

효과적인 간경변 백서 모델의 개발

The development of an efficient rat hepatic cirrhosis model

Introduction: Applying clinical conditions to on experimental animals for to verififying the mechanism of disease and drug effects is crucial. Cirrhotic livers induced by Hepatitis B virus are frequent, and eEspecially in Korea where a great deal of more liver-related diseases occurs, cirrhotic livers induced by Hepatitis B virus are frequent, and, such viral-induced cirrhosis, and this often impedes other medical treatments. Therefore, creating a proper elucidating properly derived cirrhosis method in animal model to simulate the actual pathophysiology of cirrhosis can benefit future researches.

Aims: We wanted to Te testing various hypotheticalsized methods of inducing cirrhosis in animal models, and we wanted the model to have a with higher rate of reproducibility.

Method: To induce cirrhotic liver, thioacetamide (Sigma, St. Louis, USA) was given either freely via oral intaken or it wasand injected into the peritoneal space ofn Sprague-Dawley(SD) rats. The SD rats wereare divided into four groups: the oOral intake gGroup 1 ((N=10, 0.03%, 13 weeks), the oOral intake gGroup 2 (N=20, 0.04%, 30 weeks), the ilntraperitoneal Injected gGroup 1 (N=10, 300mg/kg, 12 weeks (3 times per week for first 2 weeks, 2 times per week for next 10 weeks) and the ilntraperitoneal Injected gGroup 2 (N=20, 300mg/kg, 2 times per week for 16 weeks). The mMortality rate of the tested subjects is recorded, and a visual test of the livers is performed at the end of the experiment, a visual test of the livers is performed. Also, the extracted liver cells that were dyed with Trichrome are compared to evaluate the extent of the liver cirrhosis.

Result: For theIn oral intake group 1, no loss of occurred until wWeek 13, and 5 of the SD rats (50%) showed signs of liver cirrhosis by the Trichrome dye test. However, the extent of cirrhosis greatly differed between each of the subjects. ForIn the oral intakae group 2, no loss occurred until wWeek 30. 20 of the SD rat (100%) in this group possessed a cirrhotic liver. However, the weight of the cirrhoscirrhotic liversis differed from a minimum of 231g to a maximum of 770g. For theIn Injected gGroup 1, 4 tested subjects (40%) died between wWeeks 3 and 4; however, the rest of them survived and they all revealed a signs of cirrhosis. ForIn the ilnjected gGroup 2, only 3 tested subjects (15%) died, and after wWeek 16, 17 survivors (100%) showed a signs of cirrhosis.

Conclusion: The short-term oral administration of thioacetamide only induced a minimal amount of cirrhosis;, thus, a longer period of consumption is suggested. Injection of thioacetamide into the peritoneum resulted in higher death rate when thoacetamide was injected frequently. Therefore, selecting a proper method to create a cirrhotic liver, with considering the reproducibility, on cirrhotic liver, the survival rate of the experimental animals, and the length of the experiment, isare strongly suggested for creating an animal model of cirrhotic liverfor further experiments.

Key words : Liver cirrhosis, animal model, Sprague-Dawley rat, Thioacetamide

중심단어: 간경변, 동물모델, Sprague-Dawley 백서, 티오아세트아미드

최봉희¹, 최새별^{1,2}, 조진아¹, 이지연¹,
김경식^{1,2}, 조장환¹, 김병로¹

연세대학교 의과대학 외과학교실¹,
세브란스 병원 세포 치료실²

Feng Ji Cui¹
Sae Bul Choi, M.D.^{1,2}
Jin A Cho¹, Ji Youn Lee¹
Kyung Sik Kim, M.D.^{1,2}
Chang Hwan Cho, M.D.¹
and, Byong Ro Kim, M.D.¹

Dept. of ¹Surgery, Yonsei University College of Medicine, ²Cell therapy center, Severance Hospital, Seoul, Korea

책임저자

김경식
120-752
서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-2228-2125
Fax: 02-313-8289
E-mail: kskim88@yumc.yonsei.ac.kr

※ 본 연구 결과는 보건복지부 보건의료기술
진흥사업 중개연구과제 A060774로 지원되
었음

※ 본 논문의 요지는 2007년 제26차 춘계
한국간담체외과학회에서 발표되었음.

서 론

간경변은 만성적인 간손상으로서 간섬유화가 진행되어 발생하며 간 전반에 섬유화와 재생결절들이 형성되고 이로 인해 식도정맥류 출혈, 복수, 간성혼수 및 간부전증, 간암으로 진행되기도 한다.¹⁻² 간경변 치료에 있어서 아직까지 효과적인 치료제가 없어 큰 문제가 되고 있으며 현재까지 간이식술 외에는 특별한 치료 방법이 없을 뿐만 아니라 그 결과로 생기는 간성혼수 등의 병인도 밝혀지지 않은 상태이다.³⁻⁴ 따라서 간경변의 병인에 대한 연구나 인공 간 등의 새로운 치료법의 개발에 동물실험이 필수적이고 이를 위한 간경변 동

물모델 개발이 중요하다. 임상에서는 B형간염에 의한 간경변이 동반되는 경우가 많고, 이로 인해 치료에 장애가 되는 예를 흔히 볼 수 있어 임상에서 발생할 수 있는 조건을 실험동물에 적용하여 질병의 기전 및 약물작용기전을 연구하는 것은 매우 중요하다. 간질환을 포함한 여러 질환에서 인체를 대상으로 수행하기 어려운 연구를 하고, 새로운 치료를 발전시키기 위해 적절한 실험동물 모델은 필수적이다.⁵ 간경변 실험동물 모델을 고안할 때 자연경과와 실험동물 모델 사이에 근본적인 차이가 있음을 명심해야 하며 실험동물모델에서는 인체에서와 같이 알코올이나 간염바이러스 주입 등을 실험동물모델에 그대로 적용하기는 곤란하다. 대신에 간에

독성을 주는 약물이나 담관 결찰 등에 의한 섬유화 유발 모델이 보편적으로 이용되고 있다. 약물로 인한 섬유화 유발 모델은 간염바이러스나 다른 간염 이후에 일어나는 섬유화와 가까운 모델이다. 이러한 동물모델을 이용하여 적절한 간경변을 유도하는 것은 임상과의 연관성을 좁힐 수 있어 매우 유용하다. 간에 섬유화를 일으키는 약물로는 thioacetamide (TAA), 사염화탄소 (CCl₄), dimethylnitrosamine (DMN) 등이 있다. CCl₄는 간손상이 주로 중심정맥주변에서 일어나며 인체에서 일어나는 광범위한 간손상과 다르고 oil과 희석하기 때문에 복강내 투여가 곤란하고 쥐에 통증을 유발할 수 있다. DMN은 생존율이 낮고 비용이 많이 드는 단점이 있다. 이 중에서 TAA는 활성 산소종을 매개로 하여 간손상을 유도하며 이로 인한 백서의 간경변 모델은 사람의 경우와 형태학적, 생화학적 특징이 유사하여 재 시행시 동일한 병변을 얻을 수 있으며 사망률이 낮은 것으로 보고되고 있다.⁶⁻⁷ 또한 현재까지 TAA, CCl₄ 등의 간 독성 약물의 투여 경로로는 경구, 복강 및 근육 내 투여 등 여러 가지 방법이 보고되어 있으나 투여 경로에 따라 재현성의 차이가 있고 간경변 유도 과정에 쥐가 많이 사망하는 문제가 심각할 수 있고 규격화된 구체적인 방법이 없다. 또한 급성 간부전을 유발하는 동물모델에 관한 많은 문헌이 있지만 간경변 실험동물모델에 대해 집중적으로 기술한 문헌이 부족하다. 그러므로 간경변 유도 시 인체에 발생하는 간경변과 가장 유사한 TAA를 이용하여 지금까지 제시된 여러 가지 간경변 유도방법을 검증하여 보다 재현성 높은 동물모델개발 방법을 제시하고자 한다.

실험대상 및 방법

1. 실험 동물

실험 동물은 Sprague-Dawley 백서 (♂, 150-200g) 60마리를 대상으로 하였다. 구입한 쥐는 연세대학교 의과대학 임상의학연구센터 내 SPF (specific pyrogen free) 사육실에서 온도(22℃), 습도(55%)가 일정하게 유지된 환경에서 무균 음수와 멸균사료로 AAALAC (Association of Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 기준에 의해서 사육하였다.

2. 실험군의 설정

간경변을 유도하기 위해 백서에 TAA (Sigma, Saint Louis, USA)를 투여하였으며 음용군은 TAA를 수돗물에 섞어 10L을 만들어 음용 1군 (N=10, 0.03%, 13주), 음용 2군 (N=20, 0.04%, 30주)에 음용시켰다. 복강투여 1군 (N=10, 300mg/kg, 12주, 첫 2주 주 3회 그 후 주 2회) 및

복강투여 2군 (N=20, 300mg/kg, 16주, 주 2회) 복강투여군은 TAA를 75mg/ml 씩 생리 식염수에 희석하여 쥐 무게 100g 당 0.4cc 씩 투여하였다. 복강투여 1군은 주3회 투여하니 쥐가 많이 사망하기에 첫 2주만 주 3회 투여하고 그 후 주 2회 투여하고 비교군은 정상 및 지방간 군을 선택하였다. 실험군을 그림으로 나타내면 다음과 같다(Fig. 1).

3. 간기능 검사

실험 동물을 각 그룹별 약물투여 종료 후 그룹당 임의로 3마리를 선정하여 꼬리혈액을 채취하여 4500rpm에서 10분 원심분리 후 상층액인 혈청을 취하여 한국동물임상연구소(주)에 간기능 검사를 의뢰하였다. AUTOMATED BIOCHEMICAL ANALYZER(TOSHIBA 30FR, JAPAN) 기계를 사용하여 총단백 (total protein albumin)은 Biuret 법, 빌리루빈 (bilirubin)은 BCG법으로 600nm 파장에서 측정하고 Alkaline Phosphatase는 DEA 완충액을 사용하는 pNPP 기질 법으로 405nm 파장에서 측정하고 GOT (glutamic oxalacetic transaminase)와 GPT (glutamic pyruvate transaminase)는 UV-rate (340nm)법에서 측정하였다.

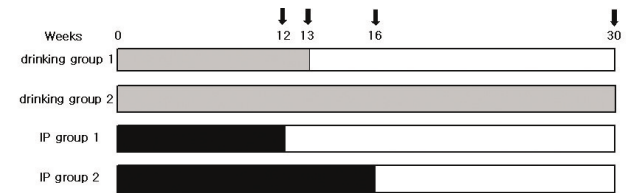


Fig. 1. Experimental protocols. Dotted bars, 0.03%–0.04% thioacetamide (TAA) in drinking water; black bar, 300mg/kg thioacetamide (TAA) in intraperitoneal injection (IP); gray bar; arrows, rats killed.

4. 육안 검사 및 조직 병리학적 검사

간섬유화를 평가하기 위해 적출된 간에서 육안적인 소견을 관찰하였다. 모든 군의 간은 10% 중성 완충포르말린액에 고정 후 파라핀으로 포매를 거쳐 4µm두께의 조직절편을 제작한 후 조직학적 소견의 비교를 위해 Hematoxilin-Eosin 염색, Masson's trichrome 염색 및 picro-sirius red 염색⁸을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 간경변 점수화

H-E 염색을 시행하여 간경변에 의한 괴사와 염증 및 간섬유화의 정도를 평가하는 방법인 HAI (histologic activity index)를 점수화하였다. 점수는 문맥내 괴사, 간소엽내 괴사, 문맥 내 염증 및 섬유화의 정도에 따라 각 항목별로 계산하였다. 예를 들어 섬유화가 없을 때 0점, 문맥역 섬유화일 때 1점, 문맥주위 섬유화일 때 2점, 문맥과 중심정맥을 잇는 섬유화일 때 3점, 간경변일 때 4점으로 점수화하여 각

항목의 점수를 더하여 HAI 점수를 구한 뒤 각 그룹별로 비교 분석하였다.

6. 간 섬유화의 정량분석

간 섬유화 정도를 확인하기 위하여 슬라이드 당 임의로 6곳을 선정하여 광학 현미경 40배에서 조직 소견을 촬영한 뒤 각각의 사진에서 이미지 분석프로그램인 MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA)를 사용하여 Masson's trichrome 염색에서 파란색으로 염색된 섬유화 부위의 면적을 측정하고 또 다른 염색 방법인 picro-sirius red 염색에서 빨간색으로 염색된 섬유화 부위의 면적을 측정하였다.

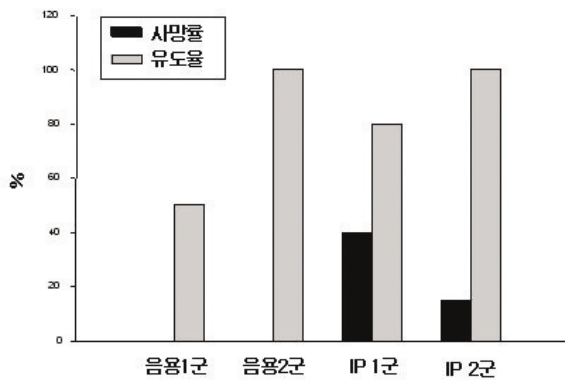


Fig. 2. 사망률 및 유도율 비교

7. 통계학적 분석

통계 프로그램인 SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, USA)을 사용하여 실험설계에 대한 분산 분석은 ANOVA로 검정하였고, 결과를 Mean ± SEM으로 표시하였고, p<0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

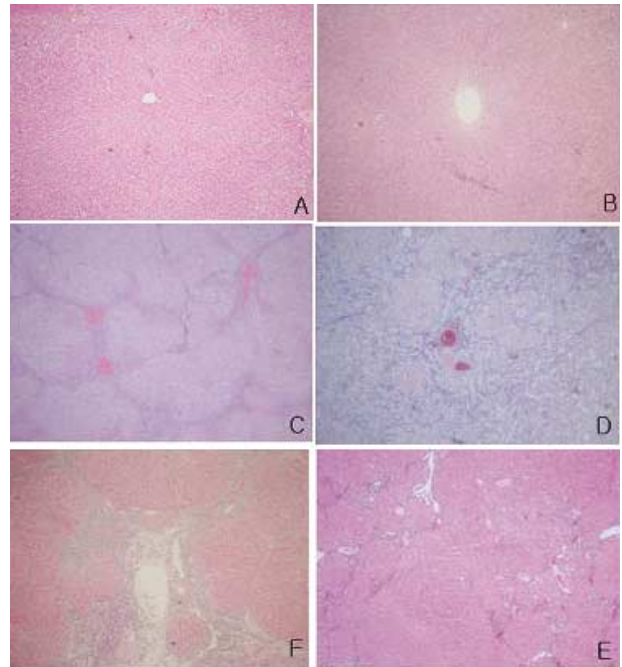


Fig. 4. H & E stain
a) 정상간 b) 지방간 c) 음용 1군 d) 음용 2군 e) IP 1군 f) IP 2군

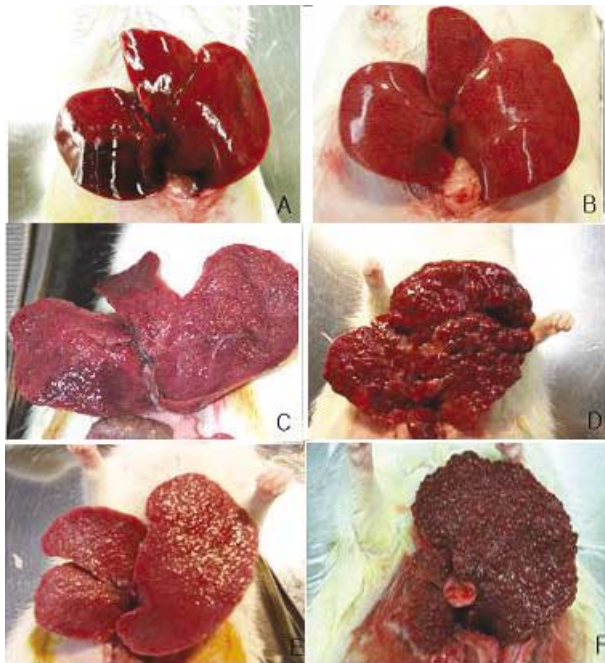


Fig. 3. 간 육안적 관찰
a) 정상간 b) 지방간 c) 음용 1군 d) 음용 2군 e) IP 1군 f) IP 2군

결 과

1. 실험동물의 사망률 및 육안적 간경변 유도율

음용1군에서는 음용 13주후까지 한 마리 손실도 없었으며 개체 사이에 무게 변화가 크지 않았다. 음용 2군에서는 음용 30주후까지 한 마리 손실도 없었으며 개체 사이에 무게가 최소231g, 최대 770g으로 무게변화가 컸다. 복강투여 1군에서는 투여 3-4주 사이에 실험 동물이 많이 죽었고 (4마리, 40%) 그 후에는 잘 죽지 않았고 복강투여 2군에서는 죽은 실험 동물 (3마리, 15%)이 적었다. 음용 1군에서 Trichrome염색에 의한 조직 검사상 5마리 (50%)에서 간경변이 유도되었다. 그러나 개체간에 간경변의 유도 정도에 차이가 많았다. 음용 2군에서 육안 및 간조직 검사에서 20마리 (100%)에서 모두 간경변이 유도되었다. 음용후 16주에 거의 대부분의 동물 (17마리, 100%)에서 간경변이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

2. 간기능 검사

간손상정도를 확인하기 위하여 생화학적 지표인 총단백

(total protein albumin), 빌리루빈 (billirubin), Alk P(Alkaline Phosphatase), GOT(glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase)의 측정률 측정한 결과 total protein albumin, billirubin은 정상수치를 나타내고 GOT, GPT는 정상, 지방간에 비해 큰 차이가 없었다(Table 1).

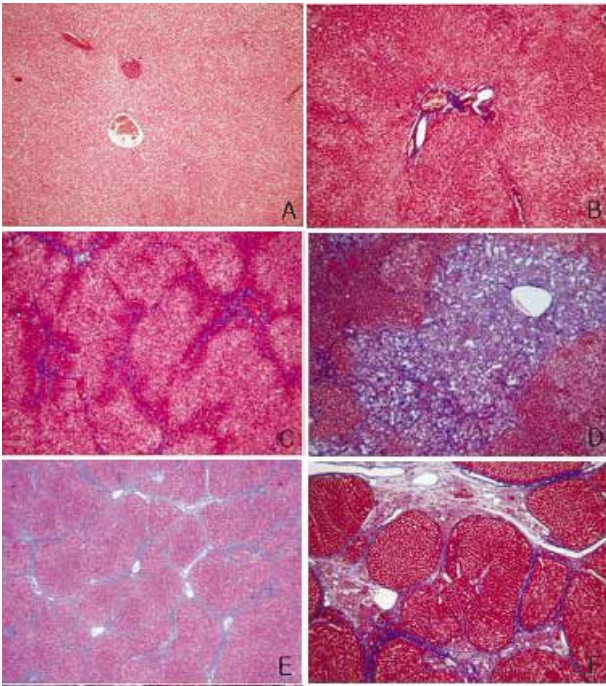


Fig. 5 Trichrome stain
a) 정상간 b) 지방간 c) 음용 1군 d) 음용 2군 e) IP 1군 f) IP 2군

3. 간경변의 평가

간경변을 유도한 후 정상간, 지방간과 비교한 결과 음용1군은 미약한 정도의 섬유화 소견을 보이고 (Fig. 3) 음용2군은 상등 정도의 섬유화 소견을 보이며 IP 1군은 중등 정도의 섬유화 소견을 보이고 IP 2군은 상등 정도의 섬유화 소견을 보여 음용2군과 IP 2군이 간경변이 유도된 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). 간섬유화 정도를 확인하기 위하여 Trichrome, Picro-sirius red 염색 결과, 음용1군과 IP 1군은 섬유화 소견을 보였다. 음용2군과 IP2군에서 동물은 완전하게 간경변의 소견을 보였다(Fig. 5, 6). 음용2군에서 중증 담관증식과 담관암종이 많은 부위에서 관찰되었다(Fig. 7).

4. 간경변 점수화

간조직의 만성 간손상의 정도를 반영하는 HAI 점수를 HE 염색하여 간경변을 평가한 결과, 정상, 지방간에 비하여 음용군과 IP군이 괴사와 염증이 일어난 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). HAI결과, 음용 2군이 문맥내 괴사 5.3 ± 0.8 , 간소엽내 괴사 3.8 ± 0.4 , 문맥내 염증 3.5 ± 0.5 , 섬유화 $3.8 \pm$

0.4 이고, IP 2군이 문맥내 괴사 4.7 ± 1.0 , 간소엽내 괴사 2.0 ± 1.1 , 문맥 내 염증 3.0 ± 0 , 섬유화 3.3 ± 0.5 이었다. 음용 1군은 문맥내 괴사 2.0 ± 1.1 , 간소엽내 괴사 1.3 ± 0.8 , 문맥내 염증 1.7 ± 1.0 , 섬유화 1.3 ± 0.8 이고, IP 1군은 문맥내 괴사 0, 간소엽내 괴사 0.2 ± 0.4 , 문맥 내 염증 0.8 ± 0.4 , 섬유화 3.0 ± 0 이었다. 최종점수는 음용1군은 6.3 ± 2.3 점, 음용 2군은 16.5 ± 1.0 점, IP 1군은 3.8 ± 0.4 점, IP 2군은 13 ± 2.2 점으로 음용 2군과 IP 2군이 가장 높은 점수로 간경변이 유도된 것을 알 수 있다(Table 2).

5. Trichrome, Picro-sirius red 염색후 metamorph 프로그램을 이용한 간경변 형성율의 비교

간섬유화 정도를 확인하기 위하여 Trichrome 염색 후 MetaMorph 프로그램을 사용하여 파란색으로 염색 된 부위의 면적을 측정한 결과, 음용 2군이 $728.6 \times 10^3 \pm 357.0 \mu m^2$, IP 1군이 $581.1 \times 10^3 \pm 170.5 \mu m^2$, IP 2군이 $731.1 \times 10^3 \pm 131.8$ 으로 정상 $0 \mu m^2$ 보다 유의하게 증가하였고, 음용 2군과 IP 2군이 가장 큰 면적을 나타내었다(Table 3, Fig. 8). 간섬유화 정도를 확인하기 위한 또 다른 염색방법인 Picro-sirius red 염색한 후 MetaMorph 프로그램을 사용하여 빨간색으로 염색 된 부위의 면적을 측정한 결과, 음용 2군이 $285.7 \times 10^3 \pm 252.3 \mu m^2$, IP 1군이 $284.8 \times 10^3 \pm 99.9 \mu m^2$, IP 2군이 $370.2 \times 10^3 \pm 77.4 \mu m^2$ 으로 정상 $4.8 \times 10^3 \pm 3.1 \mu m^2$ 보다 유의하게 증가하였고, IP 2군이 가장 큰 면적을 나타내었다(Table 4, Fig. 9).

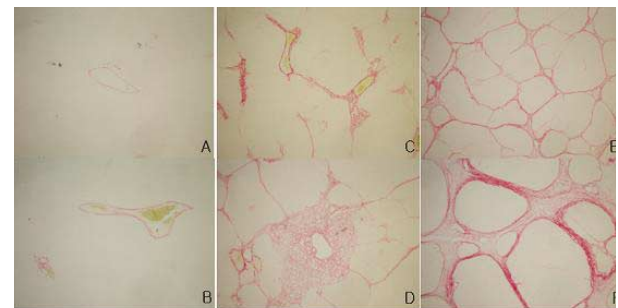


Fig. 6. picro-sirius red stain
a) 정상간 b) 지방간 c) 음용1군 d) 음용 2군 e) IP 1군 f) IP 2군

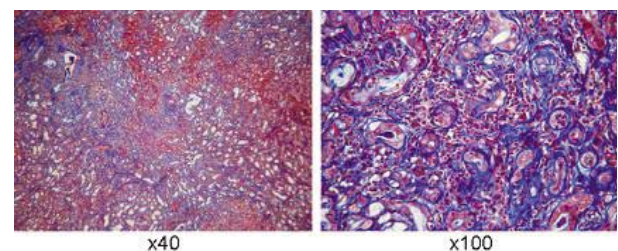


Fig. 7. TAA 음용 2군 담도암 유발 (Trichrome stain)

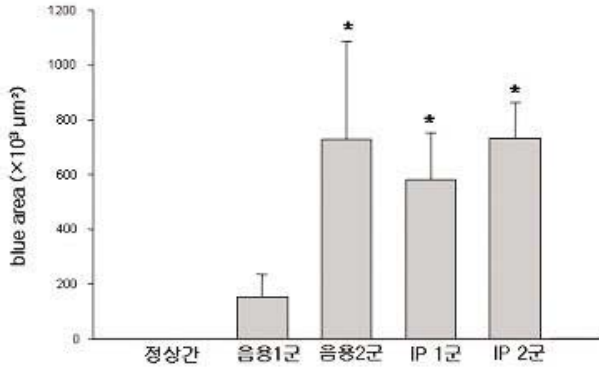


Fig. 8. Trichrome 염색후 간경변 부위의 측정 (n=3) *p<0.05.

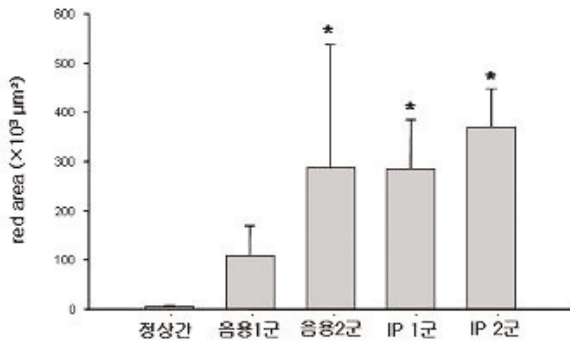


Fig. 9. Picro-sirius 염색후 간경변 부위의 측정 (n=3) *p<0.05.

Table 1. Total protein albumin, bilirubin, Alk P, GOT, GPT 간기능 검사

	정상	지방간	음용1군	음용2군	IP1군	IP2군
Total Protein g/dL(6.0-9.0)	6.2	7.5	6.3	7	6.6	8
Albumin g/dL(2.7-4.0)	3.8	3.8	3.8	3.6	2.7	4
Bilirubin, Total mg/dL(0.0-1.0)	0.5	0.5	0.6	0.3	0	0.6
Alk, Phosphatase IU/L(60-220)	142	409	481	447	190	396
AST(GOT) IU/L(75-150)	146	141	177	134	184	91
ALT(GPT) IU/L(25-60)	51	36	73	68	63	70

Table 2. PN, IN, PI, fibrosis 점수 및 HAI 점수화

Group	N	Periportal necrosis(PN)	Intralobular necrosis(IN)	Portal inflammation(PI)	fibrosis	Score
음용 1군	6	2.0±1.1	1.3±0.8	1.7±1.0	1.3±0.8	6.3±2.3
음용 2군	6	5.3±0.8	3.8±0.4	3.5±0.5	3.8±0.4	16.5±1.0
IP 1군	6	0	0.2±0.4	0.8±0.4	3.0±0	3.8±0.4
IP 2군	6	4.7±1.0	2.0±1.1	3.0±0	3.3±0.5	13±2.2

Table 3. Trichrome 염색후 MetaMorph 프로그램을 사용한 섬유화 영역 측정

	N (random)	red area (x10 ³ μm ²)
정상간	6	4.8 ± 3.1
음용1군	6	108.7 ± 60.5
음용2군	6	285.7 ± 252.3
IP 1군	6	284.8 ± 99.9
IP 2군	6	370.2 ± 77.4

Data are expressed as mean ± SD.

Table 4. Picro-sirius 염색후 MetaMorph 프로그램을 사용한 섬유화 영역 측정

	N (random)	blue area (x10 ³ μm ²)
정상간	6	0
음용1군	6	155.2 ± 81.1
음용2군	6	728.6 ± 357.0
IP 1군	6	581.1 ± 170.5
IP 2군	6	731.1 ± 131.8

Data are expressed as mean ± SD.

고 찰

간염으로 인하여 간세포가 손상을 받게 되면 간세포의 괴사 후 상처 재생과정의 조직 반응으로 인하여 간 섬유화가 발생하여 최종적으로 간경변증을 일으키게 된다. 간 섬유화의 병리기전 연구, 간 섬유화 환자의 수술에 관한 연구 및 간 섬유화 방지에 관한 연구를 시행하기 위해서는 간 섬유화 실험동물 모델의 확립이 필수적이라고 생각된다. TAA에 의해 유도되는 간경변은 약물의 작용을 매개하는 활성 산소종이 주요인인 것으로 알려져 있으며, 시간이 경과함에 따라 TAA 그 자체에 의한 독성보다는 cytochrome P450 효소에 의하여 생성되는 thoacetamide S-oxide에 의한 독성으로 인해 대사활성화 과정이 요구되는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹⁰ 또한 TAA는 저용량에서는 세포 자멸(apoptosis)을 유발하나 용량을 올리면 지방 과산화와 소엽중심성 괴사를 유발한다. 백서에서 TAA에 의해 유도된 간경변은 사람 간 질환의 병변과 형태학적, 생화학적 특징이 유사하여¹¹ 조직학적 소견이 인간 간경변과 더 매우 유사하다고 보고되었다.¹² TAA로 유발된 섬유화 패턴은 CCl₄에 의해 유발되는 것과 다르다. TAA는 섬유성 결합 조직의 생성과 담관 세포의 증식의 특성이 있다.¹³ 하지만 CCl₄에 의한 간손상은 주로 중심정맥 주변에서 일어나며 인체에서 일어나는 광범위성 간괴사(massive hepatic necrosis)의 형태를 닮지 않은 단점이 있다. 또한 간에서 완전히 대사되지 않은 CCl₄가 폐나 신장 같은 다른 장기의 손상을 유발하여 간손상만 단독으로 유발하기 힘들다. Dimethylnitrosamine 또한 비용이 많이 들기 때문에 TAA 약물로 유발된 간경변이 가장 적합하고 우수하다. 실험목적에 따라 마우스나 흰쥐를 이용하며 담도결찰법도 이용되지만 간염바이러스나 다른 감염이후에 일어나는 간 섬유화와 가까운 모델로서 약제에 의한 간손상 모델이 일반적으로 이용된다. 또한 수술적 모델은 재현성이 좋으나 가역성이 문제가 있으며, 수술 과정이 복잡할수록 수술의 기술

적 측면이 요구된다.¹⁴ 또한 담도 결찰에 의해 간경변을 유도한 경우 섬유화에 대한 약물 투여의 효과에 대한 실험을 진행할 수 있으나 간문부쪽에 수술 창상에 의한 유착 등이 유발되어 허혈성 손상 등의 모델에서는 이용할 수 없다는 단점이 있다. 본 연구는 TAA로 간섬유화를 일으켜 음용 13주, 30주 투여와 복강 12주, 16주 투여하여 간경변 모델을 만들었다. 생존율은 음용군이 한 마리의 손실도 없었고 복강 12주 투여군은 주 3회 투여 높은 사망률 40%를 보였고 복강 16주 투여군은 15% 사망률을 보였다. 이는 주 3회 복강투여하면 사망률이 높기 때문에 주 2회 복강 투여하는 것이 적당하다. 간기능 검사에서는 total protein albumin, billirubin, Alk P, GOT, GPT 실험군 모두 정상보다 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 꼬리혈액 채취 시 용혈현상, 기계로 나타내는 수치의 정확도 문제로 간기능 검사결과로 증명하기 어렵다고 본다. 육안적인 관찰과 섬유화정도를 나타내는 Trichrome, Picro-sirius red 염색 결과에서 음용 13주와 IP 12주는 중등 정도의 섬유화 소견을 보이지만 음용 30주와 복강 16주 투여한 군이 상등 정도의 섬유화 소견을 보이며 간경변일 때 나타나는 간세포 재생결절이 광범위하게 형성되고 그 주위를 둘러싼 섬유성 격막이 관찰되어 간경변이 유도됨을 알 수 있다. 또한 간세포 괴사, 변성 그리고 염증성 침윤, 이토 세포의 증식과 결합 조직의 형성된 것을 관찰하였다. 조직학적 소견에서 TAA 0.03%를 음용 30주 실험군에서 담관 증식과 담관암종이 관찰되었다. 담도암 발생에 관한 다른 문헌에서는 인간에게서 보이는 것처럼 0.05%의 thioacetamide를 13주 음용한 백서에서 간질의 결합조직 형성과 함께 중등 담관 증식과 담관암종의 다발성 부위를 보여주었고 실험이 종료되었을 때 이 용량에서의 TAA는 제 14주 말에 조금의 사망률도 초래하지 않았다고 한다.¹⁵ 이것은 다른 담도암 연구에 도움이 될 수 있으며 담도암종의 좋은 실험모델로 사용될 수 있다. 실험동물모델을 고안할 때 표준화된 계획안을 사용해야 한다. 간손상의 정도가 측정할 수 있어야 하고 표준화 되어야 한다. 그렇지만 최근 수년간 논문에서 아직까지 개별적으로 이 요건을 만족시킨 모델은 없다. 가장 이상적인 모델은 일정량의 약물을 일정기간 투여하였을 때 같은 정도의 섬유화를 일으키고 그 이후 가역적인 반응이 일어나지 않으면서 실험동물이 오래 살아야 하는데¹⁶ 본 연구에서 실험군 음용 30주 모델과 IP 16주 모델이 이 조건에 부합되었다.

결론

이상의 결과를 통하여 경구 투여시 단기간 투여하면 간경

변의 재현성이 낮고 재현성을 높이기 위해서는 장기간 투여해야 한다는 단점이 있고 개체간 무게 차이가 컸다. 무게는 700g, 적게는 200g의 무게차이를 보였다. 복강투여의 경우, 역시 단기간 여러 차례 복강 내 투여한 경우 실험동물이 많이 사망해 주의해야 한다. 간경변 유도 of 가장 이상적인 모델은 TAA 300mg/Kg IP 16주 모델이다. 간경변에 대한 재현성과 실험동물의 생존율 및 실험 기간을 고려하여 적절한 방법을 선택하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Friedman SL, *Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatology* 2003;38(Suppl 1):38-53.
2. Bataller R, Brenner DA, *Liver fibrosis. J Clin Invest* 2005;115:209-218.
3. Friedman SL, *Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatology* 2003;38(Suppl 1):38-53.
4. Bataller R, Brenner DA, *Liver fibrosis. J Clin Invest* 2005;115:209-218.
5. Mullen KD, McCullough AJ, *Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. Hepatology* 1989;9:500-503.
6. Muller A, Machnik F, Zimmermann T, et al. *Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats usefulness and reliability of this animal model. Exp Pathol* 1988;34:229-236.
7. An JH, Kim J, Seong J, *Rodex signaling by ionizing radiation in mouse liver. Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:86-94.
8. Sakaida I, Nagatomi A, Hironaka K, et al. *Quantitative analysis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy. Am J Gastroenterol* 1999;94:489-496.
9. Kim KH, Bae JH, Cha SW, et al. *Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. Toxicol Lett* 2000;114:225-235.
10. Jeong TC, Gu HK, Park JI, et al. *Pretreatment of male BALB/c mice with beta-ionone potentiates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Toxicol Lett* 1999;105:39-46.
11. Muller A, Machnik F, Zimmermann T, et al. *Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats-usefulness and reliability of this animal model. Exp Pathol* 1988;34(4):229-36.
12. Zimmermann T, Muller A, Machnik G, et al. *Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uie: WIST rats. Z Versuchstierkd* 1987;30:165-80.
13. Da-Hee Jeong, Ja-June Jang, Su-Jae Lee, et al. *Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl4 or thioacetamide. J Gastroenterol* 2001;36:24-33.
14. 황성규. 급성 간부전의 실험 동물모델. *대한소화기학회지* 2001;37:303-311.

15. Al-Bader A, Mathew TC, Abul H, et al. *Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. Molecular and Cellular Biochemistry* 2000;208: 1-9.
16. Mullen KD, McCullough AJ. *Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. Hepatology* 1989;9:500-503.