

철 과잉투여가 흰쥐의 Hepatic Fibrogenesis와 Collagen 및 TGF- β 유전자 발현에 미치는 영향

박종환 · 이현영 · 정연희 · 김해영* · 양영목†

건국대학교 의과대학 의예과

*경희대학교 생명과학부 및 식물대사 연구센터

Influence of Collagen and TGF- β Gene Expression and Hepatic Fibrogenesis by Iron Overload in Rat

Jong-Hwan Park, Hyun Young Lee, Youn-Hee Joung,
Hae-Yeong Kim* and Young Mok Yang†

Dept. of Premedical Course, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

*Institute of Life Sciences and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University,
Suwon 449-701, Korea

Abstract

Iron excess is known to affect long-term iron accumulation and tissue change such as fibrosis in liver. To determine the changes of expression level of genes associated with fibrosis by short-term iron exposure, we measured liver mRNA levels by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in rats fed dietary carbonyl iron (3%, wt/wt) for 9 weeks. The results showed that the expression of the collagen (I, III) and transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNAs was enhanced in high-dose iron treated rat, compared to normal-dose iron treated rat. An electron microscopy study revealed that excess iron caused increase of collagen fibrils in liver. The cell shapes and compositions of hepatocytes and extracellular matrix (ECM) in liver were changed by the iron-treatment. Also, necrosised hepatocytes were broadly seen in ECM. Taken together, we suggest that iron overload affects changes of collagen and TGF- β 1 gene expression and these changes are associated with liver fibrogenesis.

Key words: collagen, ECM, hepatocytes, RT-PCR, TGF- β 1

서 론

철(iron)은 하등 생물로부터 고등 생물에까지 성장과 다양한 대사경로의 유지를 위해 외부로부터 지속적인 공급을 필요로 한다. 철은 세포에서 hemoglobin, myoglobin, cytochromes과 같은 heme 복합체의 주요한 구성요소이며, 주요 기능은 전자 및 산소운반, 세포호흡, 그리고 DNA 합성 등 생리 과정에 필요한 미량 금속 이온으로 알려져 있다(1-3). 하지만 체내 철 성분이 과량으로 축적되면 오히려 세포 내 독성물질로 작용하게 되며, 특히 철의 주된 저장소인 간에 치명적인 작용을 한다(4). 세포 내 자유상태의 철 이온은 과산화수소와 Fenton 반응하여 세포에 독성을 나타내는 hydroxyl radical 형성을 촉매한다(4). 이렇게 생성된 hydroxyl radical들은 간 세포 내 소기관(mitochondria, microsomes)들의 인지질 막의 과산화 작용으로 기능상 변이를 유도하여 세포기능의 불균형 및 조직과피를 야기한다(5-7). 특히, 간 섬유화는 만성적으로 간의 손상을 받을 경우 나타나는 질환으로 바이러스

감염, 알코올 남용 또는 금속이온의 과잉 투여에 의해 발생하는 성질과는 달리 extracellular matrix(ECM) 성분의 과잉 침전이 특징적으로 나타난다(8-10). 또한, ECM은 간세포의 분화 및 발달과 기능에 중요한 역할을 수행한다(11,12). Hepatic stellate cell(HSC)은 lipocytes, fat-storing cell 또는 Ito cell로 알려져 있으며 간 섬유화의 발달에 관련된 non-parenchymal liver 세포로 알려져 있다(13). 또한 HSC는 정상 간 세포와 섬유화된 세포에서 ECM의 주요 공급원으로써 알려져 있고, 정상적인 간 세포에서는 hepatocyte와 밀접하게 접하고 있으며, vitamin A의 주요 저장소로서 정상시에는 비활성 상태로 존재한다(14). 그러나 간에 염증이 유발되면 다양한 cytokine들이 분비되어지며, 이들 중 특정한 cytokine들이 hepatic stellate cell을 활성화시켜서 결정적으로 collagen을 생산하여 섬유화에 이르게 하는 myofibroblast와 같은 모양으로 발달하게 한다(15). Extracellular matrix 단백질의 생산에 중요한 역할을 하는 cytokine 중에 transforming growth factor(TGF)- β 의 유전자는 rodent(16), chicken(17), human

†Corresponding author. E-mail: ymyang@kku.ac.kr
Phone: 82-43-840-3754, Fax: 82-43-851-9329

fibroblast(18) 그리고 rat myoblast(16)에서 collagen의 형성에 관여하며, 이러한 collagen 합성의 증가는 안정된 상태의 procollagen mRNA의 발현량 증가에도 연관성이 있는 것으로 나타났다(16,18). 현재까지 염증과정에 의해 발생하는 간 섬유화와 간경변 등의 기전과 세포의 형태변화는 구체적으로 잘 보고되어 있으나 철 이온의 과잉 투여에 의해 발생하는 간 섬유화의 분자적인 기작은 아직 뚜렷한 보고가 없어 이에 대한 연구가 필요하다고 본다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐에 철 이온을 과잉 투여하여 간 섬유화에 관여하는 유전자로 알려진 collagen type I, III와 TGF- β I의 mRNA 유전자 발현량의 변화를 측정하고, 간 조직 내 각 세포 소기관들의 미세 구조와 형태적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley계의 흰쥐는 대한실험동물센터로부터 구입하였고, carbonyl iron 시약은 Sigma사로부터 구입하였다. 실험에 사용된 모든 제한효소는 Boehringer Mannheim사에서 구입하였고, Semi-quantitative 정량 분석에 사용한 RT-PCR용 premixer는 Bioneer사(한국)로부터 구입하였다. RNA 실험에 사용되는 모든 완충용액은 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC, sigma)를 처리하여 사용하였으며, 모든 초자기구 등은 180°C에서 18시간 가열 처리한 후 사용하였다.

실험동물

대한실험동물센터(주)에서 구입한 Sprague-Dawley계 9주령의 수컷 흰쥐(260~300±5 g body wt)를 구입하여 동물사육실에서 일주일간 적응시켜 각각의 실험군당 3마리를 사용하였다. 동물 사육실 실험조건은 온도 21~25°C, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 명암은 12시간을 주기로 조절하였다. 본 실험 식이로는 삼양유지사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 carbonyl iron이 첨가되지 않은 대조군, 철 이온의 급여군 식이는 대조군의 식이를 분쇄하여 carbonyl iron(3%)을 첨가하고 사료제조기를 이용하여 사료 pellet을

만들었다. 사육기간중 식이 섭취량은 매일 측정하고 물은 종류수를 공급하였다.

흰쥐의 간 적출

흰쥐에서 간의 적출은 흉강 절개법을 실시하여 혈액을 완전히 방혈한 다음 가슴을 열고 간을 적출하여 액체질소에 급냉동시킨 후, 다음 이용 시까지 -70°C에 보관하였다.

흰쥐의 간에서 total RNA 분리

Total RNA의 분리는 Chomczynski와 Sacchi(19)의 방법을 이용하여 RNA를 분리하였다. 약 0.3~0.4 g의 간 조직을 knife로 잘라내어 tissue grinder에 넣은 후, 2 mL의 RNA extraction buffer[4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate(pH 7.0), 0.5% sarkosyl, β -mercaptoethanol, 2 M sodium acetate(pH 4.0), 50% H₂O-saturated phenol]를 첨가하여 조직을 완전하게 균질하였다. 간 조직을 충분히 균질화한 후, 2 mL tube에 1 mL씩 분리하여 넣고, 여기에 200 μ L의 chloroform을 첨가하여 얼음에 15분간 방치하였다. 그리고 4°C의 원심분리기로 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 새로운 tube에 옮긴 다음, 1 mL의 isopropanol을 잘 섞어 -20°C에서 10시간 이상 방치하였다. 그 다음 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후, 0.1% DEPC 처리된 70%의 에탄올로 3번 세척하였다. 그리고 pellet을 간단하게 실온에서 말린 후 50 μ L의 RNase-free water를 이용하여 pellet을 녹였다. RNA 정량은 spectrophotometer(Shimadzu사, Japan)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 추출된 total RNA의 농도 및 순도를 계산하였다.

Semi-quantitative analysis

RT(Reverse transcription)-PCR(Polymerase chain reaction): RT-PCR을 위하여 정상 식이군과 철 투여군의 흰쥐로부터 추출한 각각의 1 μ g의 total RNA를 주형으로 하여 Table 1에 예시된 각각의 reverse primer를 10 pmol씩 첨가한 후 여기에 reverse transcriptase 20 U, RNasin 10 U 그리고 2 mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNA-free water로 최종 부피를 20 μ L로 조정한 후, 57°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 94°C에서 5분간 처리한 후 cDNA로 사용하였다(20).

Table 1. PCR primers for semi-quantitative analysis

Target mRNA		Primer Sequence (5'→3')	PCR product size (bp)
Collagen α 1 (I)	Forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG	462
	Reverse	CACAAGCGTGCTGTAGGTGA	
Collagen α 1 (III)	Forward	AGATCATGTCTTCACTCAAGTC	463
	Reverse	TTTACATTGCCATTGGCCTGA	
TGF- β 1	Forward	CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC	298
	Reverse	CACGATCATGTTGGACAAGTCTCC	
GAPDH	Forward	GATGCTGGTGCTGAGTATGT	650
	Reverse	TCATTGAGAGCAATGCCAGC	

Secondary PCR : 앞서 reverse transcription으로부터 준비된 cDNA, PCR 완충용액, 2 mM dNTP, Table 1에서의 예시된 forward primer와 reverse primer를 넣고 여기에 Taq polymerase를 첨가하여 잘 혼합한 후 RNase-free water를 첨가하여 최종 부피가 20 μL가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. 반응조건은 thermocycler에서 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 40회 반복으로 PCR을 수행하였다.

Semi-quantitative analysis 결과 분석 : PCR 반응이 끝난 후 증폭된 각각의 sample을 ethidium bromide가 함유된 1.2% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에 올려놓고 자외선을 이용하여 증폭된 band를 확인한 후, Polaroid camera를 이용하여 사진촬영을 하였다. 그리고 Fluor-S multimagier system (Bio-Rad사, USA)을 사용하여 data를 분석하였다.

간의 미세구조적 관찰

조직의 준비 : 흰쥐는 ethyl ether 마취 하에서 흉강을 절개하고, 관류고정을 통하여 회생시켰다. 관류고정은 좌심실을 통해 0.9% phosphate buffered saline(PBS)를 주입한 다음, 0.1 M phosphate buffer로 완충된 2% paraformaldehyde (PFA)와 2.5% glutaraldehyde(GA) 혼합액을 주입하여 시행하였다. 관류고정이 끝난 후 간 조직을 절취하였다. 절취된 간 조직은 1 mm³의 크기로 세절한 후, 같은 고정액으로 8시간 동안 침지 고정시켰다.

투과 전자현미경 관찰 : 전 고정된 간 조직은 0.1 M phosphate buffer로 세척하였으며, 같은 buffer로 완충된 1% osmium tetroxide(OsO₄)에 1시간 고정하였다. 고정된 조직들은 ethanol series(50%, 60%, 70%, 80%, 95%, 100%×2 각 10분씩)의 탈수 과정을 거친 후 propylene oxide와 epon mixture의 혼합액으로 침투를 한 후 pure epon mixture로 60°C에서 72시간 동안 열 중합하였다. 열 중합에 의해 포매된 조직을 ultramicrotome(LKB-ultracut E)으로 1 μm의 두께로 준 초박절편(semithin section)을 제작하여 toluidine blue로 염색하여 전자현미경으로 관찰할 부위를 선택한 뒤, 80 nm의 두께로 초박절편(ultrathin section)을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 JEOL 1200EX II 투과형 전자현미경으로 관찰하였다.

통계 처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균(mean)±표준오차(SE)로 표시하였으며, 각 군의 통계적 유의성은 SAS(Statistical Analysis System) 프로그램을 이용하여 Paired-t test를 통하여 검정하였다.

결 과

Semi-quantitative 분석 기법을 이용한 유전자 발현 결과 분석

철 이온의 과량 섭취에 의해 간세포가 섬유화로 진행하는

과정에 관여하는 유전자들의 발현량 정도를 측정하기 위해 RT-PCR 기법을 이용한 RNA Semi-quantitative 정량분석을 하였다. 그 결과 Fig. 1~Fig. 3에서 볼 수 있듯이, 간 섬유화 진행에 관련된 유전자들은 정상 식이군에 비해 철 이온이 함유된 사료를 섭취한 군에서 유전자 발현의 유의적인 차이를 보였다. Type I collagen mRNA의 경우 철 이온이 포함된 사료를 섭취한 군이 정상 식이군에 비해 2배 이상의 유전자 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다(**p<0.01)(Fig. 1). TGF-β1 mRNA도 정상 식이군에 비하여 철 이온이 함유된 사료를 섭취한 군에서 1.5배 정도의 유전자 발현이 증가한 것으로 나타났다(p<0.05)(Fig. 3). 그러나, Type III collagen mRNA의 경우에는 약 1.1배 정도로 유전자 발현의 유의적인 차이를 볼 수 없었다(Fig. 2).

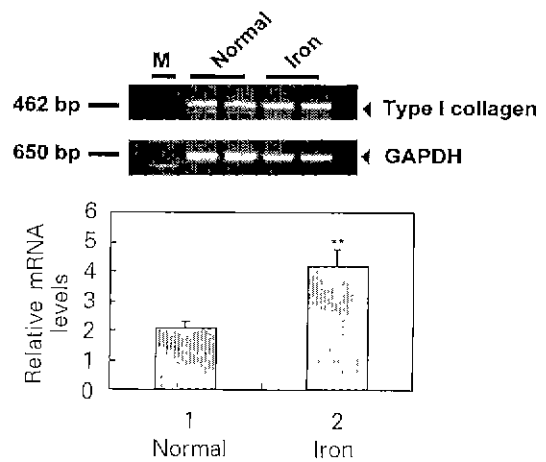


Fig. 1. Differential expression of type I collagen mRNA by semi-quantitative analysis. Rat used as control were fed a chow diet for 9wks. Iron-supplemented rats were fed the chow diet supplemented with 3% carbonyl iron (wt/wt). Type I collagen gene expression of iron-loaded group was increased 2.0-fold (**p<0.01). M=1 kb ladder.

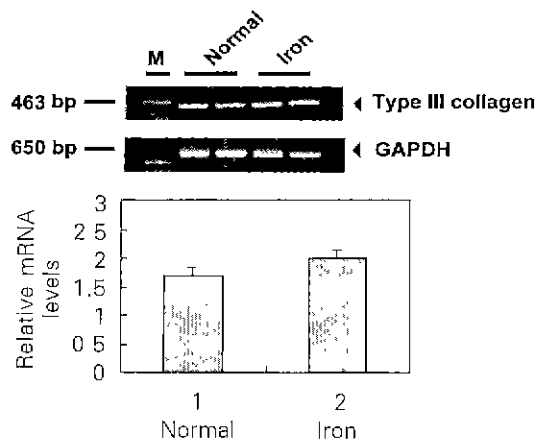


Fig. 2. Differential expression of type III collagen mRNA by semi-quantitative analysis. Type III collagen gene expression of iron-loaded group was increased 1.1-fold M=1 kb ladder

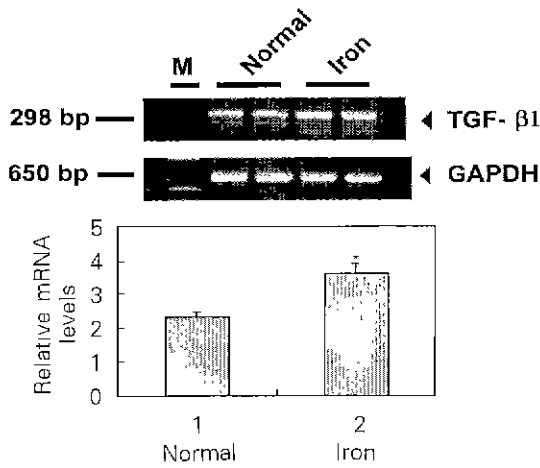


Fig. 3. Differential expression of TGF-β 1 mRNA by semi-quantitative analysis.
Levels of TGF-β 1 mRNA in iron-loaded group increased by factor of 1.5-fold (*p<0.05). M=1 kb ladder

간세포의 미세구조적 특징

간세포의 미세구조 변화를 투과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 정상 식이군의 간 세포 소기관(nucleus, plasma membrane, endoplasmic reticulum, lysosome, mitochondria 구조 및 bile canaliculi)들은 정상적으로 명확하게 나타났으며, 또한 hepatocyte와 hepatocyte 간의 연결이 밀착되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한, ECM 성분과 HSC도 정상적인 형태로 보였다(Fig 4, 5)

그러나 철 이온이 함유된 사료를 섭취한 군의 간 조직에서는 상당한 collagen 섬유가 축적되었으며, ECM이 대부분을



Fig. 4. Electron micrograph of a portion of normal rat liver (×8,000).
All organelles of hepatocytes were well-formed (nucleus, nuclear membrane, mitochondria, plasma membrane, endoplasmic reticulum, and granules). No collagen fibrils found Bar, 1 μm.

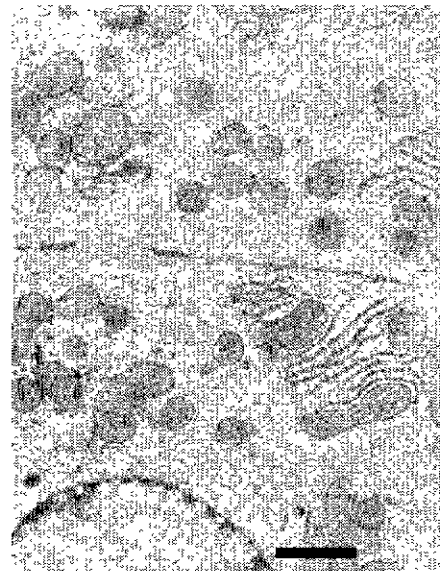


Fig. 5. Electron micrograph of a portion of normal rat hepatocyte (×8,000).
Hepatocytes were compactly brought together. Bar, 1 μm.

차지하며 또한 크기도 확장되어 있음을 보였다(Fig. 6). 그리고 HSC는 정상 식이군에 비해 2배 이상 크기로 비대해진 것이 관찰되었고, 세포내 구성도 정상 식이군과는 현격한 차이를 보였다. 그리고, Fig. 7과 8에서는 ECM의 거의 대부분이 collagen 섬유로 채워져 있었고, 세포외사에 의한 것으로 추정되는 손상된 세포들을 관찰할 수 있었으며, hepatocyte 내의 세포질 부분도 정상 식이군과는 상당한 차이를 보였다

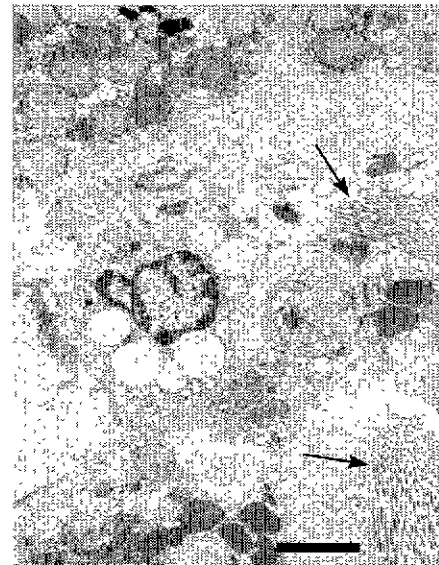


Fig. 6. Electron micrograph of a portion of iron-treated rat liver, after 9wk on 3% (wt/wt) carbonyl iron-supplemented diet (×4,000).
Hepatocytes and ECM of iron-loaded rat liver were significantly different from those of normal rat in shape and composition. The size of HSC was twice that of normal tissue. Bar, 2 μm



Fig. 7. Electron micrograph of a portion of iron-treated rat liver ($\times 12,000$).
Collagen bundles largely accumulated in Extracellular matrix (arrow). Bar, 500 nm.



Fig. 8. Electron micrograph of a portion of iron-treated rat liver ($\times 12,000$).
A necrosed cell, which is likely to be a hepatocyte, was seen spreading into ECM (arrow) Bar, 500 nm.

Fig. 8에서는 hepatocyte들로 추정되는 세포의 세포질이 ECM으로 퍼져 나오는 것을 볼 수 있었는데, 아마도 철 이온의 과량 침착으로 인한 괴사에 의한 것으로 추측되었다.

고 찰

Collagen은 척추동물에 있어 가장 많이 존재하는 구조 단백질로써 몸체 조직을 받쳐주며, 세포의 성장과 세포-세포

간의 상호작용에 있어 매우 중요한 역할을 한다(21). 그러나, 세포의 손상이나 염증 등의 손상요인이 있을 경우 collagen은 과다하게 발현되고 이에 의해 조직이 섬유화로 진행하게 된다. 특히 철 이온의 과잉 섭취에 의해 발생하는 free radical에 의한 세포의 산화적 손상(4)과 지질 과산화는 간세포 소기관(lysosomes, mitochondria, microsomes)들의 변이를 초래하여 collagen 유전자의 발현을 증가시켜 간 섬유화를 형성하는 하나의 요인으로 추정하였다(22). 최근 Bacon 등(23)은 흰쥐에 carbonyl iron(3%)을 함유한 사료를 섭취시킨 결과 철 이온을 섭취한 군의 간 조직중의 철 이온의 농도($4630 \pm 560 \mu\text{g Fe/g liver}$)는 대조군의 농도($210 \pm 110 \mu\text{g Fe/g liver}$)에 비해 뚜렷하게 증가됨을 밝혔다. 과잉 섭취된 철 이온들은 다른 조직보다도 특히, 간 조직에 대다수가 축적되어 간 섬유화와 간경변 등을 유발시킬 수 있다는 보고를 하였다(24,25). 본 실험결과에서도 collagen type I과 TGF-β1 mRNA의 유전자 발현 정도가 모두 유의적으로 증가됨을 보였다(Fig. 1, Fig. 3). 특히, 과잉된 철을 섭취한 흰쥐의 간에서 collagen type I mRNA의 증가는 간세포에 존재하는 유리상태의 철 이온으로부터 발생된 free radical에 의한 세포의 독성(4)과 지질 과산화 작용의 결과로써 macrophage 또는 lymphocyte로부터 분비된 cytokine들에 의해서 collagen 유전자의 발현을 증가시킨 것으로 추정하였다(16-18). 또한, pro-fibrogenic cytokine으로서 제시되는 TGF-β1은 monocyte와 fibroblast를 활성화시키며, interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor-α(TNF α)의 자극 그리고 그밖에 다른 ECM 성분들의 생성을 증가시킴으로써 섬유화에 관여하는 것으로 알려졌다(26). 만성적인 간의 손상이 일어나게 되면 HSC는 활성화되면서 증식하게 되고, α-smooth muscle actin이 다량 발현되면서 myofibroblast와 같은 표현형으로 형질전환되면서 vitamin A가 떨어져 나가고, rough endoplasmic reticulum(RER)이 증가하고, 세포의 크기가 커지며, 다양한 ECM 단백질의 합성이 증가되고, proliferative surface receptor와 collagen type I과 III와 같은 fibrogenic 유전자들의 발현이 증가되면서 간 섬유화의 진행이 시작된다고 보고하였다(27). 본 실험의 결과 또한 철 투여군에서 collagen 섬유화의 축적과 ECM 성분들의 증가 및 변성을 확인할 수 있었으며, HSC가 두배 이상으로 커졌고, 세포질 내 RER이 상당히 증가된 것을 관찰할 수 있었으며, 괴사된 것으로 추측되는 세포들이 다수 관찰되었으나, HSC의 유의할 만한 증식은 관찰할 수 없었다(Fig. 4). 이러한 결과는 철 이온의 과량 침착에 의해 유도되는 산화적 손상과 지질 과산화는 세포의 괴사 및 HSC의 활성화에 관여하여 ECM 성분들의 증가와 변성을 초래하여 결과적으로 간 섬유화를 유발하였음을 추측할 수 있었다.

정상적인 간세포에서는 소량의 collagen type I, III 그리고 IV가 존재하는데 이 중 collagen 섬유유인 type I과 III는 각각 40%씩 차지하며, basement membrane collagen인 type IV는 약 7%정도 존재한다. 그러나 섬유화와 간경변이 발병된

간에서는 collagen이 총량의 평균 5배 이상 증가한 것으로 나타났으며, 섬유화 형성의 진행에 따라 collagen의 조성비율은 3단계로 변한다. 섬유화의 진행 초기 단계에서는 basement membrane collagen의 축적이 증가하였고, 두번째 단계에서 granulation tissue의 reticular network 형성과정에서 type III collagen의 합성이 늘었으며, 마지막 단계인 섬유화가 정점에 달한 시기에서는 거의 대부분이 type I collagen 분자로 구성된 collagen 섬유가 뻘뻘하게 밀집된 형태를 나타낸다(28). 본 실험에서도 과잉 철 이온을 섭취한 군에서 간 조직의 변화를 관찰한 결과 collagen 섬유가 조직의 대부분을 점유하고 있었는데, 이것은 섬유화가 이미 마지막 단계에 이르렀다는 것을 추정할 수 있었다.

요 약

철 이온의 과잉 투여에 의한 흰쥐의 간 섬유화의 진행과 이에 관련된 유전자 발현 및 세포의 미세구조와 형태변화를 분석하기 위해 흰쥐에 carbonyl iron(3%)을 함유한 사료를 섭취시켜 인위적으로 철의 과잉상태를 유발하였다. 정상 식이군과 철 이온이 함유된 사료를 섭취한 군의 간 조직에서 total RNA를 추출하여 철 이온의 투여에 의한 collagen type I, III mRNA 및 TGF- β I mRNA의 유전자 발현 수준을 정량 분석하였다. 그리고 전자현미경을 이용하여 간 세포의 미세구조의 변화를 관찰하였다. 그 결과 정상 식이군에 비해 철 이온을 함유한 사료를 섭취한 군에서 type I collagen mRNA와 TGF- β I mRNA의 유전자 발현 수준이 유의적으로 증가됨을 확인하였으나, type III collagen mRNA의 유전자 발현 수준은 유의적인 차이를 발견할 수 없었다. 또한 철 이온의 과잉 섭취에 의해 간 조직 내의 각 세포의 변형이 일어났으며, 이로 인하여 hepatocyte의 괴사, 세포질의 변화, HSC의 증대, 세포 소기관들의 변화, ECM 성분의 변화 및 증대, 그리고 collagen 섬유의 상당한 축적을 확인하였다.

문 헌

- Dallman, P.R. : Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency *Annu. Rev. Nutr.*, **6**, 13-40 (1986)
- Eisenstein, R.S. and Blemings, K.P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J. Nutr.*, **128**, 2295-2298 (1998)
- Hentze, M.W. and Kuhn, L.C. : Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 8175-8182 (1996)
- Pippard, M.J. : Secondary iron overload. In *Iron metabolism in health and disease*, Brock, J.H., Halliday, J.W., Pippard, M.J. and Powell, L.W. (eds.), WB Saunders, London, p.271 (1994)
- Mario, C., Gaetano, B., Laura, D. and Paolo, A. : Manipulation of cellular iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects. *Blood*, **75**, 1903-1919 (1990)
- Yang, Y., Evette, R. and Elizabeth, A.L. The iron-responsive element binding protein. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19005-19010 (1992)
- Bacon, B.R. and Britton, R.S. : Hepatic injury in chronic iron overload. role of lipid peroxidation. *Chem. Biol. Interact.*, **70**, 183-226 (1989)
- Gianluca, S.B., Francesco, R., Antonio, D.S., Alessandro, C. and Luca, M. : Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells. differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology*, **29**, 1743-1751 (1999)
- Rojkind, M., Giambone, M.A. and Biempica, L. : Collagen type in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, **76**, 710-719 (1979)
- Schuppan, D. : Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver : collagen and glycoproteins. *Semin Liver Dis.*, **10**, 1-10 (1990)
- Brown, S.E., Guzelian, C.P., Schuetz, E., Quattrochi, L.C., Kleinman, H.K. and Guzelian, P.S. : Critical role of extracellular matrix on induction by phenobarbital of cytochrome P450 2B1/2 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Lab. Invest.*, **73**, 818-827 (1995)
- Saad, B., Scholl, F.A., Thomas, H., Schawwalder, H., Streit, V., Waechter, F. and Maier, P. : Crude liver membrane fractions and extracellular matrix components as substrata regulate differentially the preservation and inducibility of cytochrome P-450 isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 805-814 (1993)
- Friedman, S.L. : Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1828-1835 (1993)
- Blaner, W.S. : Retinoid (vitamin A) metabolism and the liver. In *The Liver - Biology and pathobiology*, Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D.A. and Shafritz, D.A. (eds.), Raven, New York, Vol. 9, p.529-541 (1994)
- Svegliati-Baroni, G., Baraona, E., Rosman, A.S. and Lieber, C.S. : Collagen-acetaldehyde adducts in alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Hepatology*, **20**, 111-118 (1994)
- Ignatz, R.A., Endo, T. and Massague, J. : Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6443-6446 (1987)
- Ignatz, R.A. and Massague, J. : Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4337-4345 (1986)
- Raghow, R., Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L. and Kang, A.H. : Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1285-1288 (1987)
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987)
- Park, J.H., Lee, H.Y., Roh, S.C., Kim, H.Y. and Yang, Y.M. : Screening of differentially expressed genes by desferrioxamine or ferric ammonium citrate treatment in HepG2 cells. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 396-401 (2000)
- Svegliati-Baroni, G., D'Ambrosio, L., Ferritti, G., Casini, A., DiSario, A., Salzano, R. and Ridolfi, F. : Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **27**, 720-726 (1998)
- Chojkier, M., Houghum, K., Solis-Herruzo, J. and Brenner, D.A. : Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J. Biol. Chem.*, **264**, 16957-16962 (1989)

23. Bacon, B.R., O'Neill, R. and Britton, R.S. : Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron load *Gastroenterology*, **105**, 1134-1140 (1993)
24. Bassett, M.L., Halliday, J.W. and Powell, L.W. Genetic hemochromatosis. *Semin Liver Dis.*, **4**, 217-227 (1984)
25. Tavill, A.S. and Bacon, B.R. : Hemochromatosis iron metabolism and the iron overload syndromes. In *Hepatology: a textbook of liver disease*, Zakim, D. and Boyer, T.D. (eds.), Saunders, Philadelphia. p.1273-1299 (1990)
26. Eghbali-Fatourehchi, G., Sieck, G.C., Prakash, Y.S., Maercklein, P., Gores, G.J. and Fitzpatrick, L.A. : Type I procollagen production and cell proliferation is mediated by transforming growth factor-beta in a model of hepatic fibrosis *Endocrinology*, **137**, 1894-1903 (1996)
27. Iredale, J.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 43-53 (1997)
28. Murata, K., Kudo, M., Onuma, F. and Motoyama, T. : Changes of collagen types at various stages of human liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*, **31**, 158-161 (1984)

(2001년 1월 22일 접수)