



Original Article / 원저

구속 스트레스 모델에서 석결명의 간손상 및 우울증 관련 인자에 미치는 영향

김민정^{1#}, 오탈우^{2#}, 도현주³, 김광연², 양주혜², 손재동¹, 양예진¹, 유영주¹, 김우현⁴, 강승호⁵, 이동호⁶, 기승희^{6*}, 김영우^{7*}, 박광일^{1*}

¹경상대학교 수의과대학 수의생리학, ²한국한의학연구원 한의기술응용센터, ³대구 경북첨단의료산업진흥재단, ⁴경상대학교 수의과대학 수의전염병학, ⁵대구한의대학교, ⁶인제대학교 부산 백병원, ⁷동국대학교 한의과대학

Effect of *Nardotidis seu Sulculii Concha* water extract (NSCE) on liver damage and depression in restraint-induced stress model

Min-Jung Kim^{1#}, Tae-woo Oh^{2#}, Hyun-joo Do³, Kwang-yeon Kim², Joo-hye Yang², Jae-Dong Son¹, Ye-jin Yang¹, Young-Zoo You¹, Woo-Hyun Kim⁴, Seung-Ho Kang⁵, Dong-ho Lee⁶, Seung-hee Ki^{6*}, Young-Woo Kim^{7*}, Kwang-Il Park^{1*}

¹Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

²Korean Institute of Oriental Medicine Technology Application Center

³Daegu-gyeongbuk Medical innovation foundation

⁴Department of Veterinary Epidemiology College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

⁵Daegu Haany University

⁶Department of Anaesthesiology and Pain Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University

⁷School of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : This study investigated anti-inflammatory effects of *Nardotidis seu Sulculii Concha* water extract (NSCE) against restraint-induced stress.

Methods : *In vivo*, NSCE was orally administered to male white mice at concentrations of 250 mg/kg and 500 mg/kg for 3 days, and then restraint-induced stress was induced for 6 hours. The level of liver damage was measured by serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH). The stress-related hormones such as cortisol and corticosterone were measured by ELISA assay. Also, western blot analysis was performed to detect expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins. Pathological changes were observed by hematoxylin and eosin (H&E) staining of the liver tissue, and Immunohistochemical (IHC) staining was performed to examine liver inflammation through macrophage infiltration.

Results : The AST, ALT, LDH and the stress related hormones such as cortisol and corticosterone were significantly decreased in the NSCE treated group compared with stress group. In histological analysis, H&E staining of liver tissues did not detect the hepatic injury or damage in all groups. As a result of IHC staining, it was confirmed that infiltration of macrophages was increased in the stress-induced group, but decreased in the group treated with NSCE. The COX-2 and MAPK proteins expression was significantly increased by restraint-induced stress, but these proteins were decreased in the NSCE treated group.

Conclusions : These results suggest that NSCE has the anti-inflammatory activity in restraint-induced stress model, and it is believed that NSCE can be used for the prevention of liver inflammation.

Key words : Anti-Inflammation, restraint-induced stress, liver, *Nardotidis seu Sulculii Concha*.

I. 서론¹⁾

스트레스는 긴장을 뜻하는 라틴어 stringere에서 유래된 말로 신체의 평형을 자극하는 외력에 대해 원래 상태를 유지하려는 반작용을 뜻한다. 그리고, 현대인에게 있어서 아주 큰 건강위험 요인이 작용하고 있다¹⁾.

스트레스 요인에 노출되면, 자율 신경계와 스트레스 호르몬을 통해 장내 내독소의 유입 증가, 산화스트레스 심화에 따른 염증세포의 간 조직으로의 이동을 유발하여 간 조직의 손상을 더욱 악화시키며²⁾, 간 관련 질병은 stress와 밀접한 관련이 있다³⁾.

간은 우리 몸에서 면역과 해독을 담당하며 스트레스나 근육에 쌓여 있는 피로물질을 제거하고 인체 생존에 필요한 에너지를 만들어 저장한다. 그러나 스트레스를

받게 되면 간 내의 면역반응을 억제하는 시스템에 혼란을 유발하여 염증성 간 손상이 나타나게 된다⁴⁾. 간세포가 손상되면 reactive oxygen species(ROS)가 생성되고 이로 인해 생성된 간성상세포는 extracellular matrix를 생성해, 간 섬유화 상태로 변환된다⁵⁾. 일반적으로 간섬유증은 결절이 없으며 간 손상 원인을 제거하면 회복이 가능하지만, 간 섬유화 과정이 반복되면 결절성 간경변으로 진행된다⁶⁻⁷⁾. 따라서 간 염증 및 섬유화 억제 메커니즘을 가진 간 손상 예방제 또는 치료제를 개발이 필요하다⁸⁾.

석결명(*Nardotidis seu Sulculii Concha* : NSC)은 전복을 지칭하는 말이며, 《자산어보》에는 鰓魚라 하였고, 《본초강목》에는 九孔螺라고도 쓰인다. 본 약제는 두통, 현기증, 갑작스러운 인체 경련 등 증상에 쓰이는

#These authors equally contributed to this work.

*Corresponding author : Seunghee Ki, Department of Anaesthesiology and Pain Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University, 75 Bokji-ro, Busanjin-gu, Busan, 47392, Republic of Korea.

Tel : +82-51-890-6520, Fax : +82-51-898-4216, E-mail : emong0303@gmail.com

*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

*Corresponding author : Kwang Il Park, Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-55-772-2342, Fax : +82-55-772-2349, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

•Received : May 10, 2022 / Revised : May 12, 2022 / Accepted : May 18, 2022

것으로 알려져 있다⁹⁾. 또한, 다양한 선행연구에서 석결명은 피부세포에 대한 항산화 및 항노화 효과¹⁰⁾, 인삼 모상근 성장과 ginsenoside 성분들의 생합성 반응에 대한 효과¹¹⁾ 및 산화적스트레스에 대해 간세포 및 간의 보호 작용¹²⁾에 대한 효과가 있음이 알려져 있다. 그러나, 석결명이 다양한 생리적 유용성을 지닌 소재로 인식하고 있음에도 불구하고 스트레스로 인한 염증 작용에 대한 분자생물학적 메커니즘 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 구속 스트레스 유발 동물모델에 석결명의 간 염증 억제 효과를 보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

석결명은 대원약업사(Daegu, Korea)에서 구매하여 석결명 200g을 3차 증류수로 실온에서 열수 추출하였다. 열수 추출한 농축액은 0.2 μm filter를 이용하여 여과한 뒤 동결건조하여 NSCE(*Nardotidis seu Sulculii Concha* water Extract)로 명명하고 사용하였다.

2. 동물모델

Table 1. Control and treatment groups (n=5).

Group	
Control group	CTL
Restraint-induced stress group	Stress
Restraint-induced stress group treated with NSCE 250 mg/kg	S+N250
Restraint-induced stress group treated with NSCE 500 mg/kg	S+N500
Control group treated with NSCE 500 mg/kg	C+N500

3. 혈액 생화학적 검사

실험동물의 복대정맥으로부터 1 mL 이상의 혈액 채혈한 후 원심분리기를 사용하여 4 °C에서 10분간 3000×g로 혈청을 분리하였다. 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), lactate dehydrogenase(LDH)는 analysis kits(Point Scientific Inc., Canton, MI, USA)와 automated blood chemistry analyzer(Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석하였다. 또한 enzyme-linked immunosorbent assay(R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 스트레스 지표로서 혈청 코르티코스테론과 코르티솔 수치를 측정하였다.

실험동물은 6주령 수컷 흰쥐(27-32g)를 샘타코 주식회사(Osan, Korea)에서 구입하였고 1주일간 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였으며, 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하면서 사료(Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 물은 제한 없이 섭취하도록 하였다. NSCE는 250 mg/kg, 500 mg/kg의 농도로 총 3일 동안 경구 투여하였으며, 3일 동안은 1일 1회씩 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 NSCE를 경구투여하였다. 전체 실험 기간 중 대조군과 stress 유도군에는 NSCE 투여량과 동일한 양의 생리식염수를 경구 투여하였다. 구속 스트레스는 50 mL의 conical tube를 이용하여 유도하였으며, 구속 스트레스에 대한 노출은 6 h 동안 수행하였다. Table 1.와 같이 처리한 군으로 나누어 실시하였다. 실험 종료 당일 마취 후, 복대 정맥에서 혈액을 채취하여 보관하였으며, 실험동물의 간 조직은 적출하여 -80°C에 보관하였다. 본 연구는 한국한의학연구원의 동물보호 및 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)에 승인되었으며, 한국한의학연구원 IACUC의 지침에 따라 수행되었다.

4. Hematoxylin & Eosin(H&E) 및

Immunohistochemical(IHC) staining

간 조직의 일부를 10% paraformaldehyde(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정시킨 후 파라핀에 매립하고, microtome(Thermo fisher scientific, Germany)으로 4 μm의 두께로 조직을 절단하여 H&E으로 염색하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한, IHC는 F4/80 폴리클론 항체(1:50; Santa Cruz, USA)로 대식세포를 염색하였으며, 조직병리학적 변화는 광학 현미경으로 관찰하였다.

5. Western blot

간 조직을 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer

를 넣고 tissue grinder(BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄 후, 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, -80°C 에서 냉동 보관하였다. 간 조직의 COX-2, MAPK 단백질의 발현을 측정하기 위하여, 10 μg 의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C 에서 overnight 시킨 다음, Tris buffered saline with tween 20(TBS-T)로 6분마다 5회 세척하고, 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후, TBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 노출시킨 후, Chemidoc(Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인하였다.

6. 통계처리

실험 결과는 mean \pm standard error of the mean (SEM)로 나타내었고, t-test 및 one way analysis of variance(ANOVA)로 통계적 유의성을 검정하였고, $p < 0.01$ 그리고 $p < 0.001$ 의 유의성을 검증하였다.

III. 결과

1. 구속 스트레스로 인한 간 손상에 NSCE이 미치는 영향

구속 스트레스로 유도된 급성 간 손상에 대한 NSCE의 영향을 알아보기 위해 혈청 내 AST, ALT 및 LDH 수치를 측정하였다. Stress 그룹과 Control 그룹을 비교하였을 때, 혈청 AST, ALT 및 LDH 수치는 현저히 증가하였으며, NSCE 처리군에서는 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A, 1B, 1C).

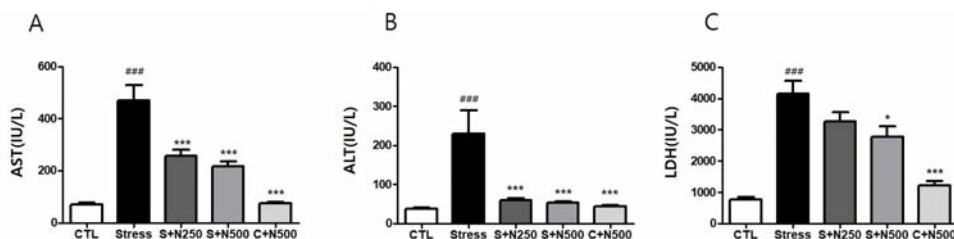


Fig. 1. Effects of NSCE on restraint-induced stress hepatic damage in mice. (A) Effects of NSCE on serum AST level. (B) Effects of NSCE on serum ALT level. (C) Effects of NSCE on serum LDH level. The results represent the mean \pm SEM values of each mouse in the same group. ### $p < 0.001$ versus the control group, * $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus the stress group.

2. 혈청 코르티코스테론 및 코르티솔 수치에 대한 구속 스트레스의 영향

구속 스트레스의 생리학적 영향을 평가하기 위해 혈청 코르티솔과 코르티코스테론의 수치를 측정하였다.

코르티솔과 코르티코스테론의 수준은 구속 스트레스에 의해 현저히 증가하였으며, NSCE 처리군에서는 코르티솔과 코르티코스테론의 농도가 유의하게 감소하였다 (Fig. 2A, 2B).

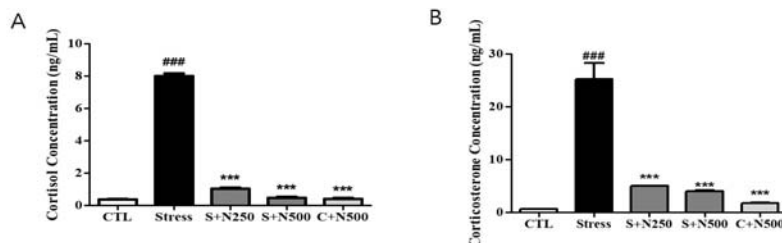


Fig. 2. The level of cortisol and corticosterone in serum were evaluated in restraint-induced stress models. (A) Cortisol levels. (B) Corticosterone levels. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ### $p < 0.001$ versus the control group, *** $p < 0.001$ versus the stress group.

3. 구속 스트레스로 유도된 동물 모델의 간 조직 세포에 미치는 NSCE의 영향

NSCE가 구속 스트레스 동물 모델의 간에서 macrophage infiltration에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 간 조직의 H&E 및 IHC 염색을 진행하였다. 그 결과, 모든 군에의 H&E 염색에서는 특이적인 조직 손상을

확인하지 못하였으나(Fig. 3A), IHC 염색을 진행하여 광학 현미경으로 관찰한 결과, 스트레스 유도군에서는 염증성 세포인 macrophage의 infiltration이 증가하였으나, NSCE를 처리한 동물 모델에서는 macrophage의 infiltration이 크게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

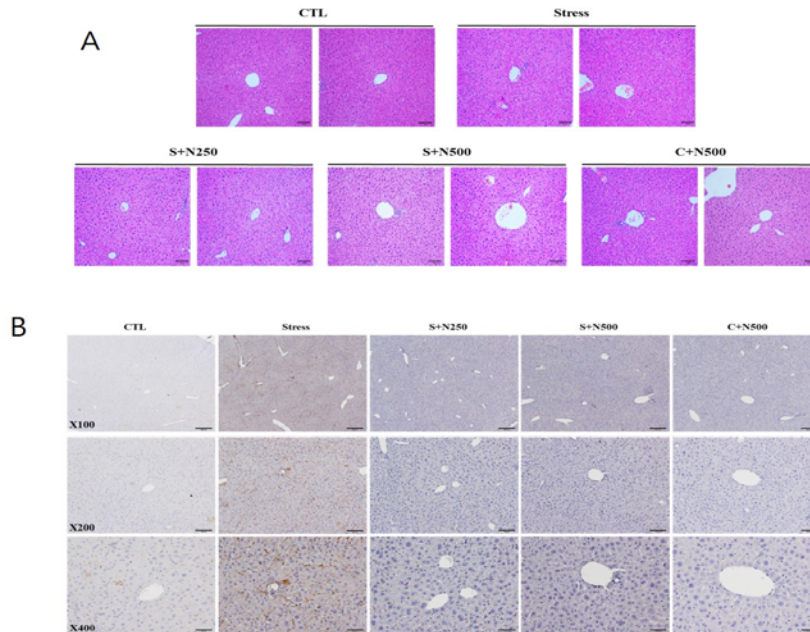


Fig. 3. Effects of NSCE on restraint-induced stress hepatic damage in mice. (A) Histological change(200 × magnification, scale bar: 100 μm). (B) IHC change (100, 200, 400 × magnification in the same region, and scale bar: 200, 100, 50 μm).

4. 구속 스트레스 유도된 MAPK 신호경로에 NSCE가 미치는 영향

NSCE 처리에 따른 간 조직에서의 COX-2 및 MAPK 발현량에 미치는 영향을 western blot을 통하여 분석하였다. 스트레스 유도군에서는 COX-2, p-ERK

및 p-JNK의 발현이 현저히 증가하였으나, NSCE을 250 mg/kg, 500 mg/kg를 처리한 그룹에서는 염증 관련 단백질의 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

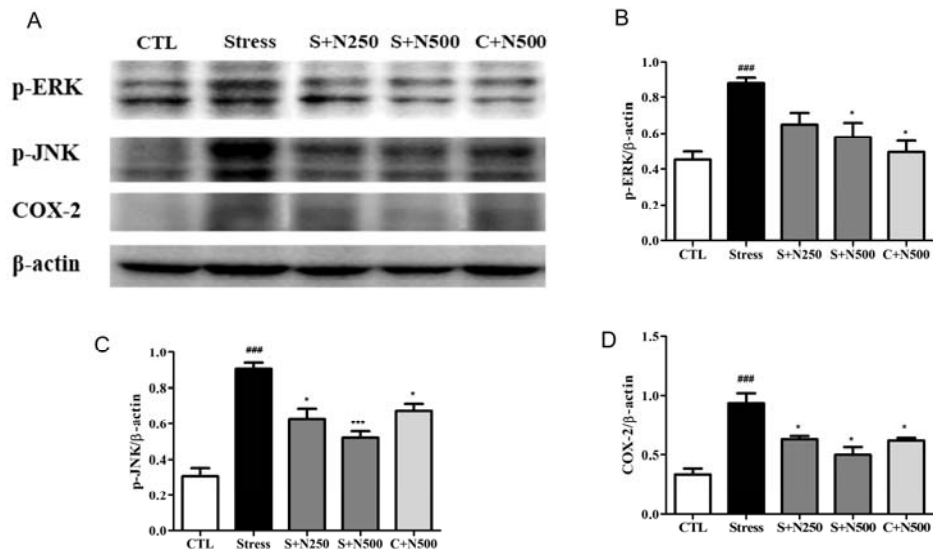


Fig. 4. Effects of NSCE on inflammation-related protein expression. protein expression of COX-2, p-ERK, p-JNK in restraint-induced stress models were measured by (A) western blot in the liver tissue. (B) The phosphorylation of ERK/ β -actin, (C) The phosphorylation of JNK/ β -actin and (D) The COX-2/ β -actin was assayed by western blot. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ###p < 0.001 versus the control group, *p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the stress group.

IV 고찰

Inflammation은 외부로부터 바이러스와 같은 병원체에 prostaglandin(PG), nitric oxide(NO), cytokines 등 염증 매개 물질에 의한 손상에 대응하는 신체반응으로 인체에 발생하는 질환 중 흔하게 나타난다¹².

한편, PG은 cyclooxygenase(COX)에 의해서 arachidonic acid로부터 생성된다¹⁴. COX에는 두 가지 isoform이 존재하며¹⁵, 그 중 COX-1은 다양한 조직에서 정상적으로 항상 발현하는 효소이며, COX-2는 평상시에는 발현되지 않다가 염증 부위에서 염증성 자극에 의하여 다량 유도 발현된다¹⁶. 다른 선행연구에 따르면 lipopolysaccharide(LPS)와 염증성 cytokine 등으로 폐포 대식세포와 호중구를 자극에 의해 유도되는 염증 매개 효소인 COX-2 발현은 염증과 통증의 증상을 증가시킨다고 보고 되어있다¹⁷⁻²⁰. 본 실험에서 NSCE를 처리한 그룹에서 COX-2의 발현량이 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 NSCE가 항염증 효과가 있다는 것을 나타낸다.

대식세포의 활성화에는 여러 가지 세포 내 신호 전달

계가 관여하며 이들 신호를 제어함으로써 대식세포가 활성을 억제되어 염증성 물질의 분비를 조절한다²¹. 대부분의 단백질들은 인산화되지 않은 상태로 존재하다가, 자극에 의해 활성화 되면 인산화되어 세포 내에 여러 가지 반응에 관여한다²². 현재까지 잘 알려진 염증 반응의 분자 신호 전달기전은 MAPK subfamily에 속하는 세가지 효소들로 ERK, JNK 및 P38 등이 있다. 이 중 ERK 활성화는 인산화에 의해서 나타나며 대식세포의 활성화에 관여하고 특히 NF- κ B를 활성화 시켜서 COX-2 발현에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²³. 또 다른 MAPK인 JNK는 stress 반응경로의 부분을 구성하며 염증성 cytokine과 같은 인자에 의해 유도된 cell stress에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다²⁴. 본 연구에서 NSCE가 MAPK pathway에 미치는 영향을 조사한 결과, p-ERK 와 p-JNK는 Stress가 유도군에서 높은 발현량을 나타내었으며, NSCE을 250 mg/kg, 500 mg/kg 처리한 그룹에서는 MAPK의 발현량이 농도가 의존적으로 감소함을 보였다. COX-2와 같은 인자들이 활성화되어 MAPK 경로를 억제함으로써 NSCE가 항염증 작용을 보인 것으로 사료된다.

간은 손상을 받으면 간세포 괴사 및 염증세포 infiltration, 간세포 섬유화 반응이 나타난다²⁵⁾. 이러한 질병의 원인, 예후 판단이 어려울 경우에 IHC로 관찰이 가능하다. 구속 스트레스로 인한 염증 효과를 면역조직화학적으로 확인하였으며, 스트레스 유도군에서는 macrophage의 infiltration이 대조군보다 증가하였으나, NSCE를 처리한 그룹에서는 macrophage의 infiltration이 현저히 감소 되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 스트레스가 간의 염증 반응에 영향을 준다는 것을 알 수 있었으며, NSCE가 macrophage의 infiltration을 억제함으로써 염증 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

또한 LDH는 심근, 적혈구, 뇌, 신장, 간 및 골격근 등의 여러 장기의 세포에서 존재하며 용혈, 심근경색, 암, 뇌염, 근육질환 및 간 괴사 등 발생 시 증가한다²⁶⁾. 그리고 ALT와 AST는 간손상 지표로서 gluconeogenesis에 관여한다²⁷⁾. ALT는 주로 간세포에 다량으로 존재하는 효소이고, AST는 간세포뿐만 아니라 적혈구와 골격근에 분포한다. 이 두 효소는 간에 상처나 손상 때문에 나타나며 inflammation을 확인하는 지표로 사용이 된다²⁸⁾. 간 손상 정도와 기능을 나타내는 혈청 검사인 ALT, AST 및 LDH 수치는 스트레스 유도군에서 상승하였으나, NSCE를 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하였음을 볼 수 있다(Fig. 1A, 1B, 1C). 그리고 선행 연구에서는 혈청 코르티솔과 코르티코스테론 수치 모두 스트레스와 밀접한 관련이 있음을 보여주고 있으며²⁹⁾, 스트레스는 시상하부 뇌하수체전엽에서 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone)를 증가시키며, 부신피질을 자극하여 코르티솔이 증가한다³⁰⁾. 코르티솔은 염증의 유발단계에서 대부분 분비되는 효소의 리소좀 막을 안정시켜 염증의 발생을 억제한다고 알려져 있다³¹⁾. 이와 상반되는 선행연구 결과에서는 간의 기능 이상, 간부전 및 간경화 같은 간의 염증 반응 시 코르티솔과 코르티코스테론의 수치가 증가하는 것을 밝혀냈다²⁾. 본 연구에서 구속 스트레스로 인해 혈청 코르티솔과 코르티코스테론이 증가하였으며, 그와 동시에 간의 염증 반응에 의해 혈청 코르티솔과 코르티코스테론의 수치가 높게 측정되었다. 그러나 NSCE를 처리한 군에서는 코르티솔과 코르티코스테론의 호르몬 수치가 감소하였으며, 이는 간 염증 반응의 감소에 의한 것을 나타내는 것이다. 더 나아가, 이는 두 호르몬이 스트레스에 밀접하게 관련이 있으며 구속 스트레스는 간의 염증과도 관련이 있다고 볼 수 있다.

연구결과를 요약하면 스트레스 유도군에서 간 손상에 대한 NSCE의 항염증 효과가 있었으며, 이러한 염증 억제는 MAPK 신호전달 경로를 통해 NSCE가 COX-2 발현을 억제시키는 것과 관련이 있다고 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 NSCE가 간에서의 항염증 효과를 알아보기 위하여 동물모델 군에게 구속 스트레스를 가한 후 AST, ALT 및 LDH와 같은 간 손상 및 염증 수치 확인하고, 코르티솔과 코르티코스테론의 스트레스 관련 호르몬 수치를 확인하고 조직학적 분석으로는 H&E와 면역조직화학(IHC) 염색을 통하여 간 조직에서 대식세포를 관찰하고 MAPK pathway를 통해 인산화된 ERK, JNK 단백질 발현을 관찰한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NSCE는 구속 스트레스 유발 동물모델에서 간의 염증반응을 억제한다.
2. NSCE는 AST, ALT 및 LDH의 억제함으로써 간 손상에 대한 보호작용을 한다.
3. NSCE는 코르티솔 및 코르티코스테론 호르몬 조절에 효과를 가진다.
4. NSCE는 MAPK 신호전달 경로를 통해 COX-2를 억제하여 항염증 효과를 가진다.

이러한 결과에 따라 NSCE가 구속 스트레스로 유도된 동물모델에서 대식세포 활성 억제와 항염증 효과가 있음을 알 수 있었으며, 간을 보호하는 유효한 약물 후보로서 NSCE가MAPK를 통한 전사인자 활성화 및 면역 조절에 관여하는 다양한 분자 기전과 NSCE의 활성 성분에 대한 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). This work was also supported by a grant (No. K17830) from the Korea Institute of Oriental Medicine funded by the Ministry of Education, Science and Technology (MEST), Republic of Korea.

References

1. KIM JK. Mediation effect of LMX quality on the relationship between job stress and job satisfaction. *The Journal of the Korea Contents Association*. 2010;10(11):424-434.
2. Joung JY, Cho JH, Kim YH, Choi SH, Son CG. A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury. *Brain Behavior*. 2019;9(3): e01235.
3. Russ TC, Kivimäki M, Morling JR, Starr JM, Stamatakis E, Batty GD. Association Between Psychological Distress and Liver Disease Mortality: A Meta-analysis of Individual Study Participants. *Gastroenterology*. 2015;148(5):958-66.
4. Spiers JG, Steiger N, Khadka A, Juliani J, Hill AF, Lavidis NA, et al. Repeated acute stress modulates hepatic inflammation and markers of macrophage polarisation in the rat. *Biochimie*. 2021;(180): 30-42.
5. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of Molecular sciences*. 2015;16:26087-124.
6. Aubé C, Bazeries P, Lebigot J, Cartier V, Boursier J. Liver fibrosis, cirrhosis, and cirrhosis-related nodules: Imaging diagnosis and surveillance. *Diagn Interv Imaging*. 2017 ;98(6):455-468.
7. Hong IH, Park SJ, Goo MJ, Lee HR, Park JK, Ki MR, Kim SH, Lee EM, Kim AY, Jeong KS. JNK1 and JNK2 regulate α -SMA in hepatic stellate cells during CCl₄ -induced fibrosis in the rat liver. *Pathology International*. 2013;63:483-91.
8. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM. The Anti-inflammatory Effect of Cinnamomi Ramulus. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2005; 26:140-51.
9. Kang SS. Medical Institute. *Dictionary of Chinese Medical Herbs*. Shanghai Science Publishing. 1998;2895-6.
10. Moon SY, Kim YW, Kim SC. Anti-Inflammatory Effects of Haliotidis Concha. *The Journal of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2013;26(4):70-80.
11. Jeong DY, Kim YJ, Shim JS, Lee JH, Jung SK, Kim SY, et al. The Effect of Haliotidis Concha on the Growth and Ginsenoside Biosynthesis of Korean Ginseng Hairy Root. *Journal of Ginseng Research*. 2009;33:206-11.
12. Kim KY, Lee SJ, Jee SY, Bae SJ, Song YR, Yun UJ, et al. Cellular-protective effects of Nardotidis seu Sulculii Concha Extract against oxidative stress. *Herbal Formula Science*. 2021;29(2):71-80.
13. Yoo DH, Leeinchul. The Antioxidant Activity of *Mangifera indica* L. var. *irwin* Branches Extracts and the Inhibitory Effect of Inflammatory Factors of iNOS, COX-2 in Macrophages. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2020;16(4):357-65.
14. Jew SS, Bae ON and Chung JH. Anti-inflammatory Effects of Asiaticoside on Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cell Line. *Journal of toxicology and public health, an official journal of the Korean Society of Toxicology*. 2003;19(1):33-37.
15. Seibert K, Masferrer JL. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*. 1994;4(1):17-23.
16. Lee HC, Yeom MJ, Kim GH, Han DO, Zhao MA, Shim IN et al. In vitro Study of Anti-inflammatory Effects of *Salvia Miltiorrhiza* Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2004;18(3):740-746.

17. Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;137(1):404-10.
18. Lo CJ, Cryer HG, Fu M, Lo FR. Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor kappaB. *Journal of Trauma.* 1998; 45(1):19-23.
19. Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *Journal of Immunology.* 1998;160(3):1402-10.
20. Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *The Journal of the American Society of Hematology.* 1997;(89)5: 1621-1628.
21. Guha M, Mackman M. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Elsevier.* 2001; 13:85-94.
22. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *Journal of Nutrition.* 2007;137:1616S-20S.
23. Jang BC, Paik JH, Kim SP, Shin DH, Song DK, Park JG, et al. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF-kappaB, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell Signal.* 2005;17(5):625-33.
24. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002;6:298(5600): 1911-2.
25. Kim SK, Seo JM, Chae YR, Jung YS, Park JH, Kim YC. Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis betaine supplementation in rats. *Chemico-Biological Interactions.* 2009;177:204-211.
26. Klein R, Nagy O, Tóthová C, Chovanová F. Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. *Vet Med Int.* 2020;2020:5346483.
27. KIM SE. Optimal evaluation of the results of liver function tests. *The Korean journal of medicine.* 2019;94(1):89-95.
28. Kim SZ, Jeong YM, Song WJ. A Temporary Increase of Liver Function Indicators, AST, ALT. *Korea Genetics Research Center/KSZ Children's Hospital.* 2013;13(1):43-47.
29. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, Luo MJ, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *Public Library of Science.* 2015;10(2):e0117503.
30. Nam ES, Uhm DC. Effects of Phytoncides Inhalation on Serum Cortisol Level and Life Stress of College Students. *Korean Journal of Adult Nursing.* 2008;20(5):697-706.
31. Lee HK. The Combined Effects of Treadmill Training and Black Garlic Intake on Cortiso Hormone, CK, CK-MB, LDH, Troponin T and Myoglobin in Rat. *Pukyong National University.* 2011.