간경변증 쥐 모델에서 혈청 Hyaluronic acid와 간섬유화의 정량적 측정치 간의 상관관계

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 병리학교실¹, 미생물학교실²,
고려대학교 의과대학 내과학교실³, 연세대학교 의과대학 내과학교실⁴

김문영 · 백순구 · 장윤옥 · 석기태 · 김재우
김현수 · 조미연¹ · 최선주² · 엄순호³ · 한광협⁴

Abstract

Serum hyaluronic acid level: Correlation with quantitative measurement of hepatic fibrosis in a cirrhotic rat model

Moon Young Kim, M.D., Soon Koo Baik, M.D., Yoon Ok Jang, M.D.,
Ki Tae Suk, M.D., Jae Woo Kim, M.D., Hyun Soo Kim, M.D.,
Mi Yun Cho, M.D.¹, Sun Joo Choi, M.D.², Soon Ho Um, M.D.³,
Kwang-Hyub Han, M.D.⁴

Department of Internal Medicine, ¹Pathology, ²Microbiology,
Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea,

³Department of Internal Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea,

⁴Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Backgrounds/Aims: The serum level of hyaluronic acid (HA) has been suggested as a useful serologic marker for hepatic fibrosis. However, the relationship between serum HA levels and quantitative markers of fibrosis from liver tissue has not been reported. The aim of this study was to determine the correlation between serum HA level and quantitative measurement of hepatic fibrosis in a cirrhotic rat model. **Methods:** Cirrhosis was produced by common bile duct ligation (BDL) in adult Sprague-Dawley rats. The animals were classified into four groups: (1) G1, sham operated ($n=5$); (2) G2, BDL for 2 weeks ($n=6$); (3) G3, BDL for 3 weeks ($n=6$); and (4) G4, BDL for 4 weeks ($n=6$). Hepatic fibrosis was analyzed histomorphologically using the Batts and Ludwig scoring system. Serum HA level and hepatic hydroxyproline content were quantified. The gene expressions in the liver of procollagen, collagen, and transforming growth factor- β (TGF- β) were measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Results:** In groups G1, G2, G3, and G4, the Batts and Ludwig scores (mean $\pm$ SD) were 0, 1.3 ± 0.5 , 2.6 ± 0.5 , and 3.4 ± 0.5 , respectively ($P<0.05$), serum HA levels were 12.5 ± 3.2 , 30.0 ± 4.3 , 228.6 ± 157.7 , and 391.3 ± 207.7 ng/mL ($P<0.05$), and the concentration of hydroxyproline was 12.4 ± 2.8 , 17.6 ± 3.8 , 17.9 ± 2.4 , and 33.4 ± 3.4 μ g/g liver tissue, and it was significantly higher in group G4 than in the other groups ($P<0.05$). The gene expressions of collagen, procollagen, and TGF- β 1 in the liver were also significantly higher in group G4 compared with the other groups ($P<0.05$). Direct linear correlations were observed between serum HA level and hepatic hydroxyproline content, hepatic gene expressions of collagen, procollagen, TGF- β 1, and histomorphological grade of hepatic fibrosis ($P<0.001$). **Conclusions:** These results indicate that serum HA is a useful and noninvasive serologic marker for the evaluation of advanced hepatic fibrosis. (Korean J Hepatol 2008;14:159-167)

Key words: Hyaluronic Acid; Hepatic fibrosis; Bile duct ligation

- ◇ Received October 14, 2007; revised May 9, 2008; accepted May 16, 2008
◇ Abbreviations: BDL, bile duct ligation; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HA, hyaluronic acid; PIIP, procollagen III peptide; TGF, transforming growth factor
◇ Corresponding author: Soon Koo Baik, E-mail: baiksk@medimail.co.kr; Phone: 033) 741-1228; Fax: 033) 741-1229
주소: 강원도 원주시 일산동 162번지 연세대학교 원주의과대학 내과학교실 (우)220-701

* This work was supported by Yonsei University Research Fund of 2007, and also by a grant from the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (no, A050021).

서 론

간섬유화는 여러 원인의 만성 간질환의 진행에 따른 간세포의 괴사 후 수반되는 필연적 과정으로서 만성 간질환의 중증도와 예후를 반영하는 가장 중요한 요소이다. 간섬유화 정도의 측정은 조직검사를 통한 직접적인 확인이 이제까지 가장 정확한 것으로 알려져 있으나, 이러한 조직검사는 침습적이고 시술로 인한 합병증 발생의 위험이 있으며, 반복적인 측정에 의한 질병 감시가 어렵다는 단점이 있다. 또한, 간섬유화가 간 전체에 걸쳐 고르게 나타나지 않는 경우 극히 일부의 조직으로 간 전체의 상태를 반영하지 못할 가능성도 배제할 수 없다.¹ 이에 현재까지 여러 연구에서 혈청 지표를 이용한 간섬유화 및 간경변증을 예측하고자 하는 시도가 있어 왔으며,^{2,3} 혈중 hyaluronic acid (HA), procollagen III peptide (PIIP), transforming growth factor (TGF) β 1, laminin 등이 대표적 지표이다. Oberti 등의 보고에 의하면 혈청 HA는 이들 직접적인 간섬유화 지표들 중에서도 가장 진단 정확도가 높은 것으로 알려져 있다.⁴ HA는 glycosaminoglycan의 하나로 간염세포에서 만들어지는 결합조직의 대표적 성분이며, 간내 동모양혈관 내 피세포에서 제거된다.⁵ 따라서, 간섬유화 및 간경변증 시 간동양내피세포의 손상 및 기능 저하에 의해 혈중 HA치가 증가한다.^{6,7} 이에 따라 이제까지 중증 간섬유화 또는 간경변증을 선별하는 검사로서 혈청 HA에 대한 많은 연구가 있어 왔으나, 대부분 간조직검사를 통해 얻은 극히 미량의 간조직과 혈청 HA와의 상관성을 보았기 때문에 연구에 제약이 있었다. 더욱이 간섬유화 및 간경변증의 조직에서 각 단계별 혈청 HA치의 변화 및 간섬유화의 다

른 지표들과의 상관관계 또한 아직까지 명확하지 않다. 이에 저자들은 총담관결찰법(Common bile duct ligation, 이하 BDL)을 이용한 간경변증 동물 모델을 이용해 간섬유화의 진행에 따른 혈청 HA 값과 간실질 전체의 homogenization을 통해 얻은 여러 정량적 직접적 간섬유화 지표들과의 상관관계를 밝힘으로써, 간섬유화의 진단에 있어 혈청 HA의 유용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 동물실험

약 250~300 g 무게의 수컷 Sprague Dawley 쥐를 대상으로 하였다. 이전에 보고된 방법을 토대로 BDL하여 간경변증 모델을 만들었다.⁸ 저자들이 시행한 방법을 간략히 기술하면, 케타민(ketamine hydrochloride)을 복강 주사하여 마취한 후, 중앙 복부 절개를 하고 봉합사(4-0 silk)로 총담관의 근위부와 원위부를 결찰하였고, 결찰된 총담관의 중간 부분을 절단하였다. 수술 후 동물들은 24℃ 항온 조건에서 12시간 주기로 빛에 노출시켰으며, 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 사육하였다. 이러한 동물실험은 기관 내 동물실험위원회에서 승인을 받았으며, 인도적으로 진행하였다.

2. 연구 진행

BDL 시행 날부터 대상 동물을 네 군으로 무작위 배정하여 1군으로 배정된 쥐들은 BDL을 시행치 않은 정상 대조군(5마리)으로 하였다. 나머지 3개 군(각 군당 6마리)에 대해서는 각각 BDL 유지기간을 달리하여 간섬유화의 정도를 차등적으로 유도하여 2, 3, 4군에서 각각 BDL 시행 2, 3, 4주째

Figure 1. Microscopic findings of the liver after bile duct ligation (BDL) (Masson-trichrome stain, $\times 200$). (A) Control group (G1): nearly normal histological findings of the liver. (B) Two-week-BDL group (G2): expansion of the portal tracts without linkage. (C) Two-week-BDL group (G3): portal expansion with portal-to-portal linkage. (D) Four-week-BDL group (G4): cirrhotic change with nodule formation.

에 희생한 후 회복하였다. 결찰 부위의 근위부 담관이 확장된 것으로 적절한 BDL이 시행되었음을 확인한 후 전체 간을 적출하여 조직을 얻었다.

3. 조직 형태 분석

대상 동물들에서 얻은 파라핀 고정 조직을 $5\ \mu\text{m}$ 두께로 잘라 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 Masson-trichrome 염색을 시행하였고, 간섬유화를 Batts와 Ludwig 점수에 따라 다음과 같이 네 단계로 평가하였다(그림 1).⁹ Stage 1, 문맥역의 팽창은 있으나 문맥역 간의 염증 및 섬유화의 연결은 없는 상태; stage 2, 문맥역의 팽창과 문맥역 간의 염증 및 섬유화의 연결이 있는 상태; stage 3, 문맥역 간의 심한 연결 및 부분적으로 문맥역과 중심정맥 간의 염증 및 섬유화의 연결이 있는 상태;

stage 4, 간경변증.

4. 혈청 hyaluronic acid (HA) 측정

희생시키기 전날 밤부터 먹이를 주지 않고 공복 상태로 유지한 후, 희생 시행 시 전체 간조직의 채취와 더불어 간정맥과 하대정맥 문합부 상방의 하대정맥에서 혈액을 채취하였으며 2시간 내에 혈청을 분리하여 -20°C 에서 냉동 보관하였다. 혈청 HA 농도의 측정은 Sandwich protein binding assay 방법을 이용한 HA test kit (Corgenix, Denver, CO, USA)로 분석하였다. 대상 동물의 혈청을 HA 결합단백질과 혼합시키고 세척완충액으로 결합되지 않은 물질들을 제거시킨 뒤 horseradish peroxidase가 부착된 HA결합 단백질과 염색시약을 첨가하여 형성된 복합체를 ELISA reader (VERSA

Table 1. Primer sequences used to detect collagen, procollagen, TGF- β

GAPDH (control)	
Forward primer	5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AAT G-3'
Reverse primer	5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TTG G-3'
Collagen	
Forward primer	5'-TGC CGA TGT CGC TAT CCA-3'
Reverse primer	5'-TCT TGC AGT GAT AGG TGA TGT TCT G-3'
Procollagen	
Forward primer	5'-TGC CGT GAC CTC AAG ATG TGC C-3'
Reverse primer	5'-CAT CCA CAA GCG TGC TGT AGG TG-3'
TGF- β	
Forward primer	5'-CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG C-3'
Reverse primer	5'-CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTC C-3'

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TGF- β , Transforming Growth Factor-beta.

max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 측정하였다. 검사의 정상범위는 50 ng/mL 이하이다.¹⁰

5. 간조직 내 hydroxyproline (HP) 정량분석

간조직 내 Hydroxyproline 함량을 측정함으로써 간섬유화의 정도를 정량분석하였다. 방법을 간단히 설명하면 전체 간조직을 homogenize시킨 후 조직액을 120°C (Dry Block Heater, JS Research Inc, Gongju-city, Korea)에서 16시간 동안 가수분해시켰다. 다시 얼음에 식힌 후 8,000 G로 원심분리하고 나서 7% chloramine T와 acetate/citrate buffer (5.7 g sodium acetate 3H₂O+3.75 g trisodium citrate 2H₂O+0.55 g citric acid H₂O+38.5 mL isopropanol) 그리고 Ehrlich's solution (Fluka, Seelze, Germany) 150 μ L를 첨가한다. 96 well plate에 표본당 200 μ L를 옮겨 담은 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 standard solution (Trans-4-Hydroxy-L-Proline, Sigma, St Louis, Mo, USA)을 이용하여 적정하였다.¹¹⁻¹³

6. 역전사중합효소반응(reverse-transcription polymerase chain reaction)을 이용한 간내 교원질(collagen), 전교원질(pro-collagen) 및 TGF- β RNA의 정량

전체 간조직을 homogenize시킨 후 여기서 TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 이용해 추출한 RNA 1 μ g으로부터 역전사반응 kit (GeneAmp RNA PCR kit, Roche, Branchburg, NJ, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그리고 합성된 cDNA 중 collagen, procollagen, TGF- β gene과 control에 해당하는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene을 QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Foster City, CA, U.S.A)와 Rotor-Gene^{TM}3000 (Corbett Life Science, NSW, Australia)를 이용하여 real time polymerase chain reaction을 통해 증폭하였다. 각 유전자의 발현 정도를 평가하기 위해 Delta-Delta CT값(Software version Rotor-Gene 6.1, Foster City, CA, U.S.A)을 이용하여 상대적 정량분석을 시행하였다. PCR 반응조건은 initial 변성(denaturation)을 95°C에서 15분 시행한 후 PCR의 세 단계인 DNA의 변성(denaturation), primer의 결합(annealing), DNA의 합성(polymerization, extension)을 각각 94°C에서 30초, 60°C에서 60초, 72°C에서 60초간 시행하였으며, 이를 35회 반복하였다. Forward 및 reverse primer의 염기서열은 표 1에 제시하였다.

Figure 2. Serum hyaluronic acid (HA) level with various degrees of BDL. HA levels were 12.5 ± 3.2 , 30.0 ± 4.3 , 228.6 ± 157.7 , and 391.3 ± 207.7 ng/mL in groups G1, G2, G3, and G4, respectively, and were higher in groups G3 and G4 than in groups G1 and G2 ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$ vs. groups G1 and G2.

7. 통계 분석

자료 관리와 모든 통계 분석은 SPSS version 13.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA)을 이용하였다. 연속형 변수는 기술 통계를 통해 '평균±표준편차'의 형식으로 명기하였고, 비모수통계인 Kruskal-Wallis 검정법, Spearman 상관계수를 구하였다. 모든 검정에는 P 값이 0.05 미만인 경우를 의미 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 조직 형태 분석

H&E염색과 Masson-Trichrome (MTC)염색을 시행하여 섬유화의 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 각 군의 대표적인 조직 소견은 그림 1과 같았다. BDL을 시행하지 않은 정상 대조군인 1군에서는 MTC에 대한 염색이 나타나지 않았다(그림 1A). 2주간 BDL을 시행한 2군에서는 결절 형성은 관찰할 수 없었지만 정도의 섬유화가 관찰되었다(그림 1B). 각각 3주와 4주간의 BDL을 시행한 3군과 4군에서는 중등도 이상의 섬유화와 결절의 형성을 관찰할 수 있었다(그림 1C, 1D). 이러한 변화들을 보다 객관적으로 증명하기 위해 Batts & Ludwig stage를 점수화 하여 섬유화의 정도를 수치(평균

Figure 3. Hepatic hydroxyproline (HP) content according to BDL group. The concentration of HP was 12.4 ± 2.8 , 17.6 ± 3.8 , 17.9 ± 2.4 , and 33.4 ± 3.4 μg/g liver tissue in groups G1, G2, G3, and G4, respectively, and was significantly higher in G4 than in any of the other groups ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$ vs. groups G1, G2, and G3.

±표준편차)로 비교하였을 때, 1군은 0점, 2군은 1.3 ± 0.5 점, 3군은 2.6 ± 0.5 점, 4군은 3.4 ± 0.5 점으로 BDL의 기간이 늘어날수록 유의하게 높은 섬유화 점수를 보여($P < 0.05$), 각 군에 따른 단계별 섬유화 형성이 성공적으로 이루어졌음을 보여주었다.

2. 섬유화 정도에 따른 혈청 hyaluronic acid (HA) 농도의 분포

BDL 기간에 따라 1, 2, 3, 4의 네 군으로 분류하였을 때, 혈청 HA치는 각각 12.5 ± 3.2 , 30.0 ± 4.3 , 228.6 ± 157.7 , 391.3 ± 207.7 ng/mL를 보였으며, 특히 섬유화가 가장 심한 제3군과 4군에서 1군 및 2군에 비해 유의하게 높게 나타나 섬유화 정도가 심할수록 혈청 HA치가 높음을 나타내었다($P < 0.05$) (그림 2).

3. 간조직 내 hydroxyproline의 정량분석

1 g의 간조직에 포함된 hydroxyproline을 정량 분석하였을 때, 1군에서는 12.4 ± 2.8 μg, 2군에서는 17.6 ± 3.8 μg, 3군에서는 17.9 ± 2.4 μg, 4군에서는 33.4 ± 3.4 μg이 측정되어, 섬유화가 가장 심한 4군에서 다른 군에 비해 유의하게 높게 측정되었다($P < 0.05$)(그림 3).

Figure 4. Relative gene expression of hepatic collagen and procollagen, as measured by real-time PCR, following various degrees of BDL. The expression of collagen was 1.1 ± 0.1 , 2.8 ± 0.4 , 10.1 ± 5.5 , and 13.9 ± 5.4 in groups G1, G2, G3, and G4, respectively, and that of procollagen was 1.2 ± 0.1 , 3.3 ± 0.8 , 15.3 ± 8.1 , and 23.0 ± 7.9 . The expressions of collagen and procollagen were significantly higher in group G4 than in the other groups ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$ vs. groups G1, G2, and G3.

Figure 5. Relative gene expression of hepatic transforming growth factor- β (TGF- β), as measured by real-time PCR in BDL groups. The expression of TGF- β was 1.1 ± 0.04 , 1.7 ± 0.7 , 3.1 ± 1.4 , and 9.4 ± 5.7 in groups G1, G2, G3, and G4, respectively, and was significantly higher in group G4 compared with the other groups ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$ vs. groups G1, G2, and G3.

Table 2. Correlation between serum hyaluronic acid levels and other quantitative markers of fibrosis measured from liver tissue

	r value	P-value
Batts-Ludwig score	0.964	<0.001
Hydroxyproline	0.817	<0.001
Collagen	0.908	<0.001
Procollagen	0.802	<0.001
TGF- β	0.883	<0.001

TGF- β , Transforming growth factor-beta.

4. 역전사중합효소반응을 이용한 간내 교원질,

전교원질, TGF- β 유전자 발현의 정량

GAPDH 유전자를 control로 하여 상대적 발현도를 보았을 때, 교원질 유전자는 각각 1.1 ± 0.1 , 2.8 ± 0.4 , 10.1 ± 5.5 , 13.9 ± 5.4 , 전교원질 유전자는 각각 1.2 ± 0.1 , 3.3 ± 0.8 , 15.3 ± 8.1 , 23.0 ± 7.9 를 나타내었고, TGF-beta 유전자의 발현 정도는 1, 2, 3, 4군에서 각각 1.1 ± 0.04 , 1.7 ± 0.7 , 3.1 ± 1.4 , 9.4 ± 5.7 이었으며, 세 가지 유전자 모두 제 4군에서 다른 군에 비해 높게 발현되었다($P < 0.05$)(그림 4, 5).

5. 혈청 hyaluronic acid (HA) 농도와 직접적, 정량적 섬유화 표지자 및 조직학적 분류간의 상관관계

간섬유화를 나타내는 직접적 표지자들과 혈청 HA치의 상관관계를 상관분석을 통해 알아보았다. Batts-Ludwig법에 따른 간섬유화의 조직학적 분류는 혈청 HA 농도와 상관계수(r) 0.964 ($P < 0.001$)의 강한 양의 선형관계를 보였으며, 간조직 내의 hydroxyproline 함량 또한 0.817 ($P < 0.001$)의 상관계수(r)를 보여 유의한 상관성을 보였다. TGF-beta, 교원질, 전교원질의 유전자 발현 역시 각각 0.883, 0.908, 0.802의 상관계수(r)를 보여 혈청 HA

농도와 강한 상관성을 보였다($P<0.001$)(표 2).

고 찰

간섬유화는 간세포암종과 더불어 만성 간질환에 의한 합병증 및 사망의 궁극적 원인으로, 주된 병리는 간성상세포(hepatic stellate cell)의 활성화에 의한 것으로 알려져 있다. 이러한 간섬유화의 진행에 대한 평가는 만성 간질환의 치료와 관리에 있어 매우 중요한 부분이며, 특히 최근 간섬유화에 대한 새로운 치료법 연구가 활발히 진행됨에 따라 간섬유화의 비침습적 예측 및 진단에 대한 필요성이 증가하고 있다.¹⁴ 이러한 간섬유화 또는 간경변증의 진단은 간조직생검에 의한 조직검사가 가장 정확한 것으로 알려져 있다. 그러나 이는 침습적 방법으로 수술과 관련된 통증 및 합병증이 발생할 수 있고, 0.03%의 사망률까지 보고되어 있으며, 충분한 조직 채취가 이루어지지 못하는 경우에는 간 실질 전체를 대표하지 못하는 한계를 가지고 있다. 또한 간섬유화가 전체 간에서 고르게 나타나지 않는다는 점, 환자의 거부감이나 비용 문제로 추적관찰을 위한 반복 검사가 어렵다는 점 등으로 인해, 간조직검사는 실제 임상에서 질환을 진단하고 치료반응의 평가를 위해 이용하기에는 많은 제약을 가지고 있다.¹ 이에 비침습적으로 간섬유화를 평가하고자 하는 여러 연구가 시도되고 있으며, 특히 혈청 지표를 이용해 간섬유화 정도를 평가하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 간섬유화의 혈청 지표는 간섬유화와 관련된 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 반영하는 직접 지표와 간세포의 염증 또는 간기능이상을 나타내는 간접 지표로 나눌 수 있다. 그 중에서도 직접 지표를 이용하여 간섬유화 단계를 구분하고, 섬유화의 진행 및 항바이러스치료에 대한 반응을 평가하려는 연구들이 다수 진행되고 있으나, 아직까지 그 유용성에 대한 논란이 많으며, 그 대표적인 것으로 혈청 hyaluronic acid (HA), 교원질(collagen), 전교원질(procollagen) 등이 있다.

HA는 glycosaminoglycan의 하나로서 주로 간

엽세포에서 생성되는 결합조직의 대표적 성분이다.¹⁵ 정상 농도는 10~100 $\mu\text{g/L}$ 이며 약 2.2~5.5분의 혈액 내 반감기를 가지고 있다. 만성 간질환에서 혈청 HA의 증가는 활성화된 간성상세포에 의한 HA의 생성 증가 및 간동양내피세포에 의한 섭취 및 분해 감소에 의한 것으로 알려져 있다.^{5-7,16} 따라서, 간섬유화가 진행될수록 간성상세포가 활성화되고 간동양내피세포의 손상 및 기능 저하가 심화되어, 혈중 HA치가 이에 비례하여 변화함을 이용하여 간섬유화의 정도를 혈청 HA 농도를 통해 간접적으로 평가하고자 하는 여러 연구가 있어 왔다. 그리고 이들 연구 결과 직접 지표 중에서는 혈청 HA 농도가 가장 예민한 개별 검사로 밝혀져 있으며, 심한 간섬유화 또는 간경변증의 진단에 매우 유용하다는 보고도 있어 왔다.¹⁷ 그러나 아직까지 보고자에 따라 상이한 cut-off치 및 민감도, 특이도를 보이고 있으며, 다른 직접 지표들과의 상관관계 또한 명확하지 않다. 본 연구에서 저자들은 BDL의 기간을 달리 함으로써 각각 다른 단계의 간섬유화를 성공적으로 유도하였으며(그림 1), 간섬유화 단계별 혈청 HA 농도 및 다른 직접 지표값을 구하고 그 상관성을 연구하였다. 혈청 HA 농도는 섬유화가 진행됨에 따라 각각 12.5 ± 3.2 , 30.0 ± 4.3 , 228.6 ± 157.7 , 391.3 ± 207.7 ng/mL를 보여, 초기 간섬유화증을 감별하는 데는 한계점을 보였으나, 다른 지표에 비해 중등도 이상의 섬유화가 발생한 경우에 유의한 증가를 보였다. 이는 이전의 연구에서와 같이 혈청 HA가 임상적으로 진행된 간섬유화나 간경변증의 선별에 유용한 지표가 될 수 있음을 확인한 것이다.¹⁷

또한 본 연구에서 저자들은 각 섬유화 단계별 실험쥐의 간 전체를 적출하여 전체 간조직 내의 hydroxyproline 함량과 교원질과 전교원질의 유전자(RNA) 발현 정도 및 간섬유화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 TGF- β 의 유전자 발현 정도를 정량적으로 직접 측정하여, 혈청 HA 농도와 상관관계를 분석하였다. 이들 지표는 간섬유화를 정량적으로 직접 측정할 수 있는 좋은 방법으로, 정확히 조직 내 섬유화 양을 측정할 수 있으며,

또한 간조직검사와 같이 일부 간조직 채취 시 발생할 수 있는 sampling error 등의 요소를 제거할 수 있어, 혈청 HA와 다른 직접 지표들과의 상관관계를 분석함에 있어서 가장 정확한 평가 방법이라 생각된다. 본 연구에서 혈청 HA 농도는 상기 간조직 내 섬유화 지표들과 매우 높은 상관성을 보였으며, 특히 혈청 HA 농도는 초기 간섬유화의 단계를 지나 중증의 섬유화 및 완전한 간경변증으로 진행함을 감별하는 데 임상적으로 유용한 지표가 될 수 있음을 보여주었다(표 2). 혈청 HA 농도는 BDL 3주 시행군에서부터 유의한 상승이 있었던 반면, 간조직에서 얻은 간섬유화의 정량적 측정값인 hydroxyproline은 BDL 4주 시행군에서야 의미 있는 증가를 보였다. 이는 완전한 간경변증으로의 이행 전에 발생하는 활발한 간섬유화 과정에서 HA의 대사 장애가 미리 생겨, 혈청 HA가 상승됨을 시사한다.

결론으로 혈청 HA 농도는 간조직 전체에서 얻은 간섬유화의 여러 직접 지표들 및 간경변증의 조직 변화와 유의한 상관성을 나타냈으며, 특히 중등도 이상의 섬유화가 발생하는 경우에 유의한 증가를 보인다. 따라서 혈청 HA 농도는 중등도 이상의 진행된 간섬유화 및 간경변증을 선별해 내는 데 도움을 줄 수 있는 비침습적 혈청 지표로 판단한다.

요 약

배경/목적: 혈청 hyaluronic acid (HA)는 간섬유화를 예측하는 유용한 지표로 제시되고 있으나, 간조직에서 정량적으로 측정된 간섬유화의 직접 지표들과의 상관관계에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 쥐를 이용한 간경변증 동물 모델을 통해 간조직 내 섬유화 지표의 정량적 측정과 혈청 HA 농도 간의 관련성을 알아보았다. **방법:** Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 총담관결찰(Common bile duct ligation, 이하 BDL)을 한 후, BDL 기간에 따라 제1군은 BDL을 시행하지 않은 대조군, 제2군: 2주간 BDL, 제3군: 3주간 BDL, 제4군: 4주간 BDL 시행한 군의 네 군(각 군 n=6, 제1군 n=5)

으로 나누었다. 이들에 대해 Batts & Ludwig 체계를 이용하여 조직으로 간섬유화의 단계를 평가하고, 혈청 HA치를 정량적 검사 kit를 이용하여 측정하였다. 쥐의 간 전체를 적출하여 이를 고르게 간후 조직 내 hydroxyproline 양을 정량하였으며, 역전사중합효소반응을 이용하여 procollagen, collagen, TGF- β 의 RNA 발현 정도를 분석하였다. **결과:** Batts & Ludwig 점수 분석상 1, 2, 3, 4군에 대해서 간섬유화 점수는 각각 0, 1.3 ± 0.5 , 2.6 ± 0.5 , 3.4 ± 0.5 로 각 군당 섬유화 발현 정도의 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 혈청 HA 농도는 각각 12.5 ± 3.2 , 30.0 ± 4.3 , 228.6 ± 157.7 과 391.3 ± 207.7 ng/mL로 3, 4군에서 유의하게 높게 나타났으며($P < 0.05$), 간조직 내의 hydroxyproline 함량도 각각 12.4 ± 2.8 , 17.6 ± 3.8 , 17.9 ± 2.4 과 33.4 ± 3.4 ($\mu\text{g/g}$ liver tissue)로 다른 군에 비해 4군에서 높은 값을 보였다($P < 0.05$). Collagen, procollagen, TGF- β 의 RNA 발현 정도 역시 다른 군에 비해 4군에서 높게 나타났으며($P < 0.05$), 혈청 HA 농도와 간내 hydroxyproline 함량, collagen, procollagen, TGF- β 1의 RNA 발현 정도 그리고 섬유화의 조직학적 단계 사이에 높은 상관성을 보였다($r=0.817, 0.908, 0.802, 0.883$ and 0.964 respectively, $P < 0.001$). **결론:** 혈청 HA 농도는 진행된 간섬유화의 평가에 있어 유용한 비침습적 혈청 지표이다.

색인단어: 히알루론산, 간섬유화, 담관결찰

참고문헌

1. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. J Hepatol 1986;2: 165-173.
2. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 1998;5:187-192.
3. Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. Lancet 2001;357:1069-1075.
4. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P,

- Aube C, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616.
5. Eriksson S, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Smedsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Exp Cell Res* 1983;144:223-228.
6. Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin Biochem* 1991;24:219-239.
7. Levesque H, Chassagne P, Frebourg T, Delpech B. Hyaluronic acid. Usefulness and perspectives of its serum assay. *Presse Med* 1990;19:1001-1005.
8. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-311.
9. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409-1417.
10. Afify A, Lynne LC, Howell L. Correlation of cytologic examination with ELISA assays for hyaluronan and soluble CD44v6 levels in evaluation of effusions. *Diagn Cytopathol* 2007;35:105-110.
11. Park DH, Baik SK, Choi YH, Kim MY, Rhim DW, Kim JW, et al. Inhibitory effect of angiotensin blockade on hepatic fibrosis in common bile duct-ligated rats. *Korean J Hepatol* 2007;13:61-69.
12. Baik SK, Jo HS, Suk KT, Kim JM, Lee BJ, Choi YJ, et al. Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on the contraction and growth of hepatic stellate cells. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:134-141.
13. Lee KI, Kong ID, Baik SK, Kim HS, Lee DK, Kwon SO, et al. Characteristics of potassium and calcium currents of hepatic stellate cells (ito) in rat. *Yonsei Med J* 2004;45:649-660.
14. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160-1174.
15. Engstrom-Laurent A, Loof L, Nyberg A, Schroder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 1985;5:638-642.
16. Gressner AM, Haarmann R. Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:222-229.
17. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:945-951.