

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 1010240-2)

흰쥐에서 부분 간이식후 이식편 재생에 관한 연구
Graft regeneration in the rat partial liver transplantation

과제책임자 : 김 성훈

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1140 1123 1704" style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 20px auto; width: 80%;"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다. 2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다. <p style="text-align: center;">(14 pont, 고딕체)</p> </div>	<p>↑ 5cm ↓</p> <p>과 제 명</p> <p>국 립 암 센 터</p> <p>↑ 3cm ↓</p>
<p>↑ 6cm ↓</p>	

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “흰쥐의 부분 간이식에서 이식편 재생에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 11. 7

국립암센터

과제책임자 : 김성훈

연구원 : 박상재

” : 김영규, 이승덕

” : 김은성

제1세부과제명(과제책임자) :

제2세부과제명(과제책임자) :

-
-
-

참여기업명 :

편집순서 3 : 목차

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

- 1. 연구의 최종목표
- 2. 연구의 내용 및 결과
- 3. 연구결과 고찰 및 결론
- 4. 연구성과 및 목표달성도
- 5. 연구결과의 활용계획
- 6. 참고문헌
- 7. 첨부서류

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

연구분야(코드)			과제번호	1010240-3
과제명	흰쥐의 부분 간이식에서 이식편 재생에 관한 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년1월1일 ~ 2013년12월31일		190,000
	1차년도	2010년1월1일 ~ 2010년12월31일		80,000
	2차년도	2011년1월1일 ~ 2011년12월31일		60,000
	3차년도	2012년1월1일 ~ 2012년12월31일		50,000
과제책임자	성명	김성훈		
	소속	간담췌암 연구과		
색인단어	국문	간재생, 부분간이식		
	영문	liver regeneration, partial liver transplantation		

◆ 연구목표

<최종목표 2012-2013년>

- 소동물 수술기반 확립 및 생체공여자 간이식에 필요한 미세수술 기법의 습득
- 소용적이식편 이용 부분 간이식에서 적절한 문맥압을 유지하는 방법(수술적 방법이나 IL-6 gene delivery 등의 분자 생물학적인 방법)을 모색하여 소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발

<2010년도 목표>

- 동소성 쥐간이식 연구 기반확립 및 시행으로 미세분합 기술 습득 및 임상 적용

<2011년도 목표>

- 다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행

<당해년도 목표>

- 소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발

◆ 연구내용 및 방법

-소용적의 간이 재생되는데 필요한 적절한 문맥압을 유지하는 방법의 모색은 간절제 모델에서도 시행되고 있으나 문맥압 향진을 조절하여 낮추는 방법이나 문맥압과 간의 재생과의 연관성에 대해서는 아직 논의가 부족. 간이식 모델에서의 연구는 더욱 요원한 상태임. 따라서, 경쟁도 심하여 시급한 연구의 실행이 요구됨. 쥐간이식은 타동물이식에 비해 적은 비용과 다루기 용이함의 장점이 있어 사람에서의 간이식후 결과를 향상시키려는 노력의 일환으로 많이 연구에 이용되고 있음.

-동소성 쥐간이식 연구 기반확립 및 시행으로 미세분합 기술 습득 및 임상 적용

수술 전 24시간 물만 주고 금식을 시킨 뒤 절제. 기도삽관 또는 diethyl ether를 이용한 마취. 절개부위를 알코올로 소독하고 복부의 중앙 아래 부위에서부터 검상 연골 아래까지 절개. 공여 쥐의 간은 구득후 100-200ml 정도의 4℃ 식염수가 있는 유리 비이커에 보관. 수혜쥐의 전간을 적출한 후 공여쥐의 이식편을 간위대정맥, 간아래 대정맥, 간문맥, 담도 의 순으로 문합. 모든 조작이 끝나면 근육과 피부를 봉합하고 소독. 수술 직후 15 ml의 5% DW를 등에 피하주사. 이식시 문합시간, 무간기, 전체간이식 시간을 기록하고 이식 후 1개월간 생존율과 유병률 및 합병증을 관찰하며 1개월간 생존한 쥐에 대해서는 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 조직을 얻어 간기능 검사와 조직검사를 시행.

-다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행

- 미세문합 기술 습득 및 임상에 적용
- 쥐 간이식후 간기능 및 생존율을 분석

1-1. 연구 대상

실험 동물로는 동물 사육실에서 표준 사료와 물로 1주일 동안 기초 사육한 체중 250-300 gm 내외의 Sprague-Dowley 계통의 웅성 백서를 이용한다.

1-2. 연구 방법

제1기간에 습득한 쥐 간이식 기술과 경험을 바탕으로 70%, 50%, 30%, 20%, 10% 부분 간이식편을 이용 부분 간이식을 시행.

-소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발

이 목표는 아직 이루지 못하였고 추가적인 연구가 필요함. 문헌에서도 아직 새로운 방법이 보고되어있지 않음. 2012년도에는 간재생연구로 50% 부분 간이식 후 면역억제제인 FK506이 간 재생에 대조군에 비해 나쁜 영향을 미친다는 결과를 간재생지수, 간기능검사, PCNA 면역조직화학검사 및 western blot 실험을 통해 얻음.

향후 추가적인 연구를 위해 암컷의 부분간을 이식받은 5개월이상 생존한 수컷쥐 20마리를 희생시켜 간조직과 혈액을 채취해 보관중임.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

소동물 수술적 실험 기반 확립

생체공여자 간이식에 필요한 미세수술 기법의 습득

다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행

궁극적 목표인 소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법은 추가적 연구가 필요함

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

성 명

김성훈, 박상재, 김영규, 이승덕, 김은성

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

편집순서 5 : 요약문 (영문)

Project Summary

Title of Project	Graft regeneration in the rat partial liver transplantation
Key Words	graft regeneration, partial liver transplantation, portal pressure
Project Leader	Seoung Hoon Kim
Associated Company	none
<p>A segmental liver graft in living-donor liver transplantation or a remnant liver after extensive hepatic resection may undergo excessive portal hypertension and perfusion, leading to small-for-size syndrome. Little information has been provided on the impact of portal venous pressure on regeneration of small livers and the methods of control over portal hypertension. As of now, the reported methods to lower portal pressure include surgical and nonsurgical treatments. The former comprise splenic artery ligation, splenectomy, subcutaneous splenic transposition, portocaval side-to-side anastomosis, and portal-systemic shunt, and the latter has a drug therapy using Terlipressin. However, the established therapy still remains to be investigated.</p> <p>The ultimate aim of this project was to find out a new way to control portal pressure for optimal graft regeneration in rat liver transplantation using small-for-size graft. For this purpose, there were three detailed steps according to three periods.</p> <p>The aim of 2010 was to establish the infrastructure of rat liver transplantation, to succeed in the transplantation by acquiring the microsurgical technique, and to apply the microsurgical technique to vascular anastomosis of human liver transplantation. The rat liver transplantation was performed by Kamada's two-cuff technique.</p> <p>The aim of 2011 was to perform partial rat liver transplantation using various small-for-size graft (20%, 30%, 50%, 60% of whole liver).</p> <p>The aim of 2010 and 2011 was successfully achieved so that more than 70% rat operated on survived more than one month. The longest survivor lived up to 18 months.</p> <p>The above-mentioned final aim was to be achieved for two years(2012-2013). But, the final aim is still elusive to achieve, and up to now, there is no novel and proper method reported or suggested in literature. I think further study is needed.</p> <p>The study of final year 2012 showed that FK506 negatively affect graft regeneration after 50% partial rat liver transplantation in terms of liver regeneration index, liver function test(AST,ALT, total bilirubin), and PCNA (immunohistochemistry and western blot). Preserved are currently partial graft liver tissues and bloods of 20 male rats that underwent 50% partial liver transplantation using female rat liver and survived more than 5months for further study.</p>	

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

- 생체공여자 간이식에 필요한 미세수술 기법의 습득
- 부분간이식후 간이식편의 재생에 필요한 최적의 문맥압 조절 방법 확립

2. 연구의 내용 및 결과

다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행

제1기간에 습득한 쥐 간이식 기술과 경험을 바탕으로 70%, 50%, 30%, 20%, 10% 부분 간이식편을 이용 부분 간이식을 시행. 1차년도에 시행된 동소성 간이식 수술방법과 수술절차는 유사하며, 공여쥐 간적출 단계에서 부분간절제가 이루어짐.

Surgical procedure

실험 동물로는 동물 사육실에서 표준 사료와 물로 1주일 동안 기초 사육한 체중 250-300 gm 내외의 Sprague-Dowley 계통의 웅성 백서를 이용하였으며, Kamada의 two-cuff technique으로 동소성 간이식 수술을 시행.

1)공여쥐의 간 적출

공여 쥐의 장기 적출을 위해 약 230gm의 수컷 흰쥐를 isoflurane로 흡입마취하고 복부를 가로절단하여 개복. 먼저 복강 내 장기의 이상 유무를 육안으로 확인한 후 좌측 횡격막정맥(left phrenic vein)을 간 상부 하대정맥유입부에서 결찰하고 분리. 간장 주위의 얇은 인대들을 조심스럽게 분리하고 간 하부 하대정맥을 후복막 조직으로부터 분리하면서 우 부신정맥등을 결찰 분리하여 간 하부의 하대정맥(inferior vena cava)을 가능한 한 길게 얻도록 준비. 간동맥은 결찰하여 절단. 담도를 십이지장 유입부까지 길게 노출시킨 후 담도를 절개하고 24G 혈관침을 4mm의 1길이로 잘라서 담도에 삽입 고정하여 담도의 문합에 이용하도록 하고 절단. 간 문맥을 주위의 조직들과 분리하는데 위 유문정맥, 비장정맥, 그리고 하 장간막 정맥 등은 결찰 후 분리하여 문맥을 가능한 한 길게 만듦. 부분 간이식에 필요한 간엽을 제외한 나머지 엷은 수직으로 들어올려 혈관을 6-0 silk 실로 묶고 가능한 한 혈관에 가까운 곳을 절단하여 간을 제거.

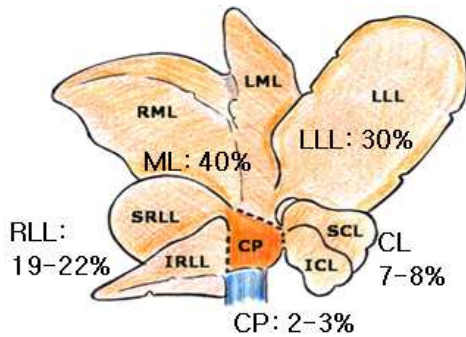


그림 4. 쥐 간의 각 엽마다의 비율

RLL:right lateral lobe(SRL: superior right lateral lobe; IRL: inferior right lateral lobe), ML: middle or medial lobe(RML: right medial lobe; LML: left medial lobe), LLL: left lateral lobe, CL: caudate lobe(SCL: superior caudate lobe; ICL: inferior caudate lobe), CP: caudate process.

- 70%, 50%, 30%, 20%, 10% 부분 간이식

70% 부분 간이식: CL, RLL 제거

50% 부분 간이식: LML, LLL, CL 제거

30% 부분 간이식: ML, LLL 제거

20% 부분 간이식: ML, LLL, CL 제거

이후 간문맥(portal vein)을 통해 200U의 헤파린이 포함되어있는 식염수 10ml의 관류액을 주입하면서 간 하부 하대정맥을 차단하고 횡격막절개를 통해 간 상부 하대정맥을 분리하여 관류액과 혈액을 배액하면서 간을 적출하고 즉시 얼음용기속의 관류액에 보존. 부분 간 이식의 경우, 6-0 black silk로 간을 절제한 다음 관류액을 주입.

2) 적출 장기의 준비

관류액에 보존된 간은 적출 후 바로 이식을 위한 준비를 하는데 먼저 간 하부 하대정맥을 다듬어 문합을 준비. 간 하부 하대정맥은 cutdown tube를 잘라서 cuff로 이용 삽입하고 5-0 black silk로 고정. 간 문맥은 면봉을 잘라서 cuff로 이용 삽입 고정. Cuff 삽입 후 간 문맥과 간 하부 하대정맥을 통해 10ml의 관류액으로 재차 관류. 간 상부 하대정맥은 불필요한 조직을 제거하고 간 상부 하대정맥을 다듬어 혈관문합을 준비.

3) 수여 쥐에서의 간 이식

수여 쥐는 공여 쥐보다 20-30gm정도 큰 것을 선택. 수여 쥐의 간장 적출은 공여 쥐의 간장 적출과 같은 방법으로 하였으며 간 하부 하대정맥과 간 문맥 그리고 담도는 문합을 위하여 가능한 한 길게 남겨 놓음. 공여 간장을 수여 쥐의 우 상복부에 동소성으로 위치시킨 후 간 상부 하대정맥을 7-0 prolene으로 10분 내외로 연속 문합하고 간 하부 하대정맥과 간 문맥은 cuff를 이용하여 문합한 후 간 문맥의 겹자를 풀고 이어서 간 상부 하대정맥의 겹자를 풀어 이식 간의 혈류를 개통시킴. 이후 간 문맥과 간 상부 하대정맥의 이상 유무를 확인하고 간 하부 하대정맥과 담도를 문합하고 복벽을 봉합하여 수술 종료.

현재 2010년 시행된 실험에서 4마리의 쥐가 생존해 있음.

실험날짜	OLT	Donor operation time	cuff preparation time	Recipient operation time	anhepatic phase	Donor sex	Recip. Sex	Donor BW	Recip. BW	perfusion	Liver weight	survival time (Month) ~2011.10.10
2010.04.05	100%				20	M	M					18
2010.05.18	90%	18	7	48	20	M	M					17
2010.12.02	60%	15	7	32	16	M	M					11
2010.12.28	50%	15	10	35	15	M	M					10

표 1. 2010년 생존 쥐 현황.

2011년 시행된 실험에서 총 420 마리의 쥐를 사용하였고, 210 case의 실험이 실행되어졌으며, 총 30마리의 쥐가 생존.

실험날짜	OLT	Donor operation time	cuff preparation time	Recipient operation time	anhepatic phase	Donor sex	Recip. Sex	Donor BW	Recip. BW	perfusion	Liver weight	survival time (Month) 2011.10.10 기준
2011.01.07	80%	15	10	34	19	M	M					9.1
2011.01.28	50%	19	10	39	20	M	M					8.4
2011.04.14	90%	17	9	32	14	M	M					5.9
2011.04.20	60%	18	10	32	15	M	M					5.7
2011.04.27	100%	13	10	31	18	M	M					5.4
2011.04.27	50%	16	12	28	15	M	M					5.4
2011.04.29	60%	17	11	36	17	M	M					5.4
2011.06.07	100%	20	10	31	10	M	M					4.1
2011.07.06	50%	30	8	30	16	M	M					3.1
2011.07.06	60%	12	9	28	13	M	M					3.1
2011.07.12	50%	12	8	30	15	F	M					2.9
2011.07.19	60%	10	8	32	16	F	M	220	230			2.7
2011.07.20	60%	12	6	30	15	F	M	215	230			2.6
2011.07.21	50%	15	8	32	18	F	M	230	260			2.6
2011.07.26	50%	14	10	30	16	F	M	240	240			2.5
2011.07.29	50%	17	10	30	16	F	M	240	250			2.4
2011.08.10	60%	13	6	26	13	F	M	230	250			2
2011.08.19	50%	15	8	22	11	F	M	215	230	上		1.7
2011.08.23	50%	15	7	27	12	F	M	220	270	上		1.6
2011.08.26	50%	21	12	26	12	F	M	180	290	中		1.5
2011.09.05	30%	15	11	28	11	F	M	250	200	上		1.2
2011.09.14	50%	14	7	31	18	F	M	220	230	上		0.9
2011.09.20	50%	20	12	40	18	F	M	240	270	上		0.7
2011.09.20	40%	13	7	24	12	F	M	235	280	上		0.7
2011.09.20	50%	13	7	24	12	F	M	210	210	中		0.7
2011.09.21	50%	15	10	29	15	F	M	230	220	上		0.7
2011.09.30	50%	12	6	26	12	F	M	222	241	中	4.62	0.3
2011.10.04	50%	17	9	29	14	F	M	217	210	中	4.53	0.2
2011.10.04	50%	12	8	25	12	F	M	230	215	上	5.75	0.2
2011.10.05	50%	15	10	26	12	F	M	228	240	中	5.07	0.2

표 2. 2011년 생존 쥐 현황.

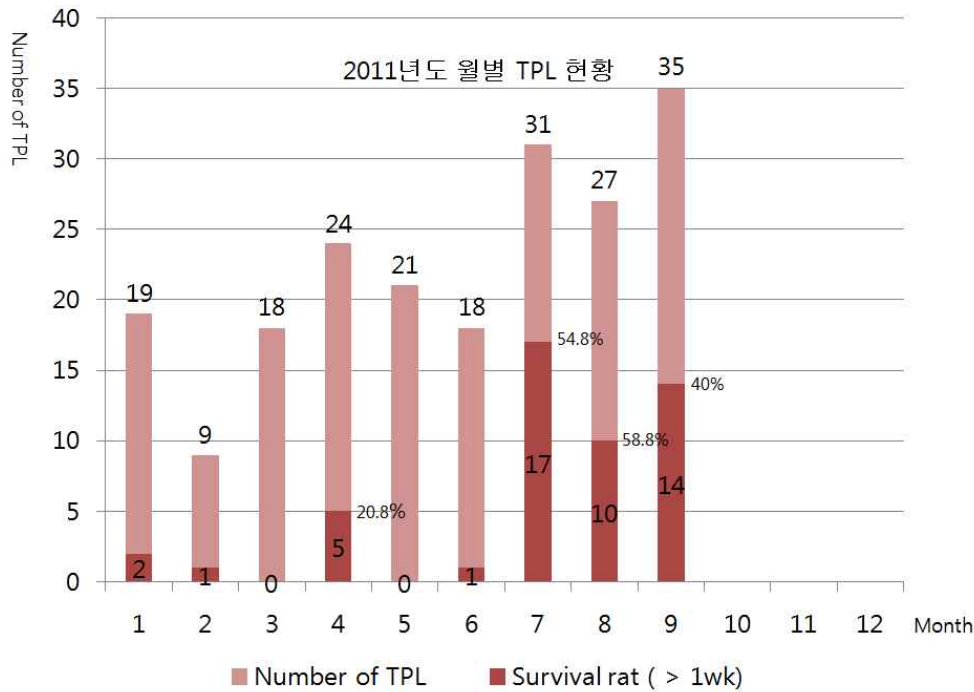


그림 1. 2011년도 월별 TPL(transplantation) 현황.

흰쥐에서의 부분간이식 후 FK506의 처리 유무에 따른 간재생의 효과

1. 실험재료

7주령, 200~250g의 Sprague-Dawley 계통의 웅성 흰쥐(rat)를 사용함. 일정하게 조정된 실내 환경에서 5일 간의 적응기간 후 그룹을 나누어 물과 고형사료를 정상적으로 공급함. 두 그룹으로 나누어 실험군은 1mg/kg/day의 FK506을 생리식염수에 용해시켜 회생하기 전까지 피하주사(subcutaneous injection)하고, 대조군은 동량의 생리식염수만 투여하여 각각 비교함. 대조군과 실험군의 간은 부분간이식 후 1일, 3일, 5일, 7일에 회생시켜 즉시 혈액을 채취하고 간을 적출하여 후속 실험의 재료로 사용.

2. 방법

2-1. 50% 부분간이식술

-공여쥐의 간 적출

공여 쥐의 장기 적출을 위해 약 230gm의 수컷 흰쥐를 isoflurane로 흡입마취하고 복부를 가로절단하여 개복. 먼저 복강 내 장기의 이상 유무를 육안으로 확인한 후 좌측 횡격막정맥(left phrenic vein)을 간 상부 하대정맥유입부에서 결찰하고 분리. 간장 주위의 얇은 인대들을 조심스럽게 분리하고 간 하부 하대정맥을 후복막 조직으로부터 분리하면서 우 부신정맥등을 결찰 분리하여 간 하

부의 하대정맥(inferior vena cava)을 가능한 한 길게 얻도록 준비. 간동맥은 결찰하여 절단. 담도를 십이지장 유입부까지 길게 노출시킨 후 담도를 절개하고 24G 혈관침을 4mm의 1길이로 잘라서 담도에 삽입 고정하여 담도의 문합에 이용하도록 하고 절단. 간 문맥을 주위의 조직들과 분리하는데 위 유문정맥 결찰 후 분리하여 문맥을 가능한 한 길게 만듦. 미상엽, 좌외측엽, 좌정중엽을 수직으로 들어올려 혈관을 6-0 silk 실로 묶고 가능한 한 혈관에 가까운 곳을 절단하여 간을 제거. 절제된 간엽의 무게를 기록함.

이후 간문맥(portal vein)을 통해 200U의 헤파린이 포함되어있는 식염수 10ml의 관류액을 주입하면서 간 하부 하대정맥을 차단하고 횡격막절개를 통해 간 상부 하대정맥을 분리하여 관류액과 혈액을 배액하면서 간을 적출하고 즉시 얼음용기속의 관류액에 보존. 부분 간 이식의 경우, 6-0 black silk로 간을 절제한 다음 관류액을 주입.

-적출 장기의 준비

관류액에 보존된 간은 적출 후 바로 이식을 위한 준비를 하는데 먼저 간 하부 하대정맥을 다듬어 문합을 준비. 간 하부 하대정맥은 cutdown tube를 잘라서 cuff로 이용 삽입하고 5-0 black silk로 고정. 간 문맥은 면봉을 잘라서 cuff로 이용 삽입 고정. Cuff 삽입 후 간 문맥과 간 하부 하대정맥을 통해 10ml의 관류액으로 재차 관류. 간 상부 하대정맥은 불필요한 조직을 제거하고 간 상부 하대정맥을 다듬어 혈관문합을 준비.

-수여 쥐에서의 간 이식

수여 쥐는 공여 쥐보다 20-30gm정도 큰 것을 선택. 수여 쥐의 간장 적출은 공여 쥐의 간장 적출과 같은 방법으로 하였으며 간 하부 하대정맥과 간 문맥 그리고 담도는 문합을 위하여 가능한 한 길게 남겨 놓음. 공여 간장을 수여 쥐의 우 상복부에 동소성으로 위치시킨 후 간 상부 하대정맥을 7-0 prolene으로 10분 내외로 연속 문합하고 간 하부 하대정맥과 간 문맥은 cuff를 이용하여 문합한 후 간 문맥의 겹차를 풀고 이어서 간 상부 하대정맥의 겹차를 풀어 이식 간의 혈류를 개통시킴. 이후 간 문맥과 간 상부 하대정맥의 이상 유무를 확인하고 간 하부 하대정맥과 담도를 문합하고 복벽을 봉합하여 수술 종료.

수술 직후에 20% 포도당 용액을 1ml 씩 복강주사(intraperitoneal injection) 하며, 10% 포도당 용액을 표준 사료와 자유 섭식하도록 함.

조직은 수술 후 1일, 3일, 5일, 7일에 적출하여 재생한 무게를 측정하고 단백질 추출을 위해 적당한 크기로 자르고 즉시 액체질소에서 동결한 후 deep freezer(-70℃)에 보관. 나머지 조직은 광학현미경과 면역조직화학염색을 위해 10% neutral buffered formalin(v/v)용액에 고정.

2-2. 간 기능 검사

이식 후 간 재생이 일어나는 동안의 간 기능의 수행여부를 확인하는 방법 중의 하나로서 효소활성도를 측정. 즉, 흰쥐를 희생시켜 복대정맥에서 혈액을 채취하고 4℃에서 혈액응고를 일으킨 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취함. Glutamate oxaloacetate transaminase(GOT),

glutamate pyruvate transaminase(GPT), total bilirubin(TBIL)의 활성도는 생화학 자동분석기를 이용하여 측정.

2-3. 단백질 발현 분석(Western blot)

시간 별로 적출한 간이식편 조직 내 PCNA 함량을 비교하기 위하여 western blot를 시행. 적출한 간 조직을 단백질 추출 시약인 Pro-prep과 함께 균질 분쇄하고 -20°C 에서 30분간 처리한 후, 4°C 에서 13,000rpm으로 5분간 원심분리하여 단백질을 추출. 추출한 단백질은 $30\mu\text{g}$ 씩 정량하여 변성시킨 후 10% acrylamide gel을 사용하여 100V에서 2시간 동안 전기영동 하고, hydrophobic polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane으로 2시간 동안 이동시킴. 이동이 완료된 membrane은 ponceau S solution으로 단백질 이동이 잘 되었는지 확인하고, TBS(Tris-buffered saline)로 세척. 비특이적 반응을 억제하기 위하여 blocking 용액(5% skim milk in tris-buffered saline with 0.05% tween 20(TBST))에서 1시간 동안 처리 후, blocking 용액으로 3,000배 희석시킨 1차 항체(monoclonal mouse anti-PCNA)에 overnight. 그 후 TBST로 10분씩 3회 세척하고 blocking 용액으로 500배 희석시킨 2차 항체(ZyMax Goat Anti-Mouse IgG(H+L) HRP Conjugate)를 상온에서 1시간 동안 처리하고 동일한 방식으로 세척. Signal 검출은 peroxidase의 기질인 luminol이 peroxidase에 의해 산화되며 빛을 내는 것을 x-ray 필름상에 감광시키는 enhanced chemiluminescence(ECL)법을 이용하여 검출 및 정량함.

2-4. 면역조직화학 표본제작(Immunohistochemistry)

증식 중인 세포에서 뚜렷하게 증가하는 것으로 알려져 있는 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)의 발현 양상을 조사하기 위해 조직을 제작하고 DAB chromogen kit와 anti-PCNA를 사용하여 면역조직화학(immunohistochemistry)적 방법으로 조사. 파라핀에 포매된 간 조직을 microtome을 이용하여 $5\mu\text{m}$ 의 두께로 자른 후 슬라이드에 올림. 조직은 말려서 자일렌에 각 10분씩 2회 처리하여 파라핀을 제거하고, 무수에탄올에서 부터 60% 에탄올까지 각 5분씩 흡수 처리. 흡수된 조직을 실온에서 3% H_2O_2 에 5분간 처리하고 Immunotech kit를 이용하여 blocking 용액 및 PCNA에 대한 300배 희석된 1차 항체(monoclonal mouse anti-PCNA)를 10분씩 처리. 습기 상자 안에서 2차 항체(biotinylated secondary antibody)와 streptavidin peroxidase를 10분씩 처리한 후, DAB로 발색시키고 광학현미경으로 관찰 및 촬영.

3. 결과

1) 50% 부분간이식후 재생된 간 무게 계산

시간에 따른 간 재생정도를 보면 간 이식후 24시간까지는 육안으로는 큰 변화가 나타나지 않음. 그 이후에 대조군과 실험군 모두에서 남아있는 간의 크기가 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 7일이 지나면서 간의 재생이 거의 완료되는 것으로 조사됨. 시간대 별로 재생된 간을 적출하고 기록

하여 대조군과 실험군의 간 재생 정도를 비교. 또한, 7일째에 대조군의 간은 거의 재생이 완료된 것으로 보였던 반면 실험군의 경우, 간 재생이 대조군에 비해 낮은 것으로 관찰.

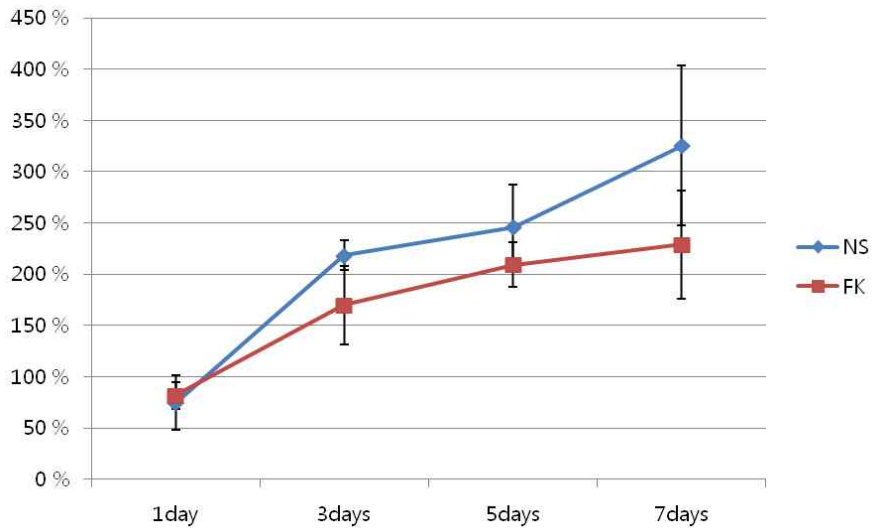


그림 2. Liver regeneration index. NS: normal saline(대조군), FK: FK506(실험군)

2) 간기능 검사

부분간이식 후 간 기능의 변화를 보기 위하여 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) 및 glutamate pyruvate transaminase(GPT)와 total bilirubin(TBIL)의 활성도를 측정. 두 그룹에서 간 절제 후 초기 GOT, GPT, TBIL의 높은 활성도를 보이다가 시간이 경과함에 따라 활성도가 떨어져 7일에는 정상수치로 되는 것을 확인 할 수 있음. GOT, GPT, TBIL 모두 간 절제 후 1일까지 GOT 및 GPT, TBIL의 활성도가 매우 높았고, 24시간 이후부터 활성도가 낮아져 3~5일이 지나면 대조군과 실험군이 정상수치로 돌아오는 것을 관찰. 부분간이식 후 1일째부터 대조군 혈청내 GOT, GPT, TBIL 활성도가 실험군에 비해 낮게 나타남.

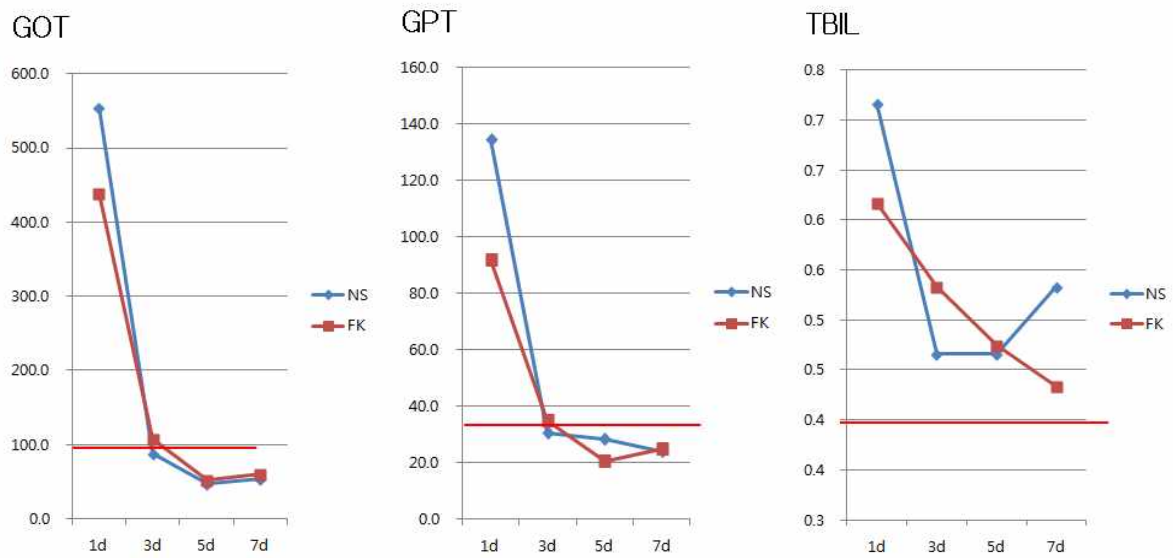
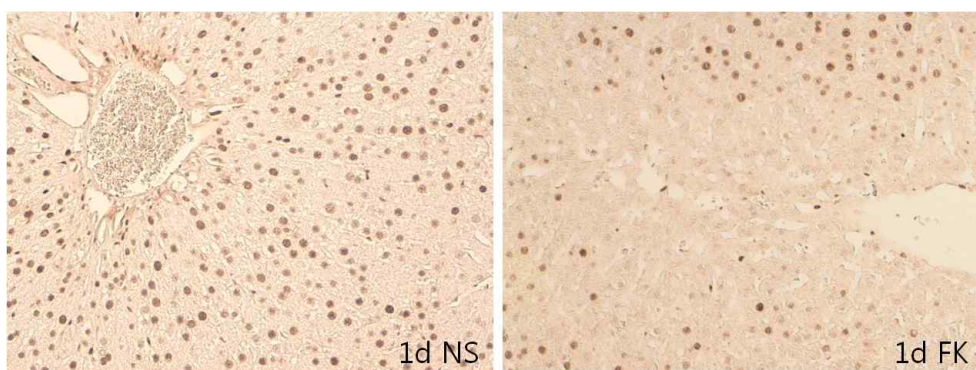


그림.3 대조군(NS)과 실험군(FK) 사이에서의 GOT(glutamate oxaloacetate transaminase), GPT(glutamate pyruvate transaminase), TBIL(total bilirubin) 수치

3) 면역조직화학적 분석

PCNA 단백질의 분포위치와 간 조직 내 발현양을 확인하기 위해 면역조직화학법을 사용. 일차 항체를 처리한 모든 그룹에서 PCNA의 존재를 나타내는 양성 반응이 나타남. 시간별 적출한 조직에서의 단백질 발현정도를 알아본 결과, 이러한 반응산물들은 부분간이식 후 1일부터 5일까지 조직에서 증식을 하는 세포들이 대조군에서 많이 보임.



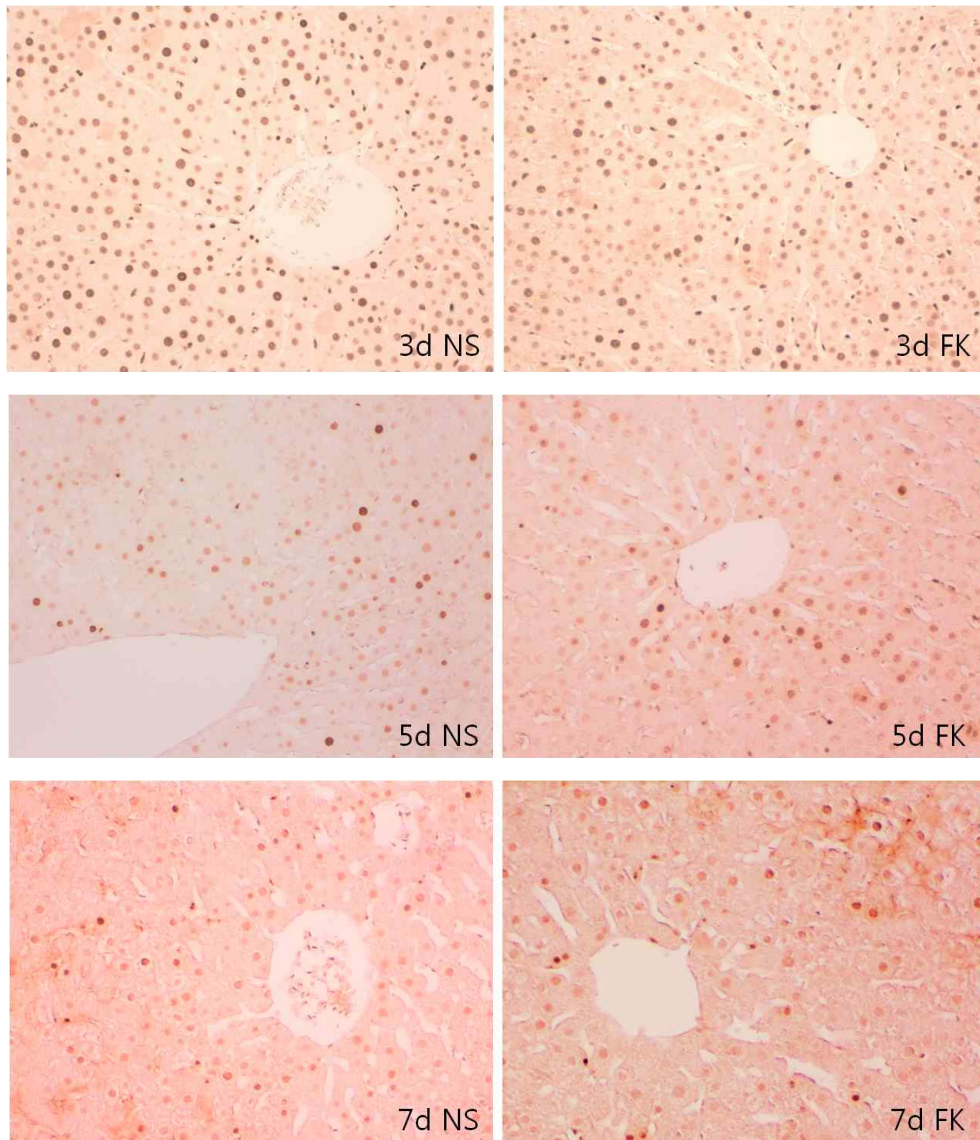


그림. 4 80%PHx 후, 1일 3일 5일 7일에서의 PCNA의 면역조직화학적 분석. 실험군과 비교하여 대조군에서 PCNA가 많이 발현.

4) 단백질 발현 분석

부분간이식 후 시간이 경과함에 따라 PCNA 단백질의 발현이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 간 절제 후 1일에서부터 PCNA 단백질 발현이 보이다가 3일째에서 최고치에 이르는 것을 관찰할 수 있었고, 그 후 감소. 간 절제 후 3일까지 대조군이 실험군보다 PCNA 단백질 발현양이 실험군에 비해 높은 것을 확인. 5일째에는 대조군과 실험군의 PCNA 단백질 발현양이 조금씩 줄었지만 여전히 대조군의 단백질 발현양이 실험군에 비해 많음.

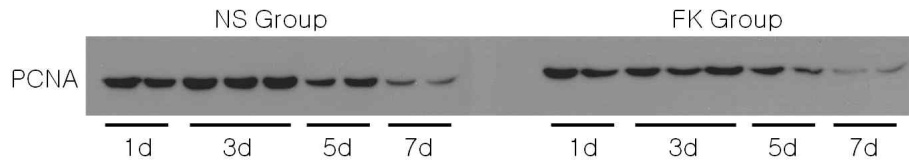


그림 5. 단백질 수준에서 대조군과 실험군의 시간별 PCNA 발현.

3. 연구결과 고찰 및 결론

간절제나 간이식은 간암의 일차적인 근치적 치료법으로 널리 시행되고 있다. 하지만 간절제후 최소 어느정도의 간이 남아야 하는지, 간이식후 수혜자의 대사적 요구를 충족시킬수 있기 위해 얼마의 간이 필요한지는 아직 명확한 답이 없는 실정이다. 현재까지 알려져 있는 바로는, 인간의 경우 최대 80%까지는 절제할 수 있다는 보고가 있고, 안전을 고려해 65-70%까지 절제를 하는 것이 대부분이다.

생체 간이식 초기에는 성인 수혜자에게 공여자의 좌간을 이식편으로 이용하였다. 그러나 소아 수혜자와는 달리 체격이 큰 수혜자에서 이식편의 용적이 부족하여 대사 요구량을 충족시키지 못하는 경우가 있어, 최근에는 충분한 용적의 이식편을 얻기 위해서 공여자의 우간을 이용하는 경우가 늘고 있다. 그러나 이식편을 많이 절제할수록 공여자의 안전성은 침해된다. 따라서 공여자에게 부담이 적은 좌간이나 그 보다 적은 용적의 간을 이용하고, 동시에 수혜자에서는 이식편의 용적이 적더라도 가능한 적은 손상을 받고 재생이 충분히 빨리 일어나 이식 초기의 대사 요구량을 만족시킬 수 있다면, 수술 후 환자와 이식편의 생존율은 향상될 것이다.

간 이식편의 재생은, 허혈 및 재관류에 의한 손상, 보존액에 의한 손상, 면역학적인 인자 등이 복합적으로 작용하여 원활하지 못하다. 특히 적은 용적의 이식편에서는 문맥압 항진에 의한 손상이 부가된다. 즉, 적은 용적의 이식편에 대하여 단위 조직당 혈류량이 증가하게 되므로, 정상적인 문맥 혈류에서도 문맥압이 항진된다. 이러한 문맥압 항진은 간 울혈을 일으키고, 간세포를 괴사시키며, 간 재생에 방해 요인으로 작용하여 간이식의 성적에 좋지 않은 영향을 미친다. 성인 생체 공여자 간이식 후 초기 문맥압이 20mmHg 이하일 때 수혜자 및 이식편의 생존율이 향상된다는 보고도 있다. 따라서 적은 용적의 이식편이 재생이 활발한 이식 초기에 적절한 문맥압을 유지하는 것이 중요하다. 그러나 높은 문맥압을 낮추는 방법이나 문맥압과 간의 재생과의 연관성에 대해서는 아직 논의가 부족하다.

문맥 혈류량을 조절하여 문맥압을 줄이는 방법으로는 약물에 의한 비수술적 요법과 비장 동맥의 결찰, 비장의 피하 전이, 문맥 대정맥 측측 문합, 전신-문맥 단락술등의 수술적 요법이 있다. 약물요법의 경우 그 효과가 일시적이고 부작용이 있을 수 있으며 적절한 용량을 정하는데 통일된 지침이 없다. 수술요법의 경우 문맥혈류를 우회시키거나 감소시켜야 한다. 문맥 대정맥 측측 문합, 전신-문맥 단락술 등의 혈류우회를 위한 혈관문합은 혈류우회에 따른 합병증이 동반될 수 있다.

다시 말해, 대량간절제나 적은용적을 이용한 부분간이식은 현재 간암의 근수술적 치료로 널리 간부전을 비롯한 작은간 증후군(small-for-size syndrome)의 합병증을 동반할 수 있는데, 이를 극복할 수 있는 방법을 찾는 것이 이 기관고유사업의 궁극적인 목표였다.

2010년도에 소동물 수술기반 확립을 하였고 미세수술 기법을 습득하여 쥐 전간이식을 성공적으로 수행하였다. 2011년도에는 다양한 소용적이식편 이용 부분 간이식을 시행하였고 30% 부분간이식을 하여 일주일을 생존시켰다. 이 과정에서 습득된 미세수술기법은 실지 임상에 적용되어 생체공여자 간이식의 간동맥 문합불량으로 인한 합병증이 없게 되었다.

2012년부터 2013년까지의 최종목표는 ‘수술적 방법이나 IL-6 gene delivery 등의 분자 생물학적인 방법을 모색하여 소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발’이었다. 이 목표는 아직 이루지 못하였고 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 문헌에서도 아직 새로운 방법이 보고되어 있지 않다. 2012년도에는 간재생연구로 50% 부분 간이식 후 면역억제제인 FK506이 간재생에 대조군에 비해 나쁜 영향을 미친다는 결과를 간재생지수, 간기능검사, PCNA 면역조직화학검사 및 western blot 실험을 통해 얻었다.

향후 추가적인 연구를 위해 암컷의 부분간을 이식받은 5개월이상 생존한 수컷쥐 20마리를 희생시켜 간조직과 혈액을 채취해 보관중이다..

계속해서 쥐를 이용한 소동물 실험을 하고싶다.

4. 연구성과 및 목표달성도

소동물 수술적 실험 기반 확립

생체공여자 간이식에 필요한 미세수술 기법의 습득

다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행

논문은 없음

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
생체공여자 간이식에 필요한 미세수술 기법의 습득	1차년도	동소성 쥐간이식 연구 기반확립 및 시행으로 미세분합 기술 습득 및 임상 적용		100	
소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발	2차년도	다양한 소용적 이식편 이용한 부분간이식 시행		95	
	3차년도	소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발		5	

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
동소성 쥐간이식 연구 기반확립 및 시행으로 미세분합 기술 습득 및 임상 적용	성공적
소용적 이식편을 안전하게 이용할 수 있는 방법을 개발	추가적 연구가 필요(1년은 너무 짧음)

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

국립암센터 소동물 수술이용연구 기반확립 및 시행으로 미세분합 기술 습득 및 임상 적용.
간이식 결과의 향상으로 이어질 것임

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

추가적 연구가 필요(1년은 너무 짧음)

6. 참고문헌

- Boillot O, Delafosse B, Mechet I, Boucaud C, Pouyt M. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient; a new transplant technique. *Lancet* 2002;359:406-7
- Brown IPI, Lam R, Lakshmanan J, Fisher A. Transforming growth factor alpha in developing rats. *Am J Physiol* 1990; 259: E256-E260.
- Cai SR, Motoyama K, Shen KJ, Kennedy SC, Flye MW, Ponder KP. Lovastatin decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2000;32:67-77
- Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, Rozga J. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996; 24: 1452-1459.
- Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A, Hirata K, Ohta Y, Mochida S, Tomiya T, Higashio K, Kurokawa K. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1993; 18: 1443-1449.
- Fukuchi T, Hirose H, Onitsuka A, Hayashi M, Senga S, Imai N, Shibata M, Yamauchi K, Futamura N, Sumi Y. Effects of portal-systemic shunt following 90% partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2000;89(2):126-31
- Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984;4:902-4
- Grasl-Kraupp B, Schausberger E, Hufnagl K, Gerner C, Low-Baselli A, Rossmannith W, Parzefall W, Schulte-Hermann R. A novel mechanism for mitogenic signaling via pro-transforming growth factor α within hepatocyte nuclei. *Hepatology* 2002;35:1372-1380
- Inoue Y, Tomiya T, Yanase M, Arai M, Ikeda H, Tejima K, Ogata I, Kimura S, Omata M, Fujiwara K. p53 may positively regulate hepatocyte proliferation in rats. *Hepatology* 2002;36:336-344.

- Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Hirohashi K, Tanaka AK. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation* 2003;75(8):1313-7
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*. 1979;28:47.
- Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Noguchi H, Tanaka N, Namba M. Intrasplenic transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prolongs the survival of 90% hepatectomized rats. *Transplant Proc* 2000;32:2365-7
- Kurumiya Y, Nozawa K, Sakaguchi K, Nagino M, Nimura Y, Yoshida S. Differential suppression of liver-specific genes in regenerating rat liver induced by extended hepatectomy. *J Hepatol* 2000;32:636-44
- Lee S, Broelsch CE, Flamant YM, Chandler JG, Charters AC 3rd, Orloff MJ. Liver regeneration after portacaval transportation in rats. *Surgery* 1975;77(1):144-9
- Man K, Lo CM, Oi-Lin I. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts. *Arch Surg* 2001;136:280-5
- Moser MJ, Gong Y, Zhang MN, Johnston J, Lipschitz J, Minuk GY. Immediate-early protooncogene expression and liver function following various extents of partial hepatectomy in the rat. *Dig Dis Sci* 2001; 46(4): 907-914
- Oberti F, Veal N, Kaassis M, Pilette C, Rifflet H, Trouve R, Cales P. Hemodynamic effects of terlipressin and octreotide administration alone or in combination in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1998;29(1):103-11
- Okada M, Sakairi T, Kusakabe M, Goto K, Tsuchiya T, Sugimoto J, Sano F, Mutai M, Morohashi T, Kobayashi K. Immunohistochemical localization of transforming growth factor alpha in regenerating rat liver. *J Vet Med Sec* 2002; 64(11): 1045-1048
- Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:S35-41.
- Ortega R, Gines P, Uriz J, Cardenas A, Calahorra B, De Las Heras D, Guevara M, Bataller R, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: results of a prospective, nonrandomized study. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):941-8
- Panis Y, McMullan PD, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997;121:142-9
- Renz JF, Busuttil RW. Adult-to-adult living-donor liver transplantation: a critical analysis. *Semin Liver Dis* 2000;20(4):411-24
- Sarac TP, Sax HC, Doerr R, Yuksel U, Pulli R, Caruana J. Preoperative fasting improves survival after 90% hepatectomy. *Arch Surg* 1994;129:729-33
- Shimamura T, Taniguchi M, Jin MB, Suzuki T, Matsushita M, Furukawa H, Todo S.

- Excessive portal venous inflow as a cause of allograft dysfunction in small-for-size living donor liver transplantation. *Transpl Proc* 2001;33(1-2):1331
- Tanaka K, Kiuchi T. Living-donor liver transplantation in the new decade: perspective from the twentieth to the twenty-first century. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9(2):218-22
- Tomiya T, Ogata I, Fujiwara K. Transforming growth factor α levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Am J Pathol* 1998; 153(3):955-961
- Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* 2002 Apr 4;346(14):1074-82
- Wang XD, Soltesz V, Andersson R, Bengmark S. Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 per cent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 1993;80:66-71
- Yanaga K, Kishikawa K, Suehiro. Partial hepatic grafting: porcine study on critical volume reduction. *Surgery* 1995;118:486-92

7. 첨부서류

없음