

Experiment of Ischemia/Reperfusion Injury of the Cirrhotic Liver in the Murine Mouse Model

Koo Jeong Kang

Division of Hepatobiliary & Pancreatic Surgery, Department of Surgery, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

As a medical doctor, the final goal of any type of research is focused on better treatment or contemporary care of the patient. As a surgeon, the research is focused on improving results in surgical procedure and improving the immediate to long term outcomes. In human beings, hepatobiliary tract and pancreas (HBP) play a major role in digestion, body metabolism and endocrine function. These organs are sophisticated in pathology as well as anatomy and physiology. The surgery of the hepatobiliary and pancreatic organ is very difficult. Therefore, the hepatobiliary surgeon's endeavor to treat patients who have hepatobiliary and pancreatic diseases should be scientific and based on evidence in order to get the best result.

Here I describe the topic of ischemia/reperfusion injury of the liver from my experience to establish safe surgical resection of the liver with limited bleeding and ischemia/reperfusion injury. Furthermore, I have added ischemia/reperfusion injury in the cirrhotic mouse model, methodology and brief result that I have achieved.

Key Words: Liver; Reperfusion Injury; Animal Experimentation; Liver Cirrhosis; Apoptosis

Correspondence to: Koo Jeong Kang
우700-712, 대구광역시 중구 달성로 56,
계명대학교 의과대학 외과학교실
Department of Surgery, Keimyung University School of Medicine, 56 Dalsung-ro, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea
Tel: +82-53-250-7655
Fax: +82-53-250-7322
E-mail: kjkang@dsmc.or.kr

Received 4 June 2013
Revised 26 July 2013
Accepted 4 August 2013

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

의사로서 실험연구나 임상연구의 궁극적인 목표는 환자에게 더 좋은 치료를 제공하기 위함이다. 외과의사는 일반의사와는 달리 환자의 육체에 어떤 형태로든 더 침습적인 시술로 근본적인 치료를 하는 경우가 많다. 처음 개발한 약물을 사람에게 투여할 때도 마찬가지로 시술이 환자에게 안기는 긍정적인 효과나 그 부작용에 대하여 충분히 이해하고 있어야 한다. 하지만 약물을 사람에게 투여하거나 시술이 임상적으로 시도되기 전에 충분히 검증되지 않은 경우, 먼저 실험실에서 혹은 동물실험으로 그 효과와 부작용을 증명한 후 사람에게 적용하여 효능과 안전성을 확보하여야 한다.

외과의사에게 실험연구는 어떤 의미를 가지며 어떻게 시도할 것인가? 외과의사는 환자를 진료하거나 수술실에서 대다수의 시간

을 보내기에 따로 시간을 내어 실험을 하기는 여간 어려운 일이 아니다. 처음에는 직접 동물을 다루면서 실험모델을 이용하여 자신의 가설이나 아이디어를 적용하여 샘플을 취하고 파이펫을 잡고 직접 분석을 하여 가설의 결과를 직접 들여다보고 문제점이 무엇인지 파악하는데 초점이 맞추어질 것이다. 실험모델이 확립되고 나면 그 다음 반복실험이나 다른 아이디어를 추가하여 진행하는 응용실험에 있어서는 실험연구원을 활용하여야 지속적으로 시행할 수 있다. 그렇지 않다면 초기의 소모적인 노력이 일회적 혹은 결과를 얻지 못하고 단순히 실험을 시도해본 것으로 만족해야 할지 모른다.

여기서는 본인의 실험연구에서 얻은 성취나 실패를 바탕으로 외과의사로서 어떻게 효율적으로 실험연구를 진행하며 좋은 결과를 얻을 수 있고 어떻게 응용할 것인가에 관하여 일반적인 의견과 더

불어 본인이 직접 시행한 간의 허혈/재관류 손상 모델을 예로서 설명하였으며 고찰에서 외과의사로서 실험연구의 의미를 기술하고자 하였다.

본 론

1. 가설 설정

실험 주제의 선정은 임상분야에서 진료나 수술 중 가진 의문을 중심으로 문제 제기하기 쉽다. 외과 전공의 시절 선배 교수들이 간 절제 수술할 때마다 출혈이 많이 되었으며, 이러한 경우 수술자는 간으로 흘러 들어가는 혈액, 즉 간동맥과 간문맥 혈류공급을 줄이기 위하여 문맥과 동맥혈을 일시적으로 차단하는 간문맥 차단기법을 시행하여 출혈을 줄였다. 수술 중이나 수술 후 간혈류를 얼마 동안 차단해도 안전한지에 관하여 수술하신 교수님께 질문을 하면 대략 30분까지는 괜찮지 않겠느냐며 명확한 답을 주지 않으면서 좀 얼버무리는 것을 보았다. 이후에 알게 된 바로는 1980년대에는 이러한 의문이 제기되었으나 증명되지 않았으며, 이 무렵부터 간혈류 차단시간과 안전성에 대한 실험연구가 시작되었다.

대학병원에 근무하면서 해외연수 기회에 듀크대학병원 간담체 외과 및 간이식외과 임상 및 실험연구를 주로 하는 연구소에 가서 실험연구에 처음 참여하여 간의 허혈/재관류 손상 연구 경험을 갖게 되었다. 그때까지 미국 대부분의 실험연구실에서는 해외에서 연구원을 모집하여 실험연구를 해왔다. 책임연구자(primary investigator, PI)는 우리나라의 외과의사와 마찬가지로 바쁜 일상을 보내면서 일주일에 한번 실험실의 연구원들의 한 주간 동안 실험결과를 발표하게 하여 진행상황을 점검하고 다음 실험계획을 논의하고 제시하는 실험연구 세미나를 개최한다.

한국인들의 미국연수는 1년인 경우가 많은데 1년간 실험실에 머문다면 선뜻 실험연구를 맡기지 않는 경우가 보통이다. 그 이유는 실험모델을 익히는데 수개월을 보내야 하고 실험동물 상당수를 희생시키고 시약을 소모하면서 연습하고 나서 일정한 결과를 얻지 못하면 실험실 책임자로서 예산만 낭비하기 때문이다. 실험을 처음 시작하고 1년 내에 결과를 내기란 여간 어려운 일이 아니다. 나의 경우도 마찬가지로 연수기간 초기에 실험에 참여해 볼 것을 제안했지만 거절당했다. 그러나 일주일에 한번 그것도 토요일에 가지는 연구원 세미나에 지속적으로 참여하면서 3개월을 보낸 후 다시 실험제안을 했다.

간의 허혈/재관류 손상을 줄이는 간문맥 차단기법에 관한 것이다. 서양에서는 간혈류에 있어서 30분간 지속차단을 선호하지만 일본과 한국에서는 15분 차단 5분 재관류하는 간헐적 차단법을 선호한다. 서양에서는 간기능이 정상을 유지하면서 대장암 잔잔이에 대한 간절제 수술 빈도가 높지만 일본과 한국에서는 오랜 바이러스 성 간염을 앓아 간경변증이 발생한 환자에서 후속으로 일어난 간

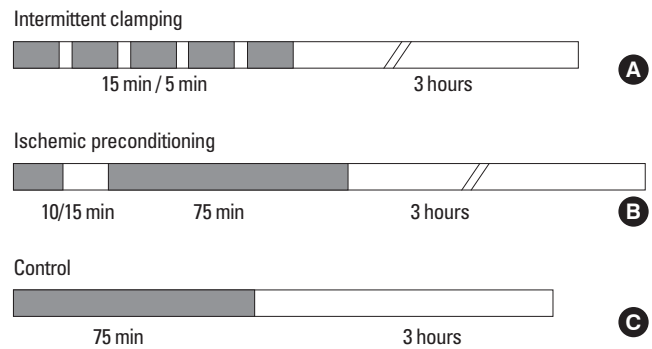


Fig. 1. Protocol of hepatic ischemia/reperfusion of the experimental mouse. (A) Intermittent clamping, five cycles of repeated ischemia for 15 minutes and reperfusion for 5 minutes. (B) Ischemic preconditioning, ischemia for 10 minutes and reperfusion for 15 minutes, then prolonged ischemia for 75 minutes. (C) Control, continuous 75 minutes ischemia.

세포암에 대한 간절제 수술 빈도가 절대적으로 높다. 따라서 간경변증환자에서 간 재관류 손상을 줄이기 위한 방법을 우선 고려하다 보니 간헐적 차단법을 주로 선택한다. 이 연구실에서는 심장을 이용한 연구에서 허혈 전처치(ischemic preconditioning, IPC)가 손상을 줄인다는 사실이[1] 알려진 지 얼마되지 않은 시점이어서 간손상 모델을 이용하여 간에서 허혈 전처치가 간손상 방지하는 것과 그 작용기전에 관한 연구를 하고 있었다. 이런 연구를 하고 있었기에 그전까지 궁금했던 간혈류 차단시간에 따른 손상 정도와 허혈 전처치의 손상방지 효과에 관해서 실험해 보고 싶었다. 간혈류의 75분간 지속차단, 15분간 혹은 30분간 간헐적 차단 및 15분간 허혈 전처치 후 다시 지속적으로 75분까지 지속 차단하는 방법의 손상 정도를 비교하고 싶다는 제안을 하여 책임연구자로부터 실험 참여 허락을 받았다. 즉, 가설은 15분 간헐차단 5분간 재관류를 5회 반복하여 총 75분 차단(1군), 15분 허혈 전처치 후 75분 지속차단(2군), 75분 연속 차단(3군) 등 세 군의 간손상 정도를 비교하는 실험연구를 계획하였다(Fig. 1).

이 실험을 성공적으로 마친 후에 실험동물에 간경변을 유발시켜 다시 위의 프로토콜을 적용하여 간허혈/재관류 손상 실험을 시행했다. 즉, 3단계의 실험이 이루어진 것이다.

순차적 실험 계획: 1차-정상간에서 허혈/재관류 손상; 2차-실험 쥐에서 간경변 유도; 3차-간경변 실험 쥐에서 허혈/재관류 손상

2. 실험모델 및 실험설계

1) 실험동물은 어떤 것을 선택할 것인가?

문헌상 가장 많이 이용한 동물을 선택하는 것이 가장 바람직하다. 지금까지 지상 발표된 논문검색에서도 간손상 연구를 계속해 온 본 실험실에서도 C57BL6 마우스(mouse)를 가장 많이 사용해 왔다. 20-30 g에 불과한 마우스보다는 200-250 g 되는 랫(rat)은 몸

집이 더 크기에 다루기 쉽지만 동물가격이 더 비쌀 뿐만 아니라 마취 안정성이 떨어져 실험도중 동물이 잘 죽는 경향이 있다.

2) 마취방법 선택

무게가 수십 kg 되는 개나 돼지는 기관 삽관 후 흡입 마취하는 것이 보통이지만 작은 동물의 마취는 복강 내 마취약제를 주입하여 서서히 흡수되도록 하는 것이 쉽다. 그러나 간손상 실험에서 복강 내 마취는 약물로 인한 간손상을 일으킬 수 있다. 이것은 실험결과에 중대한 영향을 미치는 편향(bias)으로 작용할 수 있기 때문에 곤란하다. 마우스와 같이 작은 동물 마취도 흡입 마취로 시간제한 없이 마취를 지속할 수 있다. 우선 각성상태의 마우스를 흡입 마취제를 약간 넣어둔 밀폐된 용기에 잠깐 집어 넣으면 마우스는 금방 활동을 멈추게 된다. 잠든 마우스를 꺼내어 실험용 유리관에 한 장의 거즈를 넣고 그 안에 흡입마취약제 액을 약간 떨어뜨린 튜브입구에 마우스 입을 약간 밀어 넣으면 마우스는 쉽게 마취된다. 호흡이 느려지면 대개 마취가 깊기 때문이고 마취가 얕으면 약간씩 움직인다. 마취가 얕으면 안쪽으로 집어 넣고 깊으면 죽을 염려가 있기에 마우스의 입을 튜브에서 약간 빼다. 본격적인 실험을 하기 위한 시술에 집중하다 보면 마취가 너무 깊어 실험 쥐가 죽을 염려가 있기에 호흡을 감시하는 것을 한시라도 놓쳐서는 안 된다.

3) 실험 마우스 수술

우선 복부 절개할 부위의 털을 면도날로 면도한 후 종절개로 복강 내 장기를 노출시키고 간을 싸고 있는 간상인대를 박리하여 간엽을 자유롭게 움직일 수 있도록 한다. 20-30 g인 마우스의 배를 갈라 간에 혈류를 차단하는 조작은 5-10배 배율의 현미경을 이용하는 것이 좋다. 간문맥과 동맥 및 담관이 한 다발로 되어 있는 간십이지장 인대를 분리하여 마이크로 동맥집자를 물려 간으로 가는 혈류를 완전 차단할 준비를 한다. 마우스의 경우 우엽, 중간엽, 좌엽 및 미상엽이 엽상으로 잘 구획되어 있으며 문맥혈을 차단하면 간 전체에 혈류가 공급되지 않는다. 자명종 시계를 옆에 두고 미리 계획한 프로토콜에 따라 허혈 시간과 재관류 시간대로 정확히 혈관집자를 물려 허혈과 재관류를 반복한다(Fig. 2). 30분 이상 혈류 차단을 지속할 경우 기다리는 동안 복강 안 장기나 복막에서 수분이 증발하기에 복부를 꿰매어 놓고 기다리는 것이 좋다. 허혈/재관류 손상을 관찰하기 위해선 재관류 시간이 6시간 이상 24시간까지 지날 때 손상이 극대화되지만 실험시간 배정이나 여러 가지 다른 상황을 고려하면 3시간 정도 지난 후 혈액이나 조직을 취해도 좋다.

3. 시료분석 및 데이터 취합

실험동물에 허혈/재관류 손상을 보기 위한 프로토콜을 설정한 시간대로 간혈류를 차단하고 손상 입을 만큼 시간이 경과한 다음 마우스 간손상 정도를 측정하기 위한 재료를 획득한다. 간손상 정

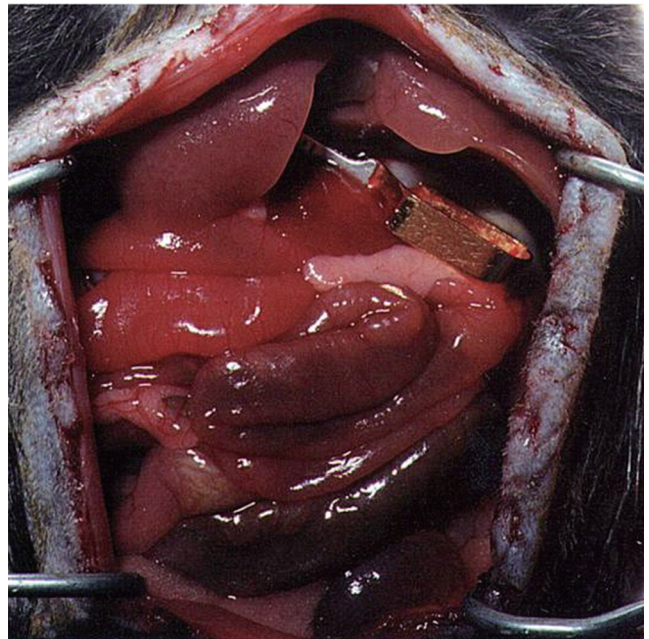


Fig. 2. Clamping of the portal triad of the mouse liver.

도를 판단하기 위한 재료는 혈액과 간조직 두 가지다. 간세포에서 혈액으로 흘러나온 아스파라긴산 아미노전이효소(AST)나 알라닌 아미노전달효소(ALT)를 측정하기 위하여 혈액을 채취하고 동시에 간조직을 채취한다. 혈액과 간조직을 취하면 실험동물은 사망하게 된다. 혈액은 25 gauge 주사바늘을 장착한 1 cc 주사기를 이용하여 대정맥 안으로 주사바늘을 찔러 넣어 혈액을 취할 수 있는 거의 전부를 흡입한다. 혈액을 모두 취해도 1 cc를 초과하지 않는다. 1 cc면 AST나 ALT 측정에는 충분하다.

그 다음은 간조직을 취하는 것이다. 혈액을 채취하고 나면 마우스가 거의 사망하기에 손상 입을 간조직을 떼어 내어 에펜도르프 튜브에 넣고 미리 준비해둔 파쇄용 용기에 꽂아 두었다가 모든 시술이 끝난 후 액체질소탱크나 섭씨 영하 83도 이하의 실험용 초저온 냉장고에 조직을 보관해두었다가 조직이 충분히 모이면 한꺼번에 분석작업에 들어간다.

4. 시료분석 및 결과판정

간손상 정도에 따라 그 손상 정도를 측정하는 방법이 다르다. 세포괴사에 이르는 비가역적(lethal or irreversible) 손상에 이르면 현미경으로 괴사된 세포를 직접 관찰할 수 있지만 손상 정도가 심하지 않은(sublethal) 가역적 손상인 경우에는 세포자멸사(apoptosis) 관련 인자들을 측정하여 그 손상 정도를 가늠하게 된다. 가역적이든 비가역적이든 간손상 정도를 측정하는 간단한 방법은 손상된 간세포에서 혈청으로 흘러나온 간효소치(AST, ALT) 측정이다. 간효소치는 간손상 정도를 비교적 잘 반영해준다.

간손상 정도가 심하지 않은 세포자멸사의 경우 자멸경로에서

(Fig. 3) 보여주듯이 관련 시토카인(TNF- α)과 관련 물질들(caspase 3 & 9, cytochrome c, Bcl-2, Bcl-x etc.)을 측정하는 방법[2]과 궁극적 손상결과 DNA가 파괴된 조각(fragmentation)을 관찰하는 방법으로 대표적인 것이 terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) 염색이다 (Fig. 4). TUNEL 염색은 terminal deoxynucleotidyl transferase를 포함하는 효소반응에서 free 3'-OH terminal에 형광물질을 부착하여 염색한 다음 형광주사현미경으로 형광염색 된 핵을 계수하여 손상 정도를 관찰한다[3]. 다른 한가지 방법은 단순 면역조직화학 검사로 염색된 핵을 관찰하는 방법이다. 또한 손상에 의하여 쪼개진 DNA 조각(fragment)들의 크기가 제각각 다르기에 전기영동을 하면 DNA 조각들의 크기에 따라 사다리모양으로 그려지게 되는 것을 관찰함으로써 간접적으로 손상을 추정하는 방법(DNA laddering)이 있다(Fig. 5)[2]. 그리고 전자현미경을 이용하여 핵이 자멸하는 과정을 손상 정도에 따라 변형 정도를 직접 관찰할 수 있다 [2]. 손상 정도에 따라 원형질의 blebbing, 핵소체의 응축, vacuole 생성, kupffer세포가 자멸되어가는 세포체를 탐식한 phagocytosis

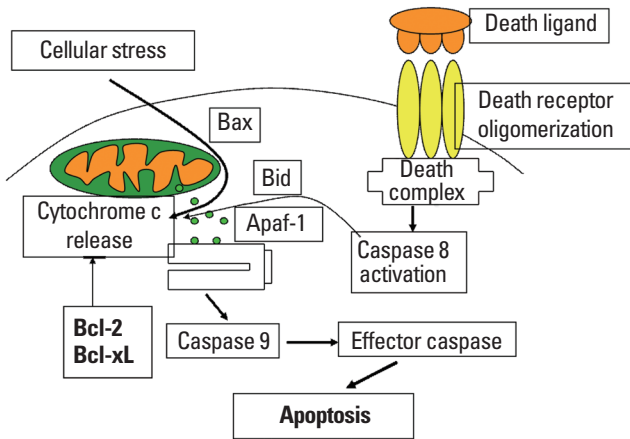


Fig. 3. Intracellular signal pathway of apoptosis.

some 등을 관찰할 수 있다[4].

이와 같이 세포가 괴사되지 않을 정도의 손상 입은 간조직은 hematoxylin and eosin (H&E) 염색에서 조직손상소견은 뚜렷하지 않지만 조직 괴사가 일어날 정도로 심한 허혈/재관류 손상이 발생

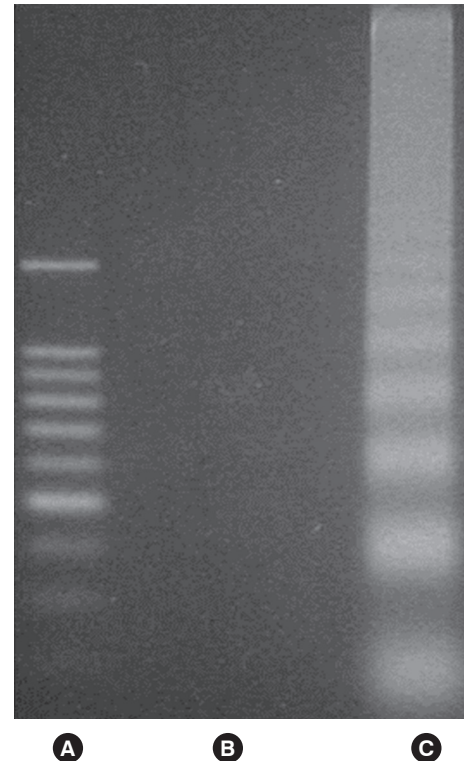


Fig. 5. DNA laddering. Agarose gel electrophoresis of DNA from livers after reperfusion for 3 hours. (A) Known markers are shown comparing the experimental material. (B) Varying ischemic insults showed no DNA laddering in both intermittent clamping. (C) By contrast, the livers subjected to continuous ischemia showed the typical laddering pattern indicating DNA fragmentation. Ref. 7 with permission from Elsevier.

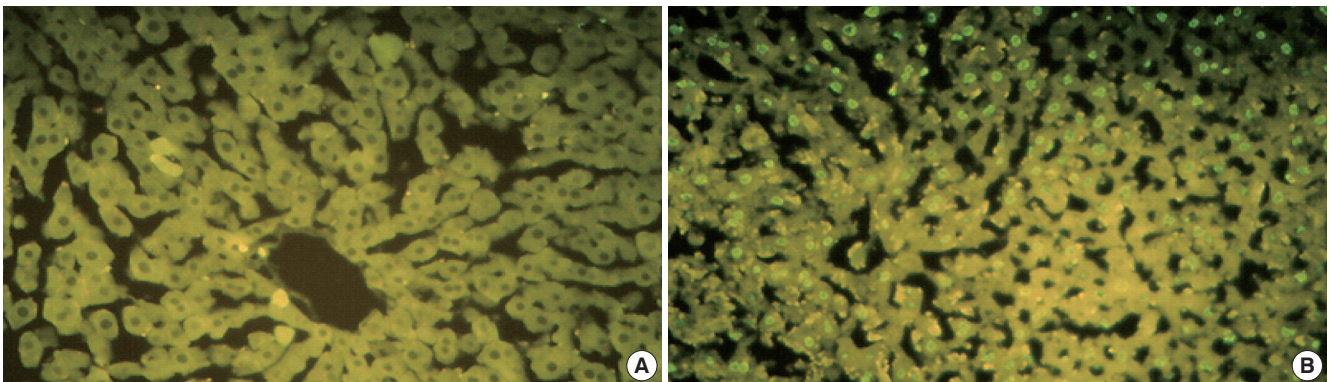


Fig. 4. TUNEL stain. (A) Negative for TUNEL stains, (B) Positive for TUNEL stain, multiple green colored fluorescent stained nuclei are shown, which reflects injured DNA of the hepatocyte nucleus. Ref. 4 with permission from John Wiley and Sons.

한 경우엔 간 H&E 염색으로 조직괴사를 관찰할 수 있다[4].

5. 생존분석

간손상 실험에서 마지막으로 중요한 것은 허혈/재관류 손상 유발 후 실제적으로 실험동물에게 가한 손상으로 인하여 동물의 생존에 차이가 있는가를 보여주는 것이다. 이것은 똑같이 허혈/재관류 손상을 프로토콜대로 시행한 후 70%의 간을 절제해내는 기법을 이용한다[5]. 이것은 전체 간에 허혈/재관류 적용 후 우측간엽과 미상엽을 절제해내고 나서 동물 사육실에 정상적으로 물과 먹이를 공급하면서 12시간마다 생존여부를 관찰한다. 이렇게 하여 시료분석결과와 일치하는지를 보여줌으로써 실험결과에 신뢰도를 높일 수 있다.

시료분석에서는 5마리의 동물을 이용해도 유의성을 나타내기가 쉽지만 생존분석에 사용할 실험동물의 숫자는 최소 7마리가 되어야 의미 있는 차이를 발견할 수 있다.

6. 해석 및 결론

가설을 설정한 후 프로토콜대로 허혈/재관류 손상을 마우스에 적용하여 혈청과 간조직을 취하여 손상 관련인자를 분석하여 세 군의 손상 마커들을 비교하여 1군에 2, 3군에 비하여 현저하게 손상이 적었으며 2군에 3군에 비하여 현저하게 손상이 적었다. 즉, 15분 간헐적 혈류 차단이 가장 손상이 적었으며 허혈 전처치를 한 후 혈류 지속차단군이 전처치 없이 지속 차단한 군에 비해 손상을 줄이는 효과를 가져왔다. 허혈 전처치는 전체 혈류 차단 시간이 전처치 없이 지속차단 군보다 길지만 손상을 줄이는 효과를 가져왔다 [6]. 그 이전에 관하여 많은 연구가 있어 왔지만 아직도 그 비밀은 완전히 밝혀져 있지 않다. 다음으로 간헐적 차단에 있어서 15분 간격과 30분 간격군 간에 간손상에 차이가 있는가라는 실험을 하여 두 군 사이에 차이가 없다는 결과를 얻었다.

7. 간경변 실험 위에서 허혈/재관류 손상 실험으로 확장

위의 연구를 마치고 나니 또 의문이 생겼다. 간경변증에서 간헐적 차단효과는 어느 방법이 효율적이며 간경변증에서도 허혈 전처치가 간손상 방지에 효과가 있을 것인가라는 의문이 들었다. 따라서 다음단계의 실험은 간경변 실험동물모델을 확립하고 난 다음 다시 허혈/재관류 시간 프로토콜을 설정하여 앞의 연구와 같이 분석을 하고자 하는 것이다.

1) 간경변증 모델

먼저 지금까지 간경변증 동물모델이 어떤 방법이 있는지 논문을 검색하였다. 간경변증 실험모델은 크게 분류하여 두 가지였다. 담관결찰에 의한 담즙정체성 간경변증과 약물투입에 의하여 간세포 손상을 지속적으로 일으켜 간경변증을 유도하는 것이다. 마우스를

Table 1. Protocol to induce hepatic cirrhosis of the mouse model

Drugs	Animal	Concentration	PO or IP	Duration
Thioacet-amide (TAA)	Mouse	0.3, 0.6% in d/w*	PO (2 times/week)	12 weeks
	Rat	0.3, 0.6% in d/w		12 weeks
Dimethyl-nitrosamine (DMN)	Mouse	10 mg/kg	IP (3 times/week)	12 weeks
	Rat	10 mg/kg		12 weeks
Carbon Tetra-chloride (CCl ₄)	Mouse	2 mL/kg (50% sol.)	PO	12 weeks [†]
	Rat	4 mL/kg (50% sol.)	PO	12 weeks
		1 mL/kg (10, 30, 50, 50×2% solution)	IP	12 weeks

PO per oral, IP intraperitoneal, *d/w distilled water; [†]Per oral intake of CCl₄ 50% solution for 12 weeks is the most effective protocol to induce cirrhosis without less mortality.

이용하여 담즙정체가 일어나도록 담관결찰하는 기술은 간단하지 않다. 담관직경이 너무 작기 때문이다. 독성약물투여에 의한 방법은 세가지 방법이 주로 보고되어 있다(Table 1). Thioacetamide, dimethyl nitrosamine (DMN) 및 carbon tetrachloride (CCl₄)를 적당한 농도로 희석하여 경구 혹은 복강 내로 주입하는 것이다.

독성약물에 의한 간경변 유도 실험결과를 보고한 논문에선 논문마다 저자들이 사용한 방법이 가장 좋다고 기술되어 있어서 어느 방법을 선택할 것인가 쉽지 않았다. 장기적으로 안정적인 방법을 확립하기 위해서 세가지 방법을 모두 시험적으로 시도해 보았다. 저자들이 각 프로토콜대로 간경변증 유발시험한 결과 CCl₄ 경구투여가 가장 좋겠다는 결론을 얻었다(Fig. 6)[7]. Thioacetamide의 경우 약물을 동물사육 상자의 음용수에 혼합하여 실험에 드는 노동력을 줄일 수 있으나 독성으로 의하여 잘 죽는 경향이 있고 경변증이 유도되면서 간암발생도 일어나서 본 실험을 하는데 문제점이 되기도 하였다. Dimethyl nitrosamine의 경우는 독성이 더 강하여 간경변증에 이르기까지 동물이 생존하는 경우가 1/2 이하로 더 곤란하다. CCl₄는 투여 경로에 따라 경구투여와 복강 내 주입 두 가지 방법이 있으나 복강 내 투여도 간경변 유도가 비교적 잘 일어나지만 8-10주 후에 복강 내 염증반응이 심하여 본 실험을 하는데 제한이 있다. 따라서 CCl₄ 경구 투여방법이 90% 이상에서 중정도의 간경변 유발이 일어나기까지 안정적으로 생존하였다[7].

2) 다음은 간경변을 가진 마우스에서 허혈/재관류 손상 실험을 하고자 프로토콜을 설정하여 첫 실험과 같이 혈류 차단시간을 정하여 프로토콜 대로 문맥혈과 간동맥혈류 차단과 재관류를 반복하였다. 일정시간 재관류 후 샘플을 취했다. 간경변이 있는 마우스에서 문맥을 박리하는 것은 정상간에서보다 어렵다. 문맥 고혈압이 있기에 작은 실수로 간문맥 손상이 있으면 지혈할 수 없고 동물은 죽어 버린다. 실험 중 동물이 죽어버리면 2개월 이상 간경변 유도를 위하여 애쓴 수고가 허사로 돌아가게 된다. 그러기에 현미경기술에 충분히 익숙해지고 나서 집중력을 가지고 수술을 해야 한다. 간경변증에서 허혈/재관류 손상 실험 결과 정상간에서와 마찬가지로

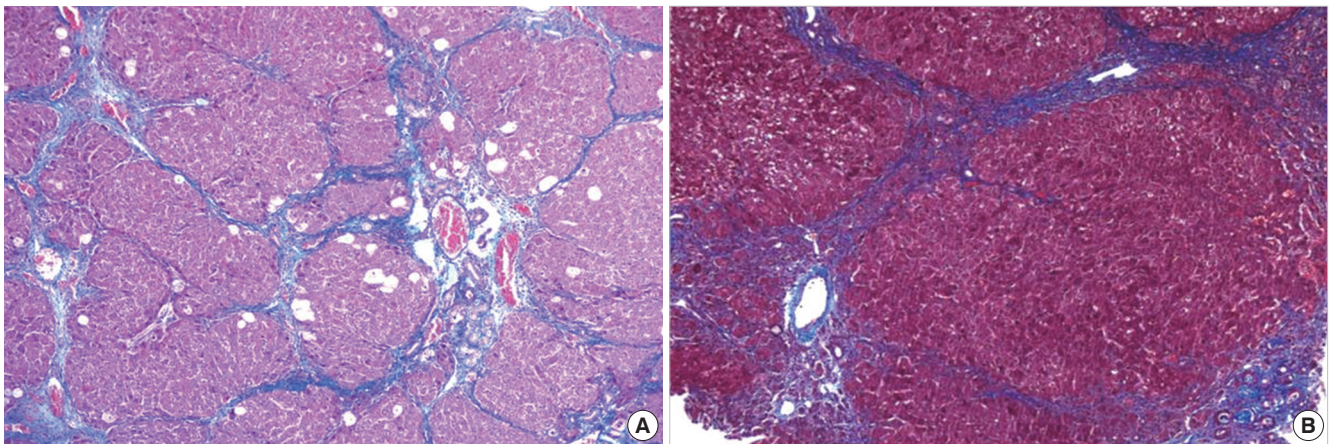


Fig. 6. Trichrome stained experimental mouse liver. (A) After intraperitoneal injection of 50% solution of CCl₄ for 10 weeks. (B) After oral ingestion of thioacetamide solution for 10 weeks.

간혈적 혈류 차단이 지속차단에 비하여 간손상이 적었으며 허혈 전처치를 한 군이 허혈 전처치를 하지 않은 군에 비해 간손상이 적었다[8].

고 찰

생명현상과 세포의 죽음에 관한 연구의 진보와 더불어 간의 허혈/재관류 손상에 있어서 복합적인 기전이 하나씩 밝혀져 가고 있다. 허혈/재관류 손상의 병리기전은 세포 내외에서 일어나는 많은 매개체와 세포의 상호작용에 의하여 일어나는 매우 복잡한 관계로 얽혀져 있다. 이에 관한 연구는 심장을 모델로 앞선 연구가 있었으며 간을 모델로 한 연구에서는 간 내 sinusoidal endothelial cell의 초기 세포자멸사에 이은 간세포(hepatocyte)의 세포자멸사가 허혈/재관류 손상의 주된 기전의 하나로 밝혀졌고[2] 허혈/재관류 후 간 내피세포의 변형 후 곧바로 mitochondrial dysfunction이 일어나는 것도 밝혀졌다. 세포자멸사는 세포의 위축, microvilli의 소실, 세포막의 변형, 염색체의 condensation과 핵소체의 절단으로 이어져 궁극적으로 apoptotic body가 생성된 후 탐식세포에게 포식되는(phagocytosis) 일련의 과정을 거친다. 세포 내부에서 일어나는 현상 가운데 미토콘드리아 기능부전에 의하여 cytochrome c가 미토콘드리아 막에서 유리되며 이것이 DNA를 공격하는 caspase를 활성화시킨다. 간의 냉장보관은 기질 metalloproteinase와 같은 다양한 단백분해효소의 작용으로 perisinusoidal matrix plate에서부터 떨어지도록 함으로써 세포 손상이 시작된다. 세포벽으로부터 떨어짐과 함께 아직은 살아있지만 혈액의 재관류와 함께 유리산소를 포함하는 재관류 혈액에 의하여 내피세포는 급속히 세포자멸사가 일어난다. Caspases와 calpains이 재관류 후 손상의 주된 매개인자의 하나로 작용하며 Bcl-2 gene이 이 손상과정에 손상방어인자로 작용을 하며 혈소판과 백혈구가 sinusoid에 부착(adhesion)하는 현

상이 내피세포의 세포자멸사를 일으키는 중요한 인자로 작용한다[9]. 세포 내에서 일어나는 일련의 과정 속에서 궁극적으로 면역세포 natural killer (NK)처럼 caspase 3가 세포자멸사를 일으키는 마지막 공격물질로 작용한다. 이러한 일련의 과정은 FasL/FasR (Fig. 3)와 TNF pathway가 가장 잘 알려진 모델이다. Caspase inhibitor나 apoptotic pathway를 저지하는 유전인자에 의하여 재관류 손상을 방지할 수 있으며 adenosine이나 nitric oxide와 같은 물질도 세포자멸사를 방지하는 것으로 알려져 있다[10,11]. 세포자멸사를 방지함으로써 세포의 손상을 줄일 수 있다는 연구에 반하여 세포자멸사를 유발함으로써 악성종양발생을 저지할 수 있다는 연구도 다른 한편에서는 진행되고 있다[12].

동물을 이용한 실험은 단순히 실험실에서 조직이나 혈액샘플을 가지고 시약만으로 시행하는 실험보다는 좀 번거롭지만 의미 있는 결과를 내기가 비교적 용이한 편이다. 설치동물을 이용하여 간 허혈/재관류 손상 실험은 안전한 간절제의 확립이나 간이식 수술 확립에 지대한 공헌을 하였다. 위에 기술한 방법으로 동물을 이용한 간손상 실험은 비교적 간단한 방법이다. 이 모델을 이용하여 간절제나 간이식 등에서 있을 수 있는 간문맥 차단기법으로 인한 간손상 정도를 가늠해보고 안전한 혈류 차단방법을 확립해 왔다. 정상 간에서 지속적으로 간혈류를 차단할 수 있는 안전한 시간은 대략 60분으로 알려져 있고 허혈 전처치를 가할 경우에는 75분까지 차단하여도 안전하다고 여겨진다[6]. 60분 이상 간혈류 차단을 사람에게 적용할 때는 신중해야 한다. 그러나 더욱 안전한 방법은 15분 간 차단 후 5분간 재관류하는 간혈적 차단법이 가장 안전하다. 15분 간혈적 차단으로 수술하여 비가역적 간손상을 받지 않는 안전한 시간은 최대 얼마일까? 전이성 간암에서 총 18개의 전이 간종을 떼어내기 위하여 총 322분간 차단한 것이 가장 오랫동안 안전하게 혈류를 차단한 기록이다[13].

생체 간(liver)의 허혈/재관류 손상(warm ischemia/warm reper-

fusion)에 관한 연구 및 이식을 위한 절제 간의 보존 후 생체이식모델을 이용한 연구(cold ischemia/warm reperfusion)는 간절제 수술과 간이식 수술의 발전을 위하여 중요한 역할을 하리라 기대된다. 간이식 때 공여자 간의 보존액에 일정시간 보관하였다가 이식 후 재관류할 때 손상은 생체에서 단순 간혈류 차단할 때 보다 더 많이 일어날 수 있다. 혈액 순환 없이 보존액에 수시간에서 수십 시간까지 보존할 때 간세포에서 어떤 형태로든 세포의 생존에는 불리한 변화가 일어날 것이기 때문이다. 이 실험은 살아있는 동물을 이용하는 것이 아니라 간만을 떼어내어 이용하기에 마우스보다 몸집이 10배 정도 큰 랫을 이용한다. 랫 간을 적출하여 간문맥으로 혈액 대신 실험하려는 물질을 넣은 관류액을 주입하여 적출 간 보존액에 손상을 줄이려는 물질을 혼합하여 간문맥으로 관류시스템을 제작하여 관류실험을 한다(Fig. 7)[14].

예를 들어 백혈구나 혈소판을 관류액에 혼합하여 대조군과 비교 실험을 하여 백혈구나 적혈구가 재관류 손상에 영향을 미친다는 결과를 얻기도 하였다[9]. 과거 간절제 수술이나 간이식 수술의 수술 사망률이 10%를 상회하던 시절에 비하면 지금은 거의 안전하게 간절제나 간이식 수술을 시행하고 있다. 1990년대에 간뿐만 아니라 심장을 이용해서 허혈/재관류 손상에 관한 실험논문이 대단히 중요하게 다루어졌으나, 간절제 수술이나 이식 수술이 확립된 현재 이 연구를 지속하거나 더 나아가는 연구를 위한 동기가 약해졌다.

실험연구는 임상에서 시대적 요청에 의하여 이루어지는 경우가 많다. 과거에 중요하고 대단한 평가를 받았던 논문도 그와 관련된 연구가 거의 다 밝혀진 얼마간의 시간이 지난 다음에 보면 아무것도 아닌 연구로 여겨질 수 있다.

어떤 연구주제를 정할 것인가? 임상에서 가지는 의문을 해결해 보려는 주제를 정하는 것이 좋을 때가 많다. 학생 때 가졌던 의문에 천착하여 의사로서 혹은 연구자로서 그 의문을 풀기 위하여 지속적으로 매달려 연구를 지속해 나갈 때 큰 성취를 얻기 쉽다. 그 대표적인 예는 혈관수술의 기초를 놓아 노벨생리의학상을 받은 프랑스

의 알렉시스 카렐(Alexis Carel)이다. 그는 의과대학 임상실습 중 자국 프랑스의 대통령이 자객의 칼에 찔려 간문맥 손상을 입어 프랑스 최고의 외과의사도 그 손상을 수습하지 못하여 사망한 사건을 보고 충격을 받았다. 의과대학 졸업 후 군의관으로 복무하는 동안 혈관 손상을 입은 병사들을 수술하면서 혈관연결 수술방법을 터득하여 동맥연결 수술을 확립하였고 이것이 노벨상을 받게 되는 바탕이 되었다[15].

과거나 현재 그리고 미래에도 가지적으로 해결하기 어려운 과제는 암이다. 암 절제 수술을 많이 하게 되는 외과의사는 어느 분야의 의사보다도 암정복에 관심을 가지며 임상연구를 기본적으로 하게 되지만 좀더 도전심이 강한 사람들은 실험연구에 호기심을 가지고 눈을 돌리기도 한다. 암에 관한 실험연구는 외과의사 혼자서는 시도하기 쉽지 않다. 암에 관한 실험연구는 외과의사 혼자서 하기 어렵기 때문에 기초의학전문가와 공동으로 실험하는 것이 바람직하다. 기초 의학을 연구하는 사람들은 연구재료 즉, 암 조직을 얻기가 어렵고 암의 임상경과에 대한 정보를 얻기 어려운 대신 실험에 익숙하기 때문에 연합하면 완전한 형태의 연구공동체가 될 수 있다. 외과의사는 조직을 늘 얻을 수 있기 때문에 조직과 임상 데이터를 제공하고 기초의학자는 조직을 이용하여 기초실험을 진행하여 임상소견과 결부시켜 해석함으로써 암의 실체에 대한 이해에 더 가까이 갈 수 있다.

요즘 가장 많이 관심을 가지는 것 중의 하나가 암유전자 연구다. 암조직을 취하여 생체 냉동 보관했다가 조직에서 DNA, RNA, micro-RNA 등을 추출하여 유전자 발현을 보기도 하고 염기서열을 분석하여 유전자 변이 여부나 정도에 관한 데이터를 임상양상과 결부시켜 분석함으로써 유전자 발현과 변이가 환자에게 어떻게 영향을 미치는지 분석하여 암의 발생과 전이 및 예후에 관하여 더 나은 정보를 얻을 수 있다. 이 연구에는 반드시 유전자 통계 전문가의 전문적인 통계분석이 결들여져야 한다[16]. 또한 이 연구는 비용이 많이 든다. 그러기에 이 연구에 단독으로 보다는 여러 기관이 연합하고 국가나 암정복 사업 등 국가적인 지원을 끌어내어 진행해야 할 연구과제다.

결론

임상의사 중에서 임상진료와 수술에 보내는 시간이 절대적으로 많은 외과의사가 실험연구를 병행한다는 것은 쉬운 일이 아니다. 그렇지만 암을 비롯한 중환자 수술을 하면서 가졌던 의문에 대하여 지속적으로 답을 얻으려는 노력을 임상현장과 필요할 경우 실험연구를 통하여 질병의 치료에 유익을 끼칠 수 있다면 더없이 바람직하다. 수술과 실험을 병행하기 위해서 외과의사의 생각을 실험으로 실천할 수 있는 연구전담요원을 선발하고 지속적으로 교육하여야 한다. 처음은 어렵지만 일단 실험실이 갖추어지고 여러 연구요원이 연

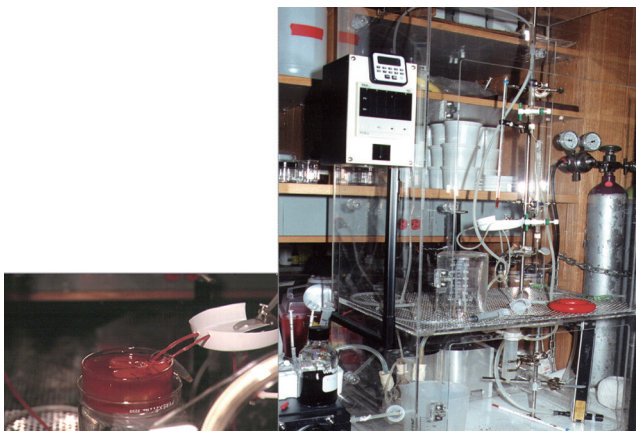


Fig. 7. Isolated perfused rat liver model.

합할 수 있는 체제를 갖추면 실험을 지속할 수 있다. 또한 외과의사 혼자서 연구를 기획하고 진행하는 것 보다는 다른 임상 의사와 기초 연구요원과 연합하여야 더 비중 있는 연구결과를 얻을 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
2. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:1652-60.
3. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30:1223-31.
4. Kang KJ, Jang JH, Lim TJ, Kang Y, Park KK, Lee IS, et al. Optimal cycle of intermittent portal triad clamping during liver resection in the murine liver. *Liver Transpl* 2004;10:794-801.
5. Yadav SS, Gao W, Harland RC, Clavien PA. A new and simple technique of total hepatic ischemia in the mouse. *Transplantation* 1998;65:1433-6.
6. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400-7.
7. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN, Lee IS. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplant Proc* 2008;40:2700-3.
8. Jang JH, Kang KJ, Kang Y, Lee IS, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping confer protection against ischemic injury in the cirrhotic mouse liver. *Liver Transpl* 2008;14:980-8.
9. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000;118:183-91.
10. Caban A, Oczkowicz G, Abdel-Samad O, Cierpka L. Influence of ischemic preconditioning and nitric oxide on microcirculation and the degree of rat liver injury in the model of ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 2006;38:196-8.
11. Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, et al. Adenosine-dependent activation of hypoxia-inducible factor-1 induces late preconditioning in liver cells. *Hepatology* 2008;48:230-9.
12. Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rudiger HA, Sindram D, Hannun YA, et al. Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:1233-40.
13. Sakamoto Y, Makuuchi M, Takayama T, Minagawa M, Kita Y. Pringle's maneuver lasting 322 min. *Hepatogastroenterology* 1999;46:457-8.
14. Clavien PA, Sanabria JR, Cywes R, Harvey PR, Strasberg SM. A method for sequential excision biopsies of rat liver in an isolated perfused system. *Liver* 1992;12:69-72.
15. Cosimi AB. Surgeons and the Nobel Prize. *Arch Surg* 2006;141:340-8.
16. Yang JD, Seol SY, Leem SH, Kim YH, Sun Z, Lee JS, et al. Genes associated with recurrence of hepatocellular carcinoma: integrated analysis by gene expression and methylation profiling. *J Korean Med Sci* 2011;26:1428-38.