

간섬유화 동물에서 D-페니실라민의 항섬유화 효과 검색

김기영* · 윤기중 · 문형배
원광대학교 의과대학 병리학 교실
(Received March 17, 1996)

The Antifibrotic Effects of D-penicillamine in Liver Fibrosis Animal

Ki Young Kim*, Ki Jung Yun and Huyng Bae Moon
Pathology, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—One of therapeutics in liver disease (morbus wilson) is D-penicillamin (D-pen: D-3-mercapto-valin). Especially the cross-linking of collagen molecules could be inhibited by D-pen in extracellular space. In this study we investigated the antifibrotic effects of D-pen in rats that were induced the liver fibrosis by bile duct ligation and scission (BDL/S). Rats were treated for 4 weeks with D-pen after BDL/S operation or sham operation. The balance between fibrogenesis-marker (PNIIP) and the fibrolysis-maker (PNIVP) were observed in sera by RIA (radioimmunoassay), and the parameter of collagen deposition in liver tissue (hydroxyproline: HYP) was measured by colorimetry. The weight of liver in BDL/S operated group was increased significantly in compared with sham operation group ($15.2 \text{ g} \pm 1.1$, vs $11.9 \text{ g} \pm 3.9$; $p < 0.005$, $p < 0.05$). The rats group treated by D-pen showed the lower level of PNIIP ($6.7 \text{ ng/ml} \pm 1.5$, vs $9.5 \text{ ng/ml} \pm 2.8$) and the higher value of PIVCP ($14.0 \text{ ng/ml} \pm 1.9$, vs $7.9 \text{ ng/ml} \pm 1.5$) in sera that compared to untreated rats. The content of HYP was decreased by 141% in BDL/S with D-pen treated group than that of it in BDL/S group. No correlation was revealed between collagen parameters in sera and HYP in liver tissue of BDL/S operated and D-pen treated rats. The group treated with D-pen showed the lower value of clinical biochemistry parameters (GOT: glutamate oxalacetate transaminase, Total-Bilirubin) in compared with only BDL/S operated rats, but the value of GPT (glutamate pyruvate transaminase) and Alkaline phosphatase in two BDL/S groups was nearly same. In the histological finding, we observed mild bile duct proliferation, weak inflammation and fibrosis in BDL/S with D-pen treated group, but BDL/S operated group showed the formation of septum (island of hepatocytes), massive bile duct proliferation. This result represents that the BDL/S operation induces liver fibrosis (cirrhosis) in 4 weeks, and D-pen inhibits the synthesis of collagen weakly and stimulates the degradation of collagen in the extracellular space. We conclude that the monitoring of PNIIP, PIVCP in sera is useful parameter for screening of antifibrotic effect, and D-pen delay the liver fibrosis.

Keywords □ Experimental liver fibrosis; Procollagen type III; Procollagen type IV; D-penicillamin; Hydroxyproline.

간조직에 있어서 동양혈관주위와 간정맥주위에 세포 외기질(extracellular matrix: collagen, proteoglycan, glycoprotein, elastin) 특히 collagen fiber(콜라젠섬유)의 과도한 침착으로 인한 형태학적 변화는 간경

변과 간섬유화를 의미한다. 간섬유화는 간경변의 전단계로서 collagen fiber의 과도한 축적은 간경변과 동일하나 간에서 구조 변화가 나타나지 않는 상태이며, 간경변은 간구조의 파괴 또는 변형을 수반한다. 또한 간경변은 간세포괴사후에 미만성 섬유증식과 소결절의 형성이라고 하고¹⁾, Popper 등은 간세포괴사보다는 virus, 약물, alcohol, 담즙정체, 증감속 축적 등에 기인하는 지속적이

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-50-6775 (팩스) 0653-52-2110

고 반복적인 만성간손상에 의한 새롭게 생성된 세포외기질의 광범위한 축적에 기인하는 섬유화와 간세포의 재생결절의 형성 및 반흔이라고 보고 하고 있다.²⁾ 세포외기질중에서도 collagen은 난용성의 섬유를 형성하며 간조직중에는 6가지 아형(subtype)이 있는데, 특히 collagen type I, III, IV, V, VI, XIV는 fibril collagen으로, collagen type IV는 기저막 collagen으로 구분된다. Collagen 분자들은 procollagen 형태로 세포내에서 형성되어 세포밖으로 유리 되고, N-, C-terminal endopeptidase에 의해 분해되어 crosslinking되면서 collagen fiber를 형성하여 조직중에 존재한다. 이러한 N-, C-procollagen extension peptide는 체액중에 순환함으로써 측정이 가능하며, 특히 간질환에 있어서 혈청중의 collagen type III와 collagen type IV의 수치 증가는 만성활동성 간염^{3,4)}, 알코올성 간염⁵⁾, 만성간질환^{6,7)}, 원발성담즙성간경변^{8,9)} 등에서 간질환의 진단지표로서 연구 되어 있으며, 또한 조직중의 형태학적 소견¹⁰⁾, 총 collagen양¹¹⁾, procollagen type III mRNA^{12,13)}와 좋은 상관관계가 있다고 보고 되어 있다. 비공격적이며 재현성을 지닌 collagen 역동학적 대사과정의 표지자인 혈청중의 PNIIP와 PNIVP의 측정은 간질환의 진행과정의 환자의 상태파악과 나아가 항섬유화 약물효과 검색에 유용한 지표로서 알려져 있다.

지금까지 효능이 있는 항섬유화 약물 치료방법이 결여되어 있는 원인으로서는 간섬유화에 분자적 세포생물학적 변화과정의 불충분한 이해와 설명, 적절한 실험동물모형의 확립 또는 개발, 장시간 투여후 환자에서 효과 관찰시의 문제점등이 있다.¹⁴⁾ 그럼에도 불구하고 현재 사용되고 있는 원발성 담도성 간경변 및 진행성 피사후성 간경변의 치료제로서 면역억제제, 면역조절제 등의 D-penicillamine (D-pen), azathioprine, colchicine, chrolambucil, cyclosporin, prednisolon, ursodesoxycholic acid, prostaglandin E, interferon- γ 등이 사용되고 있거나 연구되고 있다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 이 중에서도 D-pen은 세포밖에서 collagen섬유의 교차결합을 저해하는 작용이 있는데 이는 collagen합성과 분해의 균형 변화를 의미하며, 또한 항섬유화 효과가 있을 가능성을 시사 한다. 이에 본연구에서는 담도손상을 가하여 간섬유화를 유발시킨 실험동물에 D-pen을 4주간 투약하여 혈청과 조직중의 collagen의 역동학적 및 조직학적 변화를 관찰하여 항섬유화효과를 검색하고자 하였다.

실험방법

실험동물과 실험군의 분류 - 성숙된 자성 위스타렛 드를(230~300 g) 실험동물로 사용하였으며, 6마리씩을 한군으로 하여 대조군, 대조및 투약군, 간섬유화유도군, 간섬유화유도 및 투약군으로 구분하여 밤과 낮의 리듬을 주었고, 먹이와 물은 자유롭게 공급하였다.

간섬유화유도 및 D-pen의 투약방법 - Kountras 등¹⁹⁾의 방법으로 실험동물에 담도결찰수술을(bile duct ligation/scission) 행하여 4주간을 관찰 하였으며, D-pen은 상용량의 1.5배(10 mg/kg/day)를 먹이와 혼합하여 4주간 투여하였다. 관찰기간후 실험동물을 희생 시켜 간조직과 혈청을 얻어서 시료로 사용하였다.

혈청중의 PNIIP, PIVCP측정 - Schuppan 등²¹⁾의 방법으로 시행하였으며, PNIIP, PIVCP를 일정농도로 희석하여 표준물질로 사용하였고, 측정하고자 하는 시료는 1 : 4, 1 : 20, 1 : 80으로 희석하여 일차 항체를(rat-PNIIP)를 넣고 PNIIP, PNIIVP는 ¹²⁵I를 사용하여 표지하여 12000 rpm/100 μ l을 가한후, 이차항체로서 goat anti rabbit IgG와 반응 시킨후 원심분리하여 γ -scintillation counter (Berthold)로 측정하여 계산하였다.

혈청에서 생화학적검사 - GOT, GPT, alkaline phosphatase (ALP), creatinin, total bilirubin을 자동분석기 (clinical chemistry analyser : gilford 400E)를 사용하여 분석 하였다.

조직중의 hydroxyproline 측정 - Jamall 등²²⁾의 방법에 따라 염산으로 간조직을 가수분해 시켜 일정량을 취하여 염산을 날려 보낸후, 잔류물을 Isopropylalcohol에 녹여 chloramine-T로 산화 시켰다. 발색제로서 ehrlich's reagent solution (p-dimethylaminobenzaldehyde)을 사용하였고 558 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

조직염색 및 소견 - 조직을 10% 중성포르말린에 고정후, paraffin으로 embedding하여 일반적인 H & E 염색과 -75°C에서 보관한 조직을 절편하여 Goldstein방법에²³⁾ 따라 APAAP (alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase) 염색을 하였다. 조직 소견은 염증세포수의 증가, 담관증식, 섬유화정도에 따라 약(+), 중간(++), 강(+++)으로 구분 하였으며, collagen type III, IV 항체를 사용하여 collagen fiber의 분포양

상을 관찰하였다.

통계처리 - student's t-test를 행하였고 median \pm standard deviation으로 표시 하였으며 p-value를 구하여(p<0.005, p<0.05) 유의성을 검증 하였다.

결 과

일반적인 고찰 및 체중변화, 간장무게의 변화 - 실험 동물은 대조군에서는 일반적인 상태가 양호 하였으며, 간섬유화유도군에서(투약, 비투약) 2~4일 사이에 황달 현상, 1~2주 사이에 체중의 감소가 관찰 되었고, 그리고 3~4주사이에는 처음의 체중을 다시 회복 하였다. 간섬유화 유도 수술후 4주간의 관찰시기 동안에 랫드의 치사율은 각각 12.5%로서 투약군과 비투약군에서 동일하였다. 간장의 무게는 대조군에서 7.8 ± 0.5 g, 비투약 간섬유화유도군 15.2 ± 1.1 g, 간섬유화유도 및 D-pen투약군에서 11.9 ± 3.1 g으로 비투약 간섬유화군에서 간중대가 유의성 있게 나타났다.(p<0.0005, Tab. 1)

조직중의 hydroxyproline 함량 - 대조군 ($1.2 \text{ mg} \pm 0.3$, $1.3 \text{ mg} \pm 0.3$)과 비교시 hyp치는 비투약 간섬유화 유도군에서 358%, 투약군에서 217% 유의성 있는 증가를 보였으며(p<0.005, p<0.05), 간섬유화를 유도한 투약군 hyp치는 비투약군과 비교시 감소된 수치가 나타났으나 유의성은 검증되지 않았다.(Table I)

혈청중의 PNIIP 및 PIVCP 변화 - 대조군의 투약군과 비투약군에서 PNIIP, PIVCP 수치는 별 다른 차이가 없었으며(Tab. II), 대조군과 비교시 간섬유화를 유도한 비투약군에서는 PNIIP, PIVCP 수치가 각각 250% (P<0.05), 160%, 간섬유화를 유도하여 투약한 군에서는 148%, 258% (P<0.005) 유의성 있게 증가하였다.(Table II, Fig. 1)

혈청중의 생화학적검사 - 간섬유화 유도군과 대조군

Table I - The weight of liver in rats and the value of hydroxyproline in liver tissue of rats

Group	Liver weight (g)	HYP (mg/liver)
untreated control	7.8 ± 0.5	1.2 ± 0.3
treated control	8.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3
untreated BDL/S	$15.2 \pm 1.1^{**}$	$5.5 \pm 1.0^*$
treated BDL/S	$11.9 \pm 3.9^*$	3.8 ± 0.9

D-penicillamin treated period was 4 weeks, BDL/S : bile duct ligation and scission.
The data shows M \pm SD, **p<0.005, *p<0.05 : significantly different from control.

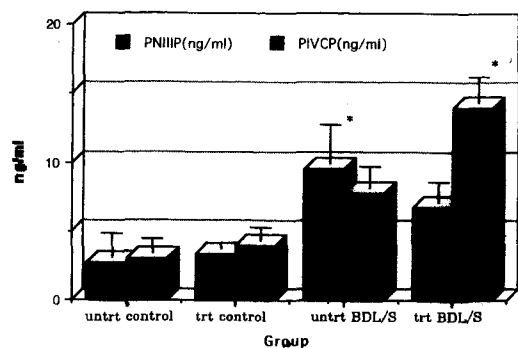
에 있어서 creatinin치는 변화가 없었으며, 대조투약군 랫드와 비투약군 랫드 혈청에 있어서 GOT, GPT, ALP, T-bili치는 정상범위에 머물렀고, 단지 ALP치가 대조투약군에서 86.9% 증가하였다. 간섬유화를 유도하여 약물을 투여하지 않은 동물의 혈청에서 GOT, ALP, t-bili치의 유의성(P<0.005) 있는 증가가 나타났으나, 투약군에서는 GOT와 t-bili치 증가의 정도가 경미하였다(Table III).

간조직의 형태학적 소견 - 대조군에서 면역화학염색시 collagen type III는 central vein, portal triad 주위에서 얇은 fibril을 형성하였고(Fig. 2A), collagen type IV는 동양혈관과 portal triad에서 미세한 collagen 섬유가 관찰 되었다.(Fig. 2B) 비투약 간섬유화 유도군 간조직에서는 collagen type III와 IV가 stroma에 두꺼운 fibril을 만들어 광범위하게 존재하고

Table II - The value of procollagen type III-peptide and procollagen type IV-peptide in sera of BDL/S with D-pen treated rats group and untreated rats group.

Group	PNIIP (ng/ml)	PIVCP (ng/ml)
D-pen untreated control	2.7 ± 1.8	3.0 ± 1.0
D-pen treated control	3.3 ± 0.4	3.9 ± 1.0
D-pen untreated BDL/S	$9.5 \pm 2.8^*$	7.8 ± 1.5
D-pen treated BDL/S	6.7 ± 1.5	$14.0 \pm 1.9^{**}$

D-penicillamin treated period was 4 weeks, BDL/S : bile duct ligation and scission.
The data shows M \pm SD, **p<0.005, *p<0.05 : significantly different from control.



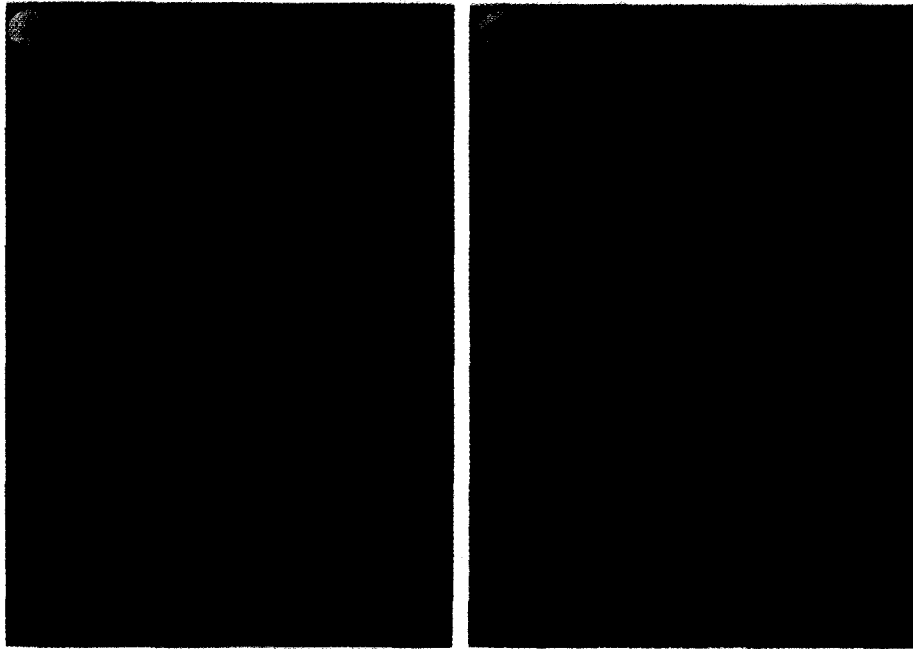
D-penicillamin treated period was 4 weeks, BDL/S : bile duct ligation and scission. untrt : untreated with D-pen, trt : treated with D-pen. * p<0.005, *p<0.05 : significantly different from control

Fig. 1 - The diagramm of PNIIP-level and PIVCP-level in sera of rats.

Table III—The value of clinical biochemistry in sera of rats

Group	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	t-bili (μM/l)
D-pen untreated control	51±25	17±10	30.5±7.9	11.3±2.3
D-pen treated control	47±10.8	19.5±4.1	57±13.7	5.7±2.2
D-pen untreated BDL/S	153.8±30.4**	22±1.5	238±56.4**	114.2±47.3**
D-pen treated BDL/S	110.2±11*	24±2.3	236±43.4**	45.1±30.6

D-penicillamin treated period was 4 weeks, BDL/S : bile duct ligation and scission.
The data shows M±SD, ** p<0.005, *P<0.05 : significantly different from control.



a. primary antibody is PNIIP

b. primary antibody is PIVCP.

Fig. 2—The section of liver in sham operated rats (APAAP-staining, X 80)

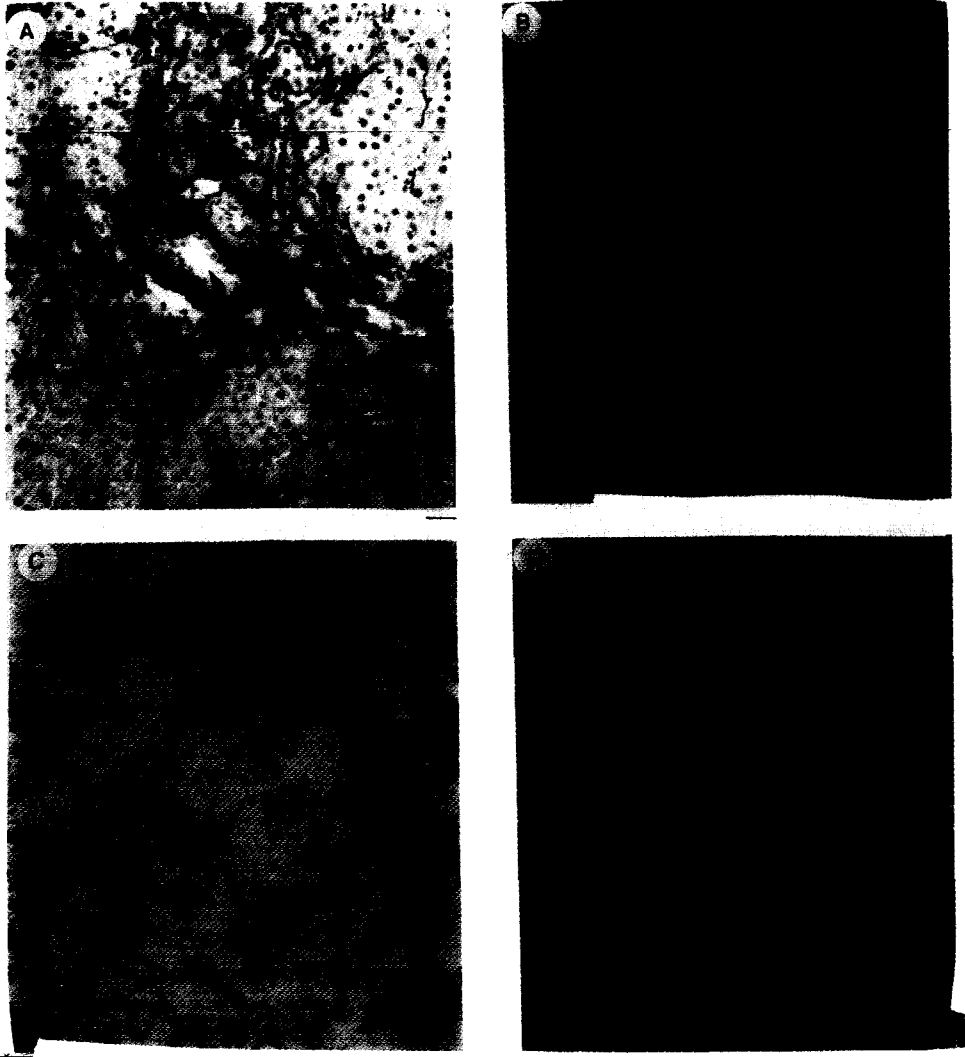
(Fig. 3A, 3B, 3C, 3D), 염증세포수의 증가(+++), 담관증식(+++), 간세포들이 담관증식에 의해 격리되어 섬들이 관찰 되었으며(Fig. 4A, 4B), portal-portal septum, 약간의 portal central septum을 형성하였다. 투약군에서 stroma와 portal triad주위의 fibril이 나타났고 septum형성은 되지 않았으며, 염증세포나 담관증식은 비투약군에 비해서 약간은 경미하였다.(Fig. 3c, 3d)

고 찰

간섬유화의 치료는 근원적인 요소들을 제거하거나 (virus, alcohol, 약물등) 치료하는것, collagen의 과도한 생성억제 또는 지연, 섬유화과정을 반전시켜 col-

lagen섬유를 분해 시키는것이라 할 수 있다. D-pen은 근본적으로는 중금속 해독제로서 특히 간조직중에 축적되어 있는 cu++와 chelating하여 cu++을 배설시켜 wilson씨병에 치료효과가 있으며, 원발성 담즙성 간경변시에는 약물투여중에 단백뇨, 피부에 대한 반응, 위장관 장애등과 같은 부작용에 의해 치료중단으로 인해서 효과 검색시에 문제점^{23, 24)}, 알코올성 간질환시에 proline hydroxylase의 활성 증가²⁵⁾, 또한 세포밖에서 collagen의 교차결합(crosslinking)을 저해하는 작용이 있다고 보고 되어 있다.²⁶⁾ D-pen이 collagen 합성과정중의 한 단계를 저해 한다는 것은 조직중의 collagen 축적을 감소시킬수 있는 가능성을 제시한다.

본 연구에서 D-pen이 collagen 합성과 분해 즉 불균형에 의한 간섬유화진행시에 영향을 미칠 수 있는가를



A, C : primary antibody is PIVCP

B, D : primary antibody is PNIIP

Fig. 3—The section of liver in BDL/S operated rats that were treated with D-pen or untreated rats. (APAAP-staining : X 80, X 160)

간질화진단 방법으로서 비공격적이며 재현성을 지닌 collagen 합성과 분해의 진행과정을 나타내는 지표인 혈청중 PNIIP (fibrogenesis-maker), PIVCP (fibrolysis-maker) 와 간조직중의 HYP (총collagen) 수치를 비교한 결과 섬유화 억제 효과가 있음이 검색 되었다.

무엇보다도 간섬유화 약물 검색을 위해서는 적절한 실험동물모델의 선정인데, 간섬유화를 유도 하기 위하여 위스타 랫드에 담도결찰 수술방법을 사용하였는데 이 방법은 다른 간섬유화 실험동물모델보다 치사율이 낮고 간섬유화 유도가 CCL₄보다 빠르며 전반적인 상태가 좋다

는 장점이 있어 선택하였다. 간섬유화는 비투약군 실험 동물을 부검시 간종대가 빠르게는 2~3주에, 4주째에는 유의성 있게 나타났으며($p < 0.005$, Tab. I), 간조직에서 형태학적 변화는 담관증식, 염증세포의 증가, septum형성과 과도하고 광범위한 collagen fiber의 축적이 조직화학염색시에, 강한 간섬유화 + + +, 담관증식 + + +, 염증세포수의 증가 + + +가 관찰 되었다. 대조군에 비해서 간섬유화 유도군에서 혈청중 PNIIP치와 조직중 HYP 수치는 각각 250%, 358% 유의성 있게 증가 하였으며($p < 0.005$, $p < 0.05$) hyp과 PNIIP, HYP과

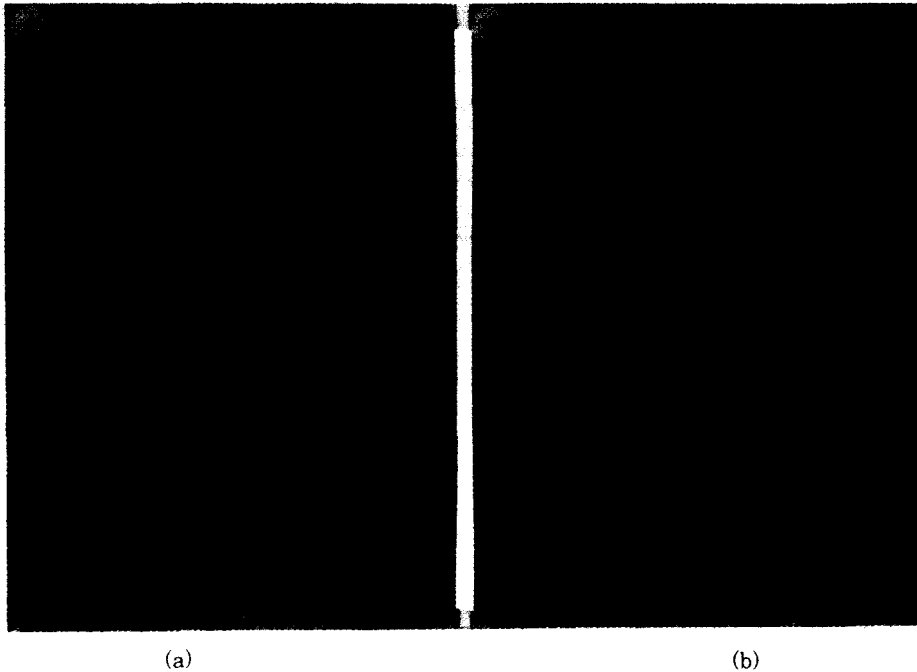


Fig. 4 — The section of liver in BDL/S operated rats (H & E, X 160).

PIVCP 진단지표사이에 좋은 상관관계를 나타내었다. ($r=0.80$, $r=0.81$) 혈청진단 지표인 PNIIP 수치와 조직중의 HYP 수치간의 좋은 상관관계는 Ruwart등의 보고와도 일치 한다.¹¹⁾ 그러나 혈청 PIVCP와 조직중 HYP와의 상관관계에 대한 보고는 없으나, 본 실험에서는 좋은 상관관계가 나타났다. 이로서 담도 결찰 수술방법은 간편하며 확실한 간섬유화 유도에 사용할 수 있으며, 혈청중 PNIIP, PIVCP는 간섬유화 진행과정을 잘 나타내는 유용한 진단지표라고 사료된다.

일차적인 실험결과에서 담도결찰 수술 4주후 간섬유화가 최대한으로 유도된것을 확인 한후 4주간 D-pen (10 mg/kg/day)을 경구투여하여 항섬유화 약효 검색을 하였다. D-pen 투약군에서 비투약군과 비교시 간중대가 20%정도 경미하게 나타났으며(Table I). 비투약군보다 낮은 PNIIP 수치와 높은 PIVCP 수치를 보였다. 낮은 PNIIP는 새롭게 형성된 procollagen type III (fibrogenesis-marker) 합성이 억제 되었고 높은 PIVCP (fibrolysis-marker)는 collagen의 분해가 촉진된 것으로 사료된다. HYP은 subtype에 따라 약간씩은 다르나 총 collagen양의 약 10%에 해당하며 다른 단백질에서 보다 특이적으로 collagen에 많이 함유되어 있어 총 collagen양을 반영한다. D-pen을 투여한 실험

군에서 비투여군과 비교시 조직중의 낮은 HYP 수치는 조직중 collagen fibril 축적의 감소를 의미한다.(Fig. 1) 생화학적 검사 결과는 투약군과 비투약군간에 별 다른 차이를 나타내지는 않았다.(Tab. II) 그러나 비투약군과는 반대로 PNIIP 와 HYP, PIVCP 와 HYP 지표간의 유의성은 없는것으로 관찰 되었다. 또한 간조직의 형태학적 소견 역시 비투약군보다는 섬유화, 담관증식, collagen fiber가 약간은 경미 하게 나타났다.(Fig. 3) 이러한 결과는 D-pen이 항섬유화 효과가 있음을 말하는데, Carter 등은 세포내에서 hydroxylation과정에서 필수적인 효소인 lysylhydroxylase 는 D-pen에 의해 교차 결합이 억제 됨으로서 fibril형성이 완전하게 일어나지 못하는데 기인 한다고 보고 하고 있다. 세포내에서 mRNA로 부터 생성된 1500개의 아미노산으로 구성된 3개의 α -chain은 peptidyl-proline과 peptidyl-lysin 위치에 hydroxylation이 되고, 이어서 hydroxylysin 에 galactose와 glucose 연결 된다. 순차적으로 cystein위치에서 disulfide bridge를 만들고, 계속적으로 triplehelix가 형성된 후 procollagen 형태로 세포밖으로 분비된다. 세포밖에서는 procollagen은 endopeptidase에 N-, C-말단이 절단되면서 collagen분자가 만들어진다. collagen분자들은 1/4씩 교차결합을 하면서

collagen섬유를 형성 한다. D-pen의 항섬유화효과는 세포내에서 hydroxylation에 관여하는 효소인 lysyl-hydroxylase의 activity를 저해하는 것으로 사료된다.

이로서 D-pen은 혈청중 PNIIP와 PIVCP 그리고 조직중 HYP 치의 긍정적인 수치의 변화를 나타냄으로써 항섬유화 효과가 있다.

결 론

본 연구에서는 담도수술결찰 방법을 사용하여 간섬유화를 유도하여 D-pen (10 mg/kg/day)을 위스타 랫드에 4주간 투약하여 비공격적이며 재현성을 지닌 혈청중 PNIIP (fibrogenesis-maker), PIVCP (fibrolysis-maker) 즉 collagen 합성과 분해의 진행과정을 나타내는 지표와 간조직중의 HYP (총 collagen)을 측정하여 항섬유화 약효를 검색 하였다.

담도수술결찰 방법으로 간섬유화는 4주만에 확실하게 유도 되었으며, 혈청중의 collagen대사의 진단지표인 PNIIP, PIVCP를 측정하는 방법은 간섬유화 유도 확인시 및 항섬유화 약물 검색시에 매우 유용하며 예민한 진단지표로서 사용 할 수 있다고 사료 된다. 또한 D-pen은 PNIIP, PIVCP, HYP 치의 긍정적인 변화를 나타냄으로써(collagen 합성억제, collagen 분해 촉진, 간조직중의 collagen fiber 침착의 억제) 항섬유화 효과는 있으나, 투약군과 비투약군간에 생화학적 검사수치 사이에 큰 차이가 없는것으로 미루어 보아 효소활성을 측정하는것 보다는 혈청중의 collagen peptide 측정방법이 항섬유화 약물 검색시에 좀 더 확실한 진단 지표라고 사료 된다.

감사의 말씀

본 연구는 원광대학교 교내 연구비에 의해 수행된것으로 지원에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Sherlock, S. : Disease of the liver and biliary system. 8th ed., BlackwellScientific Publication, London, P 344 (1989).
- 2) Popper, H. : Die Leberfibrose-Entstehung, Dynamik und klinische Bedeutung. *Leber, Magen,*

Darm 8 65 (1978).

- 3) McCullough, A. J., Stassen, W. N., Wiesner, R. H. : Serum type III procollagen peptide concentration in severe chronic active hepatitis : Relationship to cirrhosis and disease activity. *Hepatology* 7 49 (1987).
- 4) Annoni, G., Cargnel, A., Colombo, M., Hahn, EG. : Persistant elevation of the aminoterminal peptide of type III procollagen in serum of patients with acute viral hepatitis distinguishes chronic active hepatitis from resolving of chronic persistant hepatitis. *Hepatology* 2 379 (1986).
- 5) Torres-Salines, M., Pares, A., Cabeleria, J., Jimenez, W. : Serum procollagen type III peptide as marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 90 1241 (1986).
- 6) Frei, A., Zimmermann, A., Weigand, K. : The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 4 830 (1984).
- 7) Hayasaka, A., Schuppan, D., Ohnishi, K. : Serum concentration of the carboxy terminal crosslinking domain of procollagen type IV (NC1) and the aminoterminal propeptide of procollagen type III(PIIIP) in chronic liver disease. *J. hepatol* 10 17 (1990).
- 8) Babbs, C., Smith, A., Hunt, L. P., Rowan, B. P., Haboubi, N. Y., Warnes, T. W. : Type III procollagen peptide : A marker of disease activity and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Lancet*: 1021 (1988).
- 9) Beukers, A., van Zanten, R. A., Schalm, S. W. : Serial determination of type III procollagen amino peptide serum levels in patients with histologically progressive and non-progressive primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* 14 22 (1992).
- 10) Galambos, M. R., Collins, D. C., Galambos, J. T. : A radioimmunoassay procedure for type III procollagen : its use in the detection of hepatic fibrosis. *Hepatology* 5 38 (1985).
- 11) Ruwerts, M. J., Wilkinson, K. F., Rush, B. D., Vidma, T. J., Kim, K. Y. : The intergrated value of serum procollagen type III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content

- and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology* **10** 801 (1989).
- 12) Pierce, R. A., Glaug, M. R., Greco, R. S., Mackenzie, J. W., Boyd, C. D., Deak, S. B. : Increased procollagenmRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol-chem*, **262** 1652 (1987).
 - 13) Savolainen, E. R., Brocks, D., Ala-Kokko, L., Kivirikko, K. I. : 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).
 - 14) Schuppan, D. Chronische Hepatitis : Antifibrotische Therapieansätze. *Z. Allg. Med.* 71: 1153-1157. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart German (1995).
 - 15) Mezey, E., Treatment of alcoholic liver disease. *Sem. Liver Dis*, **13** 210 (1993).
 - 16) Beukers, R., Schalm, S. W. : Immunosuppressive therapy for primary biliary cirrhosis *J. Hepatol.* **14** 1 (1993).
 - 17) Ruwart, M. J., Henley, K. S. : Prostaglandin's effects on the extracellular matrix. In : Zern MA, Reid L eds. *Extracellular matrix. Chemistry, biology and pathology with emphasis on the liver.* Marcel Dekker, New York 369 (1993).
 - 18) Rockey, D. C., Maher, J., Jarnagin, W. R., Gabiani, G., Friedmann, S. L., : Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon- γ . *Hepatology*, **16** 776 (1993).
 - 19) Lindor, K. D., Dickson ER, Baldus, W. P., Jorgensen, R. A., Ludwig, J., Murtagh, P. A., Harrison, J. M., Wiesner, R. H., Anderson, M. L., Lange, A. N., Lesage, G., Rossi, S. S., Hofmann, A. F. : Ursodesoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol.* **106** 1284 (1994).
 - 20) Kountras, J., Billing, B. H. and Scheuder, P. J. Prolonged bile duct obstruction : a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* **65** 305 (1984).
 - 21) Schuppan, D., Dumont, J. M., Kim, K. Y., Hennings, G. and Riecken, E. O., Hahn, EG. : Serum concentration of the aminoterminal procollagen type III peptide in the reflects early formation of connective tissue in experimental liver cirrhosis. *J. Hepatol.* **3** 27 (1986).
 - 22) Jamall, I. S., Finelli, V. N. : A single method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **112** 70 (1981).
 - 23) Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N. : Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase *J. Histochem. Cytochem.* **32** 219 (1987).
 - 24) Dickson, E. R., Flemming, T. R., Wiesner, R. H., Baldus, W. P. : Trial of penicillamine in advanced primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **312** 1011 (1985).
 - 25) Neubauer, J., Cristensen, E., Portmann, B., Caballeri, J., Rodes, J., Ranek, L. : Double blind controlled trial of d-penicillamine in patients with primary biliary cirrhosis. *GUT* **26** 114 (1985).
 - 26) Mezey, E, Potter, J. J., Iber, F. L., Maddrey, W. C. : Hepatic collagen proline hydroxylase activity in alcoholic liver disease : Effect of d-penicillamine. *J. Lab. Clin. Med.* **93** 92 (1979).
 - 27) Kaplan, M. M. : Medical treatment of primary biliary cirrhosis. *Sem. Liver Dis*, **9** 138 (1989).