



Original Article / 원저

아라키돈산과 철 유도성 산화적 스트레스에 대한 抑肝散加陳皮半夏의 간세포 보호 효능

김예림, 진효정, 박상미, 제갈경환, 송창현, 김경순, 변성희, 김상찬*

대구한의대학교 한의과대학

Ukgan-san plus Citri Pericarpium and Pinelliae Rhizoma Protects Hepatocytes from Arachidonic Acid and Iron-mediated Oxidative Stress

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

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Ukgan-san plus Citri Pericarpium and Pinelliae Rhizoma (UCP) is used as a traditional herbal formula in Korea and Japan for treatment of fever, fever-induced convulsions, and liver dysfunction and so on. In this study, we investigated the cytoprotective effect and underlying mechanism of UCP against oxidative stress induced by cotreatment of arachidonic acid (AA) and iron.

Methods : To evaluate the hepatoprotective effects of UCP against AA + iron-induced oxidative stress in HepG2 cell, cell viability and changes on apoptosis-related proteins were assessed by MTT and immunoblot analyses. The changes in intracellular reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), and mitochondrial membrane permeability (MMP) were investigated against to the oxidative stress. Furthermore, to verify underlying molecular mechanism, NF-E2-related factor 2 (Nrf2) and its downstream target genes were examined by immunoblot analysis.

Results : Treatment of UCP increased the cell viability and altered the expression levels of apoptosis-related proteins such as PARP, caspase-9, caspase-3, Bcl-2. UCP also inhibited the GSH depletion, excessive ROS production and mitochondrial dysfunction induced by AA + iron. In addition, the Nrf2 and the Nrf2 target genes activation were increased by UCP.

Conclusions : These results indicated that UCP has the ability to protect against oxidative stress-induced hepatocyte damage, which may be mediated with Nrf2 pathway.

Key-words : Ukgan-san plus Citri Pericarpium and Pinelliae Rhizoma (UCP), Hepatocyte, Oxidative stress, Nrf2

I. 서론

신체 내 산소를 사용하여 에너지를 생산하는 과정은 hydroxyl radical, superoxide radical 등과 같은 활성산소종 (ROS)을 생성하게 된다¹⁾. 일반적으로 이는 체내의 superoxide dismutase (SOD), glutathione, catalase 등의 항산화 시스템에 의해 적절하게 제거되어 항상성이 유지된다²⁾. 그러나 과도하게 생성된 ROS는 체내 항산화 시스템의 항상성 기능 저하를 유발하여 산화적 스트레스(oxidative stress)가 발생하게 된다³⁾. 이러한 과정에 의해 발생한 산화적 스트레스는 DNA와 protein의 변형 및 기능 이상, lipid 손상에 의한 생체막 영향 등 체내에 광범위한 영향을 미치게 된다⁴⁾. 이러한 산화적 스트레스가 지속적으로 체내 발생할 경우 당뇨병, 암, 심혈관질환 등을 유발한다고 알려져 있다⁵⁻⁷⁾.

간은 신체 내에서 가장 큰 기관으로 대사 조절 및 병원균과 외인성 항원을 제거하는 역할을 하며, 독소 및 노폐물을 분해하는 역할을 한다^{8,9)}. 또한, 알코올 및 약물 섭취, 바이러스 감염 등의 다양한 환경적 요인들에 의해 간은 다량의 ROS를 생성하게 되며²⁾ 산화적 스트레스에 노출되기 쉽다³⁾. 이러한 산화적 스트레스가 간에서 지속적으로 발생할 경우 간염, 간섬유화, 간경화 및 간암을 유발한다고 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾. 이로 인해 현재 산화적 스트레스로부터 간보호 효과를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

抑肝散은 當歸, 川芎, 茯苓, 白朮, 柴胡, 甘草, 鈎鈎藤으로 구성되었으며, ‘抑肝散加陳皮半夏’는 抑肝散에서 陳皮, 半夏를 추가하였으므로, 抑肝散 合 二陳湯의 의미이다¹⁶⁾.

근래까지 抑肝散에 대한 연구는 알츠하이머^{17,18)}, 발작¹⁹⁾, 치매²⁰⁾와 같은 신경성 질환과 본태성 떨림질환 등에 대한 개선 효과²¹⁾, 감삼선기능항진 개선²²⁾, Chorea Hyperglycemia Basal Ganglia Syndrome 개선²³⁾, 항간질²⁴⁾, 항비만 및 항지질^{25,26)}, 항산화²⁷⁾, anti-apoptosis²⁶⁾ 효과가 있다고 알려져 있다. 抑肝散에 추가된 陳皮와 半夏에 대한 연구로는, 陳皮

의 항산화²⁸⁾, 항관절염²⁹⁾, 항고혈압 및 항암³⁰⁾ 효과가 보고되어 있으며, 半夏는 종양 활성 억제³¹⁾, 항천식³²⁾, 항비만³³⁾ 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나, 抑肝散加陳皮半夏에 대한 연구는 뚜렛증후군³⁴⁾에 대한 임상연구로서 1편의 연구결과만이 보고되어 있으며, 抑肝散加陳皮半夏의 간세포 보호 효과에 대한 연구 결과는 알려진 바가 없다. 또한 抑肝散에는 항비만효과²⁵⁾ 및 신경세포 보호³⁵⁾, 항산화 효과²⁷⁾ 등이 보고되어 抑肝散加陳皮半夏가 간보호효과에도 유의할 것으로 판단되어 본 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 연구에 사용한 抑肝散加陳皮半夏 (Ukgan-san plus Citri Pericarpium and Pinelliae Rhizoma; UCP)는 (주)제일한방(서울, 한국)의 抑肝散加陳皮半夏를 사용하였으며, 약물의 구성 및 용량은 Table 1과 같다. Procaspase-9, procaspase-3, poly (ADP ribose) polymerase (PARP), lamin A/C, β -actin, heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 항체와 HRP conjugated anti-mouse IgG는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다. Bcl-2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였으며, Sestrin2 항체는 Protein tech group (Chicago, IL, USA)으로부터 구입하였다. 세포 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin과 streptomycin은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA)는 Calbiochem (San Diego, 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,

*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, Gyeongsang-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.
Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : September 25, 2023 / Revised : November 8, 2023 / Accepted : November 12, 2023

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.

Table 1. Composition of Ukgan-san plus Citri Pericarpium and Pinelliae Rhizoma in this study

Herb	amount (g)	%
當歸	1.0	10.5
川芎	1.0	10.5
茯苓	1.33	14.0
白朮	1.33	14.0
柴胡	0.67	7.1
甘草	0.5	5.3
釣鉤藤	1.0	10.5
陳皮	1.0	10.5
半夏	1.67	17.6
계	9.5	100

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 HepG2 cell (human hepatocyte derived cell line)은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 10 % FBS와 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 DMEM에 혼합하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator (MCO-20AIC, Sanyo Electric Biomedical Co., Japan)에서 배양하였다. 모든 세포 실험은 80-90 % confluence로 배양된 세포를 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정

24-well plate에 1.5×10⁵ cell/well의 농도로 세포를 분주하여 배양한 후, HepG2 cell의 confluence가 약 80-90% 되었을 때, 12시간 동안 FBS가 포함되지 않은 배지에서 배양하였다. UCP 단독 처치 시 세포에 대한 독성을 분석하기 위하여 0.03-1.0 mg/mL의 UCP를 24 시간 동안 처치한 후 세포 생존율을 분석하였다. 또한 UCP의 간세포 보호 효과를 관찰하기 위하여 0.03-1.0 mg/mL의 UCP를 1시간 전처치 한 후 10 μM AA를 12시간, 5 μM iron을 1시간 동안 처치하였다. 해당 약물 처치가 완료된 HepG2 cell에 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 추가한 후 4시간 동안 반응시켜 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 이용하여 생성된 formazan을 용

해한 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 × (absorbance of treated cell) / (absorbance of control cell)]

4. 전세포 추출액 및 핵 분획의 제조와 immunoblot 분석

약물 처치를 한 HepG2 cell로부터 얻은 전세포 추출액은 phosphatase 및 protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc.)이 첨가된 radio-immunoprecipitation assay buffer를 이용해 용해하여 4°C, 15,000 × g에서 15분 동안 원심분리하여 세포의 전추출액(whole cell lysate)으로서 상등액을 취하였다. 핵 분획(nuclear fraction)은 UCP, AA, iron을 처치한 세포에 NER-PER™ Nuclear and cytoplasmic extraction reagents 제조사에서 제시된 방법에 따라 상등액을 추출하였다. 해당 추출액들은 단백질 함량을 위하여 BCA protein assay kit를 이용하였다.

정량화된 lysate의 동일량을 8-12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동을 통해 단백질의 크기별로 분리 후, nitrocellulose membrane으로 electro-transfer 하였다. 비특이적 결합을 제거하기 위해 5% skim milk

로 상온에서 1시간 30분 동안 blocking한 후, 표적 단백질에 대한 1차 항체를 12시간 이상 반응시키고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 상온에서 반응시키고, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 image analyzing system (Imager 600, Amersham Biosciences)을 이용하여 감광하였다. 각 단백질의 상대적인 발현 정도는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)를 이용하여 분석하였다.

5. GSH 함량 측정

HepG2 cell을 24-well plate에 각 well당 1.5×10^5 개로 분주하여 배양한 뒤, UCP와 AA, iron을 순차적으로 처리하였다. 처리가 완료된 세포를 $500 \mu\text{L/well}$ 의 metaphosphoric acid를 이용하여 용해하고, GSH BIOXYTECH GSH-400 kit를 이용하여 405 nm의 파장으로 automated microplate reader (Tecan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

6. 세포 내 ROS 측정

UCP가 세포 내에서의 ROS에 미치는 영향을 측정하기 위해 DCFH-DA를 이용하였다. HepG2 cell을 24-well plate에 배양 후, UCP를 0.3, 1.0 mg/mL로 1시간 동안 처리하고, $10 \mu\text{M}$ AA (12시간), $5 \mu\text{M}$ iron (1시간)을 처리하였다. 이후, $20 \mu\text{M}$ DCFH-DA를 1시간 동안 37°C 에서 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

UCP 처리로 인한 미토콘드리아 막 전위의 변화를 측정하기 위하여 막투과성 양이온 형광 염료인 rhodamine 123을 이용하였다. UCP, AA, iron을 순차적으로 처리한 HepG2 cell에 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 의 rhodamine 123을 30분 동안 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

pGL4.37 [luc2P/ARE/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA) 리포터 유전자 형질이 도입된 재조합 HepG2 cell을 24-well plate에 배양한 후, UCP를 처리한 후, passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 용해하였다. 이후, luciferase assay reagent (Promega)를 첨가하여 발현된 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase의 활성도는 표준곡선을 이용해 단백질 농도를 기준으로 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. UCP의 AA + iron으로 유도된 cell death에 대한 보호 효과

우선, UCP 단독처리 시 세포 내 독성 유무를 파악하기 위하여 0.03-1.0 mg/mL의 UCP를 처리하여 세포 생존율을 분석하였다. UCP는 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL을 각각 처리하였을 때, 무처리군($100 \pm 2.57\%$) 대비 99.32 ± 6.83 , 95.49 ± 5.17 , 104.18 ± 2.28 , $101.80 \pm 15.45(\%)$ 로 통계적으로 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 1A). AA + iron로 산화적 스트레스가 유도된 경우, AA + iron 처리군은 무처리군($100 \pm 13.74\%$) 대비 $38.22 \pm 3.95\%$ 로 세포의 생존율을 유의하게($p < 0.01$) 감소시켰다. 반면, 1.0 mg/mL의 UCP를 처리한 경우, $108.54 \pm 6.63\%$ 로 AA + iron군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 1B). 따라서 UCP는 단독적인 세포 독성을 나타내지 않으며, AA + iron 처리로 인한 cell death에 대한 세포 보호 효과가 있음을 의미한다.

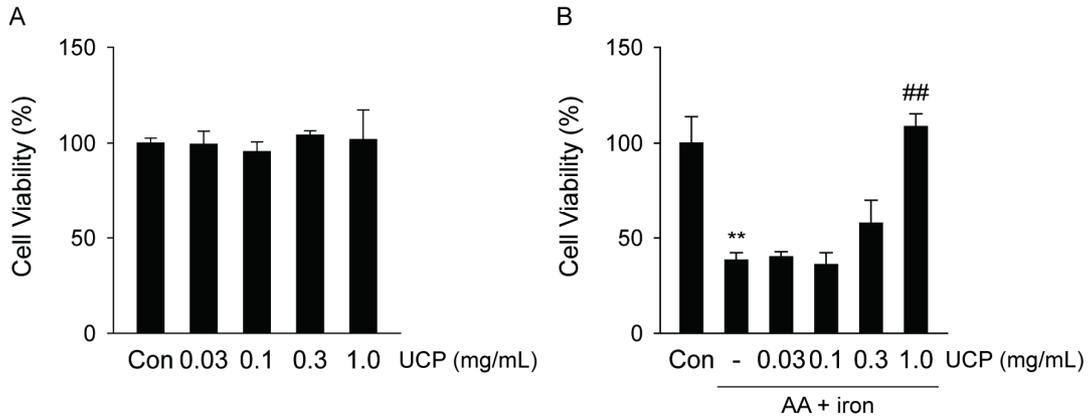


Fig 1. Effect of UCP against AA + iron-induced hepatotoxicity.

The effects of UCP on cell viability were assessed by using the MTT assay. (A) To investigate the effect of UCP alone on cytotoxicity, HepG2 cells were treated with 0.03–1.0 mg/mL of UCP for 24 h. (B) To determine the cytoprotective effect of UCP, HepG2 cells were pretreated with 0.03–1.0 mg/mL of UCP. And then, the cells were exposed to AA (10 μ M) for 12 h, and were incubated with iron (5 μ M) for 1 h. 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. UCP의 AA + iron으로 유도된 apoptosis 억제 효과

Apoptosis는 손상되거나 감염된 세포의 제거와 발달, 세포 분화 및 증식을 포함한 다양한 생물학적 과정에서 중추적인 역할을 한다³⁶. 이러한 apoptosis에 관여하는 인자로는 Bcl-2, caspase-9, caspase-3, PARP 인자가 알려져 있다³⁷⁻³⁹.

이를 바탕으로 UCP의 AA + iron에 의해 유도되는 apoptosis에 대한 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2의 발현의 변화를 immunoblot analysis를 통해 분석하였다 (Fig. 2A). HepG2 cell에 AA + iron을 처치한 경우,

cleaved PARP는 무처리군(1.00 \pm 0.05) 대비 2.02 \pm 0.05로 유의하게(p < 0.01) 증가하였고, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2는 무처리군 대비 각각 0.51 \pm 0.11, 0.63 \pm 0.04, 0.41 \pm 0.01로 유의하게(p < 0.01) 감소하였다. 그러나 1.0 mg/mL의 UCP를 처치할 경우, cleaved PARP는 1.30 \pm 0.09로 유의하게(p < 0.01) 감소하며, procaspase-9, procaspase-3, Bcl-2는 0.94 \pm 0.10, 0.91 \pm 0.01, 1.23 \pm 0.31로 유의한(p < 0.01) 증가를 나타내었다(Fig. 2B). 이는, UCP가 apoptosis를 억제함으로써 HepG2 cell을 보호함을 알 수 있다.

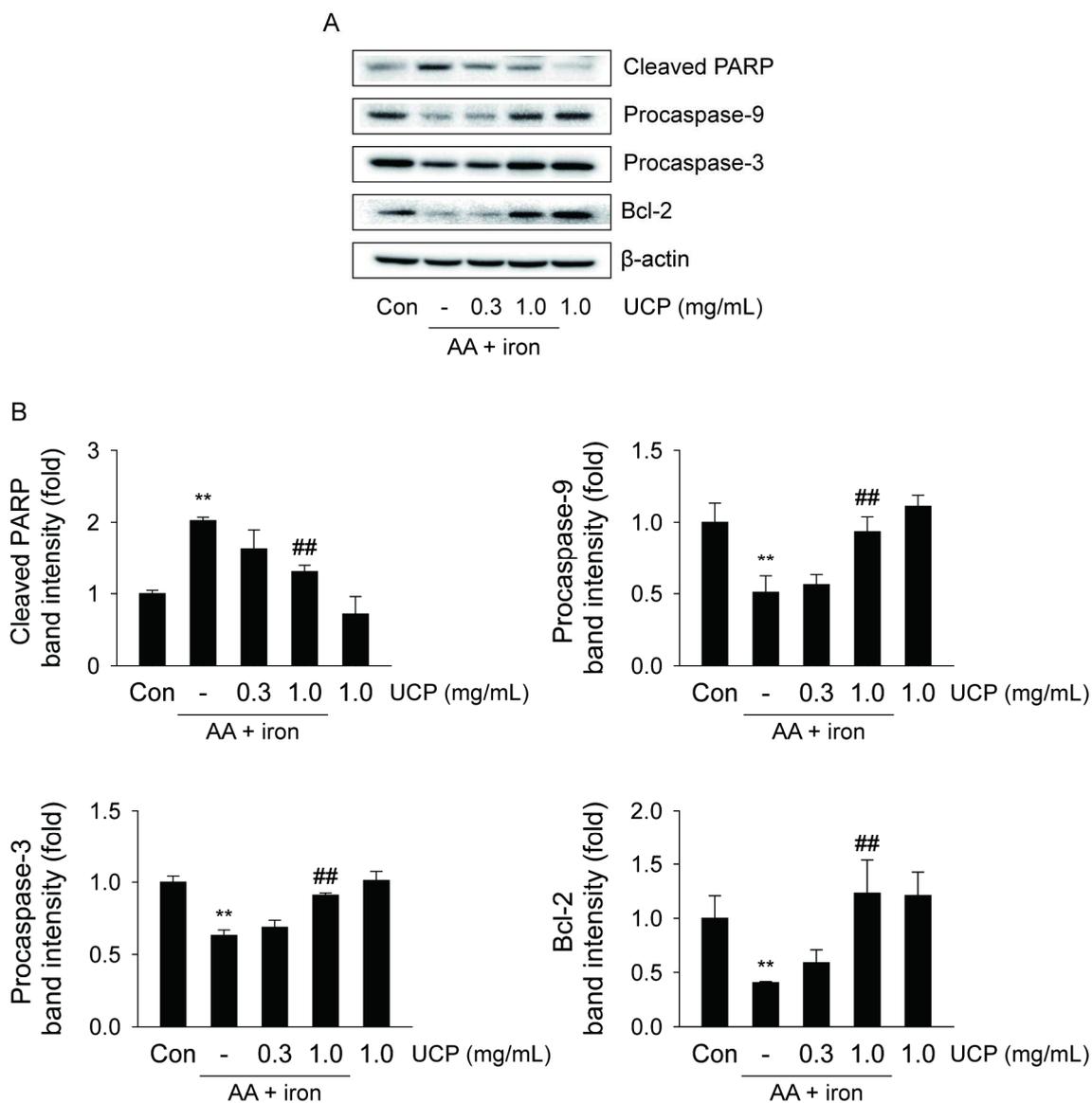


Fig 2. Effect of UCP on AA + iron-induced apoptosis.

(A) Immunoblot analysis of apoptosis-related proteins. (B) Cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3, and Bcl-2 expression intensities were measured 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. UCP의 AA + iron에 의한 세포 내 GSH 감소 및 ROS 축적 억제 효과

세포 내 AA + iron 처치로 유도된 GSH 고갈 및 ROS 생성 증가는 산화적 스트레스를 유발하여 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다^{40,41}. 이를 바탕으로 UCP의 항산화 효능을 확인하기 위하여 세포 내 GSH와 ROS의 농도를 분석하였다. 우선, AA + iron 처치를 통한 세포 내의 환원형 GSH의 농도 변화를 분석하였다. AA + iron 처치군은 무처리군($27.68 \pm 3.53 \mu\text{mol/mg protein}$)에 대비하여 $9.80 \pm 1.58 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 유의한($p < 0.01$) 감소를 나타냈

으며, 1.0 mg/mL의 UCP를 처치한 경우에는 $35.18 \pm 4.05 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 3A). 또한 AA + iron 처치로 인한 세포 내 ROS 축적의 변화를 측정된 결과, 무처리군(1.00 ± 0.18) 대비 AA + iron 처치군에서 8.03 ± 2.01 배로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. 하지만 1.0 mg/mL의 UCP를 처치한 군은 2.59 ± 0.87 배로 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 UCP가 세포 내의 GSH 고갈 및 ROS 축적을 억제하여 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

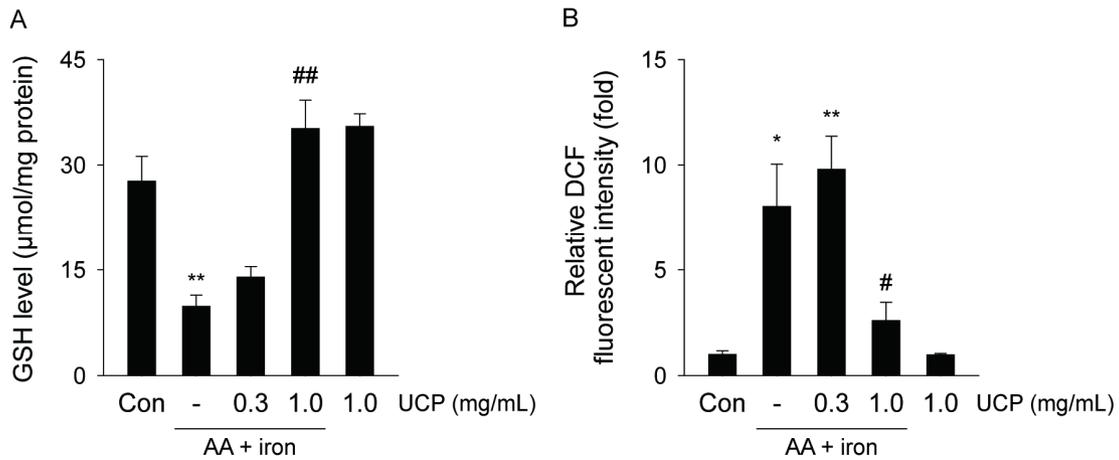


Fig 3. Effects of UCP on AA + iron-induced GSH depletion and ROS production.

(A) The cellular GSH contents were measured by using commercial kit as mentioned in materials and methods section, and the values were normalized by protein concentration. (B) To observe the intracellular ROS accumulation, HepG2 cells were treated with 0.3–1.0 mg/mL UCP and AA + iron. After then, DCFH-DA (20 μM) was added for 1 h. DCF fluorescence was monitored by automated microplate reader. (Significant compared to control, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; Significant compared to AA + iron, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$).

4. UCP의 AA + iron으로 유도된 mitochondrial dysfunction에 대한 억제 효과

미토콘드리아의 AA + iron으로 인한 기능 이상은 내인성 경로를 통해 apoptosis를 유도한다^{42,43}. 따라서 UCP의 AA + iron에 의한 미토콘드리아 막 기능 장애 억제 효과를 분석하기 위하여, 미토콘드리아 막에 특이적 결합을 하는 rhodamine123을 이용하여 MMP를 측정하였다. AA + iron을 처리한 군은 rhodamine123

negative fraction (RN1)이 무처리군(23.01 ± 3.66 %) 대비 78.62 ± 2.36 %로 통계적으로 유의한($p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 반면, 0.3, 1.0 mg/mL의 UCP를 전처리한 경우 53.29 ± 1.11, 48.83 ± 1.70%로 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 AA + iron에 의한 미토콘드리아 막 기능 장애가 UCP를 처리함으로써 억제되어 세포 보호 효과가 나타남을 알 수 있다.

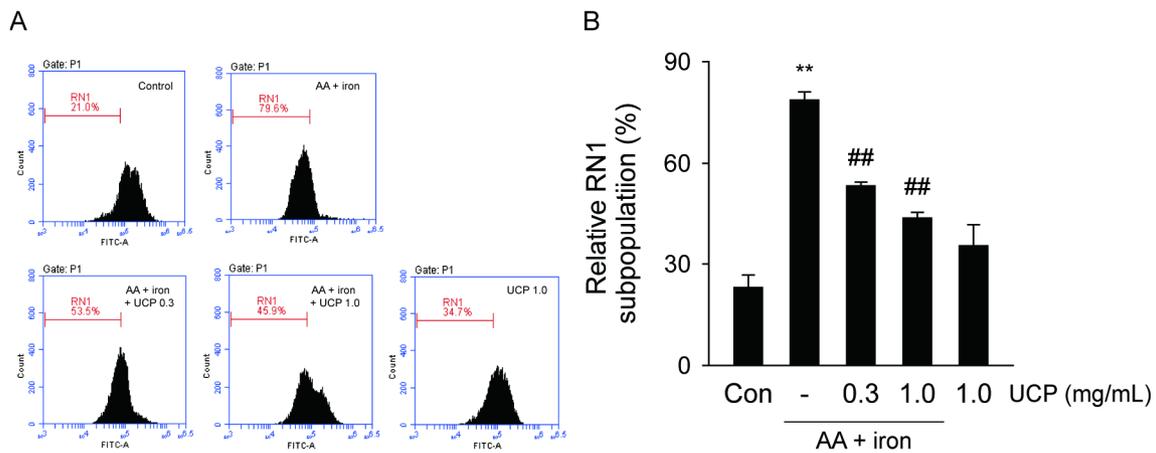


Fig 4. Effect of UCP on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction.

(A) HepG2 cells were treated with 0.3, 1.0 mg/mL of UCP, AA + iron as described in material and methods and subsequently stained by rhodamine 123 for 30 min. (B) Proportions of low rhodamine 123 intensities (RN1 fraction) were presented as percentages of the 10,000 cells. All data represent mean ± S.D. of three separated experiments. (Significant compared to control, $**p < 0.01$; Significant compared to AA + iron, $##p < 0.01$).

5. UCP의 Nrf2 활성화에 미치는 효과

Nrf2는 세포 내 항산화 관련 단백질의 발현을 유도하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 전사인자이다⁴⁴. 다양한 신호분자에 의해 Nrf2가 활성화 될 경우 세포질에서 핵으로 이동하여 프로모터 영역의 ARE에 결합한 후 Sestrin2, HO-1, NQO1 등을 포함한 항산화 유전자들의 전사를 활성화 시킨다⁴⁵⁻⁴⁷. UCP가 Nrf2 활성화에 관여하는지 규명하기 위해, ARE-luciferase를 발현하는 재조합 세포주를 활용하여 repoter gene 분석을 실시하였다.

0.3, 1.0 mg/mL의 UCP를 처리한 경우, 무처리군

(1.00 ± 0.54) 대비 2.87 ± 0.36, 7.15 ± 1.03배로 통계적으로 유의한($p < 0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 5A).

또한 UCP의 Nrf2 활성화에 있어 처리 시간 및 농도 별 미치는 영향을 분석하기 위하여 세포의 핵 내 존재하는 Nrf2 발현의 변화를 immunoblot analysis을 통해 분석하였다.

우선, 1.0 mg/mL의 UCP의 처리 시간별 핵 내의 Nrf2 발현량의 변화를 측정한 결과, 무처리군(1.00 ± 0.46) 대비 3시간과 6시간에서 처리한 경우 2.08 ±

0.22, 2.14 ± 0.26배로 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 5B). 또한, UCP를 농도별로 3시간 동안 처치하였을 때 핵 내의 Nrf2의 변화를 측정하는 결과, 무처리군(1.00 ± 0.09) 대비 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL의

UCP를 처치한 군에서 1.41 ± 0.18, 1.68 ± 0.27, 2.23 ± 0.15배로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 5C). 이는 UCP가 핵 내의 Nrf2 활성화를 통해 항산화 효능이 나타남을 알 수 있다.

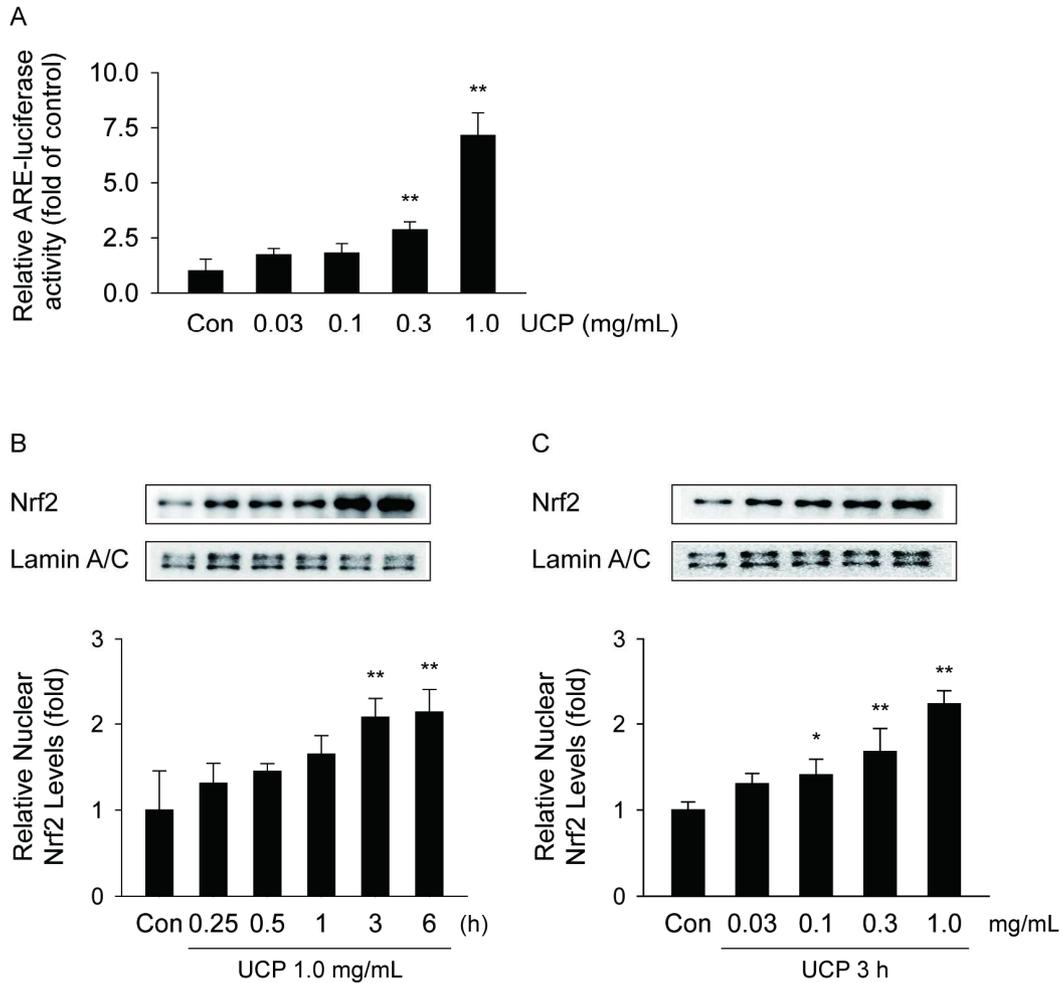


Fig 5. Effect of UCP on Nrf2 activation

(A) Reporter gene assay to measure ARE-mediated transcriptional activation. The expressed luciferase activity of recombinant HepG2 cells, treated with 0.03–1.0 mg/mL of UCP for 24 h, was measured. (B) To measure the time-course nuclear Nrf2 expression levels, HepG2 cells were treated with 1.0 mg/mL UCP for 0.25–6 h. (C) To determine the concentration-dependent nuclear Nrf2 expression changes, HepG2 cells were treated with 0.03–1.0 mg/mL UCP for 3 h. Immunoblot loading control for equal loadings was used as lamin A/C. All data represent mean ± S.D. of three separated experiments. (Significant compared with control, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

6. UCP의 Nrf2 표적 항산화 유전자 발현에 미치는 효과

1.0 mg/mL의 UCP를 1시간 또는 3시간 동안 HepG2 cell에 처치하여, Nrf2의 표적 항산화 인자인 Sestrin2, HO-1, NQO1의 변화를 immunoblot analysis를 통해 분석하였다(Fig. 6A).

Sestrin2 단백질은 무처리군(1.00 ± 0.36) 대비 3시간 처치한 군에서 2.21 ± 0.20 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였으며, HO-1 단백질 발현은 무처리군

(1.00 ± 0.33) 대비 3시간 처치하였을 때 2.78 ± 0.51 배로 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다.

또한 NQO1의 발현은 무처리군(1.00 ± 0.10) 대비 3시간 처치한 군에서 2.25 ± 0.24 배로 통계적으로 유의한($p < 0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 6B).

이러한 결과는 UCP의 항산화 효과가 Nrf2 의존성 항산화 인자들의 발현을 통해 나타나는 것을 시사한다.

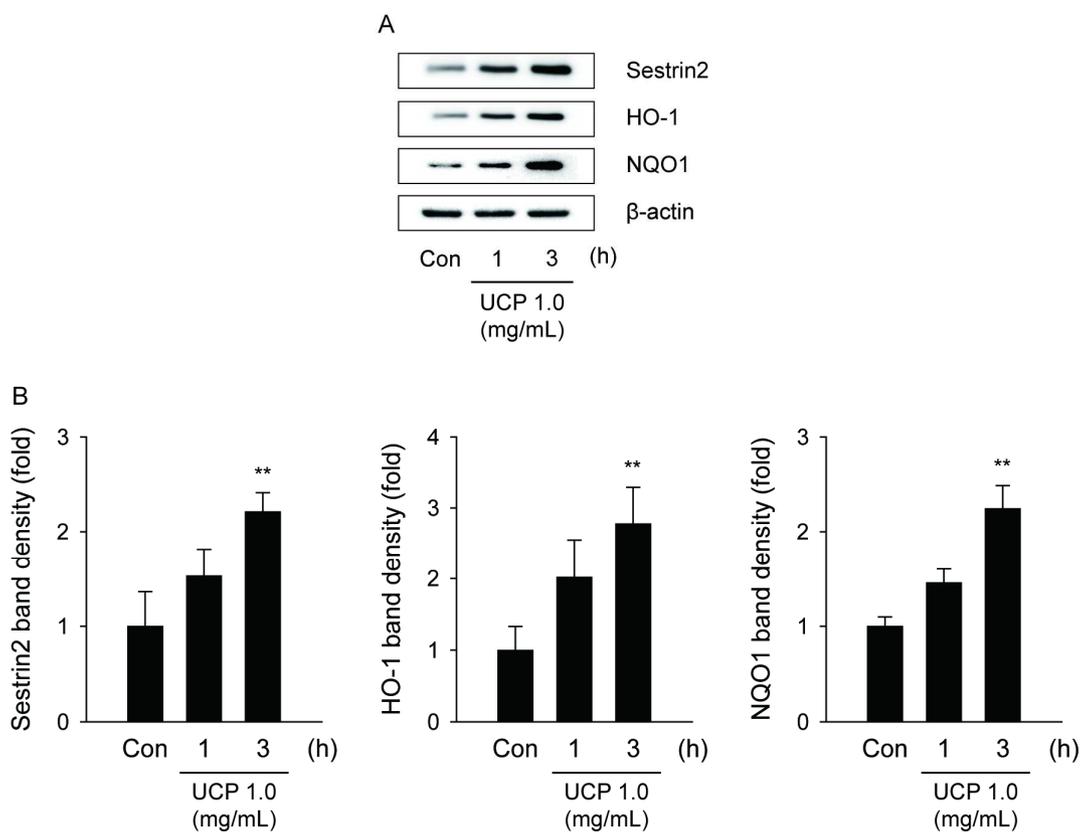


Fig 6. Activation of Nrf2 and its target genes expression by UCP.

The protein levels of Sestrin2, HO-1, NQO1 were immunoblotted in the HepG2 cells treated with 1.0 mg/mL UCP for 1 or 3 h. Equal protein loading was confirmed by β -actin immunoblotting. All Data represent the mean \pm S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, ** $p < 0.01$).

IV. 고찰

抑肝散은 〈中醫方劑大辭典〉에 3종의 方劑가 수록되어 있으며, 이 3종의 抑肝散은 〈保嬰撮要〉, 〈醫便〉, 〈簡明醫彙〉에記載된 방제이다.

〈保嬰撮要〉의 抑肝散은 當歸 1錢, 川芎 8分, 茯苓, 白朮 各1錢, 柴胡, 甘草 各5分, 鈞鈎藤 1錢으로 구성되어 小兒肝經虛熱發搐, 或發熱咬牙, 或驚悸寒熱, 或木乘土而嘔吐泄瀉, 腹脹少食, 睡臥不安를 치료하며, 복용법은 水煎하여 子母가 同服한다^{48,49}. 이는 전해질 성분의 약은 정도의 차이는 있으나, 母乳로 移行되는 경우가 많으므로, 授乳를 통하여 약의 효능을 강화시키기 위한 것으로 보인다. 〈醫便〉의 抑肝散은 柴胡 2錢半, 赤芍藥, 牡丹皮, 各1錢半, 靑皮 2錢, 當歸, 生地黃 各5分, 地骨皮, 香附子 各1錢, 川芎 7分, 連翹 5分, 山梔仁 1錢, 甘草 2分, 神麩 8分으로 구성되어 寡居獨陰婦人, 惡寒發熱, 全類瘡者, 久不愈, 卽成瘵疾者를 치료하는데, 이와 주치증이 유사한 〈方藥合編〉 增補203 柴胡抑肝湯⁵⁰과는 약물 구성상 祛當歸 加蒼朮의 차이만이 있을 뿐이다. 〈簡明醫彙〉의 抑肝散은 香附子 4兩, 柴胡, 黃連, 靑皮 各2兩, 甘草 1兩로 구성되어 治怒하며, 爲未하여 每服 2錢한다. 이 중 抑肝散加陳皮半夏의 기본 방제가 되는 것은 〈保嬰撮要〉의 抑肝散이다.

抑肝散은 〈東醫寶鑑〉, 〈方藥合編〉, 한의과대학 공동교재인 〈韓醫方劑學〉에서는 기재되어 있지 않고, 〈圖說漢方診療要方〉⁵¹ 및 〈藥局製劑 漢方212方の使

方〉⁵²에 기재되어 있다. 우리나라에서는 일반적으로 湯劑를 사용하는 경우는 〈圖說漢方診療要方〉의 용량을 참고하는 경우가 많고, 엑기스제를 사용하는 경우는 〈藥局製劑 漢方212方の使方〉와 용량이 동일한 T社의 제품⁵³을 사용하는 경우가 많은데, 실제 약물의 구성에서는 〈圖說漢方診療要方〉의 용량이 원방에 가깝다 (Table 2). 〈保嬰撮要〉대비 〈圖說漢方診療要方〉의 약물 변화량의 합은 0.814이며, 〈保嬰撮要〉대비 엑스제의 약물 변화량의 합은 1.871이며, 〈圖說漢方診療要方〉과 엑스제의 t-test 값은 0.028로 유의성있는 차이가 있다. 抑肝散加陳皮半夏 (抑肝散 合 二陳湯)는 Cho等⁵⁴의 연구에 의하면, 矢數道明의 〈臨床應用漢方處方解說〉에서 加減方으로 제시되었고, 大塚敬節, 矢數道明, 清水藤太郎의 〈漢方診療醫典〉에서 抑肝散加陳皮半夏가 독립적 方劑로 제시되었다. 또한 〈藥局製劑 漢方212方の使方〉에서도 本方은 日本에서 創製된 方劑인 것으로 기록하고 있다⁵². 抑肝散과 마찬가지로 우리나라 임상에서는 湯劑로는 〈圖說漢方診療要方〉의 용량을 참고하는 경우가 많고, 엑기스제를 사용하는 경우는 다양한 제조사의 엑기스제를 사용하는데, Cho等의 연구 결과인 7개 제조사의 약물 구성⁵⁴을 보면 대부분 〈藥局製劑 漢方212方の使方〉의 용량을 따르고 있음을 알 수 있다 (Table 2). 본 연구에서는 〈藥局製劑 漢方212方の使方〉과 용량이 같은 (주제일한방의 抑肝散加陳皮半夏를 사용하였다.

Table 2. Comparison of Herbal Composition and Dosage of UGS and UCP

방제명	抑肝散 (UGS)						抑肝散加陳皮半夏 (UCP)							
	保嬰撮要		圖說漢方診療要方		漢方212方の使方		엑스제 (T社)		圖說漢方診療要方		漢方212方の使方		엑스제 (國內社)	
출처	용량	%	용량	%	용량	%	용량	%	용량	%	용량	%	용량	%
當歸	1錢	17.2	8	17.8	3	14.6	3	14.6	8	13.6	3	10.5	1	10.5
川芎	8分	13.8	5	11.1	3	14.6	3	14.6	5	8.5	3	10.5	1	10.5
茯苓	1錢	17.2	8	17.8	4	19.5	4	19.5	8	13.6	4	14.0	1.33	14.0
白朮	1錢	17.2	8	17.8	4	19.5	4	19.5	8	13.6	4	14.0	1.33	14.0
柴胡	5分	8.6	4	8.9	2	9.8	2	9.8	4	6.8	2	7.0	0.67	7.1
甘草	5分	8.6	4	8.9	1.5	7.3	1.5	7.3	4	6.8	1.5	5.3	0.5	5.3
鈞鈎藤	1錢	17.2	8	17.8	3	14.6	3	14.6	8	13.6	3	10.5	1	10.5
陳皮	-	-	-	-	-	-	-	-	6	10.2	3	10.5	1	10.5
半夏	-	-	-	-	-	-	-	-	8	13.6	5	17.5	1.67	17.6

抑肝散加陳皮半夏에 대한 연구로는 뚜렛증후군³⁴⁾에 대한 임상연구 1편 밖에 없으며, 특히 抑肝散加陳皮半夏의 간세포 보호 효과에 대한 연구 결과는 알려진 바가 없다. 따라서, 본 연구는 抑肝散加陳皮半夏의 HepG2 cell에 AA와 iron의 병용처치로 유도되는 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 효과를 규명하고자 하였다.

간은 에너지 대사 및 해독 작용이 일어나는 기관으로 대사 과정에 필요한 iron이 저장된다. 대사 과정에 의해 세포 내 iron이 과도하게 저장될 경우, 지질과산화물을 촉진하며 phospholipase A2가 활성화 되어 AA를 활성화 시켜 산화적 스트레스를 유도한다^{55,56)}.

또한 세포 내 iron이 AA와 함께 반응할 경우 ROS 생성이 가속화 된다고 알려져 있다⁴⁰⁾. 이러한 ROS 축적 및 산화적 스트레스가 지속적으로 발생할 경우, 미토콘드리아 막전위 저하로 인한 기능 장애 및 apoptosis를 유발한다^{57,58)}.

본 연구팀에서는 HepG2 cell에 10 μ M AA와 5 μ M iron을 병용 처치하였을 경우, 세포 내 GSH 고갈과 ROS 증가 및 미토콘드리아 막 기능이 저하되어 apoptosis가 유도되었다고 보고하였다^{59,60)}. 이를 바탕으로 본 연구는 10 μ M AA와 5 μ M iron을 병용 처치하여 산화적 스트레스로 인한 세포 독성을 유도하였다. 따라서 본 연구는 AA + iron의 병용 처치를 통해 HepG2 cell에 산화적 스트레스를 유도하였으며 산화적 스트레스를 매개하는 간세포 독성에 대한 UCP의 항산화 효능을 규명하고자 하였다.

HepG2 cell에 0.03-1.0 mg/mL UCP를 단독으로 처치하여 MTT assay를 분석한 결과, 해당 농도에서는 UCP가 간세포에 독성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다. 또한 HepG2 cell에 1.0 mg/mL의 UCP와 AA + iron을 처치한 경우, AA + iron 유도성 cell death가 감소되었다.

Apoptosis는 내인성 경로(intrinsic apoptosis)와 외인성 경로(extrinsic apoptosis)로 분류된다⁶¹⁾. 외인성 경로는 수용체를 매개하여 apoptosis 수용체에 리간드가 결합하여 유도된다⁶²⁾. 반면, 내인성 경로는 세포 내 DNA 손상, ROS 축적, 미토콘드리아 막 기능 변화 등에 의해 발생한다⁶³⁾.

세포 내 ROS 등에 의한 자극이 발생할 경우, 미토콘드리아를 통해 cytochrome-*c*가 방출된다. 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome-*c*는 caspase-9과 함께 apoptosome을 형성하여 procaspase-3를 caspase-3로

활성화하며, DNA repair 및 세포증식에 관여하는 PARP의 절단(cleavage)를 통해 DNA 손상을 야기하여 apoptosis를 유도한다⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

이를 바탕으로 apoptosis 관련 단백질인 cleaved PARP, procaspase-9, procaspase-3, bcl-2의 변화를 immunoblot analysis를 통해 분석하였다. 결과적으로, AA + iron 처치로 유도된 apoptosis가 1.0 mg/mL UCP를 처치함으로써 억제되는 것을 알 수 있었다. 해당 결과들은 UCP가 apoptosis를 억제하여 cell death에 대한 간세포 보호 효과가 있음을 의미한다.

AA와 iron 병용 처치는 세포 내 ROS를 과도하게 축적 시키며, 이는 세포 내의 항산화 인자인 GSH와 ROS간의 불균형이 발생하여 산화적 스트레스 발생을 유도한다⁶⁷⁾. 또한 지속적인 ROS 생성은 세포 내의 미토콘드리아의 막 전위 저하가 나타나 apoptosis가 유도된다. 이를 바탕으로 HepG2 cell에 UCP를 전처치하였을 때, UCP는 AA + iron 처치로 인한 GSH 고갈 및 ROS 축적을 억제하였다. 또한 UCP를 전처치 한 경우, AA + iron 처치에 의한 MMP의 저하가 억제되었다. 이는 UCP가 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아의 막 기능 손상을 억제하여 세포 보호 효과가 있음을 알 수 있다.

선행연구에서는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하기 위한 방어 인자로 AMPK (AMP-activated protein kinase)가 제시되었다⁶⁸⁻⁷⁰⁾. 이를 바탕으로 UCP가 간세포를 보호하기 위해 AMPK를 매개하는지 확인하기 위하여, 화학적 AMPK inhibitor인 compound C를 전처치 하고 UCP와 AA + iron을 처치하였다. 실험 결과, UCP는 AMPK를 매개하여 세포를 보호하지 않음을 알 수 있었다(Data not shown). 따라서 UCP의 간세포 보호 효과는 AMPK의 활성화에 대한 관련성은 적을 것으로 생각되며, 다른 인자와 관련이 있을 것으로 판단되었다.

세포 내 항산화 관련 인자 발현을 유도하는 Nrf2의 활성화는 산화적 스트레스를 억제할 수 있다고 알려져 있다^{60,71)}. 활성화된 Nrf2는 Keap1 분자와 분리되어 세포질에서 핵으로 이동을 하고, 항산화 유전자 프로모터 영역인 ARE에 결합을 한다⁷²⁾. 해당 결합 이후, Sestrin2, NQO1, GCLC (glutamate cysteine ligase catalytic subunit), HO-1 (heme oxygenase-1)과 같은 항산화 관련 유전자들의 발현을 활성화 한다⁷³⁻⁷⁵⁾. 이를 바탕으로 본 연구에서는 UCP 처치로 인해 세포 내

Nrf2가 핵 내로의 이동이 증가하여 ARE와의 결합이 증가하였음을 규명하였다. 또한 Nrf2 활성화와 관련있는 항산화 유전자인 Sestrin2, HO-1, NQO1의 발현의 변화를 분석한 결과, UCP를 처치한 경우 해당 유전자들의 발현이 증가했음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 UCP의 Nrf2 활성화를 통해 항산화 유전자가 활성화되어 세포 보호 효과가 나타났음을 시사한다. 따라서 본 연구는 AA + iron 처치에 의한 산화적 스트레스로부터 UCP 처치로 Nrf2 활성화 유도를 통한 간세포 보호 효과를 규명하였다.

향후 Nrf2 관련 인자인 ERK, PI3K, Akt, GSK3등과^{76,77)} 하위 조절 인자인 GCLC, GCLM, GPx2, CXCR3-B, MRP^{78,79)} 등의 추가적인 연구가 필요하며, 또한 *in vivo* 연구에서도 UCP의 간보호 효능 및 기전이 확보되면 간질환 관련 후보 소재로써 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

AA와 iron의 병용처치로 유도된 산화적 스트레스에서 HepG2 cell에 대한 간세포 보호 효과를 규명하고자 하였다.

UCP는 AA + iron에 의해 유도된 HepG2 cell에서의 세포독성 및 apoptosis를 유의하게 억제하였다. 또한 UCP는 Nrf2 활성화에 의한 세포 내 항산화 관련 단백질의 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 UCP가 Nrf2 활성화를 통한 항산화 기전을 통해 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

Acknowledgement

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

References

1. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50–64.
2. Sadasivam N, Kim YJ, Radhakrishnan K, Kim DK. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and

- Liver Diseases. *Molecules.* 2022;27(10):3159.
3. Tanikawa K, Torimura T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol.* 2006;39(1):22–7.
4. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(25):8082–91.
5. Ihm SH. Oxidative Stress in Diabetes. *Korean Diabetes Journal.* 2001;22(3):249–52.
6. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22–8.
7. Santos JL, Quadros AS, Weschenfelder C, Garofallo SB, Marcadenti A. Oxidative Stress Biomarkers, Nut-Related Antioxidants, and Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2020;12(3):682.
8. Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol.* 2013;3(2):567–98.
9. Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(3):328–36.
10. Kim JH, Li L, Kim MS, Cho EJ, Kim HY. Protective Effects of Hesperidin and Hesperetin on Kidney Toxicity by Regulation of Antioxidant Activity in AAPH-induced Rats. *Journal of Agriculture & Life Science.* 2022;56(1):111–6.
11. Kumar V, Xin X, Ma J, Tan C, Osna N, Mahato RI. Therapeutic targets, novel drugs, and delivery systems for diabetes associated NAFLD and liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;176:113888.
12. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26087–124.
13. Zhang YJ, Yeager RL, Tanaka Y, Klaassen CD. Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicology and applied pharmacology.* 2010;245(3):326–34.
14. Son JW, Jung JY, Kim KY, Hwangbo M, Park CA, Cho IJ, Back YD, Jung TY, Kim SC, Jee SY. The

- Protective Activity of Soeumin Bojungykgi-tang Water Extract Against Oxidative Stress-induced Hepato-Toxicity. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2017;25(4):509-26.
15. Noh BK, Lee JK, Won YD, Park HJ, Lee SJ. The antioxidative effect of black garlic extract on paraquat-induced oxidative stress in ICR mice. *Korean journal of food science and technology*, 2011;43(6):760-5.
 16. Kwon OK, Kim SC, Byun SH, Lee DE. How to use 212 Herbal formulas. Jeonpagwagak publisher;Seoul. 2006. 241-3.
 17. Furukawa K, Tomita N, Uematsu D, Okahara K, Shimada H, Ikeda M, Matsui T, Kozaki K, Fujii M, Ogawa T, Umegaki H, Urakami K, Nomura H, Kobayashi N, Nakanishi A, Washimi Y, Yonezawa H, Takahashi S, Kubota M, Wakutani Y, Ito D, Sasaki T, Matsubara E, Une K, Ishiki A, Yahagi Y, Shoji M, Sato H, Terayama Y, Kuzuya M, Araki N, Kodama M, Yamaguchi T, Arai H. Randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial of Yokukansan for neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2017;17(2):211-8.
 18. Monji A, Takita M, Samejima T, Takaishi T, Hashimoto K, Matsunaga H, Oda M, Sumida Y, Mizoguchi Y, Kato T, Horikawa H, Kanba S. Effect of yokukansan on the behavioral and psychological symptoms of dementia in elderly patients with Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(2):308-11.
 19. Park W, Yoo DM, So JN. Effects of Ukgansan (Yokukansan in Japanese, Yigansan in chinese) on the Locomotor Velocity and Glutamate-Induce Paroxysm in Planarian. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 2014;29(1):67-71.
 20. Soraoka H, Oniki K, Matsuda K, Ono T, Taharazako K, Uchiyashiki Y, Kamihashi R, Kita A, Takashima A, Nakagawa K, Yasui-Furukori N, Kadowaki D, Miyata K, Saruwatari J. The Effect of Yokukansan, a Traditional Herbal Preparation Used for the Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, on the Drug-Metabolizing Enzyme Activities in Healthy Male Volunteers. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(9):1468-74.
 21. Ha DJ, Huh TY, Park SE. A Case Report of Essential Tremors Treated with Yeokhan-san. *J Int Korean Med*. 2021;42(5):1102-8
 22. Kim SM. Effects of Ukgan-san on the L-thyroxine-induced Rat Hyperthyroidism. *Oriental Physiology & Pathology*. 2012;26(5):679-86.
 23. Lee YJ, Suh WJ, Ha WJ, Kim SH, Lee HK, Cho KH, Moon SK, Jung WS, Kwon SW. A Case Report of Late Onset Chorea Hyperglycemia Basal Ganglia Syndrome using Yokukan-san. *J. Int. Korean Med*. 2020;41(3):523-30.
 24. Kim KS, Sung GK, Moon BS. An Experimental Study on the Antiepileptic Effects of Ukgansan. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 1998;19(1):57-72
 25. Chun JM, Choi G, Kim DS, Sung YY, Nho KJ, Kim SH, Kim HK. The Anti-obesity Effect of 5 Herbal Formulas in High Fat Diet Induced Obese Mice. *Herbal Formula Science*. 2013;21(2):44-52.
 26. Nogami-Hara A, Nagao M, Takasaki K, Egashira N, Fujikawa R, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Hatip FB, Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K. The Japanese Angelica acutiloba root and yokukansan increase hippocampal acetylcholine level, prevent apoptosis and improve memory in a rat model of repeated cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol*. 2018;214:190-6.
 27. Kim YJ, Jeong SJ, Seo CS, Lim HS, Sohn E, Yun J, Kim BY. Simultaneous Determination of the Traditional Herbal Formula Ukgansan and the In Vitro Antioxidant Activity of Ferulic Acid as an Active Compound. *Molecules*. 2018;23(7):1659.

28. Lee SG, Oh SC, Jang JS. Antioxidant Activities of Citrus unshiu Extracts obtained from Different Solvents. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 2015;28(3):458-64.
29. Kim YS, Jung JK, Park YK, Son KH. Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice. *The Korea Journal of Herbology*. 2011;26(3):1-6.
30. Do JR, Kim KJ, Cho JH, Kim YM, Kim BS, Kim HK, Lim SD, Lee SW. Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Medicinal Herbs. *The Korean Journal of Food SCI Technol*. 2005;37(2):206-13.
31. Park SH. The Tuber Extract of Pinellia ternata (Thunb.) Brei Suppresses Cancer Cell Migration by Regulating Tumor-associated Macrophages. *Physiol & Pathol Korean Med*. 2022;36(1):1-6.
32. Song JJ, Park YC. Effects of Pinelliae Rhizoma on immunocyte and cytokine production in asthma model mouse. *Korean Oriental Internal Medicine*. 2005;26(1):156-68.
33. Yoon SG, Kim HJ, Lee MJ. Effects of Pinelliae Rhizoma on the Obese Zucker Rats' Lipid of Blood Serum and Skeletal Muscles Fatty Acid Metabolism. *Korean Oriental Med*. 2006;27(2): 211-24.
34. Jung H, Sung W, Lee S, Son J, Han S. A clinical report of a patient with Tourett's disorder. *J. of Oriental Neuropsychiatry*. 2003;14(2):213-8
35. Chae IC, Jang JH, Seol IC, Kim YS, Park G, Yoo HR. Ukgansan Protects Dopaminergic Neurons against MPTP-Induced Neurotoxicity via the Nurr1 Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:7393557.
36. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1-2): 41-58.
37. Green DR. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis Part II: The BCL-2 Protein Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(6):a041046.
38. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis:an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(3):289-317.
39. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2005;37(11):719-27.
40. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1, 2-dithiole-3-thione congeners. *Mol Pharmacol*. 2009;75(1): 242-53.
41. Khan M, Yi F, Rasul A, Li T, Wang N, Gao H, Gao R, Ma T. Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation, and mitochondrial dysfunction. *IUBMB Life*. 2012;64(9):783-94.
42. Yin H, Zhou Y, Zhu M, Hou S, Li Z, Zhong H, Lu J, Meng T, Wang J, Xia L, Xu Y, Wu Y. Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion*. 2013;13(3):209-24.
43. Zhang S, Rao S, Yang M, Ma C, Hong F, Yang S. Role of Mitochondrial Pathways in Cell Apoptosis during Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2357.
44. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16(2):123-40.
45. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013;1(1):45-9.
46. Han X, Ding C, Zhang G, Pan R, Liu Y, Huang N, Hou N, Han F, Xu W, Sun X. Liraglutide ameliorates obesity-related nonalcoholic fatty liver disease by regulating Sestrin2-mediated Nrf2/HO-1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;525(4):895-901.
47. Aghagolzadeh P, Radpour R, Bachtler M, van Goor H, Smith ER, Lister A, Odermatt A, Feelisch M, Pasch A. Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via

- KEAP1/NRF2/NQO1 activation. *Atherosclerosis*. 2017;265:78–86.
48. Xue Ji. *Baoyingcuoyao*. Shanghai Ancient Books Publisher:Shanghai. 1991;95.
49. Peng HR. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions (Vol. 5)*. Beijing: Renminweisheng publisher. 1994;392.
50. Hwang DY. *Bangyakhappyeon*. Seoul: Namsandang. 1985;332.
51. Lee JH. *Illustrated Herbal Prescriptions for Diagnosis and Treatment*. Medical research publisher:Gwangju. 1989;501–4.
52. Hanioka H, Takino KS. *Pharmacy preparation—How to use 212 Kampo medicines*. Jihou:Tokyo. 2004;223–5.
53. https://www.tsumura.co.jp/english/products/pi/JPR_T054.pdf. Search date 2023.06.20.
54. Cho KH, Kim TH, Jin C, Lee JE, Kwon S. The Literary Trends of Herbal Prescription Ukgan-san and its Application in Modern Traditional Korean Medicine. *J Korean Med*. 2018;39(3):17–27.
55. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(4):385–91.
56. Pompeia C, Lima T, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct*. 2003;21(2):97–104.
57. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066–77.
58. Wu MY, Yiang GT, Lai TT, Li CJ. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3420187.
59. Kim JK, Jung JY, Park SM, Park CA, Ku SK, Byun SH, Cho IJ, Kim SC. Study of hepatoprotective effect of Haegan-jeon through activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and optimization of herbal composition based on molecular mechanism. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2018;26(3):207–21.
60. Jin HJ, Park SM, Kim EO, Kim SC. Hepatoprotective effect of Ikwiseungyang-tang via Nrf2 activation. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2021;29(4):167–79.
61. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021;125:73–120.
62. Fulda S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39:20–5.
63. Larson-Casey JL, He C, Carter AB. Mitochondrial quality control in pulmonary fibrosis. *Redox Biol*. 2020;33:101426.
64. Kalpage HA, Bazylianska V, Recanati MA, Fite A, Liu J, Wan J, Mantena N, Malek MH, Podgorski I, Heath EI, Vaishnav A, Edwards BF, Grossman LI, Sanderson TH, Lee I, Hüttemann M. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB J*. 2019;33(2):1540–53.
65. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):2000–16.
66. Henning RJ, Bourgeois M, Harbison RD. Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Toxicol*. 2018;18(6):493–506.
67. Kim KY, Lee SJ, Jee SY, Bae SJ, Son YR, Yun UJ, Bak SB, Song JK, Son TJ, Son JD, Kim WH, Yang JH, Park SD, Kim SC, Kim YW, Park KI. Cellular-protective effects of Nardotidis seu Sulculii Concha Extract against oxidative stress. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2021;29(2):71–80.
68. Kim DY, Park SM, Byun SH, Park CA, Cho IJ,

- Kim SC. Hepato-protective Effects of *Daucus carota* L. Root Ethanol Extract through Activation of AMPK in HepG2 Cells. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2018;26(4):329-40.
69. Song YR, Park SD, Kim YW. Effect of Bojungikgi-tang on cytochrome P450 and LKB1-AMPK anti-oxidant signaling pathway. *The Journal of Herbal Formula Science*. 2021;29(4):277-83.
70. Lee MS, Kim YH. Effects of quercetin on the improvement of lipid metabolism through regulating hepatic AMPK and microRNA-21 in high cholesterol diet-fed mice. *Journal of Nutrition and Health*. 2022;55(1):36-46.
71. Lee SH, Oh MH, Shin MR, Lee JH, Roh SS. Effect of Soshiho-tang on a Thioacetamide-induced Liver Fibrosis Mouse Model. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2021;42(6):1223-36.
72. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci*. 2022;291:120111.
73. Che X, Chai J, Fang Y, Zhang X, Zu A, Li L, Sun S, Yang W. Sestrin2 in hypoxia and hypoxia-related diseases. *Redox Rep*. 2021;26(1):111-6.
74. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J Adv Res*. 2021;34:43-63.
75. Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Y, Shen J, Zhu P, He Q, Zhao M. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiol Res Pract*. 2020;2020:5695723.
76. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4777.
77. Kong J, Kui H, Tian Y, Kong X, He T, Li Q, Gu C, Guo J, Liu C. Nephrotoxicity assessment of podophyllotoxin-induced rats by regulating PI3K/Akt/mTOR-Nrf2/HO1 pathway in view of toxicological evidence chain (TEC) concept. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023;264:115392.
78. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3143-53.
79. Zhu J, Wang H, Fan Y, Lin Y, Zhang L, Ji X, Zhou M. Targeting the NF-E2-related factor 2 pathway: A novel strategy for glioblastoma (Review). *Oncol Rep*. 2014;32(2):443-50.