



Original Article / 원저

Nrf2활성화를 통한 參朮健脾湯의 간세포보호효과

김예림, 진효정, 박상미, 변성희, 송창현, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학

Hepatoprotective effect of Samchulgeonbi-tang via Nrf2 Activation

Ye Lim Kim, Hyo Jeong Jin, Sang Mi Park, Sung Hui Byun, Chang Hyun Song, Sang Chan Kim*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Oxidative stress is an important cause of many diseases including liver injury. Therefore, adequate regulation of oxidative stress plays a pivotal role in maintaining liver function. Until recently, there has been no studies on the hepatoprotective effect of Samchulgeonbi-tang (SCGBT). Therefore, the hepatoprotective effect of SCGBT was investigated in HepG2 cells. In this study, oxidative stress was induced by arachidonic acid (AA) and iron.

Methods : To analyze the hepatoprotective effects of SCGBT against oxidative stress induced by AA + iron, the cell viability, apoptosis-related proteins and intracellular ROS, glutathione (GSH), and mitochondrial membrane permeability (MMP) were measured. In addition, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transcription activation and expressions of Nrf2 target gene were analyzed through immunoblot analysis.

Results : SCGBT increased the cell viability from AA + iron - induced cell death and inhibited apoptosis by regulating apoptosis related proteins. SCGBT protected cells by inhibiting ROS production, GSH depletion, and MMP degradation against AA + iron induced oxidative stress. Furthermore, Nrf2 activation was increased by SCGBT, and the Nrf2 target genes were also activated by SCGBT.

Conclusions : These results suggest that the SCGBT has a hepatocyte protection effect and antioxidant effect from AA + iron induced oxidative stress.

Key words : Samchulgeonbi-tang (SCGBT), Oxidative stress, Nrf2, Hepatoprotection.

I. 서론

간은 간실질세포, 간상세포와 쿠퍼세포 등의 여러 세포들로 구성되며, albumin과 담즙을 생성하여 소화과정의 영양소 저장 및 처리에 주된 역할을 한다^{1,2)}. 또한 간은 신진대사 및 해독작용과 에너지 및 물질대사가 활발한 기관이다^{3,4)}. 이러한 대사과정을 진행하기 위해서는 간세포 내의 미토콘드리아가 참여하게 되며, 결과적으로 세포 내에 대사산물인 과산화수소(H_2O_2), 과산화물 음이온(O_2^-) 및 하이드록실 라디칼(OH)과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다⁵⁾. 만약 체내의 항산화 시스템과 과도하게 생성된 ROS 사이에서 항상성(Homeostasis)에 불균형이 초래될 경우, 체내의 산화적 스트레스가 유발된다. 이는 세포의 lipids, proteins 및 DNA와 같은 세포 구성 요소들에 영향을 미치게 되고 결과적으로 세포의 구조적 및 기능적 변화를 초래하게 된다⁶⁾.

또한 산화적 스트레스는 당뇨병⁷⁾, 암⁸⁾, 심혈관질환⁹⁾, 간질환^{2,10)} 등의 다양한 질병의 원인으로 알려져 있다. 그 중 간질환의 경우 산화적 스트레스가 간염, 간섬유화 및 간암까지 유도된다고 밝혀진 바가 있다¹¹⁾.

따라서 간의 정상적인 대사기능을 유지할 수 있도록 산화적 스트레스 억제 및 산화적 스트레스로부터의 간 보호 효능에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{2,12,13)}. 蓼朮健脾湯은 <東醫寶鑑>에記載된 方劑로 人蓼, 白朮, 白茯苓, 厚朴, 陳皮, 山查肉 各一錢, 枳實, 白芍藥 各八分, 神麩, 麥芽, 縮砂, 甘草 各五分, 薑三棗二로 구성되어 있으며, 健脾養胃하고 運化飲食하는 효능이 있다. <東醫寶鑑>에서는 본 방제를 <醫方集略>에서 인용하였으며¹⁴⁾, 본방은 한방건강보험 요양급여한약 제제 중의 하나로 蓼朮健脾湯(혼합단미엑스산)으로 사용되고 있다¹⁵⁾.

蓼朮健脾湯에 대한 연구로는 면역기능 강화¹⁶⁾, 위궤양, 만성위염, 과산증, 복통, 소화불량과 같은 위장병 완화 효과¹⁷⁾, 노중대사성분 변화¹⁸⁾ 등이 보고된 바가 있다. 하지만 아직까지 蓼朮健脾湯의 간세포보호 효과와 관련된 연구는 보고 된 바가 없었다.

따라서 본 연구에서는 蓼朮健脾湯(혼합단미엑스산)을 이용하여 HepG2 세포에서 arachidonic acid (AA)와

iron의 병용처치로 유도된 산화적 스트레스에 대한 간 보호 효능을 평가하여, 蓼朮健脾湯의 효능 확대 및 활용도를 제고하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 연구에 사용한 蓼朮健脾湯(Samchulgeonbi-tang; SCGBT)은 (주)경방신약(인천, 한국)의 경방 蓼朮健脾湯(혼합단미엑스산)을 사용하였다. Poly (ADP ribose) polymerase (PARP), procaspase-3, procaspase-9, β -actin, lamin A/C, NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 항체와 HRP conjugated anti-mouse IgG는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Bcl-2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, Sestrin2 항체는 Protein tech group (Chicago, IL, USA)으로부터 구입하였다. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였고, 세포배양 시 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin과 streptomycin은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA)는 Calbiochem (SanDiego, CA, USA)에서 구매하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 및 rhodamine 123 등의 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. NER-PER™ Nuclear and cytoplasmic extraction reagents와 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. GSH BIOXYTECH GSH-400 kit는 Oxis International Inc. (Portland, OR, USA)에서 구매하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 HepG2 세포 (human hepatocyte derived cell line)는 American Type Culture Collection

*Corresponding author : Sang Chan Kim. Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.
Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : May 12, 2023 / Accepted : May 22, 2023

(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, DMEM에 10% FBS와 100 U/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 혼합하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator (MCO-20AIC, Sanyo Electric Biomedical Co., Japan)에서 배양하였다. 모든 세포실험은 80-90% 정도의 confluency로 배양된 세포를 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정

24-well plate에 well당 세포를 1.5×10^5 cell/well의 농도로 분주하여 배양한 후 HepG2 세포의 confluence가 약 80% 이상이 되었을 때, 12시간 동안 FBS가 포함되지 않은 배지에서 배양하였다. SCGBT 단독 독성을 분석하기 위하여 0.03-1.0 mg/mL의 SCGBT을 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 측정하였으며, SCGBT의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여 0.1-1.0 mg/mL의 SCGBT을 1시간 전처리한 후, 10 μ M AA (12시간)와 5 μ M iron (1시간)을 순차적으로 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 유도하고, 약물 처리가 완료된 HepG2 세포에 0.5 mg/mL의 MTT용액을 각 well 당 200 μ L씩 추가한 후 4시간 동안 반응하여 생성된 formazan을 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 이용하여 용해시킨 후, automated microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다. [cell viability (%) = 100 \times (absorbance of treated cell) / (absorbance of control cell)]

4. 전세포 추출액 및 핵 분획의 제조와 immunoblot 분석

약물 처리가 완료된 HepG2 세포로부터 전세포 추출액은 phosphatase 및 protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc.)이 첨가된 radioimmunoprecipitation assay buffer를 이용해 용해한 뒤, 4°C, 15,000 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고, 세포의 전세포추출액(whole cell lysate)으로서 상등액을 취하였다. 핵 분획(nuclear fraction)은 수거된 세포에 NER-PER™ Nuclear and cytoplasmic extraction reagents를 처리하여 제조사에서 제시된 방법에 따라 상등액을 추출하였다. 해당 추출액들은 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 함량을 정량하였다.

정량화된 lysate의 동일량을 8-12% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로

단백질의 크기별로 전기영동을 통해 분리한 후, nitrocellulose membrane으로 electro-transfer 하였다. 비특이적 결합을 제거하기 위해 5% skim milk로 상온에서 1시간 30분 blocking한 후, 표적단백질에 대한 1차 항체를 12시간 이상 반응시키고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 상온에서 반응시킨 뒤, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 image analyzing system (Imager 600, Amersham Biosciences)을 사용하여 감광하였다. 각 단백질의 상대적인 발현 정도는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)를 이용하여 분석하였다.

5. GSH 함량 측정

GSH 함량을 측정하기 위하여, 24-well plate에 각각의 well당 HepG2 cell을 1.5×10^5 개로 분주하여 배양한 뒤, SCGBT과 AA 및 iron을 순차적으로 처리하고, 처리가 종료된 cell을 500 μ L/well의 metaphosphoric acid를 이용하여 용해한 후, GSH BIOXYTECH GSH-400 kit를 이용하여 405 nm의 파장으로 automated microplate reader (Tecan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

6. 세포 내 ROS 측정

DCFH-DA를 이용하여 SCGBT가 세포 내에서의 ROS에 미치는 영향을 측정하였다. HepG2 세포를 24-well plate에 배양한 후, SCGBT을 0.3, 1.0 mg/mL로 처리하고, 1시간 후 10 μ M AA를 12시간 동안 처리하고 이후 5 μ M iron을 1시간 동안 처리하였다. 이후, 20 μ M DCFH-DA를 1시간 동안 37°C에서 배양한 뒤, 형성된 DCF의 형광 강도를 excitation (485 nm), emission (530 nm)의 파장에서 automated microplate reader (Tecan)로 측정하였다.

7. 미토콘드리아 막 전위의 측정

막투과성 양이온 형광 염료인 rhodamine 123을 이용하여 미토콘드리아 막 전위의 변화를 측정하였다. SCGBT, AA, iron을 순차적으로 처리한 HepG2 세포에 0.05 μ g/mL의 rhodamine 123을 30분간 처리하고, 1% FBS가 포함된 phosphate buffered saline을 이용하여 세포를 tube에 회수하였다. 회수된 세포는 sample 당 10,000개의 세포를 BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 리포터 유전자 분석

Antioxidant response element (ARE)가 매개되는 전사 활성화를 측정하기 위한 리포터 유전자 분석은 이전의 보고된 방법¹⁹⁾에 따라 수행하였다. 리포터 유전자인 pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA)이 형질 도입된 재조합 HepG2 세포를 24-well plate에 배양한 후, SCGBT, AA, iron을 순차적으로 처리를 한 후, passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 용해하였다. 이를 luciferase assay reagent (Promega)를 첨가하여 발현된 luciferase 활성을 측정하였다. 또한, luciferase의 활성은 표준곡선을 이용하여 단백질 농도로 보정하였다.

9. 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복 시행 후 SPSS version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 그룹 간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance를 이용하여 검정하였다. 사후검정은 Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test를 이용하였으며 mean \pm standard deviation (S.D.)로 표기하였다. 유의수준이 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 인 경우를 기준으로 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

III. 실험 결과

1. AA + iron으로 유도된 cell death에 대한 SCGBT의 보호 효과

먼저 SCGBT 단독의 세포 독성을 파악하기 위해 0.03–1.0 mg/mL의 SCGBT를 처리한 후, 세포 생존율을 측정하였다. SCGBT은 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL에서 무처리 control cell (100 \pm 26.94 %) 대비 95.12 \pm 6.95, 113.80 \pm 6.60, 119.16 \pm 13.42, 123.42 \pm 10.08 %로 통계적으로 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1A).

AA + iron을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 경우, AA + iron 처리는 무처리 control cell (100 \pm 5.93 %) 대비 33.40 \pm 3.12 %로 HepG2 세포의 생존율을 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 감소시켰으며, SCGBT를 0.1–1.0 mg/mL으로 전처리한 경우 AA + iron에 의하여 감소되는 세포 생존율을 회복시키는 경향을 나타냈으며, 1.0 mg/mL 농도에서 103.60 \pm 6.70 %로 AA + iron 처리 그룹에 비하여 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. B). 이러한 결과는 SCGBT 1.0 mg/mL는 단독적인 세포 독성은 없으며, AA + iron로 유도된 cell death에 대하여 세포보호 효과가 있음을 나타낸다.

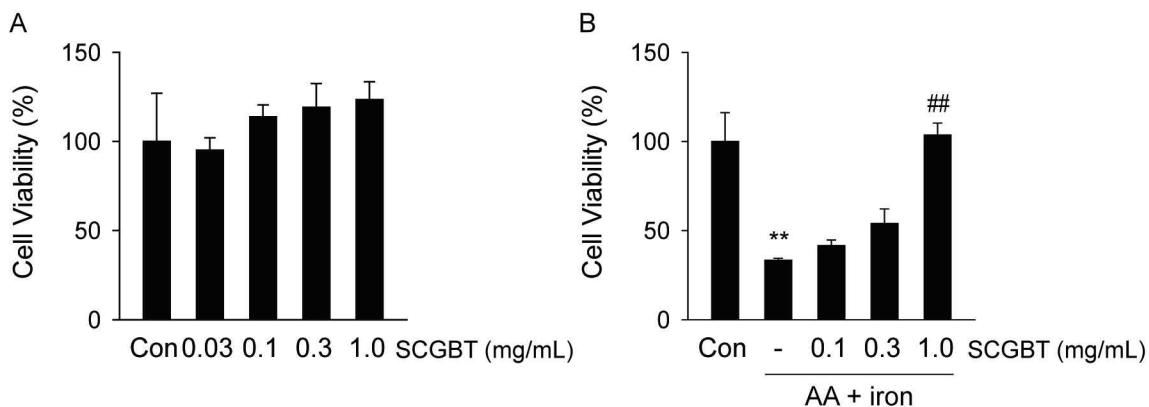


Fig. 1. The effect of SCGBT on AA + iron-induced cell death

(A) The effect of SCGBT alone on cytotoxicity. HepG2 cells were treated with 0.03–1.0 mg/mL of SCGBT for 24 h. (B) The cytoprotective effect of SCGBT. HepG2 cells were incubated in 0.1–1.0 mg/mL of SCGBT for 1 h prior to the addition of AA (10 μ M), and the cells were further incubated for 12 h. Then, the cells were incubated with iron (5 μ M) for 1 h. The effect of SCGBT on cell viability was assessed using MTT assays. All data represent the mean \pm S.D. of three separated experiments (Significant compared with control; ** $p < 0.01$; Significant compared with AA + iron, ## $p < 0.01$).

2. AA + iron 유도성 세포자멸사에 대한 SCGBT의 억제

세포 내에서 apoptosis 관련 단백질로는 Bcl-2 family, caspase-9, caspase-3 그리고 PARP 등이 잘 알려져 있다²⁰⁻²². ROS, UV 및 호르몬 등의 자극으로 인해 세포 내에서 Bcl-2 family가 활성화 될 경우 미토콘드리아의 막이 붕괴되어 cytochrome-c를 방출하게 되고, 방출된 cytochrome-c는 caspase-9을 활성화시킨다. 이렇게 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화시키고, caspase-3는 DNA repair에 관여하는 PARP의 기능을 억제하여 apoptosis 신호를 전달하게 된다²³. 이러한 내용을 바탕으로 SCGBT이 AA + iron으로 유도되는 세포자멸사를 억제하는지 확인하기 위해서 cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3 및 Bcl-2 발현의 변화를

immunoblot을 통해 분석하였다(Fig. 2A). AA + iron 처치를 한 경우 무처리 control cell에 비해 cleaved PARP에서는 2.49 ± 0.45 로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였고, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2의 발현은 control 대비 0.39 ± 0.03 , 0.57 ± 0.04 , 0.38 ± 0.14 로 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다. 하지만 SCGBT 1.0 mg/mL을 전처치한 경우에는 cleaved PARP에서 0.98 ± 0.19 로 유의하게($p < 0.01$) 감소하였으며, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2의 발현은 1.12 ± 0.11 , 1.42 ± 0.19 , 1.30 ± 0.09 로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 2B). 따라서 SCGBT은 세포자멸사를 억제함으로써 세포를 보호한다고 판단된다.

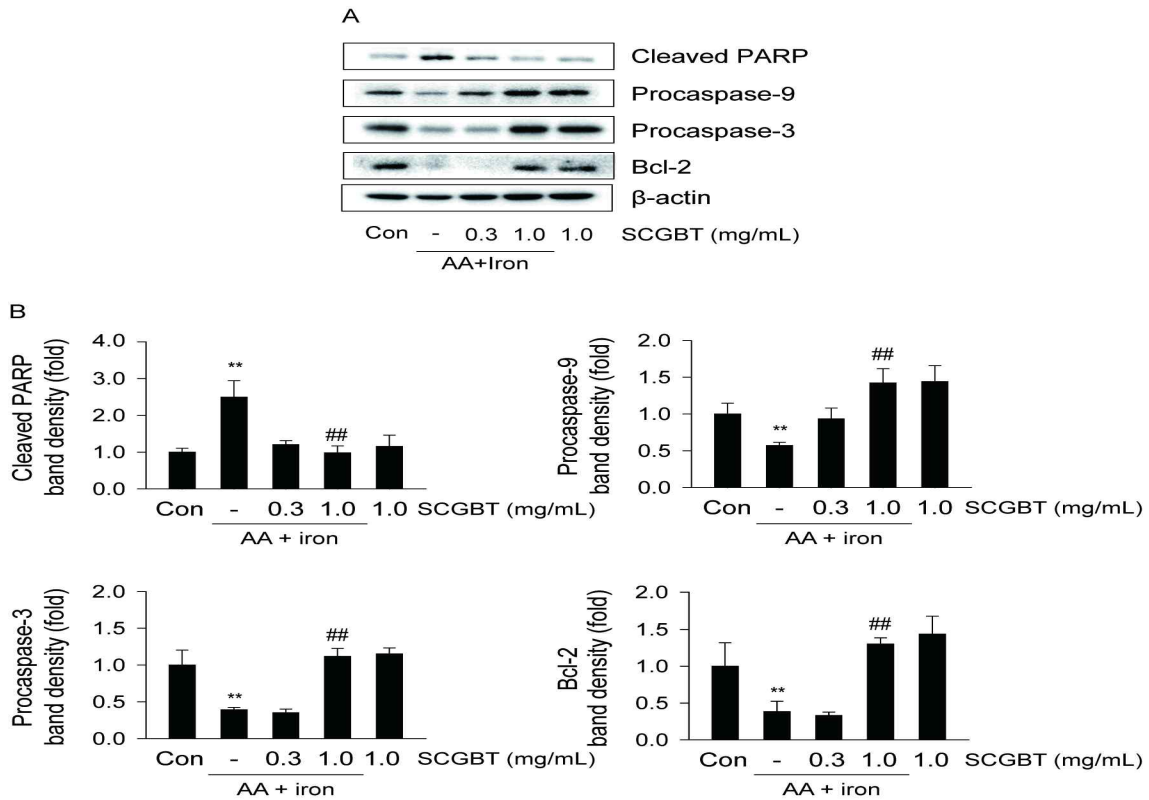


Fig. 2. Inhibitory effect of SCGBT on AA + iron-induced apoptosis

(A) Immunoblotting of apoptosis-related proteins. HepG2 cells were treated with 0.3 and 1.0 mg/mL SCGBT. After 1 h, the cells were incubated with AA ($10 \mu M$) for the next 12 h, and then subsequently exposed to iron ($5 \mu M$) for 1h. Expression of apoptosis-related proteins were observed by immunoblotting. Immunoblot against β -actin was used as loading control. (B) Cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3, and Bcl-2 expression intensities were determined by scanning densitometry. Data represent mean \pm S.D. of three separated experiments (Significant compared to control, $**p < 0.01$; Significant compared to AA + iron, $##p < 0.01$)

3. AA + iron 유도성 산화적 스트레스에 대한 SCGBT의 항산화 효과

AA + iron 처치는 세포 내에서 산화적 스트레스를 유발하여 세포 내의 ROS 생성 증가 및 GSH를 고갈시켜 세포자멸사를 유도한다고 밝혀져 있다^{24,25}. 이를 바탕으로 SCGBT의 항산화 효과를 확인하기 위해 GSH와 ROS의 세포 내 농도를 측정하였다. AA + iron 처치를 하여 세포 내의 환원형 GSH의 함량을 측정하였다. AA + iron 처치군은 무처리 control cell ($62.58 \pm 9.16 \mu\text{mol/mg protein}$)에 비하여 $17.00 \pm 7.75 \mu\text{mol/mg protein}$ 로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$)

감소하였으며, 1.0 mg/mL의 SCGBT 전처리에서는 $57.53 \pm 3.47 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 3A). 또한, AA + iron 처치를 한 HepG2 세포는 ROS가 무처리 control cell (1.00 ± 0.09) 대비 6.94 ± 0.90 배로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였으며, 0.3, 1.0 mg/mL의 SCGBT 전처리는 ROS의 생성을 AA + iron 처치군과 비교하여 1.77 ± 0.87 , 0.94 ± 0.18 배로 유의하게($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 3B). 이상의 결과는 SCGBT이 세포 내의 GSH의 고갈과 ROS의 생성을 억제하여 항산화 효과를 나타냄을 시사한다.

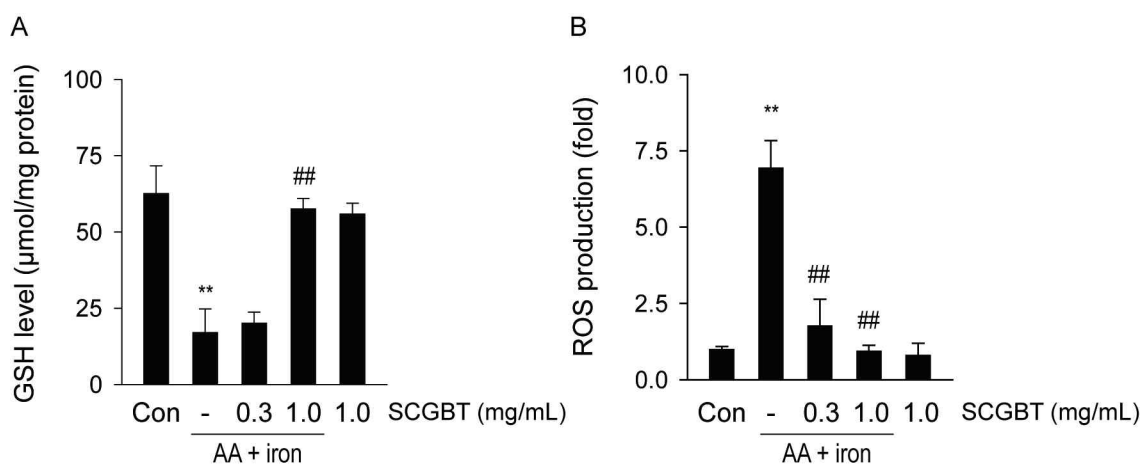


Fig. 3. Antioxidant effect of SCGBT on AA + iron-induced oxidative stress.

(A) Cellular GSH contents. The levels of GSH were measured by commercial kit as mentioned in materials and methods section, and the values were normalized by protein concentration. (B) ROS production. HepG2 cells were treated with 0.3 and 1.0 mg/mL SCGBT. After 1 h, the cells were incubated with AA ($10 \mu\text{M}$) for the next 12 h, and then subsequently exposed to iron ($5 \mu\text{M}$) for 1 h. DCFH-DA ($20 \mu\text{M}$) was added for 1 h after iron treatment. DCF fluorescence was monitored by automated microplate reader. All data represent mean \pm S.D. of three separated experiments. (Significant compared to control, ** $p < 0.01$; Significant compared to AA + iron, ## $p < 0.01$).

4. AA + iron 유도성 mitochondrial dysfunction에 대한 SCGBT의 억제 효과

미토콘드리아는 세포 내에서 에너지 생성뿐만 아니라 내인성 경로를 통한 세포자멸사를 유도한다²⁶. AA + iron은 미토콘드리아의 막전위 손상으로 인한 미토콘드리아 기능 이상을 야기한다^{27,28}. SCGBT의 미토콘드리아 보호 효과를 알아보기 위하여 미토콘드리아 막에 특이적으로 결합하는 형광염료인 rhodamine123을 이용한 MMP를 측정하였다. AA + iron을 처치한 경우, rhodamine123

negative fraction (RN)은 무처리 control cell ($19.2 \pm 4.60 \%$)에 대비하여 $70.86 \pm 3.58 \%$ 로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 반면 1.0 mg/mL SCGBT을 전처리한 경우에는 $21.6 \pm 0.59 \%$ 로 통계적으로 유의한($p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 4). 이상의 결과는 SCGBT이 산화적 스트레스로부터 유발되는 미토콘드리아의 막 기능 장애를 막아 세포보호 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

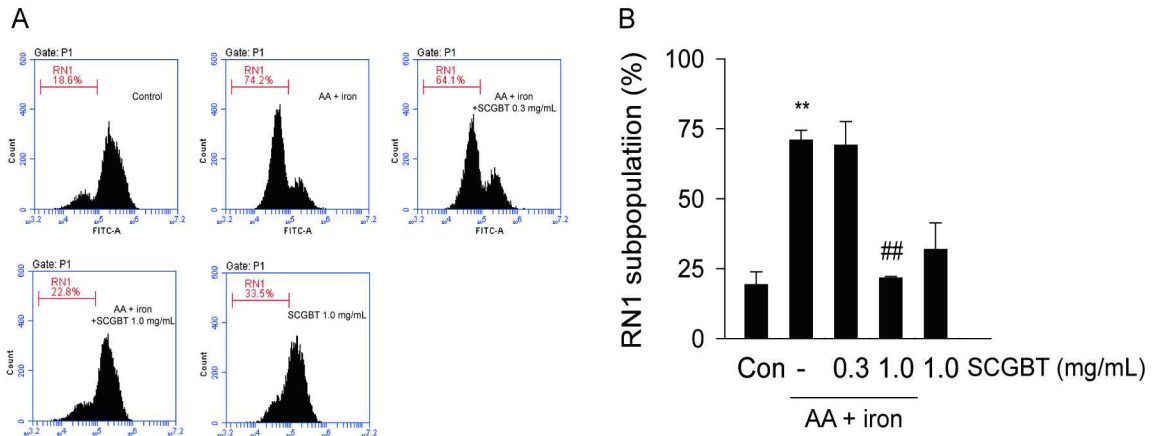


Fig. 4. Effect of SCGBT on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction.

(A) HepG2 cells were treated with SCGBT (0.3 and 1.0 mg/mL). After 1 h, the cells were incubated with AA (10 μ M) for the next 12 h, and then subsequently exposed to iron (5 μ M) for 1 h. And the cells were stained with rhodamine123 for 30 minutes. The changes of mitochondrial membrane permeability were analyzed using flow cytometry. (B) Cellular populations with low rho123 intensities (RN1 fraction) are presented as percentages of the 10,000 cells. All data represent mean \pm S.D. of three separated experiments. (Significant compared to control, ** $p < 0.01$; Significant compared to AA + iron, ## $p < 0.01$).

5. SCGBT이 Nrf2의 활성화에 미치는 효과

세포 내 산화적 스트레스를 제어하는 항산화 시스템 기전 중 Nrf2는 다양한 신호에 의해 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) 분자로부터 분리되어 세포질에서 핵으로 이동하여 프로모터 영역 중 ARE에 결합하여 heme oxygenase-1 (HO-1), GCLC 등 항산화 유전자들의 전사를 조절하는 전사인자이다²⁹⁾. SCGBT이 Nrf2-ARE 경로를 통한 전사 활성화에 관여하는지 규명하기 위하여 ARE-luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 세포주를 활용하여 reporter gene 분석을 실시하였다. 1.0 mg/mL SCGBT에서는 무처리 control cell (1.00 \pm 0.21)과 비교하여 ARE-luciferase의 활성이 1.79 \pm 0.34배로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 5A). 또한 산화적 스트레스에 대한 세포보

호 효과에 SCGBT이 Nrf2의 활성화에 미치는 영향을 파악하기 위하여 핵 내에 존재하는 Nrf2의 발현을 immunoblot을 통해 분석하였다. 먼저, 1.0 mg/mL SCGBT의 처리 시간에 따른 핵 내의 Nrf2 발현의 변화를 측정된 결과 무처리 control cell (1.00 \pm 0.33) 대비 1시간에서 1.80 \pm 0.14배로 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 5B). 또한 SCGBT 1시간에서 처리 농도에 따른 핵 내의 Nrf2 발현량의 변화를 측정된 결과, SCGBT를 처리하였을 때 무처리 control cell (1.00 \pm 0.12) 대비하여 농도별로 1.56 \pm 0.10, 1.73 \pm 0.14, 2.03 \pm 0.20, 2.22 \pm 0.22배로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 5C). 이상의 결과에 따라 SCGBT이 Nrf2의 활성화를 유도하여 항산화 효능을 가지는 것을 알 수 있다.

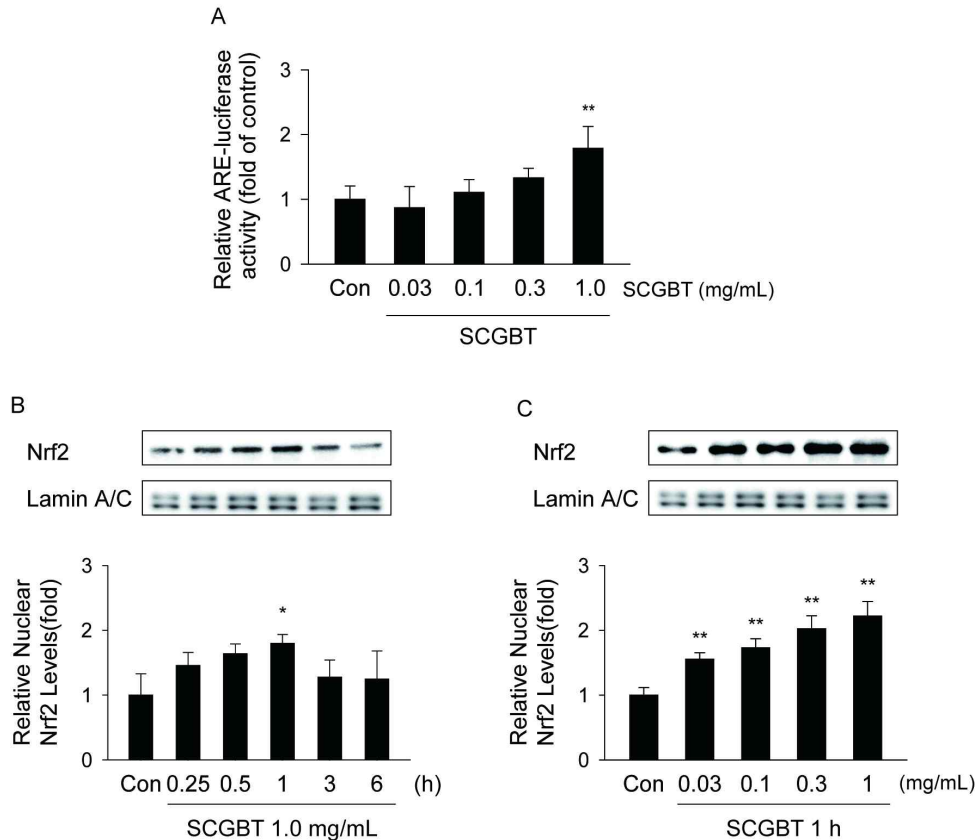


Fig. 5. Effect of SCGBT on Nrf2 activation.

(A) Reporter gene assays to measure ARE-mediated transcriptional activation. The expressed luciferase activity of recombinant HepG2 cells treated with 0.03–1.0 mg/mL SCGBT for 24 hours was measured. (B) Time-course nuclear Nrf2 expression level. HepG2 cells were treated with 1.0 mg/mL SCGBT for 0.25–6 h. (C) Concentration-dependent nuclear Nrf2 expression changes. HepG2 cells were treated 0.03–1.0 mg/mL SCGBT for 1 h. Lamin A/C was used as control for equal loadings. All data represent mean \pm S.D. of three separated experiments. (Significant compared with control, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

6. SCGBT의 Nrf2 표적 항산화 유전자 발현에 미치는 효과

SCGBT 1.0 mg/mL을 0.5 또는 1시간 동안 HepG2 세포에 처치한 후 Nrf2 표적 항산화 유전자인 Sestrin2, NQO1, GCLC를 immunoblot 분석하였다(Fig. 6A). Sestrin2 단백질 발현은 무처리 control cell (1.00 ± 0.50)에 대비하여 1시간 처치한 경우에서 2.18 ± 0.17 배로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였으며,

NQO1 단백질 발현은 무처리 control cell (1.00 ± 0.28) 대비 1시간에서 2.04 ± 0.43 배로 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. GCLC의 발현은 무처리 control cell (1.00 ± 0.78)과 비교하여 1시간에서 3.48 ± 0.24 배로 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 SCGBT의 항산화 효과가 Nrf2 의존적인 항산화 인자들의 발현을 통해 나타나는 것을 보여주고 있다.

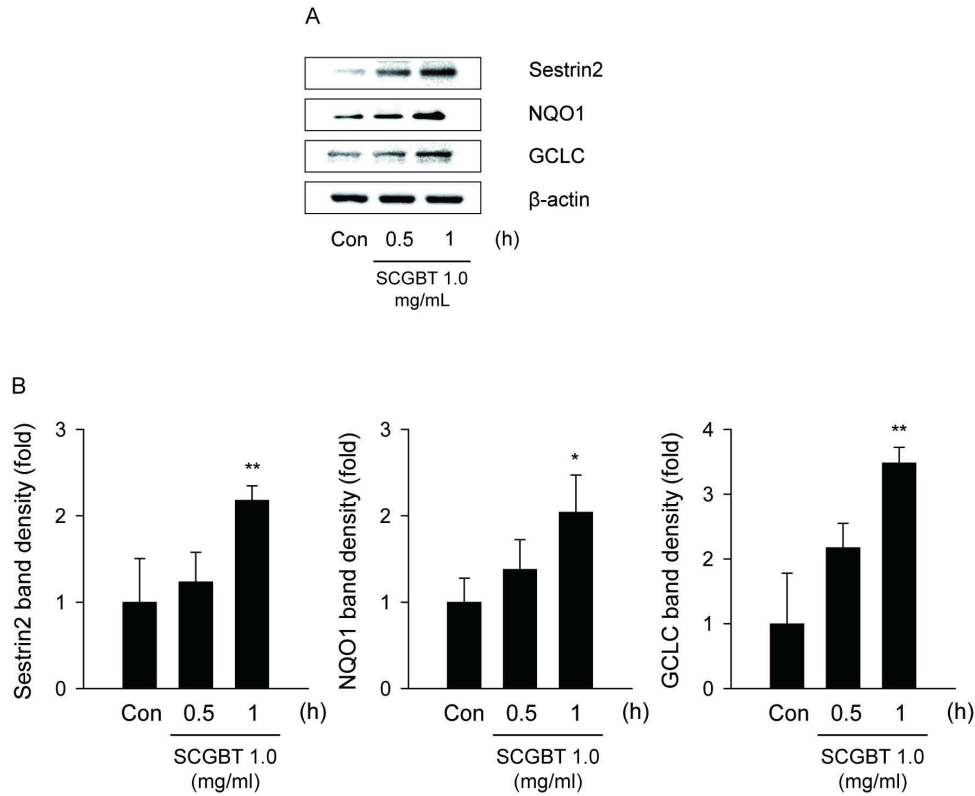


Fig. 6. Induction of Nrf2-targeted antioxidant genes by SCGBT.

The Sestrin2, NQO1, GCLC were immunoblotted in the HepG2 cells were treated with 1.0 mg/mL SCGBT for 0.5 or 1 h. Equal protein loading was confirmed by β-actin immunoblotting. All Data represent the mean ± S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

IV. 고찰

參朮健脾湯은 <中醫方劑大辭典>에 4개의 方劑가 기재되어 있다. 시대 순으로 보면 1596년 <東醫寶鑑>의 參朮健脾湯, 1602년 <證治準繩> 類方 卷二 및 卷五의 參朮健脾湯, 1773년 <雜病源流犀燭>의 參朮健脾湯이 그것이다.

<證治準繩> 類方 卷二의 參朮健脾湯은 人蔘, 茯苓, 陳皮, 半夏, 砂仁, 厚朴 各一錢, 白朮 二錢, 炙甘草 三分으로 구성되어 脹滿을 치료하는데³⁰⁾, 본 方劑의 약물 구성은 <小兒藥證直訣>의 異功散¹⁵⁾(人蔘, 茯苓, 白朮, 陳皮, 甘草 各等分)에 砂仁, 厚朴을 加한 것이며, <證治準繩> 類方 卷五의 參朮健脾湯은 人蔘, 白朮 各一錢五分, 茯苓, 陳皮, 白芍藥, 當歸 各一錢, 炙甘草 七分으로 구성되어 發黃日久 脾胃虛弱 飲食少思를 치료

하는데³⁰⁾, 方劑의 약물 구성은 異功散에 芍藥, 當歸를 加한 것으로, 이는 脾陰虛弱下血을 치료하는 <筆花醫鏡>의 歸芍六君子湯(當歸身, 芍藥 各二錢, 人蔘, 白朮, 白茯苓 各一錢五分, 陳皮, 半夏 各一錢, 炙甘草 五分)³¹⁾에서 半夏를 祛한 것과 같다. 또 다른 參朮健脾湯은 <雜病源流犀燭> 治瘧方四十六의 方으로 人蔘, 橘紅, 茯苓, 白豆蔻, 山查, 麥芽, 藿香, 白朮, 白芍, 山藥으로 구성되어 凡瘧總服하는 것으로³²⁾ 扶脾開胃 大補元氣의 효능이 있다³⁰⁾.

마지막으로 <東醫寶鑑>의 參朮健脾湯은 人蔘, 白朮, 白茯苓, 厚朴, 陳皮, 山查肉 各一錢, 枳實, 白芍藥 各八分, 神麩, 麥芽, 縮砂, 甘草 各五分, 薑三棗二로 구성되어 있으며, 健脾養胃하고 運化飲食하는 方劑이다. <東醫寶鑑>에서는 본 방제를 <醫方集略>에서 인용하였다¹⁴⁾. <方藥合編>에서는 參朮健脾湯의 活用법으로, 氣虛하면 倍加人蔘하고, 腹冷動蛔하면 加 薑, 桂, 烏梅,

花椒가 제시되어 있다³³. <東醫寶鑑>의 參朮健脾湯은 <證治準繩> 類方 卷二의 參朮健脾湯과 비교해 볼 때, <證治準繩> 類方 卷二의 參朮健脾湯에서 祛 半夏, 加 芍藥, 枳實, 山查, 神麩, 麥芽한 방제이다.

<東醫寶鑑>의 參朮健脾湯은 <證治準繩> 類方 卷二의 參朮健脾湯에서 祛 半夏, 加 芍藥, 枳實, 山查, 神麩, 麥芽한 방제로 분석이 가능하고, 또한 異功散 合 厚朴湯(<外臺秘要>卷6)³⁴ 合 三仙散(<痘科類編>)³⁵ 加 砂仁, 芍藥으로도 분석이 가능하다. 異功散은 益氣健脾, 行氣化滯의 효능으로 脾胃氣虛兼氣滯證을 치료하고¹⁵, 厚朴湯은 厚朴 二兩, 枳實 三兩, 生薑 三兩으로 구성되어 霍亂後煩嘔 및 吐利腹脹을 치료하며³⁴, 三仙散은 山查, 神麩, 麥芽 各等分으로 구성되어 雲痘疹 및 小兒宿食停滯, 消化不良, 腹痛脹滿, 飲食減少를 치료한다³⁵. 또한 砂仁은 和胃醒脾, 通行結滯하여, 厚朴湯의 脹滿, 三仙散의 宿食停滯, 消化不良, 腹脹, 飲食減少를 보조한다. 芍藥은 和血脈, 收陰氣, 緩中止痛하여³⁶, 參朮健脾湯의 枳實과 合하여서는 枳實芍藥散으로 行氣活血하고, 甘草와 合하여서는 芍藥甘草湯으로 酸甘化陰하여 제반 辛溫香燥한 약물에 대한 反佐역할을 한다.

또한 본 方劑는 한방건강보험요양급여 한약 제제 중 하나로서, 소화기계가 약한 사람의 소화기능의 개선, 소화불량, 식욕부진, 복부팽만, 위십이지장염 및 궤양, 대장염, 식도의 운동장애 및 만성 바이러스 간염¹⁵에 활용될 수 있다. 하지만 參朮健脾湯의 간보호 효과는 아직까지 보고 된 바가 없어, 본 연구에서는 AA + iron 유도성 산화적 스트레스에 대한 SCGBT의 효능을 확인하고자 하였다.

산화적 스트레스는 간질환뿐만 아니라 심혈관질환, 대사질환 등을 유발한다고 알려져 있다³⁷⁻³⁹. 일반적으로 세포 내 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) 등의 항산화 물질들의 항산화 시스템은 정상적인 생리 상태에서는 ROS를 적정 수준으로 제거하지만, 정상 수준 이상으로 ROS가 생성될 경우 산화적 스트레스가 발생하게 되어 세포사멸을 유도하게 된다. 이처럼 산화적 스트레스 발생 시 생체막 내 인지질의 변형 및 지방산과 산화를 촉진하여 phospholipase A2를 통해 세포막 내 아라키돈산(AA)의 유리를 증가시킨다⁴⁰⁻⁴². 증가된 AA는 산화적 스트레스를 생성하여 세포사멸사를 유발한다⁴³. 또한 세포 내 iron이 존재할 경우 AA에 의한 ROS 생성이 가속화 되

어 간세포의 세포사멸사를 촉진시킨다⁴⁴.

이를 바탕으로 SCGBT의 산화적 스트레스로부터 간세포 보호 효과를 평가하기 위해 간세포에 AA + iron 병용 처치로 유도되는 산화적 스트레스 모델을 이용하였다.

본 연구그룹에서는 선행연구에서 HepG2 세포에 AA와 iron의 병용 처치로 ROS 증가 및 GSH 고갈, 미토콘드리아 막 전위 저하 등으로 인한 세포사멸사 신호경로가 활성화 되어 세포 독성이 유도되었다고 보고하였다^{21,25,27}. 이를 근거로 본 연구는 10 μM의 AA와 5 μM의 iron을 처치하여 세포 독성을 유도하였다.

세포사멸사는 유기체의 기본적인 생리학적 과정이다. 이는 배아 성장, 장기 유지 및 노화 등의 과정에서 중요한 역할을 한다^{45,46}. 세포사멸사는 Fas receptors, DR4/DR5, tumor necrosis factor receptors (TNF-R)와 TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAIL-R) 등의 수용체를 통한 외부 자극에 의해 매개되는 외인성 세포사멸사(extrinsic signal pathway)와 DNA 손상 및 산화적 스트레스와 같은 내부적인 자극에 의해 발생하는 내인성 세포사멸사(intrinsic signal pathway)로 구성된다⁴⁷. 세포 내에 ROS 등의 자극 발생 시, Bcl-2 family protein이 미토콘드리아를 매개로 cytochrome-c의 방출을 통해 유도하며, 이후 caspase가 활성화되는 과정에 의해 세포사멸사가 활성화된다⁴⁸. Caspase 중 effector caspase인 caspase-3는 자극에 의해 활성화 될 경우, 세포증식 및 DNA 재조합에 있어 중요한 역할을 하는 PARP를 비활성화 시켜 DNA 손상을 야기한다⁴⁹⁻⁵¹.

본 연구에서는 SCGBT을 단독 처치한 MTT assay 분석 결과 세포 생존율에 영향을 주지 않았다. 이는 0.03-1.0 mg/mL 농도에서는 SCGBT이 간세포 독성을 나타내지 않는 것을 의미한다. 또한 AA + iron 유도성 cell death에 대해 1.0 mg/mL SCGBT을 전처리하였을 때 세포 생존율이 증가되었다. 또한 immunoblot 분석을 통해 세포사멸사 관련 단백질인 cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2의 변화를 분석한 결과, AA + iron 처치로 인해 유도된 세포사멸사가 1.0 mg/mL의 SCGBT을 통해 억제되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과들은 SCGBT이 AA + iron으로 유도된 세포사멸사를 억제하여 cell death에 대한 세포보호 효과가 있음을 의미한다.

AA + iron으로 인해 생성된 ROS는 세포 내에 축적



되면서 미토콘드리아의 막전위(MMP)를 저하시켜 미토콘드리아의 기능 장애 및 세포자멸사 관련 인자들의 발현을 유도한다⁵²⁾. 또한 세포 내 위치한 항산화 인자인 GSH⁵³⁾는 세포 내 증가한 ROS를 억제하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다. 하지만 세포 내 ROS가 과도하게 증가하여 GSH와 ROS 사이의 불균형이 발생할 경우 세포사멸을 유도하게 된다⁵⁴⁾.

이를 바탕으로 SCGBT의 산화적 스트레스로부터 세포보호 효능을 분석하기 위하여 HepG2 세포 내의 환원형 GSH와 ROS의 축적을 관찰하였다. SCGBT은 AA + iron 유도성 산화적 스트레스로 인한 HepG2 환원형 GSH의 고갈 및 세포 내의 ROS 축적을 억제하였다.

또한 SCGBT을 전처리 한 후 MMP의 변화를 측정된 결과, SCGBT은 AA + iron에 의한 미토콘드리아의 막전위 저하를 억제하였다. 이러한 결과는 SCGBT이 미토콘드리아의 막 기능 장애를 막아 세포보호 효과를 나타내었다고 판단된다.

선행 연구에서는 산화적 스트레스로 인한 세포 손상을 방어하는 분자로 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화가 제시되었다^{55,56)}. 이를 바탕으로 SCGBT이 AMPK를 매개로 세포보호 효과가 있는지 확인하기 위하여 AMPK의 화학적 inhibitor인 compound C를 전처리 한 후 SCGBT과 AA + iron을 처리하였다. 결과적으로, SCGBT은 AMPK에 의한 세포보호 효과는 나타나지 않았다(Data not shown). 이를 바탕으로 SCGBT의 간세포 보호 효과는 AMPK의 활성화와는 관련이 없으며, 다른 분자적 기전과 관련이 있을 것으로 생각되었다.

Nrf2는 세포 내 항산화 관련 유전자들의 발현을 유도하는 전사인자이다. 이는 정상 상태에서는 세포질에 주로 위치하며 Keap1과 결합을 하여 불활성화 상태로 존재한다. 그러나 산화적 스트레스가 발생할 경우 Nrf2-Keap1 복합체의 결합이 분리되어 Nrf2 분자가 핵 안으로 이동하고, 이후 해당 유전자의 촉진 인자 영역(antioxidant response element; ARE)에 결합을 한다^{57,58)}. Nrf2와 ARE의 결합 이후 Sestrin2, NAD(P)H-quinone oxidoreductase (NQO1), Glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)와 같은 항산화 관련 유전자들의 발현을 조절한다⁵⁹⁻⁶¹⁾.

이를 바탕으로, 본 연구에서는 SCGBT이 Nrf2의 핵 내 축적을 증가시켜 ARE와의 결합 증가를 유도하였음

을 규명하였다. 또한 Nrf2의 활성화에 의해 항산화 유전자인 Sestrin2, NQO1, GCLC의 인자가 활성화되는 것을 알 수 있었다. 이는 SCGBT이 Nrf2를 활성화하여 항산화 유전자를 통해 세포보호 효과가 나타나는 것을 시사한다.

본 연구에서는 SCGBT이 AA + iron 유도성 산화적 스트레스로부터 Nrf2 활성화를 통한 세포보호 효과를 규명하였다. 그러나 본 연구에서는 SCGBT을 구성하는 본초의 효능 비교 연구 및 *in vivo* 연구를 시행하지 않았으므로, 향후 추가적 연구를 통해 參朮健脾湯(혼합단미엑스산)의 肝臟疾患에 대한 활용도를 제고할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 AA + iron에 의한 산화적 스트레스가 유도된 HepG2 세포에서 SCGBT의 세포보호 효과를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. SCGBT은 AA + iron로 유도된 산화적 스트레스에 의한 cell death를 억제하며, 세포자멸사 관련 단백질인 PARP, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2의 발현을 조절하였다.
2. SCGBT은 AA + iron에 의한 세포 내 ROS 생성, 환원형 GSH의 고갈을 억제하며, 미토콘드리아의 기능을 정상화시켰다.
3. SCGBT은 Nrf2의 핵 내 축적을 유도하며, ARE 결합과 Nrf2 표적 항산화 유전자의 발현을 증가시켰다.

Acknowledgement

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272)

References

1. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases—diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(1):45–56.
2. Son JW, Jung JY, Kim KY, Hwangbo M, Park CA,

- Cho IJ, Back YD, Jung TY, Kim SC, and Jee SY. The Protective Activity of Soeumin Bojungyuki-tang Water Extract Against Oxidative Stress-induced Hepato-Toxicity. *Herbal Formula Science*. 2017; 25(4):509-26.
3. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-51.
 4. Cheng ML, Nakib D, Perciani CT, MacParland SA. The immune niche of the liver. *Clin Sci (Lond)*. 2021;135(20):2445-66.
 5. Lee G, Kim J, Kang H, Bae D, Choi CY. Antioxidant Activities and Hepato-protective Effects of *Stauntonia hexaphylla* Fruit Extract Against H₂O₂-induced Oxidative Stress and Acetaminophen-induced Toxicity. *Journal of Life Science*. 2018; 28(6):708-17.
 6. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2020; 152:116-41.
 7. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med*. 2021;171(2):179-89.
 8. Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett*. 2018;413:122-34.
 9. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014;30(2):271-281.
 10. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(25):8082-91.
 11. Uchida D, Takaki A, Oyama A, Adachi T, Wada N, Onishi H, Okada H. Oxidative Stress Management in Chronic Liver Diseases and Hepatocellular Carcinoma. *Nutrients*. 2020;12(6):1576.
 12. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14205-18.
 13. Kim HJ, Cho SY, Kim JB, Kim HW, Choe JS, Jang HH. Effects of the *Cedrela sinensis* A. Juss. leaves on the alcohol-induced oxidative stress in the human hepatic HepG2 cells. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 2018;31(4):464-70.
 14. Huh J. *Donguibogam*. Seoul:Namsandang. 1983: 431.
 15. Herbal Formula Textbook Compilation Committee. *Herbal Formula Science in Korean Medicine (Special)*. Paju:Koonja Publisher. 2023:464, 745-747, 1311.
 16. Lee SY, Kim JH. Effects of Samchulkunbitang on the Immunosuppression Induced by Methotrexate in Rats. *J Pediatr Korean Med*. 1998;12(1):257-76.
 17. Kim TG, Ko SG, Baik TH. An experimental study on the effect of Samchulgunitang affecting gastro-intestine and central nervous system. *The Journal of Internal Korean Medicine*, 1997;18(1): 1-14.
 18. Han YG, Lee MJ. The effects of Sam-chool-gun-bi-tang administration on urine metabolic responses during carbohydrate loading diet to long distance runners. *The Journal of Dong Guk Oriental Medicine*. 2000;8(2):83-96.
 19. Park SM, Kim JK, Kim EO, Jegal KH, Jung DH, Lee SG, Cho IJ, Kim S, Byun SH, Ku SK, Park CA, Lee CW, An WG, Kim SC, Zhao R. Hepatoprotective Effect of *Pericarpium zanthoxyli* Extract Is Mediated via Antagonism of Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:6761842.
 20. Jung EH, Lee JH, Kim SC, Kim YW. AMPK activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid X receptor. *Eur J Nutr*. 2017;56(2):635-47.
 21. Jung JY, Lee CW, Park SM, Jegal KH, Kim JK, Park CA, Cho IJ, Jung DH, An WG, Ku SK, Zhao R, Kim SC. Activation of AMPK by *Buddleja officinalis* Maxim. Flower Extract Contributes to Protecting Hepatocytes from Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:9253462.
 22. Jegal KH, Ko HL, Park SM, Byun SH, Kang KW, Cho IJ, Kim SC. Eupatilin induces Sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress. *Apoptosis*.



- 2016;21(5):642–56.
23. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 2008;41(1):11–22.
 24. Park SM, Kim SW, Jung EH, Ko HL, Im CK, Lee JR, Byun SH, Ku SK, Kim SC, Park CA, Kim KJ, Cho IJ. Sipjeondaebotang Alleviates Oxidative Stress-Mediated Liver Injury through Activation of the CaMKK2-AMPK Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018:8609285.
 25. 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 Radic Biol Med.* 2009;47(7):1082–92.
 26. Abate M, Festa A, Falco M, Lombardi A, Luce A, Grimaldi A, Zappavigna S, Sperlongano P, Irace C, Caraglia M, Misso G. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98:139–53.
 27. 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 Complement Altern Med.* 2013;13:64.
 28. Ko HL, Jung EH, Jung DH, Kim JK, Ku SK, Kim YW, Kim SC, Zhao R, Lee CW, Cho IJ. Paeonia japonica root extract protects hepatocytes against oxidative stress through inhibition of AMPK-mediated GSK3 β . *Journal of Functional Foods.* 2016;20:303–16.
 29. Kim JK, Park SM, Jegal KH, Kim YW, Byun SH, Kim SC, Cho IJ. Gleditsia Spina Extract Protects Hepatocytes from Oxidative Stress through Nrf2 Activation. *The Korea Journal of Herbology.* 2015;30(4):57–64.
 30. Peng HR. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 6).* Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:905
 31. Jiang HT. *Bihuayijing* (translated by Liu BG and Shin MR). Seoul:Jeongdam publisher. 1996:79.
 32. Shen JA. *Zabingyuanliuxizhu.* Beijing:Zhongguozhonghuyiyao publisher. 1996:237.
 33. Hwang DY. *Bangyakhappyeon.* Seoul:Namsandang. 1985:141–142.
 34. Peng HR. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 7).* Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:416.
 35. Peng HR. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 1).* Beijing:Renminweisheng publisher. 1994:532.
 36. Lee SI. *Herbilogy.* Seoul:Suseowon. 1981:104, 394.
 37. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci.* 2019;19(7):994–1003.
 38. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(9):689–709.
 39. Han JH, Choi YE. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress, Antioxidants. *Journal of the Korean Academy of Family Medicine.* 2006;27(10):773–81.
 40. Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 2001;31(12):1539–43.
 41. Sztolsztener K, Chabowski A, Harasim-Symbor E, Bielawiec P, Konstantynowicz-Nowicka K. Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development. *Biomolecules.* 2020;10(8):1133.
 42. Bao Y, Shen Y, Wu Z, Tao S, Yang B, Zhu T, Jin M. High dietary arachidonic acid produces excess eicosanoids, and induces hepatic inflammatory responses, oxidative stress and apoptosis in juvenile *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture Reports.* 2023;29:101506.
 43. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(11):3285.
 44. Yin H, Zhou Y, Zhu M, Hou S, Li Z, Zhong H, Wu Y. Role of mitochondria in programmed cell

- death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion*. 2013;13(3):209-24.
45. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1106-21.
46. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
47. Kim KB, Kim YA, Park JJ. Effects of 8-week Exercise on Bcl-2, Bax, Caspase-8, Caspase-3 and HSP70 in Mouse Gastrocnemius Muscle. *Journal of Life Science*. 2010;20(9):1409-14.
48. Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol Immunol*. 2020;64(4):252-69.
49. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380-89.
50. Tay KC, Tan LT, Chan CK, Hong SL, Chan KG, Yap WH, Pusparajah P, Lee LH, Goh BH. Formononetin: A Review of Its Anticancer Potentials and Mechanisms. *Front Pharmacol*. 2019;10:820.
51. Ahmed K, Zaidi SF, Mati-Ur-Rehman, Rehman R, Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *J Therm Biol*. 2020;91:102615.
52. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-50.
53. Shen Y, Huang H, Wang Y, Yang R, Ke X. Antioxidant effects of Se-glutathione peroxidase in alcoholic liver disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2022;74:127048.
54. Liu T, Sun L, Zhang Y, Wang Y, Zheng J. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(1):e22942.
55. Lee JH, Baek SY, Jang EJ, Ku SK, Kim KM, Ki SH, Kim YW. Oxyresveratrol ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by regulating hepatic lipogenesis and fatty acid oxidation through liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;289:68-74.
56. Jung EH, Lee JH, Kim SC, Kim YW. AMPK activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid X receptor. *European journal of nutrition*. 2017;56:635-47.
57. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol*. 2020;40(13):e00099-20.
58. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci*. 2022;291:120111.
59. Oliveira RP, Machado IF, Palmeira CM, Rolo AP. The potential role of sestrin 2 in liver regeneration. *Free Radic Biol Med*. 2021;163:255-67.
60. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:763257.
61. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(17):3221-47.