

## Thioacetamide로 유도된 간섬유화 모델에서 生肝健脾湯의 보호 효과

최정원<sup>1#</sup>, 정성미<sup>2#</sup>, 신미래<sup>1</sup>, 정다운<sup>3</sup>, 노성수<sup>1\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 정성미한의원

3 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터

### Protective effect of *Saenggangeonbi-tang* on liver fibrosis induced by thioacetamide

Jeong Won Choi<sup>1#</sup>, Sung Mi Chung<sup>2#</sup>, Mi-Rae Shin<sup>1</sup>, Da un Jeong<sup>3</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1\*</sup>

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Shinchendong-ro, Suseong-gu, Deagu 42158, Republic of Korea

2 : CHUNG SUNG MI Korean Medical Clinic, 43-20, Jeongbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 10402, Republic of Korea

3 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38610, Republic of Korea

### ABSTRACT

**Objective** : In modern society, liver diseases such as liver fibrosis are on the rise as inflammation and wound healing processes of the liver are repeated due to factors such as drinking, smoking, and stress. This study was conducted to evaluate the effect of *Saenggangeonbi-tang* (SGGBT) on thioacetamide (TAA)-induced liver fibrosis.

**Methods** : The mice were divided into 4 groups for examination (n=6): Normal group (Nor), distilled water-treated liver fibrosis mice (Con), silymarin 50 mg/kg-treated liver fibrosis mice (Sily), SGGBT 200 mg/kg-treated liver fibrosis mice (S200). Liver fibrosis was established in the mice via TAA for 8 weeks (1 week 100 mg/kg, 2,3 weeks 200 mg/kg, 4-8 weeks 400 mg/kg, three times a week, intraperitoneal injection) and they were administered silymarin and SGGBT (every day, oral administration) with the TAA.

**Results** : SGGBT significantly decreased the levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, ammonia, and myeloperoxidase in serum increased by liver fibrosis. As a result of confirming H&E and MT staining, it was confirmed that SGGBT reduced damage and inflammatory cell infiltration in liver tissue, and alleviated changes in collagen fiber deposition and histological fibrosis. Also, it was confirmed through PAS staining that it reduced glycogen deposition in liver tissue. In addition, SGGBT significantly decreased the NADPH oxidases as well as significantly modulated the expression of MMP-2 and TIMP-2.

**Conclusions** : These results suggest that SGGBT regulates the expression of MMP/TIMP protein through inhibition of oxidative stress and alleviates liver fibrosis by reducing collagen and glycogen deposition in liver tissue.

**Key words** : Liver fibrosis, *Saenggangeonbi-tang*, thioacetamide, histological analysis

\*Corresponding author : Seong-Soo Roh, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Shinchendong-ro, Suseong-gu, Deagu 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Jeong Won Choi, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Shinchendong-ro, Suseong-gu, Deagu 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : purpne@nate.com

Sung Mi Chung, CHUNG SUNG MI Korean Medical Clinic, 43-20, Jeongbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 10402, Republic of Korea

· Tel : +82-31-915-8288 · Fax : +82-31-915-8090 · E-mail : ellisa771225@gmail.com

· Received : 11 October 2022 · Revised : 07 November 2022 · Accepted : 25 November 2022

## I. 서론

간 (Liver)은 체내대사율이 가장 높은 장기 중 하나로 세포 내 생화학적 반응을 통해 여러 대사물질을 생성한다. 또한 造血 및 破血 작용과 같이 혈액관련 기능과 더불어 체내에서 생성된 독소와 체외에서 유입된 유해물질의 해독작용을 담당한다<sup>1)</sup>. 현대사회에 들어서면서 산업화에 따른 공해물질과 유독물질의 노출에 의해 간은 끊임없는 해독작용에 시달리고 있으며, 음주, 흡연, 정신적 스트레스 및 바이러스 등으로 인한 간의 지속적 손상에 의해 간질환이 증가하고 있다<sup>2)</sup>. 간섬유화는 다양한 종류의 간 손상에 의해 지속적으로 염증이 발생함에 따라 나타나는 상처치유와 재생과정으로, collagen의 축적을 특징으로 하며 간섬유화 단계에서 치료하지 못하면 간경변, 간암 또는 간부전 까지 이어질 수 있다<sup>3)</sup>. 간섬유화는 간경변과 달리 thin fibril로 구성되어 간 손상의 원인을 치료하면 정상회복이 가능하지만, 간경변까지 이어지게 되면 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)간의 결합이 증가하여 thick fibril이 형성된 비가역적 상태에 이르게 된다<sup>4)</sup>. 따라서 간경변으로 진행되기 전 간섬유화를 신속하게 치료하는 것이 매우 중요하게 여겨지고 있으며, 간섬유화 치료와 간 기능 개선을 위해 치료소재의 탐구가 활발하게 이루어지고 있다.

Thioacetamide (TAA)는 간 독성 물질로 생물 내에서 S-oxide로 산화된 뒤 S,S-dioxide로 대사되어 만성적으로 생성될 경우 간기능 장애, 산화 스트레스 및 지질 과산화가 이어져 간섬유화를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>5, 6)</sup>. TAA는 자유 라디칼의 생성을 유도하고 산화 스트레스를 증가시켜 간세포의 항산화 방어작용을 감소시키고 세포의 괴사를 유도하는데, 이러한 메커니즘은 인간의 간섬유증과 유사하다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 이러한 이유로 TAA는 설치류의 간질환 유발에 보편적으로 사용되고 있다<sup>8, 9)</sup>.

生肝健脾湯은 金秉雲 先生이 創方한 처방으로 淸淨濕熱하고 利膽하며 간세포 회복, 대사과정의 활성화 및 만성간염에 대한 치료효과가 입증되어 있어 임상에서 만성간염을 포함한 간질환에 보편적으로 사용되고 있다<sup>10)</sup>. 현재 生肝健脾湯에 대한 연구로는 알코올 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방<sup>11)</sup>, HepG2 cell의 증식, 세포사멸 및 활성조절 신호전달계에 미치는 영향<sup>12)</sup>, 간기능과 비만에서의 임상사례<sup>13)</sup> 등이 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 *in vitro*를 통한 항산화 효능의 평가와 TAA로 유도한 간섬유화 동물모델에서 生肝健脾湯의 간 보호 및 간섬유화 개선효과에 대해 확인하였으며 유의한 결과를 얻었기에 이에 대해 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

生肝健脾湯의 구성 약재는 웅기한약국 (Daegu, Korea)에서 구매하였고 생약규격집에 맞추어 약전규격에 적합한 것을 사용하였으며 1첩의 구성과 분량을 Table 1에 기재하였다. 2첩

분량의 10배에 해당하는 증류수를 넣고 약탕기를 사용하여 100℃에서 2시간동안 추출하였다. 추출물을 여과한 뒤 회전감압농축기 (Buchi B-480, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 농축하였으며, 동결건조기 (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System, LABCONCO)를 사용하여 완전한 파우더 상태로 만들었다. 生肝健脾湯의 수율은 14%로 나타났으며 실험에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

Table 1. Contents of *Saenggangeonbi-tang*

Herbal name	Scientific name	Amount (g)
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	3
藿香	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Meyer)	3
蘿蔔子	<i>Raphanus sativus</i> L.	3
麥芽	<i>Hordeum vulgare</i> L.	7.5
木香	<i>Aucklandia lappa</i> Decne	3
白茯苓	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	3.75
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	7.5
蓬朮	<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	3
砂仁	<i>Amomum villosum</i> Lour.	3
三稜	<i>Scirpus flaviatilis</i> (Torr.) A. Gray	3
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	3
茵陳	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	1,388
豬苓	<i>Polyporus umbellatus</i> (Pers.) Fries	3.75
枳實	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin.	3
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	3.75
青皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	3
澤瀉	<i>Alisma orientalis</i> (Sam) Juzep	1,388
厚朴	<i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wilson	3.75
山楂肉	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bge	7.5
Total amount		70,276

### 2) 시약

본 실험에 사용한 thioacetamide (TAA), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, naringin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium persulfate, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, diethylene glycol, sodium hydroxide은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, sodium carbonate는 DAEJUNG (Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. 1차항체로 사용한 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) 및  $\beta$ -Actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터

구입하여 사용하였으며, 2차항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor mixture와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였으며, nitrocellulose membranes와 ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

### 3) 실험동물

7주령의 웅성 C57BL/6 mice (Daehan Biolink, Chungbuk, Korea)는 일주일간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였으며, 사육실의 조건은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ , 명암주기 (light: dark cycle) 12시간으로 조절하였다. 사료 (조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 공급하였으며, 본 연구는 동물실험의 과학적, 윤리적 타당성 검토 및 효율적 관리를 위해 대구한의대학교 동물실험 윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인을 받아 진행되었다 (승인번호: DHU2022-020).

## 2. 방법

### 1) Total polyphenol 및 total flavonoid 함량 측정

Total polyphenol 함량은 Folin Ciocalteu's의 방법<sup>14)</sup>을 참고하여 측정하였다. 生肝健脾湯 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500  $\mu\text{L}$ 와 7.5% sodium carbonate 400  $\mu\text{L}$ 를 혼합하고, 암소상태에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계 (Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 파장 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선을 gallic acid를 이용해 작성하여 生肝健脾湯 추출물의 total polyphenol (mg gallic acid equivalent (GAE)/g) 함량을 산출하였다.

Total flavonoid 함량은 Lister의 방법<sup>15)</sup>을 참고하여 측정하였다. 生肝健脾湯 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 diethylene glycol 1 mL, 1N sodium hydroxide 10  $\mu\text{L}$ 를 혼합하고,  $37^\circ\text{C}$ , 암소상태에서 1시간동안 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 파장 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선을 naringin을 이용해 작성하여 生肝健脾湯 추출물의 total flavonoid (mg naringin equivalent (NE)/g) 함량을 산출하였다.

### 2) DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 측정

DPPH free 라디칼 소거능은 Blois의 방법<sup>16)</sup>에 따라 측정하였다. 60  $\mu\text{M}$  DPPH 용액 100  $\mu\text{L}$ 에 농도별로 희석한 生肝健脾湯 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하고 30분간 암소상태로 반응시켰다. 분광광도계를 사용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정 후 라디칼을 50% 감소시키는 시료의 농도를  $\text{IC}_{50}$  값으로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능은 Re등의 방법<sup>17)</sup>에 따라 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하고 암소상태에서 16시간 이상 방치하여  $\text{ABTS}^+$ 를 형성시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 ethanol로 희석하였다. 희석한 ABTS 용액 95  $\mu\text{L}$ 와 농도별로 희석한 生肝健脾湯 용액 5  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 15분간 반응시켰다. 분광광도계를 사용하여 온도  $30^\circ\text{C}$ , 파장 415 nm에서 흡광도를 측정 후 라디칼을 50% 감소시키는 시료의 농도를  $\text{IC}_{50}$  값으로 나타내었다.

DPPH and ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \{1 - \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{blank}}\} \times 100$$

### 3) 간섬유화 유발 및 동물 처치

실험군은 정상군 (Nor), 간섬유화 유발군 (Con), 간섬유화 유발 및 silymarin 50 mg/kg 투여군 (Sily), 간섬유화 유발 및 生肝健脾湯 추출물 200 mg/kg 투여군 (S200) 총 4군으로 나뉘었다. 24마리의 실험동물을 각각 6마리씩 무작위로 분리하였다. 모든 동물은 매일 일정한 시간에 체중을 측정 후 경구투여를 통해 해당 약물을 처치하였다. 정상군을 제외한 나머지 군은 약물투여 1시간 30분 후에 생리식염수에 녹인 TAA를 8주간 (1주 100 mg/kg, 2-3주 200 mg/kg, 4-8주 400 mg/kg) 주 3회 복강투여 하였다. 실험종료 후 동물을 마취하여 심장에서 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하였고, 간 조직을 적출하여 이를  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 4) 혈중 AST, ALT, ammonia 및 MPO 측정

Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 수치는 assay kit (Asanpharm Co., Ltd, Seoul, Korea)의 프로토콜에 따라 측정하였으며 ammonia와 myeloperoxidase (MPO) 수치는 각각 ammonia assay kit (Abcam, Cambridge, UK), MPO colorimetric activity assay kit (BioVision, CA, USA)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

### 5) 간 조직의 조직학적 관찰

간 조직은 hematoxylin&eosin (H&E), Masson's trichrome (MT), 및 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색법을 통해 분석하였다. 간 조직을 10% neutral buffered formalin에 고정시킨 후 graded alcohol로 탈수시키고, 파라핀으로 포매하여 표본을 제작하였다. H&E 염색은 파라핀을 3  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 hematoxylin 및 eosin 시약으로 염색한 후 탈수하였으며, xylene으로 clearing한 후 탈수하여 고정하였다. MT 염색은 파라핀을 5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 weigert iron hematoxylin, iebrich scarlet-acid fuchsin 및 aniline blue 시약으로 염색한 후 1% acetic acid 에서 2분 동안 염색하였다. 그 후 phosphotungstic-phosphomolybdic acid에서 7분 동안 배양하고 aniline blue로 10분 동안 염색한 뒤에 1% acetic acid로 clearing한 후 탈수하여 고정하였다. PAS 염색은 파라핀을 5  $\mu\text{m}$  두께로 절편한 후 0.5% periodic acid로 산화

과정을 거쳤으며, schiff 및 harris hematoxylin 시약으로 염색한 후 탈수하여 고정하였다. 각 슬라이드는 광학현미경 (Olympus BX51 Microscope, Olympus Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 조직의 특이 병변 유무를 관찰하였다.

### 6) 간 조직 western blotting

간 조직의 세포질 부분을 얻기 위해 buffer A (10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 ice 위에서 30분간 정치시켰다. 그 후, 10% NP-40 용액을 첨가하고 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 세포질을 포함하는 상층액을 분리한 뒤 -80℃에서 냉동보관하였다. 간 조직 세포질에서 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) 및 β-Actin의 발현을 확인하기 위하여 12 μg의 단백질을 8~14% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 뒤 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차항체 (1:1000)를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차항체에 적합한 2차항체 (1:3000)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에

노출시켜 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)을 이용해 단백질 발현을 확인하였으며, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다. 각각의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나눈 후 상대적 비로 나타내었다.

### 7) 통계분석

*In vitro* 연구의 수치는 mean ± standard error of mean (SEM)으로, *in vivo* 연구의 수치는 mean ± standard deviation (SD)로 표시하였다. SPSS (Version 26.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였으며 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 통해 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을  $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. Total polyphenol과 total flavonoid 함량 측정

生肝健脾湯의 total polyphenol 함량은  $24.15 \pm 0.03$  mg GAE/g으로 측정되었으며, total flavonoid 함량은  $23.19 \pm 0.11$  mg NE/g으로 측정되었다 (Table 2).

Table 2. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of *Saenggangeonbi-tang*

	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg NE/g)
<i>Saenggangeonbi-tang</i>	$24.15 \pm 0.03$	$23.19 \pm 0.11$

GAE; gallic acid equivalent, NE; naringin equivalent.

All experiments were performed in triplicate and values are expressed mean ± SEM.

### 2. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 측정

生肝健脾湯의 항산화 활성 측정을 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯의 DPPH

IC<sub>50</sub> 값은  $83.56 \pm 0.73$  μg/mL로 측정되었으며, ABTS IC<sub>50</sub> 값은  $159.22 \pm 2.28$  μg/mL로 측정되었다 (Table 3).

Table 3. DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity of *Saenggangeonbi-tang*

	DPPH (IC <sub>50</sub> , μg/mL)	ABTS (IC <sub>50</sub> , μg/mL)
<i>Saenggangeonbi-tang</i>	$83.56 \pm 0.73$	$159.22 \pm 2.28$

DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS; 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). All experiments were performed in triplicate and values are expressed mean ± SEM.

### 3. 혈중 AST, ALT, ammonia 및 MPO 측정

동물실험 종료 후, 혈중에서 AST, ALT, ammonia 및 MPO를 측정하였다. AST 측정 결과, 간염유화로 인하여 Con군의 수치가 Nor군 수치의 6.20배로 유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.001$ ), Sily군, S200군은 Con군 AST 수치의 0.57배 ( $p < 0.01$ ), 0.58배 ( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하는 것으로 나타

났다. ALT의 경우, Nor군 보다 Con군에서 2.52배 유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.001$ ), Sily군은 유의하지는 않으나 감소하는 경향이 나타났다. S200군은 Con군 ALT 수치의 0.72배 ( $p < 0.05$ )로 유의하게 감소하였다. 혈중 ammonia 농도를 측정된 결과, Nor군에 비하여 Con군은 간염유화로 인하여

ammonia를 분해하지 못하여 2.44배 유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.001$ ), Sily군과 S200군은 Con군 수치에 각각 0.67배 ( $p < 0.001$ ), 0.83배 ( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. MPO 측정 결과, Con군에서 Nor 보다 6.49배

유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.001$ ), Sily군과 S200군은 Con군 MPO 수치의 0.49배 ( $p < 0.01$ ), 0.63배 ( $p < 0.05$ )로 유의하게 감소하였다 (Table 4).

Table 2. Body Weight and Food Efficiency Ratio

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Ammonia (nmon/ $\mu$ L)	MPO (mU/mL)
Nor	11.89 $\pm$ 2.17	7.70 $\pm$ 0.53	22.59 $\pm$ 1.37	270.74 $\pm$ 18.32
Con	73.69 $\pm$ 12.86 <sup>###</sup>	19.38 $\pm$ 3.30 <sup>###</sup>	55.08 $\pm$ 3.02 <sup>###</sup>	1756.88 $\pm$ 147.83 <sup>###</sup>
Sily	41.75 $\pm$ 2.53 <sup>**</sup>	16.85 $\pm$ 0.88	37.04 $\pm$ 0.71 <sup>***</sup>	863.13 $\pm$ 178.98 <sup>**</sup>
S200	42.74 $\pm$ 3.97 <sup>**</sup>	13.97 $\pm$ 0.83 <sup>*</sup>	45.76 $\pm$ 1.94 <sup>**</sup>	1103.15 $\pm$ 279.88 <sup>*</sup>

Aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALT, myeloperoxidase; MPO. Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). Significance: <sup>###</sup> $p < 0.001$  versus Nor group, <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  versus Con group.

#### 4. 조직학적 분석

##### 1) 간 조직 H&E 염색

동물실험 종료 후, 간 조직을 H&E 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, Con군의 경우 TAA로 인하여 섬유화가 유발되어

중심정맥 주변으로 다수의 염증세포가 침윤된 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 Sily군과 S200군의 경우, Con군과 비교하여 염증세포의 침윤이 줄어들어 TAA로 의한 간섬유화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

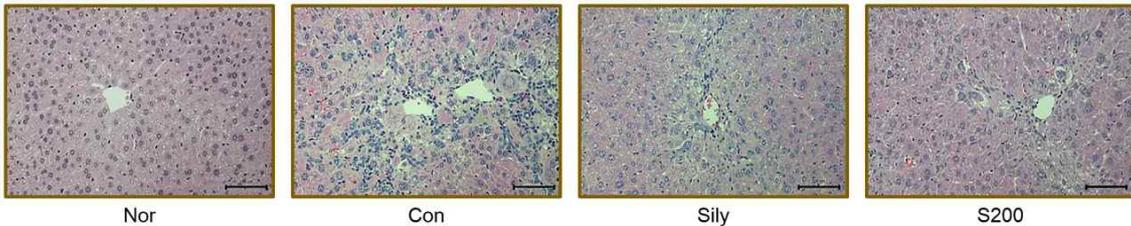


Fig. 1. Liver histological examination through H&E staining.

Hematoxylin and eosin; H&E (Original magnification  $\times 200$ , scale bar; 100  $\mu$ m). Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200.

##### 2) 간 조직 MT 염색

Collagen 관련 특수염색인 MT 염색을 실시하여 현미경으로 관찰한 결과, Nor군과는 다르게 Con군에서 중심정맥 주변을 기준으로 collagen섬유가 광범위하게 침착된 것이 관찰되었다.

반면에 Sily군과 S200군에서는 Con군보다 감소된 collagen 섬유를 확인할 수 있었다. 이는 生肝健脾湯이 TAA에 의한 collagen섬유의 침착 및 합성을 억제하는 항섬유화 활성을 지니고 있음을 보여 준다 (Fig. 2).

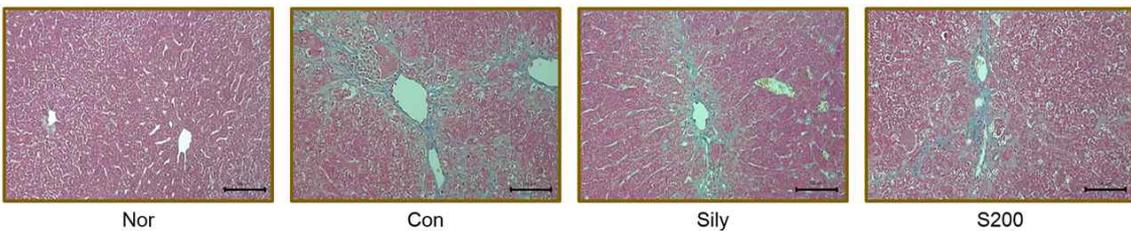


Fig. 2. Liver histological examination through MT staining.

Masson's trichrome; MT (Original magnification  $\times 200$ , scale bar; 100  $\mu$ m). Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200.

3) 간 조직 PAS 염색

간 조직 내 glycogen 검출을 위해 PAS 염색을 실시하여 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, Nor군과 비교하여 간섬유

화를 유발한 Con군의 간 조직에서 광범위한 glycogen 축적이 관찰된 반면, Sily군과 S200군은 간 조직에서 glycogen 축적을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

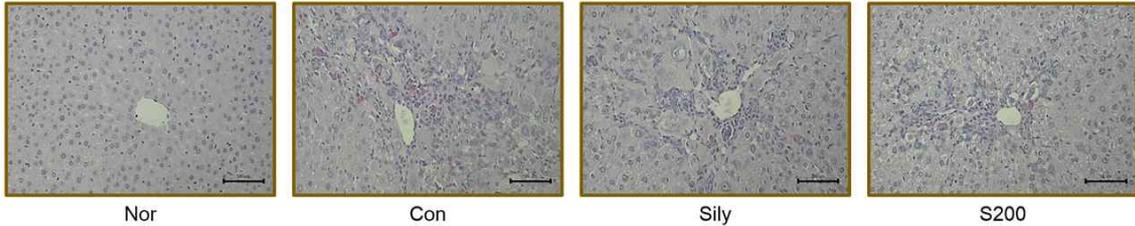


Fig. 3. Liver histological examination through PAS staining. Periodic acid-Schiff; PAS (Original magnification  $\times 200$ , scale bar;  $100 \mu\text{m}$ ). Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200.

5. Wsetern blot 분석

1) 간 조직 내 NADPH oxidase 발현

간 조직에서 자유라디칼의 생성에 관여하는 NADPH oxidase (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>)의 발현을 분석한 결과, Nor군에 비하여 Con군에서 간섬유화가 유발되어 유의하게 발현이 증가

하였다. 반면에 간 조직 내 증가한 NADPH oxidase 발현을 Sily군과 S200군이 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, p22<sup>phox</sup>의 경우 S200군에서 Con군 보다 감소율이 36.73%로 Nor군 수준까지 감소시키는 것으로 나타났다 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

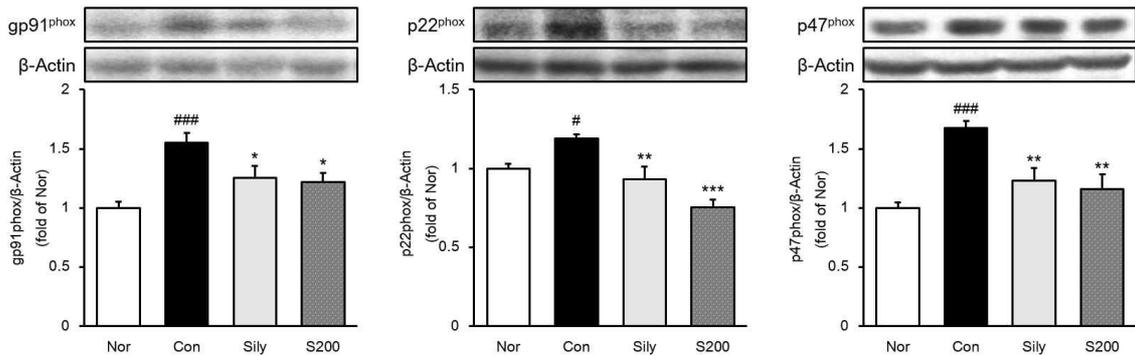


Fig. 4. Expression of NADPH oxidase in liver. Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). Significance: # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  versus Nor group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus Con group.

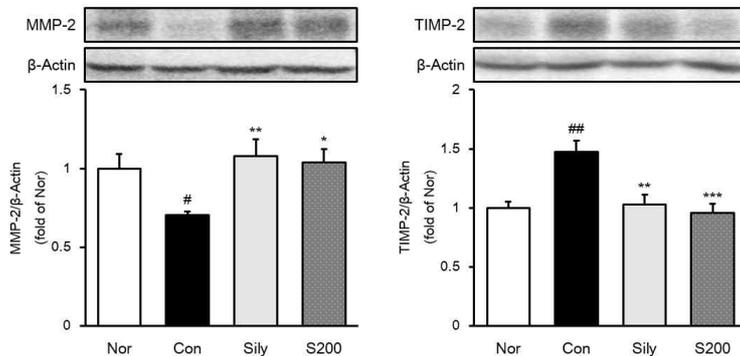


Fig. 5. Expression of MMP-2 and TIMP-2 in liver. Normal mice; Nor, liver fibrosis mice; Con, silymarin 50 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; Sily, *Saenggangeonbi-tang* 200 mg/kg body weight/day-treated liver fibrosis mice; S200. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). Significance: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , versus Nor group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus Con group.

## 2) 간 조직 내 MMP-2와 TIMP-2 발현

간 조직에서 세포외기질 분해 효소인 MMP-2의 발현을 분석한 결과, Nor군과 비교하여 Con군에서 간섬유화 유발에 의해 발현이 29.68% 유의하게 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ), Sily군과 S200군에서 Con군 보다 증가율이 각각 53.14% ( $p < 0.01$ ), 47.77% ( $p < 0.05$ )로 유의하게 MMP-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 MMP-2를 억제시키는 TIMP-2의 발현을 측정된 결과, Nor군에 비하여 Con군에서 47.41% 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 반면에 Sily군과 S200군에서 Con군 보다 감소율이 각각 30.33% ( $p < 0.01$ ), 35.10% ( $p < 0.001$ )로 유의하게 TIMP-2 발현이 감소하였으며, 특히 S200군은 Nor군 수준으로 나타났다 (Fig. 5).

## IV. 고찰

간섬유화는 반복된 간 손상에 대한 상처치유반응으로, 간의 생리학적 구조를 파괴하는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)의 축적과 과다한 염증발생을 특징으로 한다<sup>18</sup>. 한국인에게서 주로 발생하는 만성질환 중 간염, 간섬유화 및 간암은 큰 비중을 차지하고 있으며, 우리나라의 경우 선진국에 비해 음주인구가 상대적으로 많기 때문에 지속적으로 간손상 환자의 발생이 늘어나고 있는 추세이다<sup>19</sup>. 간질환의 치료에 사용되고 있는 소재로는 서양영경귀 (*Silybum marianum* L.) 유래 silymarin이 대표적이는데, silymarin은 용해성과 생체이용률이 낮다는 단점이 있다. 현재 이 외 소재의 발굴과 상업화는 이루어지지 못하고 있는 실정이며 간 손상을 줄이고 간기능을 회복시킬 수 있는 새로운 소재에 대한 연구가 필요한 것으로 보여진다<sup>20, 21</sup>.

生肝健脾湯은 茵陳五苓散과 加減胃苓湯의 합방으로, 간손상을 회복하게 하고 대사과정을 활성화시킨다고 알려져 있어 임상에서 간질환의 치료에 사용되고 있는 처방이다<sup>22</sup>. 따라서 본 연구에서는 간섬유화를 개선시키는 새로운 소재 발굴을 위해 thioacetamide (TAA)로 유도한 간섬유화 동물모델에서 生肝健脾湯의 간보호 및 항섬유화 효과에 대해 평가하였다. 生肝健脾湯의 투여 농도는 200 mg/kg로 설정하였으며 이는 간질환에서 한약재의 효능평가지 일반적으로 사용되는 농도이다<sup>23, 24</sup>.

AST와 ALT는 간세포 내의 amino acids와 ketoacids 사이에서 amino 전달의 촉매를 담당하는 효소로, 간세포의 손상이 발생하면 세포막의 투과성이 증가하게 되고 AST와 ALT가 혈액으로 방출된다. 혈액 내 방출이 과다하게 되면 간세포의 손상과 괴사를 유발하므로 간질환에서 혈중 AST, ALT의 수준을 확인하는 것은 간기능 평가의 주요 항목으로 여겨지고 있다<sup>25</sup>. 혈중 AST와 ALT를 측정할 결과 정상군 대비 간섬유화 유발군에서 유의한 수치의 증가가 나타났으며, 生肝健脾湯을 투여받은 군에서 유의한 수치의 감소가 확인되었다 (Table 4). Ammonia는 주로 간에서 단백질의 대사에 의해 생성되는 독성물질로, 요소 합성을 통해 제거되어야 하지만 지속적인 간질환에 의해 ammonia가 축적되면 생성되면 간의 해독작용을 방해한다<sup>26</sup>. 또한 myeloperoxidase (MPO)는 호중구와 대식세포에서 방출되는 효소로, HOCl과 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)의 생성을 촉진시키고, 생성된 산화성 물질은 간 정상세포를

활성화 시켜 세포사멸 및 간섬유화를 유발하게 된다<sup>27</sup>. 혈중 ammonia와 MPO 수준을 측정된 결과, 정상군 대비 간섬유화 유발군에서 현저하게 수치가 증가한 것으로 확인되었으며, 生肝健脾湯을 투여받은 군에서 유의하게 수치의 발현이 줄어든 것이 확인되었다 (Table 4).

간손상이 발생하면 간세포 괴사, 염증세포 침윤 및 간세포의 섬유화 반응이 나타나는데 이러한 예후의 판단은 조직학적 관찰을 통하여 확인할 수 있다<sup>28</sup>. Hematoxylin&eosin (H&E) 염색은 염기 친화성 구조인 핵을 보라색으로 착색하는 염료인 hematoxylin과 산성 친화성 구조인 세포질을 분홍색으로 착색하는 eosin을 통해 세포의 변화와 양상을 관찰할 수 있다<sup>29</sup>. H&E 염색 결과 간섬유화 유발에 의해 중심정맥 주변으로 염증세포의 이동 및 침윤이 크게 증가하였으며, 生肝健脾湯을 투여받은 군에서 현저하게 개선된 것이 확인되었다 (Fig. 1). 섬유화에 의해 증가한 collagen의 증가와 침착은 Masson's trichrome (MT)염색을 통하여 확인하였다. MT 염색은 collagen을 파란색으로 염색하여 간섬유화의 정도를 평가하는데 일반적으로 사용되고 있는 염색법이다<sup>30</sup>. MT 염색 결과, 간섬유화 유발군에서 collagen 섬유 침착이 중심정맥 주변으로 광범위하게 나타났지만, 生肝健脾湯을 투여받은 군에서 확연하게 감소하였다 (Fig. 2). 간은 몸에서 glycogen을 저장하는 가장 큰 저장소로 손상이 일어나게 되면 glycogen 대사에 영향을 미치게 된다<sup>31</sup>. 본 실험에서 수행한 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색은 여러 간질환에서 glycogen 침착의 유무를 확인할 수 있는 염색법 중 하나이다<sup>32</sup>. PAS 염색 결과 간섬유화 유발군은 정상군에 비해 glycogen의 축적이 광범위하게 나타났으며, 生肝健脾湯을 투여받은 군에서는 축적 정도가 감소한 양상을 보였다 (Fig. 3).

산화적 스트레스 (oxidative stress)는 체내 자유라디칼의 생성계와 제거계의 균형이 깨진 것을 의미하며, 산화적 스트레스가 발생하면 세포사멸과 조직 손상을 야기하여 여러 질병을 유발할 수 있다<sup>33</sup>. NADPH oxidase의 구성 요소 중 gp91<sup>phox</sup>와 p22<sup>phox</sup>는 결합하여 세포막 단백질로 존재하는데 과도하게 활성화되면 자유라디칼의 생성을 촉진하여 간섬유화의 진행을 악화시킨다고 알려져 있다<sup>23</sup>. 또한 산화적 스트레스가 발생할 때 세포질 단백질 p47<sup>phox</sup>는 인산화되어 세포막 단백질 p22<sup>phox</sup>와 결합하고 NADPH 산화효소 시스템을 활성화 시킨다<sup>32</sup>. 따라서 NADPH oxidase의 발현을 조절하는 것이 간섬유화의 치료에서 중요하게 여겨지고 있다. 간 조직에서 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> 및 p47<sup>phox</sup>의 발현을 확인한 결과 간섬유화 유발군 대비 生肝健脾湯 투여군에서 유의하게 감소한 것이 확인되었다 (Fig. 4).

간섬유화에 의해 간 조직에 ECM이 과도하게 생성되면 단백질 분해효소 matrix metalloproteinases (MMPs)에 의해 ECM의 분해가 일어나는데, 동시에 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)의 발현 또한 증가하여 MMPs의 작용을 억제한다<sup>24</sup>. 현재 알려진 바에 의하면 MMPs와 TIMPs는 여러 아형이 존재하지만, TIMP-2는 MMP-2를 억제한다고 알려져 있다<sup>34</sup>. 따라서 간 조직에서 MMP-2와 TIMP-2의 발현 정도를 확인하였다. MMP-2는 간섬유화 유발군 대비 生肝健脾湯 투여군에서 인자의 발현이 유의하게 증가하였으며, TIMP-2는 간섬유화 유발군 대비 生肝健脾湯 투여군에서 인자

의 발현이 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

이러한 결과를 통해 生肝健脾湯은 TAA로 유발된 간섬유화 동물모델에 대해 간보호 효과를 가짐을 확인하였다.

## V. 결 론

본 연구에서는 8주간 thioacetamide (TAA)로 간섬유화 유발과 동시에 生肝健脾湯을 투여하여 간섬유화 개선효과에 대하여 실험을 진행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험에 사용한 生肝健脾湯에 함유된 total polyphenol 함량은  $24.15 \pm 0.03$  mg GAE/g이 측정되었으며, total flavonoid 함량은  $23.19 \pm 0.11$  mg NE/g이 측정되었다. 또한 라디칼 소거능 측정 결과, DPPH는  $IC_{50}=83.56 \pm 0.73$   $\mu$ g/mL, ABTS는  $IC_{50}=159.22 \pm 2.22$   $\mu$ g/mL으로 나타났다.
2. 간섬유화로 인해 증가된 간손상 수치를 生肝健脾湯 투여로 감소하는 것이 확인되었다.
3. 간섬유화로 인해 증가된 ammonia 수치를 生肝健脾湯 투여로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.
4. 간섬유화로 인해 증가된 MPO 수치를 生肝健脾湯 투여로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.
5. 간 조직 H&E, MT 및 PAS 염색 결과, 간섬유화로 인해 간 조직 내 중심정맥 주변으로 증가된 염증세포, collagen 섬유 및 glycogen을 生肝健脾湯 투여로 감소하는 것을 확인하였다.
6. Western blot 분석결과, 生肝健脾湯 투여는 간섬유화로 인해 증가된 NADPH oxidase (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>)와 TIMP-2의 발현을 유의하게 억제시켰으며, 세포외기질 분해 효소인 MMP-2의 발현은 유의하게 증가시켰다.

따라서 TAA로 유발된 간섬유화 동물모델에서 生肝健脾湯의 투여는 혈중 간섬유화 관련 바이오마커인 AST, ALT, ammonia 및 MPO의 증가를 저해하고, NADPH oxidase와 세포외기질 관련 단백질에 작용하여 간섬유화를 개선시키는 효과가 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 성과물은 2022년도 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 (No. 2018R1A5A2025272)과 농촌진흥청 연구사업 (No. PJ015272012022)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Lee JA, Shin MR, Lee JH, Roh SS. The Effect of Chaemelis Fructus Extract on Acute Hepatic Injury in Rats. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2021 ; 42(1) : 1-10.
2. Kim HY. Effects of Water Extracts of Black Tea on Hepatic Functional Improvement and Anti-fibrosis in Rats. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*. 2013 ; 23(1) : 44-52.
3. Han SC, Yun JH, Yoon WJ, Yoon SA, Kang HY, Yoo ES. Suppressive Effects of Premature Citrus unshiu Extract on Dimethylnitrosamine-induced Hepatic Fibrosis in Mice. *Yakhak Hoeji*. 2020 ; 64(5) : 377-386.
4. Park SM, Lee JH, Kim YC, Woo HJ. Effect of Yinjinchunggan-tang(YJCGT) on Fibrogenesis in Thioacetamide(TAA)-induced Rat Liver Tissue. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2009 ; 30(2) : 270-287.
5. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, Hanzlik RP. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*. 2012 ; 25(9) : 1955-1963.
6. Marciniak S, Wnorowski A, Smolińska K, Walczyna B, Turski W, Kocki T, Paluszkiwicz P, Parada-Turska J. Kynurenic Acid Protects against Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*. 2018 ; 2018 : 1270483.
7. da Silva BS, Paulino AMB, Taffarel M, Borba IG, Telles LO, Lima VV, Aguiar DH, Dias MC, Nascimento AF, Sinhorin VDG, Luvizotto RAM, Bomfim GF. High sucrose diet attenuates oxidative stress, inflammation and liver injury in thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Life sciences*. 2021 ; 267 : 118944.
8. Schyman P, Printz RL, Estes SK, O'Brien TP, Shiota M, Wallqvist A. Concordance between Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rat and Human In Vitro Gene Expression Data. *International journal of molecular sciences*. 2020 ; 21(11) : 4017.
9. Xia Y, Li J, Chen K, Feng J, Guo C. Bergenin Attenuates Hepatic Fibrosis by Regulating Autophagy Mediated by the PPAR- $\gamma$ /TGF- $\beta$  Pathway. *PPAR research*. 2020 ; 2020 : 6694214.
10. Koo JS, Kim BH, Seo BI. A clinical study on a patient with hypothyroidism. *The Korea Journal of Herbology*. 2014 ; 29(5) : 17-21.
11. Hwang SJ, Choi HS, Kim SM, Woo CH. Effects of Saengkankeonbi-tang on Prevention of Hyperlipidemia and Liver Damage Induced by Alcohol. *The Korea Journal of Herbology*. 2009 ; 24(4) : 9-16.
12. Kim JY, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The Effects of

- Saengkankunbi-tang on Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling Pathways of HepG2 Cells. *The journal of internal Korean medicine*. 2006 ; 27(1) : 149-165.
13. Lee SN, Kim SJ, Lee JS, Kim EG, Jang SG. Effect of Ganjeonggyeok Acupuncture and Saengkankunbi-tang Treatment in the Changes of LFT and Lipid-obesity Index Values. *The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2008 ; 25(6) : 47-54.
  14. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols*. 2007 ; 2(4) : 875-877.
  15. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JRL. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994 ; 64(2) : 155-161.
  16. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199-1200.
  17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 1999 ; 26(9-10) : 1231-1237.
  18. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation*. 2007 ; 117(3) : 539-548.
  19. Byun SH, Park SM, Kim SC, Cho IJ. Anti-fibrotic Effect of Mori Folium Extract in Hepatic Stellate Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2013 ; 28(4) : 49-55.
  20. Tajmohammadi A, Razavi BM, Hosseinzadeh H, Silybum marianum (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: A review. *Phytother Res*. 2018 ; 32(10) : 1933-1949.
  21. Chang WI, Nam KH, Cho JY, Lee JH, Yu YH, Park MH, Kim JH. Effects of Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor Oil on Solubility and Bioavailability of Silymarin in Combined Preparation Containing Silymarin and Ursodeoxycholic Acid. *The Journal of Applied Pharmacology*. 1997 ; 5(3) : 272-277.
  22. Seo YH, Kim JD, Choi HY, Jung TY. Case Report of Suggested Alcoholic Hepatitis Treated with Saenggangeonbi-tang and Kongjin-Dan. *The Journal of East-West Medicine* 2011 ; 36(4) : 83-89.
  23. Choi JW, Shin MR, Lee JH, Roh SS. Hepatoprotective Effect of Uncaria rhynchophylla on Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis Model. *Biomedical Science Letters*. 2021 ; 27(3) : 142-153.
  24. Lee JA, Lee SH, Shin MR, Noh JS, Roh SS. The Effect of Chaenomelis Fructus Extract on Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2021 ; 50(8) : 757-764.
  25. Xu L, Yu Y, Sang R, Li J, Ge B, Zhang X. Protective Effects of Taraxasterol against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018 ; 2018 : 8284107.
  26. Olde Damink SW, Jalan R, Dejong CH. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. *Metabolic brain disease*. 2009 ; 24(1) : 169-181.
  27. do Carmo RF, Vasconcelos LR, Mendonça TF, de Mendonça Cavalcanti Mdo S, Pereira LM, Moura P. Myeloperoxidase gene polymorphism predicts fibrosis severity in women with hepatitis C. *Human immunology*. 2014 ; 75(8) : 766-770.
  28. Kim MJ, Oh TW, Do HJ, Kim KY, Yang JH, Son JD, Yang YJ, You YJ, Kim WH, Kang SH, Lee DH, Ki SH, Kim YW, Park KI. Effect of Nardotidis seu Sulculii Concha water extract (NSCE) on liver damage and depression in restraint-induced stress model. *Herbal Foormula Science*. 2022 ; 30(2) : 85-93.
  29. Amin A, Mahmoud-Ghoneim D. Texture analysis of liver fibrosis microscopic images: a study on the effect of biomarkers. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2011 ; 43(3) : 193-203.
  30. Wan Y, Hu Z, Liu Q, Wang L, Sullivan MA, Gilbert RG. Liver fibrosis alters the molecular structures of hepatic glycogen. *Carbohydrate polymers*. 2022 ; 278 : 118991.
  31. Krishna M. Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clinical liver disease*. 2013 ; 2 (Suppl 1) : S8-S10.
  32. Oh MH, Shin MR, Roh SS. Protective Effect of Spatholobi Caulis in Thioacetamide induced Acute Liver Injury of Rat. *The Korea Journal of Herbology*. 2021 ; 36(2) : 31-42.
  33. Huang J, Kleinberg ME. Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22 (phox). *The Journal of biological chemistry*. 1999 ; 274(28) : 19731-19737.
  34. Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflammatory bowel diseases*. 2007 ; 13(1) : 97-107.