



Original Article / 원저

보중익기탕이 cytochrome P450 및 LKB1-AMPK 항산화 신호에 미치는 영향

송유림, 박선동, 김영우*

동국대학교 한의학과 방제학교실

Effect of Bojungikgi-tang on cytochrome P450 and LKB1-AMPK anti-oxidant signaling pathway

Yu Rim Song, Sun-Dong Park, Young Woo Kim*

School of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : We investigated the effects of Bojungikgi-tang (BJIGT) on P450 cytochrome enzyme and oxidative stress in the cells.

Methods : We enrolled the HepG2 hepatocyte cell line to assess MTT assay, flow cytometer, and immunoblotting analysis. Expression of CYP450 was confirmed by immunoblotting analysis in the Huh7 cell line.

Results : We determined that BJIKT markedly changed the expression of the CYP2C19, CYP2D6, and CYP2E1. Moreover, BJIKT inhibited the cell toxicity induced by arachidonic acid + iron treatment, as assessed by FACS analysis. BJIKT induced AMPK activation, which increased the phosphorylation of ACC.

Conclusions : This study verified the effects of BJIKT, on P450, ROS production, mitochondrial damage and AMPK signaling pathway, which might give us the scientific information about the traditional herbal prescription.

Key words : Bojungikgi-tang, AMPK, LKB1, CYP450.

I. 서론

활성산소종(ROS)은 과잉 생산되거나 항산화 기능이 저하되면 산화적 스트레스를 유발한다¹⁾. AA에서 생성된 프로스타글란딘은 세포 보호의 필수 구성 요소이지만 과도한 양의 AA는 미토콘드리아 호흡과 관련된 여러 과정의 기능을 감소시키는 높은 수준의 세포 및 미토콘드리아 ROS를 유발할 수 있다²⁾. 축적된 iron은 세포내 단백질 및 지질과산화물을 시켜 세포독성을 나타내며, 산화적 스트레스로 인한 AA의 방출을 유발한다^{3,4)}. AA와 iron의 병용 처치는 철이 촉매제로 작용하여 세포손상이 가속화됨으로써 활성산소의 생성을 통한 세포독성과 세포자멸사가 나타나며 미토콘드리아의 막전위를 손상시켜 미토콘드리아의 기능 장애를 일으킨다. 그러므로 AA와 iron병용 투여 모델은 항산화 물질을 스크리닝하는 효과적인 수단으로 사용되어져 왔다^{5,6,7)}.

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 포도당 흡수, 지방산의 β 산화 및 간, 근육, 지방조직에서 미토콘드리아의 생합성을 포함한 세포 에너지 항상성에 중요한 역할을 한다⁸⁾. AMPK는 산화 스트레스 조건으로부터 간세포를 보호하기 위해 소분자에 의해 직간접적으로 활성화될 수 있다⁹⁾. LKB1은 AMPK upstream kinase이며, AMPK의 활성화를 촉진시키고 세포의 에너지 고갈에 의해 유발된 세포자멸사에 대한 보호효능이 보고되었다^{10,11)}. 여러 연구에서 AMPK pathway를 통해 HepG2 세포에서 AA와 iron에 의한 세포자멸사를 억제하는 분자기전이 제시되었다. 특히, AA와 iron병용 투여 모델에서 AMPK 활성화를 통해 다양한 한약들이 세포 보호효과가 있는 것이 증명되었다^{7,11,12)}.

따라서, 본 연구에서는 HepG2 세포에 AA(arachidonic acid)와 iron의 병용 처치를 통해 세포독성을 유발하여 보중익기탕의 간세포 보호효능과 이와 관련된 세포 내 분자기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 시약 및 추출물 제조

anti-CYP 1A2, anti-CYP 3A4, anti-phospho-ACC, anti-phospho-AMPK α , anti-AMPK α , anti-phospho-liver

kinase B1 (LKB1), anti-liver kinase B1 (LKB1), anti- β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, anti-CYP 2B6은 invitrogen에서 구입하였다. anti-CYP 2C19, anti-CYP 2D6, anti-CYP 2E1은 GeneTex에서 구입하였고, HRP-conjugated anti-mouse IgG, HRP-conjugated anti-rabbit IgG는 Enzo Life Sciences (Enzo, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), rhodamine 123 (Rh 123), Dimethyl sulfoxide (DMSO), ferric nitrilotriacetic acid (iron)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, AA (arachidonic acid)는 Calbiochem (San diego, CA, USA)에서 구입하였다. 보중익기탕(補中益氣湯, Bojungikgi-tang, BJIGT)의 구성성분은 아래와 같고, 필터 후 사용하였다.

Table 1. Composition of Bojungykgi-tang Used in This Study

本草名	學名	用量(g)
黃芪	<i>Astragalus propinquus</i>	101.34
人蔘	<i>Panax ginseng</i>	67.5
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i>	67.5
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	67.5
當歸	<i>Angelica gigas</i>	33.84
陳皮	<i>Cirtus unshiu</i>	33.84
升麻	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	20.34
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i>	20.34
Total amount		412.2

2. 세포배양 및 처리

인간 간암세포주인 Hep3B, HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다. 두 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 50units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco'smodified Eagle's medium liquid(DMEM) high glucose 배지를 사용하여 37° C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3. MTT assay

보중익기탕으로 인한 세포생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. HepG2 세포는 1×10⁵ cells/well

*Corresponding author : Young Woo Kim. School of Korean Medicine, Dongguk University, 123, Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5823, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : ywk@dongguk.ac.kr

•Received : November 19, 2021 / Revised : November 24, 2021 / Accepted : November 29, 2021

로 48well plate에 24시간동안 배양하였다. 7시간동안 FBS starvation 후 보중익기탕(100, 200, 300, 1000 μ g/ml)과 AA (10 μ M) 를 12시간동안 처치 후 Iron (5 μ M)을 첨가하여 1시간동안 배양하였다. 이 후, ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)를 사용하여 540 nm 흡광도에서 세포생존율을 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 계산하였다^{5,7,11}.

4. Immunoblot analysis

Hep3B, HepG2 세포는 약물 처치가 완료된 후 RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 통해 용해하고 30분 동안 원심분리 (4° C, 15,000rpm)하여 상층액을 취하여 BCA 단백질 분석 키트 (Thermo Fisher Scientific Inc)를 사용하여 단백질 정량하였다. 단백질을 30-50 μ g을 sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 분리하여 polyvinylidene fluoride (PVDF)으로 옮겼다. 표적 단백질에 대한 1차 항체와 2차 항체를 반응시킨 후, ECL 시약과 chemidoc 이미지 분석기(Vilber Lourmat, France)를 사용하였다^{7,11}.

5. Mitochondrial membrane potential (MMP) 측정

flow cell analysis는 mitochondrial membrane potential (MMP)의 변화를 감지할 수 있는 친유성 양이온 염료인 Rh123을 사용하여 분석하였다. HepG2 세포에 보중익기탕과 AA를 12시간동안 처치하고 Iron 1시간 처치 후 0.05 μ g/ml Rh 123으로 1시간 염색하였다. trypsin을 처리하여 세포를 취하였고, PBS에 현탁시켰다. 샘플당 1×10^4 개의 세포를 BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)로 측정하였다^{5,11}.

6. 통계처리

통계 분석을 위해 독립 실험에서 얻은 데이터는 student t-test를 사용하여 분석하였다. 통계적 유의성에 대한 기준은 $P < 0.01$, $P < 0.001$ 로 설정하였고 모든 실험 결과는 mean \pm S.D. 으로 표시 하였다.

III. 실험결과

1. 보중익기탕이 CYP450에 미치는 영향

보중익기탕이 CYP450의 발현에 미치는 영향을 관찰

한 결과, CYP1A2, 2C19, 2D6, 2E1 등에 영향을 미치는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

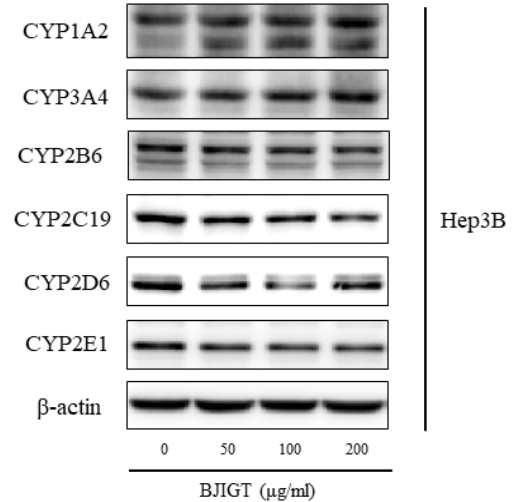


Fig. 1. Effect of BJGT on the activities of CYP450
 Cytochrome P450 (CYP450) protein expression was assessed by western blot analysis. Hep3B cells were treated with BJGT (0, 50, 100, 200 μ g/ml) for 48h.

2. 보중익기탕이 AA와 iron에 의해 유도된 산화스트레스에 대한 보호 효과

HepG2 세포에서 AA와 iron로 인한 산화스트레스를 유도하여 보중익기탕 (100, 200, 300, 1000 μ g/ml)의 세포 보호 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 보중익기탕의 처치는 1000 μ g/ml에서 가장 효과적인 세포 보호 효과를 보였다(Fig 2A).

A)

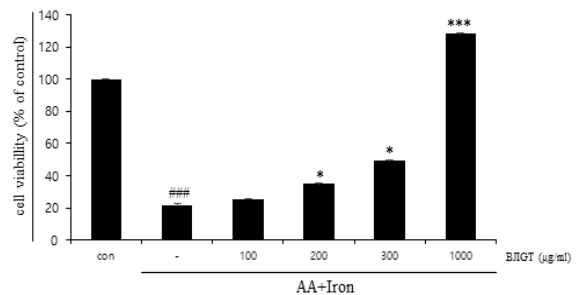


Fig. 2. Protective effect of BJGT on AA+Iron-induced oxidative stress.

A) Cell viability was assessed by MTT assay.

HepG2 cells were treated with BJIGT (100, 200, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$) and AA (10 μM) for 12 h followed by Iron (5 μM) for 1 h. Data represent means \pm SD of three independent experiments(### $\rho < 0.001$ vs. control group; ## $\rho < 0.01$ and ### $\rho < 0.001$ vs. AA + iron-treated group).

3. 보중익기탕이 mitochondrial damage에 미치는 영향

보중익기탕의 mitochondria 보호 효과를 확인하기 위하여 flow cytometry 분석을 통해 AA+Iron에 대한 mitochondria 기능장애를 확인하였다. HepG2 세포에 AA+Iron의 처치는 대조군에 비해 Rh 123 음성 세포인 RN1 분획이 증가시켰다. 보중익기탕의 처치는 AA+Iron에 의해 유도된 RN1 분획의 증가를 현저히 감소시켰다(Fig 3A).

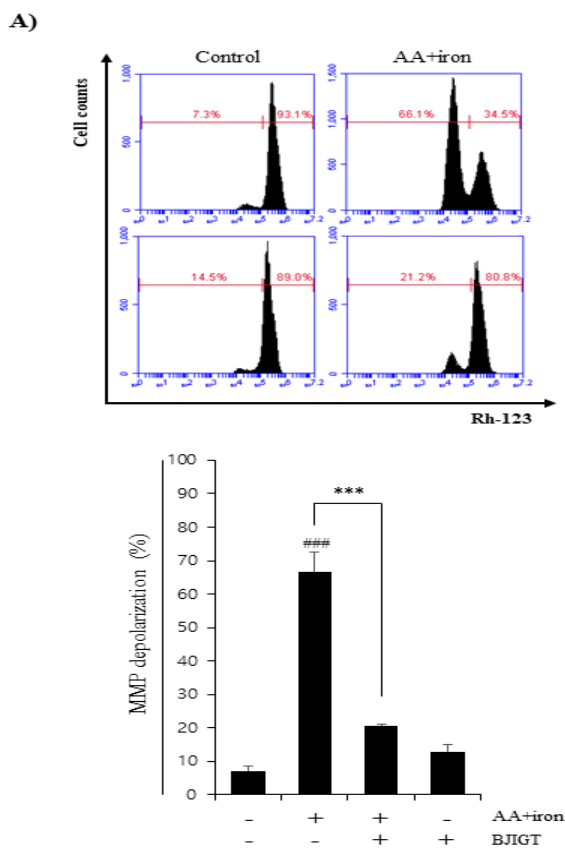


Fig. 3. Effect of BJIGT on mitochondrial membrane potential (MMP).

A) Mitochondria protective effect of BJIGT

by flow cell analysis. HepG2 cells were treated as describe in Fig2. The cells were then incubated with Rh 123(0.05 $\mu\text{g/ml}$) for 1h. Relative proportion of low Rh 123 intensity were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments(### $\rho < 0.001$ vs. control group; *** $\rho < 0.001$ vs. AA + iron-treated group).

4. 보중익기탕에 의한 AMPK 활성화

HepG2 세포에 보중익기탕 (1000 $\mu\text{g/ml}$)를 10분-6 시간 처치한 결과, 보중익기탕은 10분-1시간에 AMPK의 인산화를 증가시켰고, AMPK의 하위 기질 단백질인 ACC의 인산화도 증가시킨 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A).

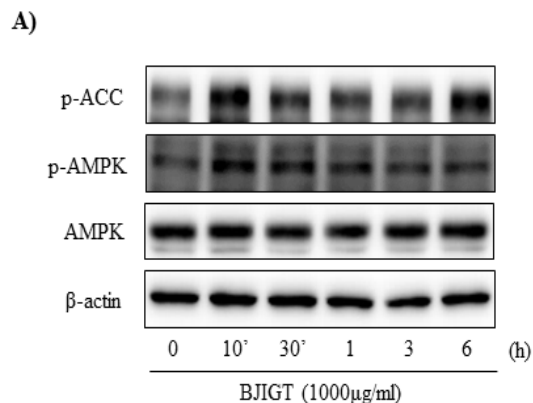


Fig. 4. Effect of BJIGT on AMPK activation

A) Immunoblotting of AMPK signaling pathway molecules in HepG2 cells. HepG2 cell were incubated with BJIGT(1000 $\mu\text{g/ml}$) for indicated time periods.

5. 보중익기탕이 LKB 1의 인산화에 미치는 효과

AMPK의 upstream kinase로 알려진 LKB1이 AA+Iron에 의한 산화스트레스에서 보중익기탕의 보호효과에 LKB1의 활성이 매개되는지 여부를 규명하고자 하였다. 그 결과, HepG2 세포에서 보중익기탕 (1000 $\mu\text{g/ml}$)의 처치로 인해 LKB1의 인산화가 증가하였고, 6시간에서 가장 크게 증가하였다(Fig 5A).

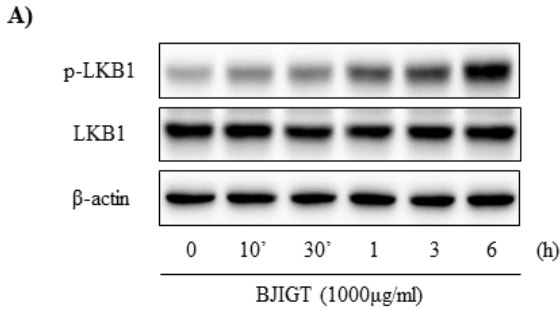


Fig. 5. Expression effect of LKB1 by BJIGT
 Immunoblot analysis of phosphorylation of LKB1, an upstream regulator of the AMPK signaling pathway. HepG2 cells were incubated with BJIGT (1000 µg/ml) for 10min-6h.

IV. 고찰

산화적 스트레스는 세포독성으로 인한 세포자멸사를 일으킨다. 활성산소종(ROS)은 과도하게 생산되면 산화 스트레스를 유발하여 PLA2(phospholipase A2)를 활성화하여 세포막의 인지질과 지방산을 인산화시킴으로써 AA를 유리한다¹³⁾. 장에서 흡수된 Iron은 주로 간에 축적되고, 이렇게 축적된 iron은 산화적 스트레스 유발하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 본 논문에서는 AA와 iron의 병용 처치 모델을 사용하였으며, 본 모델에서 AA와 iron의 병용 처치는 세포 독성을 유발하고, 산화적 스트레스를 일으켰으며 미토콘드리아 손상을 유도하였다.

보중익기탕은 전통적으로 gastroptosis, leiasthenia 및 myasthenia와 같은 위장 장애를 치료에 사용되는 처방이다¹⁶⁾. 보중익기탕은 IFN-γ을 증가시켜 면역증강효과가 있으며, 아밀로이드-베타 응집과 BACE 활성을 억제하고 항산화 활성을 증가시켜 알츠하이머의 치료효과를 나타내었다¹⁷⁾. 또한 근위축성 측삭 경화증에서 근육과 척수의 기능을 개선시켰으며¹⁾, LPS로 처리된 RAW264.7 세포에서 염증매개체 사이토카인의 생성과 유도성 산화질소 및 cyclooxygenase-2(COX-2)의 단백질 발현을 억제하여 항염증효과를 나타냈다¹⁸⁾. 또한 소음인보중익기탕이 *in vivo*와 *in vitro* 모델에서 산화적 손상에 대해 세포 보호 효능이 있음을 나타내었다¹⁹⁾. 본 논문에서는 AA와 iron의 병용 투여 모델에서 MTT assay를 통하여 세포의 생존율에 대한 보중익기탕의 세포 보호

효능을 확인하였다. 또한 AA와 iron의 병용 투여로 인한 MMP 감소를 유의하게 방어함으로써 미토콘드리아의 손상을 보호하는 효과를 확인하였으며, 보중익기탕의 세포 보호 효능은 AMPK pathway를 활성화시킴으로써 AA와 iron에 의한 세포 독성과 미토콘드리아 손상을 보호하는 것으로 사료된다.

약물대사는 독성 약물을 해독되거나 무독성 약물이 생체 변형에 의해 독성 대사산물로 활성화함으로써 약물 부작용을 결정한다²⁰⁾. 약물대사는 대부분 간에서 발생하며, 간은 I상 산화 반응에서 중요한 역할을 하는 헴 함유 효소인 cytochrome P450 (CYP450)의 풍부한 공급원이다²¹⁾. CYP는 스테로이드, 담즙산, 지방산, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 생체 아민, 레티노이드 또는 다양한 발암 물질 및 환경오염 물질의 생합성 및 대사에 관여한다. 이러한 효소는 또한 무독성 화학물질을 독성 또는 발암성인 반응성 중간체로 변형시킬 수 있다²²⁾. sulfotransferase(ST), uridine diphosphoglucuronosyl transferase(UGT), *N*-acetyl transferase(NAT) 및 glutathione S-transferase(GST)와 같은 II상 효소도 생체이물질의 해독과 배설에 중요한 역할을 한다²³⁾. 인간 간유래 실험 시스템을 포함하는 *in vitro* 스크리닝 분석은 perfused liver, liver slices, primary hepatocytes, cytosol, S9 fractions, uposomes, cell lines, transgenic cell lines 및 microsomes을 통해 생체 내 인간 약물 대사를 추정하여 개발되었다^{24,25,26)}.

현재 사용 가능한 인간 간 세포주는 Hep G2(간세포 암종), BC2(간종), Hep 3B(간세포 암종), C3A(간모세포종) 등이 있으며 간세포는 인간 간에서 CYP 발현의 이질성을 반영하는 I상 및 II상 간 약물 대사 경로를 모두 연구하는 데 사용된다. 배양된 간세포 및 1차 간세포 현탁액은 시험관내-생체 내 상관관계가 여러 약물의 대사를 분석할 수 있다²⁷⁾. cytochrome P450 (CYP450)은 간세포의 소포체에서 약물의 산화, 환원 또는 가수분해반응이 일어나는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 인간 약물 대사의 90%가 7가지 주요 효소(CYP 1A2, 2C9, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1 및 3A4/5)에 기인할 수 있는 것으로 추정되었다²⁹⁾. 이전연구에서 보중익기탕은 500 µg/ml의 농도에서 인간 간 CYP450(CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) 및 UGT(UGT1A47), UGT12활성의 억제를 통해 한약간의 상호작용을 일으

키지 않을 것이라고 보고되었다¹⁸⁾.

V. 결론

본 연구에서 HepG2 세포를 활용한 AA와 iron의 병용 처치 모델에서 세포 독성을 유발하여 보중익기탕(補中益氣湯, Bojungikgi-tang, BJIGT)의 간세포 보호 효과와 이와 관련된 분자기전을 규명하였다.

- 1) 보중익기탕은 AA+iron에 의해 유도된 세포 독성과 산화적 스트레스를 억제한다.
- 2) 보중익기탕은 AA+iron에 의한 미토콘드리아 손상을 보호한다.
- 3) 보중익기탕은 AMPK pathway를 활성화시킴으로써 AA와 iron에 의한 세포 독성과 미토콘드리아 손상을 보호한다.

이러한 결과는 보중익기탕이 *in vitro* 모델에서 AA와 iron의 병용 처치로 인한 산화적 손상에 대한 세포보호 효과가 있음을 입증한 것으로, 분자기전으로서 AMPK pathway조절을 제시하였다. 향후 보중익기탕의 명확한 세포보호 기전에 대한 연구가 추가적으로 필요한 것으로 생각된다.

Acknowledgments

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (number: HF20C0212) and (HF21C0061).

References

1. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int J Molecul Sci.* 2014;16(1):193-217.
2. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic

- acid mobilization. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(4):385-391.
3. Galaris, D., Pantopoulous, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(1):1-23.
4. Neufeld, E.J. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood* 2006;107(9):3436-3441.
5. Kim JK, Park SM, Jegal KH, Kim YW, Byun SH, Kim SC, et al., Gleditsia Spina Extract Protects Hepatocytes from Oxidative Stress through Nrf2 Activation. *The Korea Journal of Herbology.* 2015;30(4):57-64.
6. Ko HL, Jegal KH, Song SY, Kim NE, Kang J, Byun SH, et al., Water Extract of Rosa laevigata Michx. Protects Hepatocytes from Arachidonic Acid and Iron-mediated Oxidative Stress. *The Korea Journal of Herbology.* 2015;30(6):7-15.
7. Lee EH, Baek SY, Kim KY, Lee SG, Kim SC, Lee HS, et al., Effect of Rheum undulatum Linne extract and Glycyrriza uralensis Fischer extract against arachidonic acid and iron-induced oxidative stress in HepG2 cell and CCl4-induced liver injury in mice. *Herbal Formula Science.* 2016;24(3):163-174.
8. Ha J, Lee S. Role of AMPK in the Regulation of Cellular Energy Metabolism. *Journal of Korean Endocrine Society.* 2010;25(1):9-17.
9. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):121-135.
10. Alexander A, Walker CL. The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Letters.* 2011;585(7):952-957.
11. Seo HL, Baek SY, Lee EH, Lee JH, LEE SG, Kim KY, et al., Ligustris lucidi Fructus inhibits hepatic injury and functions as an antioxidant by activation of AMP-activated protein kinase in vivo and in vitro. *Chemico-Biological Interactions.* 2017;262:57-68.
12. Jung EH, Kim SC, Cho IJ, Kim YW. Akebiae

- Caulis Inhibits Oxidative Stress through AMPK Activation. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. Korean Society of Oriental Pathology. 2015;29(1):18-26.
13. Chen JK, Capdevila J, Harris RC. Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol cell Biol*. 2001;21(18):6322-31.
 14. Suh Jk, Jeon IS. Basic Understanding of Iron Metabolism. *Clin Pediatr Hematol Oncol*. 2018;25:1-9.
 15. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2008;45(1):1-23.
 16. Lim HS, Kim YJ, Sohn E, Yoon J, Kim BY, Jeong SJ. Bojungikgi-Tang, a Traditional Herbal Formula, Exerts Neuroprotective Effects and Ameliorates Memory Impairments in Alzheimer's Disease-Like Experimental Models. *Nutrients*. 2018;10(12):1952
 17. Cai M, Lee SH, Yang EJ. Bojungikgi-tang Improves Muscle and Spinal Cord Function in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Mol Neurobiol*. 2019;56:2394-2407
 18. Jin SE, Ha H, Shin HK. Effects of Herbal Formulas Bojungikgi-tang and Palmijihwang-hwan on Inflammation in RAW 264.7 Cells and the Activities of Drug-Metabolizing Enzymes in Human Hepatic Microsomes. *Journal of Medicinal Food*. 2018;21(11):1173-1187
 19. Son JW, Jung JY, Kim KY, Hwangbo M, Park CA, Cho IJ, et al., The Protective Activity of Soeumin Bojungykgi-tang Water Extract Against Oxidative Stress-induced Hepato-Toxicity. *Herbal Formula Science*, 2017;25(4):509-52616.
 20. Li AP. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005;2(2):179-185.
 21. Asha A, Vidyavathi. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160:1699-1722.
 22. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*. 1997;29:413-580.
 23. Park YC, Kim J, Lee S. Mechanisms and Prevention for Metabolism and Toxicity of Korean Herbal-Medicine. *Korean journal of oriental preventive medical society*. 2008;12(1):73-87.
 24. Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2003;189(3):233-246.
 25. Akram M, Iquebal MA, Naimuddin K, Sahi J, Grepper S, Smith C. Hepatocytes as a Tool in Drug Metabolism, Transport and Safety Evaluations in Drug Discovery. *Current Drug Discovery Technologies*. 2010;7(3):188-198.
 26. Choi JM, Jeon JS, Kim SK. The Optimization of Method for Prediction of Drug-Induced Liver Injury Using HepG2 Cells Cultured with Human Liver Microsomes. *Yakhak Hoeji*. 2015;59(5):201-206.
 27. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes in primary culture: The choice to investigate drug metabolism in man. *Current Drug Metabolism*, 2004;5:443-462.
 28. Lee J, Ahn SH. Recent Trends in Drug Interaction Studies based on Drug Metabolism. *Yakhak Hoeji*. 2020;64(1):8-20.
 29. Tang L, Ye L, Lv C, Zheng Z, Gong Y, Liu Z. Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes. *Toxicology Letters*. 2011;202(1):47-54.