대한외과학회지 : 제 63 권 제 2 호
Vol. 63, No. 2, August, 2002

□ 원 저 □

쥐의 부분 간이식에 있어 문맥과 간동맥 재개통 후 이식편의 재관류 손상에 관한 조직학적 연구

고신대학교 복음병원 외과, [1]부산대학교병원 외과

윤명희 · 이충한 · 한군택[1] · 김동헌[1] · 심문섭[1]

Histologic Study on Reperfusion Liver after the Revascularization through the Portal Vein or Hepatic Artery Following Heterotopic Partial Liver Transplantation in Rats

Myung Hee Youn, M.D., **Chung Han Lee,** M.D., **Koon Taek Han,** M.D.[1], **Dong Hun Kim,** M.D.[1] and **Mun Sup Sim,** M.D.[1]

Purpose: The technique of partial liver transplantation from a living donor was developed to expand the donor pool. However such small grafts may not only be functionally inadequate for the recipient, but will also sustain injury characterized by cholestasis and histological features of ischemia after implantation. Damage to partial liver grafts after reperfusion is frequently observed but the mechanism of injury remains unclear. Injury to partial liver grafts may be related to changes in portal blood flow. In this study, we investigated the histologic changes of the reperfusion of livers after revascularization through the portal vein or hepatic artery following heterotopic partial liver transplantation in rats.

Methods: Inbred Lewis partial liver were transplanted to inbred Brown Norway rats heterotopically in three groups. The first group of transplants, Group I (Portal vein group, n=3) was reperfused firstly through the portal vein. The second group, Group II (Hepatic artery group, n=3) was firstly reperfused through the hepatic artery. The third group, Group III (Control, n=1) was sham-operated. After reperfusion, the liver grafts were procured and fixed in formalin. The reperfusion livers were studied using immunohistochemical staining and in-situ RT PCR.

Results: In the H&E staining of the reperfusion livers there were no differences between groups I and II. Using immunohistochemical staining of TNF ·R, FAS L, caspase 8 and in-situ RT PCR (NOS mRNA, TNF · R mRNA, FAS mRNA), the hepatic artery first reperfusion liver showed more damage than the portal vein first reperfusion liver. TUNEL staing showed severe apoptosis in hepatic artery reperfusion liver.

Conclusion: The expression of the apoptosis molecular markers was more prominent in the reperfused liver performed with initial revascularization using the hepatic artery, rather than portal vein. These findings may be due to fact that the high oxygen blood in the hepatic artery is stressful to the reperfusion liver. The routinely used portal vein first revascularization technique decrease reperfusion injury to the graft when compared to hepatic artery first revascularization. **(J Korean Surg Soc 2002;63:89-98)**

Key Words: Reperfusion injury, Portal vein revascularization, Partial liver transplantation

중심 단어: 재관류 손상, 문맥재개통, 부분간이식

Department of Surgery, Kosin Medical College, Gospel Hospital, [1]Department of Surgery, School of Medicine, Busan University, Busan, Korea

서 론

간이식은 1990년대에 말기 간 질환의 치료법으로서 그 자리매김을 하였으며, 간절제에 의한 생체 부분간이식술은 영유아뿐만 아니라, 뇌사자 장기가 부족한 나라에서는 성인에서도 활발하게 시행되어 작은 크기(small-for-size graft)의 간이식이 빈번하게 이루어지고 있다.(*1*) 우리 나라에서도 1994년 이후 소아 및 성인에서 생체 부분간이식술을 시행하여 1년 생존율 87.3%, 2년 생존율 85.6%, 3년 생존율 85.6%, 그리고 사망률 5.7%로 보고하였다.(*2*)

생체 부분간이식의 문제점들은 수혜자가 필요로 하는 간의 용적보다 이식편의 용적이 작아 기능적으로 문제가 되거나,(*2-4*) 허혈-재관류 손상,(*5*) 유출구 폐쇄로 인한 이식편의 울혈(*6*) 및 이식편의 담즙 울체 등으로 인한 primary non-function 등(*7*)이 있으며, 그 기전은 정확히 밝혀지지 않았다.

이러한 손상 가운데, 허혈-재관류 손상(*5*)은 pre-preservation injury, cold preservation injury, rewarming injury, and

책임저자 : 윤명희, 부산시 서구 암남동 34번지
㉾ 602-702, 고신대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 051-990-6462, Fax: 051-990-3007
E-mail: yoonmhj @dreamwiz.com
접수일 : 2002년 6월 20일, 게재승인일 : 2002년 7월 3일

reperfusion injury 등으로 나눌 수 있으며, 이는 공여자에서 간을 구득하기 전의 상태, 간 구득 후 보존액의 종류, 성분 및 저온에 의한 손상, 수혜자의 복강 내에 들어와 혈관 문합 후 재관류하기까지의 시간 및 체온에 의한 손상, 그리고 재관류로 인한 여러 가지 요인들에 의한 손상을 말한다.

작은 크기의 이식편에서의 허혈-재관류 손상의 원인 중 중요한 한 가지는 관류되는 문맥 혈류량 및 그 혈류의 성상이다.(*8-10*) 통상적인 간이식의 재관류는 문맥을 먼저 문합하고 재개통한 후 간동맥을 문합하여 이차적으로 관류를 시행한다. 그러나, 몇몇 기관에서는 간동맥을 먼저 문합하고 재관류를 시행한 후 이차적으로 문맥을 문합하고 관류를 한 성적을 보고하고 있다.(*11-19*) 그러나 그러한 연구도 임상적인 혈역동학적 관찰을 하였을 뿐 문맥과 간동맥 각각의 우선 관류에 대한 간의 조직학적 손상을 보고한 자료는 부족하다.

이에 저자는 작은 크기의 이식편의 간이식 수술에 있어 문맥과 간동맥의 재관류 순서의 차이에 따른 허혈-재관류 손상을 이식편의 조직학적 측면에서 관찰하고, 통상적인 문맥 우선 재개통에 대한 검정을 해 보고자 하였다.

그 방법으로는, 간이식 시 재관류를 시행한 후 이식편을 채취하여 조직의 세포사(apoptosis)와(*20*) 관련되어 발현되는 단백질(TNF-α receptor (TNF・R), FAS ligand, caspase 8)과 유전자 산물(NOS mRNA, TNF・R mRNA, FAS mRNA)을 immunohistochemical staining과 in situ RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 또한 세포사의 관찰은 TUNEL법을 이용하였다.

방 법

1) 재료

(1) 시약 및 oligonucleotide: TNF-α receptor (TNF・R), FAS ligand (FAS L), caspase 8의 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)의 제품을, DEPC, sodium chloride, Tris-HCl, sodium citrate, magnesium chloride, 3-aminopropyltriethyoxylsilane 등은 Sigma (USA)의 제품을, hydrochloric acid, sodium hydroxide 등은 Shinyo (Japan)의 제품을, slide seal은 TaKaRa (Japan)의 제품을, Dig DNA labeling and detection kit 등은 Roche (Germany)의 제품을, ethanol, methanol은 Merck (Germany)의 제품을, RNase-free DNase, RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, dNTP 등은 Promega (USA)의 제품을, LSAB universal kit은 DAKO (USA)의 제품을, PCR machine은 Omnigene (Hybaid, UK)의 제품을 사용하였다. Oligonucleotide들은 Bioneer (Korea)에 합성을 의뢰하였다(Table 1). 그 외에도 tube, pipette, tips 등과 같은 plastic 제품들은 멸균된 일회 용품을 사용하였고, 증류수와 재활용 초자 기구들은 121°C에서 20분간 고압 증기 멸균하여 사용하였다.

(2) 실험 동물: 공여쥐로 inbred Lewis와 수혜쥐 inbred Brown Norway 수컷(Charles River Co., Japan)을 구입하여 사료와 물로써 적절한 환경에서 사육하였다. 무게 250±20 gm의 동물을 사용하였으며 시술 전 12시간 금식시켰다. 공여쥐는 3 ml의 urethane (120 g urethane/sterile water 1 L) 복강 내 투여로 마취하였고 수혜쥐는 ether로 흡인 마취하였다. 시술 후 2 ml의 식염수를 음경정맥으로 투여하여 수분을 공급하였다. 면역억제제는 사용하지 않았다.

(3) 실험군 및 간이식술

① **제1군(Portal Vein (PV) group, n=3);** Lee 등(*21,22*)의 이소성 보조 부분 간이식술을 이용하여, 공여쥐에서 70% 간절제 후 간동맥 및 담관을 결찰하고, 문맥을 박리한 후 문맥을 통해 heparin (heparin 1,000 U/normal saline 1 L)을 섞은 5 cc 생리식염수로 관류시켰다. 간상대정맥을 우심방 가까이에서 잘라 이식 때 정맥유출 경로를 넓게 하였다. 수혜쥐의 이식술은 간 가까이의 간하대정맥 측부에 공여쥐의 대정맥단을 9 0 ethilon으로 단측 문합하고 이식편으로 역류되지 않게 겸자(鉗子)로 차단한 뒤 수혜쥐의 대정맥은 개통시켰다. 이식편의 문맥은 수혜쥐의 문맥과 단단문합 후 재관류하였다(Fig. 1). 이식 시 총 허혈-재관류 시간은 40분이었다. 재관류 후 평균 10분 정도 경과한 뒤 동물을 희생시켜 이식편의 우측 전엽을 얻어 포르말린 고정하였다.

② **제2군(Hepatic Artery (HA) group, n=3);** 제1군과 동일하게 이소성 보조 부분 간이식술을 이용하였으며, 문맥과 간동맥 주위를 박리하여 celiac axis 아래 부분에서 대동맥

Table 1. List of oligonucleotide used in the experiments

Name	Sequence	GC%	Direction
rFAS L	TTAAAGCTTATACAAGCCGAAAAAGGTC	35	Forward
rFAS L	CAGTCTTGCAACAACCAGCCCC	59	Reverse
TNF・R	CCATGAGCACAGAAAGCATGATC	47	Forward
TNF・R	TCACAGAGCAATGACTCTAAA	38	Reverse
NOS	TCAAAGGAGGCCGCATGAGCTTG	56	Forward
NOS	TCAGAGCCTCGTGGCTTTGGGCTC	63	Reverse

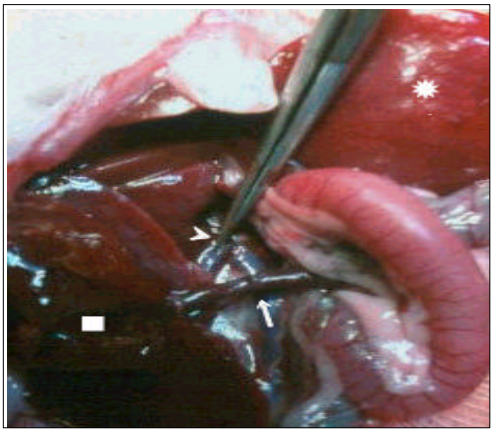

Fig. 1. Photograph of the portal vein reperfusion of heterotopic partial liver transplantation in rat. ● = recipient liver; ■ = graft liver; ↑ = portal vein anastomosis; ▲ = vena cava anastomosis.

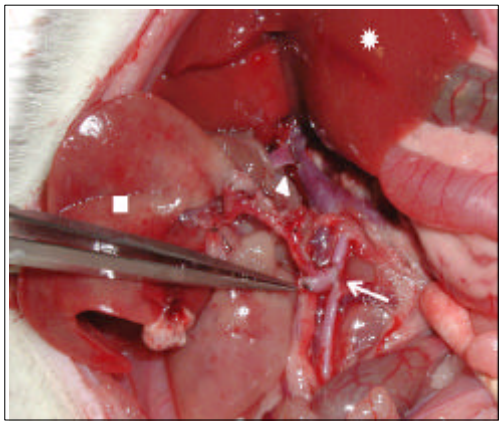

Fig. 2. Photograph of the hepatic artery reperfusion of heterotopic partial liver transplantation in rat. ● = recipient liver; ■ = graft liver; ↑ = hepatic artery-aorta anastomosis; ▲ = vena cava anastomosis.

을 겸자로 잡고 문맥을 통해 관류한 후 문맥을 결찰하였다. 이후 이식편을 구득한 후 Bench surgery에서 간동맥이 기시하는 대동맥을 문합을 위해 박리하였다. 수혜쥐의 이식 수술 시 혈류 유출은 제1군과 동일하게 간하대정맥-대정맥단을 단측 문합하였으며, 간동맥은 공여쥐의 간동맥이 기시하는 celiac axis 주위의 대동맥과 수혜쥐의 좌신동맥 기시부 아래의 대동맥을 단측 문합 후 재관류시켰다(Fig. 2). 이식 시 총 허혈-재관류 시간은 50분이었다. 재관류 후 평균 15분 정도 경과한 뒤 동물을 희생시켜 이식편의 우측 전엽을 얻어 포르말린 고정하였다.

③ **제3군(Control group, n=1);** 동물을 마취하여 개복 후 다른 시술 없이 간의 우측전엽을 채취하여 포르말린 고정하였다.

2) 방법

(1) 조직 절편 제작: 조직학적 염색표본 제작, 면역조직화학 표본 제작, 병리세포학적 표본제작(in situ RT-PCR 및 TUNEL) 등을 위하여 간 절편은 10% 포르말린에 고정하고 저장하였다. 고정 조직을 automatic tissue processor로서 처리하고 paraffin 포매한 후 7 μm 두께 절편으로 제작하여 3-aminopropyltriethoxy silane (Sigma, USA)-coated slides에 고정하였다. 탈파라핀 후 절편들을 함수과정을 거쳐 hematoxylin-eosin 용액에서 1분간 염색하였다.

(2) Apoptotic cell 검출법(TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling): 본 연구에서는 Roche (Germany) 사에서 고안한 변법인 in situ cell death detection kit (Roche, Germany)를 이용한 TUNEL 기법을 사용하여 사멸한 세포를 염색하였다. 조직 절편의 탈파라핀 및 함수 과정은 면역화학적 염색표본에서 사용한 방법과 동일하다. 이들 조직 절편들은 다시 proteinase K (20 μg/ml in Tris Hcl, pH 7.4 8.0)를 실온에서 15분간 처리하여 용액 침투를 용이하게 하였고 효소를 불활성화하기 위해 95°C에서 3분간 열처리하였다. 이 조직절편을 PBS로 15분간 3회 세척하였다. 절편에 TUNEL mixture를 첨가하고 37°C에서 한시간 동안 반응시킨 후 PBS로 20분간 3회 세척하였다. 이 TUNEL 반응에서 terminal dNTP transferase (TdT)라는 효소가 형광표식 fluorescein을 부착시킨 dUTP를 apoptosis 과정에서 절단된 DNA 조각들에 결합시키는 반응이 일어난다. 따라서 fluorescein 특이 항체에 alkaline phosphatase를 결합시킨 항체 용액으로서 37°C에서 30분 반응시킨 후 PBS로서 20분간 3회 세척한 후 alkaline phosphatase 기질 용액인 NBT/BCIP를 증류수 200 μl당 4 μl를 첨가한 발색제를 조직에 떨어뜨려 암실에서 30분간 발색시킨 후에 증류수에 씻어준 후 현미경하에서 염색된 세포를 관찰하였다.

(3) 면역 조직화학적 염색(TNF · R, FAS L, caspase 8): 조직 절편을 xylene에 15분간 3회 침지시켜 탈파라핀시켰고 각종 농도의 ethanol (100, 95, 80, 70%) 용액에 2분씩 담근 후 마지막으로 증류수에 30초간 담궈 함수시켰다. 세포내 재성 peroxidase를 비활성화하기 위하여, 조직 절편을 3% H_2O_2를 함유한 methanol에 넣고 30분간 처리하였다. 이 절편들을 PBS (phosphate buffered saline)에서 20분씩 3회 세척시킨 후, antibody diluent에 1 : 1000의 비율로 희석한 1차 항체를 절편에 떨어뜨린 후 4°C에서 밤새 반응시켰다. 절편은 PBS로 20분씩 3회 세척한 후, biotin을 부착한 2차 항체 (DAKO LSAB kit)를 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 다시 PBS로 20분씩 3회 세척하였다. 이들 절편에 peroxidase를 부착시킨 streptavidin (DAKO LSAB kit)을 37°C에서 30분간 반응시킨 후, PBS로 20분씩 3회 세척하였다. 발색제인 DAB (3, 3-diaminobenzidine) 용액에 담그고 효소 발색 반응을 끝낸 후, hematoxylin으로 counterstain한다.

염색 후 양성 판정은 관찰 대상 세포의 5% 이상에서 세포질이나 핵에 미세한 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 하였다. 염색의 정도는 5 24%는 (+), 24 50%는 (++), 51 74%는 (+++), 75% 이상은 (++++) 로 표시하였다.

(4) In situ RT-PCR (NOS mRNA, TNF · R mRNA, FAS L mRNA): 탈파라핀 및 함수 과정은 면역조직화학적 조직절편 처리와 동일하게 실시하였다. 먼저 PCR 반응이 진행되는 동안 primer가 genomic DNA와 결합하여 비특이적으로 증폭되는 것을 방지하기 위하여 절편들을 RNase-free DNase (5 units/ 100 μg)를 37°C에서 3시간 동안 반응시켰고, 94°C에서 3분간 처리함으로 DNase를 불활성화시켰다. 다음 in situ reverse transcription 과정으로 절편 내 간세포 세포질에 함유된 mRNA들을 M-MuLV reverse transcriptase로서 첫 번째 cDNA를 합성하였다. In situ PCR반응에는 Taq polymerase를 사용하여 유전자를 증폭시켰다. 이 실험의 조작과정에서 조직절편과 반응액들은 밀봉하여 증발방지 조치를 취하였다. PCR 증폭조건은 94°C에서 30초간 denaturation시키고, 60°C에서 30초간 renaturation시키고 72°C에서 30초간 cDNA를 증폭시키는 과정을 30회 반복하였다. 이 실험에 사용된 primer는 Table 1에 요약하였다. PCR 반응기질에는 digoxigenin 표식 dUTP를 사용하였기 때문에 항 digoxigenin 항체를 사용하였고, 이 항체는 또한 alkaline phosphatase가 표식되어 있었기 때문에 alkaline phosphatase 효소 반응을 이용하여 cDNA들을 세포 수준에서 검색할 수 있었다.

양성 판정은 관찰 대상 세포의 5% 이상에서 핵이나 세포질에 짙은 보라색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하였다. 염색의 정도는 5 24%는 (+), 24 50%는 (++), 51 74%는 (+++), 75% 이상은 (++++) 로 표시하였다.

결 과

1) 재개통 후 이식간의 육안적 소견

(1) 제1군(PV group, n=3): 수혜쥐의 간이식술 시 이식편의 혈류 유출부인 대정맥을 문합 후 문맥을 문합하고 재관류를 시켰을 때 장간막 혈류(splanchnic blood)가 순식간에 이식편으로 충만되면서 대정맥을 통해 유출되었다(Fig. 1). 재관류 직후에는 다소 흑적색의 이식편이 다량의 장간막 혈류로 인해 부종이 생기는 양상을 보였으나 차츰 그 정도가 감소하며 이식편의 색깔도 수혜쥐 자신의 간과 비슷하게 변하였다. 실험 동물 세 마리 모두에서 동일한 현상을 보였다.

(2) 제2군(HA group, n=3): 수혜쥐의 간이식술 시 혈류 유출 부위는 제1군과 동일하게 대정맥을 문합 후 이식편의 간동맥 기시부의 대동맥과 수혜쥐의 좌신동맥 아래의 대동맥을 문합하고 재관류시켰다. 수혜쥐의 대동맥의 혈관 겸자를 풀자 이식편의 간동맥으로 혈류가 유입되면서 이식편 내로 퍼지기 시작하였다. 재관류 직후 간 이식편은 제1군과 비교해서는 매우 서서히 선홍색의 동맥 혈류에 의해 채워지고 , 약 15분 경과 뒤 이식편 전체가 충만되었다(Fig. 2). 그러나 세 마리 중 한 마리는 약 20분이 지난 뒤 이식편 전체가 혈류로 충만되었다.

2) 조직학적 소견

두 실험군, 즉 문맥 관류 간과 간동맥 관류 간의 재관류 손상의 정도를 조직학적으로 비교 검색하였다.

(1) Hematoxylin-eosin 염색 소견: Hematoxylin-eosin 염색 상들에서는 문맥 관류 간조직과 간동맥 관류 간조직 사이

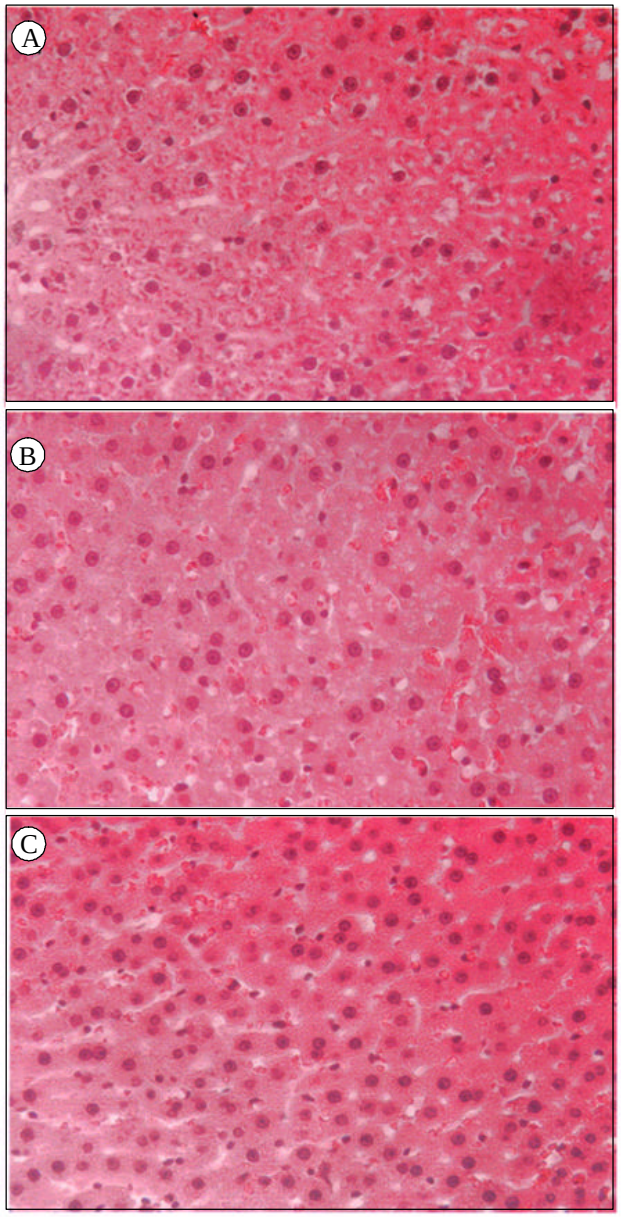

Fig. 3. Hematoxylin-eosin staining. There is no apoptotic cells in control liver (A), PV reperfusion liver (B) and HA reperfusion liver (C). ×200.

에는 특별한 차이점을 찾을 수 없었으나, 대조군에 비해서 실험군 두 군의 간세포가 핵의 염색질이 응축되거나 분절화되고, 세포질이 호산성으로 짙게 염색되는 소견을 보였다(Fig. 3).

(2) Apoptotic cell 검출(TUNEL): 실제로 죽어가고 있는 세포들을 TUNEL 기법으로서 검색해 보았을 때, apoptotic hepatocytes는 control군에서는 나타나지 않았으며, PV group에서는 20 30%, HA group 에서는 50% 이상에서 나타나, HA group에서 세포사가 더 뚜렷하였다(Fig. 4).

(3) Signaling step of apoptosis: Apoptosis 경로에서 발현되는 주요 분자들 가운데, TNF-α에 의해 활성화되어 적응단백과 결합하여 apoptosis를 유발하는 TNF 수용체(TNF · R)는 면역조직화학적 염색에서 문맥 관류 간에서보다 간동맥 관류 간에서 더 강하게 발현되어, 문맥과 중심정맥 주위의 간세포의 세포질이 전반적으로 적갈색의 과립으로 염색되었다(Fig. 5). TNF · R 유전자의 mRNA 발현을 in situ

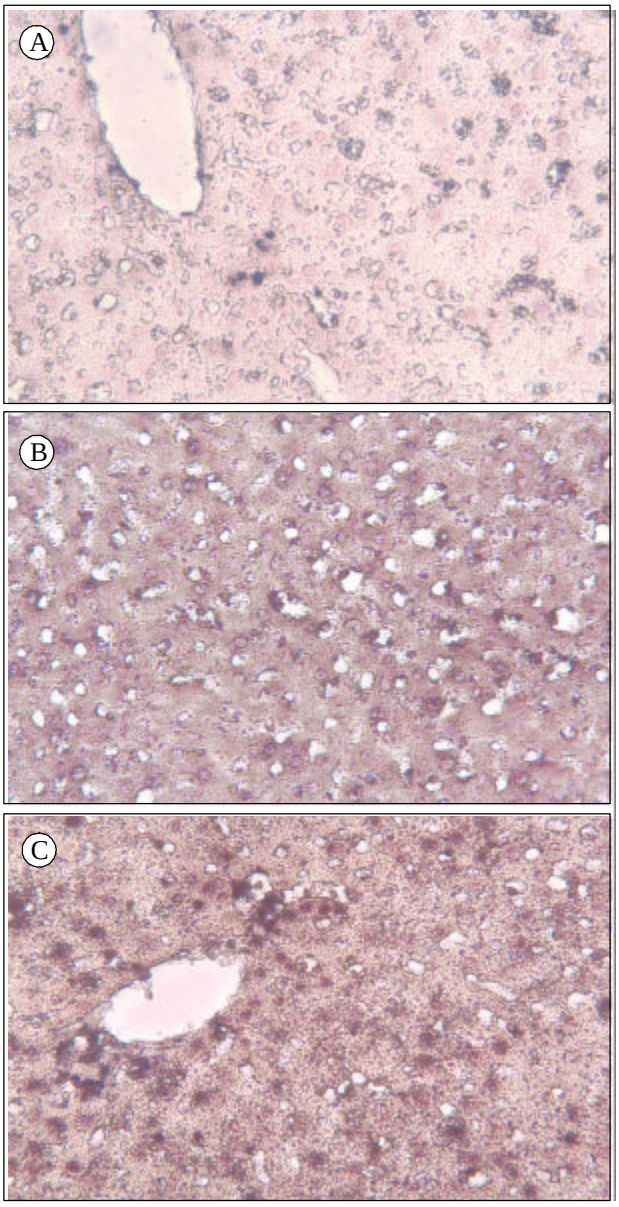

Fig. 4. TUNEL staining. These findings show focal accumulation of apoptotic hepatocytes in PV reperfusion liver (B), and many apotic hepatocytes in areas of central vien of HA reperfusion liver (C). A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

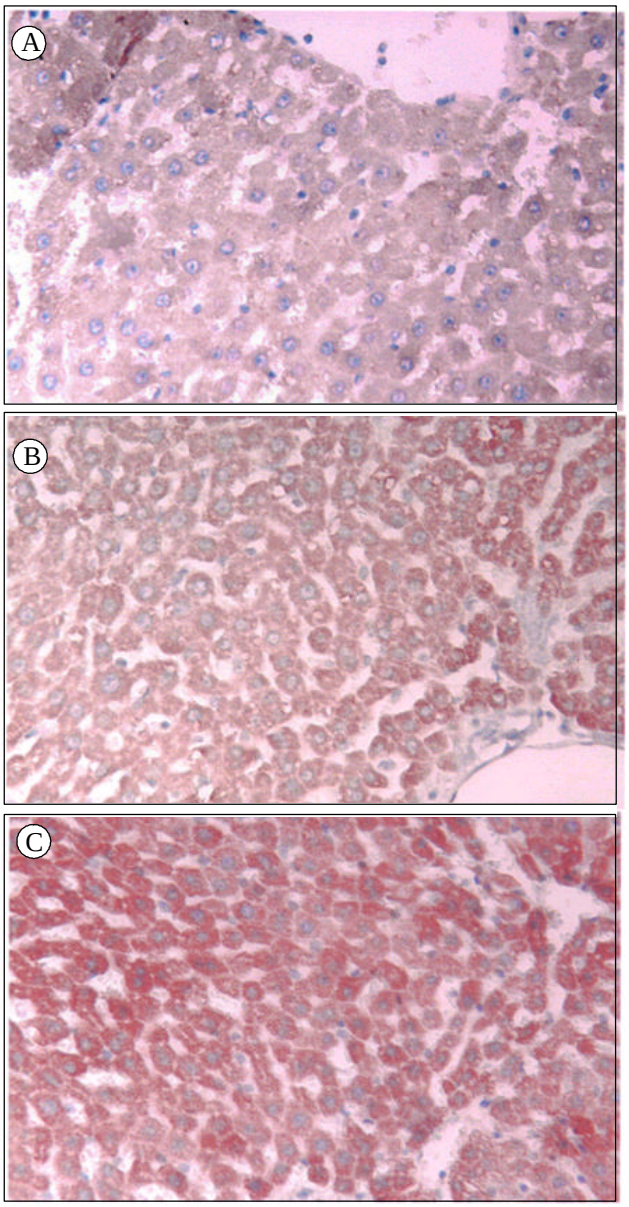

Fig. 5. Immunohistochemical reaction of TNF · R by anti-TNF · R antibody. Hepatocytes show faint cytoplasmic staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse brownish, fine granular cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C). A. Control liver, B. PV reperfusion liver, C. HA reperfusion liver ×200.

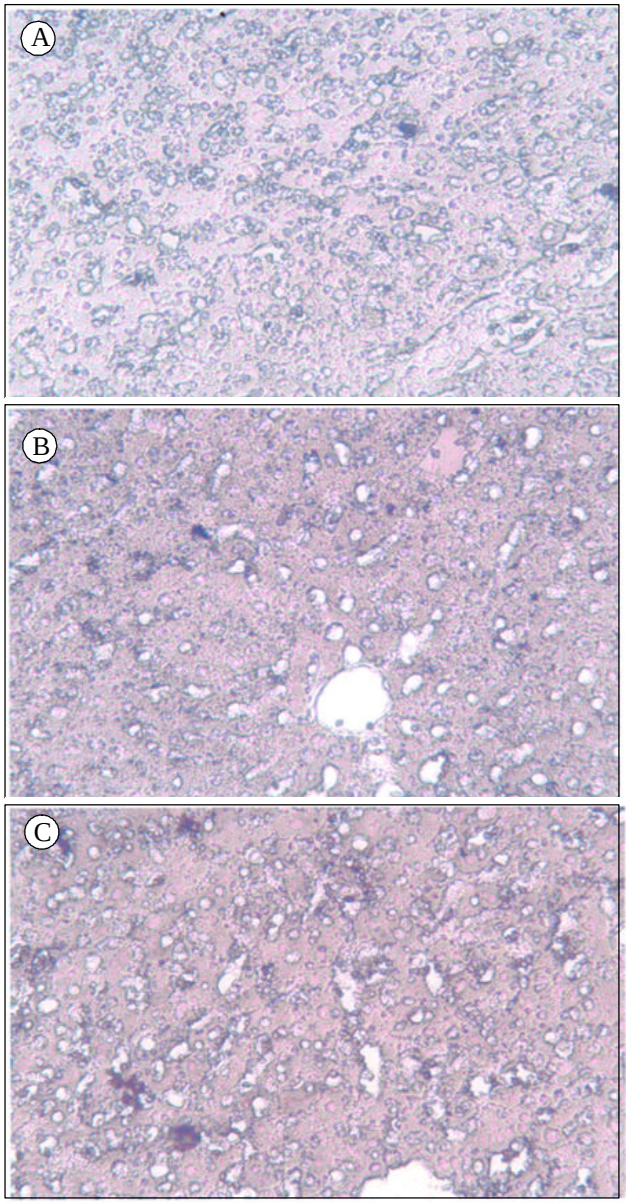

Fig. 6. In situ RT-PCR of TNF · R mRNA expressing cells. Hepatocytes show focal purple-colored staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse purple-colored nuclear or cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C). A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

RT-PCR법으로서 검색해 보면, 그 발현 강도는 문맥 관류 간에서보다 간동맥 관류 간에서 간세포의 세포질이 연한 보라색으로 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 6).

세포표면의 수용체인 FAS에 FAS L가 결합함으로써 시작되는 FAS에 의한 apoptosis는 간동맥 관류 간에서 더 강하게 발현되었다(Table 2). 간세포의 세포질이 적갈색으로 염색되는 소견이 문맥 주위의 간세포에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 7). FAS L mRNA 발현을 in situ RT-PCR 법으로서 검색해 보면, 역시 간동맥 관류 간에서 연한 보라색으로 염색되는 정도가 강하였다(Fig. 8).

염증 반응과 자유 라디칼로도 작용하는 nitric oxide의 산물인 NOS mRNA를 in situ RT-PCR 법으로 관찰하였을 때, 간동맥 관류 간에서 연한 보라색으로 염색되는 정도가 뚜렷하였다(Fig. 9).

(4) Execution step of apoptosis: 다양한 apoptosis 신호와 조절기전이 수렴되면 실행 caspase가 활성화되어 apoptosis가 일어나게 되는데 그중 caspase 8을 면역조직화학적 방법으로 조사하였을 때, 간동맥 관류 간에서 문맥 관류 간에서보다 간세포의 세포질이 적갈색으로 염색되는 정도가 더 강하였다(Fig. 10).

고 찰

본 연구의 목적은 간 부분 이식술에서 portal vein reperfusion technique과 hepatic artery reperfusion technique 후의 이식 간 조직에 나타나는 조직학적 소견을 비교 분석하는 데 있었다. 연구 결과로는, 부분 간이식에 있어 통상적인 간문맥 우선 개통의 재관류가 간동맥 우선 재관류보다 이식편의 간손상을 줄일 수 있는 것으로 나타났다.

장기이식 수술에 있어서 재관류 손상을 최소화할 수 있는 방법은 매우 중요하다. 1980년 후반기 심근 경색의 재관류 손상에서 시작하여 뇌혈관 경색 재관류 손상에 이르기까지 수많은 연구들이 이루어져 왔으며, 간이식 외과에서도 이식에 따르는 재관류 손상에 대한 문제를 해결하기 위해 많은 연구들이 진행되고 있다. 지난 십 여년 동안의 세포사멸 분자기전 연구의 발전에서 괴사(necrosis)와 고사(apop-

Table 2. Histologic staining of TNF·R/TNF·R mRNA, FAS L/FAS L mRNA, NOS mRNA and caspase 8

	Control gruop	PV group		HA group	
		Extent	Integrity	Extent	Integrity
TNF·R	−	++	+	++++	++
TNF·R mRNA	−	++	+/−	+++	+
FAS L	−	++++	+	++++	+++
FAS L mRNA	−	+	+	+++	++
NOS mRNA	−	++	+	+++	+++
Caspase 8	−	+++	++	+++	+++

− ≦ 5% staining; + = 5 24% staining; ++ = 24 50% staining; +++ = 51 74% staining; ++++ ≧ 74% staining.

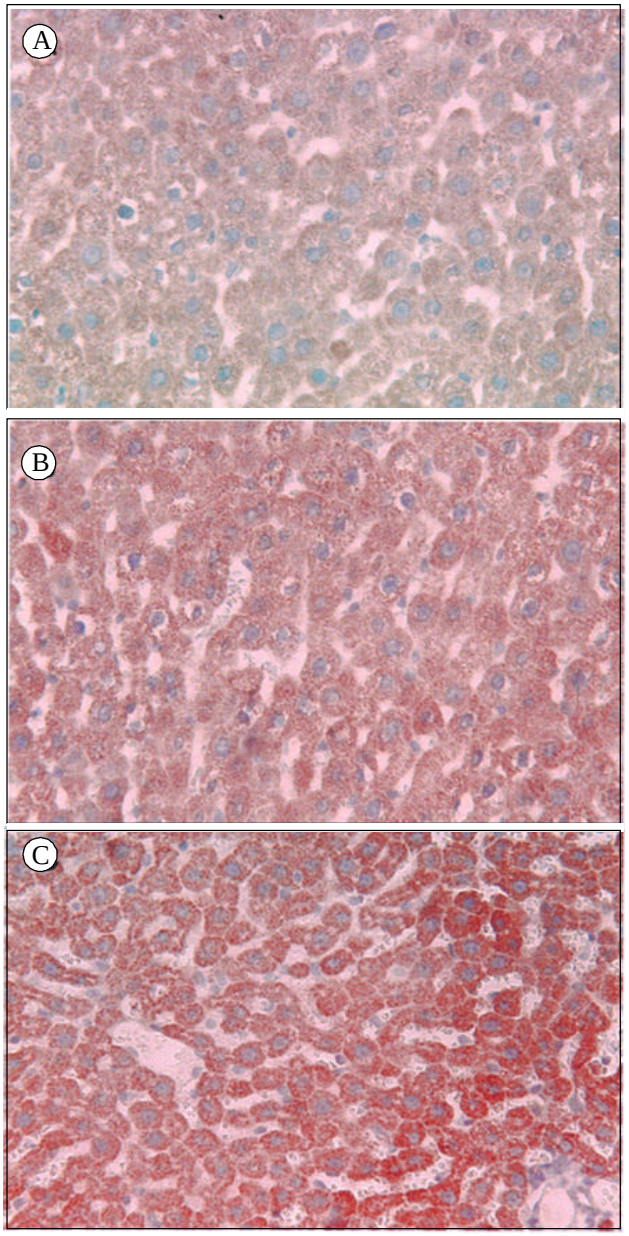

Fig. 7. Immunohistochemical reaction of FAS L by anti-FAS L antibody. Hepatocytes show faint cytoplasmic staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse brownish, fine granular cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C), especially in areas of portal vein. A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

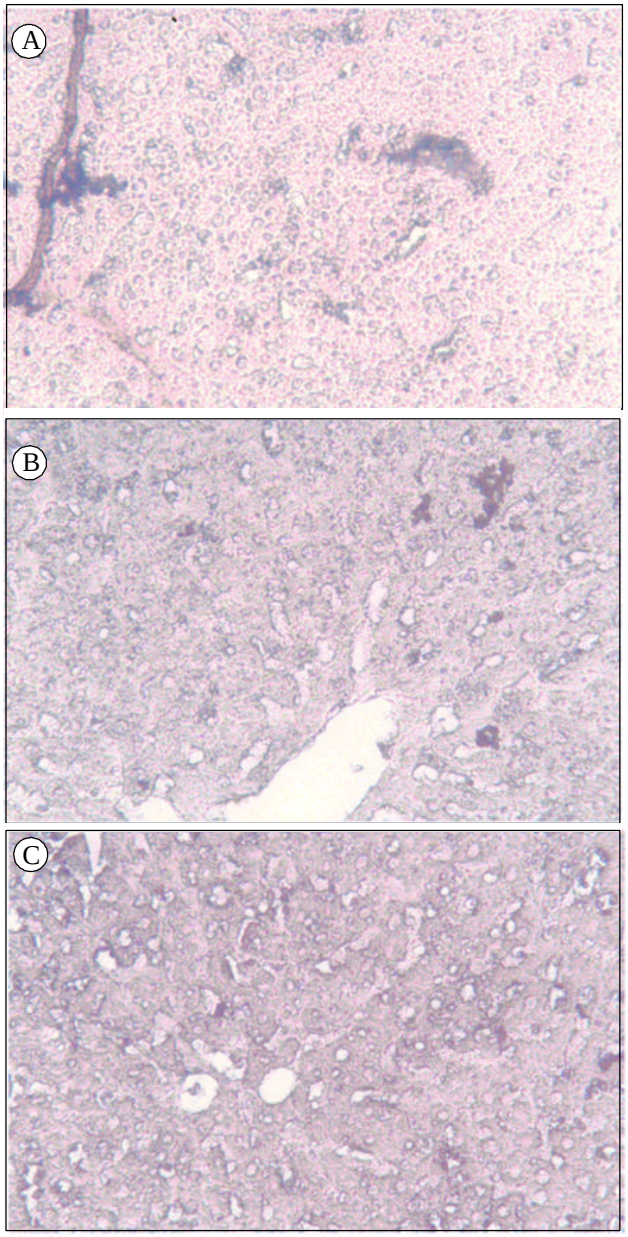

Fig. 8. In situ RT-PCR of FAS L mRNA expressing cells. Hepatocytes show focal purple-colored staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse purple-colored nuclear or cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C). A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

tosis)의 분자 기전의 차이들이 밝혀졌고, 재관류 손상의 분자 기전 연구에도 진전이 있었으나, 장기마다의 생리적 특성 때문에 여전히 많은 부분이 미지로 남아 있다.

간 이식편의 혈관 문합 후 재개통 시, 혈역동학 및 대사성 변화를 일으키는 징후를 postreperfusion syndrome (PRS)으로 정의하며,(23) 이는 재관류 직후 첫 10분내에 최소한 5분 이상 활력 징후의 이상을 말한다. 본 연구에서는 이에 근거하여 문맥과 간동맥 문합 후 재관류를 시행하여 간 이식편으로 혈류가 충만되고 10분 이내에 조직을 얻었다.

참고로, apoptosis 유도의 분자 기전을 크게 signaling step와 execution step으로 생각해 보면 signaling step의 대표적인 분자들로서 TNF-α/TNF · R, FAS/FAS L을 들 수 있고, execution step의 대표적인 분자로서 caspase 8을 들 수 있다.(24-26) 재관류 손상의 주요 triggering factor들은 저산소

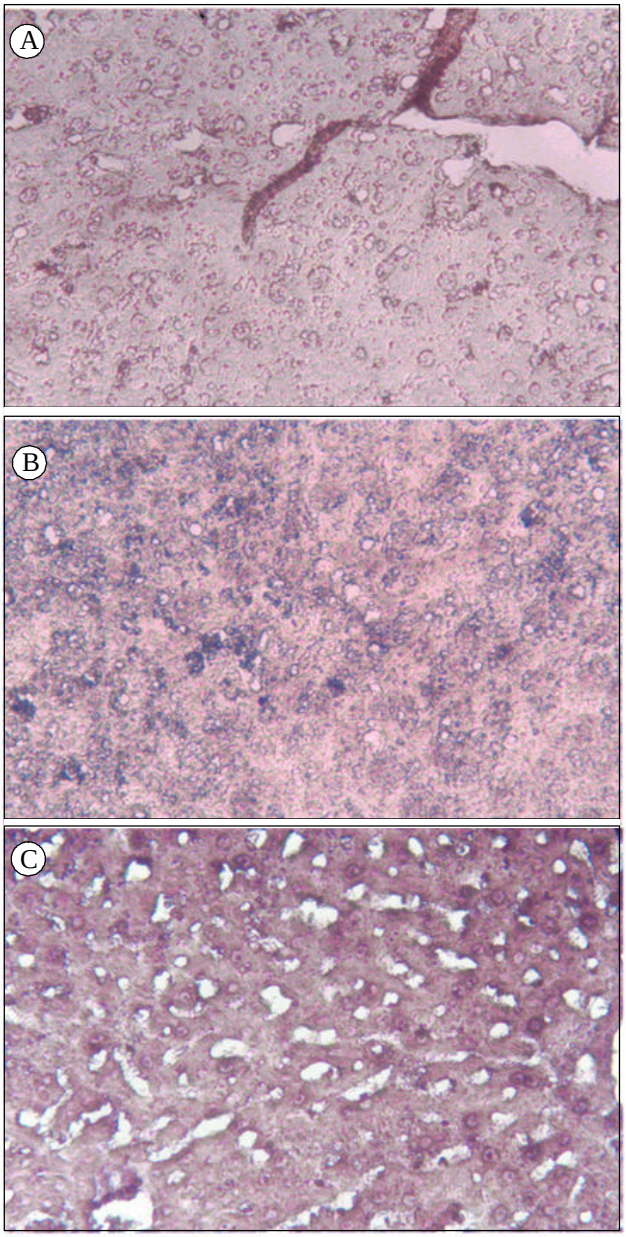

Fig. 9. In situ RT-PCR of NOS mRNA expressing cells. Hepatocytes show focal purple-colored staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse purple-colored nuclear or cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C). A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

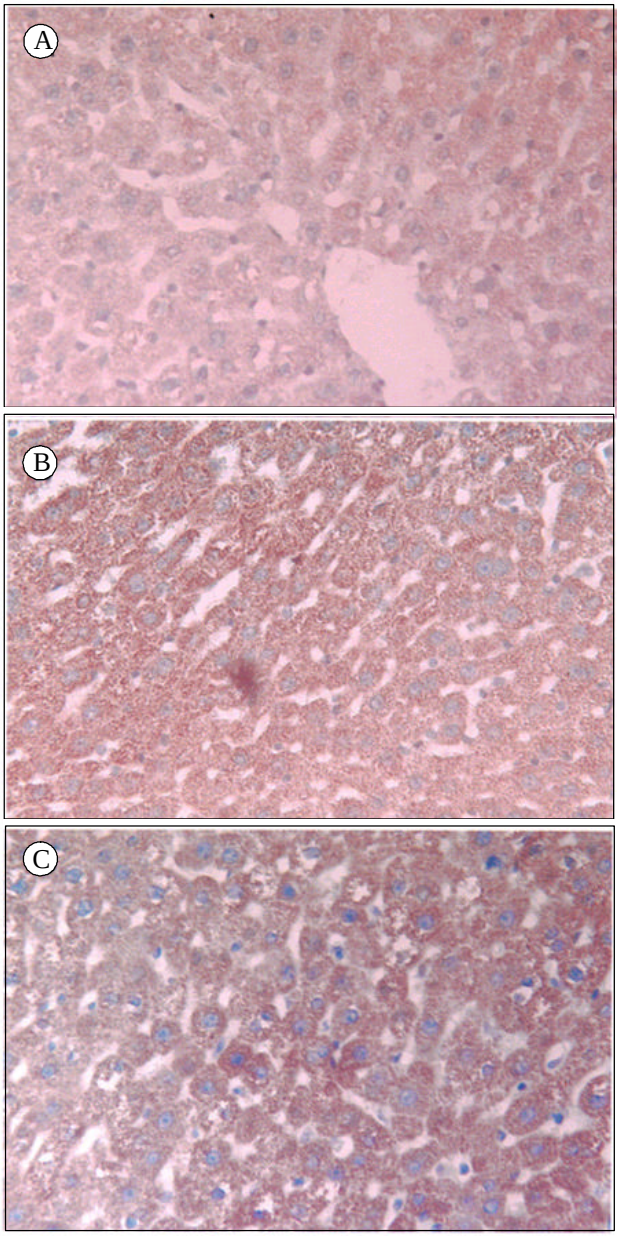

Fig. 10. Immunohistochemical reaction of caspase 8 by anti-caspase 8 antibody. Hepatocytes show faint cytoplasmic staining in PV reperfusion liver (B), and diffuse brownish, coarse granular cytoplasmic staining in HA reperfusion liver (C). A. Control liver B. PV reperfusion liver C. HA reperfusion liver ×200.

와 저혈당 조직 환경에서 산소의 공급이 갑자기 증가할 때, 각 세포의 mitochondria에서 발생하는 과산화물들(superoxides, reactive oxygen species, free radicals)로 생각되고 있다.(*27*) 간 조직의 모든 세포들(Kupper cells, endothelial cells, hepatocytes 등)의 mitochondria에서 일어나는 이 반응 물질들은 MPT (mitochondrial permeability transition) pore라는 비정적 Ca^{++} channel을 통하여 대량의 Ca^{++}과 cytochrome C 누출을 유발한다고 보고하고 있다.(*28*) 세포 내에 대량의 Ca^{++}가 출현하면 TNF-α/TNF・R, FAS/FAS L 등의 발현이 증가하고, 이러한 분자들이 주역이 되어 caspase 경로를 활성화시켜 apoptosis를 유도할 수 있다.(*23-27*) 특이한 것은 면역억제제인 cyclosporin A가 이 MPT pore의 specific blocking agent로서 알려져 있다.(*28-30*)

심근 경색 또는 뇌혈관 경색의 임상적 또는 실험적 연구

들에서는 미세혈관 혈전 형성에 따르는 저산소 상태와 재관류 손상의 결과로서 necrotic death와 apoptotic death가 모두 일어난다고 볼 수 있으나, haparin 처리가 된 이식 간에 있어서는 혈전 형성의 위험이 거의 없으며, necrotic cell death를 초래할 정도의 급격한 저산소 상태는 없다고 생각되므로, 저자는 이식 간 세포의 재관류 손상 결과로서 온 간세포 사멸은 주로 apoptosis 경로를 밟으리라고 가정하였다.

이 가정 아래 apoptosis pathway에서 발현되는 주요 분자들 가운데, FAS ligand, TNF-α receptor, caspase 8 등의 조사하여, 간세포 상해는 문맥 관류 간에서보다 간동맥 관류 간에서 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었다. 또한 hematoxylin-eosin 염색상(Fig. 3)으로는 문맥 관류 간과 간동맥 관류 간 사이에 아무런 차이를 발견할 수 없었으나, 세포사를 TUNEL법으로 검색하였을 때, 간동맥 관류 간에서 apoptotic body가 더 많이 나타났다(Fig. 4).

그러면 분자 지표 발현의 차이는 어디서 유래하는 것일까? 이에 대한 설명은 쉽지 않으나, 분자 기전으로는 두 기법 상 재관류 혈액의 성상의 차이, 특히 산소 함량, 환원성 물질들과 영양 물질들 농도의 차이 등에 의해 문맥 관류 간에서보다 간동맥 관류 간에 oxidative stress가 더 작용하여 간조직 상해의 분명한 차이를 보여 준 것으로 생각된다.

간은 high blood flow와 vascular resistance가 거의 없다는 해부학적 특성을 가지고 있으며, 인체를 예로 든다면 1,300 1,400 ml per min 정도로 대량의 혈액 관류를 받고 있다. 그 중 78%를 문맥에서 공급받고, 22%를 간동맥에서 공급받고 있으므로 재관류의 속도가 다를 것이고, 그 혈액의 내용도 산소농도, 환원성 물질농도 그리고 glucose를 비롯한 영양물질의 농도 상에서 크게 차이가 있다. 고산소 재관류는 아마 간세포 mitochondria에서 free radical, superoxide, ROS 축적과 나아가 oxidative stress 조성에 기여하게 되는 것으로 생각할 수 있다.

REFERENCES

1) Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, et al. Living related liver transplantation in adults. Ann Surg 1998;227:269-74.
2) Lee SG, Park KM, Lee YJ, Hwang S, Choi DR, Ahn CS et al. 157 Adult-to-adult living donor liver transplantation. Transplantation Proceedings 2001;33:1323-5.
3) Furukawa H, Shimamura T, Ishikawa H, Jin MB, Kamiyama T, Matsushita M, et al. What is the limit of graft size for successful living donor liver transplantation in adults? Transplantation Proceedings 2001;33:1322.
4) Emond JC, Renz JF, Ferrell LD, Rosenthal P, Lim RC, Roberts JP, et al. Functional analysis of grafts from living donors. Ann Surg 1996;224;544-54.
5) Pierre-Alain Clavien, P. Robert C. Harvey, Steven M. Strasberg preservation and reperfusion injuries in liver allografts. Transplantation 1992;53:957-78.
6) Cui D, Kiuchi T, Egawa H, Hayashi M, Sakamoto S, Ueda M, et al. Microcirculatory changes in right lobe grafts in living-donor liver transplantation: A near-infrared spectrometry study. Transplantation 2001;72:291-5.
7) Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, et al. Liver transplantaion in rats using small-for-size grafts. Archives of Surgery 2001;136:280-5.
8) Ku Y, Fukumoto T, Nishida T, Tominaga M, Maeda I, Kitagawa T, et al. Evidence that portal vein decompression improves survival of canine quarter orthotopic liver transplantation. Transplantation 1995;59:1388-92.
9) Margarit C, Lazaro JL, Hidalgo E, Mora A, Bilbao I, Murio E. Diminished portal and total hepatic blood flows after liver graft revascularization predicts severity ischemic lesion. Transplantation Proceedings 1999;31:444.
10) Ducerf C, Mechet I, Landry JL, DeLaRoche E, Berthoux N, Bourdeix O, Adham M, Bizollon T, Baulieux J. Hemodynamic profiles during Piggyback liver grafts using arterial or portal revascularization. J Am Coll Surg 2000; 190:89-93.
11) Van As AB, Lotz Z, Tyler M, Kahn D. Impact of early arterialization in the liver allograft. Transplantation Proceedings 1999;31:406-7.
12) Van As AB, Lotz Z, Tyler M, Kahn D. Effect of early arterialization of the porcine liver allograft on reperfusion injury, hepatocellular injury, and endothelial cell dysfuntion. Liver Transplantation 2001;7:32-7.
13) Roger Noun, Alain Sauvanet, Jacques Belghiti. Appraisal of the order of revascularization in human liver grafting: A controlled study. Journal of American College of Surgeons 1997;185:70-3.
14) Rosemary Hckman and Cath Rose Innes. The relevance of the order of revascularization in liver grafting. Hepatology 1990;11:471-6.
15) Nakajima Y, Matsumoto M, Fukuoka T, Kanehiro H, Wada T, Hisanaga M, et al. An experimental evaluation of the order of revascularization after interrupting hepatic afferent blood flow. Journal of Surgical Research 1990:48:111-5.
16) Ducerf C, Rode A, Adham M, De la Roche E, Bizollon T, Baulieux J, et al. Hepatic out-flow study after Piggyback liver transplantation. Surgery 1996;120:484-7.
17) Walsh TS, Hopton P, Garden OJ, Lee A. Effect of graft reperfusion on haemodynamics and gas exchange during liver transplantation. Br J Anesth 1998;81:311-6.
18) Massarollo PC, Mies S, Raia S, et al. Simultaneous arterial and portal revascularization in liver transplantation. Transplantation Proceedings 1998;30:2883-4.
19) Post S, Palma P, Gonzalez AP, Rentsch M, Menger MD. Timing of arterialization in liver transplantation. Ann Surg 1994;220:691-8.

20) Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-65.
21) Lee S, Edgington TS. Heterotopic liver transplantation utilizing inbred rat strains. Am J Pathol 1968;52:649-5.
22) Lee S, Charters III AC, Orloff MJ. Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. Am J Surg 1975;130:38-42.
23) Figueras J, Sabate A, Fabregat J, Torras J, Drudis R, Rafecas A, et al. Hemodynamics during the anhepatic phase in orthotopic liver transplantation with vena cava preservation: a comparative study. Transplantation Proceedings 1993;25:2588-9.
24) Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. Oncogene 1998;17:3261-70.
25) Stanger BZ. Looking beneath the surface: the cell death pathway of Fas/APO-1 (CD95). Mol Med 1996;2:7-20.
26) Budihardjo I. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 1999;15:269-90.
27) Lee H, Wei Y. Mitochondrial role in life and death of the cell. J Biomed Sci 2000;7:2-15.
28) Bernardi P, Petronilli V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. J Biengerg Biomembr 1996;28:129-36.
29) Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{++} dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem J 1988;255:357-60.
30) Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. Biochem Biophys Acta 1995;1242:139-76.