



Original Article / 원저

AMPK 활성화를 통한 중금속 유발 산화적 스트레스에 대한 비파엽의 세포 보호 효과

김민진¹, 김영은¹, 박선빈¹, 배수진¹, 박광일^{2,*}, 박선동^{1,*}, 김영우^{1,*}

¹ 동국대학교 한의과대학 방제학교실

² 경상대학교 수의과대학 생리학 실험실

Cytoprotective effect of *Eriobotrya japonica* L. against the iron-induced oxidative stress through AMPK activation

Min-Jin Kim¹, Young-Eun Kim¹, Seon Been Bak¹, Su-Jin Bae¹, Kwang-Il Park^{2,*},
Sun-Dong Park^{1,*}, Young Woo Kim^{1,*}

¹ AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL),
School of Korean Medicine, Dongguk University

² Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the cytoprotective effect of *Eriobotrya japonica* L. (EJ) extract against Arachidonic acid (AA)+iron-induced oxidative stress.

Methods : To confirm the cytoprotective effect of EJ against AA+iron-induced oxidative stress in HepG2 cells, it was evaluated by MTT assay, immunoblot analysis, and Calcein-AM/propidium iodide (PI) staining. Additionally, the mechanism of action of the cytoprotective effect was evaluated through molecular mechanisms.

Results : EJ (100 µg/mL) inhibited Arachidonic acid (AA)+iron-induced cell death in a concentration-dependent manner. It also inhibited AA+iron-induced mitochondrial dysfunction and ROS production. EJ activated the LKB1-AMPK signaling pathway.

Conclusions : In conclusion, EJ has the ability to protect liver cells from oxidative stress, indicating that it is related to AMPK-LKB1 signaling pathways.

Key words : *Eriobotrya japonica* L., oxidative stress, AMPK, hepatocyte

I. Introduction

간 손상은 약물 과다 복용, 스트레스, 과음 등 다양한 요인으로 인해 의학적, 과학적으로 문제가 늘어나고 있다¹⁾. 특히 독성 약물로 인한 간 손상에 대해 잠재적 위험이 우려되고 있다²⁾. 따라서 문제가 되는 약물과 간 손상 사이의 인과 관계를 확립하고, 부작용 없이 효과적으로 보호할 수 있는 약제 개발 노력이 필요하다. 이러한 이유로 국내외에서는 천연물의 항산화 기능과 간 보호 효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다^{3,4)}.

산화스트레스는 산화 시스템과 이를 방어하는 항산화 시스템 간에 균형이 심각하게 무너진 상태로, 간 질환, 대사 질환 등을 일으키는 주요 원인으로 알려져 있다⁵⁾. 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포에서 일반적으로 생성되는 부산물로, 산소를 포함하고 있어 세포 내의 분자와 쉽게 반응하는 불안정한 분자의 일종이다⁶⁾. 세포의 성장과 생존에 매우 중요하게 작용하기 때문에 항상성 유지가 매우 중요하다고 알려져 있다^{7,8)}. 산화스트레스는 ROS의 생산을 초래하는데, 과할 경우 DNA, 단백질, 지질 등을 산화시켜 에너지 대사 손실, 세포사멸 관련 신호전달 경로, 세포 기능 장애를 유발할 수 있다^{7,8,9)}. 선행연구에 따르면 간세포에서 천연물에 대한 항산화 및 미토콘드리아 기능 보호 효과에 대한 다양한 연구가 수행되고 있다^{10,11)}.

비파엽 (*Eriobotrya japonica* L., EJ)은 비파나무의 잎으로, 한의학에서 만성 기침에 쓰이는 한약재 중 하나이다¹²⁾. 예로부터 진해, 거담 또는 기관지염, 습진, 피부염에 효과가 있다고 알려져 있어 처방에 사용한다¹²⁾. 비파엽 추출물의 경우, 항염증, 항산화 효과에 대한

연구^{12,13)}가 이뤄지고 있지만, 간 질환과 관련된 기전은 명확하지 않다. 비파엽은 kaempferol, quercetin 등 다양한 생리 활성 물질이 포함되어 있어 연구가 활발히 이뤄지고 있다고 알려져 있다^{12,13)}.

본 연구는 비파엽 추출물이 잠재적인 개발 물질로의 가능성이 있다고 판단하여, 간세포에서의 항산화 효과에 집중하였다. HepG2 세포에 아라키돈산 (Arachidonic acid, AA)+iron 유도로 인한 산화스트레스에서 비파엽의 간세포 보호 효과 및 작용 기전의 분자 메커니즘을 확인하고자 한다.

II. Materials & Methods

1. Reagents

anti-phospho-LKB1, anti-phospho-AMPK α , anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC), anti-phospho-YAP associated protein (YAP), anti-phospho-LATS1, anti-Bcl-xL, anti-caspase3는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit와 anti-mouse IgG는 Enzo Life Sciences (Enzo, USA)에서 구입하였으며, anti- β -actin는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Rhodamine 123 (Rh 123), arachidonic acid (AA), ferric nitrilotriacetic acid (iron), Calcein-AM, propidium iodide (PI)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

*Corresponding author : Young Woo Kim, AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL), School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.
Tel : +82-31-961-5823, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : ywk@dongguk.ac.kr

*Corresponding author : Sun-Dong Park, AI-Bio Convergence DDI Basic Research Laboratory (BRL), School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.
Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

*Corresponding author: Kwang Il Park, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.
Tel : +82-53-940-3877, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

•Received : January 31, 2024 / Revised : February 6, 2024 / Accepted : February 19, 2024



2. Preparation of *Eriobotrya japonica* water extracts (EJ)

*Eriobotrya japonica*은 물추출 후, 거즈로 1차 여과한 후, 원심 분리하였다. 이후 상층액을 취하여 0.22 μm filter로 2차 여과하여 사용하였다¹¹⁾. 여과액은 동결건조하여 얻었으며, -20°C 에 보관하고 3차 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

3. Cell culture and treatment

인간 유래 간세포 암종 세포주 HepG2 세포 및 Huh7 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다¹¹⁾. 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 및 RPMI 1640 배지에서 37°C , 5% CO_2 환경에서 배양하였으며, 배지는 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin이 함유되었다.

4. MTT assay

HepG2 세포는 48 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 후, 10% FBS가 없는 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 10 μM AA와 EJ와 함께 12시간 배양하였으며, 5 μM iron과 함께 3시간 동안 배양하였다¹¹⁾. 이어서, 세포를 0.25 mg/mL MTT와 함께 1시간 동안 배양하고, formazan crystals을 200 μL 의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 용해하였다. 흡광도는 ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

5. Measurement of ROS production

HepG2 세포에서 세포 내 ROS 생산을 정량화하기 위해 DCFH-DA를 사용하였다. HepG2 세포는 96 well plate에 1×10^4 cell/well로 분주한 후, 10% FBS가 없는 배지에서 12시간 동안 배양한 후 측정하였다¹¹⁾.

6. Immunoblot analysis

HepG2 세포와 Huh7 세포는 6 well plate에 8×10^5 cell/well로 분주한 다음 24시간 후, FBS가 없는 배지로

교환하였다. 이후, 시간별 (0, 10', 30', 1h, 3h, 6h)로 EJ를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처치하였으며, 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 Chemi-luminescence Bioimagingprogram을 이용하여 Quantification analysis를 실시하였다¹¹⁾.

7. FACS analysis of mitochondrial membrane potential (MMP)

HepG2 세포는 6 well plate에 8×10^5 cell/well로 분주한 다음 24시간 후, FBS가 없는 배지로 교환하였다. 추출물과 시약은 이전에 설명한 대로 처리하였으며, MMP는 Rho 123으로 1시간 동안 염색한 후 유동 세포 분석을 이용하여 측정하였다¹¹⁾.

8. Calcein-AM/propidium iodide (PI) staining

Live/dead 세포를 분석하기 위해 HepG2 세포를 설명된 대로 처리한 후 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Calcein-AM 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI로 염색하였다. 이어서, 세포를 30분 동안 배양하고 형광현미경(Nikon)으로 검사하였다.

9. Statistical analysis

실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 값으로 나타냈다. 통계 처리를 사용하여 유의성을 나타내었다.

III. Results

1. Effects of *Eriobotrya japonica* (EJ) on HepG2 cell viability.

AA+iron에 의해 유도된 세포 사멸에 대한 EJ의 세포 보호 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였다. 그 결과, AA+iron 유도로 인한 세포사멸은 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도 의존적으로 유의하게 회복하였다. 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 생존율은 대조군에 비해 유의적으로 회복하였다. 본 결과에 따라 이후 진행하는 AA+iron 유도 산화스트레스의 보호 효과에서 EJ의 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 결정하여 진행하였다 (Fig. 1).

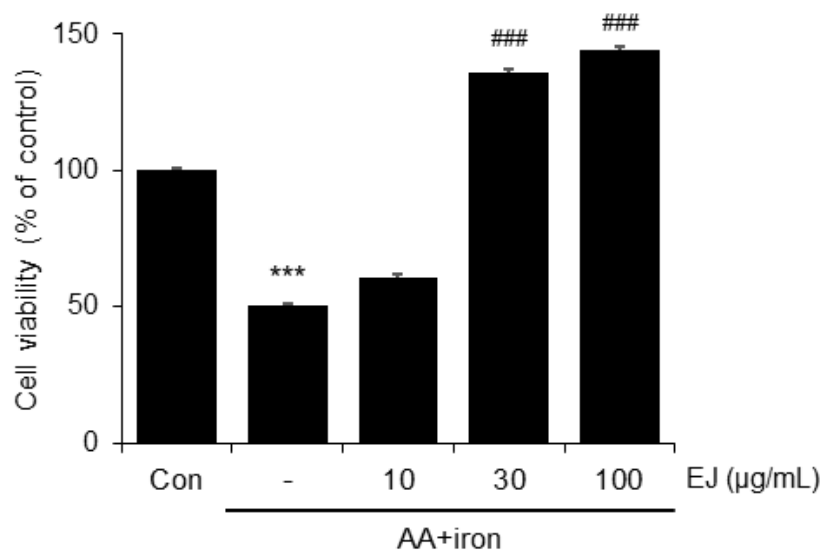


Fig. 1. MTT assay. Cell viability was assessed using an MTT assay. HepG2 cells were treated with Arachidonic acid (AA) (10 μ M) for 12h, followed by iron (5 μ M) for 3h. *Eriobotrya japonica* (EJ) (10, 30, 100 μ g/mL) was pretreated with AA. The data represent the means \pm S.D. of replicate experiments at least three times. Significance of statistical differences between each treatment group and the vehicle-treated control group (***, $p < 0.001$) and AA+iron-treated control group (###, $p < 0.001$) were verified.

2. Effect of EJ on AA + iron-induced cell death in HepG2 cell.

AA+iron에 의해 유도된 세포 사멸에 대한 EJ의 세포 보호 효과를 확인하기 위해 Immunoblot analysis와 Calcein-AM 및 PI 염색을 진행하였다. AA+iron에서 세포 사멸 과정의 신호전달경로에 주도적 역할을 하는 Caspase-3와 Bcl-xl의 단백질 발현은 감소하였으며, EJ는

이를 현저하게 억제하였다 (Fig. 2A). 사멸된 세포와 건강한 세포를 확인하기 위해 Calcein-AM 및 PI 염색을 진행한 결과, 막 투과성이 없는 세포의 경우 적색광이 띄는 원리로 인해 AA+iron에서 적색광이 띄었으며, EJ는 이를 현저하게 억제하였다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 EJ가 AA+iron 유발 세포사멸을 유의하게 억제했음을 나타낸다.

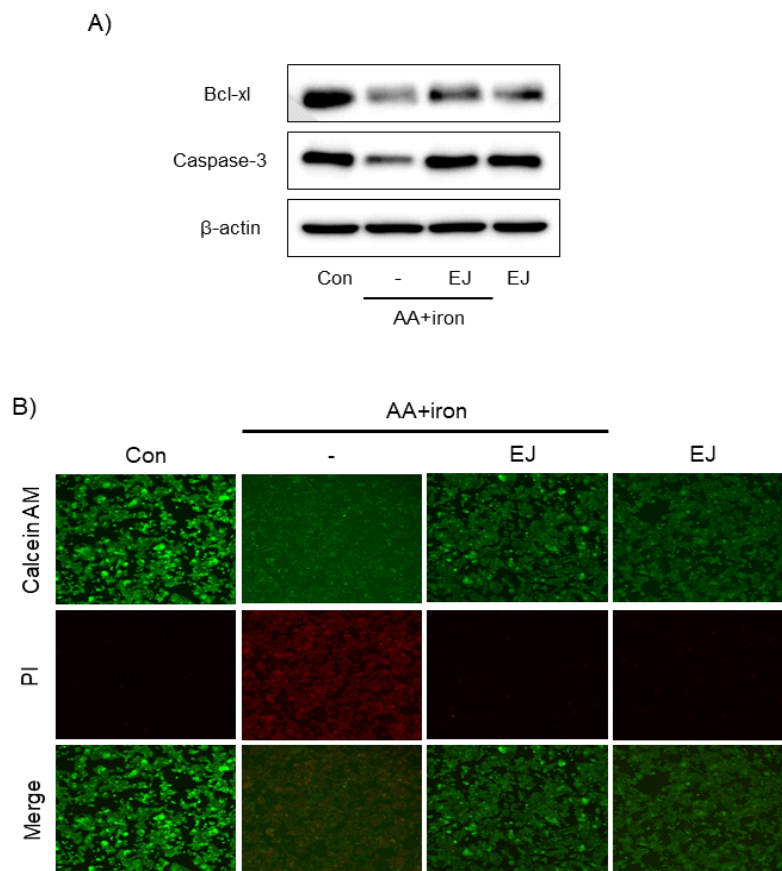


Fig. 2. Effect of EJ on AA + iron-induced cell death in HepG2.(A) Immunoblotting of cell death-related protein, Bcl-xl, caspase 3. HepG2 cells were treated with AA (10 μ M) for 12 h, followed by iron (5 μ M) for 3 h. EJ (100 μ g/mL) was pretreated with AA. (B) Fluorescence image of HepG2 cells using calcein-AM/PI staining. HepG2 cells were treated with AA (10 μ M) for 12 h, followed by iron (5 μ M) for 3 h. EJ (100 μ g/mL) was pretreated with AA. HepG2 cells were stained with 0.5 μ g/mL calcein-AM and 0.5 μ g/mL PI and incubated for 30 min.

3. Effect of EJ on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction and ROS production.

AA + iron에 의한 미토콘드리아 기능 장애 및 ROS 생성에서 EJ의 세포 보호 효과를 확인하였다. 미토콘드리아는 산화 스트레스 작용에 중요한 역할을 하는 세포 소기관이다. mitochondrial membrane potential (MMP)에 대한 EJ의 효과는 Rh 123을 사용하여 flow

cytometry으로 측정하였다. 선행 연구결과에서와 같이 AA+iron로 인해 미토콘드리아 세포막의 기능 저하를 유도하여 Rh 123 negative cell의 증가를 확인하였으며, EJ는 이를 현저하게 억제하였다 (Fig. 3A). AA+iron는 ROS 생성을 증가시켰으며, EJ는 AA+iron으로 인한 ROS 생성을 유의한 수준으로 감소시켰다 (Fig. 3B).

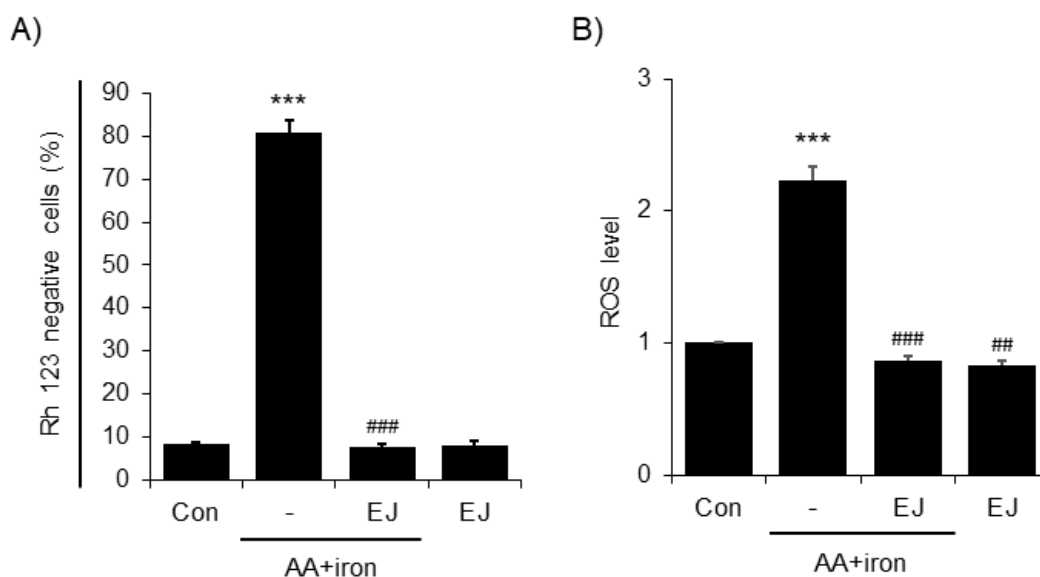


Fig. 3. Effect of EJ on AA+iron-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in HepG2 cell. (A) FACS analysis of Rho 123 staining. HepG2 cells were treated with AA (10 μ M) for 12h, followed by iron (5 μ M) for 3h. EJ (100 μ g/mL) was pretreated with AA. The cells were incubated with Rho 123 (0.05 μ g/mL) for 1h after the iron treatment. (B) ROS production measurements. The cells were incubated with DCFH-DA (10 μ M) for 30 min after iron treatment. The data represent the means \pm S.D. of replicate experiments at least three times ($***p < 0.001$ vs. control group; $##p < 0.01$, $###p < 0.001$ vs. AA+iron-treated group).

4. Effect of EJ on LKB1-AMPK signaling pathway in hepatocytes.

AA+iron에 의한 산화적 스트레스에 EJ이 나타내는 세포 보호 효과의 작용 기전을 확인하기 위해 Immunoblot analysis를 진행하였다. EJ 또한 선행연구에서와 같이 AA+iron로 인한 산화 스트레스 조절에 중요한 역할을 하는 LKB1-AMPK 신호전달 경로의 활성화를 확인하였다. HepG2 세포에서 100 μ g/ml의 농도의 EJ를

시간에 따라 처치한 결과 p-LKB1의 발현이 10분에서 증가하였으며, p-AMPK의 발현은 3시간에서 유의하게 증가하였다. AMPK 활성화에 의해 인산화되는 잘 알려진 하위 표적인자인 ACC의 인산화 역시 3시간 이후에서 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A). Huh7 세포에서 p-LKB1은 10분에서, p-AMPK은 3시간에서, ACC은 10분에서 발현이 증가하였다 (Fig. 4B).

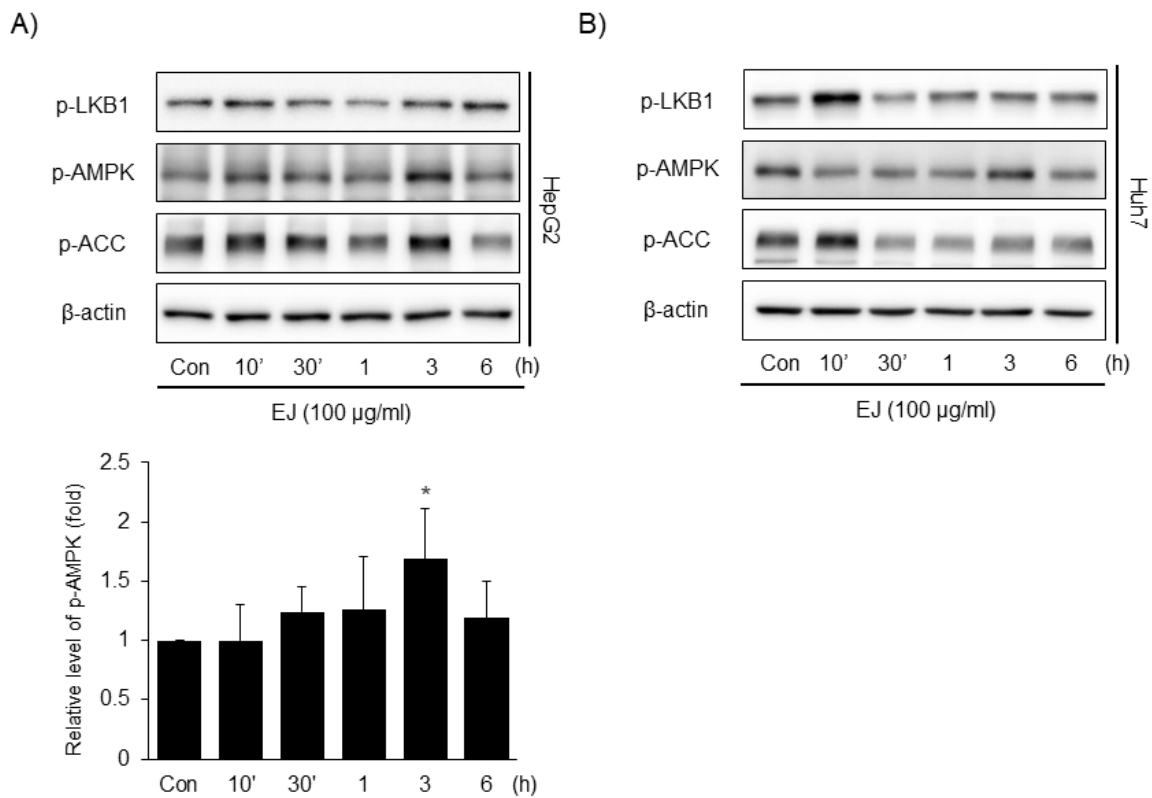


Fig. 4. Immunoblot analysis for key signaling proteins of LKB1-AMPK signaling pathway molecules in (A) HepG2 cell and (B) Huh7 cell. HepG2 cell and Huh7 cell were incubated with EJ (100 μ g/mL) for indicated periods. β -actin was used as a loading control. The graph shows relative protein levels in HepG2 cells. The data represent the means \pm S.D. of replicate experiments at least three times (* $p < 0.05$ vs. control group).

5. Effect of EJ on Hippo-YAP signaling pathway in hepatocytes.

선행연구에 따르면 Hippo-YAP pathway는 산화적 스트레스와 관련 있는 것으로 보고되고 있다. 산화 스트레스 유발 신호를 매개하는 전사 활성 인자로 알려져 있는 YAP과 관련 단백질인 LATS1의 인산화를 추가로

확인하였다. HepG2 세포에서 EJ 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 시간에 따라 처치한 결과 YAP의 상위 표적 인자인 LATS1과 YAP의 인산화가 대조군에 비해 점차 증가하였다 (Fig. 5A). 마찬가지로 Huh7 세포에서 p-LATS1은 10분에서, p-YAP은 1시간에서 발현이 증가하였다 (Fig. 5B).

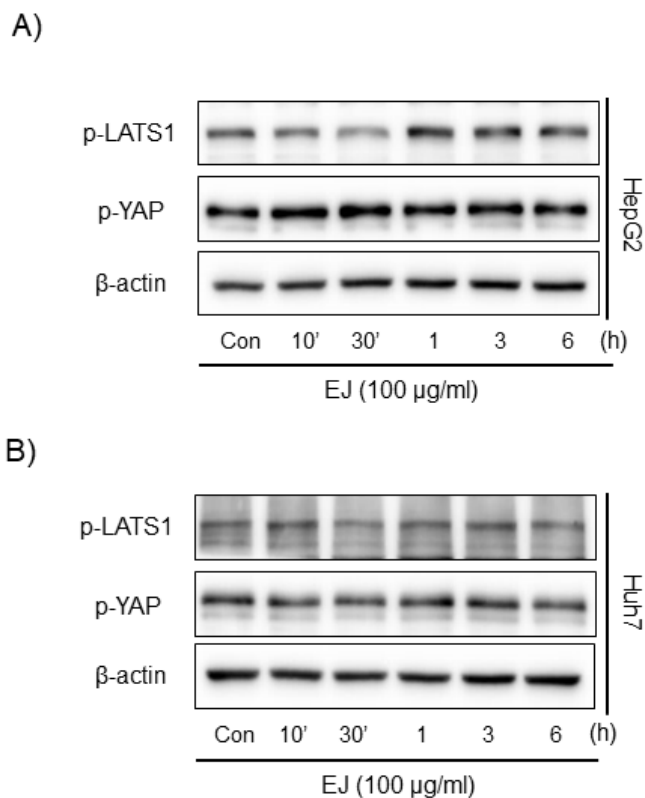


Fig. 5. Immunoblot analysis for key signaling proteins of YAP signaling pathway molecules in (A) HepG2 cell and (B) Huh7 cell. HepG2 cell and Huh7 cell were incubated with EJ (100 $\mu\text{g/mL}$) for indicated periods. β -actin was used as a loading control.



IV. Discussion

간세포 손상 관련 선행연구에 따르면, AA와 iron의 병용 처치는 시너지 효과를 나타내어 산화스트레스 유발 모델로 사용한다^{14,15}. 아라키돈산(AA)은 잘 알려진 염증성 지방산으로, 미토콘드리아 기능 장애를 유도하고 세포 ROS 생성을 촉진하여 세포사멸을 일으킨다^{14,15,16}. 철(iron)은 신체의 산소 운반에 필수적인 금속이며 인간의 간, 비장 등에 저장된다¹⁴. 하지만 세포나 장기조직에 과도한 양이 축적되면 염증 상태 유발, 세포 사멸 등이 일어난다¹⁴. 이뿐만 아니라 AA 방출을 촉진하고, 간 조직 손상을 일으키며, 산화스트레스를 강화시킨다^{14,15,16}. 선행연구에 따르면 철의 촉매작용으로 인해 AA는 산화스트레스를 증가시키고 ROS 매개 미토콘드리아 기능 장애 및 미토콘드리아 막 투과성 전이를 효과적으로 약화시킨다¹⁴. 이처럼 AA+iron 유도로 인한 산화스트레스 모델은 간 질환 치료할 수 있는 항산화 약물을 스크리닝 하는 데 적합하다. 본 연구에서는 AA+iron 유도로 인한 산화적 스트레스에 대한 EJ의 세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과 EJ가 농도 의존적으로 세포 생존율이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). FACS analysis를 이용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정한 결과, EJ는 AA+iron 유도로 인한 미토콘드리아 막 전위 하락을 억제하였으며 (Fig. 3A), ROS 생산은 이를 통해 EJ이 AA와 철에 의해 유도되는 세포 독성 및 미토콘드리아 기능 장애로부터 보호할 수 있다는 것을 시사하였다.

세포의 생존과 사멸은 신호전달 경로와 분자 간의 상호작용을 통해 발생하는 것이 특징이다¹⁷. 잘 알려진 세포 사멸 과정은 자가 사멸 세포 사멸 (apoptotic cell death)이 있으며, caspase의 활성화로 인해 세포 골격에 영향을 주는 과정으로 진행된다^{18,19}. 그중 caspase-3는 주로 세포 단백질의 특정 부위를 절단하는 데에 작용한다^{18,19}. 의학 연구 분야에서 caspase-3는 조직 분화, 재생 및 신경 발달에 직접적인 역할을 통해 세포사멸 관련 질환을 치료하는데 주목받고 있다²⁰. caspase-3의 활성화 경로는 미토콘드리아 시토크롬 C 방출 및 caspase-8 활성화로 만들어진 복합체가 caspase-3을 절단하여 세포사멸이 시작된다^{21,22}. Bcl-xl은 세포사멸에 중요한 인자로, 시토크롬 C 방출을 방지하여 항 세포사멸 과정으로 작용한다²³. 본 연구에서 caspase-3와 Bcl-xl을

immunoblot으로 분석한 결과 AA+iron 유도로 인해 발현이 줄어들었으며, EJ는 이를 회복했다 (Fig. 2A).

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 에너지 상태를 모니터링하고 에너지의 균형을 조절하는 에너지 센서이다²⁴. 이전 연구에서 AMPK는 활성산소종에 의해 유도된 산화스트레스 등에 활성화된다고 알려져 있다^{10,14,24}. LKB1 (Liver Kinase B1)은 AMPK의 상위 표적 인자로 인산화를 통해 AMPK를 활성화한다. 이처럼 LKB1-AMPK 신호전달 경로는 에너지 및 대사 스트레스 조건에서 세포 보호와 관련된 신호전달 경로 연구에서 중요하게 쓰인다²⁴. 산화스트레스에 대한 EJ의 보호 효과가 LKB1-AMPK 신호전달 경로에 영향을 미치는지 확인하기 위해 immunoblot analysis를 진행하였다. EJ를 HepG2 세포와 Huh7 세포에서 시간별(0, 10', 30', 1h, 3h, 6h)로 처치한 결과, p-LKB1의 발현이 증가함에 따라 p-AMPK 활성화가 유도되었으며, 잘 알려진 하위 표적 인자인 ACC가 뒤따르는 것으로 확인하였다 (Fig. 4). 또한 산화 스트레스 유발 신호를 매개하는 것으로 알려진 YAP, LATS1의 인산화가 증가하였다 (Fig. 5).

본 연구는 선행연구에서 보인 비파엽 추출물의 항산화, 항염 효과^{12,13}에서 더 나아가 간세포에서 항산화 효과를 확인하였다. 이것을 통해 비파엽 추출물이 잠재적인 재발 물질로의 가능성이 있다고 판단하였다.

V. Conclusion

본 연구에서 AA+iron 유도를 통한 세포 독성, 미토콘드리아 기능 장애 및 ROS 생산을 확인하였으며, 이에 대한 억제를 통해 EJ의 세포 보호 효과를 나타내었다. 특히 LKB1-AMPK 신호전달 경로와 관련 분자의 인산화를 매개하여 세포 보호 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 EJ의 항산화를 통한 간 보호 효과를 시사한다.

Acknowledgments

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (number: HF20C0212). This work was also supported

by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea Government [MSIT] (RS-2023-00218419) (NRF-2022R1I1A3053818) (2022R1A2C1092168).

References

1. Park YC, Park HM, Lee SD. Inducible Mechanisms for Hepatotoxicity caused by Traditional Korean Medicines in a view of Toxicology. *Journal of Korean Medicine*. 2011;32(4):48-67.
2. Kim DJ. Review : The Assessment of Toxic Liver Injury. *Korean Journal of Gastroenterol*. 2009;53(1):5-14.
3. Yang YM, Hyun JW, Lim KH, Sung MS, Kang SS, Park WH, et al. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (III). *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1996;27:105-110.
4. Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, et al. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The Oncologist*. 2000;5(2):108-114.
5. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav U. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*. 2016;148:183-193.
6. Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) sap. *Korean Journal of Food Preservation*. 2008;15(1):105-110.
7. Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Molecular aspects of medicine*. 2005;26(4-5):299-312.
8. Lim DG. Oxidative stress; reactive oxygen species and nitric oxide. *Acute and Critical Care*. 2004;19(2):81-85.
9. Kang SW. Role of reactive oxygen species in cell death pathways. *Hanyang Medical Reviews*. 2013;33(2):77-82.
10. Jang MH, Seo HL, Kim SC, Kim YW. Effect of *Prunellae Spica* on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Hepatocyte. *J Physiol and Pathol Korean Med*. 2016;30(1):20-26.
11. Seo HL, Lee JH, Jang MH, Kwon YW, Cho IJ, Kim KJ et al. Mitochondria protection of *Sparganii Rhizoma* against oxidative stress in hepatocytes. *Herbal Formula Science*, 2015;23(2):15-22.
12. Bae YI, Seo KI, Park SK, Shim KH. Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Leaf Tea Processing and Its Physicochemical Properties. *Korean Journal of food preservation*. 1998;5(3):262-269.
13. Kim SJ, Park JO, Park SN. Antioxidative Effect and Component Analysis of *Eriobotrya japonica* Leaf Extracts. *Journal of the Soc. Cosmet. Sci. Korea*. 2012;38(1):57-65.
14. Choi HY, Jeggal KH, Kim YW, Lee JW, Jo SA, Cho IJ, et al. Cytoprotective effects of *Artemisia princeps* extract through inhibition of mitochondrial dysfunction. *Herbal Formula Science*. 2013;21(2):63-71.
15. Jang EH, Kim SC, Cho IJ, Kim YW. *Akebiae Caulis* inhibits oxidative stress through AMPK activation. *Journal Physiol and Pathol Korean Med*. 2015;29(1):18-26.
16. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006;1761(4):385-391.
17. Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R. Oxidative damage and antioxidant defense in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8, 586578.
18. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2008;37(3):269-275.
19. Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* Extracts on Proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Journal of Korean Soc. Food Sci Nutr*. 2003;32(2):217-222.
20. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O,



- Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2022;69(4): 1633–1645.
21. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*. 1999;6(2):99–104.
22. Li M, Wang D, He J, Chen L, Li H. Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacological research*. 2020;151:104547.
23. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *The FEBS journal*. 2011;278(3): 403–413.
24. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):251–262.