

## 아라키돈산과 철 유도성 산화적 스트레스에 대한 金櫻子 열수 추출물의 간세포 보호 효능

고해리<sup>#</sup>, 제갈경환<sup>#</sup>, 송시연, 김난이, 강지원, 변성희, 김영우, 조일제, 김상찬<sup>\*</sup>

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

### Water Extract of *Rosa laevigata* Michx. Protects Hepatocytes from Arachidonic Acid and Iron-mediated Oxidative Stress

Hae Li Ko<sup>#</sup>, Kyung Hwan Jegal<sup>#</sup>, Si Yeon Song, Nan Ee Kim, Jiwon Kang,  
Sung Hui Byun, Young Woo Kim, Il Je Cho, Sang Chan Kim<sup>\*</sup>

Department of Herbal Formula, College of Korean Medicine, Daegu Haany University,  
Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Rosa laevigata* Michx. has been used for the treatment of renal disease in traditional Korean medicine. In this study, we investigated cytoprotective effect of *R. laevigata* water extract (RLE) against oxidative stress induced by arachidonic acid (AA) + iron.

**Methods** : To evaluate the protective effects of RLE 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 effects of RLE on reduced glutathione level, production of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential were also monitored. Furthermore, to verify underlying molecular mechanism, NF-E2-related factor 2 (Nrf2) was examined by immunoblot analysis. Additionally, Nrf2 transactivation and its downstream target genes expression were also determined by reporter gene and realtime RT-PCR analyses.

**Results** : RLE pretreatment (30-300 µg/ml) prevented cells from AA + iron-mediated cell death in a concentration dependent manner. In addition, 100 µg/ml RLE inhibited AA + iron-induced glutathione depletion, reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. RLE accumulated nuclear Nrf2 and also transactivated Nrf2, which was evidenced by antioxidant response element- and glutathione S-transferase A2-driven luciferase activities and mRNA level of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and sestrin 2. Moreover, protective effect of RLE against AA + iron was abolished in Nrf2 knockout cells.

**Conclusions** : These results indicate that RLE has the ability to protect hepatocyte against oxidative stress through Nrf2 activation.

**Key words** : *Rosa laevigata* Michx., Hepatocytes protection, Oxidative stress, Nrf2

#### 서론

간은 내인적 또는 외인적 인자에 대한 물질대사가 가장 활

발한 인체 장기 중 하나로서 독성물질의 지속적 노출과 이들의 제거를 위한 대사과정의 부산물로 자유라디칼 (free radical) 과 활성산소종 (reactive oxygen species)의 생성이 많은 장

\*Corresponding author : Sang Chan Kim, K.M.D., Ph.D., MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1821 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : sckim@dhu.ac.kr

#First author : Hae Li Ko, MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1864 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : ydko6@hanmail.net

Kyung Hwan Jegal, K.M.D., MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1864 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : outshinerz@gmail.com

· Received : 13 October 2015 · Revised : 13 November 2015 · Accepted : 16 November 2015

기이다<sup>1)</sup>. 세포 내 존재하는 glutathione (GSH), superoxide dismutase, catalase, peroxidase를 포함한 다양한 항산화 시스템은 세포 적응반응을 통하여 생리적 수준의 활성산소를 제거하여 항상성을 유지하는데 관여하지만, 생리적 범위를 넘어서는 과도한 활성산소의 생성 및 이를 통한 산화적 스트레스는 세포 내 생체분자의 변형을 통해 세포 사멸을 유도한다. 따라서 과도한 산화적 스트레스는 급만성 간질환을 포함한 다양한 인체 질환을 야기하는 주요 병인으로 간주되어 왔다<sup>2-4)</sup>.

세포 내 과도한 산화적 스트레스는 세포막의 변형과 지방산의 산화를 촉진하고, phospholipase의 활성화를 통하여 세포 내외의  $\omega$ -6 다가불포화 지방산 중 하나인 아라키돈산 (arachidonic acid, AA)의 유리를 증가시킨다<sup>5)</sup>. AA는 sphingomyelinase에 의한 ceramide 유리, 세포질  $Ca^{2+}$ 의 증가 및 미토콘드리아 전자전달계 활성 변화에 따른 활성산소 증가를 통하여 세포 독성을 유발하며, 간염을 포함한 다양한 만성질환 환자의 혈액 내에  $\omega$ -6 지방산의 농도가 증가되어 있음이 보고되었다<sup>6-11)</sup>. 이와 더불어 iron의 존재 시 AA에 의한 활성산소 생성 및 미토콘드리아 막 전위 저하를 통한 세포 독성이 가속화될 수 있음이 보고되었다<sup>12)</sup>.

독성물질로부터 세포를 보호하는 약물들의 분자기전으로서 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)의 활성화가 보고되었다. Nrf2는 basic leucine zipper domain을 포함하는 전사인자 중 하나로서, 프로모터에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 표적 유전자들의 전사를 촉진함으로써 산화적 스트레스로부터 세포 및 조직을 보호하는데 관여하며<sup>13)</sup>, glutathione S-transferase (GST), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1), glutamate-cystein ligase catalytic subunit (GCLC), hemeoxygenase 1 및 sestrin 2 (SESN2)를 포함한 다양한 항산화 유전자들의 전사를 조절한다<sup>2,14,15)</sup>. 이와 더불어 Nrf2를 활성화시킬 수 있는 다양한 화합물들이 (비)알코올성 지방간, 간염, 간경화 및 간암을 포함한 급만성 간질환에 대한 치료 효능을 나타내었고, Nrf2 결손 동물에서 독성물질에 의한 급만성 간질환이 악화될 수 있음이 보고되어 급만성 간질환 치료에 있어서도 Nrf2의 활성화가 중요 약물 표적이 될 수 있음이 제시되었다<sup>13,16,17)</sup>.

金櫻子 (*Rosa laevigata* Michx.)는 장미과(Rosaceae)에 속한 상록반원관목인 金櫻子의 성숙한 과실을 건조한 약재로 성미가 酸澁하고 收斂하는 성질로 固精縮尿, 瀉腸止瀉의 효능을 지녀, 遺精, 遺尿, 小便頻數, 婦女的 帶下 및 久泄 등의 증상에 응용한다<sup>18)</sup>. 金櫻子は flavonoid계 화합물을 함유하며, 대표적인 성분으로는 kaempferol계 배당체인 afzelin, multiflorin A, multiflorin B와 quercetin계 배당체인 multinosie, quercitrin 등이 보고되어있다<sup>19)</sup>. 최근 金櫻子의 total saponin 및 total flavonoid가 다양한 급만성 간질환 동물모델에서의 치료 효능이 보고되었다<sup>20-22)</sup>. 이와 더불어 아밀로이드 베타와 과산화수소수에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 金櫻子 추출물 및 특정 분획의 세포 보호 효능이 보고되었다<sup>23-25)</sup>. 그러나 金櫻子가 급만성 간질환의 핵심 기전 중 하나인 산화적 스트레스에 의한 간실질세포의 사멸에 미치는 영향 및 항산화능 증가와 관련된 분자기전에 대한 연구는 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 金櫻子 열수 추출물 (*R. laevigata* water extract, RLE)을 급만성 간질환 치료 및 예방의 후보 소재로 발굴하고자, HepG2 cell을 이용하여 AA와 iron의 병용치

를 통해 산화적 스트레스를 유발하는 세포 독성 모델에서 RLE의 세포 보호 효과와 이에 관여하는 분자기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Anti-caspase-3, anti-poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), Anti-Bcl2, HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-Nrf2 항체는 Santacruz Biotechnology (Santacruz, CA, USA)에서 구입하였다. AA, rhodamine123는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)은 Hyclone laboratories (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Anti-Lamin A/C 항체는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), ferric nitrate, nitrilotriacetic acid (NTA), anti- $\beta$ -actin 항체 및 기타 분석용 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 金櫻子 열수추출물, RLE의 제조

金櫻子 (나눔제약; 원산지, 중국; 규격, 생약규격; 수입원, 동경종합상사(주); 품질검사연월일, 2009년 10월 20일; 품질검사기관, 한국의약품수출입협회)는 대원약품사 (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 증류수 세척 후 음건한 건조중량 200 g의 金櫻子에 물 1.5 L를 넣고 3시간 동안 전탕 한 후, 추출물을 거르로 1차 여과한 뒤 300 mm filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여, 여과액을 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 이 농축액을 12시간 동안 동결 후, 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 건조하여 35.63g의 추출물을 얻었다. RLE는 사용 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였으며, 물에 용해하여 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과 후 실험에 사용하였다.

### 3. 세포배양 및 처리

HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 10% FBS, 100 units/ml penicillin과 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. Wild type (Nrf2 +/+) 및 Nrf2 knockout (Nrf2 -/-) murine embryonic fibroblast (MEF) cell은 가톨릭대학교 약학대학 광미경 교수로부터 분양받아 10% FBS가 포함된 IMDM에서

배양하였다<sup>26)</sup>. 각 세포는 100 mm 배양접시에서 80% confluency에 도달하도록 배양한 후 multiwell plate에 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

#### 4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay를 통해 측정하였다. 세포는 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well 농도로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. Serum이 없는 배지에서 12시간 동안 배양하여 증식을 억제시킨 뒤, 10–300  $\mu\text{g/ml}$  RLE를 1시간 전처리 후, 순차적으로 10  $\mu\text{M}$  AA (12시간)와 5  $\mu\text{M}$  iron (1시간)을 처리하였다. MEF cell의 경우, 15  $\mu\text{M}$  AA를 3시간 처리한 후 5  $\mu\text{M}$  iron (1시간)을 처리하였다. 처리가 완료된 세포를 0.25 mg/ml의 MTT (4시간)와 반응하여 생성된 formazan을 dimethylsulfoxide로 용해하여 Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Tecan, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 다음과 같이 계산하였다 [Relative cell viability (%) =  $100 \times (\text{absorbance of treated cell}) / (\text{absorbance of control cell})$ ].

#### 5. 전세포 추출액, 핵 분획 추출액의 분리와 immunoblot 분석

전세포 추출액 (whole cell lysates)을 얻기 위하여 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후, radioimmunoprecipitation assay buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 2.5 mM sodium pyrophosphate]와 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)로 용해하여  $15,000 \times g$  에서 30분 간 원심분리하여 얻은 상층액을 전세포 추출액으로 사용하였다. 핵 분획은 수거된 세포를 10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM dithiothreitol, 0.1% NP-40와 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 혼합한 hypotonic buffer 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 4°C에서 10분간 용해한 뒤,  $7,800 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 10 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 25% glycerol과 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 혼합한 hypertonic buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 1시간 용해 후,  $14,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다. 단백질 추출액은 bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. Immunoblot을 위해 8–10%의 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하고, 5% skim milk로 2시간 이상 blocking하였다. Membrane을 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence solution (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 발광시켜 X-ray 필름 또는 Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)을 사용하

여 감광하였다. 각 단백질의 발현 정도는  $\beta$ -actin (전세포 추출액) 및 Lamin A/C (핵 분획)에 대한 immunoblot을 통해 보정하였고, Image J를 이용하여 densitometric analysis를 실시하였다.

#### 6. GSH 함량 측정

6-well plate에 배양 및 처리된 세포에 500  $\mu\text{l}$ 의 metaphosphoric acid를 첨가하여 용해한 후 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)을 이용하여 GSH 함량을 405 nm의 파장에서 Infinite M200 automatic microplate reader (Tecan, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정된 흡광도는 단백질의 농도로 보정하였다.

#### 7. 세포 내 활성산소종 측정

세포 내 활성산소종의 측정은 DCFH-DA를 이용하여 이전 보고한 방법에 따라 수행하였다<sup>27)</sup>. 처리된 세포를 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA로 1시간 동안 37°C에서 반응하여 형성된 DCF의 형광 강도를 excitation (485 nm), emission (530 nm)의 파장에서 Infinite M200 automatic microplate reader (Tecan)를 이용하여 측정하였다.

#### 8. 미토콘드리아 막 전위 측정

미토콘드리아 막 전위의 변화는 막투과성 양이온 형광염료인 rhodamine123을 이용하여 이전 보고한 방법에 따라 수행하였다<sup>27)</sup>. 약물 처리가 완료된 세포에 0.05  $\mu\text{g/ml}$  rhodamine123로 30분간 염색한 후, 1% FBS가 포함된 PBS에 부유시켜 각 샘플당 20,000개의 세포를 Partec GmbH FACS Calibur flow cytometer (Münster, Germany)를 이용하여 측정하였다.

#### 9. 리포터 유전자 분석

ARE 및 rGSTA2의 프로모터를 포함하는 리포터 유전자 플라스미드를 안정적으로 발현하는 재조합 HepG2 cell은 이전 보고된 방법에 따라 확립하였다<sup>28)</sup>. 24-well plate에 배양된 재조합세포에 30–300  $\mu\text{g/ml}$  RLE를 24 시간 동안 처리한 후, Passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 용해하였다. 세포 용해액 내의 luciferase 활성을 Luciferase Reporter Assay System™ (Promega)을 이용하여 Infinite M200 automatic microplate reader (Tecan)로 측정하였다. 각 샘플의 발광 강도는 단백질 함량으로 보정하였다.

#### 10. Total RNA의 분리 및 realtime RT-PCR 분석

Total RNA는 Tri-solution (Bioscience Technology, Gyeongsan, Gyeongsangbukdo, Korea)를 사용하여 분리하였다. 추출된 total RNA (2  $\mu\text{g}$ )는 d(T)<sub>16</sub> primer와 Accupower RT premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 제조사의

방법에 따라 역전사하여 cDNA를 얻었다. Realtime PCR은 SyBr Green premix (Takara Bio, Shiga, Japan)와 CFX96™ thermalcycler (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 증폭하였다. 본 연구에 사용한 primer는 Bioneer에서 합성하였으며, 염기서열 정보는 Table 1과 같다. 각 유전자의  $C_T$  값은 GAPDH 유전자의  $C_T$  값으로 보정하여 상대 정량하였으며, melting curve 분석을 통해 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다.

Table 1. Primer sequences used in this study.

Gene symbol	Species	Primer	PCR product size (bp)
GCLC	human	Forward 5'-GAAGTGGATGTGGACACCAG-3'	128
		Bacward 5'-TTGTAGTCAGGATGGTTTGGCA-3'	
NQO-1	human	Forward 5'-GGATTGGACCGAGCTGGAA-3'	137
		Bacward 5'-TGCAGTGAAGATGAAGCAAC-3'	
SES2	human	Forward 5'-CAAGCTCGAATTAATGTGCC-3'	323
		Bacward 5'-CTCACACCATTAAAGCATGGAG-3'	
GAPDH	human	Forward 5'-GAAGGTGAAGGTGGAGTC-3'	226
		Bacward 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	

## 11. 통계분석

본 연구의 각 처리군은 one way analysis of variance 분석을 사용하여 통계적 유의성을 검정하였다 ( $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$ ). 사후검정은 등분산 가정이 성립 하였을 때에는 Tukey HSD test를 이용하였고, 등분산 가정이 성립하지 않았을 경우에는 Tamhane test를 실시하였다. 모든 실험 결과는  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 로 표시하였다.

## 결 과

### 1. AA + iron으로 유도된 세포 독성에 대한 RLE의 세포 보호 효능

HepG2 cell에서 AA + iron으로 유도된 세포 독성에 대한 RLE의 보호 효능을 MTT assay를 통하여 연구하였다. HepG2 cell에 10–300  $\mu\text{g/ml}$  RLE를 한 시간 전처리하고 AA (10  $\mu\text{M}$ , 12시간)와 iron (5  $\mu\text{M}$ , 1시간)을 순차적으로 처리한 결과, AA + iron 처리에 의해 감소한 세포생존율 ( $43.72 \pm 8.86\%$ )이 RLE 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 30, 100 및 300  $\mu\text{g/ml}$  RLE는 AA + iron에 의해 감소한 세포생존율을  $98.99 \pm 6.19$ ,  $99.06 \pm 1.61$ ,  $100.66 \pm 3.27\%$ 로 각각 통계적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 1A). 24 시간 동안 10–300  $\mu\text{g/ml}$  RLE 단독 처리는 HepG2 cell에 세포 독성을 나타내지 않았다 (data not shown). 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 AA + iron에 의한 세포 독성에 세포자멸사 (apoptosis)가 관여함을 보고한 바 있다<sup>27,29</sup>. AA + iron에 의한 세포 독성에 대한 RLE의 세포 보호 효능에 세포자멸사 관련 단백질의 억제가 관여하는지 알아보기 위하여 immunoblot 분석을 실시하였다. HepG2 cell에서 AA + iron

의 처리는 기존에 보고된 바와 같이 세포자멸사 관련 단백질 (PARP, procaspase-3, Bcl2)의 발현을 억제하였다. 그러나, 100  $\mu\text{g/ml}$  RLE 전처리는 AA + iron에 의한 세포자멸사 관련 단백질들의 발현 감소를 억제하여 이들 단백질들의 발현을 control cell 수준으로 회복시켰다(Fig. 1B). 이상의 결과는, RLE가 HepG2 cell에서 AA + iron에 의해 유도된 세포자멸사에 대한 세포 보호 효능이 있음을 나타낸다.

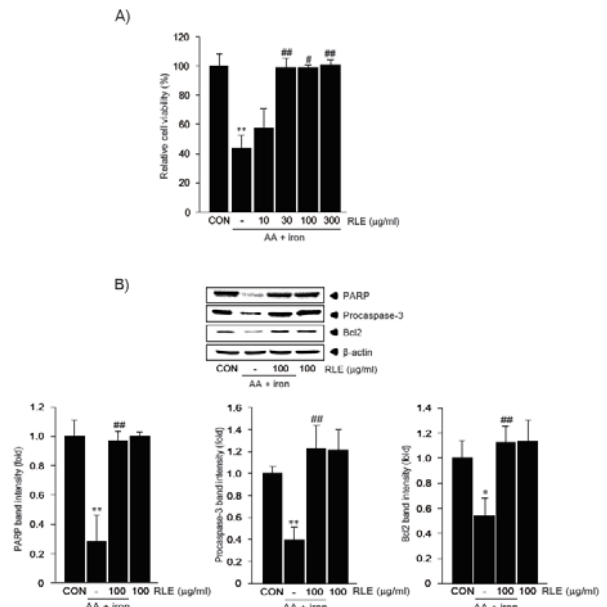


Fig. 1. Inhibition of AA+iron-induced apoptosis by RLE. HepG2 cells were pretreated with 10–300  $\mu\text{g/ml}$  RLE for 1 h and continuously incubated with 10  $\mu\text{M}$  AA for 12 h, followed by exposure to 5  $\mu\text{M}$  iron for 1 h. The relative cell viability (A) and expression of apoptosis-related proteins (B) were assessed by MTT and immunoblot analyses, respectively. All values represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments ( $^*p < 0.01$ ,  $^{\#}p < 0.05$  between control and AA+iron-treated cells;  $^{##}p < 0.01$ ,  $^{\#\#}p < 0.05$  between AA+iron-treated cells with or without RLE).

### 2. AA + iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 RLE의 억제 효과

AA + iron에 의한 세포 독성의 유도 과정에 세포 내 활성산소종의 생성과 미토콘드리아 막 전위의 저하를 통한 산화적 스트레스가 관여한다<sup>27,29</sup>. AA + iron에 의해 유도된 세포자멸사에 대한 RLE의 억제에 산화적 스트레스의 저하가 수반되는지 확인하기 위하여, 세포 내 산화적 스트레스의 억제에 관여하는 환원형 GSH의 함량 변화를 측정하였다. Control cell에서 환원형 GSH의 함량은  $83.63 \pm 6.73$  nmol/mg이었으며, AA + iron의 처리는 GSH의 함량을  $14.65 \pm 6.77$  nmol/mg으로 저하시켰고, 100  $\mu\text{g/ml}$  RLE의 전처리는 GSH 함량을  $102.00 \pm 14.76$  nmol/mg으로 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 또한 100  $\mu\text{g/ml}$  RLE 단독 처리시 세포 내 GSH 함량이  $102.77 \pm 20.06$  nmol/mg으로 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2A). 다음으로 세포 내 활성산소종 축적을 DCFH-DA를 이용한 형광 강도로서 측정한 결과, 100  $\mu\text{g/ml}$  RLE의 전처리는 AA + iron에

의하여 증가된 활성산소종을 통계적으로 유의한 수준으로 감소시켰으며, RLE 단독 처치에 의해서는 세포 내 활성산소종의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 2B). AA + iron에 의한 산화적 스트레스는 미토콘드리아 막 전위의 저하를 수반하여 rhodamine123에 대한 형광강도가 저하된 세포의 수 (RN1 fraction)를 증가시킨다<sup>29,30</sup>. RLE에 의한 세포 보호에 미토콘드리아 막 전위 회복이 관여하는지 알아보기 위하여 flow cytometry 분석을 통하여 미토콘드리아 막 전위를 측정하였다. AA + iron의 처치는 rhodamine123 염색을 통한 RN1 fraction에 해당되는 세포의 수를 control cell (3.93 ± 0.76%) 대비 약 77.06 ± 1.89%로 증가시켰으며, 100 µg/ml RLE 전처치는 AA + iron에 의해 증가한 RN1 fraction을 4.58 ± 1.28%로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 이와 더불어 RLE 100 µg/ml 단독 처치시 RN1 fraction의 비율은 6.00 ± 1.51%로 control cell과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서, RLE는 AA + iron에 의하여 유도된 산화적 스트레스의 억제를 통하여 세포 보호 효능을 나타내는 것으로 생각된다.

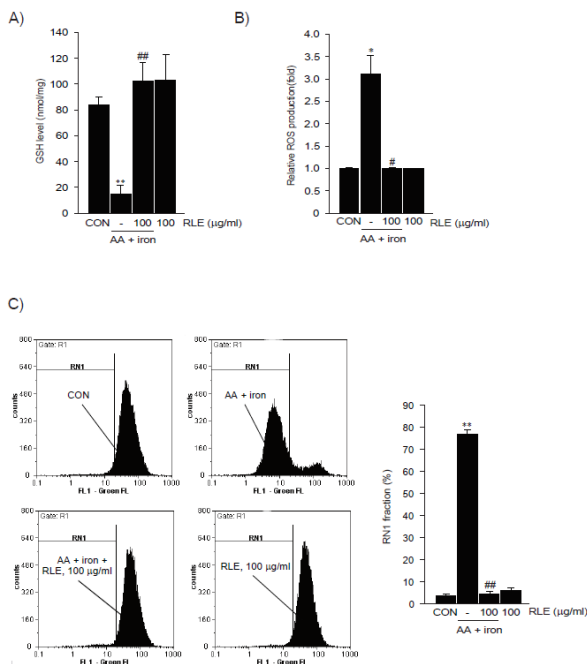


Fig. 2. The effects of RLE on AA + iron-mediated oxidative stress. GSH contents (A), ROS production (B), and relative RN1 fraction (C) were assessed in HepG2 cells that had been treated with RLE, AA and iron, as described in figure 1. After treatments, cells were further incubated with either 10 µM DCFH-DA for 1 h (B) or 0.05 µg/ml rhodamine123 for 0.5 h (C). All values represent the mean ± S.D. of three separate experiments (\**p* < 0.01, *p* < 0.05 between control and AA + iron-treated cells; #*p* < 0.01, #*p* < 0.05 between AA + iron-treated cells with or without RLE).

### 3. RLE가 Nrf2의 활성화에 미치는 효과

RLE의 세포 보호 효능에 관련된 분자기전을 규명하기 위하여 산화적 스트레스의 억제에 관여하는 핵심 전사인자 중 하나로 보고된 Nrf2의 활성화에 미치는 RLE의 영향을 연구하였다. 우선, HepG2 cell에 100 µg/ml RLE를 1시간에서 24시간까지 처치하고 핵 분획 단백질을 분리하여 Nrf2 발현을

immunoblot 분석을 통해 관찰한 결과, RLE에 의해 Nrf2의 핵 내 축적이 RLE 처치 1시간 이후부터 증가하기 시작하였고, 3시간 이후부터 통계적으로 유의하게 증가하여 24시간까지 유지되었다(Fig. 3A). 이와 더불어 최대 축적을 보였던 6시간을 기준으로 RLE 처치 농도에 따른 Nrf2의 핵 내 축적을 관찰한 결과, 30–300 µg/ml RLE 처치에 의하여 Nrf2의 핵 내 축적이 control cell과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3B). RLE에 의한 Nrf2의 핵 내 축적이 ARE와의 결합을 통한 표적 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있는지 규명하기 위하여 ARE-luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 HepG2 cell에서 리포터 유전자 활성을 관찰한 결과, 30–300 µg/ml RLE 처치에 의하여 ARE 의존적 luciferase 활성이 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3C). 이상의 결과는 RLE에 의한 산화적 스트레스의 억제에 Nrf2의 활성화가 관여할 수 있음을 시사한다.

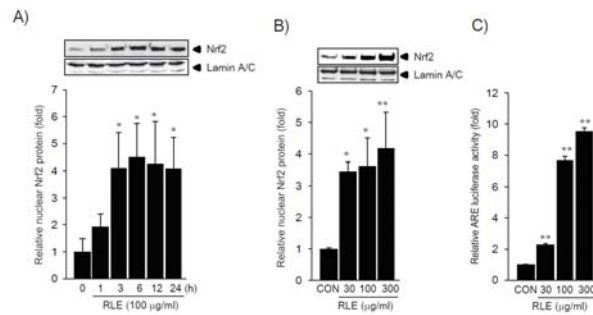


Fig. 3. The effect of RLE on the Nrf2 activation. Time-dependent (A) and concentration-dependent (B) nuclear accumulation of Nrf2 were assessed by immunoblot analysis. Equal loadings of nuclear protein were verified by Lamin A/C immunoblotting. (C) ARE-driven luciferase activity. HepG2 cells that had been stably transfected with ARE-driven luciferase were treated with 30–300 µg/ml RLE for 24 h. All values represent the mean ± S.D. of three separate experiments (\**p* < 0.01, *p* < 0.05 between control and RLE-treated cells).

### 4. RLE의 항산화 유전자 발현에 미치는 효과

GSTA2, GCLC, NQO-1, SESN2를 포함한 많은 항산화 유전자들의 프로모터에는 활성화된 Nrf2가 결합할 수 있는 ARE가 존재한다<sup>2,14,15</sup>. 따라서 RLE에 의한 Nrf2의 활성화가 Nrf2 표적 유전자군 (예, 항산화 유전자)의 발현을 증가시킬 수 있는지 리포터 유전자 및 realtime RT-PCR 분석을 통해 연구하였다. GSTA2-luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 HepG2 cell에 30–300 µg/ml RLE를 24시간 처치하였을 때 luciferase 활성이 증가하는 경향을 나타내었으며, 100 및 300 µg/ml의 RLE 처치에 의해 리포터 유전자 활성이 2.07 ± 0.11, 2.35 ± 0.07배로 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이와 더불어 realtime RT-PCR 분석 결과, 100 µg/ml RLE (24시간)의 처치는 GCLC, NQO-1, SESN2 mRNA 양을 통계적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 4). 이상의 결과는 RLE가 Nrf2의 활성화에 의해 항산화 유전자의 발현을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

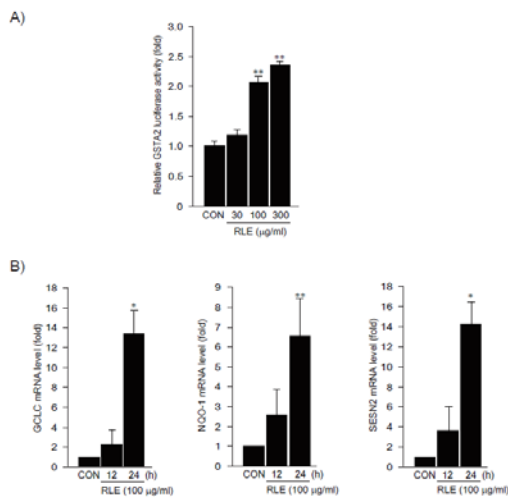


Fig. 4. Induction of antioxidant genes by RLE. (A) GSTA2-driven luciferase activity. HepG2 cells that had been stably transfected with GSTA2-driven luciferase were treated with 30–300 µg/ml RLE for 24 h. (B) Realtime RT-PCR analysis. Cells were treated with 100 µg/ml RLE for 12 or 24 h. All values represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments ( $^*p < 0.01$ ,  $^*p < 0.05$  between control and RLE-treated cells).

## 5. Nrf2 knockout cell에서의 RLE의 세포 보호 효과

RLE에 의한 세포 보호 효과에 Nrf2 활성화의 관련성을 연구하기 위하여 Nrf2가 결손된 MEF cell (Nrf2  $-/-$ )에서의 RLE의 세포 보호 효능을 연구하였다. Nrf2  $-/-$  cell에서는 Nrf2의 발현이 관찰되지 않음을 immunoblot 분석을 통하여 확인하였다(Fig. 5A). HepG2 cell과 동일하게 wild type MEF cell (Nrf2  $+/+$ )에서도 AA + iron에 의한 세포 독성이 나타났으며, 100 µg/ml RLE의 전처치는 AA + iron에 의한 세포 독성을 통계적으로 유의하게 억제하였다. 그러나, AA + iron에 대한 RLE의 세포 보호 효과가 Nrf2  $-/-$  cell에서는 나타나지 않았다(Fig. 5B). 이상의 결과는 RLE의 세포 보호 효능에 Nrf2의 활성화가 기여하는 것을 시사한다.

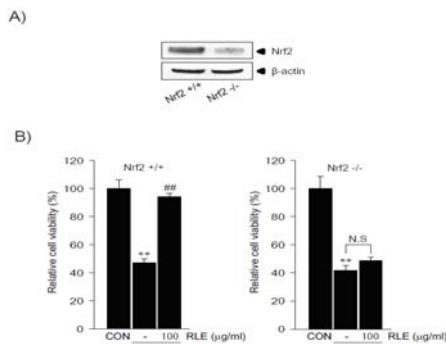


Fig. 5. The effect of Nrf2 knockout on RLE-mediated cytoprotection. (A) Immunoblot of Nrf2 both in Nrf2  $+/+$  and Nrf2  $-/-$  MEF cells. (B) MTT assays were conducted in MEF cells that had been treated with RLE (100 µg/ml, 1 h), AA (15 µM, 3 h), and iron (5 µM, 1 h). All values represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments ( $^*p < 0.01$  between control and AA+iron-treated cells;  $^{##}p < 0.01$  between AA+iron-treated cells with or without RLE).

## 고찰

산화적 스트레스는 다양한 급만성 간질환을 포함하여 뇌질환, 심혈관질환, 대사질환 및 면역질환의 주요 원인으로 알려져 있다. 알코올성, 만성 간염을 포함한 다양한 간질환 모델에서 간 조직 내 iron 및 AA의 비정상적 축적이 보고되었다<sup>9,31-33</sup>. Iron은 대표적 산화적 스트레스 유발물질로서 세포 내에서 Fenton 반응 (Harbor-Weiss 반응)을 통하여 hydroxyl radical과 (per) ferry radical의 생성을 촉진하며, 세포 내 다양한 분자의 과산화물을 통하여 세포 손상을 가속화시킨다<sup>34</sup>. 본 연구그룹에서는 선행보고를 통하여 HepG2 cell에서 AA와 iron 병용 처치 시 활성산소의 증가, GSH의 고갈, 미토콘드리아 막 전위의 저하 및 세포자멸사 신호회로의 활성화에 의한 세포 독성이 촉진됨을 보고하였고, 본 연구에서도 선행 연구 결과와 동일하게 10 µM AA (12시간)와 5 µM iron (1시간)의 병용처치에 의해 세포 내 활성산소의 증가, GSH의 고갈, 미토콘드리아 막 전위의 저하 및 세포자멸사의 활성화에 의한 세포 독성이 나타남을 확인하였다. 따라서, AA와 iron 처치 모델은 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸의 과정을 분자 수준에서 연구할 수 있는 모델일 뿐 아니라, 더불어 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 다양한 후보 소재를 발굴하는데 활용 가치가 높은 세포 모델이다.

본 연구그룹에서는 AA + iron 독성 모델을 활용하여 皂角子, 紅蓼, 木通, 艾葉 등의 다양한 本草 추출물 및 本草 유래 활성 성분이 세포 보호 효능이 있음을 보고하였으며<sup>27,29,30,35-37</sup>, 간질환 치료에 활용 가능한 方劑를 구성하는 100여 종의 本草들에 대한 효능 탐색 연구를 통하여 金櫻子가 산화적 스트레스에 대한 억제 효능을 가질 수 있음을 도출하였다. 본 연구에서 金櫻子 열수 추출물, RLE가 처치 농도 의존적으로 AA + iron에 의한 세포 독성을 억제하였으며, 최대 세포 보호 효과를 나타내었던 100 µg/ml RLE의 전처치가 AA + iron에 의한 활성산소의 증가, GSH의 고갈, 미토콘드리아 막 전위의 저하 및 세포자멸사 관련 단백질들의 변화를 통계적으로 유의하게 억제하였다.

선행 연구를 통하여 AA와 iron의 병용처치에 의한 세포 독성 모델에서 紅蓼, 木通, 艾葉 추출물 및 本草 유래 활성 성분이 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화를 통하여 세포 보호 효능을 가지는 것으로 보고하였다<sup>29,30,35-37</sup>. AMPK는 세포 내 에너지 상태를 인식하여 물질대사를 조절하는 핵심 조절분자이다<sup>38</sup>. 간에서 AMPK의 활성화는 acetyl-CoA carboxylase의 활성을 억제하여 지방산의 산화를 촉진하고, sterol regulatory element binding protein-1c의 발현을 조절하여 지방산의 생합성을 억제하며, mammalian target of rapamycin complex 1의 활성 조절을 통하여 단백질 생합성을 억제한다<sup>39,40</sup>. 본 연구실에서는 선행연구를 통하여 AMPK의 활성을 억제할 수 있는 화학적 억제제 (예, compound C)의 처치에 의해 本草 추출물의 세포 보호 효능이 상쇄됨을 보고하였다<sup>29</sup>. 이와 더불어 AMPK의 활성화는 하위 신호분자인 glycogen synthase kinase 3β의 불활성형인산화의 촉진을 통하여 세포 보호 효능을 가지며, glycogen synthase kinase 3β 화학적 억제제 (예, SB216763) 처치만으로도 AA + iron에 의한 세포 독성이 상쇄되었다<sup>37</sup>. 본 연구에서는 예비연구로서 RLE가 AMPK의 활성화를 통하여 세

포 보호 효능을 가지는지 확인하기 위하여 compound C를 전처리 후 RLE와 AA + iron을 처리한 결과, RLE에 의한 세포 보호 효능이 그대로 유지되었다 (Data not shown). 따라서 이전 보고한 本草 추출물과 달리 RLE에 의한 세포 보호 작용에는 AMPK의 활성화가 관련이 없을 것으로 추정된다.

본 연구에서는 RLE의 세포 보호 효능의 분자기전으로서 Nrf2의 활성화를 제시하였다. Nrf2는 산화적 스트레스에 대한 세포 및 조직의 적응반응에 관여하는 인자 중 하나로서, 급만성 간질환 병태동물 모델에서 Nrf2 유전자의 결손이 간질환을 심화시킬 수 있음이 규명되어 다양한 독성자극에 대한 간조직 보호 역할을 담당하는 핵심 전사인자로 보고되었다<sup>13,16,17</sup>. 정상상태에서 Nrf2는 세포질에 주로 존재하며, E3 ubiquitin ligase의 하나로 알려진 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과의 단백질-단백질 결합을 통해 proteasome system에 의해 분해된다. 산화적 스트레스 또한 스트레스에 대한 세포의 적응반응의 하나로서 Nrf2를 활성화시킬 수 있다<sup>13</sup>. HepG2 cell에 100 µg/ml RLE 단독 처리시 세포 내 GSH 함량이 증가하는 경향을 보인 결과와 더불어 세포 내 활성산소 및 미토콘드리아 막 전위의 저하가 관찰되지 않은 결과를 종합한다면 RLE가 세포 내 산화적 스트레스를 유발하여 Nrf2를 활성화시키는 것은 아닌 것으로 생각된다.

항산화물질은 세포 신호 네트워크의 활성화를 통해 Keap1으로부터 Nrf2의 유리를 촉진하고, 유리된 Nrf2는 핵으로 이동하며 표전유전자 프로모터에 존재하는 ARE에 결합하여 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 다양한 유전자들의 발현을 증가시킨다<sup>2,14,15</sup>. 본 연구에서도 RLE가 농도, 시간 의존적으로 Nrf2의 핵 내 축적을 증가시키고, ARE와의 결합 증가를 통한 표적 유전자 전사를 활성화시킬 수 있음을 immunoblot 분석 및 ARE를 포함한 리포터 유전자 분석을 통해 규명하였다. 또한 Nrf2 활성화에 의해 발현이 증가되어 산화적 스트레스를 억제하는데 관여하는 GSTA2, GCLC, NQO-1, SESN2의 전사가 활성화됨을 리포터 유전자 분석 및 realtime RT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 이와 더불어 RLE의 AA + iron에 대한 세포 보호 효능이 Nrf2 -/- cell에서 상쇄되었다. 따라서 RLE는 Nrf2의 활성화를 매개로 항산화 유전자들의 발현을 유도하여 세포 내 GSH의 증가, 활성산소의 억제 및 미토콘드리아 기능 회복을 통하여 세포 보호 효능을 가지는 것으로 생각된다.

金櫻子は 固精縮尿, 澁腸止瀉의 효능으로 임상에서 주로 비뇨생식기 관련 질환의 처방에 응용되고 있으나, 최근 다양한 간질환 모델을 이용한 연구에서 金櫻子の 치료 효능이 규명되고 있다. 향후 金櫻子の Nrf2 활성화와 관련된 세포 내 신호 네트워크의 규명과 추가적인 후속 연구가 진행된다면, 급만성 간질환 치료약물로서 金櫻子を 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 아울러, 金櫻子を 포함한 方劑를 급만성 간질환 치료에 활용할 수 있는 학문적 기반이 마련될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 金櫻子 열수 추출물 (RLE)이 HepG2 cell

에서 AA + iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효능을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RLE는 HepG2 cell에서 AA + iron에 의한 세포 독성을 농도 의존적으로 억제하였고, 이 과정에서 세포자멸사 관련 단백질들의 변화를 억제하였다.
2. RLE는 HepG2 cell에서 AA + iron에 의한 GSH 고갈, 활성산소의 축적, 미토콘드리아 막 전위 저하를 억제하였다.
3. RLE는 Nrf2의 핵 내 축적을 증가시켰고, ARE 결합을 통한 Nrf2의 전사 활성화와 항산화 유전자군(GSTA2, GCLC, NQO-1 및 SESN2)의 전사를 증가시켰다.
4. AA + iron에 대한 RLE의 세포 보호 효과가 Nrf2 -/- MEF cell에서는 상쇄되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 한국연구재단의 연구개발비 (Grant No. 2012R1A5A2A42671316) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Arias I, Wolkoff A, Boyer J, Shafritz D, Fausto N, Alter H, Cohen D. The Liver: biology and pathobiology. 5th ed. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2009 : 3-15.
2. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World J Gastroenterol. 2014 ; 20(25) : 8082-91.
3. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. J Androl. 2008 ; 29(5) : 488-98.
4. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. Free Radic Biol Med. 2010 ; 49(11) : 1603-16.
5. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1761(4) : 385-91.
6. Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. J Biol Chem. 1994 ; 269(8) : 5757-63.
7. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med. 1999 ; 27(1-2) : 51-9.

8. Maia RC, Culver CA, Laster SM. Evidence against calcium as a mediator of mitochondrial dysfunction during apoptosis induced by arachidonic acid and other free fatty acids. *J Immunol*. 2006 ; 177(9) : 6398–404.
9. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004 ; 106(6) : 635–43.
10. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusic AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2004 ; 350(1) : 29–37.
11. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*. 2006 ; 60(9) : 502–7.
12. 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.
13. Bataille AM, Manautou JE. Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 ; 92(3) : 340–8.
14. Shin BY, Jin SH, Cho IJ, Ki SH. Nrf2-ARE pathway regulates induction of sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med*. 2012 ; 53(4) : 834–41.
15. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 ; 47(9) : 1304–9.
16. Meakin PJ, Chowdhry S, Sharma RS, Ashford FB, Walsh SV, McCrimmon RJ, Dinkova-Kostova AT, Dillon JF, Hayes JD, Ashford ML. Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol Cell Biol*. 2014 ; 34(17) : 3305–20.
17. Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Buqnon P, Hildt E, Thiery J, Kan YW, Wemer S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*. 2008 ; 27(1) : 212–23.
18. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. Seoul : Youngrimsa. 1997 : 830–1.
19. Herbal Pharmacology Compilation Committee. *Herbal Pharmacology*. 3rd ed. Seoul : Shinilbooks. 2010 : 564–5.
20. Dong D, Yin L, Qi Y, Xu L, Peng J. Protective effect of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Nutrients*. 2015 ; 7(6) : 4829–50.
21. Dong D, Xu L, Han X, Qi Y, Xu Y, Yin L, Liu K, Peng J. Effects of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against acetaminophen-induced liver damage in mice via induction of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis. *Molecules*. 2014 ; 19(6) : 7189–206.
22. Zhang S, Zheng L, Dong D, Xu L, Yin L, Qi Y, Han X, Lin Y, Liu K, Peng J. Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Food Chem*. 2013 ; 141(3) : 2108–16.
23. Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Kim HK, Hong B, Kim CJ, Kim BG, Shin DH. Protective effect of *Rosa laevigata* against amyloid beta peptide-induced oxidative stress. *Amyloid*. 2006 ; 13(1) : 6–12.
24. Liu M, Xu Y, Han X, Liang C, Yin L, Xu L, Qi Y, Zhao Y, Peng J, Sun C. Potent effects of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx fruit against hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells via attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Molecules*. 2014 ; 19(8) : 11816–32.
25. Jia Y, Ji L, Zhang S, Xu L, Yin L, Li L, Zhao Y, Peng J. Total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit attenuates hydrogen peroxide induced injury in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chem Toxicol*. 2012 ; 50(9) : 3133–41.
26. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2003 ; 23(23) : 8786–94.
27. Kim JK, Park SM, Jegal KH, Kim YW, Byun SH, Kim SC, Cho IJ. Gleditsia Spina extract protects hepatocytes from oxidative stress through Nrf2 activation. *Kor J Herbol*. 2015 ; 30(4) : 57–64.
28. Moon SY, Lee JH, Choi HY, Cho IJ, Kim SC, Kim YW. Tryptanthrin protects hepatocytes against oxidative stress via activation of the extracellular signal-regulated kinase/NF-E2-related factor 2 pathway. *Biol Pharm Bull*. 2014 ; 37(10) : 1633–40.
29. Dong GZ, Jang EJ, Kang SH, Cho IJ, Park SD, Kim SC, Kim YW. Red ginseng abrogates oxidative stress via mitochondria protection mediated by LKB1-AMPK pathway. *BMC Complement Altern Med*. 2013 ; 13 : 64.
30. Jung EH, Kim SC, Cho IJ, Kim YW. Akebiae Caulis inhibits oxidative stress through AMPK activation. *J Physiol Pathol Korean Med*. 2015 ;



- 29(1) : 18-26.
31. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008 ; 45(1) : 1-23.
  32. Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR. Alcohol mediates increases in hepatic and serum nonheme iron stores in a rat model for alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996 ; 20(8) : 1352-61.
  33. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998 ; 114(2) : 311-8.
  34. Cederbaum AI. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol.* 2003 ; 30(2) : 115-20.
  35. Choi HY, Jeggal KH, Kim YW, Lee JW, Jo SA, Cho IJ, Kim SC. Cytoprotective effects of *Artemisia princeps* extract through inhibition of mitochondrial dysfunction. *Herb Formula Sci.* 2013 ; 21(2) : 63-71.
  36. Dong GZ, Lee JH, Ki SH, Yang JH, Cho IJ, Kang SH, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW. AMPK activation by isorhamnetin protects hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Eur J Pharmacol.* 2014 ; 740 : 634-40.
  37. Choi SH, Kim YW, Kim SG. AMPK-mediated GSK3beta inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2010 ; 79(9) : 1352-62.
  38. Lage, R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med.* 2008 ; 14(12) : 539-49.
  39. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2011 ; 13(4) : 376-88.
  40. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008 ; 30(2) : 214-26.