

백서의 일차배양 간세포에서 Plasminogen Activator와 Plasminogen Activator Inhibitor의 표피 성장인자 의존적 발현에 관한 연구

충남대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹생화학교실

윤완희 · 최정훈 · 정연주 · 이병학 · 김태동 · 송인상 · 배진선 · 임 규¹ · 황병두¹

Epidermal Growth Factor Dependent Expression of Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor in Rat Hepatocytes in Primary Culture

Wan-Hee Yoon, M.D., Jeong-Hun Choi, M.D., Yeon-Joo Jung, M.S., Byung-Hak Lee, M.S., Tae-Dong Kim, B.S., In-Sang Song, M.D., Jin-Sun Bae, M.D., Kyu Lim, Ph.D.¹ and Byung-Doo Hwang, M.D.¹

Purpose: In order to clarify the the role of epidermal growth factor (EGF) in the regulation of plasminogen activator (PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI) during liver regeneration, we investigated the EGF-dependent gene expression of PA and PAI-1 in rat hepatocytes in primary culture.

Methods: Hepatocytes were isolated from rats using a two step perfusion technique and cultivated in dishes precoated with rat tail collagen. DNA synthesis of the hepatocytes by EGF treatment was measured with ³H-thymidine incorporation. Gene expression for PAI-1, uPA and tPA was examined using Northern blot hybridization analysis.

Results: EGF treatment increased the ³H-thymidine incorporation of the hepatocytes up to 36 hours and normal polygonal hepatocyte morphology was achieved simultaneously. tPA and PAI-1 mRNA were detected in the control hepatocytes. With the EGF treatment, the tPA mRNA level increased with time up to 48 hours, however the PAI-1 mRNA level rapidly increased to 1 hour and then decreased quickly to the control level. On the contrary, uPA mRNA was not detected in hepatocytes with or without treatment of EGF. The EGF-dependent induction of tPA and PAI-1 mRNA was a protein synthesis independent process.

Conclusion: These results suggest that differential expression of tPA and PAI-1 mRNA by EGF in hepatocytes may play an important role in the regulation of liver regeneration. Among PAs, tPA seemed to be more important in EGF dependent growth or regeneration of primary hepatocytes in the rat since uPA mRNA was not induced in primary hepatocyte cultures in spite of EGF treatment. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:237-246)

Key Words: tPA, PAI-1, EGF, Primary hepatocyte, Gene regulation

중심 단어: tPA, PAI-1, 표피성장인자, 일차배양 간세포, 유전자조절

Departments of Surgery and ¹Biochemistry, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

서 론

세포표면에서의 세포외 기질단백의 분해는 수상 후 조직 개형(tissue remodeling)과 재생(regeneration)에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 간에서의 대부분의 재생반응 역시 세포외 기질의 변화를 동반하게 된다.(1)

정상간에서 기질성분은 문맥세가지의 담관을 둘러싸는 전형적인 기저막을 형성하고 있으며 이 기저막은 type IV collagen과 laminin을 함유하며 담관과 담소관, 주변의 간세포와 관련되어 있고 이 세포외 기질은 간포(liver acinus)를 지나서는 점차 변하게 되어 fibrillar collagen과 fibronectin 성분의 기저막으로 바뀌게 된다.(1)

한편 plasminogen activator (PA)와 plasminogen activator inhibitor (PAI)들은 세포외 기질의 교체를 결정하는 단백질 분해와 단백질분해억제 활성간의 균형을 조절하는 중요한 인자들로 PA는 tissue type (tPA)과 urokinase type (uPA) 두 가지 종류가 있으며 이중 tPA는 혈장내에 주로 존재하는 형태로 혈전용해과정에 매우 중요하며 uPA는 조직파괴와 세포이동에 관련된 단백질분해과정에 중요한 역할을 한다

책임저자 : 윤완희, 대전시 중구 대사동 640번지
(☎) 301-721, 충남대학교병원 일반외과
Tel: 042-220-7180, 7175, Fax: 042-257-8024
E-mail: whyoon@cnu.ac.kr

접수일 : 2001년 8월 14일, 게재승인일 : 2001년 8월 28일
본 논문은 1998년도 충남대학교병원 대형 공동임상연구비의 지원을 받은 것임.

고 생각되고 있다.(2,3) 이 PA들은 세린계 단백분해효소들로 plasminogen을 섬유소 용해에 중요한 광범위한 단백질 분해효소인 plasmin으로 전환시키며 생성된 plasmin은 기관 형성, 조직개형, 염증, 종양의 침윤과 전이 등 세포외 기질 단백질의 파괴가 발생하는 여러 생물학적 과정에 관여하게 되고(2-4) 이 때 plasmin은 자체의 단백질 분해 활성과 matrix-degrading metalloproteinases (MMPs)를 활성화시켜 그 기능을 나타내게 된다.(5,6) 또한 PA-plasmin계는 transforming growth factor β 1(TGF- β 1), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 그리고 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF) 등의 활성화에 중요한 역할을 한다고 한다.(7)

PAI들은 plasminogen 의존성 단백질 분해 조절에 중요한 역할을 하며 이 중 PAI-1은 50 kDa의 당단백으로 PA에 대한 주된 생리적 억제제이고 다양한 종류의 세포들에서 합성되며 PAI의 발현은 여러 성장인자, phorbol ester, cytokine, 호르몬들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.(2,8)

tPA와 PAI-1들은 생체내 여러 기관에서 발견되지만 정상 백서의 간에서는 발견되지 않거나 또는 매우 미약하게 발견된다고 한다.(9,10) 그러나 간부분 절제를 한 재생간에서는 즉시 plasmin과 PAI-1이 증가한다고 하며(11) 또한 백서의 경한 간경변시 tPA와 PAI-1이 증가된다고 보고(12)되어 있으며 이는 간재생시 세포외 기질개형에 이들 효소들이 중요한 역할을 하리라는 점을 시사하는 것이다.

이들 효소가 간의 어떤 세포에서 주로 분비되는지에 대해서는 논란이 있지만 일반적으로 휴지기의 백서 간세포는 생체내에서나 시험관내에서 PAI-1을 분비하지 않는다고 보고되어 있으며(9,11,13) 반면 일부 보고에서는 백서의 일차배양 간세포에서 PA와 PAI-1을 분비한다(14)고 하는 연구결과가 있는 등 보고자에 따라 그 결과가 다양한 실정이며 표피성장인자에 대한 이들의 조절에 대해서는 알려진 바가 거의 없는 형편이다.

이에 본 연구에서는 백서의 일차배양 간세포에서 표피성장인자에 의한 uPA, tPA 그리고 이들의 억제제인 PAI-1 유전자 발현의 조절에 대해 규명하고자 하였다.

방 법

1) 실험재료

Methyl- ^3H -thymidine, α - ^{32}P -deoxycytidine-5'-triphosphate(α - ^{32}P -dCTP), α - ^{32}P -deoxyadenosine-5'-triphosphate(α - ^{32}P -dATP)(specific activity, 3000 Ci/mmol), γ - ^{32}P -adenosine-5'-triphosphate(γ - ^{32}P -ATP)(specific activity, 6000 Ci/mmol)는 New England Nuclear사에서, RPMI 1640 media, fetal bovine serum, trypsin 등은 Gibco-BRL사에서, random primed DNA labeling kit, guanidine thiocyanate는 Boehringer Mannheim사에서, agarose, nytrane membrane은 Bio-Rad사에서, Hind III 등 제한효소들은 Promega사에서, insulin, epi-

dermal growth factor (EGF), cycloheximide, dibutyryl cAMP, dexamethasone, acrylamide, bis-acrylamide, formamide, formaldehyde, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS), ethidium bromide, phenol, piperazine-N',N'-bis [2-ethanesulfonic acid] (PIPES) 등은 Sigma사에서 구입하였으며, 그외 다른 시약들은 특급의 것을 사용하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용한 백서는 화학연구소에서 분양받은 웅성 백서(male Sprague Dawley rat)를 폴리프로필렌 재질의 사육장에 2마리씩 분리해 넣고 고형배합 쥐사료(제일사료 주식회사)로 체중이 250~300 g 내외로 사육하여 외견상 건강한 쥐만을 실험에 사용하였다.

3) 간세포의 일차배양

(1) 간세포의 분리: 웅성백서(250~300 g)를 urethane (1 g/kg, IP.)으로 마취시키고 복부를 절개하여 간 문맥과 하대 정맥을 노출시켰다. 간 문맥을 18 gauge 젤코침으로 삽관하고 HBSS (calcium free)로 8~10 ml/min의 유속으로 관류를 시작하면서 동시에 하대정맥을 잘랐다. 약 100 ml의 관류액을 관류시킨 후에 흉부를 열고 16 gauge 젤코침으로 상대정맥에서 간상부의 하대정맥에 걸쳐 삽관하고 하대정맥에서 도관을 묶었다. 이때 상대 정맥을 통해 나오는 액을 관류병으로 재순환시켰다. 이 조작을 37°C가 유지된 상태에서 관류액에 95% O₂, 5% CO₂를 계속 주입시키며 실시하였다. 관류액의 재순환을 마친 후, 0.05~0.06% 농도로 0.45 μm millipore membrane filter로 여과하여 멸균한 collagenase를 관류액에 첨가하고 15분간 더 관류하였다. 이후 collagenase로 처리된 간을 절제하여 collagenase가 포함되어 있지 않은 HBSS (60 ml)이 든 비이커에 옮긴 후 멸균된 가위로 간을 싸고 있는 막을 파괴하고 가볍게 흔들어서 간세포를 유리시킨 후 세포부유액은 250 μm nylon filter로 여과하였다. 여액을 멸균된 50 ml 원심분리 관에서 50×g로 4분간 일차 원심분리하여 간세포를 침전시킨 다음 HBSS로 다시 부유하고 5.7 ml의 Percoll을 첨가하여 20 ml로 조절하고 50×g에서 원심분리하였다. 마지막 세포부유액에서 세포생존율은 부유액 100 μl 와 0.4% trypan blue (0.95% NaCl) 100 μl 의 mixture를 hemocytometer로 살아 있는 세포수와 죽은 세포수를 통하여 결정하였다. 이때 세포생존율은 95% 이상이였다.

(2) 간세포 배양: Rat tail collagen으로 포매된 배양용기에 간세포가 5×10⁵ cell/ml이 되도록 분주하였으며 간세포 배양은 dexamethasone (1 μM), bovine serum albumin (1.25 mg/ml), insulin (6.25 $\mu\text{g/ml}$), Hepes (10 mM, pH 7.4), Penicillin/streptomycin이 포함된 Williams ME를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 분주 4시간 후 배

지를 교환해주고, 부착된 세포를 24시간 경과한 후 다시 새로운 배지로 교환해준 다음 실험에 사용하였다.

4) DNA 합성을 검색

일차배양 간세포에서 표피성장인자 처리 후 시간경과에 따른 DNA 합성률 변화는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 간세포를 5×10^5 개로 조절한 다음 표피성장인자를 처리한 후 일정시간(12, 24, 30, 36, 48시간) 마다 DNA 합성률 측정 20분 전에 $2 \mu\text{Ci/ml}$ 의 ^3H -thymidine으로 처리한 다음 세포를 cold PBS로 2회 세척하고 cold 5% TCA로 처리하여 4°C 에서 3시간 방치한 후 원심분리하였다. 침전물을 다시 5% TCA 2회, 95% ethanol로 3회 세척한 후 공기중에서 건조한 다음 1.5 ml의 0.3 M NaOH로 처리하여 37°C 에서 하룻밤 방치하였다. 이 용액에 $150 \mu\text{l}$ 의 3 M HCl을 가하여 중화한 다음 전입된 방사능을 측정하였다.

5) Total RNA 조제

Total RNA는 Ultraspec II kit (Biotech Lab. Inc., USA)을 이용하여 분리하였다. 즉, 표피성장인자를 처리한 간세포를 일정 시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩을 가해 세포를 수집한 후, 이에 Ultraspec II 용액을 일정량 가하여 세포를 용해시켜 4°C 에서 5분간 방치한 후, 이것에 0.1배 용량의 chloroform 용액을 가하고 진탕혼합 하였다. 이를 다시 4°C 에서 5분간 방치하고, 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 취한 후 0.5배 용량의 isopropyl alcohol을 가하고, 다시 이것에 Ultraspec II resin을 0.05배 용량 가하여 진탕혼합하고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 이때 얻은 침전물을 70% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 가해 침전물을 녹여 resin에 결합되어 있는 RNA를 용출시켰다. 이때 얻은 total RNA는 260 nm에서 그 농도를 측정하고, 사용할 때까지 50% ethanol 용액에서 -70°C 에 보관하였다.

6) Northern blot hybridization

10~50 μg 의 total RNA를 formaldehyde와 formamide 용액하에서 변성시키고 formaldehyde-1.2% agarose gel로 전기영동한 다음 RNA를 gel로부터 nytran membrane에 옮긴 후 $5 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 0.5 \text{ M NaCl} + 0.015 \text{ M Na-citrate}$)로 씻고 80°C 에서 완전히 건조될 때까지 가온하였다. 건조된 RNA blot을 hybridization (50 mM PIPES , 100 mM NaCl , $50 \text{ mM sodium phosphate}$, 1 mM EDTA 그리고 5% SDS가 포함된 용액) 용액으로 60°C 혹은 55°C 에서 45분 동안 pre-hybridization 시킨 후, 용액을 버리고 10^6 cpm/ml 의 probe이 포함된 새로운 hybridization 용액을 가하여 같은 온도에서

하룻밤 hybridization 하였다. Hybridization이 끝나면 5% SDS가 포함된 $1 \times \text{SSC}$ 로 실온에서 10분간 세척하고 다시 같은 용액으로 hybridization 온도에서 20분간 세척한 후 autoradiogram을 하였다. 이때 probe으로는 uPA, tPA 및 PAI-1 cDNA를 random primed DNA labeling kit로 ^{32}P 를 labeling하여 사용하였다.

결 과

1) 표피성장인자에 의한 일차배양 간세포의 형태학적 변화

일차배양 간세포는 세포증식이 정지되어 있으나 표피성장인자를 처리할 때 세포증식이 일어난다고 한다.(15) 본 실험에서 먼저 표피성장인자로 처리한 후 간세포의 형태학적인 변화를 관찰하였다. 간세포를 $5 \times 10^5 / \text{ml}$ 씩 분주하여 4시간 후 배지를 교환해준 다음 24시간 후 10 ng/ml의 표피성장인자를 처리하면서 시간경과에 따른 간세포의 형태학적인 변화를 검색한 바 표피성장인자를 가하지 않은 대조군은 전혀 변화가 없었으나 표피성장인자를 처리한 군은 12시간 후부터 세포 형태의 변화가 나타나다가 24시간, 48시간 후에는 점차 세포 밀도가 증가하여 다각형의 전형적인 정상 간세포의 증식양상을 나타냈다(Fig. 1).

2) 표피성장인자에 의한 간세포 DNA 합성률의 변화

세포증식이 왕성할 때는 DNA 합성이 증가하나 성장이 정지되어 있을 때는 DNA 합성도 정지되어 있다는 것은 주지의 사실이다. 본 실험에서 표피성장인자에 의한 간세포의 증식 여부를 밝히기 위해 일차배양 간세포에 표피성장인자 처리 후 DNA 합성률의 변화를 ^3H -thymidine 전입으로 검색하였다. 간세포를 $5 \times 10^5 / \text{ml}$ 씩 분주한 다음 부착한 세포를 24시간 후 새로운 배지로 교환하고 30분 후 10 ng/ml의 표피성장인자를 처리하고 세포를 포집하기 2시간 전에 $2 \mu\text{Ci/ml}$ 의 ^3H -thymidine으로 pulse시킨 후 전입된 방사능을 측정한 바 표피성장인자를 처리하지 않은 대조군은 시간경과에 따라 ^3H -thymidine이 거의 전입되지 않았으나 표피성장인자를 처리한 군은 ^3H -thymidine의 전입이 12시간 후 점차 증가하다가 36시간 후 최고치에 달하였으며 이후 감소하였다(Fig. 2). 이는 표피성장인자에 의해서 간세포의 증식이 왕성함을 시사하는 것이다.

3) 일차배양 간세포에서 표피성장인자에 의한 uPA, tPA 및 PAI-1 유전자 발현

1996년 Mars 등(16)의 연구에 의하면 백서의 일차배양 간세포에는 uPA가 존재하며 uPA는 간세포성장인자를 활성화시킨다고 하였으며 이들은 간세포의 무혈청 배양중 24 시간째에 uPA mRNA 양이 증가했다가 48시간에 감소된다고 보고하였다. 반면에 Zhang 등(17)을 비롯한 여러

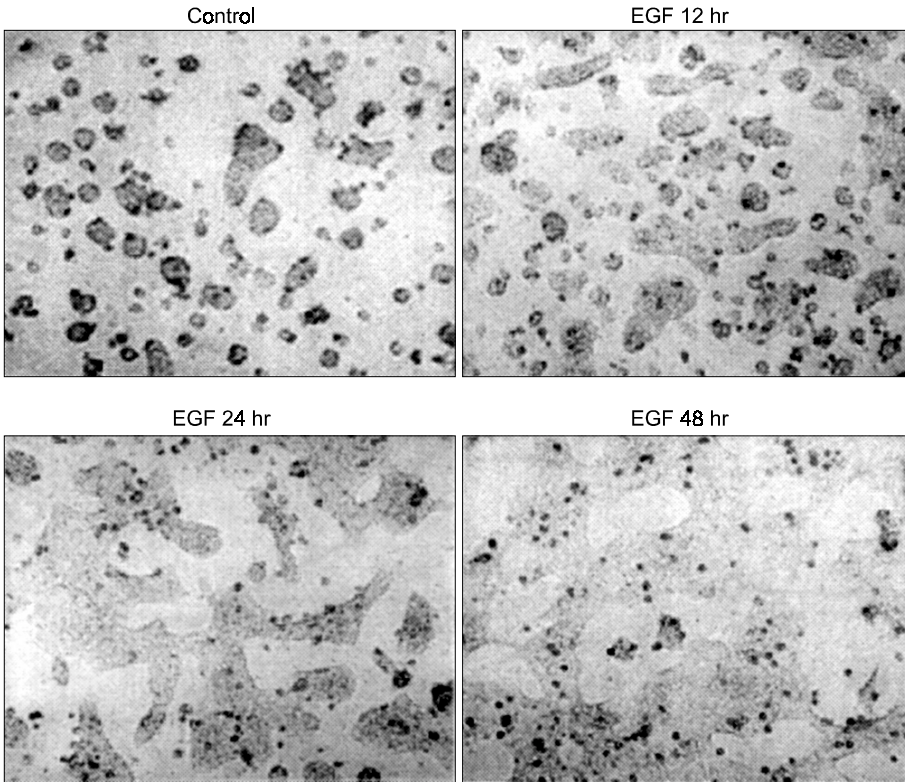


Fig. 1. Phase-contrast photomicrographs of adult rat hepatocytes at various time intervals after epidermal growth factor (EGF) exposure. Hepatocytes were isolated from adult rat and seeded at an initial density of 5×10^5 cells and cultured in William's M.E. for 24 hours. And then, the medium was replaced and the cells were exposed to EGF (10 ng/ml). After exposure of EGF, the cells were photographed at the indicated time intervals ($\times 400$).

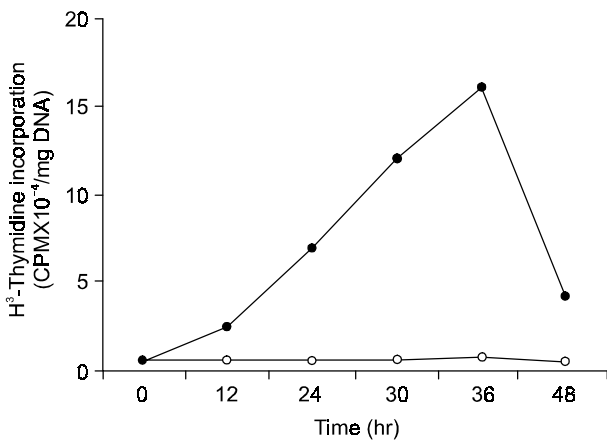


Fig. 2. Labeling of hepatocytes with [³H]-thymidine after exposure of EGF (10 ng/ml). The cells were plated at a density of 5×10^5 /ml. After exposure of EGF, the cells were harvested at several time intervals as indicated, and the levels of DNA synthesis were monitored by [³H]-thymidine incorporation.

연구자들(12)은 백서의 정상간에서의 PA의 발현은 없거나 매우 미약하다고 하였다. 이에 백서의 일차배양 간세포에서 표피성장인자에 의해 PA와 PAI-1 등의 유전자 발현이 되는지를 알아보기 위해 간세포를 10 ng/ml 농도의 표피성장인자로 처리하고 48시간 배양한 후 total RNA를 조제

하여 Northern blot hybridization으로 PA 및 PAI-1 mRNA의 변동을 검색하였다.

표피성장인자를 처리하지 않은 대조군에서는 tPA 및 PAI-1 mRNA가 각각 미약하게 검출되었으나 uPA mRNA는 전혀 검출되지 않았다. 표피성장인자를 48시간 처리하였을 때 tPA mRNA 양은 증가하였으나 PAI-1 mRNA의 양적변동은 관찰되지 않았으며 uPA mRNA는 대조군의 경우와 마찬가지로 전혀 검출되지 않았다. 반면 양성 대조군으로 사용한 uPA가 강하게 발현되는 것으로 알려진 HT 1080 섬유아세포(18)에서 uPA mRNA를 검색하였을 때에는 매우 강하게 발현되었다(Fig. 3). 같은 양의 total RNA가 Northern blot되었는지 확인하기 위해 동일한 nytrane membrane으로 β -actin의 mRNA 양을 검색한 바 2.1 kb의 β -actin mRNA가 나타났으며 그 양도 일정하여 같은 양의 total RNA가 부하된 것으로 확인되었다.

4) 표피성장인자 처리 후 시간경과에 따른 uPA, tPA 및 PAI-1 유전자 발현

상기 실험에서 표피성장인자 처리 48시간 후의 uPA, tPA 및 PAI-1 유전자 발현을 검색한 결과 tPA mRNA는 증가되었고 PAI-1 mRNA는 대조군의 수준이었으며 uPA mRNA는 검출되지 않았다. 한편 Uno 등(19)은 tPA는 delayed early growth response (DER) gene, PAI-1은 immediate early growth response (IER) gene으로 보고하였다. 이

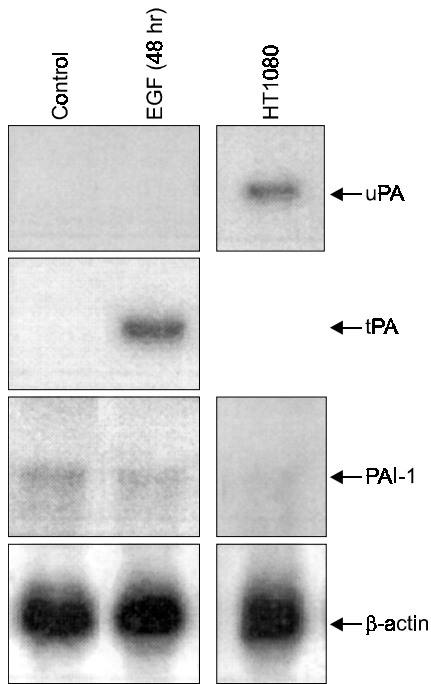


Fig. 3. Effect of EGF on uPA, tPA and PAI-1 genes expression in primary hepatocyte cultures. Hepatocytes were plated at an initial density of 5×10^5 cells/ml. EGF (10 ng/ml) was added at time zero and incubation was continued up to 48 hours. At 48 hours of cultures, the cells were harvested and total RNA was extracted. uPA, tPA and PAI-1 mRNA were measured by Northern blot hybridization as described in "Materials and Methods".

에 이들의 변화와 uPA mRNA의 검출을 명확히 규명하기 위해 표피성장인자 처리 후 시간경과에 따른 영향을 검색하였다.

일차배양 간세포에 10 ng/ml의 표피성장인자를 처리하고 시간경과에 따라 total RNA를 조제하여 Northern blot hybridization을 시행한 바 tPA mRNA는 표피성장인자 처리 1시간 후부터 서서히 증가하다가 36시간 후 현격히 증가하여 48시간까지 지속되었으나 PAI-1은 표피성장인자 처리 1시간째 최대로 증가되었다가 신속히 감소되어 12시간째부터는 대조군의 수준으로 감소된 상태로 48시간까지 지속되었다(Fig. 4). 따라서 PAI-1 유전자는 IER 유전자의 특성을 보이는 것으로 생각되었으나 tPA 유전자는 표피성장인자에 의해 초기에 발현이 증가되기는 하였으나 그 정도가 미약하여 DER 유전자로 판단하기는 어려운 것으로 추정되었다. 한편 uPA mRNA는 표피성장인자 처리 후 48시간까지 전혀 발현되지 않았으며 50 ng/ml의 표피성장인자 투여시에도 발현되지 않았다(성적 제시하지 않음). 본 실험조건의 객관성을 확보하기 위해 uPA를 발현하는 HT1080 인체섬유아세포를 양성 대조세포로 하여 검색한 바 HT1080에서는 uPA mRNA가 다량 검출되어 본

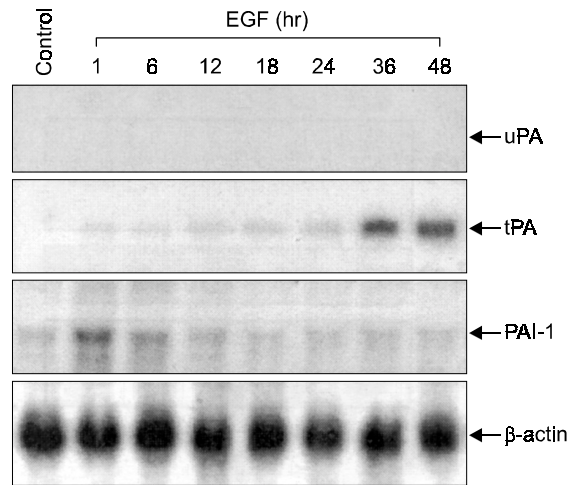


Fig. 4. Time-dependent expression of uPA, tPA and PAI-1 mRNA after EGF treatment. Hepatocytes were plated and treated with EGF (10 ng/ml) and harvested with various time intervals as indicated above. uPA, tPA and PAI-1 mRNA levels were determined with Northern blot hybridization.

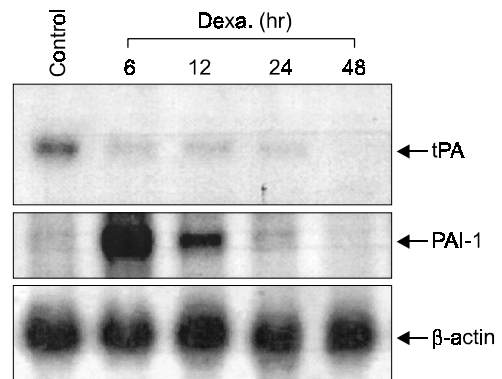


Fig. 5. Effect of dexamethasone on tPA and PAI-1 mRNA expression in primary hepatocyte cultures. The hepatocytes were treated with 10^{-7} M of dexamethasone for 6, 12, 24 and 48 hours.

실험 조건에는 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

간세포의 일차배양은 일반적으로 collagen이 포매된 배양용기를 사용하므로 collagen 이외에 여러 기저막단백들의 영향을 알아보고자 여러 기저막단백을 함유하는 Matrigel을 포매시켜 간세포배양을 하고 표피성장인자 처리 후 uPA 발현여부를 확인하였는데 대조세포인 HT1080에서는 강한 uPA mRNA의 발현이 관찰되었으나 일차배양 간세포에서는 Matrigel 사용과 표피성장인자 처리여부 또한 처리시간과 무관하게 uPA mRNA가 발현되지 않았다(성적 제시하지 않음). 또한 cyclic AMP (cAMP)는 일부 세포주들에서 PA 활성을 증가시킨다고 알려져 있으며(8) Heaton 등(8,14)은 백서의 일차배양 간세포에서의 CPT-

cAMP 처리는 tPA와 PAI-1의 증가를 유도한다고 보고한 바 있다.

이에 100 uM의 dibutyryl cAMP를 1시간, 12시간, 24시간 처리하고 uPA mRNA 양을 검색하였으나 역시 uPA mRNA는 전혀 발현되지 않았다(성적 제시하지 않음). 따라서 이러한 결과들은 백서의 일차배양 간세포에서 표피성장인자에 의해 uPA mRNA가 유도되지 않음을 시사하는 것으로 생각되었다.

Dexamethasone은 일차배양 간세포에서 tPA를 억제시키며 PAI-1은 증가시킨다고 알려져 있다.(14) 이에 본 실험에서도 tPA 및 PAI-1 유전자 발현에 대한 dexamethasone의 영향을 검색해보았다. 일차배양 간세포를 10^{-7} M의 dexamethasone으로 6, 12, 24, 48시간 처리하고 그 시간에 따른

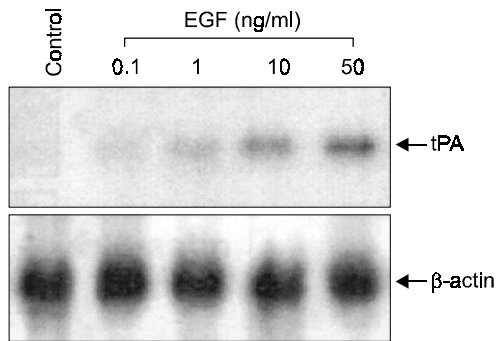


Fig. 6. Dose-dependent effect of EGF on tPA mRNA expression in primary hepatocytes. Hepatocytes were plated and treated various concentrations of EGF (0.1~50 ng/ml) for 24 hours. After 24 hours of cultures with various concentrations of EGF, cells were harvested and total RNA was extracted for Northern blot hybridization.

tPA, PAI-1 mRNA의 양적 변동을 검색한 결과 tPA mRNA는 처리 시간에 따라 점차 감소하였으나 PAI-1 mRNA는 6시간 후 최대로 증가되었다가 이후 신속히 감소되어 24시간째에 대조군과 유사한 낮은 발현을 나타내었다(Fig. 5).

5) tPA 유전자 조절에 대한 표피성장인자의 영향

선행 실험에서 10 ng/ml의 표피성장인자 처리시 일차배양 간세포는 시간이 증가함에 따라 tPA mRNA 양이 증가하였다. 표피성장인자 농도에 따른 tPA mRNA 양의 변동을 알아보기 위해 간세포를 표피성장인자로 0.1, 1, 10, 50 ng/ml의 농도가 되게 처리한 다음 24시간 후에 total RNA를 조제하여 tPA mRNA 양의 변동을 검색한 결과 농도의존적으로 tPA mRNA 양이 증가되어 50 ng/ml 농도에서 최고치에 달하였다(Fig. 6).

표피성장인자에 의한 tPA mRNA의 양적 변동에 대한 조절기전을 밝히기 위해 간세포에 10 ng/ml의 표피성장인자를 처리하고 total RNA 조제 3시간 전에 5 ug/ml의 cycloheximide를 처리한 후 Northern blot hybridization으로 mRNA 양의 변화를 검색한 결과 tPA mRNA의 양은 표피성장인자를 단독 처리할 때보다 cycloheximide를 같이 처리할 시 증가하였으며 이는 표피성장인자에 의한 tPA mRNA의 증가에는 새로운 단백질합성이 요구되지 않음을 시사하는 것이다(Fig. 7A).

CPT-cAMP 처리는 백서의 일차배양 간세포에서 tPA mRNA의 증가를 유도한다고 보고되어있다.(14) 이에 tPA mRNA에 대한 cAMP의 영향을 알아보하고자 100 uM의 dibutyryl cAMP를 간세포에 12시간 처리하고 동시에 cycloheximide (5 ug/ml)를 3시간 처리해 mRNA의 변화를 검색한 결과 cAMP에 의해 tPA mRNA 양이 증가되었으며 cycloheximide를 병용처리하였을 때 tPA mRNA 양이 더

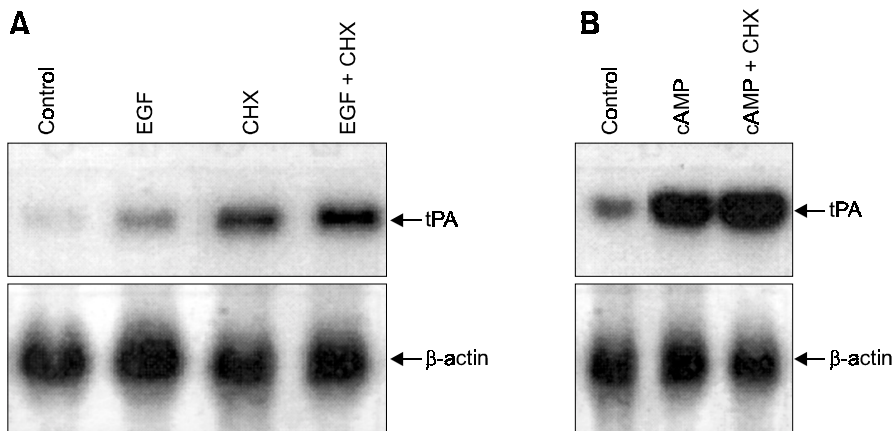


Fig. 7. Effect of cycloheximide (A) and cAMP (B) on the expression of tPA mRNA levels. (A) Hepatocytes were treated with EGF (10 ng/ml) for 24 hours and cycloheximide at a concentration of 5 ug/ml was added to the culture at a time of 3 hours before harvest. (B) Hepatocytes were treated with cAMP (100 uM) for 12 hours and cycloheximide at a concentration of 5 ug/ml was added 3 hours before harvest.

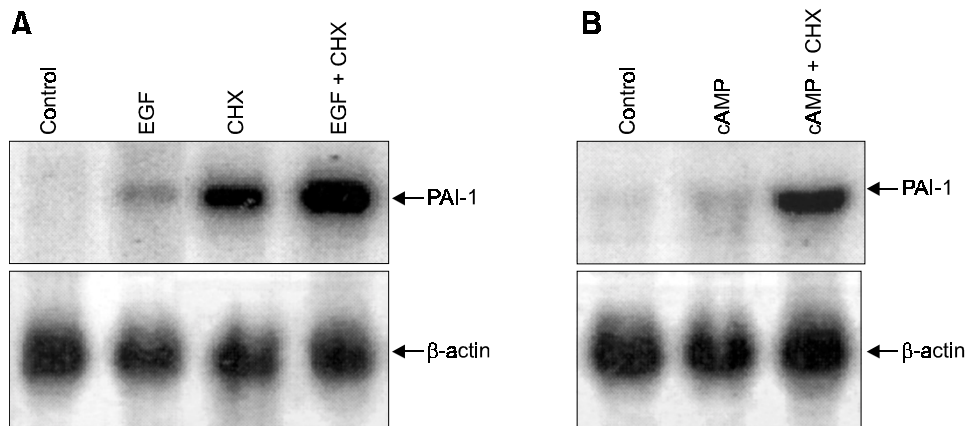


Fig. 8. Effect of cycloheximide (A) and cAMP (B) on the expression of PAI-1 mRNA levels. (A) Hepatocytes were treated with EGF (10 ng/ml) for 1 hour and cycloheximide at a concentration of 5 ug/ml was treated for 3 hours. (B) Hepatocytes were treated with cAMP (100 uM) for 12 hours and cycloheximide at a concentration of 5 ug/ml was added 3 hours before harvest.

증가하여 cAMP에 의한 tPA mRNA의 증가에도 새로운 단백질 합성이 필요치 않다고 생각되었다(Fig. 7B).

6) PAI-1 유전자 조절에 대한 표피성장인자의 영향

Fig. 5에서 나타난 바와 같이 PAI-1은 표피성장인자 처리 1시간째에 최대로 증가되었다가 신속히 감소하여 12시간째부터 48시간까지 큰 변화없이 대조군의 mRNA 양과 유사하게 낮은 발현을 나타내었다. Early growth response gene인 PAI-1 유전자에서 표피성장인자에 의한 양적 증가의 조절기전을 밝히기 위해 cycloheximide의 영향을 검색하였다. 즉 간세포에 10 ng/ml의 표피성장인자와 5 ug/ml의 cycloheximide를 처리한 후 Northern blot hybridization으로 PAI-1 mRNA 양적 변화를 검색하였다. 이때 cycloheximide는 표피성장인자 처리 2시간 전에 처리하였다.

PAI-1 mRNA의 양은 표피성장인자 단독 처리시 보다 cycloheximide 병용 처리시 현저히 증가되었으며 이는 표피성장인자에 의한 PAI-1 mRNA 양의 증가에 새로운 단백질 합성이 요구되지 않음을 시사한다(Fig. 8A).

또한 일차배양 간세포에서 cAMP에 의한 PAI-1 유전자 조절기전을 알아보하고자 100 uM의 dibutyril cAMP를 12시간 처리하고 5 ug/ml의 cycloheximide를 3시간 처리한 후 PAI-1 mRNA 양의 변화를 비교한 결과 cAMP를 처리하였을 시 대조군에 비해 그 양이 약간 증가하였으며 cAMP와 cycloheximide를 동시 처리시 PAI-1 mRNA 양이 현저히 증가되어 이 과정에서도 새로운 단백질 합성이 필요치 않음을 알 수 있었다(Fig. 8B).

고 찰

백서의 일차배양 간세포는 생체내의 간세포와 같이 정상적인 간세포의 구조를 가지며 기능을 하고 또한 정상적

인 성장조절을 하는 것으로 알려져 있다. Plasminogen activator (PA)는 plasminogen을 plasmin으로 전환시켜 간재생과 섬유화에 관련된 조직개형에 중요한 일련의 단백질 분해 과정을 유도하며(3) plasmin은 fibronectin, laminin, proteoglycan 등의 기질성분을 용해시킬 뿐 아니라 MMPs와 같은 다른 단백질 분해효소를 활성화시켜 그 작용을 나타내고 latent interstitial collagenases와 stromelysin 등을 활성화시키기도 한다.(5,6) Plasminogen이 plasmin으로 전환되는 것은 단백질 분해과정에 있어 매우 중요한 초기 과정이라 할 수 있으며 반면에 PA 억제제인 PAI-1은 uPA와 tPA의 활성을 조절하여 단백질 분해과정을 효율적으로 억제시킨다.(2,3) 이러한 현상들은 단백질 분해효소와 그 억제제들이 간재생과정에 있어 매우 중요한 조절기능을 담당하리라는 것을 의미하며 현재까지 이에 대해 명확히 규명된 것은 매우 적은 실정이다.

표피성장인자는 간세포의 강력한 mitogen으로 알려져 있으며 수용체와의 결합을 통해 수용체내에 있는 tyrosine kinase가 활성화되어 그 생리적 기능을 나타낸다.(20,21)

일차배양 간세포는 세포증식이 정지되어 있으나 표피성장인자를 처리하였을 때 DNA 합성을 증가시키는 등 세포증식을 유도한다고 한다.(15) 본 연구에서는 표피성장인자에 의해 간세포에서 PA와 PAI-1 유전자의 발현이 어떻게 이루어지는지를 알아보기 위해 *in vitro* 모델인 백서의 일차배양 간세포를 이용해 규명하고자 하였다.

실험결과 간세포를 표피성장인자로 처리했을 때 세포의 형태가 다각형으로 변화하면서 전형적인 정상 간세포의 모양과 성장을 나타냈으며 이와 병행하여 ³H-thymidine 전입도 증가하므로써 본 실험조건하에서 표피성장인자가 간세포의 증식을 유도함을 알 수 있었으며 이는 다른 연구자의 결과와 일치하였다.(15,20,21)

PA와 PAI-1 mRNA는 정상 백서의 간에서는 발현되지

않거나 또는 매우 미약하게 발현된다고 하며(9,10) 반면 간부분절제를 한 재생간 또는 간경변시 등은 증가된다고 보고되어 있으며(11,12) 이러한 소견들은 간재생시 세포외 기질개형에 이들 유전자와 효소들이 중요한 역할을 하리라는 것을 암시하는 것으로 Mars 등(16,22)은 백서의 무혈청 일차배양 간세포는 uPA를 분비하며 이 uPA는 plasminogen과 sequence, structural homology가 있으며 간재생에 관계하는 비활성인 단쇄의 간세포성장인자(scHGF)를 활성화형인 이중쇄의 간세포성장인자(tcHGF)로 전환시키는 효소 역할을 한다고 보고한 바 있으나 반면 일부 연구자들(9,11,13)은 백서의 일차배양 간세포에서 uPA mRNA를 관찰할 수 없다고 하였으며 본 실험에서도 대조세포인 HT1080 섬유육종세포는 uPA mRNA가 매우 강하게 발현되었으나 간세포에서는 표피성장인자의 처리와 관계없이 uPA mRNA signal을 발견할 수 없었으며 표피성장인자의 처리시간과 처리용량과 관계없이 발현되지 않았고 cyclic AMP에 의해서도 전혀 발현되지 않았으며 collagen 이외에 anchorage-dependent 성장에 관여될 수 있는 복합 기저막성분인 Matrigel을 도포한 배양용기를 사용한 경우에서도 uPA mRNA는 발현되지 않아 본 실험조건하에서 백서의 일차배양 간세포는 표피성장인자에 의해 uPA mRNA의 발현이 유도되지 않는 것으로 사료되었다.

그러나 tPA mRNA는 표피성장인자처리와 시간 의존적으로 그 양이 서서히 증가하여 36시간 후에 최대에 이르러 48시간까지 지속되었으나 PAI-1은 표피성장인자처리 후 1시간째에 증가되었다가 시간이 증가할수록 점차 감소하는 양상을 보였다. 이러한 양상은 일부 early growth response gene의 양상을 보이는 것으로(19) 이 중 PAI-1은 immediate early growth response (IER) gene으로 생각되었으나 tPA mRNA는 표피성장인자에 의한 발현 속도가 느린 편으로 delayed early growth response (DER) gene으로 판단하기에는 곤란하였으며 Uno 등(19)은 RT-PCR 실험을 통하여 tPA, PAI-1 유전자들을 early growth response gene이라고 주장하였으나 본 실험에서는 tPA 유전자의 경우 이들 보고와 일치하지 않는 것으로 추정되었다. Early growth response gene들은 간재생시 유도되며 세포증식의 복잡한 과정을 조절하는 중요한 역할을 하리라 추정되고 있으며 매우 다양한 기능을 하는 유전자들로 전사, 성장, 신호전달 등 다양한 기능을 담당하며(22-25) 이들 유전자들은 간부분절제 수분내에 단백질합성과 무관하게 유도된다고 한다.(19) 한편 DER 유전자들은 간절제 후 수 시간내에 유도되며 전사과정에 단백질합성이 필요한 것으로 알려져 있다.(19) 표피성장인자에 의한 tPA와 PAI-1 유전자조절에 전사과정에서의 단백질합성의 필요성 여부를 알아보하고자 단백질합성억제제로 알려진 cycloheximide를 이용해 Northern blot 분석을 시행한 결과 tPA mRNA가 표피성장인자 단독처리시 보다 증가하였으며 또한 PAI-1 mRNA 역시

현저히 증가되어 표피성장인자에 의한 이들 유전자의 조절에는 새로운 단백질합성이 필요치 않다는 것을 알 수 있었다. 그러나 Uno 등(19)은 cycloheximide에 의한 단백질합성억제에 의해 PAI-1 mRNA는 전혀 영향을 받지 않으나 tPA mRNA는 완전히 억제된다고 보고하여 tPA 유전자는 단백질합성이 필요한 DER 유전자라고 주장하였으나 본 연구에서는 표피성장인자에 의한 tPA mRNA 발현시 PAI-1 mRNA와 마찬가지로 새로운 단백질합성이 필요치 않으며 DER 유전자로 판단하기엔 무리일 것으로 사료되었다.

Cyclic AMP는 간세포의 증식과 간재생에 중요한 역할을 하리라 추정되고 있으며 간재생 직전에 간내의 cAMP 농도가 증가된다고 보고되어 있고 배양된 간세포에서 DNA 합성을 촉진시키며 재생간에서 세포주기를 촉진시킨다고 하며 일차배양 간세포의 tPA와 PAI-1 유전자 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며(8,14) 보고(19)에 의하면 간세포를 dibutyl cAMP로 6시간 처리할 시 이들 mRNA들이 2.5배에서 3배 증가되는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 tPA mRNA는 cyclic AMP에 의해 현저히 증가되며 PAI-1 mRNA도 증가되어 cAMP가 이들 유전자들의 초기 발현에 매우 중요함을 알 수 있었으며 또한 cyclic AMP에 의한 이들 유전자의 증가는 cycloheximide에 의해 억제되지 않아 이 과정 역시 새로운 단백질합성이 필요치 않음을 알 수 있었다.

한편 glucocorticoid는 백서의 일차배양 간세포에서 tPA의 활성화와 mRNA를 감소시키고 PAI-1의 활성화와 mRNA를 증가시킨다고 알려져 있으며 또한 glucocorticoid에 의한 이들 유전자의 조절에 새로운 단백질합성이 필요치 않아 유전자 전사 혹은 mRNA 안정성에 대한 직접적인 효과때문으로 추정되고 있다.(14) 본 실험에서도 dexamethasone은 tPA mRNA를 현저히 감소시켰으며, cAMP에 의해 증가된 tPA mRNA도 역시 cAMP와 dexamethasone 동시 처리시 현저히 감소되어 dexamethasone에 의한 tPA mRNA의 억제는 cAMP 신호전달과 관련되는 것으로 사료되었다. 반면에 dexamethasone 처리는 PAI-1 mRNA를 6시간째에 최대로 증가시키고 이후 급속히 감소시켰다.

간세포성장인자(26)와 종양괴사인자- α (27)를 포함한 여러 성장인자들은 간재생과정에 역할을 한다고 알려져 있으나 복잡한 재생과정의 조절에 대한 정확한 기전에 대해서는 거의 밝혀진 바가 없다. 그러나 PA-plasmin계는 시험관내에서 간세포증식과 간재생에 관여하는 인자의 활성화에 관계된다(28)고 하며 tPA와 uPA는 비활성형인 간세포성장인자(pro-HGF)를 활성화형으로 전환시키며(12,16,22) 이 활성화는 PAI-1에 의해 억제되며(16) 또한 plasmin은 비활성형인 TGF- β 를 활성화시켜 PAI-1의 생성을 증가시킨다(29)고 한다. 또한 간세포성장인자는 Hep G2 간암세포에서 PAI-1을 증가시킨다고 보고(30)되어 있다. 따라서 간세포에서의 tPA 생성은 간세포성장인자의 활성화를 통

한 간재생의 자극을 유도할 수 있을 것으로 생각되며 간세포에서 생성되는 PAI-1 역시 간재생의 과정을 조절하는 negative feedback으로 작용할 수 있을 것으로 추정된다.(11) 실제로 uPA가 아닌 tPA 활성화와 mRNA, 그리고 PAI-1 mRNA 등은 경미한 간경변과 사염화탄소에 의한 백서의 간손상시 증가된다고 보고(12)되어 있고 반면 uPA 활성화와 mRNA는 정상간뿐 아니라 lipopolysaccharide(LPS) 처리된 백서의 간에서도 발견되지 않는다는 연구결과(9)가 있다.

본 연구에서 백서 간세포의 일차배양에서 표피성장인자의 처리는 간세포의 정상적인 증식과 형태학적 변화를 유도하였으며, tPA와 PAI-1 mRNA의 발현을 유도하였으나 uPA mRNA는 표피성장인자 처리와 무관하게 발현되지 않았다. PAI-1 mRNA는 표피성장인자 처리 1시간째에 최대 증가되고 이후 급속히 감소하여 immediate early growth response gene인 것으로 판단되었으나 tPA mRNA는 표피성장인자에 의해 매우 서서히 유도되다가 처리 36시간째에 현저히 증가되어 48시간째까지 증가된 상태로 지속되어 early growth response gene으로 생각되지 않았다. 따라서 표피성장인자에 의한 백서 간세포의 tPA, PAI-1 mRNA의 시간적인 차등발현은 간재생과정에 있어 중요한 조절인자 역할을 할 것으로 사료되었으며 이때 uPA는 중요한 역할을 하리라 추정되지는 않았다. 간부전과 섬유소용해는 서로 밀접히 연관되어 있고 섬유소용해와 억제에 관련된 tPA와 PAI-1 등은 간세포의 성장과 간재생에 밀접하게 관계되며 나아가 간손상 또는 간경변시 회복을 위한 중요한 병태생리학적 역할을 하리라 추정할 수 있으며 이를 규명하기 위해서는 여러 병리학적인 동물모델에서 간세포에서 생성되는 tPA와 PAI-1의 기능과 그 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Martinez-Hernandez A, Amenta PS. Morphology, localization and origin of the hepatic extracellular matrix. In: Zern M, Reid L, editors. Extracellular matrix: Chemistry, biology, pathology. New York: Marcel Dekker; 1993. p.255-327.
- Andreasen PA, Greorg B, Lund LR, Lund LR, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: Hormonally regulated serpins. *Moll Cell Endocrinol* 1990;68:1-19.
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 1991;88:1067-72.
- Mayor M. Biomedical and biochemical aspects of the plasminogen activation system. *Clin Biochem* 1990;23:197-211.
- He C, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, et al. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human intestinal collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2632-6.
- Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds J. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667:1-12.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990;110:1361-7.
- Heaton JH, Kathju S, Gelehrter TD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator gene expression in HTC rat hepatoma cells by glucocorticoids and cyclic nucleotides. *Mol Endocrinol* 1992;6:53-60.
- Quax PHA, van den Hoogen CM, Verheijen JH, Padro T, Zeheb R, Gelehrter TD, et al. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 mRNA in rat tissue in vivo. *J Biol Chem* 1990;265:15560-3.
- Astrup T. Tissue activators of plasminogen. *Fed Proc* 1969;25:42-51.
- Thornton AJ, Bruzdinski CJ, Raper SE, Gelehrter TD. Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. *Cancer Res* 1994;54:1337-43.
- Seki T, Imai H, Uno S, Ariga T, Gelehrter TD. Production of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in mildly cirrhotic rat liver. *Thromb Haemost* 1996;75:801-7.
- Konkle BA, Schuster SJ, Kelly MD, Harjes K, Hassett DE, Bohrer M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 messenger RNA expression is induced in rat hepatocytes in vivo by dexamethasone. *Blood* 1992;79:2636-47.
- Heaton JH, Nebes VL, O'Dell LG, Morris SM, Gelehrter TD. Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1989;3:185-92.
- Nakamura T, Tomita Y, Ichihara A. Density-dependent control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biochem* 1983;94:1029-35.
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993;143:949-58.
- Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: Role of stellate cells. *J Hepatol* 1999;31:703-11.
- Andreasen PA, Pyke C, Riccio A, Kristensen P, Nielsen LS, Lund LR, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 biosynthesis and mRNA level are increased by dexamethasone in human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:3021-5.
- Uno S, Nakamura M, Seki T, Ariga T. Induction of tissue-type plasminogen activator (tPA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) as early growth responses in rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:123-8.

- 20) Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979;48:193-216.
 - 21) Richman RA, Claus TH, Pilgis SJ, Friedman DL. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3589-93.
 - 22) Mars WM, Kim TH, Stolz DB, Liu ML, Michalopoulos GK. Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. *Cancer Res* 1996;56:2837-43.
 - 23) Almendral JM, Sommer D, MacDonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1988; 8:2140-48.
 - 24) Herschman HR. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991;60: 281-319.
 - 25) Mohn KL, Laz TM, Hsu JC, Melby AE, Bravo R, Taub R. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimu-
lated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol Cell Biol* 1991;11:381-90.
 - 26) Kinoshita T, Hirao S, Matsumoto K, Nakamura T. Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:330-5.
 - 27) Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1441-6.
 - 28) Michalopoulos G, DeFrances M. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-6.
 - 29) Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;266:1092-100.
 - 30) Wojta J, Nakamura T, Fabry A, Hufnagl P, Beckman R, McGrath K, Binder BR. Hepatocyte growth factor stimulates expression of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue factor in Hep G2 cells. *Blood* 1994;84:151-7.
-