

Dimethylnitrosamine 유발 백서 간섬유화에 있어서 TGF- β 1 유전자 산물의 세포성 분포

부산대학교 의과대학 병리학교실, 부산 해동병원 해부병리과*

이 숙 녀 · 박 도 윤 · 이 선 경

Cellular Distribution of TGF- β 1 Peptide in Dimethylnitrosamine Induced Fibrosis of Rat Liver

Sook Nyo Lee, M.D.^{*}, Do Youn Park, M.D.
and Sun Kyung Lee, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Pusan National University
Department of Surgical Pathology, Haedong Hospital*, Pusan, Korea

Recently attention has been focused on the biology of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). TGF- β 1, a potent regulator of cell proliferation, stimulates the proliferation of many cell types of mesenchymal origin and inhibits the growth of many epithelial cells. But its cellular distribution and temporal expression remain unknown. The aim of this study was to investigate immunohistochemically the cellular distribution and temporal expression of TGF- β 1 during rat hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN). At an early stage of liver fibrosis, there was evidence of multiple centrilobular hemorrhagic necrosis with parenchymal lobular collapse, and at a late stage, there was septal fibrosis with micronodule formation of the parenchyme. TGF- β 1 peptide was first expressed in centrilobular clusters of macrophage which were surrounded by many TGF- β 1 negative fat-storing cells (FSCs). Along with the progression of fibrosis, the TGF- β 1 peptide was expressed in the α -smooth muscle actin positive FSCs and also in some peripherally located hepatocytes of micronodules. Serum IFN- γ was detected in the serum 2 weeks after an initial administration of DMN had reached the peak level at the 4th week and then markedly decreased at the 5th week. We think that TGF- β 1 peptide is produced by macrophages influenced by soluble IFN- γ , and is expressed in the α -smooth muscle actin positive mesenchymal cells and regenerating hepatocytes, and that this cytokine may have an important role in the synthesis of the extracellular matrix and in the regulation of hepatocytic regeneration. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 1157~1165)

Key Words: Liver fibrosis, Dimethylnitrosamine, Rat, TGF- β 1, IFN- γ

서 론

간섬유화는 심한 간 손상 후 또는 만성 간 질환에 관련하여 자주 관찰되며,¹ 섬유생성은 간경변증 발생에 가장 중요한 과정이다. 이 과정으로 인하여 간에 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)의 과잉 축적이 생기고 간내 축적된 ECM은 주로 교원질, 비교원질성 당단백질, 그리고 프로테오글라이칸 (proteoglycans)으로 구성되어 있다.² 교원질은 ECM 중 중요한 단백질이며 경변증성 간에 심하게 증가한다.² 그러므로 ECM 성분들을 생산하는 세포들에 대한 만성적 자극은 경변증 과정에서 결정적 인자라고 할 수 있다. 더우기 섬유생성의 범위는 간 손상의 정도와 상관성이 높다.³ 반복되는 간괴사, 염증, 그리고 간의 재생성 과정 혹은 이것들의 병합은 간경변증 발생과 밀접하게 관련한다. 그러나 간경변증의 점진적인 진행을 유도하는 인자에 관하여서는 아직도 잘 알려지지 않고 있다.

ECM 생산에 중요한 세포들로는 지방저장세포 (fat-storing cells, FSCs), 간세포, 내피세포 등 간내 존재하는 여러 종류의 세포들이 거론되고 있으나, FSCs가 가장 유력한 세포로 주목되고 있다. 간의 FSCs는 또한 Ito 세포, 지방세포, 혹은 동모양 혈관 주위 성상세포라고도 불리며, 이 세포는 비실질성 간세포로서 내피세포하의 Disse 강내에 위치하며, 간세포들과 밀접하게 접촉하고 있다. 세포질내에는 주로 비타민 A로 구성된 지방 적을 포함하고 있다.⁴

생체내⁵⁻⁷ 또는 시험관내^{8,9} 연구에서 시행한 전자현미경적 및 세포조직화학적 연구에 의하면, FSCs는 휴지기의 지방저장 표현형으로 부터 활발히 성장하는 근섬유모양 표현형으로 점차 이행하는 것이 알려졌다, 이런 이행형 세포들은 비타민 A 지방적의 감소, smooth muscle actin microfilament의 발달, 그리고 ECM 합성의 심한 증가 등을 동반한다.⁸ 이런 특성 때문에 FSCs는 간섬유화에서 ECM의 과잉 축적에 큰 역할을 할 것이라고 추정되고 있다.

간에서 일어나는 아미노산, 단백질, 지질, 무기질 그리고 탄수화물 등의 신진대사에 cytokine들이 관여한다. 최근에 cytokine 중 transforming growth factor (TGF)- β 1의 생물학에 관하여 학계의 주목이 모아지고 있다.¹⁰ TGF- β 1은 25kD 단백질로서 표적세포의 성장과 생리적 조건에 따라 여러가지 작용을 발휘한다.¹¹ 이 인자는 간엽 유래의 세포들에 대하여서는 증식성 자극을 하나, 다른 세포들 즉 상피세포에 대하여는 성장을 억제한다. 뿐만 아니라 TGF- β 1의 중

요한 기능 중에는 ECM의 합성과 침착을 자극하고 ECM단백과 세포사이의 상호작용을 매개하는 수용체 integrin의 발현을 증가시키는 능력들이 있다. 이 능력은 단백질 분해효소 억제자의 합성 즉 metalloproteinase의 조직억제자의 발현과 분비를 증가시키고, 나아가 세포-ECM 사이의 상호작용과 접착성을 높인다.¹¹ 그러므로 TGF- β 1은 ECM합성과 세포-ECM 상호작용에 관여하는 가장 강력한 조절자라고 생각된다. TGF- β 1은 창상치유, 조직 분화의 발달과 형태 형성, 그리고 종양 발육의 생리학적 조절자로서의 기능도 가지는 것 같고,¹⁴ TGF- β 1은 autocrine 및 paracrine 기전에 의하여 다양한 기능을 발휘한다고 알려져 있다. 이런 점들을 고려하면 TGF- β 의 기능은 매우 다양하고 기능 발휘 기전도 대단히 복잡하다고 생각된다. 한편 IFN- γ 는 T 림프구와 NK 세포에서 생산분비되며, T 림프구와 염증세포 특히 대식세포를 자극하여 활성화시키고 활성화된 대식세포들은 여러 가지 성장인자들을 분비한다고 알려져 있다.^{12,13} 그러나, 간섬유화에서 IFN- γ 의 변동과 이와 관련한 TGF- β 1의 발현은 아직 잘 알려져 있지 않다. Nakastukasa 등^{15,16}은 사염화 탄소에 의한 백서 간 섬유증 혹은 간의 부분 절제 후 TGF- β 1의 세포성 분포와 발현의 경시적 변동을 인지투보합결합 (in situ hybridization)법 또는 Northern blot 분석법으로 조사한 바 있으나 면역조직화학적 연구는 거의 없는 것 같다. 인지투보합결합법과 Northern blot 분석법은 이런 연구에 흔히 이용되나 세포들의 형태와 세포내 물질의 확인을 동시 관찰하는데는 면역조직화학적 관찰이 더 좋다.

저자들은 dimethylnitrosamine (DMN) 유발 쥐 간섬유화의 발생 과정에서 TGF- β 1의 생성 부위, 국제 부위, 그리고 발현의 경시적 변동을 면역조직화학적 방법으로 연구하면서 아울러 TGF- β 1 발현을 가용성 혈청 IFN- γ 치의 변동과 관련지어 조사하여 보았다.

재료 및 방법

1. 동물

이 연구에 이용한 동물은 체중 200 gm 내외의 Sprague-Dawley계 숫백서 50마리였다. 동물들은 표준 실험동물 사료로서 약 1주일간 감시하에 사육하면서 건강 상태가 양호하다고 인정되는 것들만 골라서 실험에 사용하였다.

2. 간섬유화 모형의 제작

1% dimethylnitrosamine (DMN) (Sigma, St Louis,

USA)을 체중 kg 당 10 ml씩 하루 한번, 1주에 3일간씩 3주간 복강내로 주사하였다. 대조군 동물에는 같은 양의 생리적 식염수를 같은 방법으로 주사하였다. 약물 투여 시작 후 1주부터 5주까지 1주 간격으로 실험군 8마리와 대조군 2마리씩을 희생시켰다.

3. 조직학적 검사

동물들을 희생시킨 즉시로 간을 적출하여 먼저 육안적으로 관찰한 다음 간을 1 cm³ 크기로 잘라서 10% 중성 포르말린에 고정시켜서 파라핀에 포매하였다. 포매조직으로부터 4 μ m 두께의 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 Masson trichrome 염색을 시행하였다.

4. 면역조직화학적 검사

포르말린 고정, 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께의 연속 절편을 제작하여 면역조직화학적 염색들을 시행하였다. FSCs에 대한 단클론 항체로는 mouse anti-human α -smooth muscle actin (1A4, Dakopatts, Copenhagen, Denmark)을 사용하였고, TGF- β 1에 대한 단클론 항체로는 anti-human polyclonal rabbit antibody인 TGF- β 1 (V) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였으며, 면역조직화학적 염색은 labelled streptavidin biotin (LSAB) 방법으로 시행하였다. 조직절편을 xylene으로 탈파라핀한 후 알코올로 함수시켰다. 0.3% 과산화수소로 5분간 반응시켜서 내재성 과산화효소와 비오틴을 억제시킨 다음 PBS 완충액으로 10분간 세척하고 정상 면양 혈청을 가하여 20분간 반응시켰다. 정상 면양 혈청을 제거한 다음 희석한 일차항체들 (α -smooth muscle actin, 1:50, TGF- β 1 (V), 1:100)을 첨가하여 4°C 항온기에 하룻밤 두었다가 다음날 PBS 완충액으로 10분간 세척하고 비오틴과 결합된 항-생쥐 면양 혈청인 이차 항체와 20분간 반응시켰다. 세척 후 streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체를 가하여 20분간 반응시킨 후 AEC (amino-ethyl carbazole)로 발색하고 Mayer hematoxylin으로 대조염색하여 balsam으로 봉입하였다.

5. 이중 면역조직화학적 검사

α -smooth muscle actin과 TGF- β 1을 동일 조직편에서 동시에 관찰하기 위하여 이중 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 염색법을 간단히 소개하면, Histostain-DS kit (Zymed Inc., South San Francisco, USA)를 이용하여 시행하였다. 앞에서 기술한 바 있는 면역조직화학적 염색과 동일한 방법으로 염색을 두 번 시행하였다. 즉 처음에는 TGF- β 1 (V)에 대한 항체를

일차항체로 사용하고 streptavidin과 결합된 alkaline phosphatase를 반응시킨 후 BCIP/NBT로 발색시켰다. 다음으로 α -smooth muscle actin에 대한 항체를 일차항체로 사용하고 streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체를 반응시킨 후 AEC로 발색시켰다. BCIP/NBT로 발색된 TGF- β 1은 세포질에 흑갈색으로 염색될 때, 그리고 AEC로 발색된 α -smooth muscle actin은 세포질에 적갈색으로 염색될 때 각각 양성으로 판정하였다.

6. 채혈 및 혈청 분리

동물들을 ether로 마취시킨 후 회복하여 문맥으로 들어오는 정맥의 분지들 중 비장 정맥을 제외하고 나머지를 전부 결찰한 다음 문맥에서 혈액을 채취하였다. 그리고 나서 하대정맥 및 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 실온에 방치하여 혈청을 분리한 다음, 혈청 cytokine을 측정할 때까지 -20°C에 저장하였다. 대조군 및 실험군에서 총 38마리의 백서로 부터 채혈 및 혈청분리가 가능하였다.

7. 혈청 cytokine의 측정

IFN- γ 를 측정하기 위하여는 Biosource (Camarillo, California)사의 Cytoscreen rat IFN- γ Immunoassay kit를 이용하였고, 혈청 TNF- α 와 IL-1 β 는 Genzyme (Cambridge, USA)사의 mouse TNF- α ELISA kit와 mouse IL-1 β ELISA kit를 이용하였으며 모두 샌드위치 효소면역법으로 측정하였다.

8. 통계학적 검증

평균치들의 비교는 Student의 t-test와 Kruskal-Wallis 서열에 의한 일원분산분석법을 이용하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

성 적

1. 조직학적 소견

DMN 투여 시작 후 1주째에 간의 소엽들 중심부에 출혈성 괴사소가 관찰되었고, 그 부위들에서 다수의 과립백혈구, 림프구 그리고 대식세포 등 염증세포들의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 1A). 괴사부위에 인접한 간실질에서는 간세포의 고사 (apoptosis)에 의한 Councilman 소체와 같은 물질들이 나타나 있었다. DMN 투여 시작 후 2주째에는 간 소엽들에 출혈성 괴사와 간 실질의 소엽붕괴가 뚜렷하여졌고, 크고 작은 단핵구와, 작은 방추형 세포들의 출현이 현저해졌으며, 섬유성 격막들이 중심 정맥들 사이를

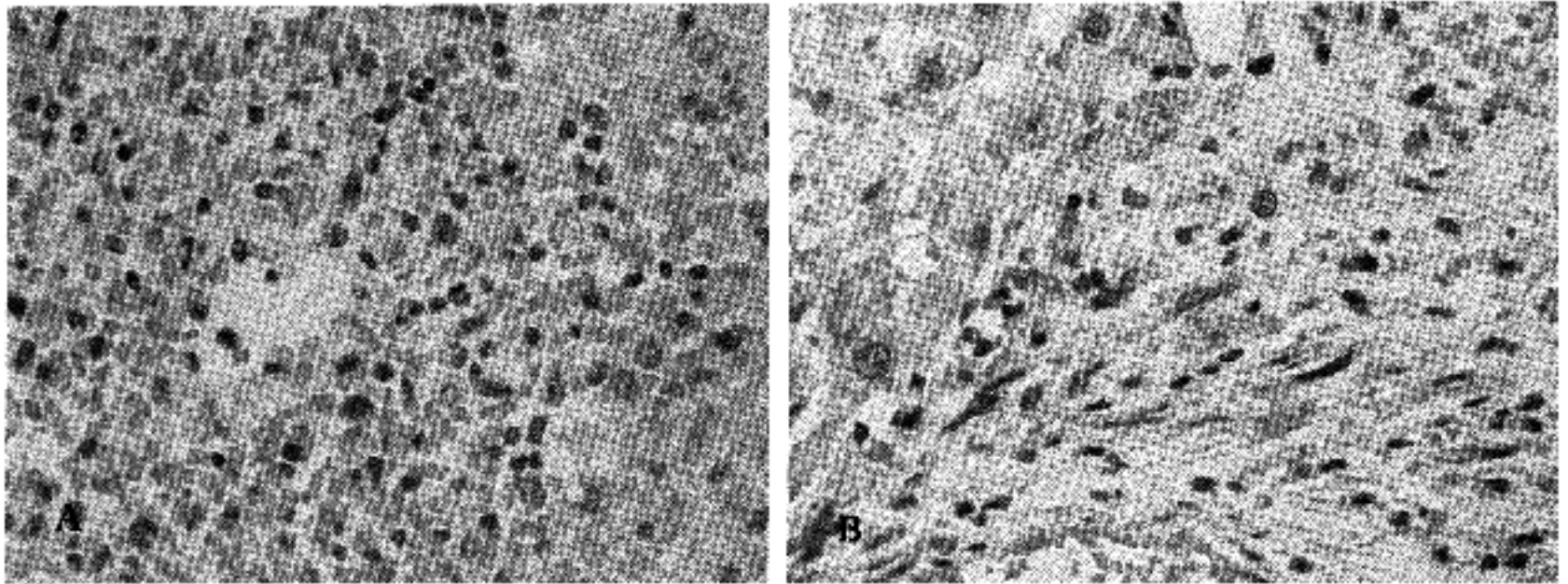


Fig. 1. At 1 week after initial administration, the liver tissue showing numerous lymphocytes and mononuclear phagocytes in the centrilobular focus of hemorrhagic necrosis (A), and at 28 days after initial administration, the areas of septal fibrosis showing many myofibroblasts or fibroblast-like FSCs (B).

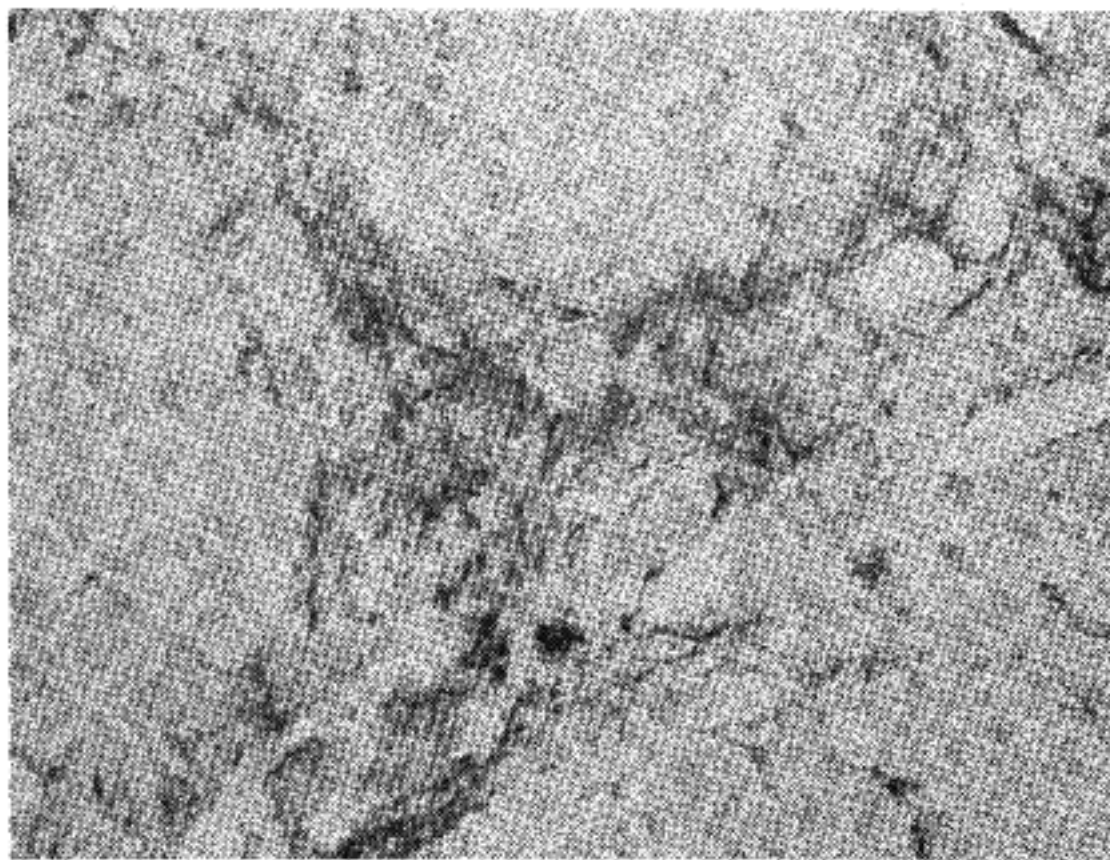


Fig. 2. At 4 weeks after initial administration, there are numerous α -smooth muscle actin-positive FSCs in the fibrous septa.

연설하여 에매하나마 미세결절을 형성하였다. DMN 투여 시작 후 3주째에는 간 실질의 소엽붕괴와 심한 섬유증이 일어나서 간 실질에 미세결절상이 뚜렷하여졌으며, 섬유성 격막을 따라 많은 수의 방추형 세포들이 출현되어 있었다. DMN 투여 시작 후 4주째에는 간 실질의 미세결절들이 3주째의 소견과 비슷하였으며, 간세포들 사이에 림프구와 형질세포

의 침윤이 심하였다. 섬유성 격막에 방추형 세포의 출현이 더욱 더 현저해졌다 (Fig. 1B). DMN 투여 시작 후 5주째에는 간 실질의 병변은 별 변동이 없었으나 섬유성 격막에 세포성분들이 많이 감소하여 있었다.

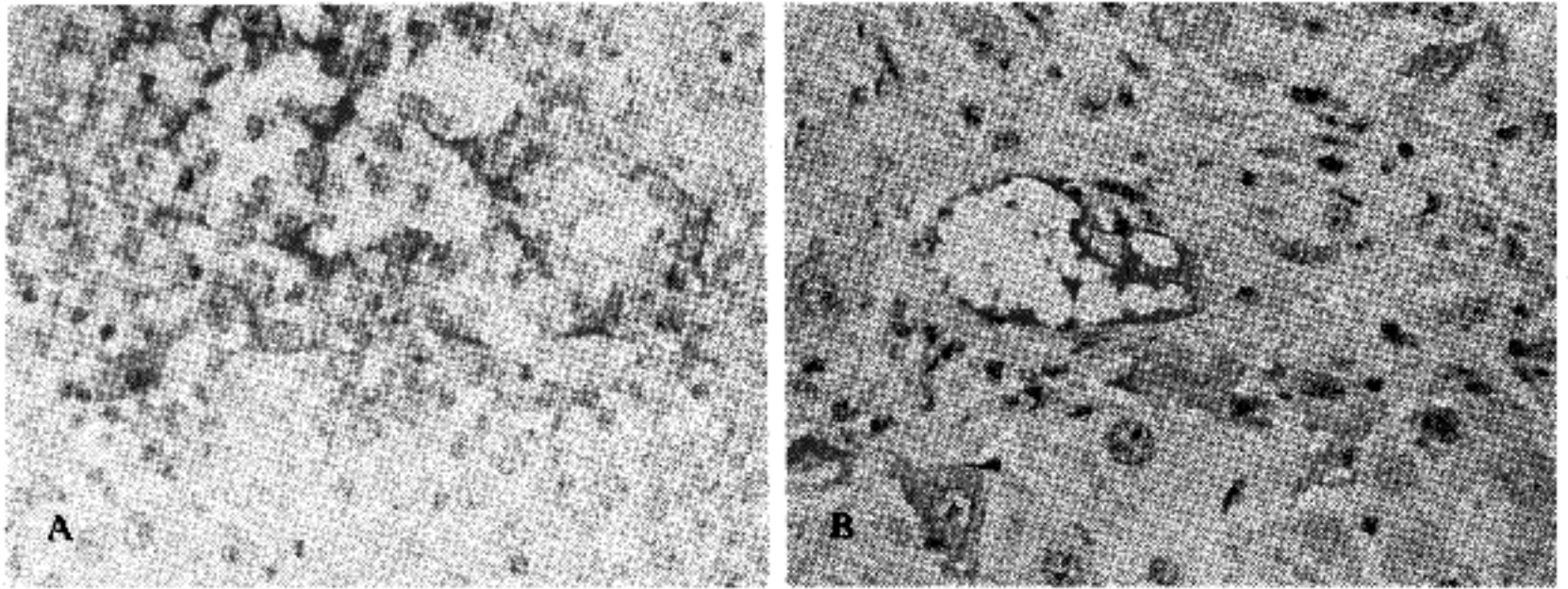


Fig. 3. At 1 week after initial administration, the centrilobular necrotic areas showing many TGF- β 1 positive mononuclear phagocytes (A), and at 4 weeks after initial administration, there are TGF- β 1 positive FSCs in the septal fibrosis and a few TGF- β 1 positive hepatocytes in the periphery of the micronodules (B).

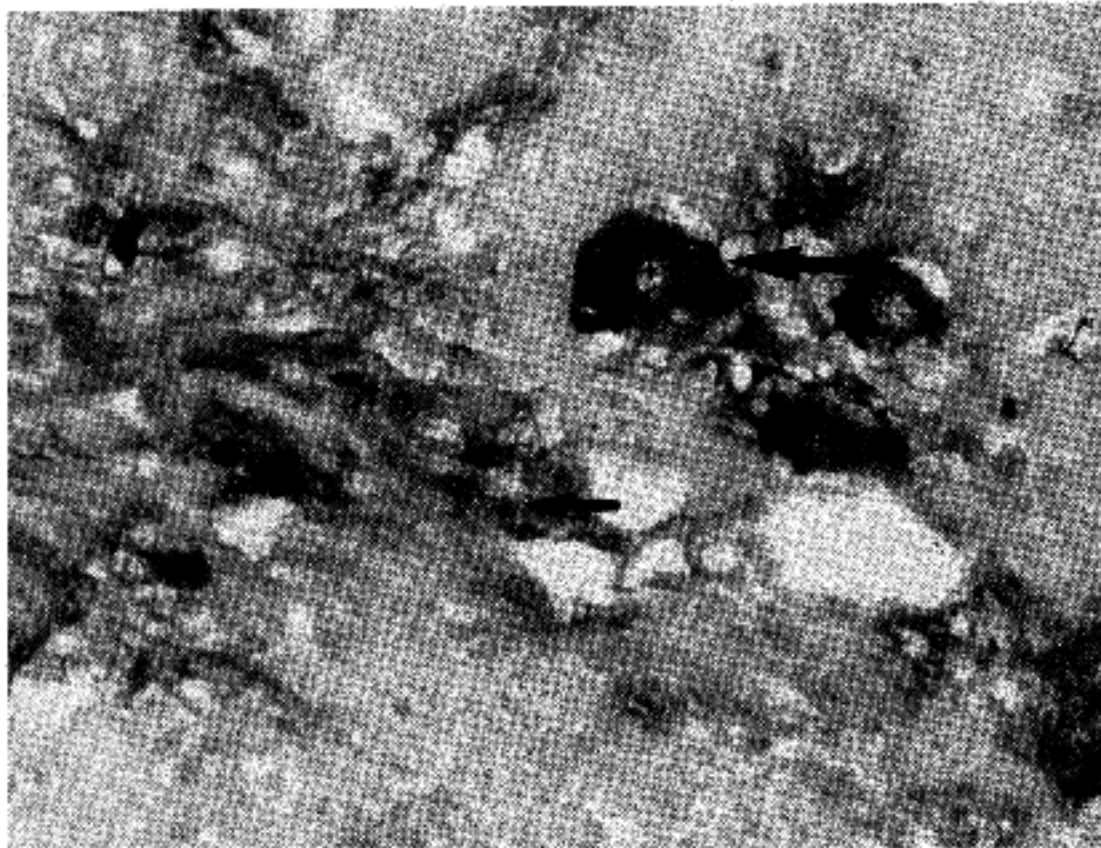


Fig. 4. At 4 weeks after initial administration, there are many both TGF- β 1 (dark brown color) and α -smooth muscle actin (brown color) positive FSCs (small arrow) and TGF- β 1 positive hepatocytes (large arrow).

2. 면역조직화학적 소견

α -smooth muscle actin에 대한 면역조직화학적 염색에서 대조군 동물의 간에는 문맥의 평활근 세포와 혈관벽 평활근 세포에만 양성 소견이 관찰되었고, 동모양 혈관을 따라서는 양성 세포가 관찰되지

않았다. DMN 투여 시작 후 2주째 간에는 섬세한 섬유성 격막과 그 근처 간세포 사이에 있는 약간의 방추형 세포들이 양성으로 염색되었다. 방추형 양성 세포는 DMN 투여 시작 후 3주째와 4주째까지는 그 수가 점차 증가하였고, 이 세포들의 출현 범위가 문맥 주위에서 섬유성 격막과 간 소엽 중심부로 확

대되었다 (Fig. 2). DMN 투여 시작 후 5주째에는 양성 세포 수가 많이 감소하였다.

TGF- β 1에 대한 면역조직화학적 염색 표본들에 있어서 대조군 동물의 간에는 간피막, 문맥역 주위, 담관주위 그리고 중심정맥에서 약하게 발현되었다. DMN 투여 시작 후 1주째에 출혈성 괴사부위에 침윤한 크고 둥근 세포들에서 발현되었다 (Fig. 3A). DMN 투여 시작 후 3주째에는 섬유성 격막과 그 근처 실질에 방추형 양성 세포들이 출현하였다. TGF- β 1 양성 세포들의 분포상은 α -smooth muscle actin 양성 세포의 분포상과 대체로 일치하였으며, 양성 세포 수와 출현 범위도 α -smooth muscle actin 양성 세포들의 소견과 잘 부합하였다. 이뿐 아니라 DMN 투여 시작 3주 이후부터 문맥역 주위와 섬유성 격막 근처에 위치하는 소수의 간세포 세포질내에도 TGF- β 1 양성 물질이 균질적으로 발현되었으며 (Fig. 3B), TGF- β 1 양성 간세포 수는 DMN 투여 시작 후 4주째와 5주째에 그 수가 더 증가하였다.

TGF- β 1과 α -smooth muscle actin 이중 염색 표본들에 있어서 양 항체에 대한 양성으로 반응하는 세포는 모두 방추형 세포들이었으며, DMN 투여 시작 후 2주째에 문맥역 주위와 섬유성 격막에 소수가 나타나서 DMN 투여 시작 후 3주째와 4주째에 약간 많아졌다가 (Fig. 4), 5주째에 다소 감소하였다. 간 소엽 중앙부위의 α -smooth muscle actin 양성 FSCs는 TGF- β 1에 대하여 음성이었다.

2. 혈청 cytokine치의 변동

연구 방법에서 언급한 바와 같이 혈청 cytokine치는 IFN- γ , TNF- α 및 IL-1 β 를 측정하였으나 IFN- γ 치만이 측정되었다. 아마도 이것은 rat TNF- α 와 IL-1 β 가 mouse TNF- α 와 IL-1 β 에 면역학적으로 어느정도는 상동성을 보이지만 효소면역법으로 측정될 정도가 아니기 때문이라고 생각된다.

Table 1은 대조군과 실험군 동물 즉 DMN투여 시작 후 1주부터 5주까지 1주 간격으로 비장 정맥, 하대정맥, 복부대동맥에서 채취 분리한 혈청의 평균 IFN- γ 치에 관한 성적이다. 이 표를 보면 각 혈관에서 채취 분리한 평균 혈청 IFN- γ 치는 DMN투여 시작 후 2주째부터 유의하게 증가하여 4주째에 최고도에 달하였다가 5주째에는 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$). 그러나 비장정맥, 하대정맥, 및 복부대동맥에서 측정된 IFN- γ 치는 서로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

Table 1. Changes of mean soluble IFN- γ levels after initiation of DMN administration in rats

Weeks	Sample No.	Mean soluble IFN- γ level (pg/ml)		
		S	V	A
Control	8	0.000	0.000	0.000
1	5	0.000	0.000	0.000
2	7	3.714	4.000	5.714
3	6	23.000	22.667	20.000
4	6	37.500	28.833	35.167
5	6	4.333	5.667	4.333

Abbreviation : S, splenic vein ; V, vena cava inferior ; A, aorta.

($H_0=18.566$, $p < 0.01$)

고찰

본 연구에 있어서 저자들은 TGF- β 1 유전자 산물 발현의 세포성 분포와 경시적 발현을 관찰하였다. 정상 간에 있어서 TGF- β 1 유전자 산물은 간 피막, 문맥역 주위, 담관 주위, 그리고 중심정맥에서 약하게 발현되었다. DMN 투여 간에 있어서 초기에는 TGF- β 1 유전자 산물이 괴사소에 침윤한 염증세포들에 발현되었고, 이어서 α -smooth muscle actin 양성 세포들에서 발현되었으며, 후기에는 α -smooth muscle actin 양성 세포들 뿐아니고 미세결절의 가장자리에 있는 약간의 간세포들에서도 발현하였다.

일찌기 Nathan 등¹⁷은 대식세포는 섬유증식 반응이 일어나기 전 창상부위에 나타나서 증식인자들의 원천이 된다고 하였고, Matsuoka와 Tsukamoto¹⁸는 백서의 실험적 알코올성 섬유증 간에서 분리한 Kupffer 세포에서 TGF- β 1의 발현과 분비 그리고 이 인자가 간의 FSCs에 의한 ECM 생산을 자극함을 관찰하였다. 이런 보고들을 고려하면 본 실험의 초기 괴사소에 침윤한 염증세포들에 TGF- β 1 유전자 산물이 발현되었다는 성적은 당연한 결과라고 생각된다. 그리고 Nakatsukasa 등¹⁶은 TGF- β 1 유전자 산물은 간섬유화의 초기에 침윤하는 염증세포들, desmin양성 FSCs와 섬유모세포들에 강하게 발현되었으나, 실질 간세포에는 발현되지 아니하였다고 보고하였다. 교원질 중 어떤 성분은 사염화 탄소 유발 간 섬유증에 나타나는 FSCs의 RER과 Golgi 장치에서 합성된다.¹⁹ 본 연구에서 섬유조직내 α -smooth muscle actin 양성 세포들에 TGF- β 1 유전자 산물이 강하게 발현하였

결 론

최근 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)의 생물학에 관하여 학계의 주목이 모아지고 있다. TGF- β 1은 강력한 세포증식 조절자로서 간염성 세포들에 대하여서는 증식성 자극을, 그리고 상피성 세포들에 대해서는 억제적 효과를 발휘한다. 그러나 세포에 따른 이 산물의 분포와 경시적 발현은 아직 불명한 점이 남아 있다. 본 연구에서는 TGF- β 1 유전자 산물의 분포와 경시적 발현을 조사하기 위하여 dimethylnitrosamine (DMN) 유발 백서 간섬유화에서 이 인자의 분포와 경시적 발현을 면역조직화학적으로 관찰하고 아울러 혈청 IFN- γ 치 변동을 측정하여 얻은 소견들을 다음과 같이 요약하였다.

DMN 유발 간 섬유화 발생 초기에는 간 소엽 중심부에 출혈성 괴사가 생겨서 인접한 괴사소와 연결되어 간 실질의 소엽붕괴를 나타내었다. DMN 투여 3주 이후의 간에는 실질의 소엽붕괴부에 섬유증식에 의한 격막상 섬유화가 출현하여 간 실질에 미세결절들이 형성되었다.

TGF- β 1 유전자 산물은 초기에는 괴사소에 침윤한 대식세포들에서 발현되었고, 대식세포 주위 FSCs에는 발현되지 않았으나, 섬유화가 진행함에 따라 섬유성 격막에 있는 대부분의 α -smooth muscle actin 양성 세포들 (FSCs)과 실질의 미세결절 가장자리에 위치한 약간의 간세포들에서 발현되었다.

혈청 IFN- γ 치는 DMN 투여 시작 후 2주째에 검출되기 시작하여 점차 증가하여 4주째에 최고치에 도달하였다가 5주째에는 현저히 감소하였다.

본 연구 결과는 대식세포들에서 관찰된 TGF- β 1 유전자 산물 발현은 혈청 IFN- γ 에 관련되고, TGF- β 1이 α -smooth muscle actin 양성 세포들과 재생성 간세포들에서 발현되는 것으로 보아, 이 인자는 간섬유화 발생과정에서 FSCs의 세포외기질 생성과 간세포의 증식을 조절하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Galambos JT. Alcoholic cirrhosis (in relation to cirrhosis in general). In Bockus Gastroenterology. 4th. ed. Vol. 5. Philadelphia : WB Saunders, 1985: 3012-49.
2. Rojkind M, Perez-Tamayo R. Liver fibrosis. Int Rev Connect Tissue Res 1983; 10: 333-93.
3. Reubner BH. Collagen formation and cirrhosis. Semin Liver Dis 1986; 6: 212-20.
4. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver; important roles in retinol metabolism and fibrosis. FASEB J 1991; 5: 271-7.
5. Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease; a morphometric study. Hepatology 1988; 8: 1027-33.
6. Mak KM, LeoMA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. Gastroenterology 1984; 87: 188-200.
7. Hom T, Junge J, Christoffersen P. Early alcoholic injury. Activation of lipocytes in acinar zone 3 and correlation to degree of collagen formation in the Disse space. J Hepatol 1986; 3: 333-40.
8. Geerts A, Vrijnsen R, Rauteberg J, Burt A, Schellink P, Wisse E. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. J Hepatol 1989; 9: 59-68.
9. Ramadan G, Veit T, Schwogler S, et al. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat storing cells. Virchows Archiv B Cell Pathol 1990; 59: 349-57.
10. Andus T, Bauer J, Gerok W. Effects of cytokines on the liver. Hepatology 1991; 13: 364-75.
11. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoiasn RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. Science 1986; 233: 532-4.
12. 김세종. 면역학. 초판. 서울 : 고려의학, 1994: 156-60.
13. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 5th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994: 187-90.
14. Sporn MB, Roberts AS, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. J Cell Biol 1987; 105: 1039-45.
15. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia C-C, Marsden E, Thorgeirsson SS. Cellular distribution of transforming growth factor- β 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. J Clin Invest 1990; 85: 1833-43.
16. Nakatsukasa H, Evarts RP, Hsia C-C, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor- β 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. Lab Invest 1990; 63: 171-80.
17. Nathan CF, Murry HW, Cohn ZA. The macrophages as an effector cell. N Engl J Med 1980; 303: 622-6.
18. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β : implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. Hepatol-

다. 이 성적은 DMN 유도 간섬유화에 있어서 FSCs가 기본적 역할을 한다는 것을 지적하고, 이 성적은 Nakatsukasa 등¹⁵의 보고와도 부합하고, TGF- β 1은 Kupfer 세포와 FSCs에서 유래하여 FSCs의 ECM 생성을 자극할 뿐만 아니라 그 인자의 mRNA를 자극한다는 보고²⁰와도 잘 부합된다. 그러나 간의 재생성 미세결절의 가장자리에 있는 약간의 간세포들에 TGF- β 1 유전자 산물 발현한다는 저자의 성적은 Nakatsukasa 등¹⁵의 보고와는 상이한 성적이다. Heine 등²¹은 첫번 연구에서 간 실질세포에는 TGF- β 1 유전자 산물이 없다고 보고하였으나, 후에 LC 1-30 (anti-TGF-S1) 항체를 이용하여 실시한 연구²²에서는 성숙한 TGF- β 1 유전자 산물의 존재를 인정하였다. 항체 LC 1-30을 이용한 연구²³는 성숙한 TGF- β 1의 세포내 epitope를 인정하였고, 생쥐 간세포와 담관 세포내에 TGF- β 1 유전자 산물을 증명하였다. Czaja 등²⁴도 LC 1-30 항체를 사용하여 정상 성숙 백서의 간세포에서 TGF- β 1 유전자 산물을 면역조직화학적으로 관찰하였고, 실험적 간섬유화 백서의 실질 간세포내에 TGF- β 1의 면역반응성이 증가하는 것을 관찰하였다. 본 연구에 이용한 TGF- β 1 (V)항체는 anti-P (50-75)에 부합되고, 이것은 Flanders 등²²에 의하여 TGF- β 1 전구물질의 amino acid 266-276에 대한 항체와 같다는 것이 알려졌다. Anti-P (50-75)는 그것의 합성 장소에서 TGF- β 1의 carboxyl-terminal에 있는 세포내 epitope를 찾아낸다. 따라서 저자들의 관찰 결과는 타당하다고 할 것이다. 저자들의 관찰 결과와 Nakatsukasa 등¹⁵의 보고 사이의 상이점의 이유를 정확하게는 지적할 수 없으나 아마도 실험 방법의 차이라고 설명할 수 있을 것 같다.

Tan 등²⁵이 보고한 사람 태아의 간담관계 TGF- β 1 유전자 산물 면역 국제 분포에 관한 연구에 의하면 이 유전자 산물은 수태 5주 중반까지는 실질 간세포내에서 인정되지 아니하였고 혼재하는 조혈세포에는 강한 반응성을 보였으며 수태 7주째에는 간세포에도 강하게 발현하였다. 배양실험에 있어서 간세포가 ECM 성분을 생산한다는 보고들이 있다.^{26,27} 사람 간섬유화와 만성 간염에서 교원질과 기저막 성분을 간세포가 생산한다는 보고도 있으며,^{28,29} Martinez³⁰는 제I형 교원질은 간세포의 RER에서 관찰되었다고 보고하였고 Chojkier 등³¹은 사염화 탄소 유발 백서 간 섬유증에서 간세포가 교원질을 생산한다고 하였다. 이런 보고들을 고려하면 간세포에도 cytokine이 생산될 가능성이 충분히 있다고 생각된다.

TGF- β 1 수용체는 여러 종류의 세포들에 존재하고,³² 백서 간세포에도 존재한다.³³ 그렇다면 간세포내 TGF-

β 1의 면역 국제는 membrane-bound 수용체를 통한 세포내이입의 결과라고 할 수 있을까? 이 연구에 사용한 항체는 전기한 바와 같이 TGF- β 1의 세포내 epitope를 인식하므로 그런 가능성은 없다고 생각된다. Coffey 등³⁴의 연구에 의하면 이 cytokine을 백서 간에 주사하여도 담즙으로 배설되지 아니하였다. 한편 Florini 등³⁵은 buffalo 백서 간세포를 혈청을 가하지 않은 배지에서 배양하여 간세포내 TGF- β 1 유전자 산물 생산을 관찰 하였고, Braun 등³⁶은 심한 염증을 동반하는 간 경변증의 재생성 결절의 변두리에 있는 약간의 간세포에 강한 TGF- β 1 mRNA 발현을 보고하였다. 그러나, 정상 성숙 간세포에는 TGF- β 1이 발현되지 않는다는 보고가 있다.³⁷ 이런 보고들과 저자들의 성적을 아울러 고려하면 TGF- β 1 유전자 산물은 증식 중인 간세포내에서는 발현되는 것 같고, 그리고 간세포에서 생산된 이 유전자 산물은 간세포의 과도한 증식을 억제하고,^{38,39} 또한 태생기에 빠른 간 확장의 시기에 성장의 조절인자로서 기능을 가지는 것 같다.^{36,40}

본 연구 결과 중 혈청 인자에 관한 성적을 보면, 대조 및 실험군에서 채취한 혈청들에서 IFN- γ , TNF- α , 그리고 IL-1 β 등을 측정하였으나 IFN- γ 만이 검출되었다. 아마도 이것은 rat TNF- α 와 IL-1 β 가 mouse TNF- α 와 IL-1 β 에 면역학적으로 60% 정도에서 상동성을 보이지만 효소면역법으로 측정될 정도가 되지 않기 때문이라고 생각된다. IFN- γ 는 DMN 투여 시작 후 2주째에 비정맥, 하대정맥 그리고 복부대동맥 등에서 분리한 혈청에 비슷하게 나타나서 점차 증가되어 4주째에 최고치에 달하였다가 5주째에 현저하게 감소하였다. 나등⁴¹은 간섬유화의 발생에 있어서 간 FSCs를 자극하여 섬유화를 증강 시키는 비장 인자의 존재를 시사하였고, 설등⁴²은 비장이 간에 미치는 영향은 비장 세포 중 CD8+ 세포와 연관하다고 보고하였다. IFN- γ 는 T 림프구와 NK 세포에서 생산 분비되어 T 림프구와 염증세포 특히 대식세포를 자극하여 활성화시키며,^{12,13} 활성화된 대식세포는 PDGF와 TGF- β 1과 같은 여러가지 성장 인자들의 분비를 유도하여 활성화시킨다.⁴³ 따라서 본 연구에 있어서 피사소에 침윤한 염증세포들에 먼저 TGF- β 1 유전자 산물 발현한 것은 혈청 IFN- γ 치와 관련이 깊다고 생각된다. 대식세포에 발현한 TGF- β 1은 paracrine 기전에 의하여 주위의 α -smooth muscle actin 양성 세포들 즉 활성화된 FSCs와 섬유모세포에 TGF- β 1 유전자 산물 발현이 일어나도록 자극하였다고 추정된다.

- gy 1990; 11: 599-605.
19. Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, et al. Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. *Lab Invest* 1988; 59: 509-21.
 20. Casini A, Pinzani M, Milani S, et al. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor β 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 1993; 105: 245-53.
 21. Heine UI, Munoz EF, Flanders KC. Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987; 105: 2861-76.
 22. Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS. Transforming growth factor- β 1 histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 1989; 108: 653-60.
 23. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol* 1989; 108: 661-9.
 24. Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC. In vitro and in vivo association of transforming growth factor- β 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 1989; 108: 2477-82.
 25. Tag CEL, Chan VSW, Yong RYY, et al. Distortion in TGF- β 1 peptide immunolocalization in biliary atresia: Comparison with the normal pattern in the developing human intrahepatic bile duct system. *Pathol Int* 1985; 45: 815-24.
 26. Diegelmann RF, Cuzelian PS, Gay R, Gay S. Collagen formation by the hepatocyte in primary culture and in vivo. *Science* 1983; 219: 1343-45.
 27. Albrechtsen R, Wewer UM, Thorgeirsson SS. De novo deposition of laminin-positive basement membrane in vitro by normal hepatocytes and during hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1988; 8: 538-46.
 28. Clement B, Grimaud JA, Campion JP, Deugnier Y, Guillouzo A. Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 1986; 6: 225-34.
 29. Bianci FD, Biagini G, Ballardini G, et al. Basement membrane production by hepatocytes in chronic liver disease. *Hepatology* 1984; 4: 1167-72.
 30. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab Invest* 1985; 53: 166-86.
 31. Chojkier M, Lyche KD, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988; 8: 808-14.
 32. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 3: 597-641.
 33. Gruppuso PA, Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1990; 50: 1464-69.
 34. Coffey RJ Jr, Cost LJ, Lyons RM, Moses HL, Larusso NF. Hepatic processing of transforming growth factor β in the rat: Uptake, metabolism and biliary excretion. *J Clin Invest* 1987; 80: 750-7.
 35. Florini JR, Roberts AB, Ewton DZ, Falen SL, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- β : A very potent inhibitor of myoblast differentiation identical to the differentiation inhibitor secreted by buffalo rat liver cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 16509-13.
 36. Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1539-43.
 37. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701-5.
 38. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 1042-50.
 39. Strain AJ, Frazer A, Hill DJ, Milner RDG. Transforming growth factor β inhibits DNA synthesis in hepatocytes isolated from normal and regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 436-42.
 40. Fausto N, Mead JE. Biology of disease. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. *Lab Invest* 1989; 60: 4-13.
 41. 나서희, 설미영, 이선경. 든 혈청 두여에 의한 백서 간 증격상 섬유화에 있어서 비 적출 효과에 대한 연구. *대한소화기학회지* 1996; 28: 74-84.
 42. 설미영, 김준연, 이선경. 백서의 실험적 간 섬유증식에 있어서 면역억제 및 증강제에 의한 비장세포 subset 변화에 관한 연구. *대한병리학회지* 1995; 29: 572-83.
 43. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 571-8.