대한한의학 방제학회지 제32권 제1호
Herbal Formula Science
2024;32(1):51~61.
pISSN 1229-1218, eISSN 2288-5641
https://doi.org/10.14374/HFS.2024.32.1.51
Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.formulastudy.com HFS

Original Article / 원저

연교의 항산화 효과 연구

김영은[1], 김민진[1], 배수진[1], 박선빈[1], 박선동[1,*], 박광일[2,*], 김영우[1,*]

[1] 동국대학교 한의과대학 방제학교실
[2] 경상대학교 수의과대학 생리학 실험실

Anti-oxidant effect of *forsythia suspensa* on cellular damage in the chronic disease

Young-Eun Kim[1], Min-Jin Kim[1], Su-Jin Bae[1], Seon Been Bak[1], Sun-Dong Park[1,*], Kwang-Il Park[2,*], Young Woo Kim[1,*]

[1] AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL), School of Korean Medicine, Dongguk University
[2] Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : This study induced oxidative stress in HepG2 cells by treating them with AA+iron and investigated the effects of forsythia suspensa extract on this stress, as well as elucidated the molecular mechanisms underlying its hepatoprotective effects.

Methods : To confirm the antioxidative effects of FSE, HepG2 cells were induced with AA+iron to induce oxidative stress, followed by MTT assay. Additionally, the effect of FSE in reducing the increased ROS levels and mitochondrial damage induced by AA+iron in HepG2 cells was confirmed using FACS. Furthermore, western blot analysis were conducted to investigate the molecular mechanisms underlying the hepatoprotective effects of FSE.

Results : FSE increased the decreased cell viability induced by AA+iron. Additionally, FSE normalized the expression of apoptosis-related proteins induced by AA+iron. The elevated ROS levels in HepG2 cells induced by AA+iron were reduced by FSE, and the increase in Rh123-negative cells induced by AA+iron was attenuated by FSE. Moreover, FSE activated the protein expression of AMPK and its related phosphorylating enzymes, LKB1 and ACC. Furthermore, FSE activated YAP and its upstream phosphorylating enzyme, LATS1.

ⓒ 2024 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This paper is available at http://www.formulastudy.com which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results demonstrate that FSE has an inhibitory effect on oxidative stress induced by AA+iron and may have potential hepatoprotective effects.

Key words : Forsythiae suspensa, AMPK, YAP, oxidative stress, ROS,

Ⅰ. 서론

Reactive oxygen species (ROS)는 생체 내 다양한 생리학적, 생화학적 산화 과정에 의해 생성되며 hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical ($O_2^{-\cdot}$), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$)등이 있다[1]. ROS는 세포 증식, 분화, 이동, 면역반응, 세포 사멸 및 괴사에 중요한 역할을 하며 정상적인 수준에서의 ROS는 적절한 세포 기능과 생존에 필수적이다[2,3,4]. 하지만 ROS가 생체 내에서 과도하게 생산되면 산화스트레스를 유발하여 세포가 정상적인 기능을 못하게 하여 DNA 손상, 세포독성, 세포 자멸사 및 암 생성 및 촉진 등을 유발할 수 있다[5]. 산화스트레스는 과하게 생성된 ROS/reactive nitrogen species(RNS) 생성 또는 항산화 작용의 감소로부터 발생한다[6]. 산화스트레스는 퇴행성 질환, 간 질환, 및 기타 만성 질환에 중요한 역할을 하는데, 지질, 단백질 및 DNA 손상 등을 유도한다[7]. 체내에는 ROS의 과도한 발생으로 인한 산화스트레스를 방어하기 위한 다양한 항산화제가 존재한다. 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제가 있는데, 효소적 항산화제에는 catalase, GSH-PX (glutathione peroxidate), heme oxygenase-1, peroxiredoxins 등이 있고 비효소적 항산화제에는 glutatione, carotenoids, vitamin C 등이 있다[8].

간은 철분 대사에 중요한 역할을 하고 철의 주요 저장소이며 철분 저장체의 센서이다[9]. 철은 적혈구 생성과 다중 세포 대사 기능에 필수적인 영양소이다[10]. 하지만 철은 높은 수준에서 독성을 띠게 되어 간에서 생성되는 체내 철분조절호르몬 (iron-regulatory hormone)에 의해 조절된다[11]. 과도한 철의 축적은 간에서 철의 침착을 유발하고 알코올성 간 질환, 비알코올성 지방간 질환, 간경변, 간암 및 기타 간 질환을 유발한다[12]. AA (arachidonic acid)는 세포 구조의 기본 구성 요소이며 발달, 성장, 세포 손상 및 손상이 심하거나 광범위할 때 필요하다[13]. AA는 불포화 지방산의 산화를 촉매하며, AA의 산화에 의해 생성된 대사산물은 염증을 유발한다[14]. AA의 과도한 축적은 산화스트레스와 관련된 염증을 유발하여 간질환의 발달과 진행에 관여한다[15]. 따라서, AA와 iron은 간세포에서 산화스트레스를 유발하여 항산화 물질을 연구할 수 있는 좋은 모델로 알려져 있다[16,17,18].

연교 (*forsythia suspensa,* FS)는 중국, 일본 및 한국에서 일반적으로 사용되는 전통 약재이다[19]. FS는 polysaccharides, phenylethanoid glycosides, phenolic acids, flavonoids, lignans 등을 포함하는 풍부한 생리활성 성분을 함유하고 항산화, 항균, 항종양, 해열 효과에 사용된다[19,20,21,22,23,24]. FS는 이러한 다양한 효과가 있지만, 간세포에서 AA+iron에 의해 유도된 산화스트레스 억제 효과에 대한 연구는 부족하다. 따라서, 본 연구에서는 간세포에서 AA+iron에 의해 유도되는 산화스트레스에 대한 연교 추출물(*forsythia suspensa* extract, FSE)의 간 보호 효과를 확인하고 관련 분자 기전 연구를 수행하였다.

Ⅱ. 실험 방법 및 재료

1. Materials

*Forsythiae suspensa*는 열수 추출하여 filter paper로 1차 여과한 후, 0.22 μm filter로 2차 여과하여 실험에

*Corresponding author : Young Woo Kim. AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL), 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 : Sun-Dong Park, AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL), School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.
Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail :sundong@dongguk.ac.kr
*Corresponding author: Kwang Il Park. College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.
Tel : +82-53-940-3877, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : kipark@gnu.ac.kr
•Received : January 31, 2024 / Revised : February 5, 2024 / Accepted : February 13, 2024

사용하였다. Anti-poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP), anti-capase3, anti-B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL), anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC), anti-phospho-AMP-activated protein kinase (AMPK), anti-phospho-liver kinase B1 (LKB1), anti-phospho-yes-associated protein (YAP), anti-phospho-large tumor suppressor kinase 1 (LATS1) antibodies는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 과 anti-mouse IgG antibodies는 Enzo Life Sciences (East Farmingdale, New York, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. Cell culture

실험에 사용한 HepG2, Huh7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다. HepG2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 unit/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin (P/S)을 첨가한 Dulbecco's modifiedEagle's medium (DMEM)을 사용하였고 Huh7 세포는 10% FBS와 100 unit/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin (P/S)을 첨가한 Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)를 사용하여 37℃, 5% CO_2 의 incubator에서 배양하였다.

3. MTT assay

HepG2 세포를 48 well pate에 분주하였다. HepG2 세포는 FBS가 없는 배지로 6시간 동안 배양한 후, FSE (1-30 μg/ml), AA (10 μM)를 12시간 동안 처리하였다. 그 후, iron (5 μM)을 2시간 동안 처리하였다. 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 1시간 동안 처리한 후에 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxied (DMSO)에 녹여 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

4. Measurement of ROS production

HepG2 세포를 96 well plate에 분주하여 FSE (30 μg/ml)와 AA (10 μM)를 12시간 동안 처리한 후에 iron (5 μM)을 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 2′,7′-dichlorofluorescin-diacetate (DCF-DA) (10 μM)을 1시간 동안 처리하여 형광을 측정하였다.

5. Flow cytometric analysis

유세포분석기를 사용하여 mitochondrial membrane potential을 측정을 측정하였다. HepG2 세포에 FSE (30 μg/ml)와 AA (10 μM)를 12시간 동안 처리한 후에 iron (5 μM)을 1시간 동안 처리하였다. 그 후, rhodamine 123 (Rh 123)을 세포에 1시간 동안 처리하였다.

6. Western blot anaylsis

HepG2 세포와 Huh7 세포를 6 well plate에 분주하여 FBS가 없는 배지로 12시간 동안 배양하였다. FSE (30 μg/ml)를 시간별 (0, 10', 30', 1h, 3h, 6h)로 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 단백질을 정량하여 SDS-PAGE로 전기영동하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) solution을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

7. Statistical analysis

실험 결과는 mean±S.D. 값으로 나타냈으며, t-test를 사용하여 통계적 유의성을 확인하였다.

Ⅲ. 결과

1. FSE가 AA+iron 유도 세포독성에 미치는 영향

HepG2 세포에서 AA+iron을 유도한 세포독성에 대한 FSE의 영향을 MTT assay로 확인하였다. HepG2 세포에 AA+iron을 유도하여 FSE를 농도별로 처리하여 세포생존률을 측정하였다. AA+iron을 처리한 군은 대조군과 비교하였을 때 세포생존률이 감소하였다. 하지만 FSE 3 μg/ml부터 농도가 증가할수록 AA+iron에 의해 감소한 세포생존률이 증가하였다(Fig. 1A). 따라서, 이후 실험에서는 FSE 30 μg/ml의 농도로 실험을 수행했다. Apoptosis에 대한 FSE의 효과를 western blot analysis를 수행하여 apoptosis 관련 단백질 발현을 확인하였다. HepG2 세포에 AA+iron 처리하여 단백질 발현이 감소하였고 FSE는 이를 정상화하였다(Fig. 1B).

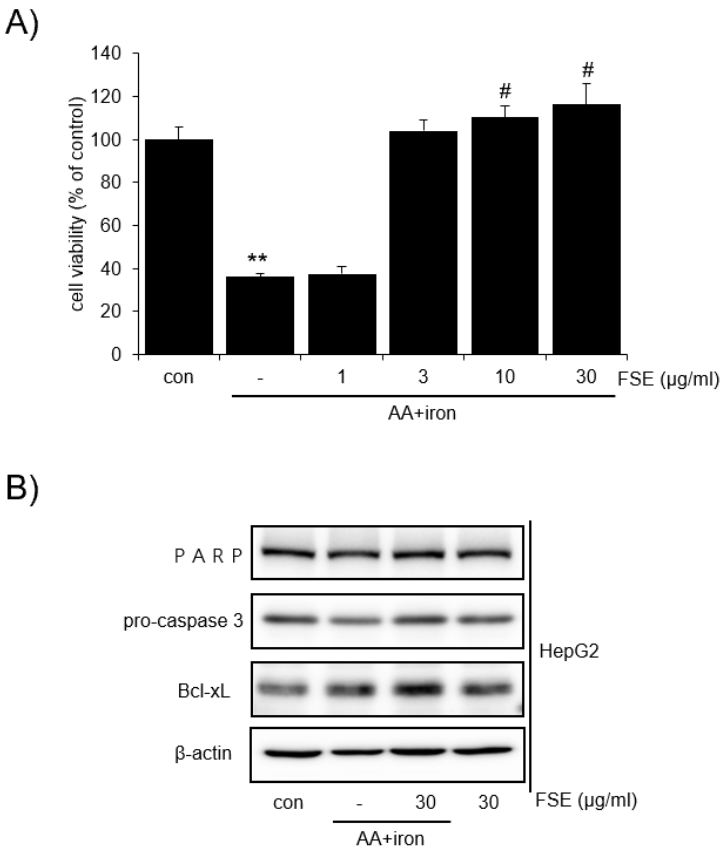

Fig 1. Effect of FSE on cytotoxicity. (A) Cell viability were measured through the MTT assay. HepG2 cells were induced with AA+iron and treated with FSE (1, 3, 10, 30 μg/mL). The data were presented as the mean ± SD from three independent experiments (**p < 0.01 vs. control group; #p <0.05 vs. AA+iron-treated group). (B) Western blot analysis was performed to examine the expression of apoptosis-related proteins. HepG2 cells were treated with AA and FSE (30 μg/ml) for 12h, followed by a 1h iron treatment.

2. FSE가 ROS 발생 및 Mitochondrial Dysfunction에 미치는 영향

AA+iron에 의해 유도된 산화스트레스에 대한 FSE의 보호효과를 확인하였다. DCF-DA를 사용하여 세포 내 ROS 발생 수준을 확인하였다. HepG2 세포에 AA+iron을 처리하여 ROS 수준이 증가하였지만 FSE는 AA+iron에 의해 증가된 ROS 수준을 감소시켰다(Fig. 2A). 다음, HepG2 세포에 AA+iron에 의해 유도된 mitochondrial dysfunction을 FACS를 사용하여 확인한 결과이다. AA+iron을 처리 군은 대조군과 비교하여 Rh123 negative 세포의 비율이 증가하였다. 하지만, FSE를 처리하여 이를 감소시켰다(Fig. 2B).

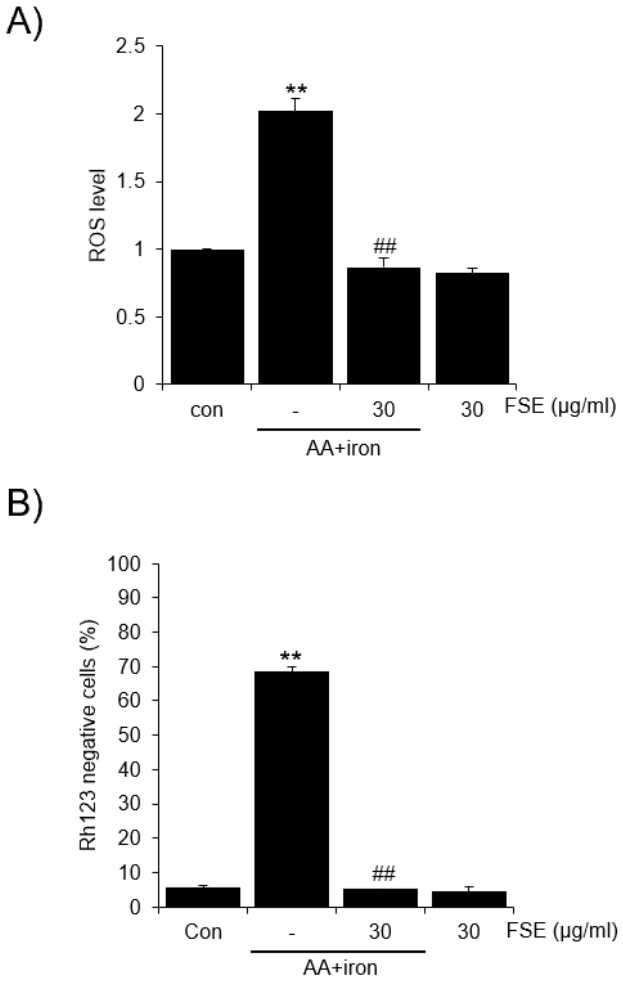

Fig 2. Effect of FSE on ROS generation and mitochondrial dysfunction. (A) The level of intracellular ROS generation was assessed using the DCF-DA assay. HepG2 cells were treated with AA and FSE (30 μg/mL) for 12 h, followed by a 2 h iron treatment. Subsequently, the cells were stained with DCF-DA (30 μM) for 1 h. (B) Mitochondrial dysfunction within the cells was measured by staining with Rh123. HepG2 cells were treated with AA and FSE (30 μg/mL) for 12 h, followed by a 2 h iron treatment. The data were presented as the mean ± SD from three independent experiments (**p < 0.01 vs. control group; ##p < 0.01 vs. AA+iron-treated group).

3. FSE가 AMPK 활성에 미치는 영향

HepG2, Huh7 세포에서 FSE가 AMPK 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot analysis를 수행한 결과이다. HepG2 세포에 FSE 30㎍/ml을 시간 의존적으로 처리한 결과, AMPK의 인산화는 1시간에서 가장 증가하였다. AMPK 상위 인산화 효소인 LKB1과 하위 인산화 효소인 ACC 모두 인산화되었다(Fig. 3A). 또한, Huh7 세포에도 FSE 30㎍/ml을 시간 의존적으로 처리하였다. 그 결과, AMPK가 인산화되었고 LKB1과 ACC 모두 인산화되는 것을 확인했다(Fig. 3B).

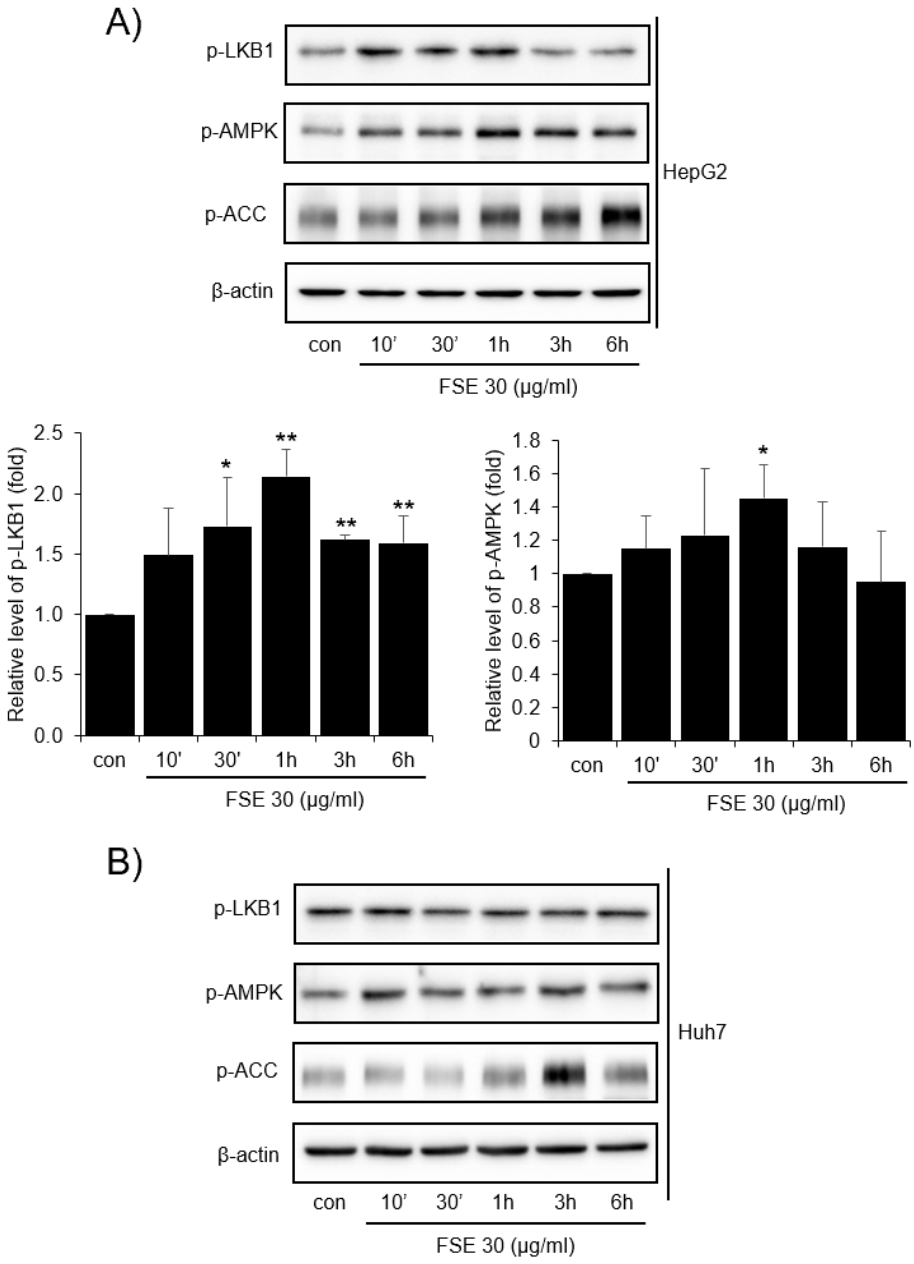

Fig 3. Effects of FSE on AMPK activation. (A) Western blotting for the AMPK signaling pathway. HepG2 cells were treated with FSE (30 μg/ml) at different time points (10', 30', 1h, 3h, 6h). The data are presented as the mean ± SD from three independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01 vs. the control group). (B) Huh7 cells were treated with FSE (30 μg/ml) at different time points (10', 30', 1h, 3h, 6h).

4. FSE가 YAP 활성에 미치는 영향

또한, FSE의 YAP 신호 전달 경로에 대한 영향을 확인하였습니다. HepG2, Huh7 세포에 FSE 30 μg/ml을 시간 의존적으로 처리하여 western blot analysis를 수행하였습니다. 그 결과, HepG2, Huh7에서 YAP 활성을 증가시켰다. 또한, YAP 상위 인산화 효소인 LATS1의 발현을 증가시켰다(Fig. 4A,B).

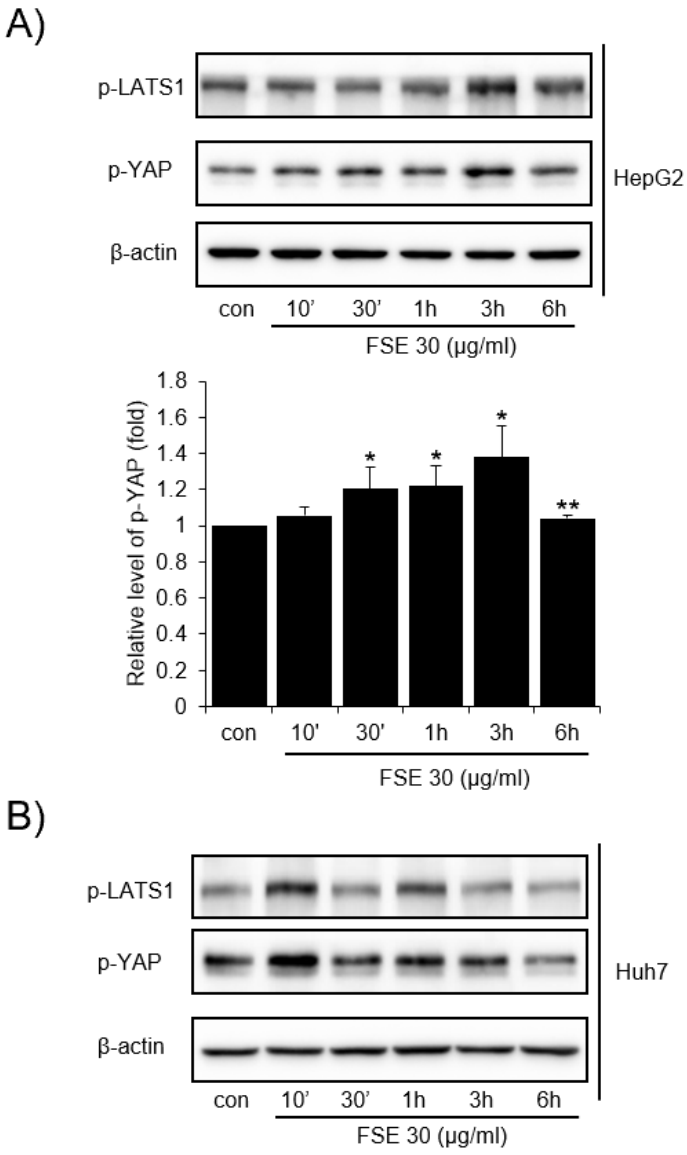

Fig 4. Effects of FSE on YAP activation. (A) Western blotting for the YAP signaling pathway. HepG2 cells were treated with FSE (30 μg/ml) at different time points (10', 30', 1h, 3h, 6h). The data are presented as the mean ± SD from three independent experiments (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ vs. the control group). (B) Huh7 cells were treated with FSE (30 μg/ml) at different time points (10', 30', 1h, 3h, 6h).

Ⅳ. 토론

자유 라디칼은 짝을 이루지 않은 전자를 가진 원자 또는 분자로, 일반적으로 불안정하고 반응성이 높다[23]. 활성 산소에는 ROS와 RNS가 있다. ROS에는 superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl radical (•OH), alkoxyl radical (RO•) and peroxyl radical (ROO•), and oxygen-centered non-radicals, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen ($^1O_2$)이 있다[25]. 이들은 지질 과산화, DNA 손상, 단백질 및 중요한 분자들을 산화시켜 손상을 유발할 수 있지만, 일정 수준의 ROS와 RNS는 중요한 생리적 기능을 수행한다[25].

간은 포도당 항상성, 생체 외 대사, 해독 등 체내 대사 조절에 필수적인 역할을 한다[26]. 간이 제대로 기능하고 항상성을 유지하기 위해 특정 크기를 유지해야한다[27]. 그러므로 간은 기능을 손상시키거나 간경변, 암 등 간질환을 유발할 수 있는 노화, 형질전환 또는 손상된 간세포를 제거해야한다[27]. 활성 라디칼의 생산 증가와 간세포에서의 항산화 방어 감소로 인해 다양한 간 기능 장애로 이어져 산화스트레스의 진행을 촉진한다[28]. 산화스트레스는 ROS와 ROS의 과도한 생성으로 인해 항산화 방어 시스템이 손상되었을 때 발생한다[28]. ROS, RNS 또는 GSH (glutathione)를 고갈시키는 제제 등에 의해 간세포에서 세포 사멸 및 괴사를 유도하며, 세포 사멸로 인하여 간 독성을 유발할 수 있다[29]. 또한, 산화스트레스로 인한 노화는 섬유화 반응을 증가시키고 비알코올 지방간 질환 및 알코올성 간 질환을 포함한 다양한 간 질환을 발생시킨다[30]. 따라서, 본 연구에서 산화스트레스로 인한 간세포 손상을 억제하는지 확인하기 위해 DCF-DA assay, flow cytometric analysis와 ROS 생산을 측정하였다. 그 결과, tBHP로 인한 간세포 사멸은 세포에 FSE를 처리함으로써 감소시켰다.

미토콘드리아는 adenosine triphosphate (ATP)와 열로서 에너지를 생성하고 세포자멸사 신호 전달 경로에 관여한다[31]. 또한, 지방 대사와 요소 순환, 아미노산과 철의 대사 등에 필요하다. 미토콘드리아 외막에서 생성된 대부분의 전자는 cytochrome C 산화 효소로 이동하여 양성자 및 산소와 반응하여 물을 형성한다[32]. 하지만, 이들 중 일부는 산소와 직접 반응하여 superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)을 형성하고 radical hydrogen peroxide (H_2O_2)를 형성한다[32]. ROS나 자유라디칼은 미토콘드리아에서 산화적 인산화에 관여하는 여러 생체 에너지 반응의 손상을 손상시켜 미토콘드리아 기능장애를 일으킨다[33]. 미토콘드리아 기능 장애는 거의 모든 병리학적, 독성학적으로 원인 중 하나이며, 저혈당, 비알코올성 간부전, 노화 등을 유발한다[31].

AMPK는 가장 중요한 조절인자 중 하나이며 간, 지방조직, 골격근, 뇌 등 많은 장기 및 조직에서 발현된다[34]. AMPK는 α-, β- 및 γ-subunit(123)으로 구성된 heterotrimer이다[35]. AMPK는 주로 adenosine monophosphate (AMP)/ATP 비율의 증가에 의해 활성화되며, ATP를 생성하는 이화과정을 활성화하여 에너지 항상성을 회복시키는 작용을 하고 동시에 ATP를 소비하는 과정을 억제한다[36]. 또한, AMPK는 serine/threonine 단백질의 kinase로서 세포 에너지 스트레스의 센서 역할을 한다[37]. AMPK의 상위 인산화 효소인 LKB1은 Thr172를 인산화하고 촉매하고 AMPK의 에너지 상태를 감지하는 메커니즘에 관여하여 지속적으로 활성화된 상태를 유지한다[38]. AMPK의 하위 인사화 효소인 ACC는 간에서 지방산의 합성과 산화를 조절한다[39]. 따라서, 본 연구에서 FSE가 AMPK 상위 인산화 효소인 LKB1을 인산화 시켜 AMPK를 활성화시켰고, AMPK 하위 인산화 효소인 ACC도 인산화된 것을 확인하였다.

Hippo/YAP 신호전달 경로는 세포 증식, 분화, 세포사멸사를 조절하여 내부 환경의 장기 크기 및 항상성을 유지한다[40]. 또한 간에서 초기 발생 및 발달, 간 크기 조절 및 재생, 종양 억제 등의 기능을 한다[27]. YAP은 스트레스 센서로서 손상된 간세포를 제거하고 손상된 간세포에서 YAP 활성화로 인하여 간동정맥으로 이동하여 세포 사멸사를 일으킨다[41]. 포유류에서 핵심적인 Hippo 경로는 크게 serine/threonine kinase가 있는데 mammalian Sterile 20-related 1과 2 kinases (MST1과 MST2; orthologs of Drosophila Hippo [Hpo])와 Large tumor suppressor 1과 2 kinases (LATS1과 LATS2; orthologs of Drosophila Warts [Wts])로 구성된다[42]. YAP/TAZ를 조절하는 중심 메커니즘은 LATS1/LATS2 kinase와 같은 상위 인산화 효소에 의한 인산화를 통하여 세포 내 국소화 및 단백질 안정성에 영향을 미친다[42]. 본 연구에서는 FSE가 YAP의 상위 인산화 효소인 LATS1을 인산화시켜 YAP을 활성화 시켰다. 따라서, FSE는 YAP을

활성화함으로써 간 보호에 대한 분자 기전을 확인하였다.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 AA+iron에 의해 유도되는 산화스트레스에 대한 FSE의 간 보호 효과를 확인하고 관련 분자 기전 연구를 수행하였다. HepG2 세포를 이용하여 AA+iron에 의해 유도되는 산화스트레스에 대한 FSE의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인하였다. 또한, apoptosis 관련 단백질을 western blot analysis를 수행하였다. 그리고 AA+iron을 HepG2 세포에 유도하여 ROS 생산과 미토콘드리아 손상에 대한 FSE의 효과에 대한 실험을 수행하였다. 그리고 AMPK signaling pathway와 YAP signaling pathway에 대한 FSE의 영향을 확인하기 위해 western blot analysis를 수행하였다.

그 결과, FSE는 AA+iron에 의해 유도하여 감소한 세포생존율을 증가시켰다. 또한, AA+iron에 의해 유도된 apoptosis 관련 단백질 발현을 FSE는 정상화시켰다. HepG2에 AA+iron을 유도한 군에서 증가된 ROS 수준은 FSE가 감소시켰으며 AA+iron에 의해 증가된 Rh123 negative 세포는 FSE가 감소시켰다. 그리고 FSE는 AMPK와 그 관련 인산화 효소인 LKB1과 ACC의 단백질 발현을 활성화하였다. 또한, YAP과 그 상위 인산화 효소인 LATS1을 활성화하였다. 따라서, FSE는 AA+iron에 의해 유도된 산화스트레스를 억제하였고 간 보호와 관련된 그 분자 기전을 확인하여 간 보호 효과에 대한 가능성을 확인하였다.

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). This work was also supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea Government [MSIT] (RS-2023-00218419) (NRF-2022R1I1A3053818) (2022R1A2C1092168). 그리고, 본 연구는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINK 3.0) (No.202306390001)에 의하여 연구되었다.

References

1. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. Cancer Lett. 2017;387:95-105.
2. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca, K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. Arch Toxicol. 2023;97(10):2499-2574.
3. Mittler R. ROS Are Good. Trends Plant Sci. 2017; 22(1):11-19.
4. Yang YC, Zhu Y, Sun SJ, Zhao CJ, Bai Y, Wang J, et al. ROS regulation in gliomas: implications for treatment strategies. Front Immunol. 2023;14: 1259797.
5. Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. J Food Drug Anal. 2014;22(1): 64-75.
6. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur J Med Chem. 2015;97:55-74.
7. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. Int J Mol Sci. 2015;16(11):26087-26124.
8. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World allergy organization journal. 2012;5;9-19.
9. Bloomer SA, Brown KE. Iron-Induced Liver Injury: A Critical Reappraisal. Int J Mol Sci. 2019;20(9): 2132.
10. Britton LJ, Subramaniam VN, Crawford DH. (2016). Iron and non-alcoholic fatty liver disease. World journal of gastroenterology. 2016;22(36): 8112.
11. Lunova M, Goehring C, Kuscuoglu D, Mueller K, Chen Y, Walther P, et al. Hepcidin knockout mice fed with iron-rich diet develop chronic liver injury

and liver fibrosis due to lysosomal iron overload. J Hepatol. 2014;61(3):633-641.
12. Liu Y, Li G, Lu F, Guo Z, Cai S, Huo T. Excess iron intake induced liver injury: The role of gut-liver axis and therapeutic potential. Biomed Pharmacother. 2023;168:115728.
13. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review. J Adv Res. 2017;11:33-41.
14. 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.
15. Zheng Z, Li Y, Jin G, Huang T, Zou M, Duan S. The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. Biomed Pharmacother. 2020;129:110354.
16. 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 CCl 4-induced liver injury in mice. Herbal Formula Science. 2016;24(3):163-174.
17. Jang M, Seo HL, Kim SC, Kim YW. Effect of Prunellae Spica on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the hepatocyte. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2016;30(1):20-26.
18. Kim KY, Lee SG, Baek SY, Lee EH, Jang EJ, Lee JH, et al. Salinomycin ameliorates oxidative hepatic damage through AMP-activated protein kinase, facilitating autophagy. Toxicol Appl Pharmacol. 2018;360:141-149.
19. Wang Z, Xia Q, Liu X, Liu W, Huang W, Mei X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of Forsythia suspensa (Thunb.) Vahl: A review. J Ethnopharmacol. 2018;210: 318-339.
20. Wang W, Yu H, Wang J, Lei W, Gao J, Qiu X, et al. The Complete Chloroplast Genome Sequences of the Medicinal Plant Forsythia suspensa (Oleaceae). Int J Mol Sci. 2017;18(11):2288.
21. Weng D, Zha SH, Zhu Y, Li H, Hou SB, Zhao QS, et al. Effect of particle size on the physicochemical and antioxidant properties of Forsythia suspensa (Thunb.) Vahl leaf powders. Powder Technology. 2022;410:117866.
22. Long SF, He TF, Wu D, Yang M, Piao XS. Forsythia suspensa extract enhances performance via the improvement of nutrient digestibility, antioxidant status, anti-inflammatory function, and gut morphology in broilers. Poult Sci. 2020;99(9): 4217-4226.
23. Weng D, Tian R, Jin H, Zha S, Zhao Q, Zhao B. Study on extraction, purification, and biological activities of forsythiaside A from Forsythia suspensa (Thunb.) Vahl leaf. Biomass Conversion and Biorefinery. 2023;1-17.
24. Gui L, Wang S, Wang J, Liao W, Chen Z, Pan D, et al. Effects of forsythin extract in Forsythia leaves on intestinal microbiota and short-chain fatty acids in rats fed a high-fat diet. Food Science and Human Wellness. 2024;13(2): 659-667.
25. Ramos-Tovar E, Muriel P. Free radicals, antioxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and liver damage. J Appl Toxicol. 2020;40(1): 151-168.
26. Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. Expert Rev Mol Med. 2012;14:e4.
27. Nishina H. Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis, and tumorigenesis. Cancer Sci. 2022;113(6):1900-1908.
28. Ezhilarasan D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective. Arab J Gastroenterol. 2018;19(2):56-64.
29. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;291(1):G1-G7.
30. Seo E, Kang H, Choi H, Choi W, Jun HS. Reactive

oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging. Aging Cell. 2019;18(2):e12895.
31. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. Exp Mol Pathol. 2007;83(1):84-92.
32. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. Gastroenterology. 2018;155(3):629-647.
33. Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. Ann N Y Acad Sci. 1998;854:155-170.
34. Omidkhoda N, Mahdiani S, Hayes AW, Karimi G. Natural compounds against nonalcoholic fatty liver disease: A review on the involvement of the LKB1/AMPK signaling pathway. Phytother Res. 2023;37(12):5769-5786.
35. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. Exp Mol Med. 2016;48(7):e245.
36. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016;311(4):E730-E740.
37. Fang C, Pan J, Qu N, Lei Y, Han J, Zhang J, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease. Front Physiol. 2022;13:970292.
38. Joshi T, Singh AK, Haratipour P, Sah AN, Pandey AK, Naseri R, et al. Targeting AMPK signaling pathway by natural products for treatment of diabetes mellitus and its complications. J Cell Physiol. 2019;234(10):17212-17231.
39. Bates J, Vijayakumar A, Ghoshal S, Marchand B, Yi S, Kornyeyev D, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation. J Hepatol. 2020;73(4):896-905.
40. Wang M, Dong Y, Gao S, Zhong Z, Cheng C, Qiang R, et al. Hippo/YAP signaling pathway protects against neomycin-induced hair cell damage in the mouse cochlea. Cell Mol Life Sci. 2022;79(2):79.
41. Miyamura N, Hata S, Itoh T, Tanaka M, Nishio M, Itoh M, et al. YAP determines the cell fate of injured mouse hepatocytes in vivo. Nat Commun. 2017;8:16017.
42. Boopathy GTK, Hong W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. Front Cell Dev Biol. 2019;7:49.