

## A Study of *Hox* Gene Expression Profile During Murine Liver Regeneration

Boyeon Youn, Byung-Gyu Kim and Myoung Hee Kim<sup>†</sup>

Department of Anatomy, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine,  
C.P.O. Box 8044, Seoul 120-752, Korea

Liver is an organ having an ability to regenerate by itself when it is damaged or removed. Since the research on the liver regeneration so far was regarding on the cellular multiplications not the formation of the shape, we intended to analyze the expression pattern of *Hox* genes during liver regeneration. RNA samples isolated from liver at the time of partial hepatectomy, 4 hours as well as 3 days later following regeneration were used to perform RT-PCR with *Hox*-specific degenerate primers. The PCR products were cloned, sequenced and analyzed through BLAST program. Genes belonging to the *AbdB* type *Hox* genes (paralogous groups IX-XIII) expressed predominantly during regeneration, while the other group (I-VII), especially *Hoxa1* and *b1* seemed to be expressed continuously before and after regeneration. These data altogether imply that paralogous group IX and X genes including *Hoxa10* and *d10* seemed to be regeneration specific genes of liver.

**Key Words:** *Hox* gene, *Hox* expression pattern, Liver regeneration, RT-PCR

### 서 론

간은 손상을 입거나 제거될 경우 스스로 재생하는 능력이 있다고 알려져 있다<sup>1,19,25</sup>. 과학적인 간 재생에 대한 실험 모델로는 1931년 Higgins와 Anderson이 흰쥐 간의 2/3 정도를 부분 절제한 후 재생 과정을 확인한 보고가 있다<sup>15</sup>. 생쥐에서 간 조직은 체중의 4~5% 무게를 차지하고 있으며, 정중엽, 우엽, 좌엽 그리고 작은 미상엽의 네 엽으로 구성되어 있다<sup>21</sup>. 간은 질환이 있어도 대부분의 경우 간 기능 검사를 하면 심한 변화를 볼 수 없는데, 이것은 손상되지 않은 건강한 부분이 증식되면서 간 기능을 정상으로 유지하려는 작용을 하기 때문인 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>. 이런 간 질환의 특징인 간 손상 시 재생 능력에 대한 연구가 필요하다.

재생 능력은 체제가 간단하고, 계통적으로 진화의 정도가 낮은 것일수록 강하다. 재생은 크게 2가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 병리적인 재생으로 유발적인 원인에 의하여 생긴 손상에 대한 보상이며, 둘째는 생리적 재생으로, 사람의 이가 나이에 따라 유치에서 영구치로 바뀌는 것 등이 있다. 포유류에서의 병리적인 재생은 간에서만 일어난다<sup>3,11</sup>. 설치류의

경우 간의 4엽 중 2엽을 절제하면 나머지 2엽의 간세포들이 빠르게 증식되어 절제 전 간의 무게만큼 성장하며, 그 모양도 유지됨을 관찰할 수 있다<sup>21</sup>. 간 재생은 매우 역동적으로 일어나며, 간 부분 절제 시 간세포, 담상피세포, 내피세포, 쿠퍼(Kupffer) 세포 및 이토(Ito) 세포의 증식을 포함하여 간을 구성하는 모든 종류의 세포 증식을 유발한다<sup>19</sup>. 간 재생은 2 단계로 이루어지는 것으로 알려져 있다<sup>7,8,18</sup>. 첫 번째 단계는 분열이 멈춘 간세포가 세포 주기 과정을 시작하는 단계로 tumor necrosis factor (TNF)와 interleukin-6 (IL-6)에 의해 조절된다. 이때 간세포들은 세포 주기의 시작을 위한 competence를 가지게 된다. 두 번째 단계는 HGF와 TGF- $\alpha$ 에 의해 세포 주기 과정이 진행되어 DNA합성이 이루어지는 단계이다. 시작 단계는 부분 절제 후 4시간째에 처음 시작된다. 70개의 immediate early gene<sup>13,17</sup> (c-fos, c-jun, c-myc<sup>20</sup>) 등이 관여하며 적어도 4개의 전사조절인자 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3), AP-1 (activation protein-1), 그리고 C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ )가 활성화되어 간 재생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>4,10,12,14,24</sup>.

재생이란 단순한 세포 증식을 의미하는 것이 아니라 손상된 부분이 손상 전과 같은 형태를 형성하며 회복되는 것으로써 성체에서 일어나는 또 다른 형태의 발생이라고도 볼 수 있다<sup>27</sup>. *Hox* 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중 하나로 척추 동물과 무척추 동물에 있어서 초기 배 발생 시 특정 시기 및 특정 위치에서 발현하며, 몸통 전·후 축의 형태를 형성

\*논문 접수: 2003년 1월 10일

수정재접수: 2003년 2월 8일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 김명희, (우) 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 해부학교실  
Tel: 02-361-5173, Fax: 82-2-365-0700  
e-mail: mhkim1@yumc.yonsei.ac.kr

하는데 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>5,16,22</sup>). 생쥐에서는 현재 39개의 *Hox* 유전자가 밝혀져 있는데, 각각의 유전자들은 서로 다른 염색체 상에 위치해 있는 4개의 locus (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, 그리고 *HoxD*)에 집단적으로 존재하며 13개의 paralogous group으로 나란히 정렬되어 있다<sup>9,26</sup>).

이제까지의 간 재생에 관한 연구들은 모두 세포 증식과 관련된 연구이고 형태 형성에 대한 연구는 미약하다. 따라서 본 논문에서는 재생 과정 중 개체의 패턴 형성을 조절하는 대표적인 유전자로 알려진 *Hox* 유전자들의 발현 패턴을 생쥐의 간 조직을 이용하여 분석하여 간 재생 과정에 관여하는 *Hox* 코드를 유추해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 간절제 시술

실험 동물로서는 연세대학교 의과대학 임상의학연구센터내 실험 동물 사육실에서 표준사료와 물로 3일 동안 기초 사육한 체중 21~23 g의 C57BL/6계통의 8주령 웅성 검정 쥐를 사용하였다. 간 절제는 Higgins와 Anderson<sup>15)</sup>의 방법으로 수행하였으며 시술 후 4시간, 3일 간격으로 실험 동물을 희생하여 간을 꺼내 실험에 사용하였다. 대조군으로는 아무 처지도 하지 않은 동종의 생쥐 간을 이용하였다. 또 절제 후 바로 실험에 사용하지 않을 경우의 간은 액체 질소에 보관하였다.

### 2. 총 RNA 분리

절제된 간 조직을 사용하여 guanidium isothiocyanate technique (GIT) 방법을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 조직을 분쇄용 튜브에 넣고 denaturing 용액 (4 M guanidium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% *N*-lauroylsarcosine, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol)을 1.4 ml 첨가한 후 pestle로 잘게 파쇄시켰다. 2 M NaOAc 140  $\mu$ l, chloroform-isoamylalcohol (49:1) 혼합물 588  $\mu$ l을 차례로 넣고 혼합한 후 얼음에 15분간 방치했다. 4°C 4,500 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 회수한 다음 동량의 chloroform-isoamylalcohol (49:1)을 처리하여 혼합하고, 4°C 4,500 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상층액과 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C freezer에서 2시간 반응시킨 다음 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 건조시켰다. 침전된 RNA는 DEPC 처리한 증류수에 녹이고 UV-spectrophotometer를 이용해서 정량하였다.

### 3. Degenerate primer 제작

취추 동물의 *Hox* 유전자 중 가장 잘 보존된 homeodomain (60 amino acid) 서열 중 가장 잘 보존된 서열을 5'쪽 (LELEKEF)과 3'쪽 (KIWFQNR)에서 취해서 이 아미노산들

을 코드하는 코돈을 모두 고려하여 디자인하였다. 이 때 생쥐 *Hox* 유전자에서의 각 아미노산들이 차지하는 비율을 %로 계산하고 (⊗), murine codon usage에서 각 코돈의 빈도 값을 찾았다 (⊙).  $\text{⊗} \times \text{⊙} = \text{Ⓣ}$ 라는 공식을 적용하여 각 코돈에 대한 ⊓값을 계산한다. 이렇게 계산된 ⊓값 중 가장 높은 확률을 보인 염기를 선택하여 primer로 제작하였다. Degenerate primer A, 5'-CTg/c GAg/a CTg/c GAg/a AAg/a GAg/a TTc/t-3'와 primer B, 5'-Cg/tg/a TTc/t TGg/a AAC CAg/a ATc/t TT-3'는 Bioneer (대전, 한국)에서 제작, 구입하였다. 각각의 primer는 forward primer 128조합, reverse primer 64조합이 가능한 degenerate primer로서 이 primer는 약 110 bp를 증폭하였다.

### 4. RT-PCR (reverse transcription-PCR)

First strand cDNA는 RNA image™kit (GenHunter, Nashville, TN)를 이용하여 다음과 같이 제조하였다. PCR 튜브에 RNA 17  $\mu$ g, anchoring primer (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C, H-T<sub>11</sub>G), 5x reverse transcriptase (RT) 2  $\mu$ M, buffer 4  $\mu$ l, dNTP (250  $\mu$ M) 1.6  $\mu$ l를 첨가하고 RNase free dH<sub>2</sub>O로 최종 용적이 19  $\mu$ l로 되도록 한 후 65°C에서 5분, 37°C에서 5분간 반응시킨 다음, 200 units의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV reverse transcriptase, Promega Co., Madison, WI, USA)를 첨가하고 37°C에서 55분 동안 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 하고, primer A와 primer B를 이용하여 94°C에서 1분, 44°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 45회 반복하여 PCR 반응을 진행 후 agarose gel에서 확인하였다.

### 5. 클로닝, DNA 염기서열 결정 및 분석

PCR product를 agarose gel에서 elution하여 pT7Blue vector (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)와 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, California)를 사용하여 클로닝하였다. agarose gel을 이용하여 농도를 유추한 후 염기서열 결정은 Macrogen (서울, 한국)에 의뢰하여 수행하였으며 NCBI의 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>)을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 재생 과정 중 간의 해부학적 변화

간 재생 과정 중 일차로 간의 해부학적 변화를 관찰하기 위하여 본 연구에서는 재료 및 방법에서와 같이 정중엽, 우엽, 좌엽, 미상엽으로 이루어진 간의 4엽 중 우엽과 좌엽의 일부를 부분 절제한 후 봉합하고, 각각 4시간, 3일 그리고 3주 경과 후 간 조직을 적출하여 형태학적 그리고 정량적 변화를 관찰하였다.

간 절제는 전체 무게 약 1.118 g 중 평균 0.363 g의 간을 제거하였다. 부분 절제 후 재생 4시간째의 전체 간 무게는 0.729 g, 재생 3일째에는 0.812 g이었다. 절제 직후의 간 무게인 0.755 g (대조군에서 전체 간 무게 1.118 g-제거된 간 무게 0.363 g)에 비해 재생 4시간째에는 오히려 무게가 감소하였다. 이것은 4시간이 수술 후 회복하기에는 너무 짧은 시간이었으며 또한 절제 시 혈액의 손실 등으로 인한 결과로 유추

된다. 그러나 짧은 시간이라도 정상적인 간 기능 유지를 위해 정중엽과 미상엽의 크기가 약간씩 증가 (각각 8.0%, 1.6%씩 증가)한 것을 관찰할 수 있었으며, 또 재생 3일에는 간 무게가 0.812 g으로 절제 직후의 무게 (0.755 g)에 비해 7.5% 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 정중엽과 미상엽은 각각 36% 그리고 25%가 증가한 것을 관찰하였다 (Table 1). 형태적으로는 그러나 재생 3일까지는 그 크기의 변화를

Table 1. Liver weight during regeneration

| Regeneration time | Number of mouse | Body weight (g) | Right central lobe* | Left lateral lobe* | Median lobe | Caudal lobe | Total liver weight |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------------|
| 0-hour            | 1               | 23.0            | 0.293               | 0.342              | 0.038       | 0.281       |                    |
|                   | 2               | 23.0            | 0.379               | 0.355              | 0.084       | 0.297       |                    |
|                   | 3               | 23.0            | 0.376               | 0.403              | 0.086       | 0.284       |                    |
|                   | 4               | 23.0            | 0.382               | 0.428              | 0.088       | 0.354       |                    |
|                   | Average         | 23.0            | 0.358               | 0.382              | 0.074       | 0.304       | 1.118              |
| 4-hour            | 5               | 22.9            | 0.098               | 0.242              | 0.077       | 0.294       |                    |
|                   | 6               | 22.8            | 0.138               | 0.211              | 0.080       | 0.313       |                    |
|                   | 7               | 22.8            | 0.117               | 0.212              | 0.083       | 0.319       |                    |
|                   | Average         | 22.8            | 0.118               | 0.222              | 0.080       | 0.309       | 0.729              |
| 3-day             | 8               | 21.6            | 0.043               | 0.215              | 0.121       | 0.426       |                    |
|                   | 9               | 21.3            | 0.106               | 0.267              | 0.106       | 0.361       |                    |
|                   | 10              | 20.8            | 0.124               | 0.236              | 0.076       | 0.357       |                    |
|                   | Average         | 21.2            | 0.091               | 0.239              | 0.101       | 0.381       | 0.812              |

\*The lobe weight left after partial hepatectomy (average 0.363 g of right central and left lateral lobes removed) followed by regeneration for 4 hour or 3 day

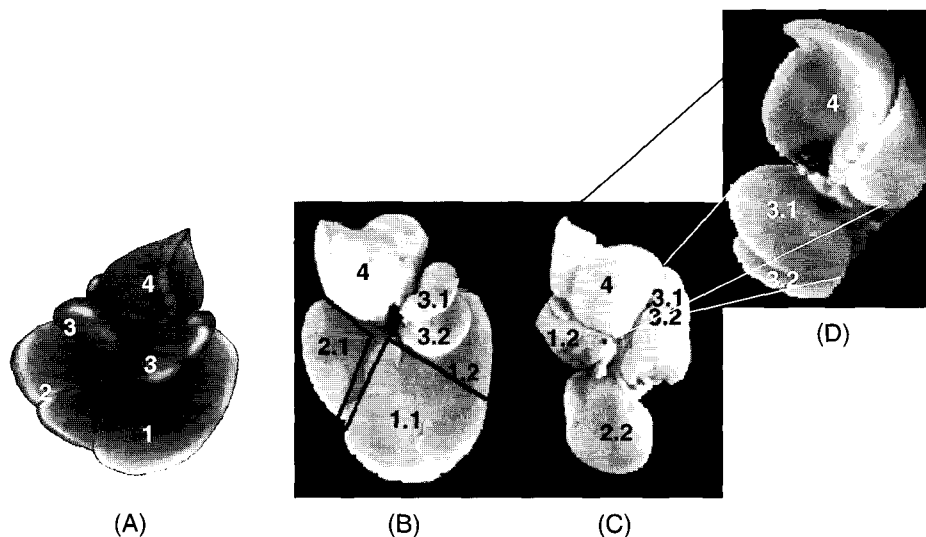


Fig. 1. The morphology during murine liver regeneration. Partial hepatectomy was performed by resecting part of right central (1.1) and left lateral (2.1) lobes. Schematic representation of liver was drawn in A. Normal (B), partially hepatectomized (C), and 3-week regenerated liver (D) are shown. The number represent the right central (1), left lateral (2), median (3), and caudal (4) lobes, in which Right central, Left lateral, Median lobes were subdivided as 1.1/1.2, 2.1/2.2, and 3.1/3.2, respectively.

|                |                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Antp</i>    | L E L E K E F H F N R Y L T R R R R I E L A H S L N L T E R Q V K I W F Q N R   |
| <i>mHoxa10</i> | - - - - - - - L - - M - - - - E - - L - I S R - V H - - D - - - - - - -         |
| <i>mHoxc10</i> | - - - - - - - L - - M - - - - E - - L - I S K T I - - - D - - - - - - -         |
| <i>mHoxd10</i> | - - - - - - - L - - M - - - - E - - L - I S K - V - - - D - - - - - - -         |
| <i>mHoxa1</i>  | T - - - - - - - - - - K - - - - A - - V - I - A - - Q - N - T - - - - - - -     |
| <i>mHoxd12</i> | A - - - N - - - L L - E F I N - Q K - K - - S N R - - - S D Q - - - - - - - - - |
| <i>mHoxc11</i> | R - - - R - - - F - - V - I N K E K - L Q - S R M - N - - D - - - - - - - - -   |
| <i>mHoxA11</i> | R - - - R - - - F - S V - I N K E K - L Q - S R M - - - - D - - - - - - - - -   |
| <i>mHoxd11</i> | R - - - R - - - F - - V - I N K E K - L Q - S R M - - - - D - - - - - - - - -   |
| <i>mHoxc8</i>  | T - - - - - - - L - - P - - - - K - - - - V S - A - G - - - - - - - - - - -     |

primer A: 5'CTg/c GAg/a CTg/c GAg/a AAg/a GAg/a TTc/t3'

primer B: 3'TTc/t TAG/a ACC AAg/a GTc/t TTg/a g/tC5'

Fig. 2. Primers used for PCR amplification. Murine homeodomain sequences in one letter code are aligned along with that of *Antp* which is a well known *Hox* prototype gene of *Drosophila*. Same amino acids are marked as -. Two highly conserved regions along the homeodomain region (shaded) were chosen and degenerate oligonucleotide primers were designed based upon the amino acid sequences: primer A (sense) and primer B (antisense) sequences were written below.

눈으로 확인하기는 어려웠으며 3주가 지난 간 조직에서는 거의 원래의 간 크기로 재생되었다 (Fig. 1).

## 2. 간 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 패턴

간 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 *Hox* specific한 degenerate primer를 고안 제작하였다. *Hox* 유전자 중 염기서열이 가장 잘 보존된 homeobox 서열 중 encode하는 아미노산 서열이 가장 잘 보존된 부위를 선택하여 각 아미노산과 그 아미노산에 대응하는 코돈이 나타나는 빈도와 생쥐의 코돈 usage를 고려하여 degenerate primer (degenerate primer A, 128종; degenerate primer B, 64종)를 고안 제작하였다 (Fig. 2). 간 손상 후 3~6시간 사이에 DNA 합성이 유도되기 시작하여 72시간 후면 종료된다는 보고가 있으므로 간 부분 절제 후 4시간제와 3일제, 그리고 대조군인 정상 (0시간) 간으로부터 총 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA로부터 degenerate primer를 사용하여 약 110 bp 짜리 DNA 절편을 증폭한 후 pT7Blue 또는 TOPO vector에 클로닝하였으며, 각 클론들은 *PvuII* 또는 *EcoRI*을 각각 처리하여 삽입된 것을 확인하였다 (Fig. 3).

총 125개의 클론 (재생 0시간, 38개; 4시간, 53개; 3일, 34개)을 분리하여 염기서열을 결정된 다음 BLAST program으로 기존의 알려진 class I *Hox* 유전자들과의 유사성을 비교 분석하였다 (Table 2). 이를 이용하여 각 재생 단계별 발현 빈도를

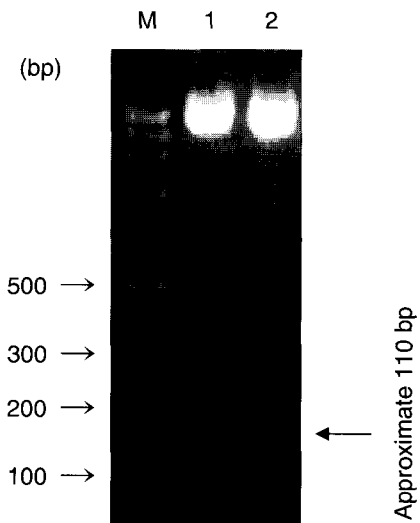


Fig. 3. Identification of PCR products by restriction enzyme. Clones ligated into a Topo vector are identified by restriction endonuclease, *EcoRI* (lanes 1 and 2). Expected size is approximate 110 bp. Molecular weight markers (M) are shown in the left lane.

조사해 본 결과 (Table 3) *Hoxb1*과 *d3*은 정상과 재생 간 모두에서 발현이 관찰되었으나 재생과 함께 차츰 그 발현이 증가하였으며, *Hoxa1*과 *b8*은 차츰 발현이 감소하였다. *Hoxa5*, *a7*, *b6*, 그리고 *d10*은 정상 간과 재생 초기 4시간제에서만 발현

Table 2. Results of nucleotide sequences

| Clone No. | Sequences (bp)                                                                                                                                                   | Homologous gene (%) |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 4-290     | <i>ccctt</i> <cggttctggaaccagattttCACCTGCGTTTCATTGAGCTCCAGGGTGGCGGCGATCTCCA<br>CCCTCCGGGCACGGCTCAGGTATTTGTTGAAATGaaactccttctcgagctc> <i>gagAagggcg</i><br>(113)  | <i>hoxb1</i> (97)   |
| 4-292     | cccttctc<gaactggagaagagatttTCTTCAATATGTATTTAACCAGGGACCGTCCGGTACGAGGT<br>GGCCCGTGTCTCAATCTCACTGAGCGGCAGGTGaaactccttctca>aatcgAagggcg<br>(106)                     | <i>hoxc9</i> (98)   |
| 4-293     | cccttctggagct<gagaaggagtttCACTTCAACCGCTACCTAACTCGGCGCCGGCGCATCGAGAT<br>CGCCAATGCTCTGTGCCTGACCGAGCGACAGATGaaactccttctcaaaaccg>Aagggcg<br>(107)                    | <i>hoxc6</i> (97)   |
| 4-294     | <i>ccctt</i> <cggttctggaaccagattttCACCTGCGTTTCATTGAGCTCCAGGGTGGCGGCGATCTCCA<br>CCCTCCGGGCACGGCTCAGGTATTTGTTGAAATgaaactccttctcgagctc> <i>gagAagggcg</i><br>(113)  | <i>hoxb1</i> (97)   |
| 4-295     | cccttctgggagctc <i>gag</i> <aaggagttcCATTTTAAACAGGTATCCGACCAGGCGCCGGCGATTGAA<br>ATAGCTCACACCCTGTGTCTGTCTGAGCGCCAGATCaagatttggttcagaa> <i>tcgAagggcg</i><br>(101) | <i>hoxd4</i> (93)   |
| 4-296     | ccctt<cggttctggaaccaaCTTGACCTGCCTTTCGGTGAGGTTGAGCAGCCGGGCCACCTCGT<br>ACCTGCGGTCCCCTGCGAGGTACATGTTAAACAGaaactccttctccag>ctc <i>gagAagggcg</i><br>(110)            | <i>hoxa9</i> (98)   |
| 4-297     | ccctt<ctggagctgaaaaggagtttCTATTTAATCCCTATCTGACTCGCAAGCGGAGGATCGAGG<br>TATCGCACGCGTGGGACTGACAGAGAGACAGGTCaagatctggttccaaaatcg>Aagggcg<br>(116)                    | <i>hoxb8</i> (96)   |
| 4-299     | cccttcggttt<tggaaccagatcttCACCTGGGTCTCATTGAGCTGTAGGGACGCGGCAATCTCCA<br>CCCTGCGCGCTCGTGTAAAGTACTTGTGAAAGTGaaactccttctccagctc> <i>gagAagggcg</i><br>(107)          | <i>hoxa1</i> (100)  |
| 4-300     | cccttcggttt<gaaccagatcttCACTTGTCTGTCCGTGAGGAGGACGCTACGGCTGATCTCTA<br>GGCGCCGCTCTCGAGTAAGGGACATGTTGAAATGaaactccttctcgagctc> <i>gagAagggcg</i><br>(104)            | <i>hoxa10</i> (97)  |
| 4-301     | cccttcggttt<tggaaccagatcttCACCTGGGTCTCATTGAGCTGTAGGGACGCGGCAATCTCCA<br>CCCTGCGCGCTCGTGTAAAGTACTTGTGAAAGTGaaactccttctccag> <i>ttccagAagggcg</i><br>(104)          | <i>hoxa1</i> (99)   |
| 4-302     | cccttctc<gagctggagaagagatttTATTCAACATGTACCTTACTCGAGAGCGGCGCCTAGAGAT<br>CAGCCGTAGCGTACACCTCACGGACAGACAAGTgaagatttggttcagaa> <i>cgcAagggcg</i><br>(109)            | <i>hoxa1</i> (95)   |

Primer and vector (italic) sequences were written as small letters. The number of amplified sequences analyzed were marked as < > along with the size in bp. Homology searches were performed with those of amplified sequences using BLAST program. The capital A between the vector and the 3' primer sequence (primer B) was originated from the T vector (pT7Blue and TOPO vector)

하였으며, *Hoxa9*, *a10*, *b2*, *b5*, *d1*, 그리고 *d4*는 정상 간에서는 발현하지 않고 재생 4시간 그리고 3일째에서만 발현이 관찰되었다. *Hoxb7*의 경우는 정상 간과 재생 3일째에서 발현하였고, *Hoxc6*는 정상과 재생 과정 중의 간 모두에서 발현하였으나 특히 재생 4일째에 과발현하는 것을 알 수 있었다. 또 몇몇 *Hox* 유전자들은 정상 간 (*Hoxa3*, *c8*, 그리고 *d8*), 재생 4시간 (*Hoxb4*, *c5*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*), 재생 3일 (*Hoxb3*, *b9*,

그리고 *d12*)째 에서만 특이적으로 발현하는 것이 관찰되었다 (Table 3).

## 고 찰

간은 신체에서 유일하게 재생이 가능한 기관이다. 재생은 손상 부위가 완전한 형태를 유지하면서 회복된다는 점에서

Table 3. Summary of *Hox* clones

| Paralogous group   | I        | II       | III      | IV       | V        | VI       | VII      | VIII     | IX       | X         | XI        | XII       | XIII      |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b><i>HoxA</i></b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> |          | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> |           | <b>13</b> |
| 0-hour             | 5        |          | 1        |          | 4        |          | 4        |          |          |           |           |           |           |
| 4-hour             | 5        |          |          |          | 4        |          | 1        |          | 1        | 7         |           |           |           |
| 3-day              | 1        |          |          |          |          |          |          |          | 3        | 8         |           |           |           |
| <b><i>HoxB</i></b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> |           |           |           | <b>13</b> |
| 0-hour             | 1        |          |          |          |          | 2        | 1        | 6        |          |           |           |           |           |
| 4-hour             | 4        | 2        |          | 1        | 2        | 6        |          | 2        |          |           |           |           |           |
| 3-day              | 4        | 1        | 1        |          | 2        |          | 3        | 1        | 2        |           |           |           |           |
| <b><i>HoxC</i></b> |          |          |          | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |          | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> |
| 0-hour             |          |          |          |          |          | 2        |          | 9        |          |           |           |           |           |
| 4-hour             |          |          |          |          | 1        | 4        |          |          | 2        | 2         |           |           |           |
| 3-day              |          |          |          |          |          | 1        |          |          |          |           |           |           |           |
| <b><i>HoxD</i></b> | <b>1</b> |          | <b>3</b> | <b>4</b> |          |          |          | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> |
| 0-hour             |          |          | 1        |          |          |          |          | 1        |          | 1         |           |           |           |
| 4-hour             | 1        |          | 1        | 2        |          |          |          |          | 2        | 3         |           |           |           |
| 3-day              | 2        |          | 2        | 2        |          |          |          |          |          |           |           |           | 1         |

The paralogous group of each *Hox* cluster (*HoxA*, *B*, *C*, and *D*) was written in bold (above), and the number of the identified clone was written below each paralog during normal (0 hour), 4-hour and 3-day after hepatectomy

성체에서 일어나는 또 다른 형태의 발생이라고 볼 수 있다. *Hox* 유전자는 발생 과정 중에서 시·공간적으로 특이적인 발현을 하여 개체의 형태를 만드는데 관여하는 유전자로 알려져 있으며, 초파리와 같은 하등 동물에서부터 사람, 생쥐를 포함하는 고등 포유류까지 잘 보존되어 있다. 현재 사람과 생쥐에서 39개의 *Hox* 유전자가 존재함이 밝혀졌으며 발생 과정 중 배아의 전·후 축을 따라 각 체 분절에 위치 정보를 준다고 보고되어 있다<sup>2,16,22</sup>. 본 연구에서는 간이 재생하는 과정 중 형태 형성에 관여한다고 알려진 *Hox* 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 간 재생을 연구하기 위한 간 손상 방법으로는 간에 독성 물질을 처리하는 방법과 부분 절제 방법이 있는데<sup>1,19,25</sup>, 여기서는 다른 간세포에는 영향을 주지 않으며 재생 과정의 관찰이 용이한 부분 절제 방법을 이용하였다.

부분 절제술을 수행하고 3주가 경과한 후 간은 원래의 크기로 재생되었다. 절제 후 재생 4시간째에는 절제 직후 남아 있던 간의 무게보다 오히려 감소하였는데 이것은 수술 후 회복하기에는 4시간이 너무 짧은 시간이며, 또한 절제할 때 혈액의 손실 등으로 인한 결과로 유추된다. 그러나 짧은 시간이라도 정중엽과 미상엽은 각각 8.0%, 1.6%씩 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 또 재생 3일째에는 절제 직후의 무게에 비해 총 간 무게가 7.5% 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 정중엽과 미상엽은 36%와 25%씩 증가한 것을 볼 수

있었다. 이상의 결과는 이전의 보고들과<sup>1,15,19,23,25</sup> 유사한 것으로, 절제된 부분의 엽들이 재생 과정에 증식하는 것이 아니라 절제되지 않은 엽들의 크기가 증가하여 재생되는 것임을 확인할 수 있었다. 흥미 있는 점은 재생 과정 중 절제하지 않은 엽의 크기가 증가할 때 그 3차원적 형태가 그대로 유지되면서 재생된다는 것이다.

형태의 유지를 위해서는 *Hox* 유전자들의 발현이 관여할 것으로 유추되어 재생 단계별로 *Hox* 유전자의 발현 양상을 분석하였으며, 그 결과 paralogous group IX와 X에 속하는 (*Hoxa9*, *a10*, *b9*, *c9*, *c10*, 그리고 *d9*) 유전자들이 재생 과정 중에만 특이적으로 발현하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 *Hoxa10*의 경우 정상 간에서는 발현하지 않았으나, 재생 4시간과 3일째에서 각각 7개와 8개의 클론을 얻는 등 매우 높은 비율로 발현하고 있음을 알 수 있었다. 반면에 paralogous group VIII에 속하는 *Hoxc8*의 경우는 정상 간에서 9개의 클론을 분리하였으며, *d8*과 더불어 재생 과정 중의 간 조직에서는 클론을 관찰할 수 없었다. 그리고 같은 paralogous group에 속하는 *b8*도 재생 중인 간보다는 정상 간에서 매우 높은 비율로 발현하였으며, 이들 외에도 *Hoxa1 b1*, *d3*, *c6*, *b8* 등은 재생 전·후에 발현을 지속하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 paralogous group IX, X에 속하는 *Hox* 유전자들은 재생 과정에 특이적인 유전자일 가능성을 강력히 시사한다. 특

히 paralogous group IX-XIII까지는 초파리의 *AbdB* 유전자 그룹에 속하는 유전자로 원래 하나의 유전자가 고등 척추 동물로 진화함과 동시에 5개의 paralogous (IX, X, XI, XII, 그리고 XIII) 유전자들로 분화되었다고 알려져 있다. 이 5그룹의 유전자들이 다른 7개의 그룹 (paralogous group I-VII)에 속하는 *Hox* 유전자들과는 레티노산에 대한 민감성이 다르며, 임신 중 레티노산에 노출되었을 경우 그 발현의 양상이 서로 반대로 증감된다고 알려져 있다. 또 이들은 발생 과정 중 paralogous group XIII부터 순차적으로 차례로 발현된다고 보고되어 있으므로 아마도 paralogous group IX-XIII이 발생의 시작과도 유사한 재생 단계에 특이적으로 발현하는 것이 아닌가 생각된다. 그러나 지금까지의 연구는 PCR과 클로닝을 통해 발현을 분석한 것으로서 이것이 세포내의 RNA양을 정확하게 정량적으로 나타내 주는 것이라고 보기는 어려우므로 추후 Northern blotting 등을 이용한 확인이 이루어져야 할 것으로 생각되나 본 연구 결과는 향후 간 뿐만 아니라 여러 다른 장기의 재생 연구를 위한 기초 자료로도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA and Michalopoulos GK (1996): Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol*, **132**: 1133-1149.
- 2) Calleja M, Renaud O, Usui K, Pistillo D, Morata G and Simpson P (2002): How to pattern an epithelium: Lessons from achaete-scute regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene*, **292**: 1-12.
- 3) Carlson MR, Komine Y, Bryant SV and Gardiner DM (2001): Expression of *Hoxb13* and *Hoxc10* in developing and regenerating Axolotl limbs and tails. *Dev Biol*, **229**: 396-406.
- 4) Cressman DE, Diamond RH and Taub R (1995): Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*, **21**: 1443-1449.
- 5) Dubouls D (1994): Guidebook to the Homeobox Genes. New York: Oxford University Press. Inc.
- 6) Duncan SA (2000): Transcriptional regulation of liver development. *Dev Dyn*, **219**: 131-142.
- 7) Fausto N (2000): Liver regeneration. *J Hepatol*, **32 (Suppl 1)**: 19-31.
- 8) Fausto N, Laird AD and Webber EM (1995): Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*, **9**: 1527-1536.
- 9) Favier B and Dolle P (1997): Developmental functions of mammalian *Hox* genes. *Mol Hum Reprod*, **3**: 115-131.
- 10) FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR and Fausto N (1995): Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ*, **6**: 417-427.
- 11) Gardiner DM, Carlson MR and Roy S (1999): Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, **10**: 385-393.
- 12) Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V and Taub R (1998): CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest*, **102**: 996-1007.
- 13) Haber BA, Mohn KL, Diamond RH and Taub R (1993): Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest*, **91**: 1319-1326.
- 14) Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F and Graeve L (1998): Interleukin -6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, **334**: 297-314.
- 15) Higgins GM and Anderson RM (1931): Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, **12**: 186-202.
- 16) Kim MH and Kessel M (1993): Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Info*, **5**: 301-308.
- 17) Kountouras J, Boura P and Lygidakis NJ (2000): New concepts of molecular biology for colon carcinogenesis. *Hepato-gastroenterology*, **47**: 1291-1297.
- 18) Kountouras J, Boura P and Lygidakis NJ (2001): Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, **48**: 556-562.
- 19) Mizuta I, Ogasawara N, Yoshikawa H and Sakoyama Y (1996): Identification of homeobox genes expressed during the process of rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Genet*, **34**: 1-15.
- 20) Sargent LM, Sanderson ND and Thorgeirsson SS (1996): Ploidy and karyotypic alterations associated with early events in the development of hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring c-myc and transforming growth factor alpha transgenes. *Cancer Res*, **56**: 2137-2142.
- 21) Sell S (2001): The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen*, **9**:

467-482.

- 22) Sharkey M, Graba Y and Scott MP (1997): *Hox* genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends Genet*, **13**: 145-151.
  - 23) Taub R (1996): Liver regeneration in health and disease. *Clin Lab Med*, **16**: 341-360.
  - 24) Tewari M, Dobrzanski P, Mohn KL, Cressman DE, Hsu JC, Bravo R and Taub R (1992): Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I kappa B that inhibits NF- $\kappa$ B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel kappa B site-binding complex. *Mol Cell Biol*, **12**: 2898-2908.
  - 25) Thorgeirsson SS (1990): Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J*, **10**: 1249-1256.
  - 26) Veraksa A, Del Campo M and McGinnis W (2000): Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab*, **69**: 85-100.
  - 27) Zorn AM and Mason J (2001): Gene expression in the embryonic *Xenopus* liver. *Mech Dev*, **103**: 153-157.
-