

마우스에서 Oleanolic Acid와 Hederagenin이 급성 알코올성 간독성에 미치는 효과

정수한¹ · 이상훈² · 고광석²

¹고려대학교 생명과학대학 생명공학과

²이화여자대학교 건강과학대학 식품영양학과

Effects of Oleanolic Acid and Hederagenin on Acute Alcohol-Induced Hepatotoxicity in Mice

Suhan Jung¹, Sanghoon Lee², and Kwang Suk Ko²

¹Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

²Department of Nutritional Science and Food Management, College of Health Science, Ewha Womans University

ABSTRACT We studied the effects of oleanolic acid and hederagenin on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. Oleanolic acid [10 and 20 mg/kg body weight (BW)/d] or hederagenin (10 and 20 mg/kg BW/d) was orally administered to the study group for 1 week. On the last day of treatment, ethanol (5 g/kg BW) was orally administered to induce acute liver injury. The oleanolic acid-treated group showed lower levels of alanine aminotransferase compared to the ethanol-treated group (EtOH). The mRNA expression level of alcohol dehydrogenase was significantly increased in the high dosage oleanolic acid-treated group compared with the control and EtOH groups. The glutathione levels of the oleanolic acid or hederagenin-treated groups were elevated significantly compared with those of the control and EtOH groups. The mRNA expression levels of glutathione synthetic enzymes were also elevated in the oleanolic acid-treated groups. The oleanolic acid or hederagenin-treated groups also showed lower levels of mRNA expression of tumor necrosis factor alpha. Thus, these results show that oleanolic acid and hederagenin could reduce oxidative stress and hepatotoxicity in ethanol-treated mouse liver.

Key words: oleanolic acid, hederagenin, acute alcohol-induced liver injury, hepatotoxicity

서 론

최근 현대인들은 과도한 알코올 섭취에 노출되어 있으며, 특히 알코올로 유발된 만성 및 급성 간독성에 의한 간 기능 저하에 노출된 사람들이 증가하고 있다. 체내에 흡수된 알코올은 대사과정에서 아세트알데하이드로 분해되며 반응성이 높은 독성 대사산물이 생성된다(1). 알코올에 의한 독성은 고지혈증, 지방간 및 간 경변과 같은 간 기능 이상을 유발하며, 만성적 간 기능 저하를 일으킨다(2). 특히 알코올의 대사과정에서 유발된 산화적 스트레스는 간 손상, 간세포의 괴사를 유발하여 간에서의 염증반응을 통해 비정상적인 변이와 암을 유발한다고 알려졌다(3).

으름(*Akebia quinata*)은 으름덩굴과의 낙엽덩굴 식물로 한국, 일본, 중국 등에 분포하고 있다. 으름의 덩굴은 해열, 소염, 구충, 부종의 약재로 예부터 사용됐으며, 으름 열매는

혈액순환 촉진, 통증 완화, 이노작용 등의 효능과 식욕부진, 요통, 월경통 등의 치료 효과가 있다고 알려졌다(4-6). 으름의 과피와 그 줄기에는 oleanolic acid, hederagenin, triterpene glycoside, norarjunolic acid와 saponin 등을 함유하고 있다고 보고되었다(7,8). 으름 추출물은 항산화, 항염증 및 항암 효과를 나타내는 것으로 알려졌으나 생리활성적 유효성분에 관해서는 연구가 미미한 실정이다.

Oleanolic acid는 식물에 존재하는 pentacyclic triterpenoid 화합물로 aglycone 또는 free acid 형태로 존재하는 것으로 알려졌으며 간 보호, 항염증, 항균, 항산화 효과 등이 있는 것으로 알려졌다(9-11). Hederagenin은 triterpenoid 계열의 aglycone saponin 성분으로 식물 등에 주로 oleanolic acid, phytolaccinic acid 등과 함께 존재한다고 알려졌다(8).

본 연구진은 그간 선행연구를 통하여 급성 알코올 간독성을 유발한 쥐에서 으름 열매 추출물의 간 보호 효과의 가능성을 확인하였다(12). 따라서 으름 추출물의 위와 같은 효과는 으름 추출물 내 다양한 성분 중 oleanolic acid와 hederagenin이 주요 지표성분이라 예상되어 본 연구에서는 급성 알코올성 간독성을 유발한 쥐에서 oleanolic acid와 heder-

Received 6 November 2015; Accepted 27 November 2015

Corresponding author: Kwang Suk Ko, Department of Nutritional Science and Food Management, College of Health Science, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea
E-mail: kko@ewha.ac.kr, Phone: +82-2-3277-6859

agenin의 항산화 및 간 보호 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

지표물질

으뜸 추출물 내 유효 지표물질로 알려진 oleanolic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 hederagenin (Shenzhen Sungening Bio-Tech Co., Ltd., Shenzhen, China)을 구매하여 PBS(phosphate buffered saline) with 2% tween 80에 녹여 동물에게 급여하였다.

실험동물 및 시료채취

본 실험을 위하여 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스(Sam-tako, Osan, Korea)를 구입하여 1주일간의 적응시간을 주었다. 마우스들은 기온 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 50%, 명암주기 12시간의 일정한 조건에서 사육되었으며, 사료(22GJ30060, Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 음용수(1차 증류수)는 자유급여 하였다. 1주일간의 적응기간 후 마우스는 5마리를 1군으로 Table 1과 같이 무작위 배치하였다. 지표물질의 급여는 매일 일정한 시간에 1주일간 위관강제투여를 하였으며, 대조군과 알코올 처리군에도 같은 위관강제투여의 스트레스를 부여하기 위해 PBS 0.1 mL/d를 투여하였다. 지표물질의 급여량은 Chai 등(13) 및 Lu 등(14)의 연구 결과를 참고하여 정하였다. 급성 알코올성 간독성을 유발하기 위하여 처리 마지막 날 5 g/kg BW 용량의 에탄올을 상응하는 군들의 위관에 강제투여하였다. 모든 실험동물은 에탄올 처리 시점으로부터 18시간 후 희생하여 생체시료를 채취하였다. 혈액의 채취는 heparin(H3393, Sigma-Aldrich Co.)을 처리한 주사기를 이용하여 심장에서 채취하였으며, 간 또한 적출하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1,200 g, 20분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 간 조직은 적출하여 PBS로 수세 후 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 모든 실험동물의 취급 및 사후처리는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았

Table 1. Group allotment

Group	Ethanol treatment	Treatment
Control	—	—
OH	—	Oleanolic acid 20 mg/kg BW
HH	—	Hederagenin 20 mg/kg BW
EtOH	○	—
EtOH+OL	○	Oleanolic acid 10 mg/kg BW
EtOH+OH	○	Oleanolic acid 20 mg/kg BW
EtOH+HL	○	Hederagenin 10 mg/kg BW
EtOH+HH	○	Hederagenin 20 mg/kg BW

OH: oleanolic acid 20 mg/kg BW, HH: hederagenin 20 mg/kg BW, EtOH: ethanol treatment 5 g/kg BW, EtOH+OL: ethanol treatment with oleanolic acid 10 mg/kg BW, EtOH+OH: ethanol treatment with oleanolic acid 20 mg/kg BW, EtOH+HL: ethanol treatment with hederagenin 10 mg/kg BW, EtOH+HH: ethanol treatment with hederagenin 20 mg/kg BW.

으며, 이화여자대학교 동물실험윤리위원회의 기준을 준수하여 시행되었다.

혈중 알코올 농도 측정

혈중 알코올 농도는 ethanol assay kit(MAK076, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 colorimetric method를 이용하여 측정하였다.

Alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성 측정

간 손상 지표로 사용되는 ALT와 AST의 활성은 ALT와 AST kit(AM101-L, Asan Pharm. Co., Ltd., Hwaseong, Korea)을 사용하여 비색정량으로 계산하였다. 실험과정은 제조사의 실험방법에 따라 진행하였다.

Glutathione 농도 측정

Glutathione(GSH)의 함량은 GSH reductase(G3664, Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 산화된 모든 GSH를 환원하여 시료 내 총 GSH를 측정하였다. 먼저 간 조직 100 mg에 1 mL의 식염수를 가한 후 균질 및 원심분리 하여 회수한 상층액 0.4 mL는 단백질의 농도 측정에 사용되었으며, 나머지 0.4 mL는 0.6 M perchloric acid(7601-90-3, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 단백질을 제거한 후 GSH 분석에 사용되었다. GSH의 함량은 검체 또는 GSH 표준액(G4251, Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mL를 2.5 mL의 반응용액[0.15 mM NADPH(N6505, Sigma-Aldrich Co.), 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(D8130, Sigma-Aldrich Co.), 50 mM NaPO_4 (7558-79-4, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan), 1.5 mM EDTA(E5124, Sigma-Aldrich Co.)]과 0.1 mL의 GSH reductase(10 units/mL)를 동시에 혼합한 후 412 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하여 구하고 표준 GSH 검량선으로부터 GSH의 농도를 간 조직 단백질 mg당 μmole 로 나타내었다.

세포 내 mRNA 추출 및 quantitative PCR

세포 내 mRNA 추출은 TRIzol reagent(Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였고, NonoDrop2000 spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 RNA 함량을 측정하였다. cDNA 합성은 RevertAid First Strand cDNA synthesis kit(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용하여 실시하였다. 세포 내 mRNA 발현 수준은 quantitative real-time PCR(qPCR) 방법을 이용하여 진행하였으며, PCR은 Maxima SYBR green/ROX qPCR master mix(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 진행하였다. PCR을 위한 primer는 다음과 같이 사용되었다. Alcohol dehydrogenase(NM_007409.2, ADH): 5'-CCG AAGCGATCTGCTAATG-3', 5'-GGTGCTGGTGTCTGA

TAAA-3'; glutamate-cysteine ligase modifier subunit (NM_008129, GCLM): 5'-TCCTGCTGTGTGATGCCAC CAG-3', 5'-GCTTCCTGGAAACTTGCCTCAG-3'; glu- tamate-cysteine ligase catalytic subunit(NM_010295, GCLC): 5'-ACACCTGGATGATGCCAACGAG-3', 5'- CCTCCATTGGTCGGAACCTCTAC-3'; GSH synthase(NM_ 0008180, GSS): 5'-GAAGAAGTGGCAAAGCAGGC-3', 5'-TGGGTACTGGTGAGGGGAAA-3'; tumor necrosis factor-alpha(NM_001278601, TNF- α): 5'-GGTGCCTA TGTCTCAGCCTCTT-3', 5'-GCCATAGAAGTGTGAG AGGGAG-3'. PCR 결과로부터 각각의 유전자의 상대적인 정량분석은 β -actin(NM_007393.5, 5'-TGACGTTGACA TCCGTAAAG-3', 5'-AGGAGCCAGAGCAGTAAT-3')에 대한 PCR 생성물의 상대적인 비율로 계산하였다.

통계분석

실험 결과는 SAS software(ver. 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 유의성 5% 이내에서 검증하였으며, 평균 간의 검정은 Duncan's multiple range test로 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

체중

본 연구에 사용된 쥐들의 실험 시작 체중 및 종료 체중 간의 체중변화량은 Fig. 1에 나타내었다. 실험기간 중 체중 변화량은 그룹들 간에 차이가 나타나지 않았으며, 비정상적인 체중의 증가와 감소는 관찰되지 않았다.

ALT와 AST 활성 측정

알코올 섭취 및 지표물질의 투여로 인한 간 손상 정도를 알아보기 위하여 간 손상 지표로 사용되는 ALT와 AST 활성을 측정하였다(Fig. 2). 알코올만 처리한 처리군보다 EtOH +OH 처리군에서 ALT 수치가 감소한 것을 확인할 수 있었

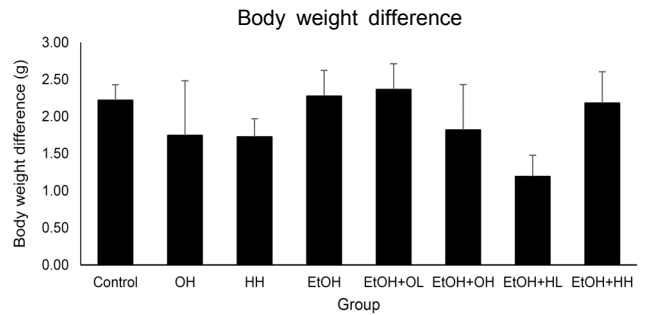


Fig. 1. Body weight difference between initial and final experimental day. Sample codes refer to the footnote of Table 1. Each bar represents the mean±standard error.

다($P<0.05$). 또한 oleanolic acid와 hederagenin을 투여한 처리구 간을 비교하였을 때 각각의 물질을 더 높은 농도로 투여한 처리군에서 ALT 활성이 감소하는 경향을 보였다. 일반적으로 알코올로 유발된 급성 간독성을 보이는 간에서는 ALT와 AST의 활성이 증가한다고 보고되었다(15). 본 연구에서는 알코올의 급여로 ALT와 AST 수치가 유의적으로 증가하지는 않았으나, 알코올 투여 후 oleanolic acid와 hederagenin의 투여가 ALT 감소에 농도 비례적으로 나타나는 경향이 있음을 볼 수 있었다. 이는 기존 연구를 통하여 밝혀진 oleanolic acid의 간 보호 효과와 유사한 경향을 확인할 수 있으며(16), 이를 통하여 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 효과의 가능성을 보였다.

혈중 알코올 농도 및 alcohol dehydrogenase mRNA 발현

으름 내 유효물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 체내 알코올 분해 능력을 알아보기 위하여 실험동물에 알코올을 투여한 후 18시간 뒤에 채취한 혈액에서 혈중 알코올 농도를 측정하였다. 실험 결과 대조군보다 에탄올을 투여한 처리군에서 혈중 알코올 농도가 높은 것을 확인할 수 있었으며, oleanolic acid와 hederagenin을 투여함에 따라 혈중 알코올 농도가 감소하는 모습을 보였다(Fig. 3). 특히 oleanolic acid와 hederagenin을 처리한 처리군에서 투여 농도가 높을수록 혈중 알코올 농도가 더욱 감소함을 확인할 수

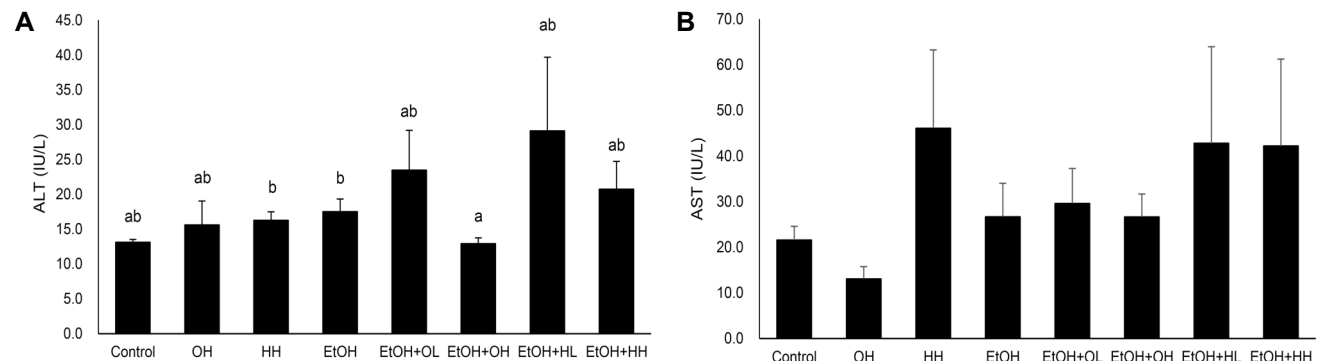


Fig. 2. Liver alanine aminotransferase (A) and aspartate aminotransferase activity (B). Sample codes refer to the footnote of Table 1. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P<0.05$). Each bar represents the mean±standard error.

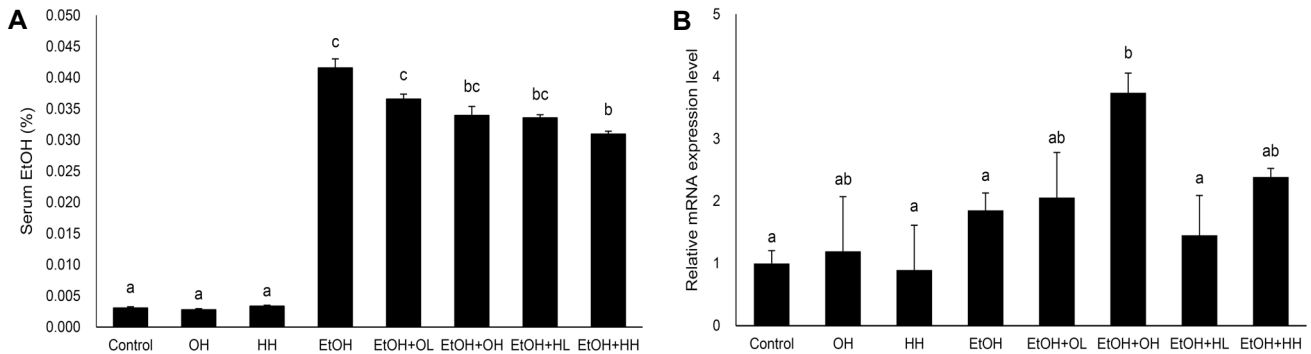


Fig. 3. Serum ethanol concentration (A) and liver alcohol dehydrogenase mRNA expression level (B). Sample codes refer to the footnote of Table 1. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). Each bar represents the mean \pm standard error.

있었다. 체내로 들어온 알코올의 분해는 간에서 alcohol dehydrogenase에 의해 알코올이 acetaldehyde로 분해되는 과정으로 시작한다고 알려졌다. 이에 본 연구에서는 oleanolic acid와 hederagenin을 투여한 쥐에서 간 내 alcohol dehydrogenase mRNA 발현 정도를 qPCR을 이용하여 측정하였다. 일반적으로 알코올을 투여한 쥐에서 alcohol dehydrogenase의 발현이 증가한다고 알려졌다(17), 본 연구에서도 대조군보다 알코올을 투여한 처리군에서 alcohol dehydrogenase의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 또한 EtOH+OH 그룹에서 그 발현이 증가하는 것을 보아($P < 0.05$) oleanolic acid의 투여가 alcohol dehydrogenase의 발현 증가에 효과가 있음을 알 수 있었다.

간 조직 내 glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level

항산화 및 해독기능을 하는 GSH는 알코올성 간질환 및 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소한다고 알려졌다(18-20). 본 연구에서는 으름 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid 및 hederagenin이 알코올로 유발된 간독성에 대한 간 보호 효과를 알아보기 위하여 간 조직 내 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도와 GSH 농도를 분석하여 Fig. 4A에 나타내었다. 알코올을 투여한 처리군의 경우 대조군보다 GSH level이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 알코올 투여 후 oleanolic acid 또는 hederagenin을 투여한 처리군에서 대조군보다 GSH level이 높게 분석되었다 ($P < 0.05$). 대조군과 OH, HH 그룹 간에는 GSH level의 유의적 차이를 보이지 않았다. GCLC mRNA 발현의 경우 대조군보다 hederagenin을 투여한 그룹에서 높게 발현되는 경향을 보였으며, EtOH 그룹과 비교하였을 때 EtOH+OL 그룹에서 그 발현 정도가 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$)(Fig. 4B). EtOH+HH 그룹의 경우 EtOH 그룹보다 GCLM이 높게 발현되는 것으로 나타났으며($P < 0.05$), 다른 그룹 간에는 GCLM의 발현 정도에 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 4C). 대조군과 알코올을 투여한 그룹 간에

GSS mRNA 발현 차이를 보이지 않았으며, EtOH+OH 그룹의 경우 알코올을 투여한 그룹보다 GSS 발현이 증가하는 것으로 나타났다($P < 0.05$)(Fig. 4D). EtOH+OL 그룹과 EtOH+HH 그룹의 경우 대조군보다 GSS mRNA 발현 정도에 유의차를 나타내지 않았으나 EtOH 그룹과 비교하였을 때 그 발현이 증가하는 경향을 보였다. 본 연구진의 기존 연구에서 알코올로 인한 급성 간독성에서 으름 추출물의 투여로 항산화 능력의 향상 가능성에 관하여 확인하였다(12). 으름의 열수 추출을 통한 추출물 내에는 많은 유기산 및 배당체가 존재한다고 알려져 있으며, 그중 oleanolic acid, hederagenin, triterpene glycoside, norarjunolic acid 등이 주요 물질로 알려졌다(7,8). 본 연구를 통하여 으름 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid와 hederagenin이 급성 알코올성 간독성 마우스에서의 간 보호 효과 및 항산화 기능을 향상할 가능성을 확인하였다. 이를 통하여 기존 연구에서 확인한 알코올로 인한 만성 또는 급성 간질환에서 으름 추출물의 효능은 추출물 내 oleanolic acid와 hederagenin의 작용일 가능성이 크다고 판단된다.

Tumor necrosis factor- α mRNA 발현 측정

급성 알코올의 섭취는 장벽의 손상을 통해 장내독소 침투를 촉진하고, 염증 유발 cytokine의 생성을 증가시킨다고 알려졌다(21). 특히 여러 연구에 따르면 급성 또는 만성적 알코올의 섭취는 간 조직에서 대표적인 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)- α 의 발현을 유의적으로 증가시킨다고 보고되었다(22,23). 따라서 본 연구에서는 으름 추출물 내 유효성분 후보물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 투여가 알코올 처리로 인한 간 조직 내 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대표적인 염증반응 지표인 TNF- α 의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 본 연구에서 EtOH 그룹의 TNF- α mRNA 발현 정도는 대조군보다 증가한 것을 통하여 알코올로 인한 간독성 및 염증반응이 발생하였음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$)(Fig. 5). 반면 EtOH 처리 그룹에 oleanolic acid 또는 hederagenin을 투여한 그룹의 경우 TNF- α mRNA 발현이 감소하는 경향이 있는 것

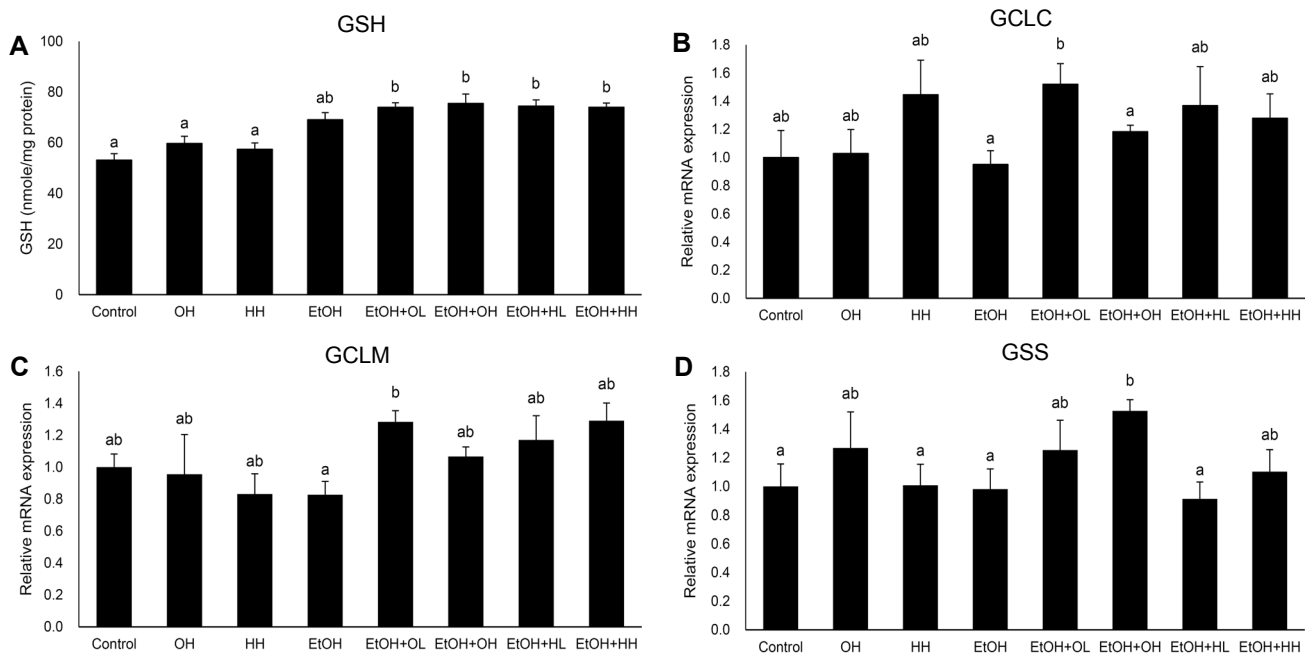


Fig. 4. Effects of oleanolic acid, hederagenin, and ethanol on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes and glutathione concentration in mouse livers. (A), GSH level in mouse livers; (B), relative mRNA expression level of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM); (C), relative mRNA expression level of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (D), relative mRNA expression level of glutathione synthase (GSS). Sample codes refer to the footnote of Table 1. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P<0.05$). Each bar represents the mean±standard error.

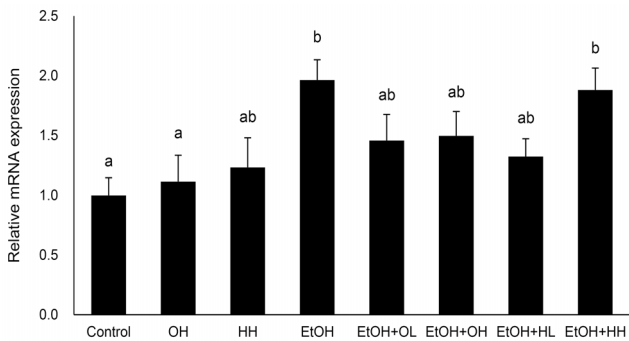


Fig. 5. Effects of oleanolic acid, hederagenin, and ethanol on relative mRNA expression level of tumor necrosis factor-alpha in mouse livers. Sample codes refer to the footnote of Table 1. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P<0.05$). Each bar represents the mean±standard error.

을 통하여 oleanolic acid와 hederagenin이 알코올로 유발된 급성 염증반응을 감소시킬 가능성이 있다고 판단된다. 위의 결과를 통하여 기존 연구에서 확인한 으름 추출물의 알코올로 유발된 급성 염증반응의 감소 효과(12)가 으름 추출물 내 oleanolic acid와 hederagenin에 의한 효과 때문이라 생각한다.

요 약

본 연구는 선행연구를 통한 으름 추출물의 간 보호 효과에 대하여 으름 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid와

hederagenin을 생쥐에 투여하였을 때 알코올로 인한 급성 간독성 상태에서 간 보호 효과를 조사하였다. 그 결과 oleanolic acid와 hederagenin의 투여는 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 혈중 알코올 농도 감소 및 alcohol dehydrogenase mRNA 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 간 조직 내 항산화 물질인 glutathione(GSH)의 농도를 증가시키고, GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 역시 증가시키는 것으로 확인되었다. 또한 염증반응 지표인 tumor necrosis factor-alpha의 mRNA 발현도 억제하는 것으로 분석되었다. 위의 결과들과 기존의 실험에서 확인한 으름 추출물의 간 보호 효과를 종합하였을 때 으름 추출물의 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증반응에 대한 간 보호 효과는 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid 및 hederagenin의 작용에 의한 것이라 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 정부(농림수산식품부)의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원 연구비(112123-03-1-HD040) 지원을 받아 연구되었습니다.

REFERENCES

1. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. 2001. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol Biol* 49: 676-682.
2. Rouach H, Clément M, Orfanelli MT, Janvier B, Nordmann

- J, Nordmann R. 1983. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochim Biophys Acta* 753: 439-444.
3. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. 2005. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res* 591: 110-122.
 4. Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. 2005. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and saponin obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J Med Food* 8: 78-85.
 5. Jung HJ, Lee CO, Lee KT, Choi J, Park HJ. 2004. Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol Pharm Bull* 27: 744-747.
 6. Ikuta A. 1995. Saponins and triterpenes from callus tissues of *Akebia trifoliata* and comparison with the constituents of other lardizabalaceous callus tissues. *J Nat Prod* 58: 1378-1383.
 7. Higuchi R, Kawasaki T. 1976. Pericarp saponins of *Akebia quinata* DECNE. I. Glycosides of hederagenin and oleanolic acid. *Chem Pharm Bull* 24: 1021-1032.
 8. Ikuta A, Itokawa H. 1988. A triterpene from *Akebia quinata* callus tissue. *Phytochemistry* 27: 3809-3810.
 9. Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49: 57-68.
 10. Hung CY, Yen GC. 2001. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *LWT - Food Sci Technol* 34: 306-311.
 11. Kinjo J, Okawa M, Udayama M, Sohno Y, Hirakawa T, Shii Y, Nohara T. 1999. Hepatoprotective and hepatotoxic actions of oleanolic acid-type triterpenoidal glucuronides on rat primary hepatocyte cultures. *Chem Pharm Bull* 47: 290-292.
 12. Lee SH, Song YS, Lee SY, Kim SY, Ko KS. 2014. Protective effects of *Akebia quinata* fruit extract on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Korean J Food Sci Technol* 46: 622-629.
 13. Chai J, Du X, Chen S, Feng X, Cheng Y, Zhang L, Gao Y, Li S, He X, Wang R, Zhou X, Yang Y, Luo W, Chen W. 2015. Oral administration of oleanolic acid, isolated from *Swertia mussotii* Franch, attenuates liver injury, inflammation, and cholestasis in bile duct-ligated rats. *Int J Clin Exp Med* 8: 1691-1702.
 14. Lu SH, Guan JH, Huang YL, Pan YW, Yang W, Lan H, Huang S, Hu J, Zhao GP. 2015. Experimental study of anti-atherosclerosis effects with hederagenin in rats. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* 504: 456354.
 15. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. 1996. Acute and chronic hepatic steatosis lead to *in vivo* lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 24: 200-208.
 16. Balanehru S, Nagarajan B. 1991. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochem Int* 24: 981-990.
 17. Höög JO, Ostberg LJ. 2011. Mammalian alcohol dehydrogenases—A comparative investigation at gene and protein levels. *Chem Biol Interact* 191: 2-7.
 18. Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 737-743.
 19. Ko K, Yang H, Nouredin M, Iglesia-Ara A, Xia M, Wagner C, Luka Z, Mato JM, Lu SC. 2008. Changes in S-adenosylmethionine and GSH homeostasis during endotoxemia in mice. *Lab Invest* 88: 1121-1129.
 20. Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. 2004. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 346-349.
 21. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. 1995. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108: 218-224.
 22. Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. 2004. Role of TNF- α in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 40: 442-451.
 23. Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, Piganelli JD, Magill A, Reiser J, Kolls JK. 2008. TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. *J Immunol* 181: 3049-3056.