

한약재(자하거, 백출, 차전자) 추출물의 간경화 억제효능에 관한 연구

유병수 · 이종형 · 조성은 · 백승화*#

원광대학교 자연과학대학 생명나노화학부, *한의학전문대학원
(Received October 24, 2006; Revised February 5, 2007)

Antifibrotic Effects of Oriental Herbs Extraction on Liver Cirrhosis

Byung Soo Yu, Jong Hyung Lee, Syung Eun Cho and Seung Hwa Baek*#

Division of Nanobiochemistry, and

*Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — Hepatic cirrhosis is an important feature of chronic liver disease. Liver cirrhosis is characterized by hyper-accumulation of fibrous tissue components and is commonly observed in latter or terminal states of chronic hepatic disease. The antifibrotic effects on liver cirrhosis by oriental herbs extraction material were examined in bile duct ligated rats. Oriental herbs extraction (0.99 mg/kg rat weight/day) was administrated to cirrhotic rats for 4 weeks. Liver collagen content of bile duct ligated rats was significantly increased. And liver histology showed collagen fiber deposition was increased as well as the normal architecture was lost with large zone of necrosis being observed. Herbs extraction administrated rats showed significantly decreased liver collagen content, accumulation of collagen fiber in histological analysis, and biochemical markers of hepatic diseases. Those results demonstrate the usefulness of herbs extraction materials as an antifibrotic agent for liver cirrhosis.

Keywords □ liver cirrhosis, collagen accumulation, bile duct ligation

현재 사용되고 있는 원발성 담도성 간경화(primary biliary cirrhosis), 진행중인 과사후성 간경화, 간염, 간암을 치료하는 약물로는 penicillamine, azathioprine, colchicine, chlorambucil, cyclosporine, prednisolone, interferon¹⁻⁷⁾ 등이 추천되고 있지만, 낮은 효과와 높은 부작용 때문에 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있으며 이들 약의 병용투여 역시 효과는 증대시키지만 부작용도 같이 증가하게 된다고 알려져 있다. 이밖에 niacin이 NAD⁺ 소모로 인한 간독성을 완화시키고,⁸⁾ α -tocopherol 전처치는 CCl₄ 투여에 의한 간독성이 완화된다는 보고가 있다.⁹⁾

실험적 연구결과는 간경화를 유도한 랫드에 terlipression (glypression)을 투여하면 portal pressure와 cardiac index를 낮추는 효과가 있고,¹⁰⁾ lazardol(aminosteroid)는 iron-dependent lipid peroxidation의 강력한 억제제로 ischemia-reperfusion injury를 방어하는 효과가 α -tocopherol과 비슷하며 desferrioxamine에 비해 100배 정도의 높은 효과를 갖는다.¹¹⁾ 매우 잘 알려진 면역억제

제인 interferon은 *in vivo*와 *in vitro*에서 강력한 간경화 치료약으로서의 가능성이 연구되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 항섬유화 약물의 효과는 extracellular matrix(collagen, laminin, fibronectin, elastin etc.)의 생산의 억제, 분해의 촉진 및 축적을 억제하는 특이적인 약물로 prolyl 4-hydroxylase inhibitor가 새로이 연구되고 있고 그 기전은 hydroxylation 되지 않은 collagen의 세포내 분해를 증가시키고 섬유화를 억제시키는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 생약에서 기원한 약물로는 웅담의 주성분인 UDCA, Silybum marianum에서 추출한 silymarin에서 항섬유화 효능에 대한 보고가 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾

많은 연구와 노력에도 불구하고 지금껏 이렇다할 간경화 치료제가 알려져 있지 않은데 간경화 치료제라는 개념은 간경화를 발전시키지는 못하더라도 지속적인 진행을 지연 또는 억제 할 수 있는 효과가 있는 것으로 생각되고 있다. 간경화에 특이적으로 나타나는 collagen 축적과 생합성의 억제, 지연 또는 감소시킬 수 있는 약물 즉 항섬유화 효과가 있는 약물은 간경화 치료에 사용할 수 있는 가능성이 몹시 크다.

따라서 본 연구에서는 독성과 부작용이 적고 민간에서 간질환에 효능이 있다고 사료되는 한약제에서 추출한 물질을 랫드에 4주간 경구 투여하여 collagen 합성지표 및 축적지표를 사용하여

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4983
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

항섬유화 효과를 검색하였다.

실험방법 및 재료

간경화 유도 및 약물 투약

실험동물로서는 유한양행 중앙연구소에서 분양 받은 Sprague-Dawley 랫드(female)를 6주간 사육하여 사용하였다. 동물은 3군(대조군 : sham operation, 실험군 : BDL/S operation, 수술 후 한약제 추출물 투약군 : BDL/S 수술 후 한약제추출물 투약군)으로 구분하였고, 담도결찰 수술방법으로 랫드에 간경화를 유도하여 천연복합물 수침액(3 ml/day/rat)를 수술 후 2일 제부터 4주간 경구 투여한 다음 도살하여 혈청과 간조직을 시료로 사용하기 위해서 수집하였다.

한약제 추출물

자하거 20 g, 백출 10 g, 차전자 20 g을 2.00 l의 물에 넣고 12시간 중탕한 후 중간 크기 거름종이를 사용 맑은 용액을 얻은 후 동결건조하여 갈색 분말 10 mg(200 mg/kg)을 얻었다. 2 mg의 갈색분말을 30 ml의 물에 녹여 한약제추출 수용액을 얻었다. 모든 한약제는 익산시 한약상에서 구입하였고 모두 한국산약제를 사용하였으며 한약제추출물 투여량은 0.99 mg/kg(rat)/day 였다.

일반적인 관찰

랫드의 체중을 매 주마다 측정하였고, 귀, 꼬리, 발에서 황달의 유무를 확인하고 도살시 간, 신장, 비장의 무게를 측정하였다.

시료의 준비

간조직의 일부는 0.5×0.5×0.5 cm로 절단하여 일부는 10% 중성포르말린에 고정하여 H&E(hematoxylin and eosin), trichrome 염색에 사용하였으며, 나머지 조직은 총 collagen양 측정을 위해 -25°C에 보관하여 사용하였다. 부검시에 심장천자법(heart puncture)으로 얻은 혈액은 실온에서 약 2시간 방치 후 3000 rpm, 10 min 원심분리하여 혈청을 얻어 분주한 후 혈청 생화학적 검사와 혈청 중 PNIIP(procollagen type III peptide)를 정량하기 위하여 -25°C에 보관하였다.

혈청생화학적 검사

Alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline pho-sphatase(ALP), total bilirubin을 자동분석기(clinical chemistry analyser 400E)를 사용하여 분석하였다.

ELISA를 이용한 procollagen type III peptide의 정량

시료인 혈청을 계단희석하여 PNIIP 항혈청과 반응시킨 후 1% bovine serum albumin-PBS/T로 blocking 시킨다. 2차항체인

biotin conjugated goat anti-rabbit IgG를 가하고, peroxidase와 extravidin으로 반응시켜 peroxidase-antiperoxidase를 처리한 후 o-phenyldiamine hydrochloride(OPD)로 발색하였다. 20~30분간 발색한 다음 ELISA reader를 이용해 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 collagen양 측정

간조직에 존재하는 총 collagen양을 측정하여 간경화의 정도를 정량적으로 파악하기 위하여 hydroxyproline(hyp)의 함량을 조사하였다. 간조직 내 hyp양의 측정은 Jamall²⁰ 등의 방법에 따라 염산으로 간조직을 가수분해 시켜 일정량을 취하여 염산을 날려 보낸 후, 잔류물을 Isopropylalcohol에 녹여 chloramine-T로 산화시켰다. 발색제로서 Ehrlich's reagent solution(p-dimethylaminobenzaldehyde)을 사용하였고 558 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

조직염색

간조직을 일반적인 H&E 방법과 면역염색인 Trichrome 방법을 사용하였다.

통계처리

Student's t-test를 이용하여 mean±standard deviation으로 표시하였으며 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결 과

일반적인 관찰

실험군에서 생존율은 65%이었고, 수술 후 한약제추출물 투약군에서는 80%이었다. 실험군과 수술 후 한약제 투약군에서는 2~3일 후에 황달이 나타났으며 시간의 경과와 함께 수술 후 한약제 투약군에서는 황달이 실험군보다 약하게 관찰되었다. 또한 4주간의 관찰시기 동안에 죽은 랫드를 부검했을 때 proximal bile가 담즙의 과도한 정체로 팽창되었으며 장, 십이지장과의 유착이 관찰되었다. 수술 후 한약제 투약군에서 간종대, 비종대가 실험군보다는 경미하였으며(Table I), 실험군에서 담즙 정체는 약 5~20 ml 이었고 수술 후 한약제 투약군의 담즙 색은 실험군에

Table I - The weight of liver, spleen and kidney of rats

Group	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)	n
Normal	8.05±1.7	1.12±0.05	2.2±0.4	8
BDL/S	20.58±2.4**	3.93±0.21**	2.6±0.6	7
BDL/S-Hb	16.21±5.3**	1.96±0.96*	2.12±0.42	8

The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. *p<0.05, **p<0.01; Significantly different from sham operated group (normal), and *p<0.05; Significantly different from bile duct ligation operated group (BDL/S).

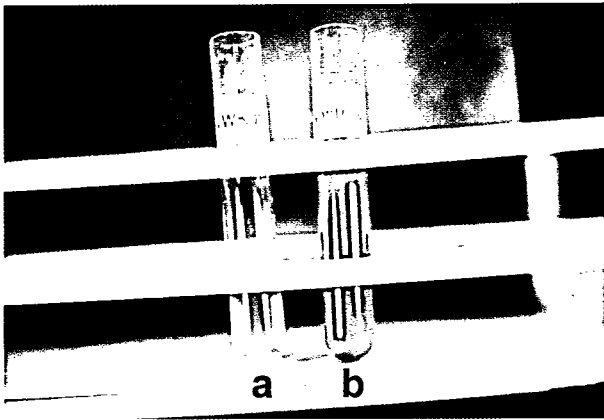


Fig. 1 – Color of bile juice.: Experimental group; a) BDL/S-Hb, b) BDL/S.

Table II – The ratio of liver weight/body weight (%) and the content of hydroxyproline in liver tissue and PNIIP in sera of control, BDL/S and BDL/S-SF group rats

Group	LW/BW (%)	Hyp (μg)/ 0.1 g liver	PNIIP (ng/ml)	n
Normal	3.67±0.26	46.8±11.7	31.5±3.6	8
BDL/S group	7.49±1.54**	85.3±13.4**	85.2±13.5**	7
BDL/S-Hb	4.64±1.22 *	63.4±23.0 *	50.3±13.0 **,*	8

The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. *p<0.05, **p<0.01: Significantly different from sham operated group (normal), and *p<0.05: Significantly different from bile duct ligation operated group (BDL/S).

비해 투명하고 양도 적었다(Fig. 1). 실험군의 담즙 색이 적색으로 나타나는 이유는 아마도 과도한 담즙정체로 간세포기능약화에 의한 현상으로 보여진다.

체중변화, 간장, 비장의 무게변화와 간/체중의 비

대조군 랫드의 체중은 4주간의 관찰시기동안에 지속적인 증가가 나타났으나, 실험군 및 수술 후 한약제 투약군에서 감소하거나 증가하는 추세가 4주 동안 관찰되었다. 간무게는 실험군과 수술 후 한약제 투약군에서 대조군에 비해 유의성 있게 높았으며(p<0.05), 또한 간과 체중의 비도 유의성 있게 높았다(p<0.05, Table II). 비장의 무게는 대조군이 가장 낮았고 실험군은 대조군보다 유의성 있게 높았으나, 수술 후 한약제 투약군에서는 대조군보다 높았으나 유의성은 검증되지 않았다. 신장의 무게는 3군간에 큰 차이가 없었다.

Table III – The value of clinical biochemistry in sera of normal, BDL/S and BDL/S-SF group rat

Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	t-Bilirubin (mg/dl)	BUN (U/L)	n
Normal	33.0±9.4	46.7±15.9	75.4±20.9	0.2±0.07	17.9±1.7	8
BDL/S group	62.0±15.8**	67.3±14.1	490.0±266.5**	4.5±3.0**	34.5±5.44**	7
BDL/S-SF	61.0±27.8**	61.7±16.4	449.0±244.0**	4.1±3.1**	30.2±4.5**	8

The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. **p<0.01: Significantly different from sham operated group (normal).

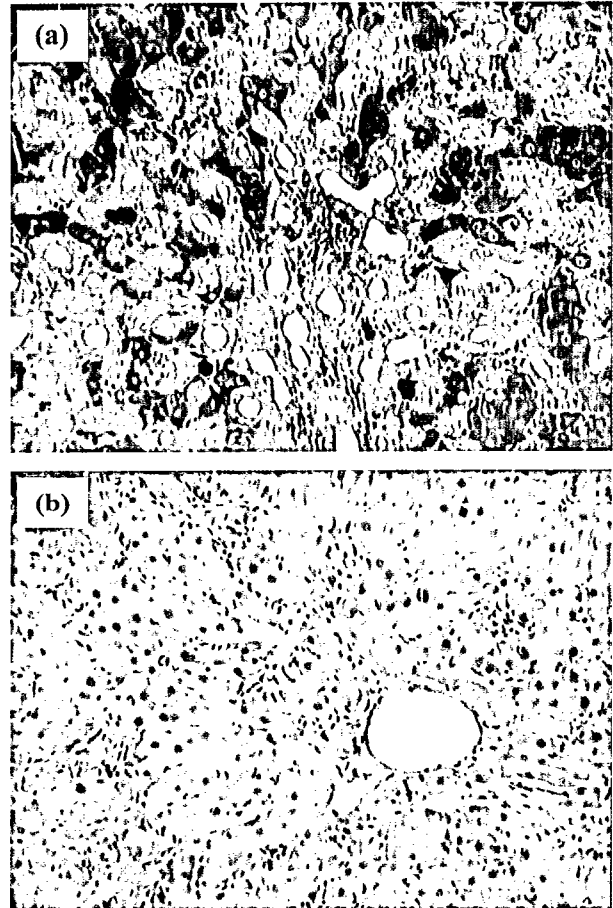


Fig. 2 – a) Photomicrograph of rat liver (BDL/S). b) Photomicrograph of rat liver (BDL/S-Hb). 푸른색 부분 : collagen bundle 형성 정도를 나타냄. Collagen bundle 이 수술 후 한약제 투여군 (b)에서 실험군(a) 보다 현저히 적게 나타남.

간조직 중 총 collagen(hyp)양의 변화

수술 후 한약제 투약군과 실험군 랫드의 간조직중 hyp양은 대조군과 비교했을 때 34.5%, 82.3% 유의성 있게 높게 나타났다(p<0.05). 수술 후 한약제 투약군에서는 실험군과 비교시 유의성 있게 낮은 수치(25.7%)로 나타났다(Table II, p<0.01).

PNIIP 변화

혈청 중 PNIIP는 대조군과 비교시 유의성 있는 증가가 실험군(84.7%)과 수술 후 한약제 투약군(59.7%)에서 관찰되었으며,

수술 후 한약제 투약군에서 실험군과 비교시 유의성 있게 낮은 PNIIP 수치(41.0%)가 관찰 되었다($p < 0.05$, Table II).

혈청 생화학적 검사

실험군과 수술 후 한약제 투약군은 대조군에 비해서 유의성 있게 ALT, AST, ALP, total bilirubin 및 BUN의 농도가 높았다 ($p < 0.05$, Table III). 그러나 수술 후 한약제 투약군의 생화학적 수치가 실험군보다 낮았으나 유의성은 나타나지 않았다(Table III).

조직학적 변화

Trichrome으로 염색한 대조군간조직에서 portal triads인 portal vein, portal artery, bile duct에서 collagen 섬유가 관찰되었다. 4 주 후에는 현저한 담관증식과 portal vein 사이에 collagen bundle 형성이 확실하고 담관과 담관들 사이가 서로 연결되어 scar formation과 일부에서는 portal-portal septum이 형성되고 새롭게 형성된 담관주위와 portal vein 주위의 collagen 섬유가 매우 두꺼워졌으며 hepatocytes island에 의한 micronodule과 광범위한 담관증식이 portal area뿐 아니라 stroma에서 확인되었다(Fig. 2). 수술 후 한약제 투약군 조직에서 mild bile duct proliferation, hepatocytes island, septum의 부위가 적게 또는 실험군과 비슷하게 관찰되었다(Fig. 2).

고 찰

간경화 치료에 대한 접근은 근원인자를 억제하거나 fibrogenesis (collagen 합성)의 진행을 지연 또는 멈추게 하고 더 나아가서는 섬유화 과정을 반전시켜 과도하게 간조직중에 침착된 extracellular matrix를 분해하는 것이다. 이러한 특성이 있는 항섬유화 약물의 효과검색에는 procollagen type III, type IV, laminin, metalloproteinase, prolyl hydroxylase 측정방법이 사용되고 있으나²¹⁻²⁴ 그 중에서 ongoing parameter(진행과정지표) 즉 fibrogenesis-marker(collagen 합성지표)로 알려진 혈청 중 collagen type III의 측정이 가장 확실한 방법으로 알려져 있다.^{25,26} 특히 만성 활동성 간염, 알콜성 간염, 원발성 담즙성 간경화, 간암 등²⁷⁻³¹에서 증가되고, 이들은 biopsy finding(병리적소견)과 상관관계가 있으며,³² 또한 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 PNIIP는 간조직중의 hydroxyproline,³³ procollagen type III peptide mRNA과 TGF β -1^{34,35} 사이에 상관관계가 있고, 임상에서는 C형 간염환자를 interferon으로 치료시에 collagen type III, 7S-collagen 감소에 대한 보고가 있다.³⁶

천연물에서 항섬유화 효과가 검색된 것은 Ginkgo biloba, 오미자를 랫드에 투여했을 때 총 collagen과 혈청 PNIIP의 수치가 낮아졌다는 연구결과가 있으며,^{37,38} 한의학 이론에 기초를 둔 UDCA, 닛셀(DDB) 등이 만성간질환(chronic liver disease) 치료

제로 사용되고 있고 최근의 발표에 의하면 동충하초(cordyceps sinensis)를 배양하여 얻은 추출물이 간손상을 유도한 후 mice에 3주간 경구투여 하였을 때에 간괴사, 염증, 섬유화가 관찰되지 않았다는 보고도 있다.³⁹

항섬유화 효과를 나타내는 prolyl hydroxylase inhibitor인 proline analogue는 합성물질로서 간조직 중의 collagen 축적을 선택적으로 억제하고(selective inhibition in hepatic collagen accumulation), UDCA, syrimarin, colchicine과 UDCA의 병용효과에 관한 보고도 있다.⁴⁰

따라서 본실험에서는 천연물에서 collagen 합성의 저해, 간조직 중의 축적을 억제할 수 있는 물질을 찾기 위해서 랫드에 담도결찰 수술을 시행하여 대조군, 실험군(BDL/S), 수술 후 한약제 투약군(BDL/S-Hb)으로 구분하고 수술 후 한약제 투약군에는 한약제 추출물 3 ml를 수술 후 2일 부터 투여하여 4주간을 관찰하였다.

그 결과 간과 체중과의 무게비는 수술 후 한약제 투약군에서 실험군보다 유의성 있게 낮았으며($p < 0.05$, Table I) 대조군보다는 높았으나 유의성은 없었다. 비장의 무게는 수술 후 한약제 투약군에서 대조군보다 높았으나 유의성은 없었고 실험군보다는 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$, Table I). 간기능을 나타내는 혈청 생화학적 지표는 대조군에 비해 수술 후 한약제 투약군과 실험군에서 유의성 있게 높았고($p < 0.05$, Table III), 수술 후 한약제 투약군과 실험군만을 비교했을 때는 수술 후 한약제 투약군이 실험군보다 약간 낮은 수치를 나타냈으나 유의성은 없었다(Table III).

김 등의 보고에 의하면^{38,41,42} D-penicillamin, colchicine, 동충하초의 수침액, 인삼과 삼칠추출물을 투약한 랫드의 혈청과 간조직에서 collagen 수치가 비투약군보다 낮았으나 유의성이 검증되지 않았으나, 본 실험에서는 혈청중의 PNIIP 수치가 수술 후 한약제 투약군에서 실험군보다 41% 유의성 있게 낮았고($p < 0.05$, Table II), 간조직중 collagen 축적지표인 hyp는 25.7% 유의성 있게 낮았으며($p < 0.05$, Table II), 혈청 중 PNIIP와 간조직중 총 collagen에서 상관관계는 나타나지 않았다. 간기능을 나타내는 혈청 생화학적 지표의 수치는 대조군에 비해 수술 후 한약제 투약군과 실험군에서 유의성 있게 높았고($p < 0.05$, Table III), 수술 후 한약제 투약군에서는 수치가 실험군보다 낮았으나 유의성은 없었다.

Trichrome으로 염색한 조직을 비교해 보면 수술 후 한약제 투약군 간조직이 때로는 실험군보다 bile duct proliferation, fibrosis의 정도가 비슷하거나 약간 경미하였으며 조직학적 변화의 큰 차이가 뚜렷한 것도 있으나 비슷한 것으로 보아 랫드에 한약제 추출물을 투약하지 않았을 때 치사율이 높았다. 4주간의 관찰시기 동안에 실험군 랫드에서 35%의 치사율은 수술 후 2~3주 동안에 나타났는데 이러한 원인은 간섬유화(경화)가 유도되는 과정에

서 proximal bile duct에 과도한 담즙의 정체와 소장, 위, 췌장의 유착에 의해 위·장관을 비롯하여 모든 생리기능의 저하에 의한 것으로 생각된다. 이에 비해 수술 후 한약제 투약군에서는 20%로 나타났는데 소장, 위, 췌장의 유착이 실험군보다 약간 경미하며 랫드의 간을 육안적으로 보면 50%는 간섬유화가 약하게 40%는 실험군과 거의 비슷하게 그리고 10%는 proximal bile duct가 파열되어 담즙이 복부에 샷다가 소멸하였고 현저한 체중감소가 관찰되었다.

Collagen 수치의 뚜렷한 감소에도 불구하고 수술 후 한약제 투약군과 실험군에서 혈청 생화학적 수치의 차이가 크게 없는 것은 본 실험에서 간섬유화 유도에 담도결찰 방법을 사용하였기 때문에 담관증식으로 인해서 많은 hepatocytes의 수적인 감소와 hepatocytes island에 의한 cell to cell interaction의 장애에 의해서 간세포의 기능이 약화된 것으로 사료된다.

결 론

담도결찰 방법으로 간섬유화를 유도한 경우에는 염증과 괴사의 정도를 반영하는 간효소 활성의 검사보다는 혈청과 간조직에서 collagen 양을 측정하여 항섬유화 검색을 하는 것이 좋고, 수술 후 한약제를 투약한 랫드는 실험군에 비해서 간섬유화(경화)가 진행되는 동안에 높은 생존율, collagen 생합성의 억제, 간조직중의 축적이 약화됨으로서 뚜렷하고 확실한 항섬유화 효과가 있는 것이 관찰되었다.

감사의 글

본 연구는 2005년 원광대학교 주산학술연구재단 지원에 의해 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Dickson, E. R., Flemming, T. R., Wiesner, R. H. and Baldus, W. P. : Trial of penicillamine in advanced primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 1011 (1985).
- 2) Neubauer, J., Cristensen, E., Portmann, B., Caballeri, J., Rodes, J. and Ranek, L. : Double blind controlled trial of d-penicillamine in patients with primary biliary cirrhosis. *GUT* **26**, 114 (1985).
- 3) Wiesner, R. M., Dickson, E. R., Lindor, D., Jorgensen, R., LaRusso, N. F. and Baldus, W. : A controlled clinical trial evaluating cyclosporin in the treatment of primary biliary cirrhosis: A preliminary report. *Hepatology*. **7**, 1025 (1987).
- 4) Batta, A. K., Saken, G., Arora, R. and Sheffer, S. : Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid metabolism in primary biliary

- cirrhosis. *Hepatology*. **10**, 414 (1988).
- 5) Schuppan, D. : Chronische Hepatitis-Antifibrotische Therapieausätze. *Z. Allg. Med.* **71**, 11531 (1995).
- 6) Ballardini, G., Faccani, A. and Bianchi, F. B. *et al.* : Steroid treatment lowers hepatic fibroplasia, as explored by serum aminoterminal procollagen III peptide in chronic liver disease. *Liver* **4**, 348 (1984).
- 7) Beukers, R. and Schalm, S. W. : Immunosuppressive therapy for primary biliary cirrhosis. *J. Hepatology*. **14**, 1 (1992).
- 8) Weitberg, A. B. and Corvese, D. : Niacin prevents DNA strand breakage by adenosine deaminase inhibitor. *Biochem. Biophy. Res. Comm.* **167**, 514 (1990).
- 9) Parola, M., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Albano, E., Biocca, M. E., Poli, G. and Dianzani, M. U. : Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*. **16**, 1014 (1992).
- 10) Lebec, D., Moreau, R., Cailmail, S., Sogni, P., Oberti, F. and Hadengue, A. : Effects of terlipression on hemodynamics and oxygen content in conscious portal vein stenosed and cirrhotic rats receiving propranolol. *J. Hepatology*. **17**, 102 (1993).
- 11) Cosenza, C. A., Cramer, D. V., Cunneen, S. A., Tusso, P. J., Wang, H. K. and Makowka, L. : Protective effect of the lazaroid U74006F in cold ischemia-reperfusion injury of the liver. *Hepatology*. **19**, 418 (1994).
- 12) Soresi, M., Bascone, E., Agate, V., Carroccio, A., Barresi, E., Cartabellota, A. and Montalto, G. : Serum variation of 2 markers of fibrogenesis in chronic hepatitis C treated with alfa interferon. *Prog. Med.* **88**, 73 (1997).
- 13) Craja, M. J., Weiner, F. R., Takahashi, S. and Giambrone, M. A. *et al.* : γ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology*. **10**, 795 (1989).
- 14) Granstein, R. D., Murphy, G. F. and Margolis, R. J. : Gamma interferon inhibits collagen synthesis *in vivo* in the mouse. *J. Clin. Invest.* **179**, 1254 (1987).
- 15) Bickel, M., Baader, E., Brocks, D. G. and Engelhart, K. : Beneficial effects of inhibitors of prolyl 4-hydroxylase in CCl₄-induced fibrosis of the in rats. *J. Hepatology*. **13**, 26 (1990).
- 16) Lacaille, F. and Paradis, K. : The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: A comparative *in vitro* study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology*. **18**, 165 (1993).
- 17) Poupon, R. E., Balkau, B., Eschwege, E. and Poupon, R. : The UDCA-PBC study group. Multicenter controlled trials of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1548 (1990).
- 18) Colombo, C., Crosignani, A., Assaisso, M., Maria, B. P., Podda, M., Giunta, A., Zimmer-Nechemias, Z. D. R. and Setchell, K. : Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis-associated liver disease. *Hepatology*. **16**, 924 (1992).
- 19) Boigk, G., Stroedter, L., Herbst, H., Waldschmidt, J., Riecken,

- E. O. and Schuppan, D. : Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*. **26**, 643 (1997).
- 20) Jamall, I. S. and Finelli, V. N. : A single method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **12**, 70 (1981).
- 21) Raedsch, R., Stiehl, A., Waldherr, R., Mall, G., Gmelin, K., Götz, R., Walker, S., Czygan, P. and Kommerell, B. : Procollagen-type III-peptide serum concentrations in chronic persistent and chronic active hepatitis and in cirrhosis of the liver and their diagnostic value. *Z. Gastroenterologie*. **20**, 738 (1982).
- 22) Collazos, J., Diaz, F. and Genolla, J. : Serum concentration of laminin in cirrhosis of the liver. *Gut*. **34**, 974 (1993).
- 23) Plebani, M. and Burlina, A. : Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin. Biochem.* **24**, 219 (1991).
- 24) Niemela, O., Risteli, J., Blake, J. E., Risteli, L., Compton, K. V. and Orrego, H. : Markers of fibrogenesis and basement membrane formation in alcoholic liver disease. Relation to severity, presence of hepatitis, and alcohol intake. *Gastroenterol.* **98**, 1612 (1990).
- 25) Torres-Salines, M., Pares, A., Cabeleria, J. and Jimenez, W. : Serum procollagen type III peptide as marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis. *Gastroenterol.* **90**, 1241 (1986).
- 26) Fabris, C., Federico, E., Toniutto, P. M. : A comparison of four serum markers of fibrosis in the diagnosis of cirrhosis. *Ann. Clin. Biochem.* **34**, 151 (1997).
- 27) Yamada, S., Suou, T., Kawasaki, H. and Yoshikawa, N. : Clinical significance of serum 7S collagen in various liver diseases. *Clin Biochem.* **25**, 467 (1992).
- 28) Rimmel, T., Rimmel, H. and Salupere, V. : Aminoterminal propeptide of type III procollagen and hyaluronan in patients with primary biliary cirrhosis: markers of fibrosis in primary biliary cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 1016 (1996).
- 29) Takamatsu, S., Nakabayashi, H., Okamoto, Y. and Nakano, H. : Noninvasive determination of liver collagen content in chronic hepatitis as variables. *J. Gastroenterol.* **32**, 355 (1997).
- 30) Farinati, F., Annoni, G., Donato, M. F., Nardelli, P., Bertozzo, A., De Maria, N., Zotti, S., Salvagnini, M., Martinez, D. and Naccarato, R. : Diagnostic and prognostic value of the determination of the aminopropeptide of type III procollagen in patients with primary liver cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 633 (1990).
- 32) Murawaki, Y., Ikuta, Y., Nishimura, Y., Koda, M. and Kawasaki, H. : Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 443 (1996).
- 33) Ruwart, M. J., Wilkinson, K. F., Rush, B. D., Kim, K. Y. and Schuppan, D. : The integrated value of serum procollagen type III peptide over time hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology*. **10**, 801 (1989).
- 34) Pierce, R. A., Glaug, M. R., Greco, R. S., Mackenzie, J. W., Boyd, C. D. and Deak, S. B. : Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J. Biolchem.* **262**, 1652 (1987).
- 35) Savolainen, E. R., Brocks, D., Ala-Kokko, L. and Kivirikko, K. : Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine induced hepatic fibrosis. *Biochem. J.* **249**, 753 (1988).
- 36) Ishibashi, K., Kashiwagi, T., Ito, A., Nagasawa, M., Tomaya, T., Ozaki, S., Naito, M. and Azuma, M. : Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology*. **24**, 27 (1996).
- 37) Li, W., Dai, Q. T. and Liu, Z. E. : Preliminary study on early fibrosis of chronic hepatitis B treated with Ginkgo biloba Composita. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih.* **15**, 593 (1995).
- 38) Park, U. J., Kim, K. Y., Kim, J. B., Kim, S. Y., Lee, S. Y. and Sohn, D. W. : The antifibrotic effects of polysaccharides extracted from Gornoderma lucidum on the experimental hepatic cirrhosis. *Yakhak Hoeji* **38**, 3384 (1994).
- 39) Manabe, N., Sugimoto, M., Azuma, Y., Takemoto, N. and Yamashita, A. : Effects of the mycelial extract of cultured cordyceps sinensis on *in vivo* hepatic energy metabolism in the mouse. *Jpn. J. Pharmacol.* **70**, 85 (1996).
- 40) Poupon, R. E., Huet, P. M., Poupon, R., Bonnand, A. M., Nhieu, J. T. and Zafrani, E. S. : A randomized trial comparing colchicine and ursodesoxycholic acid combination to ursodesoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. **24**, 1098 (1996).
- 41) Lee, G. M., Moon, S. J., Hwang, W. J. and Kim, K. Y. : The comparison and screening for antifibrotic effects of cordyceps sinensis (Dongchunghacho) by gimun (Liv 14) acupuncture and oral application in liver fibrosis induced rats. *J. Kor. Acupun. Moxibustion Soc.* **15**, 265 (1998).
- 42) Kim, K. Y., Lee, G. M. and Yu, B. S. : The study for antifibrotic effects of water extracts from ginseng and notginseng in experimental liver fibrosis (cirrhosis). *J. Kor. Acupun. Moxibustion Soc.* **16**, 305 (1999).