



Original Article / 원저

Human Hippo-YAP AXIS 및 CYP450에 미치는 오적산의 영향

배수진¹, 윤언정¹, 박선빈¹, 송유림¹, 김춘옥^{2*}, 강형원^{3*}, 김영우^{1*}

¹동국대학교 한의학과 방제학교실

²연세대학교의료원 세브란스병원 임상약리학과

³원광대학교 한의과대학 한방신경정신과

Regulation of Hippo-YAP AXIS and CYP450 enzymes by herbal pharmaceuticals, Ojeok-san

Su Jin Bae¹, Un-Jung Yun¹, Seon-Been Bak¹, Yu-Rim Song¹, Choon-Ok Kim^{2*},
Hyung Won Kang^{3*}, Young Woo Kim^{1*}

¹School of Korean Medicine, Dongguk University

²Department of clinical pharmacology, Severance hospital, Yonsei university
health system

³Department of Neuropsychiatry of Korean Medicine, College of Korean
Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the protective effect of Ojeok-san (OJS) on cellular damage induced by oxidative stress and whether it induces changes in CYP450 expression.

Methods : To investigate the protective effect, we used cells stimulated by oxidative stress caused by the combination treatment of AA+iron. Changes in CYP450 expression were detected by immunoblotting analysis using Huh7 cells.

Results : We observed that OJS altered the expression of CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6, and CYP2E1. OJS increased cell viability against AA+iron-induced oxidative stress and inhibited mitochondrial dysfunction. OJS increased phosphorylation of LKB1, phosphorylation of AMPK, and phosphorylation of ACC, which are related to the LKB1-AMPK pathway. In addition, phosphorylation of LATS1 and phosphorylation of YAP, which are related to the Hippo-YAP pathway, were increased.

Conclusions : Our results show that OJS has 1) the ability to protect hepatocytes against oxidative stress, and 2) the potential to induce changes in CYP450.

Key words : Ojeok-san, Dementia, Neuropsychiatric disorders, P450, AMPK.

I. 서론

오적산(OJS, 五積散)은 창출, 마황, 진피, 후박, 길경, 지각, 당귀, 건강, 백작약, 복령, 백지, 천궁, 반하, 계피, 감초 등으로 구성된 방제이며, 신온해표(辛溫解表), 이기화습(理氣化濕), 온중산한(溫中散寒), 보혈활혈(補血活血), 그리고 통락조경(通絡調經) 효능을 나타낸다고 알려져 있다¹⁾. 최근 연구에서는 오적산 처치가 제2형 당뇨병 환자의 혈당 저하에 유의한 효과를 나타내었다²⁾. 이외 오적산의 효능을 종합 분석한 연구에서는 소염, 해열, 진통, 고지혈증 예방, 그리고 자궁근종 세포 사멸 효과가 있는 것으로 보고하였다³⁾. 하지만 오적산을 활용한 임상 및 기초 연구 사례는 체계적 리뷰 및 메타 분석을 진행하기에는 부족한 상황이며, 특히 간에 대한 in vivo, in vitro 실험은 부족한 상황이다.

산화적 스트레스가 강조되는 이유는 보통 당뇨병, 심혈관계 질환, 신경 퇴행성 질환 그리고 암과 같은 다양한 질환의 발병 원인으로 알려져 있기 때문이다⁴⁾. 특히 산화적 스트레스에 의한 간 손상이 지속되면 간염, 간 섬유증, 그리고 간 암으로 진행될 수 있다⁵⁾. 이러한 질환들은 만성적으로 산화적 스트레스에 노출되어 발생하기도 하고 높은 수준의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 급성 노출되어 심각한 손상으로 이어지기도 한다⁶⁾. 산화적 스트레스는 ROS의 생성과 제거 과정에서 생성의 수준이 높아질 때 일어나며, 높아진 ROS는 지질 과산화, 핵산 및 단백질의 변형을 일으켜 세포에 손상을 준다⁷⁾.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포의 에너지 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다. 구조는 catalytic α -subunit, β -와 γ -regulatory

subunits으로 구성되어 있는 heterotrimeric enzyme complex이다. 세포 내 AMP와 ADP가 증가하고 ATP가 감소할 경우 liver kinase B1 (LKB1)와 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK β)에 의해 α -subunit에 포함된 threonine residue (Thr-172)이 인산화되어 AMPK가 활성화된다. 즉, 저혈당, 저산소, 고강도 운동 및 허혈 등의 상태가 세포 내 AMP, ADP/ATP 비율의 증가를 야기하여 AMPK의 활성화를 일으킨다⁸⁾. AMPK가 활성화되면 포도당 흡수를 향상시키고 글리코겐 분해 억제 및 당신생(gluconeogenesis)을 억제한다. 뿐만 아니라 지방산 산화를 향상시키고 지방의 합성과 콜레스테롤 합성은 억제하기 때문에 비만과 제 2형 당뇨병 등과 같은 대사질환(metabolic syndrome)의 발병을 예방하고 치료하는 데 중요한 역할을 할 것으로 기대되고 있다⁹⁾. AMPK는 세포 보호 효과를 나타내는데, 세포 보호 효과를 나타내는 많은 약물에서 AMPK 활성화와 항산화 효소 유도를 통해 산화적 스트레스를 억제하는 것으로 나타났다¹⁰⁾.

그러므로, 본 연구에서는 OJS의 간보호 효능을 사람의 간 세포주에 AA와 iron을 병용 처치하여 산화적 스트레스가 유발된 모델에 적용하여 실험을 진행하였다. OJS의 세포 보호 효과 및 작용 기전을 규명하고자 하였으며, 추가로 OJS이 약물 상호작용에 영향을 미치는 CYP450 효소의 변화를 유도하는지 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

anti-phospho-LKB1, anti-phospho-AMPK α , anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC), anti-phospho-YAP, anti-Yes associated protein (YAP), anti-

*Corresponding author : Choon-Ok Kim, Department of clinical pharmacology, Severance hospital, Yonsei university health system, 50-1, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul, 03722, Republic of Korea
E-mail : delivery98@yuhs.ac

*Corresponding author : Hyung Won Kang, Department of Neuropsychiatry of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 321, Sanbon-ro, Gunpo-si, Gyeonggi-do, 15865, Republic of Korea
Tel : +82-31-390-2762, E-mail : dskhw@wku.ac.kr

*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 15, 2021 / Revised : November 25, 2021 / Accepted : December 1, 2021

CYP1A2, anti-CYP3A4와 HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. anti-CYP2C19, anti-CYP2D6, anti-CYP2E1은 GeneTex (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. anti-CYP2B6는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. anti- β -actin는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), rhodamine 123 (Rh123), arachidonic acid (AA), ferric nitrilotriacetic acid (iron)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용한 OJS은 구매하여 사용하였다. 구매한 OJS은 창출, 마황, 진피, 후박, 길경, 지실, 당귀, 건강, 백작약, 백복령, 백지, 천궁, 반하, 계피, 그리고 감초로 구성되었다. 구매한 OJS은 세포에 처치하기 위해 멸균된 증류수에 녹인 후 0.22 μ m filter로 여과하여 사용하였다.

2. 세포 배양 및 처치

사람의 간세포에서 유래된 세포주인 HepG2 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA), Huh7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. OJS을 각 실험 조건에 맞는 농도로 처치하고 결과를 확인하였다.

3. 세포 생존율 측정

OJS에 의한 세포 생존율 변화는 MTT assay를 통해 확인하였다. HepG2 세포를 48 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교체하고 12시간 더 배양하였다. 이후 AA 10 μ M과 OJS (100, 200, 300 μ g/ml)을 함께 처치하여 12시간 동안 배양한 다음 5 μ M iron을 처치하고 2시간 더 배양하였다. 세포 생존율은 대조군 측정값에 대한 백분율로 나타내었다^{11,12}.

4. 미토콘드리아 막 전위 (Mitochondrial membrane potential) 측정

세포를 6 well plate에 90×10^4 cells/well로 분주하고 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교체하

고 12시간 더 배양하였다. 이후 AA 10 μ M과 OJS 300 μ g/ml을 함께 처치하고 12시간 동안 배양한 다음 5 μ M iron을 1시간 동안 처치하였다. 세포의 막 투과성 측정에 사용되는 형광염료인 rhodamine 123을 0.05 μ g/ml의 농도로 처리하고 빛을 차단한 후 1시간 동안 염색한 후 trypsin을 처리하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 다음 Flow cytometer로 미토콘드리아 막 전위를 측정하였다. 실험 결과는 세포 10,000개의 측정을 통해 산출된 값이다^{11,12}.

5. Western blot 분석

세포는 60 ϕ dish에 25×10^4 cells/well로 분주하고 12시간 배양한 후 OJS을 농도별로 처치하고 48시간 배양하였다. HepG2 세포는 6 well plate에 80×10^4 cells/well로 분주하고 12시간 배양한 후 FBS 고갈 배지에 12시간 더 배양한 다음 OJS 300 μ g/ml을 시간별로 처치하였다. ECL chemiluminescence detection reagents (Advensta, Menlo Park, CA, USA)을 이용하여 발광시킨 후 image analyzing system를 통해 표적 단백질 발현을 확인하였다. 11,12)

6. 통계처리

실험 결과는 mean \pm S.D. 값으로 나타났다. 통계 처리는 t-test로 유의성을 검정하였으며, 유의 수준은 P-value < 0.05 으로 하였다.

III. 결과

1. OJS이 CYP450 효소 조절에 미치는 영향

OJS이 약물 대사에 관여하는 인자인 CYP450 효소에 미치는 영향을 확인하기 위해 Immunoblot analysis를 수행하였다. Huh7 OJS (50, 100, 200 μ g/ml)을 48시간 처치한 결과 CYP1A2는 농도 의존적으로 감소하였고, CYP3A4는 200 μ g/ml 농도에서 감소하였다. CYP2C19는 100 μ g/ml 농도에서 증가하였으며, CYP2D6는 50, 100 μ g/ml 농도에서 감소하였다. 그리고 CYP2E1은 50 μ g/ml 농도에서 감소하는 것을 관찰하였다. 추가로 OJS이 간세포 독성에 미치는 영향을 하기 위해 다음 실험을 진행하였다(Fig. 1).

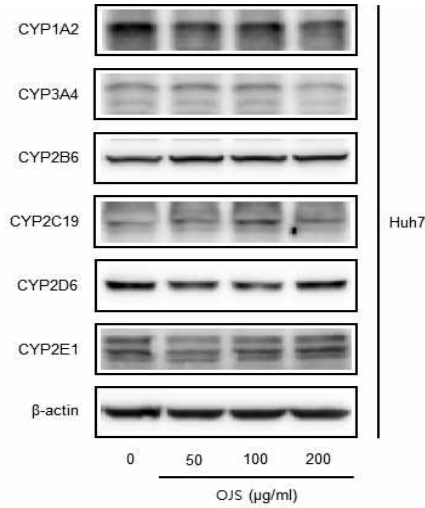


Fig. 1. Effect of OJS on regulation of CYP450 enzyme family.

Immunoblotting analysis of CYP450 enzyme family proteins was performed with Huh7 cell lysates. Huh7 cells were incubated with 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OJS for 48h.

2. AA와 iron에 의해 유도된 세포 독성에 대한 OJS의 세포 보호효과

OJS의 세포 보호 효과를 평가하기 위해 MTT assay를 진행하였다. AA + iron으로 HepG2 세포에 산화적 스트레스를 유도한 후 OJS (100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하였다. 그 결과, AA + iron을 처리한 실험군은 대조군에 비교하였을 때 세포 생존율이 $19.78 \pm 0.36\%$ 로 유의하게 감소하였다. 이를 통해 AA + iron에 의해 유도

된 산화적 스트레스가 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. AA + iron과 OJS을 함께 처리하였을 때 OJS의 농도에 의존적으로 세포 생존율이 유의하게 증가하였다. 특히, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 세포 생존율은 대조군과 비슷한 $99.49 \pm 0.12\%$ 로 나타내었다(Figure 2). 이를 바탕으로 추가 실험에서는 해당 농도를 적용하여 진행하였다(Fig. 2).

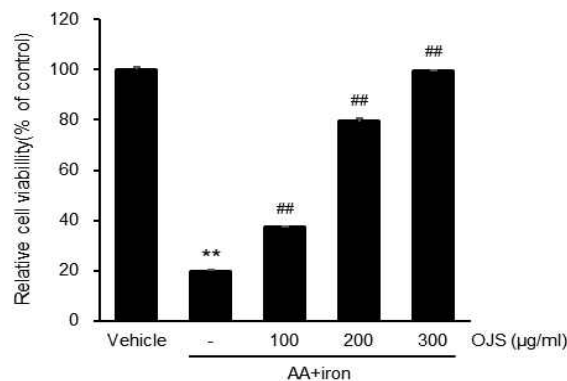


Fig. 2. Protective effect of OJS against cytotoxicity caused by AA+iron.

Cell viability was assessed by the MTT assay. HepG2 cells were treated with AA (10 μm) for 1 hour, and then incubated with OJS (100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 12h, cells were incubated with iron (5 μm) for 2 h.

All data represent means \pm SD of three replicates (** $p < 0.01$ between control and AA+iron treated cells; ## $p < 0.01$ between AA+iron and AA+iron treated cells with OJS).

3. OJS의 mitochondrial dysfunction 억제 효과

AA + iron에 의해 유도된 산화적 스트레스는 미토콘드리아 막 전위(Mitochondrial membrane potential)를 파괴하여 미토콘드리아 막투과성(Mitochondrial membrane permeability)의 증가시킨다¹¹⁾. OJS이 AA + iron에 의한 미토콘드리아 기능 장애를 억제할 수 있는지 확인하기 위해 HepG2 세포에 rhodamine 123을 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다. rhodamine 123은 미토콘드리아 막 전위가 정상일 때 미토콘드리아 외막(mitochondria outer membrane)을 잘 투과하여 미토콘드리아 기질

(mitochondrial matrix)에 축적되고 높은 형광 강도를 나타낸다. 하지만 미토콘드리아 막 전위가 파괴되면 rhodamine 123은 미토콘드리아 외막을 잘 투과하지 못해 미토콘드리아 기질에 붙지 못하고 낮은 형광 강도를 나타낸다. AA+iron 처치 군은 대조군에 비해 낮은 형광 염색 구간이 증가하였다. AA+iron과 OJS을 함께 처치하였을 때 형광 강도는 대조군과 비슷한 수준의 높은 형광 강도 구간을 나타낸다. 이를 통해 OJS이 AA+iron에 의한 미토콘드리아 기능 장애를 억제한다는 사실을 확인하였다(Fig. 3).

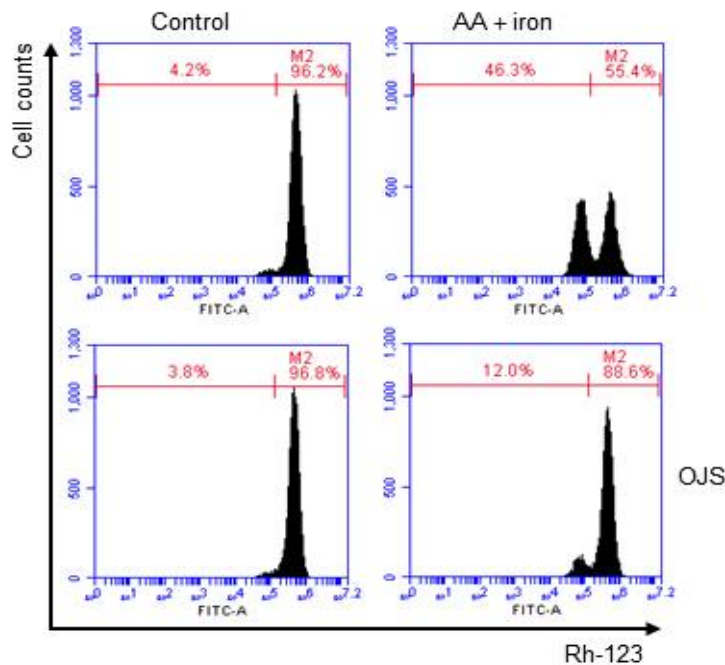


Fig. 3. Effect of OJS on AA+iron-induced mitochondrial dysfunction.

Mitochondrial membrane permeability (MMP) was measured by flow cytometry. Cells were treated with AA, iron and 300 μ g/mL OJS as described in figure 2, and then stained with rhodamine 123 (0.05 μ g/mL) for 30 min.

4. OJS이 LKB1-AMPK pathway 활성화에 미치는 영향

AA+iron에 의한 산화적 스트레스에 OJS이 나타내는 세포 보호 효과의 작용 기전을 확인하기 위해 Immunoblot analysis를 수행하였다. AA+iron에 의한 산화적 스트레스에 Liver kinase B1 (LKB1)-AMP- activated protein kinase (AMPK) pathway의 활성화가 세포 보호 효과를 나타낸다는 연구 결과가 보고되었다¹²⁾. OJS 300 μ

g/ml을 시간에 따라 처치한 결과 phospho-LKB1의 발현이 30, 60분에서 증가하였으며, p-AMPK의 발현 또한 30, 60분에서 증가하였다. AMPK 활성화에 의해 인산화되는 하위인자 Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)의 인산화 역시 60분부터 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

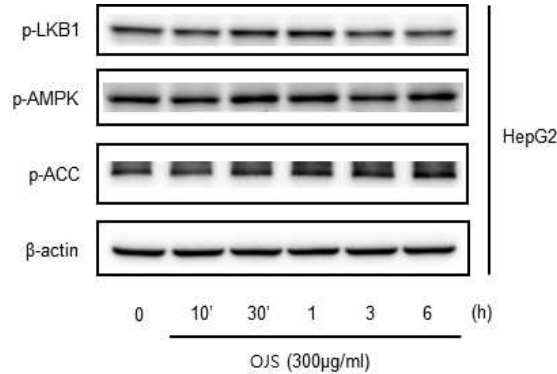


Fig. 4. Effect of OJS on AMPK activation.

Immunoblotting analysis for key signaling proteins of AMPK pathway was performed with HepG2 cell lysates. HepG2 cells were incubated in serum free media for 12 h, followed by treated with 300 µg/mL OJS for indicated time periods.

5. OJS이 YAP 활성화에 미치는 영향

Hippo-YAP pathway는 산화적 스트레스와 관련 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 Yes-associated protein (YAP)은 산화 스트레스 유발 신호를 매개하는 전사 활성인자로 알려져 있다¹³⁾. 그러므로 Hippo-YAP

pathway와 관련된 단백질인 Large Tumour Suppressor Kinase 1 (LATS1)과 YAP을 추가로 확인하였다. OJS 300 µg/ml을 시간에 따라 처치한 결과 YAP의 상위인자인 LATS1의 인산화는 10분에서 증가하였으며, YAP의 인산화 또한 10분에서 증가하였다(Fig. 5).

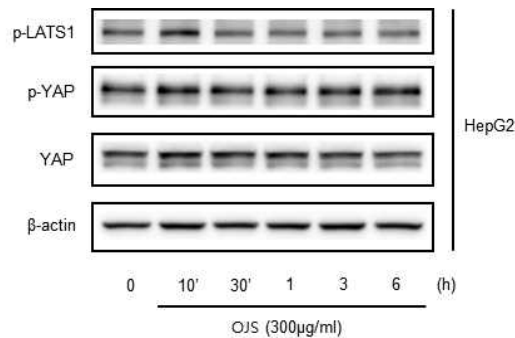


Fig. 5. Effect of OJS on YAP activation.

Immunoblotting analysis of YAP-associated proteins was performed with HepG2 cell lysates. Lysates of hepG2 cells progressed as describe in Figure 3.

IV. 고찰

최근 전문 의약품이 아닌 약용 식물 추출물을 활용한 대체 의약품 및 건강기능식품이 많이 보급되고 있는 상황에서 Cytochrome P450(CYP450) 효소에 대한 관심은 커지고 있다¹⁴⁾. CYP450은 약물 대사에 핵심적인 역할을 하는 효소 계열이다. 30개 이상의 CYP450 효소

중 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, 그리고 CYP3A4 가 약물 대사에 중요한 역할을 한다¹⁵⁾. CYP450 효소에 의해 대사되는 약물이 있는가 하면, CYP450 효소를 유도하거나 억제하는 약물도 존재한다¹⁶⁾. 약물-약물의 상호작용뿐만 아니라 약물-약용 식물의 상호작용 또한 CYP450 효소의 반응을 중심으로 연구되고 있다¹⁷⁾. 결명자 추출물은 쥐의 간 마이크로솜 CYP450 효소의 발현에 변화를 주었고¹⁸⁾, 쥐꼬리망초과

에 속하는 thunbergia laurifolia는 간세포의 CYP450 효소 mRNA의 발현을 적절히 조절함으로써 간세포의 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다¹⁹⁾. 본 연구에서는 OJS가 CYP450 효소 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. OJS 처치를 통해 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6, 그리고 CYP2E1의 발현이 변하는 것을 관찰하였다.

오적산(五積散)은 한(寒), 식(食), 기(氣), 혈(血), 담(痰)이 적체한 오적(五積)을 다스려 통증을 완화하는 방제로 쓰였다. 현대 의학에서 통증의 대표적인 원인으로 염증을 보고 있다. lipopolysaccharide로 유도된 염증 rat 모델에 오적산을 투여한 연구에서는 항염증 효과를 보였고, 간 손상지표의 상승을 억제하는 것으로 확인되었다²⁰⁾. F- α 로 유도된 혈관내피세포 염증 모델에 적용한 연구에서는 항산화 효과를 나타냈으며, Nrf2/HO-1 발현을 유도하여 혈관 염증에 대한 보호효과를 나타내는 것으로 보고되었다²¹⁾. 고지방식이 마우스 및 3T3-L1 지방세포에 적용한 연구에서는 마우스의 지방축적 억제 및 지방세포 분화 억제 효과를 나타내었으며, 특히 AMPK 인산화를 증가시키는 것으로 확인되었다²²⁾. 선행 연구들을 통해 오적산은 Nrf2 발현을 통해 ROS 생성을 억제하고, 이는 Nrf2와 관련된 AMPK의 인산화에 의한 것으로 추측할 수 있다. 아직 오적산이 산화적 스트레스로 유도된 간손상에 미치는 효과에 대해 보고된 바 없어 본 연구에서는 오적산을 AA와 iron에 의해 산화적 스트레스가 유발된 간 세포주에 적용하여 효과와 기전을 규명하였다.

산화적 스트레스는 심혈관계 질환, 신경계 질환, 당뇨 그리고 간 질환의 주요 원인으로 알려져 있다^{4,23)}. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포 대사의 일반적인 부산물로서, 박테리아 및 기타 병원체에 대항할 수 있는 세포 독성을 일으킨다²⁴⁾. 하지만 항산화 능력이 부족하거나 산화-항산화의 균형이 깨질 경우 세포 내 ROS의 과도한 증가로 이어져 phospholipase를 활성화시킨다. 활성화된 phospholipase는 세포막의 인지질과 지방산을 인산화시켜 아라키돈산(arachidonic acid, AA)를 유리시킨다. AA가 지나치게 많이 유리되면 세포와 미토콘드리아에 ROS가 축적되고 미토콘드리아 막 전위(Mitochondrial membrane potential)를 변화시킨다²⁵⁾. 미토콘드리아 막 전위의 변화는 미토콘드리아 막의

투과성(Mitochondrial membrane permeability)을 증가시켜 미토콘드리아 막 내에 존재하는 SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase)과 Cytochrome C 같은 pro-apoptotic factors가 세포질로 방출된다. 이로 인해 Caspase와 같은 apoptosis 관련 단백질이 활성화되어 세포자멸사가 일어난다²⁶⁾.

철(iron)은 혈액 내 산소 운반을 담당하는 헤모글로빈과 근육내 산소를 제공하는 마이오글로빈의 핵심 구성 성분으로 간, 근육, 비장, 그리고 골수에 저장되어 있다. 하지만 철이 과하게 존재할 경우 염증 유발뿐만 아니라 AA의 과한 방출을 유도하여 산화 스트레스를 촉진시킨다²⁷⁾. AA와 철을 병용 처치는 과한 세포 독성을 일으키므로 산화적 스트레스 유발 모델로 연구에서 쓰인다^{28,29)}. 본 연구에서 AA와 철을 병용처치하여 유발된 산화적 스트레스에 대한 OJS의 세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 확인한 결과 OJS 농도에 의존적으로 cell viability가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 이후 Flow cytometric analysis를 이용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정된 결과, AA와 철을 병용처치하였을 때 미토콘드리아 막 전위가 저하되었으며, OJS를 함께 처치하였을 때 막 전위 저하가 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해 OJS이 AA와 철에 의해 유도되는 세포 독성 및 미토콘드리아 기능 장애로부터 보호할 수 있다는 사실을 확인하였다.

OJS가 LKB1-AMPK pathway에 영향을 미치는지 규명하기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. OJS를 시간별로 처치한 결과 인산화된 LKB1과 AMPK의 발현이 증가하는 것을 관찰하였으며, 하위인자인 ACC의 인산화 또한 확인할 수 있었다. 이를 통해 OJS는 LKB1-AMPK pathway의 활성화를 통해 간세포를 보호하는 것으로 사료된다. 최근 연구에서 Hippo-YAP pathway의 활성화는 간세포 보호 효과를 나타내며, AMPK pathway와 관련이 있는 것으로 가능성을 보였다²⁹⁾. OJS가 Hippo-YAP pathway에 영향을 미치는지 규명하기 위해 OJS를 시간별로 처치한 후 immunoblot analysis를 수행한 결과 인산화된 LATS1과 YAP의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 해당 결과는 Hippo-YAP pathway의 활성이 간세포를 보호할 수 있다는 가능성을 뒷받침하는 근거를 제공할 것으로 기대된다.

V. 결론

본 연구에서는 OJS의 항산화 효과를 평가하기 위해 사람의 간 세포주에 AA와 iron을 병용처리하여 산화적 스트레스가 유발된 모델로 실험을 진행하였다. OJS의 세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 확인하였고, flow cytometer로 미토콘드리아 막 전위 변화를 측정하여 미토콘드리아 보호 효과 또한 확인하였다. OJS이 나타내는 세포 보호 효과의 작용 기전을 확인하기 위해 immunoblot analysis를 실시하였으며, LKB1-AMPK pathway 및 Hippo-YAP pathway의 활성화에 관련된 단백질의 발현을 증가시켰다.

따라서, OJS는 산화적 스트레스로 오는 간세포 손상에 대해 보호 효과가 있음을 입증하였고, 산화적 스트레스에 대한 보호 기전으로는 LKB1-AMPK pathway 및 Hippo-YAP pathway의 활성을 통한 것으로 확인하였다. 또한, 약물 대사에 핵심적인 역할을 하는 CYP450 효소의 발현에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 그러나 CYP450효소의 변화가 LKB1-AMPK pathway 및 Hippo-YAP pathway 활성화에 직접적인 영향을 미쳐 산화적 스트레스 억제를 통한 세포 보호 효과가 나타나는지 규명하기 위해 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

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. Park HM, Shin HT, Lee SD. Herbal Toxicological Effects on Rats' Fetus-Focusing on Ojeoksan-. Journal of Society of Preventive Korean Medicine. 2008;12(2):27-35.
2. Lee MS, Jeong SM, Oh SH, Lee HY, Leem HG, Ahn YM, Ahn SY, Lee BC. A Retrospective

Study on the Effect of the Co-Administration of Ojeok-san and Hypoglycemic Agents on Blood Glucose Levels in Type 2 Diabetes Mellitus. J. Int. Korean Med. 2021; 42(1):40-52.

3. Lee NH, Ha HK, Lee HY, Jung DY, Choi JY, Lee JK, Shin HK. Analysis of Studies on Ojeok-san for Establishment of Evidence Based Medicine. Herbal Formula Science. 2008;16(2):1-9.
4. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav U. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Life Sciences. 2016;148: 183-193.
5. Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. World J Gastroenterol. 2010;16(48): 6035-6043.
6. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World J Gastroenterol. 2014;20(25):8082-8091.
7. Adwas AA, Elsayed A, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering. 2019;6(1):43-47.
8. Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. Current opinion in cell biology. 2015;33:1-7.
9. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metabolism. 2006; 3(6):403-416.
10. Yang YM, Han CY, Kim YJ, Kim SG. AMPK-associated signaling to bridge the gap between fuel metabolism and hepatocyte viability. World J Gastroenterol. 2010;16(30): 3731-3742.
11. Kim YW, Lee SM, Shin SM, Hwang SJ, Brooks JS, Kang HE, Lee MG, Kim SC, Kim SG. Efficacy of sauchinone as a novel AMPK-activating lignan for preventing iron-induced oxidative stress and liver injury. Free Radical Biology and Medicine. 2009;47(7):1082-1092.



12. Dong GZ, Jang EJ, Kang SH, Cho IJ, Park SD, Kim SC, Kim YW. Red ginseng abrogates oxidative stress via mitochondria protection mediated by LKB1-AMPK pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13(64):doi:10.1186/1472-6882-13-64.
13. Shao D, Zhai P, Del Re DP, Sciarretta S, Yabuta N, Nojima H, Lim DS, Pan D, Sadoshima J. 2014. A functional interaction between Hippo-YAP signaling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nature Communications*. 2014; 5:3315.
14. R Bhadra, K Ravakhah, RK Ghosh. Herb- drug interaction: The importance of communicating with primary care physicians. *Australas Med J*. 2015; 8(10):315-319.
15. Vohora D, Singh G. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*, 1st ed. Academic Press, Cambridge, 2017, p.81-106.
16. Sharma AK, Kapoor VK, Kaur G. Herb-drug interactions: A mechanistic approach. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020;doi.org/10.1080/01480545.2020.1738454.
17. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, Ang C. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 72(3):276-287.
18. Xu LL, Tang XL, Ma ZC, Wang YG, Liang QD, Tan HL, Xiao CR, Li H, Yuan M, Gao Y. Effects of aqueous extract of Cassiae Semen on activity hepatic microsomal CYP450 isozymes in rats. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2016;41(8):1504-1510.
19. Rocejanasaroj A, Tencomnao T, Sangkitikomol W. *Thunbergia laurifolia* extract minimizes the adverse effects of toxicants by regulating P-glycoprotein activity, CYP450, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(1): 205-219.
20. Kim JH, Lee DH, Jung SE, Yang WM, Kwon BI. Anti-inflammatory Effects of Ojeok-san in LPS-induced Inflammatory Rat Model. *The Society of Korean Medicine*. 2021;42(2):21-30.
21. Han BH, Kim HY, Hong MH, Na SW, Gang DG. Inhibitory Effects of Ojeoksan on TNF- α -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2018;33(4):59-67.
22. Choi HM, Moon SO, Lee HH. Inhibitory effect of by Ojeok-san lipid accumulation in high fat diet-induced obesity mice and 3T3-L1 adipocytes. *The Korea Association of Herbology*. 2015;30(4): 121-128.
23. Spector A. Oxidative Stress and Disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2000;16(2): 193-201.
24. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(6):389-402.
25. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1, 2-dithiole-3-thione congeners. *Molecular Pharmacology*. 2009;75(1): 242-253.
26. Hasenjaeger A, Gillissen B, Mueller A, Normand G, Hemmati PG, Schuler M, Doerken B, Daniel PT. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-xL in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells. *Oncogene*. 2004;23:4523-4535.
27. Price L, Kowdley KV. The Role of Iron in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2009;23(12): 822-828.
28. Caro AA, Cederbaum AI. Synergistic toxicity of iron and arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Molecular Pharmacology*. 2001;60(4):742-752.
29. Lee EH, Baek SY, Park JY, Kim YW. Emodin in *Rheum undulatum* inhibits oxidative stress in the liver via AMPK with Hippo/Yap signalling pathway. *Pharm Biol*. 2020;58(1):333-341.