

## 실험적 간경화 동물모델 비교

박은전 · 김재백 · 손동환 · 고건일<sup>†</sup>

원광대학교 약학대학, 의약자원연구센터

(Received March 14, 1997)

### Experimental Hepatic Cirrhosis in Rats

Eun-Jeon Park, Jaebaek Kim, Dong Hwan Sohn and Geonil Ko<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Cheonbuk 570-749 Korea

**Abstract**—Hepatic cirrhosis is a common response to chronic liver injury from many causes and is one of the most common cause of all deaths. This study was carried out to compare experimental hepatic cirrhosis in rats to understand this disease and to apply for the pharmacokinetics in disease state. Following three kinds of experimental models were induced: 1) Bile duct ligation/scission (BDL/S), 2) N, N-dimethylnitrosamine(DMN), 3) Carbon tetrachloride. The hepatic cirrhosis was characterized by examining the liver/body weight ratio, serum biochemical values, hydroxyproline content in liver and histopathological lesions in cirrhotic rat liver. The results are as follows: (1) In BDL/S, the liver was enlarged to 250% of normal liver. In contrast the liver was shrunked to 48% and 78% of the normal liver in DMN and carbon tetrachloride, respectively. (2) In carbon tetrachloride and BDL/S, the serum ALT, AST, ALP and total bilirubin levels were significantly increased to 200~300% of normal level, while ALT and total bilirubin levels were significantly increased in DMN group. (3) Hydroxyproline content in cirrhotic rat liver was significantly 200~500% higher than that of normal liver. (4) Nodular formation with fibrosis was observed in BDL/S, DMN, carbon tetrachloride induced cirrhotic rat liver.

**Keywords** □ Experimental liver cirrhosis, Bile duct ligation and scission, Dimethylnitrosamine, Carbon tetrachloride.

최근에 복지부에서 발표된 한국인의 건강수준에서 간암에 의한 사망률은 10만명당 23.4명으로 세계 1위이고 만성 간 질환의 경우도 28.8명으로 3번째로 조사되었다. 또한 1997년도 3월 6일 통계청에서 95년 사망원인 통계결과 우리나라 40대의 경우 인구 10만명당 56.1명이 간 질환으로 가장 높은 사망원인으로 집계되었다고 발표하였다. 국내에서는 간 질환 중에서 가장 높은 사망률의 원인은 바이러스성 간염이지만 서구에서는 바이러스성 간염보다는 간경화에 의한 사망이 5~10배 정도로 높게 보고되어 있다.

간은 완충능력(reserve capacity)이 큰 기관으로 질환의 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 잘 나타나지

않고 상당히 악화되어서야 발견된다. 간경변증(hepatic cirrhosis)은 각종 간 질환이 만성적으로 진행할 경우 공통적으로 이르는 마지막 단계이다.<sup>3-5)</sup> 그 원인으로서는 알코올, 약물, 화학약품, 바이러스성 간염, 담도 질환, hematochromatosis와 같은 대사성 질환, 자가면역성 질환 등이 있으나, 원인을 알 수 없는 경우도 많다.<sup>6)</sup> 간경변증의 경우 간혈류량 저하, 간내 혈류의 단축로 형성(intrahepatic shunt), 대사효소의 기능 저하, 혈중 단백질의 질적 및 양적 변화 및 담즙 유량의 변화 등의 전반적인 간 기능이 저하된다.<sup>7)</sup>

그동안 간질환의 기전 및 치료제 개발 등을 위한 실험에서 동물모델이 사용되고 있다.<sup>8)</sup> 본 연구에서는 사업화탄소, N, N-dimethylnitrosamine투여 또는 담도결찰 수술에 의한 실험적 간경화를 흰쥐에서 유도하여 간경화의 진행정도를 간조직중 결합조직의 증가량, 병리

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0653-850-6820 (팩스) 0653-54-7311

조직조건 및 간 손상의 지표인 혈청 생화학적 항목 등을 모델간에 비교하고자 다음과 같이 실험을 진행하였다.

**실험방법**

**실험동물** - 실험동물로는 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 삼육실험동물(경기도 오산)에서 공급받아 각 실험군으로 분류하고 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 자연채광하에서 흰쥐용 케이지에 3~4마리씩 넣어 사용하였으며 온도는 20~24°C, 상대습도 50~60%를 유지하였고 시판사료(신촌실험동물사료, 조단백질 22.5%이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.0%이하, 조회분 9.0%이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상)와 물을 자유로이 공급하였다. 실험 동물군은 다음과 같이 6군으로 분류하였다: 담도결찰군, sham군, N, N-Dimethylnitrosamine(DMN) 투여군, N, N-Dimethylnitrosamine(DMN) 대조군, 사염화탄소 투여군, 사염화탄소 대조군.

**담도결찰(Bile duct ligation/scission; BDL/S)에 의한 간경화 유도** - 200~250 g의 수컷 흰쥐를 ether로 전 마취하고 ketamine과 xylazine으로 마취하 회복하여 원위담도와 근위담도를 봉합사로 묶고 그 사이를 자른 후 생리식염수를 약 2 ml 주입하고 복부를 봉합하였다. 4주간 면밀히 관찰하면서 간경화를 유도하였다. Sham군은 마취하 회복하여 생리식염수를 2 ml 가하고 봉합한 다음 4주후에 실험에 사용하였다.

**DMN 투여에 의한 간경화 유도** - Mancini 등의 방법에 따라 150~180 g의 수컷 흰쥐에 체중kg당 DMN 10 µl를 3주간 1주일에 3회씩 생리식염수에 희석하여 복강내주사 하였다.<sup>9)</sup> 최종 약물투여후 4일이 경과한 다음 실험에 사용하였다. 대조군에는 동량의 생리식염수를 위와 같은 방법으로 복강내 주사하여 3주후에 실험에 사용하였다.

**사염화탄소 투여에 의한 간경화 유도** - 60~90 g의 수컷 흰쥐에 10주동안 사염화탄소를 체중kg당 1 ml의 용량으로 corn oil에 희석하여 1주에 2회 경구투여하였다. 최종 약물투여후 4일이 경과한 다음 실험에 사용하였다. 대조군에는 corn oil을 동량 경구투여하여 사용하였다.

**간경화 유도 후 시료채취** - 각 실험군의 흰쥐를 부검 전에 체중을 측정하고 마취하 회복하여 심장천자로 채혈하였다. 채혈후 즉시 간을 적출하여 중량을 측정한다

음 좌엽 일부를 취하여 10% 중성 formalin에 보관하고, 일부는 hydroxyproline측정을 위해 -20°C에 보관하였다. 혈액은 상온에서 1시간 이상 방치하여 응고시킨 뒤 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 혈청을 취해 -20°C에 보관하였다. 실험기간중 각 실험군의 흰 쥐는 1주 간격으로 체중을 측정하였으며 부검시 측정간 간의 중량을 체중에 대한 비율로 계산하였다.

**혈청 생화학적 변화** - 실험군에서 채취한 혈청중 aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), albumin, total bilirubin치를 kit를 사용하여 clinical chemical analyzer(Gilford 400E)로 흡광도법을 이용하여 측정하였다.

**간조직중 hydroxyproline양 측정** - 간조직중 hydroxyproline양은 Jamall 등의 방법에 따라 측정하였다.<sup>10)</sup> 즉 6N HCl의 5% 간 homogenate를 110°C에서 가수분해시킨 다음 chloramine-T로 산화시키고 Ehrlich's reagent 용액으로 발색시켜 558 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**광학현미경적 소견** - 수술 4주후 간 조직 일부를 채취하여 10%중성 포르말린 용액에 넣어 고정한 다음 hematoxylin-eosin염색을 하여 광학현미경으로 병리 조직학적인 소견을 관찰하였다.

**자료의 통계처리** - Student's t test를 이용하여 유의성을 비교하였으며 결과는 mean±S.D.로 나타내었다.

**실험결과**

**간경화 유도기간중 흰쥐에서 체중의 변화** - 실험기간중 흰쥐의 체중은 매주 측정된 결과 담도결찰과 sham군에서는 수술후 체중이 감소하였다가 2주째부터는 점차 증가하였고 DMN군은 처치후 계속적으로 체중이 감소하였으며 사염화탄소군의 경우 처치 후 약 6주째부터 체중감소를 보였으나 각군의 정상대조군은 지속적인 체중증가 추세를 보였다(data not shown). Table I에서 나타난 바와 같이 간경화 유도후 부검전 측정된 체중을 각각의 정상대조군과 비교시 담도결찰군은 sham군과 유사하나 DMN 및 사염화탄소군은 각각 정상대조군의 71% 와 77%로 감소하였다. DMN 및 사염화탄소군의 체중감소는 간경화의 진행에 따른 것으로 사료된다.

**Table I**— Final body weight, liver weight/body weight ratio and lethality in the cirrhotic rats induced by bile duct ligation & scission operation, dimethylnitrosamine or carbon tetrachloride administration

Group	Duration (wk)	Final body weight (g)	Liver/body weight ratio (%)	Lethality (%)
Sham	4	255±18	3.6±0.2	0/6 (0%)
BDL/S	4	260±21	8.1±0.4	3/20 (15%)
DMN-Ctrl	3	247±21	3.5±0.4	0/4 (0%)
DMN 3	3	175±22	2.5±0.4	8/20 (40%)
CCl <sub>4</sub> -Ctrl	10	342±42	3.5±0.5	0/4 (0%)
CCl <sub>4</sub>	10	265±29	2.6±0.3	12/20 (60%)

Each data represents the mean±S.D.  
 BDL/S : Bile duct ligation and scission  
 DMN : N, N-dimethylnitrosamine  
 DMN-Ctrl : Normal control group to DMN-treated cirrhotic rats.  
 CCl<sub>4</sub>-Ctrl : Normal control group to CCl<sub>4</sub>-treated cirrhotic rats.

**간경화 유도후 간 중량의 상대비** - 간 중량의 상대비는 흰쥐 체중당 간 중량의 백분율로 나타내었다 (Table I). 간 중량 상대비에 있어서 담도결찰군은 약 225%정도로 Sham군에 비해 유의성 있게 증가하였다. DMN군의 경우 대조군에 비해 29%정도 유의성 있게 감소하여 현저한 간의 위축을 보였고 사염화탄소군도 약 26%정도의 유의성 있는 감소를 보여 간 위축을 나타내었다(p<0.05).

**실험기간중 흰쥐의 치사율** - 담도결찰군의 경우 4주

간의 치사율은 약 15%이었으며 DMN군은 3주간의 치사율이 40%이었고 사염화탄소군은 10주동안 약 60%의 치사율을 보였다(Table I). 담도결찰군의 경우 대부분 2주 이내에 사망한 것으로 이는 부검 결과 담도결찰 수술의 실패로 인해 담즙이 복강내 유출됨으로써 사망한 것이었으며 담도결찰시 3주이내에는 간 섬유화가 유발되지 않기 때문에 위 담도결찰군의 사망은 간경화의 심화에 의한 것은 아니었다. DMN군의 경우 2주째부터, 사염화탄소군의 경우에는 6주부터 사망하기 시작하였으며 이는 투여된 약물의 독성 내지는 간경화의 심화에 의한 것이라 사료된다.

**혈청 생화학적 변화** - 혈청 생화학적 변화에 있어서 세가지 모델 모두에서 일반적으로 간 기능 상태를 나타내는 ALT, AST, ALP 및 total-bilirubin 등의 항목에 있어서 모든 간경화 유도군에서 현저히 증가하였고 albumin치는 감소하는 경향을 보였다(Table II). 담도결찰군의 경우 ALT, AST, ALP치가 sham군에 비해 각각 600%, 676%, 319% 증가하였으며 total bilirubin치도 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다 (Table II). DMN군의 경우 ALT, AST, ALP치가 정상군에 비해 각각 296%, 188%, 506% 증가하였으며 total-bilirubin치는 정상군보다 약간 증가하였다. 사염화탄소군의 경우 10주째에는 ALT, AST, ALP치가 정상군에 비해 각각 14741%, 1811%, 666%로 유의성 있게 증가하였으며 total-bilirubin치는 유의성 있게 증가하였고 albumin치는 유의성 있게 감소하였다.

**Table II**— Serum biochemical values of cirrhotic rats induced by bile duct ligation & scission operation, N,N-dimethylnitrosamine or carbon tetrachloride administration

Group	n	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	total-Bilirubin (mg/dL)	Albumin (g/dL)
Sham	6	21±6	71±6	275±35	<0.2	4±0
BDL/S	8	126±54**	482±184*	876±289**	4±3**	3±0
DMN-Ctrl	4	25±4	89±8	285±43	<0.2	4±1
DMN	8	74±194**	167±45*	1442±129**	0.80±0.14**	4±1
CCl <sub>4</sub> -Ctrl	4	31±7	91±7	276±52	<0.2	6±2
CCl <sub>4</sub>	8	457±178**	1648±121**	1838±764**	3±2**	3±1*

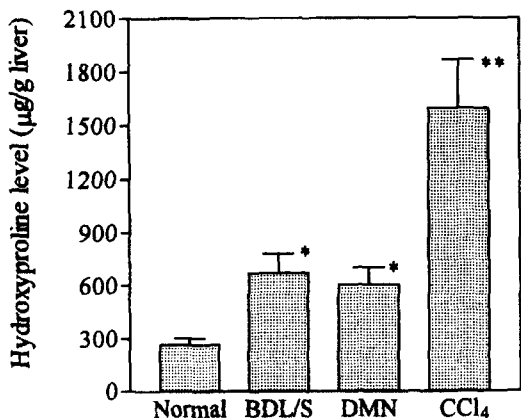
Each data represents the mean±S.D.  
 The significance of differences as compared with the control group \*p<0.05, \*\*p<0.01.  
 ALT : Alanine transaminase  
 AST : Aspartate transaminase  
 ALP : Alkaline phosphatase  
 BDL/S : Bile duct ligation and scission  
 DMN : N, N-dimethylnitrosamine  
 DMN-Ctrl : Normal control group to DMN-treated cirrhotic rats.  
 CCl<sub>4</sub>-Ctrl : Normal control group to CCl<sub>4</sub>-treated cirrhotic rats.  
 n : number of animals

**간조직중 hydroxyproline의 함량** - 담도결찰군의 경우 sham군의 수치에 비해 255%정도 유의성 있게 증가하였다. DMN군의 경우 정상치에 비해 247%의 증가를 보였다. 사염화탄소의 경우 10주에는 580%의 증가로 유의성 있는 결과는 보였다. 위의 세가지 모델 모두 정상치에 비해 간조직중 결합조직의 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 1).

**간의 육안적 관찰 소견** - 담도결찰군은 부검시 간이 상당히 팽창 경화되어 있었으며 주위 장기와 심한 육착을 보였고 황갈색을 띠며 육안으로 미세결절을 확인할 수 있었다. 또한 비장이 상당히 팽대되어 있었으며 신장은 bilirubin 등의 침착으로 인해 암갈색을 띠었다. 담즙은 약 6-12 ml 정도 차 있었다. DMN군은 간이 상당히 위축 및 경화되어 있었으며 복수가 차 있는 경우도 있었으며 미세결절이 관찰되었다. 사염화탄소군에서는 복수가 빈번히 관찰되었으나 간의 위축은 개체에 따라 그 정도가 상당한 차이를 보였고, 담도결찰 및 DMN군 보다는 비교적 큰 결절을 관찰할 수 있었다.

**간 조직의 광학현미경적 소견** - 간 조직을 hematoxylin-eosin염색시 sham, DMN 대조군, 사염화탄소 대조군 모두 정상적인 간소엽의 구조를 보였다. 담도결찰군의 경우 고도의 담관증식과 함께 문맥부 중심

의 결합조직 증식에 의하여 정상 간소엽구조가 파괴되었고 중격과 결절이 형성되어 있었으며 문맥부 주위에 중등도의 염증세포의 침윤이 관찰되었다. DMN군에서는 문맥부와 소엽간 결합조직이 증식되어 비후되어 있었으며 sinusoid내로의 증식이 관찰되었고 문맥부와 문맥부, 문맥부와 중심정맥으로 결합조직이 증식되어 소엽구조가 파괴되어 간정맥을 찾기가 곤란하였다. 사염화탄소군에서도 중격과 결절의 형성이 관찰되었는데 특히 소엽사이 중격은 담도결찰군이나 DMN군 보다 훨씬 비후되어 있었으며 고도의 염증세포의 침윤과 부분적인 간 괴사의 소견을 보였으며 사염화탄소군 역시 소엽구조의 파괴로 간정맥을 구별하기가 힘들었다. 상기의 간경화 유발군 모두에서 중격과 결절이 형성되고 소엽구조가 파괴되어 간경변증의 소견을 보였다(Fig. 2).



**Fig. 1** - Hydroxyproline contents in liver(µg/g liver) of cirrhotic rats induced by bile duct ligation & scission operation, dimethylnitrosamine or carbon tetrachloride administration. Each data represents the mean±S.D. The significance of differences as compared with the control group \*p<0.01, \*\*p<0.001. Number of animals used in each group is same as shown in Table II.



**Fig. 2** - Microscopical appearances in cirrhotic rat liver induced by bile duct ligation & scission operation, N,N-dimethylnitrosamine or carbon tetrachloride administration (H & E, 100x).  
 A : Normal  
 B : Bile duct ligation and scission  
 C : N,N-Dimethylnitrosamine  
 D : Carbon tetrachloride

## 고 찰

간경변증(hepatic cirrhosis)은 결합조직의 과다증식된 섬유화상태와 함께 정상적인 간소엽구조가 파괴되어 소엽구조의 개축이 유발됨으로써 간 기능 저하와 더불어 portal hypertension, esophageal varices 등의 증상을 나타내는 질환으로서 초기에 발견되기 어렵고 사망률 또한 높은 질환이다.<sup>6)</sup> 간경화시 간조직중 콜라겐 등의 결합조직단백(extracellular matrix)이 과다 증식하여 정상 약 5~6배까지의 증가된다.<sup>11, 12)</sup> 이와 같이 결합조직이 과다증식하는 현상은 fibrogenesis와 fibrolysis간의 균형이 파괴됨으로써 나타난다. 간경화의 기전은 아직 확실히 밝혀진 바 없지만 지속적인 간 손상에 의해 간 조직의 macrophage인 Kupffer cell이 활성화되어 TGF-beta, TGF-alpha, PDGF, EGF, TNF-alpha 등의 각종 cytokine을 분비하고 이 cytokine을 매개로 간조직중 Ito cell (lipocyte)이 활성화되어 결합조직의 합성을 촉진하는 것으로 예상되고 있으며<sup>13-19)</sup>, 사염화탄소<sup>20-22)</sup>, DMN<sup>23)</sup>, 담도결찰<sup>24)</sup> 등에 의한 실험적 간손상시 Kupffer cell과 Ito cell의 증식이 확인된 바 있다.

간경변시 고도로 생산되는 결합조직단백에는 콜라겐, proteoglycan, fibronectin, hyaluronic acid 등이 있다.<sup>11, 19)</sup> 이중 가장 대표적인 것은 콜라겐으로 (Gly-Xaa-Yaa)의 특이한 아미노산 배열을 갖고 있으며 Yaa위치에 proline 또는 hydroxyproline이 배열된다.<sup>25)</sup> Hydroxyproline은 콜라겐 중에만 특이적으로 약 10% 함유되어 있어 간조직중의 hydroxyproline을 측정함으로써 간조직중의 콜라겐 양을 예측할 수 있다.<sup>10)</sup>

그동안 간경변의 원인, 기전, 간경변시의 여러 변화 및 그 원인 등을 연구하기 위해 많은 간경화(섬유화) 실험동물을 사용해왔다. 간경화 실험동물 모델로는 사염화탄소<sup>5, 26)</sup>, 담도결찰<sup>27)</sup>, methotrexate<sup>28)</sup>, ethanol-high fat<sup>29)</sup>, dimethylnitrosamine<sup>9, 10)</sup>, 황인<sup>30)</sup> 및 엽산 등의 결핍에 의한 diet 모델<sup>31)</sup> 등의 많은 방법이 제안, 이용되어 왔다.

담도결찰 모델은 1984년 Kountouras등의 발표 이후 널리 사용되었다.<sup>27)</sup> 담도결찰의 경우 담즙에 의한 독성으로 간을 손상시킴으로써 3주정도 경과후 간 섬유화가, 4주에는 간경화가 유발되어 비교적 단기간에 간경화를 유도할 수 있으며 사람의 담도질환에 의한 간경화와 상당히 유사하다는 장점이 있다.<sup>32, 33)</sup>

또 근래 사용되기 시작한 N, N-dimethylnitrosamine에 의한 간경화 모델은 소량으로 비교적 짧은 기간인 3주만에 사람의 알콜성 간경화와 유사한 병리적 소견을 보이고 투약을 중단하여도 간경화가 유지된다는 장점이 있다.<sup>9, 34)</sup> Dimethylnitrosamine은 간 발암물질로서 체내에서 cytochrome P4502E1에 의해 대사되어 acetaldehyde를 생성시킴으로써 간 손상을 유발하는 것으로 생각되고 있으며 단백질과 핵산 등을 methylation시켜 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup>

사염화탄소에 의한 간경화 모델은 가장 널리 사용되고 있으나 높은 치사율과 간경화 유도시 8~15주가 소요되며, 투약을 중단하면 다시 회복되고, 개체차 또한 매우 크며 사람에서의 병리적 소견과는 상당히 다르다는 단점이 있다.<sup>35)</sup> 사염화탄소는 체내에서 trichloromethyl기의 free radical을 형성하여 과산화지질 형성 또는 cellular calcium의 항상성을 파괴함으로써 간 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>32)</sup>

본 실험결과 세가지 모델 모두 간경화가 유발된 것으로 확인되었다. N, N-dimethylnitrosamine 및 담도결찰군은 초기의 간경화 소견을 보였으며 사염화탄소군은 고도의 간경화의 소견을 나타내었다. 또한 세가지 모델 모두에서 간 손상의 지표가 되는 ALT, AST, ALP 등의 혈청생화학적 항목이 유의성 있게 증가하였다. 그러나 DMN군은 다른 두군에 비해 AST, ALT의 증가 추세가 낮은 편이었다. 조직중 결합조직의 양은 담도결찰군, DMN군, 사염화탄소군 순으로 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. 현재 인간의 간경화는 그 원인과 결과에 있어서 매우 다양하여 단순한 실험동물모델로는 질병상태를 재현하기가 곤란한 실정이다. 이와같이 여러 동물모델을 비교실험하므로써 치료제의 *in vivo* 검색시 약리기전 규명에 도움이 되리라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 원광대학교 교내연구비의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Sherlock, S. : Disease of the liver and biliary system 8th ed., Blackwell Scientific Publications, London, p. 1 (1989).

- 2) Meeks, R. G., Harrison, S. D., Bull, R. J. : Hepatotoxicology, CRC press, New York. 139 (1991).
- 3) Meeks, R. G., Harrison, S. D., Bull, R. J. : Hepatotoxicology, CRC press, New York. 78 (1991).
- 4) Hogemann, B. and Domschke, W. : Hepatic fibrosis-current concepts of pathogenesis and therapy. *Gastroenterol. Jpn.*, **28**, 570 (1993).
- 5) Bickel, M., Baader, E., Brocks, D. G., Engelbart, K., Gunzler, V., Schmidts, H. L. and Vagel, G. H. : Beneficial effects of prolyl 4-hydroxylase in CCL<sub>4</sub>-induced fibrosis of the liver in rats. *J. Hepatol.*, **13**, s26-s34 (1991).
- 6) Anthony, P. P., Ishack, K. G., Nayak, N. C., Poulson, H. E., Scheuer, P. J. and Sobin, L. H. : The morphology of cirrhosis. *J. Clin. Pathol.*, **31**, 395 (1978).
- 7) 高田實治 : Basic & Clinical Pharmacokinetics. 藥業新聞社, Tokyo. 248 (1987).
- 8) Tsukamoto, H., Matsuoka, M. and French, S. W. : Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Sem. Liver Dis.*, **10**, 56 (1990).
- 9) Jezequel, A. M., Mancini, R., Rinaldesi, M. L., Macarri, G., Venturini, C. and Orlandi, F. : A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. *J. Hepatol.*, **5**, 174 (1987).
- 10) Jamall, I. S., Finelli, V. N. and Que Hee, S. S. : A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal. Biochem.*, **112**, 70 (1981).
- 11) Bissell, D. M., Friedman, S. L., Mahler, J. J. and Roll, F. J. : Connective tissue biology and hepatic fibrosis : Report of a conference. *Hepatol.*, **11**, 488 (1990).
- 12) Ikeda, H., Wu, C. H., Wu, G. Y. : Ito cells in a model of chronic biliary cirrhosis lack feedback inhibition by procollagen propeptides. *Hepatol.*, **14**, 115 (1991).
- 13) Czaja, M. J., Weiner, F. R., Flanders, K. C., Giambrone, M-A., Wind, R., Biempica, L. and Zern, M. A. : In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J. Cell. Biol.*, **108**, 2477 (1989).
- 14) Andus, T., Bauer, J. and Gerok, W. : Effects of cytokines on the liver. *Hepatol.*, **13**, 364 (1991).
- 15) Shiratori, Y., Kawase, T., Shiina, S., Komatsu, Y. and Omata, M. : Role of hepatic sinusoidal cells in hepatic injury and fibrosis in the liver. *Gastroenterol. Jpn.*, **28**, 102-106 (1993).
- 16) Madden, J. W., Gertman, P. M. and Peacock, E. E. : Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: A new canine model of an ancient human disease. *Surgery*, **68**, 260 (1970).
- 17) Weiner, F. R., Giambrone, M-A., Czaja, M. J., Shah, A., Annoni, G., Takahashi, S., Eghbali, M. and Zern, M. A. : Ito-cell gene expression and collagen regulation. *Hepatol.*, **11**, 111 (1990).
- 18) Friedman, S. L. : Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Semin. Liv. Dis.*, **10**, 20 (1990).
- 19) Lissos, T. W. and Davis, B. H. : Pathogenesis of hepatic fibrosis and the role of cytokines. *J. Clin. Gastroenterol.*, **15**, 64 (1992).
- 20) Geerts, A., Lazou, J-M., de Bleser, P. and Wisse, E. : Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatol.*, **13**, 1193 (1991).
- 21) Geerts, A., Schellinck, P., Bouwens, L. and Wisse, E. : Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J. Hepatol.*, **6**, 50 (1988).
- 22) Shiratori, Y., Geerts, A., Ichida, T., Kawase, T. and Wisse, E. : Kupffer cells from carbon tetrachloride-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J. Hepatol.*, **3**, 294 (1986).
- 23) Mancini, R., Jezequel, A. M., Benedetti, A., Paolucci, F., Trozzzi, L. and Orlandi, F. : Quantitative analysis of proliferating sinusoidal cells in dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *J. Hepatol.*, **15**, 361 (1992).
- 24) Maher, J. J. and McGuine, R. F. : Extracellularmatrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J. Clin. Invest.*, **86**, 1641 (1990).

- 25) Stryer, L. : Biochemistry 3rd ed., Chap.11 Connective-Tissue Proteins. W. H. Freeman and Company, New York, 261 (1988).
- 26) Ehrinpreis, M. N., Giambrone, M. A. and Rojkind, M. : Liver proline oxidase activity and collagen synthesis in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Biochym. Biophys. Acta.*, **629**, 184 (1980).
- 27) Kountouras, J., Billing, B. H. and Scheuner, P. J. : Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.*, **65**, 305 (1984).
- 28) Custer, R. P., Freeman-Narrod, M. and Narrod, S. A. : Hepatotoxicity in wistar rats following chronic methotrexate administration: a model of human reaction. *J. Natl. Cancer Invest.*, **58**, 10111 (1987).
- 29) Tsukamoto, H., Towner, J., Crofalo, L. H. and French, S. W. : Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high-fat diet. *Hepatology*, **6**, 814 (1986).
- 30) Peterson, T. C. : Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-driven growth factor-driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology*, **17**, 486 (1993).
- 31) Rewart, M. J., Wikinson, K. F., Rush, B. D., Vidmar, T. J., Peters, K. M., Henley, K. S., Appleman, H. D., Kim, K. Y., Schuppan, D. and Hahn, E. G. : The integrated value of serum procollgen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology*, **10**, 8010 (1989).
- 32) Clawson, G. A. : Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.*, **8**, 104 (1989).
- 33) Sokol, R. J., Devereaux, M., Khandwala, R. and O'Brien, K. : Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, **17**, 869 (1993).
- 34) Ala-kokko, L., Stenback, F., Ryhanen, L. : Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, **13**, 117 (1989).
- 35) Tamayo, R. P. : Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, **3**, 112 (1983).