

N-nitrosodiethylamine 투여 백서의 간절제술 후 혈청 Interleukin-6 의 경시적 변화 및 간재생과의 관계

고신대학교 복음병원 일반외과, ¹미생물학교실, 장기려기념간연구소

윤명희 · 김광혁¹ · 신동훈 · 이충한 · 박영훈

Relationship of Serum Interleukin-6 and Liver Regeneration after Hepatectomy in N-nitrosodiethylamine-induced Cirrhotic Rats

Mung Hi Yoon, M.D., Kwang Hyuk Kim, Ph.D.¹, Dong Hoon Shin, M.D., Chung Han Lee, M.D. and Young Hoon Park, M.D.

Purpose: The evolution of cirrhosis from chronic inflammatory liver disease represents a dysmorphogenic “response to injury”. It is important to understand how inflammatory cytokines, known to be associated with such responses, influence the growth of different cell populations within the liver. The purpose of this work is to establish a role of serum interleukin-6 (IL-6) in liver regeneration following partial hepatectomy in N-nitrosodiethylamine (DEN)-induced cirrhotic rats. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were used for this study. Liver cirrhosis was induced using DEN (100 mg/kg) given once a week for 6 weeks. In Group I (n=18), 70% partial hepatectomy was accomplished and then the resected liver weight, regenerated liver weight, serum IL-6, and serum GOT/GPT was determined on postoperative days 1, 2, and 4 and at intervals. In Group II (n=19), partial hepatectomy was carried out and Laennec, a hepatocyte growth promoter, was injected on preoperative 1 day and postoperative days 1 and 2.

Results: The value of serum GOT in Group I was 415 IU/ml on the first postoperative day and peaked at 1870 IU/ml on the third day. In Group II, the level of serum GOT was 404 IU/ml on the first postoperative day and peaked at 593 IU/ml on the third day, then decreased gradually thereafter. The value of serum IL-6 was 106.54 pg/ml on the first postoperative day, 130.59 pg/ml on the 14th postoperative day in Group I, however in Group II, it was 40 pg/ml on the

first postoperative day and then decreased to 29.18 pg/ml on the 14th postoperative day. The percentages of regenerated weights of liver at intervals following the 70% partial hepatectomy was 55.1% on the first postoperative day, and 102.3% on the 4th week in Group I and 60.4% on the first postoperative day, 95.8% on the first week postoperatively, and 116.1% on the 2nd week in Group II.

Conclusion: As the value of serum IL-6 was sustained below 40 pg/ml, which was the value on the first postoperative day following partial hepatectomy with Laennec treatment, the resected liver was rapidly regenerated and restored to normal liver function. In cirrhotic liver, regenerative activity was related to serum IL-6 level, so downregulation of serum IL-6 might be helpful to the regeneration of resected liver. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:8-12)

Key Words: Liver cirrhosis, Interleukin-6, Regeneration
중심 단어: 간경변, 인터루킨-6, 재생반응

Departments of Surgery and ¹Microbiology, Medical College of Kosin University, Gospel Hospital, Chang Kee Ryo Memorial Liver Institute, Busan, Korea

서 론

간재생에 대해서는 생화학적, 유전학적, 그리고 형태학적인 변화뿐만 아니라 수많은 간성장인자에 대한 연구가 계속되어 왔으며, 최근 다음의 세 가지 사항을 초점으로 간재생에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.(1) 첫째, 간재생을 유도하는 방어쇠 역할을 하는 물질, 둘째, 다양한 간의 기능을 유지하면서 간세포 성장을 계속하게 하는 물질, 셋째, 일단 일정한 간부피에 도달하면 세포증식을 종식시키는 물질 등에 관한 것이다. Cressman 등(1,2)은 생체 내에서 간재생을 유도하는 방어쇠 역할의 주요기전을 Interleukin-6 (IL-6)의 STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein 3)활성화와 관련지었다. IL-6는 항염증 반응을 가진 급성반응의 사이토카인으로서, 급성간염을 일으킨 소동물 실험과 간절제술 환자에서 TNF- α 를 하향조절

책임저자 : 윤명희, 부산시 서구 암남동 34번지, ☎ 602-702
고신대학교 복음병원 일반외과, 장기려기념간연구소
Tel: 051-990-6616, Fax: 051-256-6101

접수일 : 2001년 5월 17일, 게재승인일 : 2001년 7월 2일
본 논문은 고신대학교 의학부 연구소 연구지원금의 일부로 이루어졌음.

하여 간세포 손상을 예방하며, epidermal growth factor와 IL-6가 STAT3를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.(3-5)

저자들은 N-nitrosodiethylamine으로 유도된 간경변 백서에서 간절제술 후의 혈청 IL-6의 경시적 변화와 술후 간재생과의 관계를 관찰하고, 술전과 술후에 간재생촉진인자로 상품화된 Laennec (녹십자)을 투여한 군에서 이들 각각의 변화양상을 통하여 IL-6와 간재생과의 관계를 알아보고자 하였다.

방 법

(1) 실험동물: 연구에 사용한 동물은 몸무게 250~350 g의 수컷 Sprague-Dawley 백서였다.

(2) 간경변 유도: N-nitrosodiethylamine (DEN, Sigma, USA)을 생리식염수에 희석(100 ppm)하여 100 mg/kg을 1주에 1회, 연속 6주에 걸쳐 복강내 주사하였다. DEN 주입하면서 8주까지 총 49마리 중 9마리 사망하여 생존율은 81.6%였으며, 남은 40마리 중 3마리의 백서를 희생시켜 조직학적으로 간경변을 확인하였으며, 남은 37마리를 대상으로 모든 시술 및 혈액채취를 에테르 마취하에 시행하였다.

(3) 실험군: Group I (n=18)은 DEN 복강내 주사 8주 후 70% 간절제술을 시행하여 백서의 몸무게, 절제한 간, 재생된 간의 무게를 측정하였으며, 술후 24시간, 48시간, 96시간, 1주, 2주에 걸쳐 각각 3~4마리씩의 동물을 희생시켜 혈액을 채취하여 혈청 IL-6, GOT/GPT 등을 검사하였다.

Group II (n=19)은 70% 간절제술 하루 전에 간세포성장인자를 1회 투여하고, 수술 직후, 술후 24시간, 48시간에 연속 3회에 걸쳐 간재생촉진인자(Laennec, 녹십자)를 3.6 ml/kg 대퇴근육에 주사하였다. 70%의 절제한 간의 무게를 측정하였으며, 술후 24시간, 48시간, 96시간, 1주, 2주에 걸쳐 각각 3~4마리씩의 동물을 희생시켜 혈청 IL-6, GOT/GPT, 그리고 재생간의 무게 등을 측정하였다.

(4) 70% 간절제술: 상복부 중앙 절개 후 간의 median lobe 과 left lateral lobe을 각각의 맥관을 절찰한 후 절제하였다.

(5) 혈청 GOT/GPT, 혈청 Interleukin-6의 측정: 시기별로 동물을 희생시켜 혈액을 채취하였으며, 혈청 IL-6의 측정을 위해 혈액 채취 후 하룻밤 냉장(4°C) 보관하고 이후 원심분리하여 상층액 1.8 ml 정도를 이용하였으며, 검사는 rat IL-6 ELISA (메디케어) Kit를 사용하였다.

(6) 재생된 간의 무게 측정: 70% 간절제술시 절제된 간의 무게를 재고 이후 재생반응 시기에 따라 동물을 희생시켜 재생된 간의 무게를 재어 그 비율을 비교하였다.

결 과

1) 혈청 GOT/GPT의 변화

(1) 혈청 GOT는 Group I에서 간절제술 후(n=18) 24시간

에 415 IU/ml로 증가 후 96시간에 1870 IU/ml로 가장 높게 증가되었다. 간절제술 전과 후에 Laennec을 투여한 Group II (n=19)에서는 술후 24시간에 404 IU/ml로 증가되어 술후 96시간에 593 IU/ml로 증가 후 차츰 감소되어 정상화되었다.

(2) 혈청 GPT는 양군에서 술후 24시간에 증가되어 이후 감소하여 정상화되었다(Fig. 1).

2) 혈청 Interleukin-6의 변화

(1) Group I (n=18)의 혈청 IL-6는 간절제술 후 24시간에 106.54 pg/ml로 높게 나타났으며, 시간이 경과하면서 감소되었으나 술후 2주에 130.59 pg/ml로 다시 증가되어 술후 4주, 6주에 76.88 pg/ml로 유지되었다.

(2) Group II (n=19)에서 간절제술 전과 후에 Laennec을 투여하였을 때 혈청 IL-6는 24시간에 40 pg/ml였으며 이후 감소되어 술후 6주에 29.18 pg/ml로 유지되었다(Fig. 2) (p=0.002).

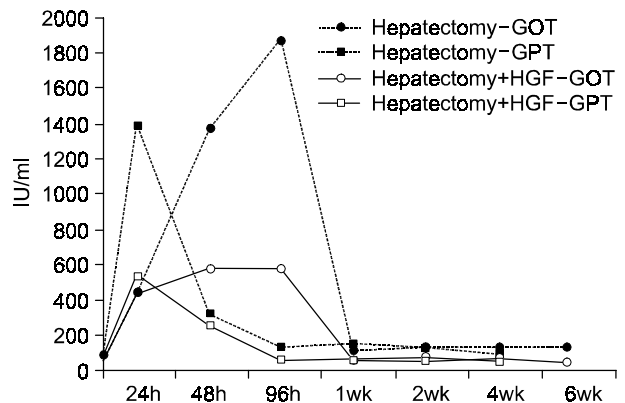


Fig. 1. Changes of serum GOT/GPT after 70% partial hepatectomy.

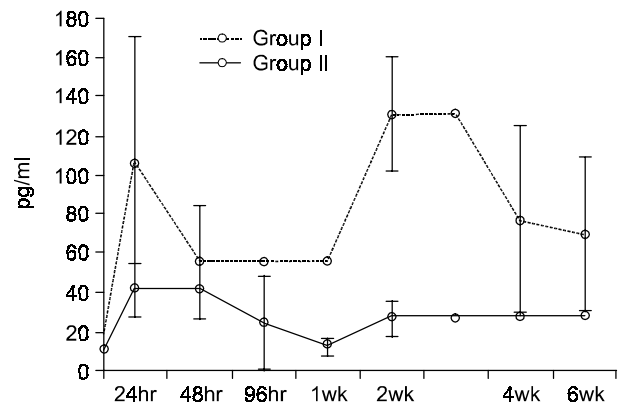


Fig. 2. Changes of serum interleukin-6 levels after 70% partial hepatectomy G I: only 70% hepatectomy, G II: 70% hepatectomy with Laennec treatment.

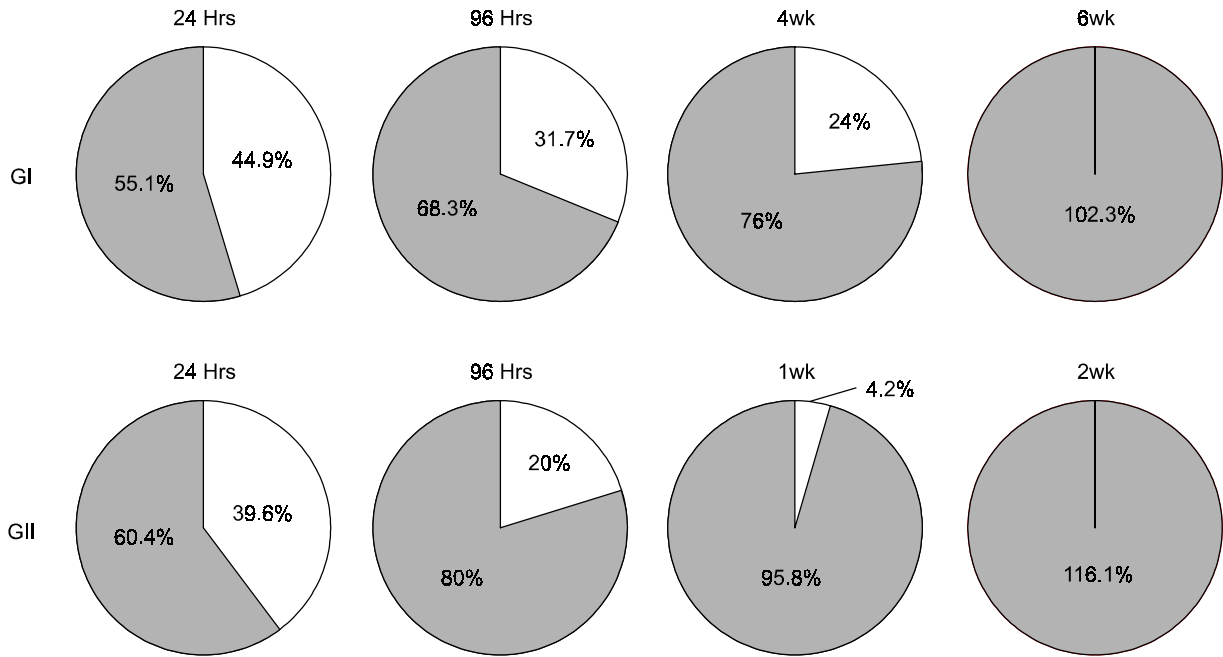


Fig. 3. Percentages of regenerated weights of liver at intervals following 70% partial hepatectomy according to HGF G I: only 70% hepatectomy, G II: 70% hepatectomy with Laennec treatment.

3) 70% 간절제술 후의 간의 재생정도

(1) 간절제술만을 시행한 Group I (n=18)에서 술후 24시간에 55.1%가 재생되었으며, 4주에 76%, 6주에 102.3%로 완성되었다.

(2) 간절제술 전과 후에 Laennec을 투여한 Group II (n=19)에서는 술후 24시간에 60.4%, 1주에 95.8%로 재생되었으며, 2주에 116.1%로 완성되었다(Fig. 3)(p=0.005).

4) 간절제술 후의 혈청 IL-6의 변화와 재생된 간의 무게의 비율

(1) Group I (n=18)에서 혈청 IL-6는 간절제술 후 24시간에 106.54 pg/ml로 높게 나타났으며, 술후 24시간에 남아있던 30%의 간은 55.1%로 재생되었다. 술후 2주 후 혈청 IL-6는 130.59 pg/ml로 다시 증가되어 술후 4주, 6주에 76.88 pg/ml로 유지되었고, 재생된 간의 비율은 4주에 76%, 6주에 102.3%로 완성되었다.

(2) Group II (n=19)에서 간절제술 전과 후에 Laennec을 투여하였을 때 혈청 IL-6는 24시간에 40 pg/ml였으며, 남아있던 30%의 간은 술후 24시간에 60.4%, 1주째 95.8%로 재생되었으며, 2주에 116.1%로 완성되었다. 혈청 IL-6는 40 pg/ml 이하로 감소되어 술후 6주에 29.18 pg/ml로 유지되었다(Fig. 4).

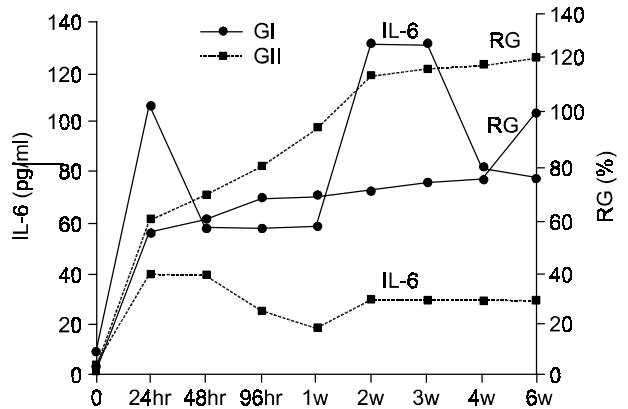


Fig. 4. Relationship of liver regeneration & serum IL-6 after hepatectomy. G I = group I; G II = group II; IL-6 = interleukin-6; RG = regeneration.

고찰

본 연구에서는 간경변이 있는 백서에서 간절제술 후의 혈청 Interleukin-6의 변화를 관찰하고 이후 간재생이 일어나는 때 따른 혈청 IL-6의 변화와 간재생과의 관계를 알아보고자 하였다.

혈청 IL-6에 관한 연구는 크게 두 가지 관점에서 이루어진다. 하나는 허혈-재관류 손상이며, 다음은 간재생 반응

에 미치는 영향이다. 만성 간질환 환자에서 급성 반응성의 싸이토카인이 고농도로 존재하며,(13) 이러한 싸이토카인은 간세포 증식을 촉진시킬 뿐만 아니라 간의 정상세포를 콜라겐-합성 세포로 전환시키기도 한다.(14) 생체의 다른 수선 기전에서와 마찬가지로 적정 농도가 유지되지 않으면 좋은 것이 나쁜 것으로도 작용할 수 있으며, 간경변증 환자에서의 부적절한 농도의 급성 반응성 싸이토카인이 간경변증의 병인론에 관여하는지 아니면 재생반응을 촉진시키는지에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 간경변 백서에서 부분간절제술 후 간기능이 회복되면서 간재생이 일어남에 따라 혈청 IL-6가 증가하는지 감소하는지를 관찰하였다. 또한, 간재생촉진제로 상품화된 Laennec을 투여하여 간재생이 촉진되고 이에 부합하여 혈청 IL-6의 농도가 어떻게 변화하는지를 관찰하였다.

저자의 연구 결과로는 간절제술 24시간 후의 혈청 IL-6는 간절제술만 시행한 Group I (n=18)에서는 106.54 pg/ml로 증가되었으며, 간절제술 전후 Laennec을 투여한 Group II (n=19)에서는 40 pg/ml였다. 양군에서 시간이 경과하면서 술후 1주까지 혈청 IL-6가 차츰 감소하였다. 이후 간절제술만 시행한 실험군에서는 술후 2주 후 130.59 pg/ml로 다시 증가된 후 술후 6주에 76.88 pg/ml까지 감소하였으며, 이 경우 수술로 인한 복강내 감염 혹은 전신감염을 고려하여, 동물을 희생시켜 조사하였으나 국소 및 전신 감염의 소견은 없었다. 간절제술 전후 간세포성장인자를 투여한 대조군에서는 계속적으로 40 pg/ml 이하로 유지되었다.

혈청 IL-6와 재생된 간의 무게의 변화는 실험군에서 혈청 IL-6는 간절제술 후 24시간에 106.54 pg/ml로 높게 나타났으며, 술후 24시간에 남아 있던 30%의 간은 55.1%로 재생되었다. 술후 2주 후 혈청 IL-6는 130.59 pg/ml로 증가되었다가 술후 4주, 6주에 76.88 pg/ml로 유지되었고, 재생된 간의 비율은 4주째 76%, 6주에 102.3%로 완성되었다. Group II에서 간절제술 전과 후에 Laennec을 투여하였을 때 혈청 IL-6는 24시간째 40 pg/ml로 Group I에 비하여 낮게 유지되었으며, 남아 있던 30%의 간은 술후 24시간에 60.4%, 1주째 95.8%로 재생되었으며, 2주에 116.1%로 완성되었다. 이러한 결과는 Laennec을 투여하여 혈청 IL-6가 더 낮게 유지되었던 군에서 간재생이 왕성하게 일어났음을 보여 준다.

Kita 등(9,10)의 보고에 의하면 건강한 자원자의 IL-2, IL-1 β 및 TNF- α 등은 혈청에서 측정되지 않지만 IL-6는 18 \pm 34 pg/mL (mean \pm SD)로 측정되었다. 또한, 말기 간질환 환자의 혈청 IL-6는 전격성 감염인 경우 203 \pm 232 pg/mL, 알콜성 간경화인 경우 116 \pm 257 pg/mL, 간암에서는 82 \pm 105 pg/mL였다.

Hamazaki 등(11)은 간경변이 동반된 환자와 간경변이 동반되지 않은 환자에서 간절제술 후의 Tumor necrosis

factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), 그리고 interleukin-8 (IL-8) 등의 변화를 관찰하였다. 간경변이 동반된 환자에서 술후 1일째 IL-6와 IL-8의 수치가 간경변이 동반되지 않은 환자에서 보다 유의있게 높았으며, 술후 전기간에 걸쳐 간경변이 동반된 환자에서 IL-6의 수치가 증가되었다고 보고하였다. Fong 등(12)은 간경변이 동반된 경우의 혈청 IL-6의 과형성은 그 자체가 부작용을 일으키는 것은 아니며 대식세포의 활성을 자극하여 다른 싸이토카인인 TNF, IL-1, and IL-8 등을 과다하게 생성하여 부작용을 일으키는 것이라고 하였다. Sakamoto 등(13)은 최근 동물실험에서 IL-6^{+/+} mice와 비교하여 IL-6^{-/-} mice에서 간절제술 후의 간세포 DNA 합성장애가 일어나며 정상간 무게로 회복하는 시기가 늦어짐을 보고하였다. 그들이 제시한 가설 중 oval cell 및 담도계 상피세포의 증식과 간세포의 hypertrophy로는 간세포무게의 회복을 설명할 수 없었으며, apoptosis rate의 차이로 기전을 제시하였다. IL-6^{+/+} and IL-6^{-/-} mice의 정상 간에서는 apoptotic cells은 거의 보이지 않았으나, 간절제술 후 60시간 뒤부터 90시간 사이에는 현저한 차이를 보였다. Apoptotic cell의 수는 간세포의 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) labeling 및 간의 DNA content 정도에 비례하였으나 간절제술 후 24시간 뒤의 최저치와 96시간 뒤의 최고치의 차이는 IL-6^{+/+} mice에서 더 큰 차이가 있었다. 양군에서 96시간 뒤의 간세포의 apoptosis의 차이는 IL-6^{-/-} mice에서 유의있게 낮게 나타났다. IL-6^{-/-} mice를 rIL-6로 치료시 이러한 반응이 완전하게 반전되어 간세포증식이 회복되고 total apoptotic bodies의 증가를 보였다고 한다. Cressman 등(12)은 생체내에서 간재생을 유도하는 방아쇠 역할의 주요기전을 IL-6의 STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein 3)활성화와 관련지었다. Wild type mice에서 간절제술 후 1시간 이내에 STAT3 DNA 결합이 잔여 간에서 나타났으며, 술후 2시간에 최고치에 달하였으나, IL-6 결여 mice에서는 이러한 반응이 나타나지 않았다. IL-6 결여 mice에서 recombinant IL-6 (rIL-6) 투여시 STAT3 활성화가 회복되었으며, 간세포 증식이 일어났다. 그러나, 비실질세포의 DNA 합성 및 다른 유전자의 활성화는 IL-6 결여 mice와 wild type mice에서 유사하였다고 보고하였다. 그러나 이러한 기전의 변이된 기능은 간경변증의 병인론에 관여할 지도 모른다고 제시하였다. Carlos 등(14)은 IL-6^{-/-} mice에서 간의 허혈/재관류(warm ischemia/reperfusion (WI/Rp)) 손상 후 그 정도를 관찰하여 rIL-6 전처치로 이러한 반응이 반전되는 것을 관찰하였다. 또한, rIL-6의 다른 중요한 효과는 허혈손상 후 간재생을 증강시키는 것이다. 간세포의 mitotic index의 증가와 PCNA로 조직을 염색하여 S상세포의 수가 증가하는 것을 관찰하였다. 그 기전으로는 IL-6가 염색질 STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein 3)를 핵내로 transloca-

tion시켜 이것이 DNA에 결합하여 여러 촉진자들을 유도하여 간세포의 증식을 증가시킨다는 것이다. 이것으로 간의 허혈/재관류 손상 후의 IL-6 역할은 항염증 반응, TNF- α 의 하향조절, 간재생의 증강 등으로 간손상을 감소시킨다고 보고하였다.

그러나 Cressman, Carlos의 연구 모델에서는 wild type의 mice와 IL-6^{-/-} mice와의 비교를 하였기 때문에 간경변이 있는 간에서의 IL-6의 변화 및 그로 인한 간재생에서의 역할은 관찰되지 않았으며, 저자들의 연구 결과인 혈청 IL-6의 수치가 낮게 유지된 군에서의 재생반응의 활성화와는 차이가 있다.

실험을 하면서 control 군으로 정상 간조직에서의 간절제술 후 동일한 실험군을 모델로 하여 시행하였으면 데이터가 더 의미가 있었을 것으로 생각되었으며, 함께 하기에는 실험 규모가 상당히 커지므로 다음 실험으로 추가되어야 할 것 같다.

결 론

간경변 백서에서 간절제술 후의 혈청 Interleukin-6는 술 후 24시간에 가장 높게 나타났으며, 이후 간기능이 회복됨에 따라 혈청 IL-6는 감소하였다. 간재생은 술후 혈청 IL-6 농도가 크게 변동없이 술후 24시간의 수치보다 낮게 유지되었던 Group II에서 더 왕성하게 일어났다. 이는 Laennec의 투여가 IL-6와는 별개의 기전으로 간재생을 시켰을 가능성도 배제할 수는 없다.

따라서, 혈청 IL-6의 농도 변화는 간재생 반응에 영향을 미칠 가능성이 있으며, 간경변에서 혈청 IL-6의 농도를 추적하는 것이 간기능의 회복과 간재생 반응에 도움이 되리라 생각되고 향후 추가연구의 가치가 있다고 사료된다.

REFERENCES

- 1) Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poon V, et al. IL-6, A key cytokine in liver regeneration. *Hepatology* 1997;25:1294-6.
- 2) Drew E, Cressman, Linda E, Greenbaum, Robert A, DeAngelis, Gennaro Ciliberto, Emma E, Furth, Valeria Poli, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379-83.
- 3) Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J*

- Exp Med* 1994;179:1529-37.
- 4) Clavien PA, Camargo CA Jr, Gorczynski R, Washington M, Levy G, Langer B, et al. Acute reactant cytokines and neutrophil adhesion following warm ischemia in cirrhotic and non-cirrhotic human livers. *Hepatology* 1996;23:1456-63.
- 5) Yamada Y, Kirillova I, Peschon J, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking Type I TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1441-6.
- 6) Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1992;103:264-74.
- 7) Devieere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Le Moine O, Schandene L, et al. High interleukin-6 serum levels and increased production by leukocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol* 1989;77:221-25.
- 8) Greenwel P, Rubin J, Schwartz M, Hertzberg EL, Rojkind M. Liver fat-storing cell clones obtained from a CCL4-cirrhotic rat are heterogenous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* 1993;69:210-16.
- 9) Kita Y, Iwaki K, Demetris AJ, Starzl TE. Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients. *Transplantation* 1994;57:1037-41.
- 10) Kita Y, Iwaki K, Noguchi K, Griffith BP, Tzakis AG, Todo S, et al. Daily serum interleukin-6 monitoring in multiple organ transplantation with or without liver allografts. *Transplantation Proceedings* 1996;28:1229-34.
- 11) Hamazaki K, Tagashira H, Mimura T, Doi Y, Yunoki Y, Mori M, et al. Changes in IL-6 and IL-8 after hepatectomy in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1995;42:13-7.
- 12) Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gyn Obstet* 1990;170:363-78.
- 13) Toshiki Sakamoto, Zejin Liu, Noriko Murase, Tsukasa Ezure, Shigeki Yokomuro, Valerie Poli, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403-11.
- 14) Carlos A, Camargo JR, John F Madden, Wenshi Gao, Rathinam S Selvan, Pierre-Alain Clavien. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26:1513-20.