

Hepatoprotective effect of *Hippocampus abdominalis* hydrolysate

Moa Son¹ · Jun young Moon² · Sanggyu Park³ · Moonjae Cho⁴ 

Hippocampus abdominalis 유래 단백질 가수분해물의 간 보호 효과

손모아¹ · 문준영² · 박상규³ · 조문제⁴

Received: 13 June 2016 / Accepted: 21 June 2016 / Published Online: 30 September 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract Recently, liver damage contributes to big percentage of the morbidity and mortality rates worldwide. Excessive intake of alcohol is one of the major causes of liver injury. When liver injury is repeated and becomes chronic, it leads to development of fibrosis and cirrhosis. In the liver, TGF- β is a profibrogenic cytokine, which participates in various critical events cause liver fibrosis. Seahorse (*Hippocampus abdominalis*) is a common traditional Chinese medicine and has been widely used for centuries. Seahorse has been known to have a variety of bioactivities, such as anti-oxidant, anti-fatigue, and anti-tumor. Peptide is one of the main compounds of seahorse. In this study, we isolated enzymatic hydrolysate from seahorse *H. abdominalis* by alcalase hydrolysis and investigated the effect of the hydrolysate on liver injury. In the present in vitro studies, the hydrolysate increases cell viability of Chang cells and protects Huh7 cells from ethanol toxicity. In addition, the hydrolysate inhibits TGF- β -induced responses. In

vivo studies show that the pretreatment of hydrolysate reduces alcohol-induced increases of serum Glutamic oxaloacetic acid transaminase and Glutamic pyruvate transaminase activities and increases liver weight and body weight. These results suggest that seahorse may have a hepatoprotective effect.

Keywords Alcoholic liver disease · Hepatoprotective effect · *Hippocampus abdominalis*

서론

전세계적으로 간 질환의 발생률은 점차 증가하고 있으며 간 질환에 의한 사망자수는 전체 사망자수에서 큰 비율을 차지하고 있다(Lozano 등, 2012; Murray 등, 2012). 이러한 간 질환의 주요 원인 중 하나로 알코올 섭취를 들 수 있다. 지속적인 알코올 섭취는 뇌, 신장, 그리고 심장 등과 같은 여러 기관에 다양한 건강상의 문제를 유발하며, 특히 해독작용을 하는 간에 심각한 손상을 가져온다(Jung과 Choi 2014). 알코올로 인한 간 질환은 비교적 단순하고 가벼운 지방간부터 간염, 간섬유화, 그리고 간 질환의 마지막 단계이며 회복이 불가능한 간경변증까지 들 수 있다(O'Shea 등, 2010). 간은 인체의 대사 기능의 중심이 되기 때문에 이러한 간 손상은 인체 기능에 치명적이다.

간이 알코올로 인해 손상을 받으면 상처 치유 과정이 일어난다. 이 과정에서 간 손상 부위에 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 축적이 일어나고 이 과정이 반복되고 만성적으로 일어나게 되면서 상처 치유 과정과 관련된 signaling이 지속적으로 활성화됨에 따라 상처 치유 반응이 계속해서 일어나게 된다. 이에 따라 과도한 세포외기질의 축적이 일어나게 되고 간섬유화, 간경변증으로 발전하게 된다(Parola과 Pinzani 2009). 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)는 세포외기질 생성을 주도하는 주

Moonjae Cho (✉)
E-mail: moonjcho@jejunu.ac.kr

¹School of Biomaterials Science and Technology, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Department of Chemical and biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon 34141, Republic of Korea

³Division of Life & Environmental Science, Daegu University, Daegu 712-714, Republic of Korea

⁴Department of Biochemistry and Institute of Medical Science, School of Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

요 세포이다. 휴지상태의 HSC가 알코올에 의해 활성화가 되면 콜라겐(collagen), α -smooth muscle actin (α -SMA), TGF- β 와 matrix metalloproteinase 등과 같은 세포외기질을 형성한다. TGF- β 는 주요 profibrogenic cytokine으로 HSC의 활성화나 간 세포의 세포사멸(hepatic apoptosis) 혹은 세포외기질 형성에 관여한다(Wynn 2008). 또한 TGF- β 는 상피간엽이행(epithelial-mesenchymal transition, EMT)을 촉진시키는데, 이는 결국 간손상을 유발하고 간섬유화로의 발전을 유도한다(Dooley과 ten Dijke 2011). 그러나 현재까지 이러한 알코올로 인해 유도된 간손상을 치료할 수 있는 효과적인 방법은 미비한 실정이다.

해마는 큰가시고기목(Syngnathiformes), 실고기과(Syngnathidae)에 속하는 어종으로 온대와 열대해역이 주 서식지이다. 아시아 등지에서 전통 약재로 널리 이용되고 있는 해마는 특히 중국에서 매우 귀한 약재로 여겨진다(Chen 등, 2015). 여러 연구에 의하면 해마는 항종양(Li 등, 2008), 항산화(Chen 등, 2011), 항피로(Jianying 등, 2000) 등 다양한 생리활성을 가지고 있다. 해마의 주요 구성 성분은 스테로이드, 미네랄, 아미노산, 펩타이드, 지방산을 들 수 있다(Chen 등, 2015). 본 연구에서는 그 구성 성분 중 아미노산과 펩타이드에 주목하였다. 아미노산은 호르몬과 저분자의 질소 함유물 합성에 중요한 역할을 하며 세포 신호전달 인자로서 유전자 발현과 단백질 인산화를 조절할 수 있다(Wu 2009). 또한 펩타이드 중 생리활성 기능을 가진 bioactive peptide는 인체의 기능에 긍정적인 영향을 끼쳐 궁극적으로 인체 건강에 도움을 줄 수 있다. 현재까지 22개의 아미노산이 해마에서 분리가 되었지만 그와 관련된 자세한 메커니즘에 관한 연구는 부족한 실정이다(Chen 등, 2015).

따라서 본 연구에서는 해마를 효소를 이용하여 해마 단백질을 가수분해하고 그렇게 얻은 해마 단백질 유래 효소 가수분해물의 에탄올에 의해 유도된 간 손상 보호 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

해마 단백질 유래 효소가수분해물(ALC) 제조

해마 원료에 단백질 가수분해 효소인 alcalase (Novozymes, Denmark)를 이용하여 50°C pH 8.0 조건 하에 24시간 동안 가수분해를 진행하였다. 가수분해 후 3,000 × g에서 20분간 원심분리 한 후 잔사를 제거한 상층액을 취하여 이를 해마 단백질 유래 효소가수분해물(ALC)로 사용하였다.

세포주 배양

본 실험에서 사용한 normal liver cell line인 Chang 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 첨가된 Roswell Park Memorial Institute medium을 이용하여 배양하였고, 간암세포주 Huh7은 10% FBS와 1% P/S이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator에 배양하였다.

세포 독성 측정

ALC의 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Chang 세포를 2.5 × 10⁴ cell/mL의 농도로 200 μ L씩 96 well plate에

분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 분주 16시간 후에 ALC를 농도별로 처리하여 24시간 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 배양액 제거 후 MTT 용액을 4시간 동안 처리한 다음 150 μ L DMSO에 30분간 녹여 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 에탄올 독성 억제효과는 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 세포를 96 well plate에 2.5 × 10⁴ cell/mL로 200 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 16시간 배양하였다. ALC를 농도별로 1시간 전처리한 후 800 mM의 에탄올을 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양액 제거 후 MTT 용액을 4시간 동안 처리한 다음 150 μ L DMSO에 30분간 녹여 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR

ALC의 TGF- β 에 의한 간 손상 억제 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. Chang 세포에 ALC를 0.2, 0.5 mg/mL 농도로 2시간 전처리 한 후 10 ng/mL TGF- β 를 처리하였다. 24시간 배양 후 RNA 추출을 위해 TRIzol 용액 500 μ L를 가해 4에서 교반기에 30분간 용해 후 Chloroform을 첨가하여 10분간 상온에서 방치하였다. 14,000 rpm, 4°C 조건에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상층액에 isopropyl alcohol을 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 다시 원심 분리하였다. 원심분리하여 얻은 RNA에 70% ethanol을 가하고 원심분리하는 세척과정을 두 번 반복한 후, 상층액을 버리고 RNA를 공기 중에서 건조하였다. 건조된 RNA에 DEPC 용액을 더한 뒤 정량 하였다. 정량 결과를 통해 0.9 μ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20°C에 냉동보관하며 사용하였으며 종합효소 연쇄반응에 이용하였다. 각 유전자의 발현양은 GAPDH 발현양을 기준으로 정량 분석하였다.

실험동물 및 사육환경

본 실험을 위하여 오리엔트바이오(Korea)로부터 5주령 ICR mice 수컷 55마리를 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 사육실의 온도는 24°C, 습도는 50%를 유지하였으며 조명은 12시간을 주기로 하였다.

급성 알코올 독성 유도

실험을 수행하기 위하여 무작위로 정상군 5마리, 알코올 투여군 10마리, ALC 투여군 10마리로 그룹을 나누어 실험을 수행하였다. 먼저 정상군과 알코올투여군에 생리식염수를 투여하고, ALC 투여 군에는 ALC (50 mg/kg body weight)을 경구투여 후 30분 뒤에, 정상군에는 생리식염수를, 나머지 두 그룹에는 에탄올(2 g/kg body weight)을 일주일 간 같은 시간에 매일 1회 투여하였다.

만성 알코올 독성 유도

실험수행을 위해 동물을 무작위로 정상군, 알코올 투여군, ALC 투여 군에 각 10마리씩으로 나누어 실험을 수행하였다. 투여 방법은 급성 알코올 독성 유도 실험과 동일하게 수행하고 투여량을 달리하였다. ALC를 25 mg/body weight의 농도로, 에탄올은 0.9 g/body weight의 농도로 4주간 매일 같은 시간에 1회 투여하였다. 7일마다 실험동물의 체중과 사료 섭취량을 측정하였다.

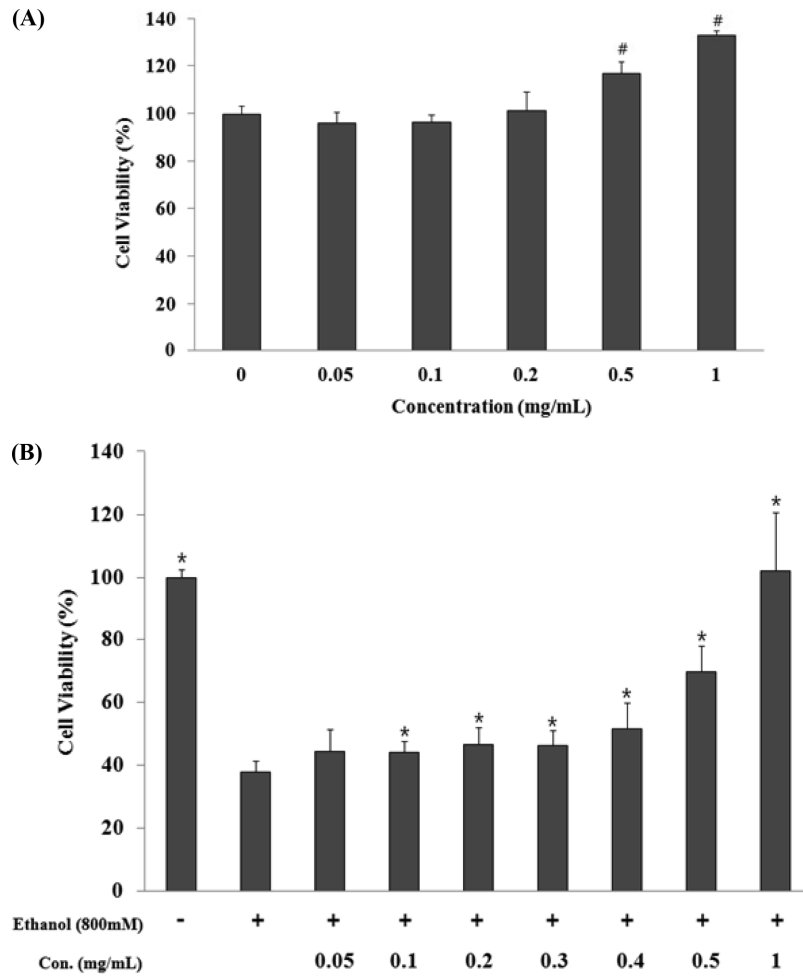


Fig. 1 Effects of ALC in Chang cells and alcohol-damaged Huh7 cell. (A) Cell viability of Chang cells treated with ALC for 24 h by MTT assay. (B) Cell viability of Huh7 cells pretreated with increasing concentrations of ALC for 24 h and cytotoxicity was induced by ethanol for 24 h. Values are expressed as the mean ± SD (n =6). [#]*p* <0.05 vs. control, ^{*}*p* <0.05 vs. ethanol

간 중량 측정

실험 동물의 간 중량 측정을 위하여 급성 알코올 독성 유도 실험의 경우 투여 처리기간인 1주 후, 만성 알코올 독성 유도 실험의 경우 4주 후 마취하고 심장 채혈한 후 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 세척한 다음 수분을 제거하고 중량을 측정하였다.

혈중 Glutamic oxaloacetic acid transaminase (GOT), Glutamic pyruvate transaminase (GPT) 활성 측정

혈액 채취 후 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 다음 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 -70 °C에서 보관하여 사용하였다. GOT·GPT 측정 Kit (Asan, Korea)를 사용하여 GOT와 GPT 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

세포 독성 확인

Chang 세포에서 ALC의 처리가 세포에 미치는 영향을 확인하

기 위해 MTT assay를 수행하여 세포생존율을 측정하였다(Fig. 1A). 실험 결과 ALC는 수행된 모든 농도(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/mL)에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 세포생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

알코올 독성 억제 효능 확인

Huh7 세포에 ALC를 1시간 전처리 한 후 에탄올을 800 mM 처리하고 24시간 뒤 세포생존율을 확인하였다(Fig. 1B). 실험 결과, 에탄올 처리에 의해 감소된 세포생존율이 ALC 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 0.1 mg/mL의 농도에서부터 유의적으로 증가하였으며 1 mg/mL의 농도에서는 대조군과 유사한 수준까지 세포생존율이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 ALC가 Huh7 세포를 에탄올 독성으로부터 보호하는 것을 확인하였다.

TGF-β에 의한 간 손상 억제 효과 확인

TGF-β는 간성상세포를 활성화시켜 세포외기질 형성을 유도하고 EMT를 촉진시킬 수 있다. 이로 인해 간손상이 유발되고, 더

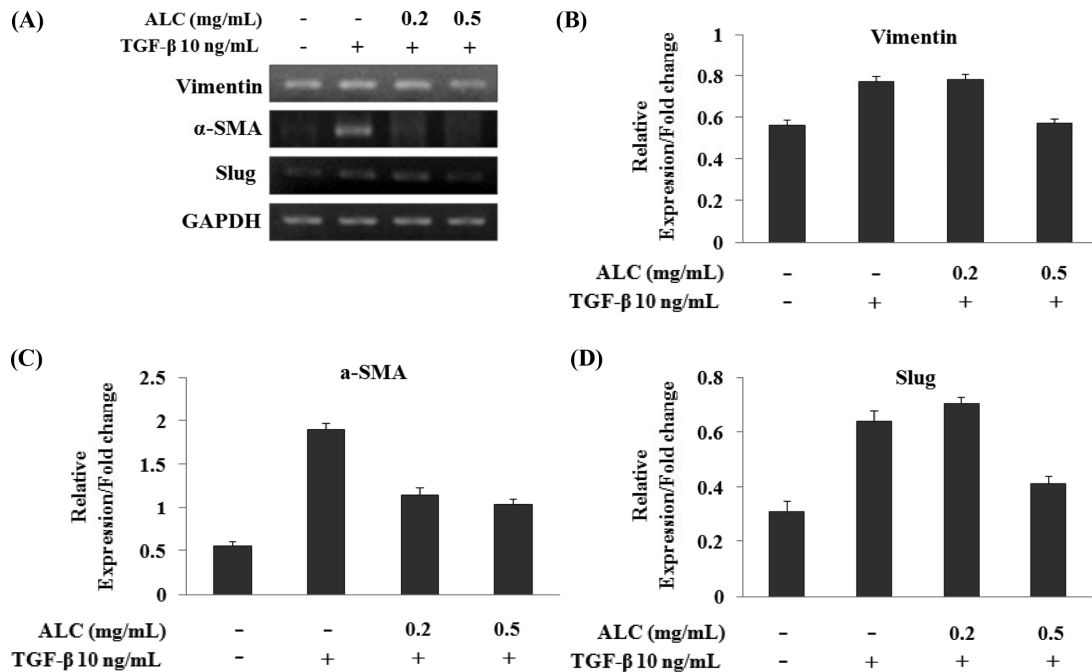


Fig. 2 Effect of ALC on TGF- β induced changes in Chang cells. Chang cells were pretreated with ALC for 2 h, then treated with TGF- β for 24 h. (A) The effect of ALC on the mRNA level of vimentin (B), α -SMA (C), slug (D) and GAPDH was measured by RT-PCR. Relative levels of mRNA were normalized to the GAPDH

진행되면 간섬유화로 발전이 된다. 이에 ALC의 간 보호 효능을 확인하기 위해 Chang 세포에 ALC를 2시간동안 전처리 하고 TGF- β (10 ng/mL)를 24시간 처리하여 RT-PCR을 통해 유전자 발현 정도를 확인하였다(Fig. 2). 간성상세포가 활성화되어 있는 동안 발현된다고 알려진 α -SMA와 vimentin의 mRNA 발현을 확인하였다(Friedman 2008). 또한 EMT marker인 slug를 확인하였다. EMT는 상피세포(epithelial cell)가 전이능력과 침윤능력을 보유하는 세포인 간엽세포(mesenchymal cell)로 분화하는 과정이다. 간에 염증이나 손상이 발생하였을 경우 EMT가 유도되게 된다. 손상된 간세포가 EMT를 통해 재생이 되며 손상이 회복되는데 그 손상이 과도하게 일어나는 경우 기질의 재형성이 유발되면서 간섬유화가 발생이 된다. Slug는 이러한 EMT의 핵심 조절 인자 중 하나이다(Kim 등, 2010). α -SMA, vimentin, slug의 유전자 발현 정도를 확인한 결과, TGF- β 에 의해 증가된 vimentin, α -SMA, slug가 ALC 투여에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 ALC가 TGF- β 로 인한 간 손상이 억제할 수 있는 효능을 가진 것이라 사료된다.

급성 알코올 독성 억제 실험. 간 중량 측정

일주일 간 ALC (50 mg/kg body weight)와 에탄올(2 g/body weight)을 투여하여 간 독성을 유도한 후 간을 적출하고 그 무게를 확인하였다(Fig. 3A). 그 결과 정상군의 평균 간 무게(1.06 \pm 0.05 g)에 비해 알코올만 투여한 대조군의 평균 간 무게(0.6 \pm 0.19 g)가 유의성 있게 감소하였고 ALC 군(0.82 \pm 0.15 g)은 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다.

급성 알코올 독성 억제 실험. 혈청 GPT 및 GOT 활성 측정

GPT와 GOT는 간세포 내에 존재하는 효소로 간 조직에 손상이 일어나면 혈청 내로 유리되게 된다. 따라서 혈청 내의 GPT, GOT 활성 증가는 간 손상의 지표로 사용된다(Coudray 등, 1993). 실험 동물의 혈청 GPT와 GOT의 활성 측정 결과(Fig. 3B, C), GPT와 GOT 모두 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 증가하여 간조직에 손상이 발생함을 확인할 수 있었다. GPT 함량은 알코올 투여군과 비교하여 ALC 투여군에서 유의적 감소를 확인하였다. 간 중량과 GOT 함량은 알코올 투여군에 비해 유의적 차이는 보이지 않았다. 그러나, 알코올 투여군에 비해 증가된 간 중량과 감소된 GPT 함량으로 볼 때 ALC 투여가 알코올 섭취로 인한 간 독성 예방에 효과가 있음을 추측할 수 있었다.

만성 알코올 독성 억제 실험. 체중 및 식이 섭취량 변화

알코올 중독이 되면 환자들의 식이섭취량이 유의적으로 감소되고 다른 영양소의 흡수가 저하되어 영양 결핍으로 인해 체중이 감소된다는 보고가 있으며(Mezey 1980; Scheig 1970), 알코올을 과량으로 섭취 시 열 발생으로 인한 에너지 소모가 증가되기 때문에 체중이 감소되는 현상이 발생한다는 연구 결과가 있다(Pikaar 등, 1987). 따라서 4주간 ALC (25 mg/kg body weight)와 에탄올(0.9 g/body weight)을 투여하여 만성 알코올 독성을 유도하고 실험기간 동안 7일마다 실험동물의 체중과 사료 섭취량을 측정하였다(Fig. 4A, B). 4주간의 체중 변화는 정상군이 마리 당 평균 2.5 g이 증가한 반면 대조군은 평균 1 g 증가하여 정상군에 비해 현저히 감소된 체중 증가량을 보여주었다. 반면

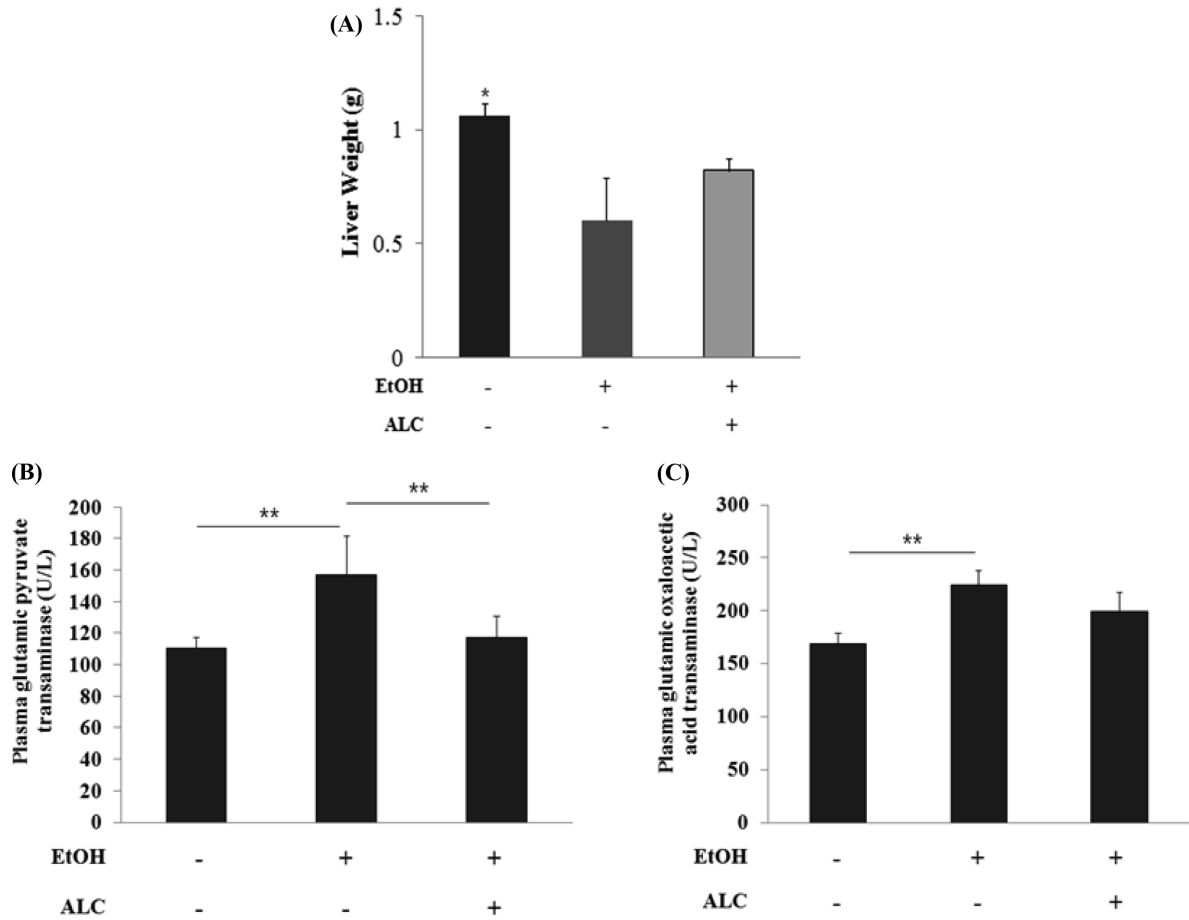


Fig. 3 ALC ameliorates alcohol induced acute liver injury in mice. (A) Liver weight of mice after 1 week treatment. (B) Change of serum GPT activity after 1-week treatment. (C) Change of serum GOT activity after 1-week treatment. Values are expressed as the mean \pm SD. * p < 0.05 and ** p < 0.001 vs. ethanol

ALC 투여군은 마리 당 평균 2.0 g이 증가함으로써 정상군과 유사한 수준의 증가량을 보여주었다. 식이섭취량 또한 체중과 유사한 경향을 보여주었다. 정상군(1.1 g/day)과 ALC (1.2 g/day) 군이 대조군(0.6 g/day)에 비해 두 배 가까이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 위 결과는 알코올 투여 시 체중 및 식이섭취량이 감소되었다는 연구 결과와 일치하였으며(Scheig 1970), 위 결과를 통해 ALC 투여에 의해 알코올 독성에 따른 체중 감소가 억제된 것을 확인하였다.

만성 알코올 독성 억제 실험. 간 중량 측정

간 무게를 측정된 결과(Fig. 4C), 대조군의 간 무게(0.8 \pm 0.14 g)가 정상군(1.04 \pm 0.19 g)에 비해 유의적으로 감소된 것을 통해 만성 알코올을 간 독성이 유도된 것을 확인하였다. 또한 ALC 투여군(0.94 \pm 0.096 g)은 대조군에 비해 유의적으로 증가된 것을 통해 알코올을 투여로 유도된 간 독성이 ALC 투여에 의해 억제된 것을 확인할 수 있었다.

만성 알코올 독성 억제 실험/혈청 GPT 및 GOT 활성 측정

혈청 GPT 및 GOT 활성을 측정결과(Fig. 4D, E), 대조군에서 정상군보다 감소된 GPT와 GOT를 확인할 수 있었다. 대조군과

ALC 군을 비교했을 때, GPT에 비해 GOT의 활성이 더 감소한 것을 관찰할 수 있었는데 이는 Soh 등(2003)과 Bae 등(2009)의 연구에서와 유사한 경향을 보여주었다. 알코올의 만성적 투여는 왜소체 에탄올 산화체계(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)를 통해 알코올 산화가 증가되면서 활성산소인 O₂[•], H₂O₂ 및 OH[•] 생성되어 간세포의 손상이 발생하게 된다(Lieber 1991). 비록 GOT에서 유의성을 관찰할 수 없었고 GPT의 경우 ALC 투여에 의한 감소를 확인할 수 없었지만, 그 외의 실험동물의 체중, 사료 섭취량, 그리고 간 중량 결과를 종합해봤을 때, ALC 투여가 간을 알코올 독성으로부터 보호해주는 것을 확인할 수 있었다.

*In vitro*에서 ALC가 에탄올에 의해 유도된 독성과 TGF- β 에 의한 간 손상을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, *in vivo*를 통해서도 ALC 처리에 의해 급성 알코올 독성과 만성 알코올 독성으로 인한 간 손상이 약화되는 것을 확인하였다. 따라서 ALC의 간 보호 효과를 유추해볼 수 있었다. 그러나 동물실험에서 간 무게 변화나 GOT와 GPT 활성변화에서 통계적으로 유의성이 나타나지 않았기에 향후 추가적인 연구가 필요할 것이라 사료된다.

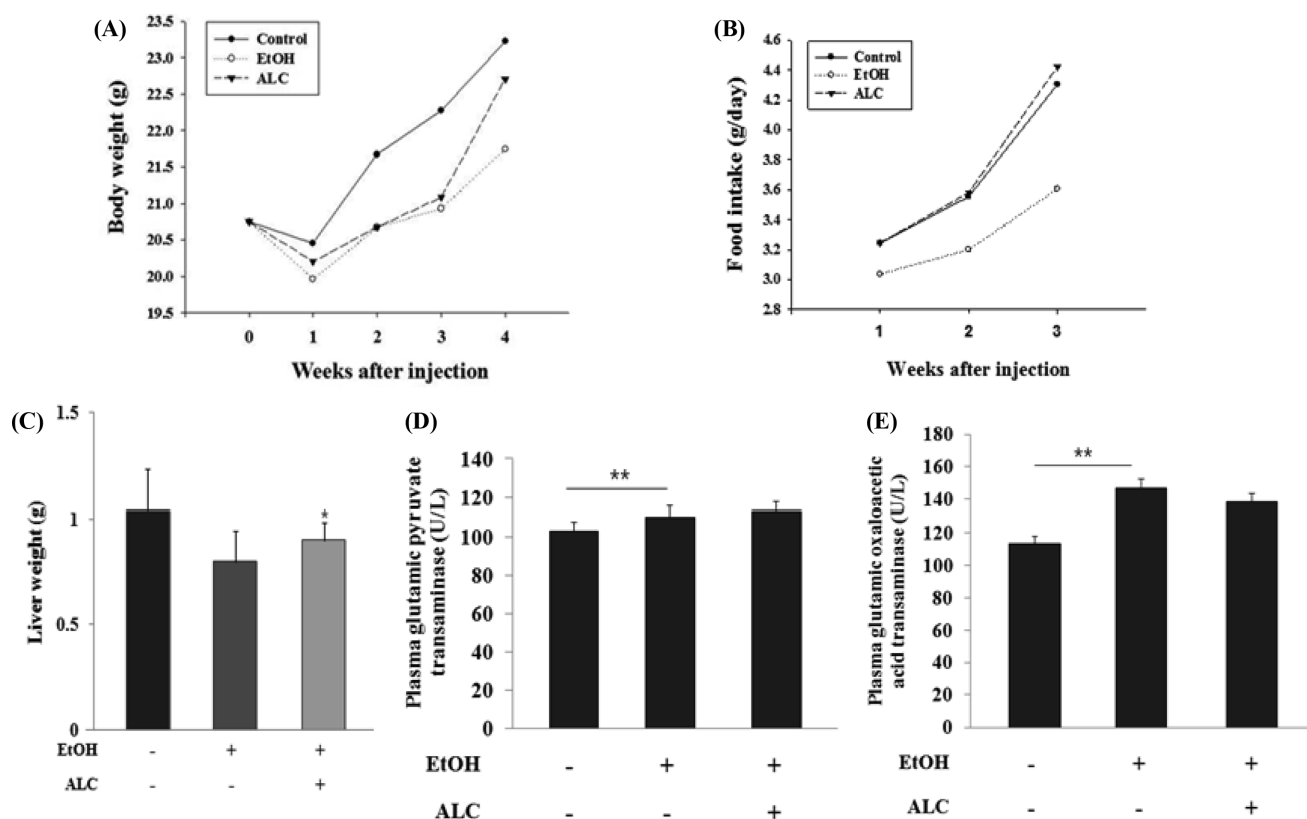


Fig. 4 ALC ameliorates alcohol induced chronic liver injury in mice. (A) Change of body weights of mice during treatment. (B) Change of food intake of mice during treatment. (C) Liver weight of mice after 4-week treatment. (D) Change of serum GPT activity after 4-week treatment. (E) Change of serum GOT activity after 4-week treatment. Values are expressed as the mean \pm SD. * p <0.05 and ** p <0.001 vs. ethanol

초 록

해마는 아시아 등지에서 이미 약재로 사용이 되어지고 있지만 그와 관련된 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구는 해양생물인 해마의 간 보호 효능을 확인하고자 하였다. 해마를 단백질 가수분해효소인 alcalase를 이용하여 가수분해 후 얻은 가수분해물(ALC)을 얻은 후 실험을 수행하였다. Chang 세포에 ALC를 1시간 전처리 후 에탄올 800 mM을 가하여 24시간 후 세포생존율을 확인했을 때, 세포가 알코올 독성으로부터 보호되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 Chang 세포에 ALC를 2시간 전처리 후 TGF- β 10 ng/mL을 처리하였을 때도, TGF- β 에 의해 증가된 vimentin, α -SMA, slug의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 에탄올을 이용한 급성과 만성 *In vivo* 조건에서도 ALC에 의한 간 보호 효과를 확인할 수 있었다. 알코올 투여에 의한 간 무게 감소와 혈청 GOT 및 GPT 활성 증가가 해마 가수분해물 처리에 의해 억제되었으며, 만성 알코올 독성 실험의 경우에는 실험동물의 무게와 식이섭취량도 해마 가수분해물 처리에 의해 정상군과 유사한 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 추가적인 연구를 통해 해마가 간 보호 효능의 기능성 식품소재로 활용 가능할 수 있을 것이라 사료된다.

Keywords 간보호효과 · 빅벨리해마 · 알코올성 간 질환

감사의 글 이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(양식 해마를 이용한 기능성식품 개발, 20150343).

References

- Bae MO, Kim HJ, Cha YS, Lee MK, Oh SH (2009) Effects of Kimchi Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with High GABA Producing Capacity on Liver Function Improvement. *Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1499–1505
- Chen CB, Yuan XH, Chen Z, Yi MH (2011) Study on extraction and antioxidant activities of liquefied protein of three-spot hippocampus. *Chinese Tropical Medicine* 11(3): 329–331
- Chen L, Wang X, Huang B (2015) The genus *Hippocampus*--a review on traditional medicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *J Ethnopharmacol* 162: 104–111
- Coudray C, Richard MJ, Faure H, Favier A (1993) Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin Chim Acta* 219: 35–45
- Dooley S, ten Dijke P (2011) TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347: 245–256
- Friedman SL (2008) Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev* 88: 125–172
- Jianning H, Bafang L, Zhijun L, Peng L (2000) An experimental study on anti-fatigue effects of eight marine pharmacokons. 19: 56–58
- Jung TS, Choi C (2014) The Effect of the Curcuma Longae Rhizoma (CLR) Extract on the Hepatocellular Carcinogenesis and Acute Liver Damage Induced by Diethylnitrosamine (DEN) and CCl₄ in Rats. *Herbal*

- Formula Science(HFS) 22: 177–192
- Kim SM, Han JH, Park SM (2010) The Role of Epithelial-mesenchymal Transition in the Gastroenterology. *Korean J Gastroenterology* 56: 69–77
- Li Y, Qian Z, Kim S (2008) Cathepsin B inhibitory activities of three new phthalate derivatives isolated from seahorse, *Hippocampus Kuda Bleeler*. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 6130–6134
- Lieber CS (1991) Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol. Clin Exp Res* 15: 573–592
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Levinson D, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mock C, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevtit MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De León FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, AlMazroa MA, Memish ZA (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2095–2128
- Mezey E (1980) Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr* 33: 2709–2718
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basáñez MG, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Elmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fèvre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Gakidou HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gonzalez-Medina D, Gosselin R, Grainger R, Grant B, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Levinson D, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mock C, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevtit MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA 3rd, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De León FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, AlMazroa MA, Memish ZA (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2197–2223
- O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ (2010) Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases and Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology Alcoholic liver disease. *Hepatology* 51: 307–328
- Parola M, Pinzani M (2009) Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2: 4
- Pikaar NA, Wedel M, van der Beek EJ, van Dokkum W, Kempen HJ, Kluff C, Ockhuizen T, Hermus RJ (1987) Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation, fibrinolysis, and blood lipids. *Metabolism* 36: 538–543
- Scheig R (1970) Effects of ethanol on the liver. *Am J Clin Nutr* 23: 467–473
- Soh JR, Tokuo T, Yamamoto, Youn-Soo Cha (2003) The Effects of Carnitine and/or Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Supplementation on the Recovery of Chronic Ethanol Administered Rats. *Neutraceuticals & Food* 8: 119–123
- Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37: 1–17
- Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199–210