 동양혈관 내의 혈액과 간세포와의 사이에는 고분자량의 물질까지 매우 용이하게 물질 교환이 이루어지고 있다<sup>13</sup>. 그러나 여러 가지 만성 간질환에서 동양혈관 내피

세포의 변화가 관찰되는데 특히 내피세포의 세포질에 있는 창들의 변화도 다양하게 일어나고 있다. 내피세포에 있는 창들의 숫적 그리고 크기의 변화를 기존의 투과전자현미경으로는 관찰하기가 매우 곤란하다. 그러나 혈액을 제거하고 관류 고정을 하여 내피세포를 노출시킨 다음 주사전자현미경으로 입체적 관찰을 하면 내피세포에 있는 창들의 분포나 숫적 변화 등을 비교적 용이하게 볼 수가 있기 때문에 최근에 동양혈관 내피세포의 미세구조와 Disse 강의 변화에 대하여 관심이 증가되었다. 본 실험에서 DEN 투여 3주 후부터 내피세포의 창들의 변화가 보이기 시작하였는데 개개의 크기가 줄어들고 숫적 감소를 보였다. 시간이 지남에 따라 그 정도가 심하여져 DEN 투여 6주 후에는 내피세포의 표면에 창이 매우 드물게 되어 대부분의 동양혈관이 막힌 형태가 되었다. 이러한 현상은 흰쥐에게 thioacetamide<sup>15</sup>나 사염화탄소<sup>22</sup>를 투여하여 간의 섬유화를 유도시킨 경우에서도 비슷한 소견이 관찰되었으며, 사람의 만성 간경변증의 재생 결절 주변에서도 흔히 관찰되는 소견이다<sup>8</sup>. 내피세포의 창들의 크기에 대하여서는 알콜, 동양혈관내의 압력 증가, 사염화탄소 중독, 저산소증, 방사선에 노출, 내독소 등에 의하여 그 크기가 증가되며, serotonin, noradrenalin 등에 의하여 크기가 줄어들어 가는 것이 관찰되었다<sup>13</sup>. 그리고 창들의 숫적 감소는 알콜성 간경변증, 간암, 유전분증, 담즙 울체증, 급성 이식거부 등의 경우에서 나타난다<sup>8</sup>. 동양혈관 내피세포의 창들의 변화에 대한 의의를 일률적으로 설명할 수는 없으나 간세포의 기능과 밀접한 관련이 있을 것으로 추측된다. 결론적으로 DEN으로 유발된 간섬유화가 진행되는 동안에 동양혈관 내피세포의 창은 숫적 감소와 함께 크기도 동시에 감소하는 것으로 보인다. 간경변증에서 간세포의 기능 저하 나아가 간기능 부전증을 초래하는 기전은 아직도 명확하지 않다. 간 섬유화에 따른 간내 혈액의 미세 순환 장애가 한가지 중요한 요인으로 보인다. 그 중에서도 간경변증으로 동양혈관 내피세포의 창이 감소내지는 완전히 막히게 되면 혈액과 간세포 사이에 물질 교환이 용이하지 않게 되며 결국 영양 및 산소의 통과에 커다란 장벽이 형성되어 이것이 간기능의 부전의 직접적인 원인이 될 것으로 추측된다. 실제로 실험적 간경변증을 유도한 다음 간세포의 섭취 능력을 측정한 실험에서 혈액내로 유입된 고분자량의 물질을 간세포가 쉽게 섭취하지 못하는 것을 보여 주었다<sup>22</sup>. 본 실험에서 DEN을 소량 반복 투여하여 유도된 간경변증에서도 초기에 간세포의 상해가 그리 심하지 않았고 시기적

으로 내피세포의 다공 구조의 변화가 먼저 초래되는 것으로 보아 동양혈관 내피세포의 창이 막히는 것이 만성 간경변증에서 간세포 기능의 장애를 초래하는 결정적인 원인이 될 것으로 믿어진다.

만성 간 섬유화가 일어나는 질환에서 동양혈관 주위에도 섬유화의 진행과 함께 동양혈관의 모세혈관화(capillarization)가 일어난다. 동양혈관의 모세혈관화는 동양혈관 내피세포에 창이 소실되는 것과 동시에 점차 내피세포 외벽에 연속적인 기저막을 형성하게 되면서, 주변의 perisinusoidal 세포가 혈관 외피세포로 바뀌고 동양혈관 내의 Kupffer 세포가 없어지는 등 혈관의 구조가 일반의 모세혈관의 구조와 같은 모양으로 바뀌는 것으로 일반적으로 만성 간경변증과 실험적으로 유도된 간경변증에서 공통적으로 관찰되는 소견이다. 그리고 만성 간질환에서 섬유화 및 동양혈관이 모세혈관화하는 동안에 동양혈관 주위 Disse 강에는 뚜렷한 세포외 기질의 침착을 보인다. DEN으로 유도된 간경변증에서도 DEN 투여 4주 후부터 투과전자현미경 관찰에서 간의 Disse 강에 섬유성 물질이 증가하였고, 불연속적인 기저막의 형성을 볼 수가 있었다. DEN 투여 6주 후에는 여러 군데에서 동양혈관 내피세포 아래에 연속적인 기저막의 형성을 관찰할 수가 있었다. 많은 만성 간질환에서 Disse 강외 세포외 기질의 변화가 초래된다. 간섬유화의 진행에서 Disse 강에 기저막 성분의 교원질과 그와 연관된 단백질의 축적이 일어나는데, 주로 laminin, 4형의 collagen, fibronectin, perlecan 등 기저막의 주요 구성 성분들이다<sup>5,6,23</sup>. 그 중에서도 laminin은 고분자량을 갖는 glycoprotein으로 신생 혈관 구축을 촉진시키는 물질로 관심의 초점이 되고 있다. laminin은 정상적으로 주로 Ito 세포와 동양혈관 내피세포에서 소량 생산되지만 간경변증의 진행되는 동안에는 간실질 세포의 상해 또는 괴사가 생산 촉진인자로 작용하여 Ito 세포가 myofibroblastic 세포로 바뀌면서 세포외 기질을 많이 생산하게 된다. 또 간경변증의 경우에 간세포도 laminin의 생산에 직간접으로 관여하는 것으로 보인다<sup>24,25</sup>. 기저막 성분의 laminin과 함께 사람의 제대정맥과 진피의 미세혈관에서 추출한 내피세포를 조직 배양한 실험에서 내피세포의 관 구조 (tube structure) 형성이 촉진되며, 반대로 항 laminin과 함께 배양한 경우에는 억제되었다<sup>26,27</sup>. 또 다른 배양 실험에서 4형의 collagen과 laminin이 대동맥 내피세포의 접착(adhesion)과 유주를 촉발시키며, 특히 collagen은 혈관 신생과 큰 혈관의 수복에 중요할 것이라는 결론을 얻었다<sup>28</sup>. 따라서 혈관 신생과 모세혈관의 구조의

구축에는 laminin을 포함한 세포외 기질이 매우 중요한 역할을 할 것으로 추측되어진다. 본 실험에서 관찰한 바와 같이 간의 동양혈관의 경우에서도 laminin의 검출과 일치하여 동양혈관에 창이 소실이 일어나며 모세혈관화가 진행되는 것으로 보아 간경변증에서 Disse 강에 증가된 laminin을 포함한 기저막 성분이 동양혈관의 구조적 변형을 일으키는 직접적인 원인으로 보인다.

따라서 DEN으로 유도된 실험적인 간경변증에서 동양혈관 내피세포의 다공성의 소실 및 기저막의 형성 등의 변형으로 동양혈관 내의 혈액과 간세포 사이의 물질 교환의 장애가 일어나며 이것이 간경변증에서 간세포의 기능 저하 나아가 간기능 부전증을 초래하는데에 중요한 기여를 할 것으로 믿어진다. 동양혈관 내피세포의 변형은 Disse 강에 laminin을 포함한 세포외 기질의 축적이 그 원인으로 생각된다.

## 요 약

실험적 간경변증에서 Disse 강외 세포외 기질의 침착에 따른 동양혈관 내피세포의 변화를 알아보고자 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에 N-Diethylnitrosamine (DEN) 100 mg/Kg을 주 1회 반복해서 복강 내로 주사한 후 간경변증을 유발하고 최초 주사 후 1일, 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주에 각각 3 마리씩 도살하여 광학현미경, 면역조직화학적, 투과전자현미경 및 주사전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과 DEN 투여 2주 후부터 동양혈관 주위의 Disse 강에 세포외 기질의 축적이 일어났으며 4주 후부터 기저막을 형성하기 시작하였다. 면역조직화학적 관찰에서 laminin은 4주 후부터 동양혈관 주위에 연속적으로 염색되기 시작하였으며 실험 6주 후에는 섬유성 격벽과 전간소엽의 동양혈관 주위에 강하게 반응하였다. 동양혈관 내피세포의 주사전자현미경 관찰에서 DEN 투여 4주 후부터 다공성의 감소가 일어나 그 크기와 숫적 감소가 시작되었다. 6주 후에는 내피세포 벽에 창이 거의 소실되어 있었다. 따라서 DEN으로 유도된 실험적인 간경변증에서 동양혈관 내피세포의 다공성의 소실 및 기저막의 형성 등의 변형이 동양혈관 내의 혈액과 간세포 사이의 물질 교환을 어렵게 하여 간세포의 기능 저하 나아가 간기능 부전을 초래하는데에 중요한 기여를 할 것으로 믿어진다. 동양혈관의 내피세포의 변형은 Disse 강에 laminin을 포함한 세포외 기질의 축적이 그 원인으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Geerts A, Rauterberg J, Burt A, Schellinck P, Wisse E. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol* 1989; 9: 59-68.
2. Weiner FR, Giambrone M, Czaja MJ, Shah A, Annoni G, Takahashi S, Eghbali M, Zern MA. Ito-cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990; 11: 111-7.
3. Abdel-Aziz G, Rescan P, Clement B, Lebeau G, Rissel M, Grimaud J, Campion J, Guillouzo A. Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J Pathology* 1991; 164: 167-74.
4. Popper H, Lieber CS. Histogenesis of alcoholic cirrhosis in the baboon. *Am J Pathol* 1980; 98: 695-716.
5. Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 1979; 59: 241-8.
6. Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979; 2: 151-75.
7. Rojkind M. Extracellular matrix. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Second Edition. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. eds. Raven Press Ltd, New York, 1988: 707-16.
8. Bail BL, Bioulac-Sage P, Senuita R, Quinton A, Saric J, Balabaud C. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. *J Electron Microscopy Technique* 1990; 14: 257-82.
9. Schaffner F, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963; 44(3): 230-42.
10. Reichen J, Hoilien C, Le M, Jones RH. Decreased uptake of taurocholate and ouabain by hepatocytes isolated from cirrhotic rat liver. *Hepatology* 1987; 7: 67-70.
11. Pessayre D, Lebrec D, Descatoire V, Peignoux M, Benhamou JP. Mechanism for reduced drug clearance in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1978; 74: 556-71.
12. Gross JB Jr, Reichen J, Zeltner TB, Zimmermann A. The evolution of changes in quantitative liver function tests in a rat model of biliary cirrhosis: Correlation with morphometric measurement of hepatocyte mass. *Hepatology* 1987; 7: 457-63.
13. Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology* 1985; 5: 683-92.
14. McGuire RF, Montgomery Bissell D, Boyles J, Joseph Roll F. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 1992; 15: 989-97.
15. Mori T, Okanoue T, Sawa Y, Hori N, Ohta M, Kagawa K. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17: 891-7.
16. Daniel H, Prichard MML, Reynell PC. The portal circulation in experimental cirrhosis of the liver. *J Pathol Bacteriol* 1952; 64: 53-60.
17. Conn HO, Atterbury CE. Cirrhosis. In: *Diseases of the liver*. Schiff L, Schiff ER, eds. 6th ed. Philadelphia. Lippincott, 1987: 725-864.
18. Magee PN. Toxic liver injury: The metabolism of diethyl- nitrosamine. *Biochem J* 1956; 64: 676-83.
19. Ogawa H. Scanning electron microscopy of rat liver hyper- plastic nodules induced by diethylnitrosamine. *Scanning Electron Microsc* 1982; 4: 1793-8.
20. Madden JW, Gertman PM, Peacock Jr EE. Dimethylnitros- amine induced hepatic cirrhosis: A new canine model of an ancient human disease. *Surgery* 1970; 62: 260-8.
21. Tanaka K, Mitsushima A. A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *J Microsc* 1984; 133: 213-22.
22. Martinez-Hernandez A, Martinez J. The role of capillariza- tion in hepatic failure: Studies in carbon tetrachloride- induced cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 864-74.
23. Rescan PY, Loréal O, Hassell JR, Yamada Y, Guillouzo A, Clément B. Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *Am J Pathol* 1993; 142: 199-208.
24. Loréal O, Levavasseur F, Fromaget C, Gros D, Guillouzo A, Clément B. Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. *Am J Pathol* 1993; 143: 538-44.
25. Clément B, Rescan PY, Baffet G, Loréal O, Lehry D, Campion JP, Guillouzo A. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver and in primary culture. *Hepatology* 1988; 8(4): 794-803.
26. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the mor-

- phological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biology* 1988; 107: 1589-98.
27. Grant DS, Tashiro KI, Segul-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 1989; 58: 933-43.
28. Herbst TJ, McCarthy JB, Tsilibary EC, Furcht LT. Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. *J Cell Biology* 1988; 106: 1365-73.
-