



Original Article / 원저

나복자의 항산화 효과

박선빈¹, 강승호², 박광일^{3*}, 이원용^{1*}

¹동국대학교 한의과대학 방제학교실

²대구한의대학교 ³경상대학교 수의과대학 수의생리학

Antioxidant effect of *Raphani Semen* (*Raphanus sativus* L.)

Seon Been Bak¹, Seung-Ho Kang², Kwang-Il Park^{3*}, Won-Yung Lee^{1*}

¹School of Korean Medicine, Dongguk University

²Daegu Haany University

³Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : *Raphani Semen* (*Raphanus sativus* L.) is known for the various beneficial effects in Korean medicine. This study aimed to investigate the effect of *Raphani Semen* extract (RSE) against arachidonic acid (AA)+iron-induced oxidative stress in cells.

Methods : Ingredients, their target information, oxidative stress liver injury-related proteins was obtained from various network pharmacology databases and software. A hypergeometric test and enrichment analysis were conducted to evaluate associations between protein targets of RSE. The cell viability was assessed by MTT assay, and immunoblot analysis was used to confirm the molecular mechanisms.

Results : A compound-target network of RSE was constructed, which consisted of 336 edges between 18 ingredients and 123 protein targets. PI3K-Akt signaling pathway, ErbB signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, PPAR signaling pathway, and AMPK signaling pathway was significantly associated with protein targets of RSE. RSE protected HepG2 cells against AA+iron-induced oxidative stress as mediated with AMPK signaling.

Conclusion : RSE was found to protect the cells against oxidative stress via the AMPK signaling pathway.

Key words : *Raphani Semen*, Arachidonic acid, Iron, Oxidative stress, AMPK.

I. 서론

네트워크 약리학은 시스템 생물학의 방법론을 약물 기전의 탐색에 적용한 것으로, 새로운 약물 표적을 식별하고 적응증을 재창출할 수 있는 수단으로 부상하였다. 질병의 치료 표적과 약물표적을 고려한 상호 연결된 생물학적 네트워크를 연구함으로써, 네트워크 약리학은 단일 표적 기반 접근방식의 한계를 극복할 수 있는 새로운 관점을 제공하고 있다.

이러한 접근방식은 최근 복합성분으로 구성되어 인체 다중표적에 작용하는 한약의 시스템 수준의 기전을 규명하기 위하여 활용되고 있다. 제2형 당뇨병에 대한 황련해독탕의 효과¹⁾, 동충하초의 주요 성분중 하나인 cordycepin의 유방암에 대한 효과²⁾, 간세포암에 대한 반묘의 효과³⁾ 등이 다른실험기법과 네트워크 약리학을 기반으로 한약의 효능을 규명한 대표적인 그 예시라고 볼 수 있다. 또 다른 연구는 네트워크 기반 접근법을 활용하여 비알콜성 간염에 대한 후보 flavonoids를 제시하고 검증한 바 있다⁴⁾. 종합하면, 네트워크 기반 접근법은 다양한 질병의 치료를 위한 한약의 주요 메커니즘과 활성 화합물을 밝힐 수 있는 효율적인 접근방식이다.

간은 한의학적으로 오장 육부 중, 오장에 속하는 장기이고, 해부학적으로는 신체에서 가장 큰 기관 중 하나이며 신체에 필요한 다양한 에너지를 생성하고 저장함으로써 에너지 대사를 조절한다⁵⁾. 생리병리적으로는 많은 물질의 대사 및 체내로 들어오는 다양한 의약품 및 독성 물질에 대한 해독 작용에 관여한다. 반면 자가면역, 약물유도, 알코올성, 감염성, 선천성 대사성 간질환 등 병리학적으로 간기능이 저하된 경우에는 피로감, 식욕부진, 소화불량, 황달, 출혈경향 등의 증상이 나타날 수 있다. 이러한 대사 및 해독 작용으로 인하여 간은 염증반응과 산화적 스트레스에 꾸준히 노출되고 있다^{6,7)}.

나복자는 한의학에서 오랜기간 동안 사용해 온 한약

재의 일종이다. 최근 연구에서도 나복자는 이상지질 혈증, 당뇨, 폐렴 등 다양한 질환의 치료 효과에 대한 논문이 출판되어 오고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 본 연구에서는 나복자를 이용하여 네트워크 약리학적 분석을 실시하고, 이를 분자생물학적인 방법으로 검증하는 연구를 수행하고자 한다. 이러한 두가지 방법을 사용한 검증을 통하여 나복자의 새로운 효능을 발굴하고 분자적 기전을 밝힘으로써 한약의 과학적 증명이라는 목표를 달성하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 성분정보 파악

나복자의 성분정보는 네트워크 약리학 데이터베이스 중 하나인 TM-MC¹¹⁾를 활용하여 얻어졌다. TM-MC는 크로마토그래피 방식으로 검출할 수 있는 한약 성분에 대한 포괄적인 성분정보를 제공해주는 데이터베이스이며, 성분에 대한 정보를 표준 ID 중 하나인 pubchem ID를 제공해주는 특성이 있다. TM-MC에서 나복자(萊菔子, Raphani Semen)으로 검색한 결과 53종 성분이 확인되었다. 이후의 분석을 위하여, 성분에 대한 대표적인 표준 ID인 Pubchem ID가 존재한 45종 성분에 대한 79개의 PubChem ID가 표적 정보를 검색할 잠재적인 나복자의 성분으로 선택되었다.

2. 검증된 표적정보 파악

본 연구에서는 나복자 성분의 검증된 표적정보를 파악하기 위하여 Huang 등¹²⁾이 구축한 데이터 세트와 STITCH¹³⁾ 및 TTD¹⁴⁾ 데이터베이스를 활용하였다. Huang 등은 여러 데이터베이스를 종합하여 천연물에 대한 다양한 직접/간접 표적 정보를 정리하였다. STITCH는 문헌, 실험적 근거 등을 포함한 다양한 데이터베이스를 종합하여 40만개 이상의 성분에 대한 표적 정보를 통합 제공하는 데이터베이스이다. TTD는 알려진 표적정보, 질환의 관련된 표적 및 신호전달경로 등을 제공하는 종합 약학 데이터베이스이다. 단백질 명명체계의 통일을 위해, STITCH의 ensemble protein ID는 SYNGO¹⁵⁾를 활용하여 gene symbol로 변환되었다.

*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

*Corresponding author : Won-Yung Lee, School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.

Fax : +82-31-961-5835, E-mail : wonyung21@naver.com

•Received : February 14, 2023 / Revised : February 15, 2023 / Accepted : February 17, 2023



3. 성분-표적 네트워크 구축 및 시각화

나복자의 성분과 단백질 표적간의 관계는 성분-표적 네트워크 구축 및 분석되어 파악되었다. 성분-표적 네트워크는 이분 네트워크 (bipartite network) 중 하나로서, 네트워크를 구성하는 점인 노드(node)는 성분 혹은 단백질 표적을 의미하고, 성분과 표적간의 연결관계인 엣지(edge)는 성분-표적관계를 나타낸다. 나복자의 성분, 표적 및 이들간의 연결관계를 시각화하기 위하여 Cytoscape (version 3.8.2)가 활용되었다¹⁶⁾.

4. 산화적 간 손상 관련 단백질

산화적 간 손상과 관련된 단백질은 Cytoscape StringApp에서 STRING PubMed 쿼리를 사용하여 검색되었다¹⁷⁾. STRING Pubmed query 프로그램은 텍스트 마이닝 기술을 기반으로 사용자 정의 쿼리와 관련된 단백질 집합을 제시하는 플러그인이다. 검색어 '간 손상' AND '산화 스트레스'를 기반으로 산화적 간 손상과 관련된 잠재적인 단백질 세트를 확보하였다. 동시 발생 점수 (co-occurrence score)가 역치값 1보다 높은 유전자/단백질을 산화 스트레스와 관련된 간 손상 관련 단백질로 선택했습니다. 선택된 단백질은 후속 네트워크 분석을 위해 STRING 네트워크로 Cytoscape 로 가져온 후에 유전자 이름의 형태로 변환되었다.

5. Enrichment analysis

나복자 성분 표적에 대한 관련된 신호전달 경로는 통계적 분석 도구인 농축분석 (enrichment analysis)을 통해 확인되었다. 농축분석은 다른 두 종류의 표본들 간에 발현 값들의 차이가 통계적으로 유의미한지 평가하는 방법이다. 실제 분석은 Enrichr 프로그램을 파이썬 환경에서 활용할 수 있는 모듈인 gseapy를 활용하여 분석되었다. Enrichr은 gene ontology, kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 등을 활용하여 신호전달경로, 생물학적 기능과 같은 여러 유전자 세트를 대상으로 adjusted p-value, z-score, combined score와 같은 연관성을 계산해주는 소프트웨어¹⁸⁾. Combined score는 p-value의 역수에 로그를 취한 값과 z-score의 곱해 계산한 값으로, 통계적 검정력과 유의성을 동시에 고려할 수 있는 장점이 있다. 관련 신호전달 경로를 정리한 유전자 세트인 KEGG 분석시, organism system의 신호전달경로만을 고려하였다.

6. 재료

나복자 물추출물 (*Raphani Semen* water extract, RSE)는 나복자 100 g을 물 1.5 L에 넣어 3시간 동안 가열한 후 거즈로 여과시킨 후 0.2 μ m filter로 여과시켰다. 여과액을 rotary evaporator로 감압농축시키고, ultra-Low temperature freezer에 12시간 동안 동결시켰다. 이후 동결건조기를 이용하여 RSE를 얻었으며, -20°C에 보관하였고, 세포배양배지 (DMEM)에 녹여 사용하였다.

7. 시약

HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA), β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Penicillin Streptomycin, Fetal bovine serum (FBS)은 Welgene Inc.(Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA), ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA, iron), rhodamine 123 (Rh123) 등의 기재되어 있지 않은 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

8. 세포 배양

HepG2 cell은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입해, 두 종류 세포 모두 DMEM에 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지로 37°C, 5% CO₂ 환경의 incubator에서 배양하였다. 각 실험 전에는 12시간 동안 FBS를 포함하지 않은 DMEM으로 starvation을 시켰다.

9. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석법

HepG2 cell을 48 well plate에 6×10⁴ cells/well로 배양하여 진행하였다. 약물 단독처리에서는 RSE를 10, 30, 100, 300 μ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 항산화 실험에서는 RSE를 10, 30, 100, 300 μ g/ml의 농도로 AA 10 μ M을 함께 처리하고 12시간 동안 배양한 후 iron 5 μ M을 5시간 동안 처리하였다.

10. 면역염색법 (Immunoblot analysis)

HepG2 cell을 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 배양하여 진행하였다. RSE 300 $\mu\text{g/ml}$ 을 처치하고 기재된 시간동안 배양하고 진행하였다. ECL법을 사용하여 발색하였다.

11. 통계처리 (Statistical analysis)

실험 결과는 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 표시하였으며, Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

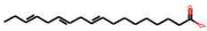
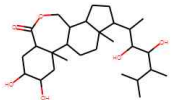


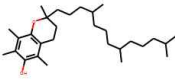





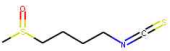
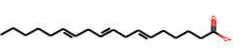


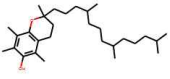

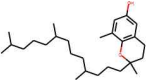
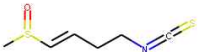
III. 결과

1. 나복자의 성분-표적 네트워크 구축

Symmap, Huang 등이 구축한 데이터 세트, TTD등

다양한 네트워크 약리학 데이터베이스를 활용하여 나복자의 성분과 실험적으로 검증된 표적을 파악하였다. 이들 정보들을 통합한 결과, 19종의 나복자에 대한 성분과 900종의 단백질 표적 사이의 1,113개의 성분-표적 정보를 확보하였다 (Table 1). 나복자의 표적 단백질 중에서는 PPARA, PPARD, FABP4, PPARG, CASP6, FABP3 등이 관련된 나복자의 성분 숫자(degree)가 가장 높았다 (각각 10, 9, 8, 8, 6, 6개). 반면, 777개의 단백질 표적의 경우 오로지 하나의 나복자 성분과 연관성이 있는 것이 발견되었다. 충분한 숫자의 나복자 성분과 관여하는 표적을 고르기 위해, 본 연구에서는 나복자성분에 대한 평균 degree(1.23) 보다 더 높은 수치를 보이는 123개의 단백질 표적을 핵심 표적으로 선택하여 이후 분석에 사용하였다.

Table1. Ingredient information of Raphani Semen.

Compound Name (Pubchem compound ID)	Compound Structure	Compound Name (Pubchem compound ID)	Compound Structure
9,12,15-Octadecatrienoic Acid (860)		Brassinolide (115196)	
Palmitic Acid (985)		Palmitoleic Acid (445638)	
DL-alpha-tocopherol (2116)		Oleic Acid (445639)	
Octadeca-6,9,12-Trienoic Acid (3453)		Elaidic Acid (637517)	
Stearic Acid (5281)		Linoleic Acid (5280450)	
Sulforaphane (5350)		Gamma-Linolenic Acid (5280933)	
Tetradecanoic Acid (11005)		Linolenic Acid (5280934)	
Vitamin E (14985)		Nervonic Acid (5281120)	
Delta-tocopherol (92094)		Sulforaphene (6433206)	



2. 산화적 간손상 단백질과의 연관성 및 관련 신호전달 경로 규명

나복자의 단백질 표적들과 산화적 간손상과의 연관성을 확인하고자 나복자에 대해 구축된 성분-표적 정보와 산화적 간손상 관련 단백질 사이의 중첩된 정도를 계산하였다. 중첩도 분석 결과, 123종의 나복자 표적 중에 19개의 표적이 간세포암종과 관련된 것을 확인하였다. 이 중첩도가 무작위 기대값 (random expectation)보다 유의미하게 차이나는지 확인을 위해 수행한 결과, 나복자의 표적 단백질이 간세포암종과의 중첩된 표적수가 무작위 기대값보다 14.23배 높은 것을 확인하였다

(P -value < 0.01). 이것은 나복자의 단백질 표적이 산화적 간손상 단백질 그룹과 유의미한 경향성을 보인다는 것을 나타낸다. 이후, enrichment analysis를 활용하여 나복자 단백질군이 어떠한 신호전달 경로와 관련되는지 평가하였다. 분석 결과, 170개의 유의미한 연관 term이 발견되었으며, 이들 중 PI3K-Akt signaling pathway, ErbB signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, PPAR signaling pathway, AMPK signaling pathway가 P -value가 가장 낮은 것으로 확인하였다 (Table 2).

Table2. Significant enrichment pathway by targets of Raphani Semen.

Term	Overlap	P-value (adjusted)	Combined Score	Genes
PI3K-Akt signaling pathway	21/354	3.24E-13	399.8	GSK3B;BAD;EPO;BDNF;NOS3;PTEN;THBS2;THBS1;RELA;MTOR;IGF1R;INS;THBS3;COMP;CASP9;RPS6KB1;MYC;EIF4EBP1;MAPK1;TLR4;TLR2
ErbB signaling pathway	11/85	1.26E-10	687.4	GSK3B;JUN;RPS6KB1;SRC;BAD;MYC;ABL1;EIF4EBP1;ABL2;MAPK1;MTOR
HIF-1 signaling pathway	11/109	1.44E-09	463.6	NOS2;RPS6KB1;EPO;NOS3;EIF4EBP1;MAPK1;TLR4;RELA;MTOR;IGF1R;INS
PPAR signaling pathway	9/74	9.87E-09	505.9	FABP1;FABP2;FABP3;FABP4;FABP5;DBI;PPARG;PPARA;PPARD
AMPK signaling pathway	10/120	3.45E-08	309.6	RPS6KB1;FASN;HNF4A;EIF4EBP1;PPARG;HMGCR;MTOR;IGF1R;INS;RAB11B

3. 성분-표적 네트워크 시각화

파악된 나복자의 성분, 표적, 그리고 관련된 신호전달 경로를 통합하여, 나복자에 대한 성분-표적 네트워크를 구축하고 시각화하였다 (Figure 1). 네트워크는 18종의 성분과 123개의 단백질 표적 사이의 336개의 성분-표적 관계로 구성되어 있다. 네트워크에서의 점은 나복자의 성분 혹은 단백질 표적을 나타내고, 이들 사이의 연

결은 나복자의 성분에 대해 실험적으로 검증된 단백질 표적을 나타낸다. PI3K-Akt signaling pathway, ErbB signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, PPAR signaling pathway, 및 AMPK signaling pathway과 관련된 단백질 표적의 갯수는 각각 21, 11, 11, 9, 10개로 확인되었다.

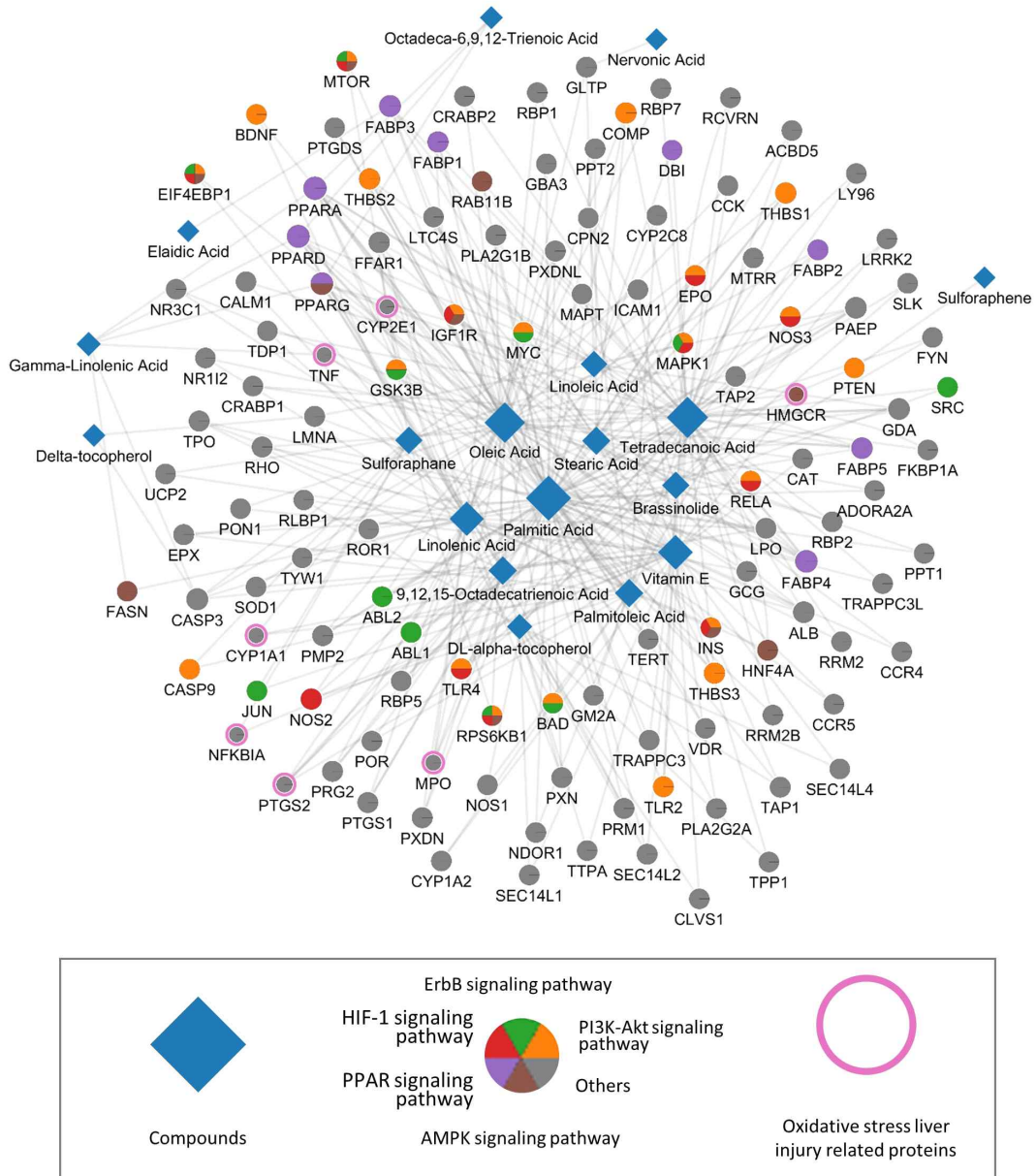


Fig. 1. Compound–target network for Raphani Semen. Circles and diamonds denote protein targets and compounds, respectively. The targets proteins related with oxidative stress liver injury–related proteins and signaling pathways are presented by border and body colors, respectively.

4. 간세포에 대한 RSE의 영향

본 실험에서 사용하는 RSE는 나복자 열수 추출물 활용하여 만들었다. RSE가 단독으로 처치시 간세포에 대해 독성을 가지는지 확인하기 위하여 MTT assay를 이

용하여 검증하였다. HepG2세포에 RSE를 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약물을 24시간동안 세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과, RSE는 세포 생존율에 영향을 주지 않았다.

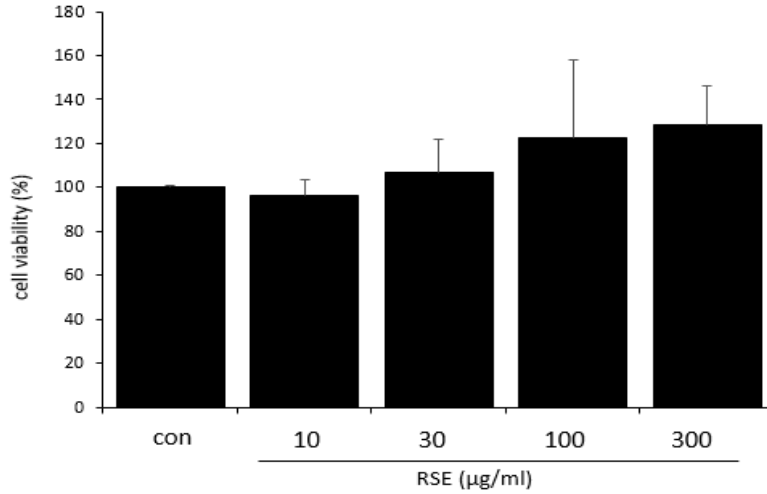


Fig. 2. The effect of *Raphani Semen* water extract on the hepatocyte.

MTT assay was assessed in the HepG2 cells treated with RSE 10, 30, 100 and 300 µg/ml. None of significant difference was observed comparing to control group.

5. AA+iron으로 유도한 산화적 스트레스에 대한 RSE의 세포보호효과

다음 실험으로 우리는 RSE의 항산화 효과를 관찰하기 위하여, AA+iron을 이용하였다. AA+iron 모델은 이미 다양한 약물의 항산화 효과를 검증하기 위하여 많이 이용되었다. HepG2 세포를 이용한 MTT 실험에서

AA+iron을 처리한 군에서 생존율이 급격히 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, RSE 100, 300 µg/ml의 농도로 전처리하였을 경우 AA+iron에 의해 유도된 세포 죽음은 감소되어, 유의적인 항산화 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

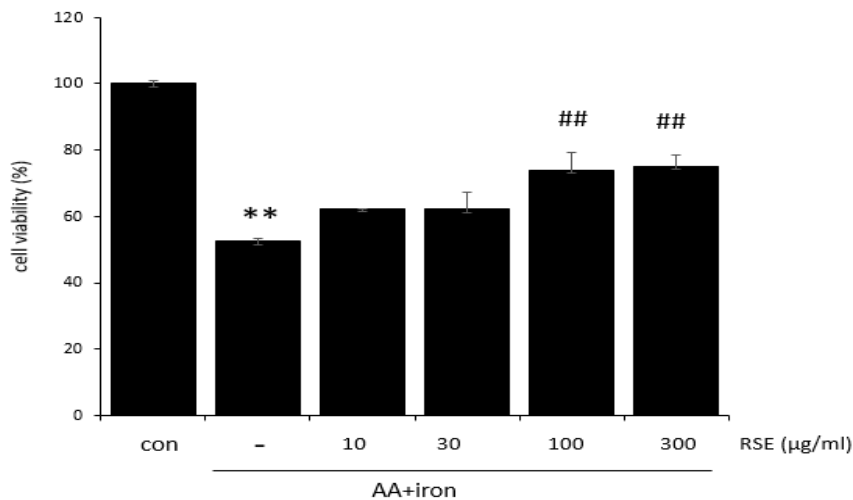


Fig. 3. The effect of RSE on the cell death induced by arachidonic acid (AA) + iron MTT assay was conducted to confirm the effect of RSE. HepG2 cells were treated with RSE (10, 30, 100, 300 µg/ml) and then AA (10 µM) + iron (5 µM) as described in Method section. **p<0.01: Control vs. AA+iron alone, ##p<0.01: AA+iron alone vs. RSE treated group.

6. RSE의 AMPK 활성화 효과

AMPK는 항산화 분자로 잘 알려져 있다. RSE가 AA+iron로 유도된 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과의 기전을 알아보기 위하여, AMPK 신호의 활성화 유무를 관찰하였다. RSE 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한

HepG2 세포를 관찰한 결과, RSE는 30분~6시간 동안 AMPK의 인산화를 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 AMPK의 활성화를 나타내는 것으로서, RSE의 항산화 효과가 AMPK 신호 의존적인 것을 알 수 있었다.

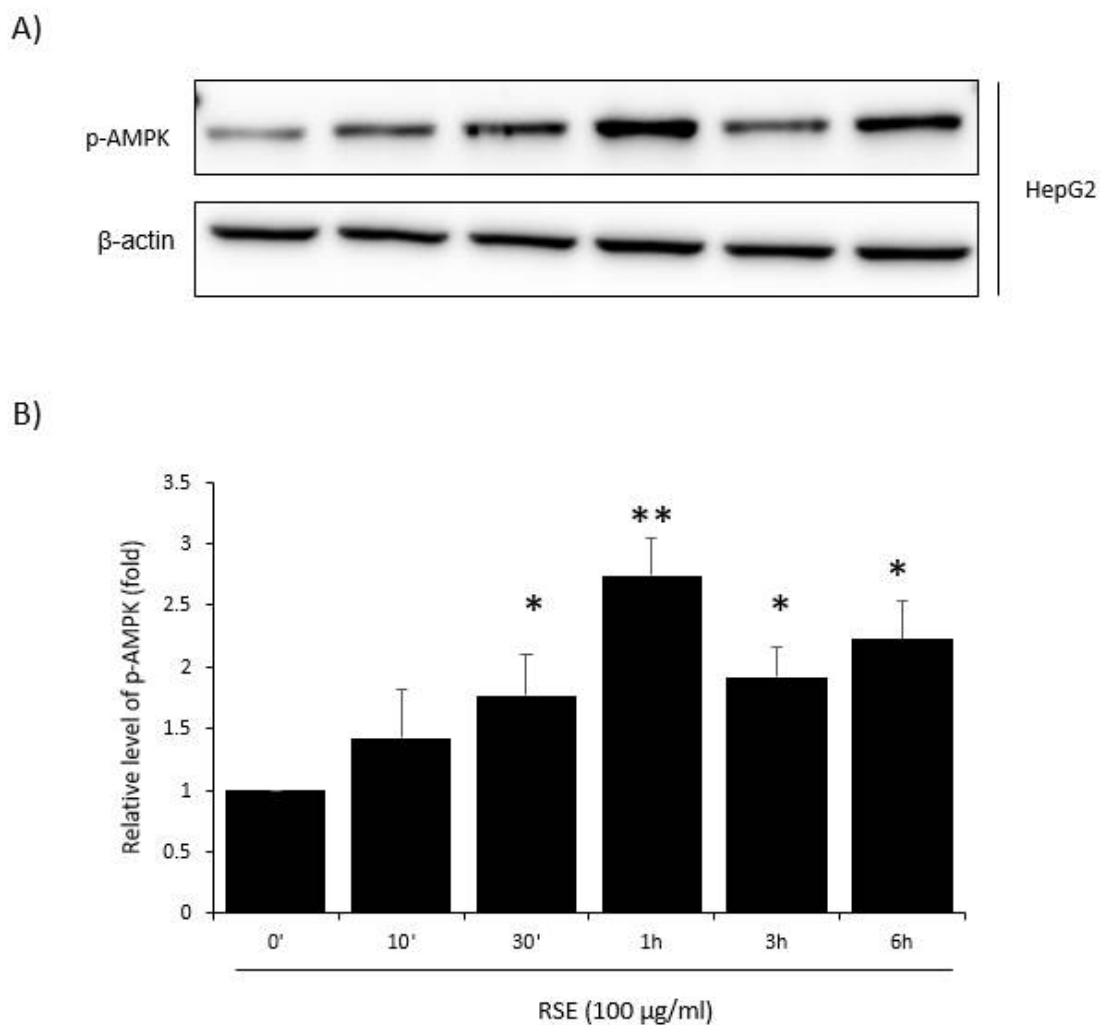


Fig. 4. The effect of RSE on the AMPK activation

(A) HepG2 cell was stimulated with RSE 300 $\mu\text{g/ml}$ for 10 minutes ~ 6 hour.

(B) Relative level of phosphorylation of AMPK. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$: Control vs. RSE group.



IV. 고찰

본 연구에서는 네트워크 약리학 기법과 *in vitro* 실험을 활용하여 산화적 간 손상에 대한 나복자의 효과와 핵심 기전을 규명하고자 하였다. 이를 위해, 나복자의 성분-표적 네트워크가 구축되었으며 산화적 간손상에 대한 단백질이 파악되었다. 이들 네트워크 구축을 통해 실험적으로 검증된 나복자의 성분과 표적 정보를 확보하였으며, 초기하테스트를 통해 나복자 성분의 표적들이 산화적 간손상과 유의미한 연관성을 가진다는 것을 확인하였다. Enrichment analysis 분석 결과는 나복자 성분의 표적들이 어떤 신호전달경로와 관련되는지를 규명하였다. MTT assay는 세포독성이 없는 유의한 RSE의 농도를 찾아냈으며, AA+iron 유도 산화적 스트레스 모델을 이용하여 RSE의 항산화 효과를 탐색하였다.

농축 분석결과를 통해 나복자 표적군에 대한 관련된 신호전달 경로는 모두 산화성 간 손상에서 역할을 하는 다양한 세포 과정을 조절하는 데 관여한다¹⁹⁾. 먼저, PI3K-Akt 경로는 세포 성장, 증식 및 생존을 조절하고 성장 인자 및 인슐린과 같은 자극에 의해 활성화된다. 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열의 수용체에 의해 활성화되는 ErbB 신호 전달 경로는 증식, 생존 및 분화와 같은 세포 과정을 조절하는 역할을 수행한다. HIF-1 신호 경로는 혈관 신생 및 산화 스트레스 반응에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 반면, PPAR 신호 경로는 지질 및 포도당 대사를 조절한다. AMPK 신호 경로는 대사 센서 역할을 하며 세포 에너지 항상성을 조절한다. 나복자가 이들 신호전달 경로와의 밀접한 연관관계를 보인다는 것은 나복자가 이러한 신호 경로의 조절을 통해 간 손상을 비롯한 다양한 질병의 발병에 관여할 수 있음을 나타낸다.

산화적 스트레스를 유발하는 반응성 산소종(ROS)은 병리학적 과정뿐만 아니라 생리학적 과정에서도 일련의 반응에 필요하다. 특히, ROS는 성장 촉진 또는 사멸, 침입하는 미생물에 대한 방어 시스템, 신호 전달 경로에서의 유전자 발현을 유발하여 주요 세포 구성 요소, 단백질, 지질 및 DNA에 영향을 미친다⁶⁾. 더욱이 간에서 심각한 산화 스트레스에 대한 급성 노출은 간세포 사멸과 염증을 초래한다고 알려져 있다⁷⁾. 따라서 간세포를 보호하고 각종 간질환을 예방하는 의약품 개발

하는 것은 간질환 치료에 중요한 전략이라고 할 수 있다. 본 연구에서 나복자는 AA+iron에 의해 유도된 산화적 손상을 방어하였다. 이러한 효능에 대한 기전으로 저자들은 AMPK를 제시하고 있다.

AMPK는 세포 보호의 핵심적인 역할을 하는 분자이다²⁰⁾. 예를 들어 지방산을 합성하거나 분해하는 과정을 조절하여 세포의 에너지 항상성을 유지하고, 간 지방 대사를 조절하는 데 중요한 역할을 한다²⁰⁾. AMPK가 활성화되면 인산화되어 하위 신호인 ACC를 인산화 시키고, 이를 통하여 항산화 유전자를 유도하고, 미토콘드리아 및 자가포식 경로를 조절하여 세포 보호 효과를 유발한다²¹⁻²³⁾. 따라서 AMPK는 산화 스트레스를 포함한 다양한 질병의 치료 약물 타겟으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 연구에서 RSE는 AMPK를 활성화 시키고, AA+iron에 의해 유도된 세포 죽음을 보호하는 효과를 나타내었다. 결론적으로, RSE는 시스템 및 분자 약리학에 의해 평가된 바와 같이 AMPK 경로 및 관련 단백질을 조절하는 것으로 밝혀져 AMPK를 활성화할 가능성을 시사한다.

V. 결론

종합하면, RSE는 AMPK 활성화를 통해 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효과를 가진다는 것을 시스템 및 분자약리학적 방법으로 확인하였다. 다만, 이러한 효과에도 불구하고, 더욱 심도 깊은 기전에 대한 후속연구도 추가된다면 의약품 개발에 한단계 다가갈 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgments

Bak SB would like to thank to the Ph.D.'s program of Dongguk University for completing the Ph.D. thesis through this work.

Funding

This work was supported by National Research Foundation (NRF) grant funded by Korea government (No. 2022R1I1A3053818).

References

1. Pan L, Li Z, Wang Y, Zhang B, Liu G, Liu J. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol.* 2020;258:112842.
2. Lee DH, Lee WY, Jung KW, et al. The inhibitory effect of cordycepin on the proliferation of MCF-7 breast cancer cells, and its mechanism: An investigation using network pharmacology-based analysis. *Biomolecules.* 2019;23(9):1-14. doi:10.3390/biom9090407
3. Kim YW, Bak SB, Baek SY, et al. Mylabris phalerata induces the apoptosis and cell cycle delay in HCC, and potentiates the effect of sorafenib based on the molecular and network pharmacology approach. *Mol Cell Toxicol.* 2022: 1-12.
4. Lee W-Y, Lee C-Y, Lee J-S, Kim C-E. Identifying candidate flavonoids for non-alcoholic fatty liver disease by network-based strategy. *Front Pharmacol.* 2022:1718.
5. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177.
6. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol WJG.* 2014;20(25):8082.
7. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J.* 2012;441(2):523-540.
8. Sham T-T, Yuen AC-Y, Ng Y-F, Chan C-O, Mok DK-W, Chan S-W. A review of the phytochemistry and pharmacological activities of raphani semen. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013.
9. Gao L, Li H, Li B, et al. Traditional uses, phytochemistry, transformation of ingredients and pharmacology of the dried seeds of *Raphanus sativus* L. (Raphani Semen), A comprehensive review. *J Ethnopharmacol.* 2022;294:115387.
10. Lee JR, Shin JH, Byun SH, et al. Anti-obese and hypolipemic effects of the aqueous extracts of Raphani semen in mice fed high fat diet. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2009;52:50-57.
11. Kim SK, Nam SJ, Jang H, Kim A, Lee JJ. TM-MC: A database of medicinal materials and chemical compounds in Northeast Asian traditional medicine. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):1-8. doi:10.1186/s12906-015-0758-5
12. Huang Y, Fang J, Lu W, et al. A Systems Pharmacology Approach Uncovers Wogonoside as an Angiogenesis Inhibitor of Triple-Negative Breast Cancer by Targeting Hedgehog Signaling. *Cell Chem Biol.* 2019;26(8):1143-1158.e6. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.05.004
13. Szklarczyk D, Santos A, Von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1):D380-D384. doi:10.1093/nar/gkv1277
14. Chen X, Ji ZL, Chen YZ. TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(1):412-415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752352> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC99057>.
15. Koopmans F, van Nierop P, Andres-Alonso M, et al. SynGO: an evidence-based, expert-curated knowledge base for the synapse. *Neuron.* 2019; 103(2):217-234.
16. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003. doi:10.1101/gr.1239303
17. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics data. *J Proteome Res.* 2018;18(2):623-632.
18. Kuleshov M V., Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016. doi:10.1093/nar/gkw377
19. Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic



- approaches. Saudi J Gastroenterol. 2012;18(3):155.
20. Ha J, Lee S. Role of AMPK in the regulation of cellular energy metabolism. J Korean Endocr Soc. 2010;25(1):9-17.
 21. Gasparrini M, Giampieri F, M Alvarez Suarez J, et al. AMPK as a new attractive therapeutic target for disease prevention: the role of dietary compounds AMPK and disease prevention. Curr Drug Targets. 2016;17(8):865-889.
 22. Alghamdi F, Alshuweishi Y, Salt IP. Regulation of nutrient uptake by AMP-activated protein kinase. Cell Signal. 2020;76:109807.
 23. STEIN SC, WOODS A, JONES NA, DAVISON MD, CARLING D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. Biochem J. 2000;345(3):437-443.
 24. Esquejo RM, Salatto CT, Delmore J, et al. Activation of liver AMPK with PF-06409577 corrects NAFLD and lowers cholesterol in rodent and primate preclinical models. EBioMedicine. 2018;31:122-132.