

볶은 들깨박으로부터 암예방효소계 활성성분의 분획

홍은영 · 강희정* · 서명자* · 남영중** · 권정숙*** · 김정상†

인제대학교 식품영양학과 및 기초과학연구소, *부산대학교 식품영양학과

한국식품개발연구원, *안동대학교 식품영양학과

Fractionation of Anticarcinogenic Enzyme Inducer(s) from Roasted Perilla

Eun-Young Hong, Hee-Jung Kang*, Myung-Ja Suh*, Young-Jung Nam**,
Chong-Suk Kwon*** and Jong-Sang Kim†

Institute of Basic Sciences and Dept. of Food Science and Nutrition, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

***Dept. of Food Science and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Abstract

Elevation of the activities of phase 2 enzymes such as quinone reductase(QR) provides protection against several types of neoplasia. In this study, we performed partial purification of QR inducer(s) from roasted and defatted perilla meal by solvent fractionation and thin layer chromatography. Cellular QR induction was most notable in chloroform fraction of roasted perilla extract, compared with other solvent fractions. QR inducer(s) was partially purified by TLC, with 0.8 of R_f value in n-butanol : n-propanol : 2N-ammonium hydroxide(10 : 60 : 30). AHH-inducing activity in TLC fractions isolated from methanol extracts of roasted perilla comigrated with QR-inducing fraction, suggesting that QR and AHH are induced by the same compound. TLC fractions shown strong QR-inducing activity also had a potent antioxidative activity, suggesting that cellular QR enzyme is induced by antioxidant(s) present in roasted perilla.

Key words: TLC, solvent fractionation, quinone reductase, AHH

서 론

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)는 꿀풀과에 속하는 동남아시아 원산의 일년초로서 잎을 식용으로 하고 종자는 기름을 짜서 약용 또는 식용으로 하며 옷의 해독에 사용하기도 한다(1). 들깨잎의 메탄올 추출물에서 분리 및 동정한 phytol을 비롯한 몇몇 화합물들이 항돌연변이의 효과가 있었으며(2), 이중 phytol은 중앙세포에 대한 직접적인 세포증식 억제효과를 나타내며, NK 세포나 대식세포의 활성을 크게 항진시킨다는 보고가 있다(3). 또한, 들깨잎 추출물의 부탄올획분에는 과산화지질 생성을 억제하는 항산화 및 돌연변이 유발억제 작용을 갖는 성분이 존재하며, 이 획분에서 몇몇 화합물이 동정되었다(4). 여러 연구에서 종실상태의 들깨의 채유 후에 남은 탈지박인 들깨박의 메탄올

추출물에서 높은 항산화효과를 나타냄을 보고하였다(5-7). 또한, 탈지들깨박에서 추출한 여러 형태의 페놀 화합물들의 항산화 효과를 비교한 연구에서는 이들 페놀산 추출물들은 식용 대두유 기질에서 BHT와 비슷한 항산화효과를 나타내었다고 하였다(8). Nagatsu 등(9)은 볶은 들깨로부터 항산화물질을 분리하였다. 여러 항산화제들은 발암억제작용을 하며(10), 이러한 항산화제들에 의해 QR 및 GST 등과 같은 2상 효소계가 상승된다는 보고들이 있다(11-13). 식품 속에 존재하는 항산화성분들에 의한 QR을 비롯한 2상 효소계의 상승은 발암억제작용과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(14,15). 특히 들깨와 같이 다가불포화지방산 함량이 높은 식물의 경우 항산화물질이 많이 존재하며, 이들이 QR유전자에 작용하여 효소의 활성화를 유도할 가능성이 높다. 한편 hepa1c1c7 세포를 이용하여 QR을

† To whom all correspondence should be addressed

빠르고 쉽게 측정하는 방법이 개발되어(16-18), 세포계에서 이 효소의 유도유무를 측정함으로써 잠재적인 항암활성을 가지는 화합물을 신속하게 탐색하는 것이 가능하게 되었다. 김 등(19)은 들깨박의 메탄을 추출물이 세포계에서 QR효소활성을 증가시키기를 보고하였으며, 그 이후 연구에서 산가수분해 및 볶음처리가 QR의 활성을 유도함을 확인하였다(accompanying paper). 본 연구에서는 볶은 들깨로부터 암예방성분분리를 위한 예비단계로서 용매분획 및 thin layer chromatography(TLC)를 수행하였으며, 여기서 얻어진 분획들에 대하여 QR효소활성 및 항산화성을 측정하여 상호 관련성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 들깨는 95년도 수확된 것으로 충북 수안농협으로부터 구득하였다. 들깨시료 50g을 210°C에서 10분간 볶아, Cemotec mill(Tecator, Sweden)로 분쇄하고, 10배의 hexane을 가하여 2회(12시간, 3시간) 탈지하였다. 탈지시료에 10배의 80%(v/v) 메탄올 수용액을 가하여 3회 추출 및 여과(12시간, 3시간, 3시간)하여 추출물을 제조하였다. 80% 메탄올 추출물(이하 메탄올 추출물)은 감압농축하고 동결건조하여 -70°C에서 보관하면서 공시하였다.

용매분획

탈지들깨박의 메탄올 추출물 1g에 대해 각각 20ml의 chloroform, ethylacetate, n-butanol 그리고 물을 사용하여 상법에 따라 순차용매분획을 실시하였다(5).

메탄올 추출물의 thin layer chromatography

분석용 또는 preparative TLC plate(Kieselgel 60 F254, Merck)에서 분리할 시료는 80% 메탄올에 0.1g/ml 농도로 용해하였으며, 각각 5 μ l 또는 80 μ l씩 점적하여 n-butanol : n-propanol : 2N ammonia(10 : 60 : 30)을 전개용매로 하여 14cm 전개시켰다. 전개가 종료된 후 자외선(short UV light : 254nm)하에서 분리된 점적 또는 띠를 확인하여 표시하였다. Preparative TLC plate에서 전개한 시료는 R_f값에 따라 각 분획을 razor blade로 채취하여 80% 메탄올로 추출하고, 원심분리 및 여과를 거쳐 공시하였다.

세포배양

Hepal1c7 세포(mouse hepatoma cell)를 10% fetal

bovine serum(heat and charcoal treated, FBS)를 함유하는 alpha-minimal essential medium(α -MEM) 배지에서 배양하였다. 세포는 1회용 세포배양 plate(55cm², Corning)에서 monolayer로 자라도록 하였으며, 배양 온도 및 CO₂ 농도는 37°C, 5%로 유지하였다.

Quinone reductase 활성 측정

Hepal1c7 세포를 10% FBS를 함유하는 α -MEM 배지에서 배양하였다. 세포를 세포배양 plate(100mm \times 10mm)에 3 \times 10⁴/ml 농도로 분주하고 48시간 배양한 다음, 추출용매에 용해시킨 동결건조 시료를 0.05mg/ml 농도로 첨가하여 24시간 더 배양하였다. 배양이 완료되면 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 10ml씩 2회 반복하여 씻었다. Plate에 0.25M sucrose 용액 1ml를 가하고, cell scraper를 이용하여 세포를 수집하고, ultrasonic cell disrupter(50W, Kontes)에서 세포를 균질화하였다. 세포 균질액(cell extract)을 micro-centrifuge(Eppendorf 5415C)에서 원심분리(10,000 \times g, 10분)한 후 상층을 QR효소활성과 단백질 함량 측정에 사용하였다. QR효소활성은 Benson 등의 방법(20)에 따라, 2-dichlorophenolindophenol(DCPIP)을 환원시키는 정도를 측정하여 나타냈다. QR효소활성은 1분간 감소되는 흡광도와 DCPIP의 molar extinction coefficient (2.1 \times 10⁴M⁻¹cm⁻¹)로부터 환원된 DCPIP의 양을 계산하고, 효소활성 측정에 사용한 시료의 단백질 함량을 측정하여 nmols DCPIP reduced/min/mg protein으로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry법(21)으로 측정하였다.

Arylhydrocarbon hydroxylase(AHH) 효소활성 측정

AHH는 Nebert의 방법(22)에 따라, benzo(a)pyrene을 기질로 하여 측정하였다. 세포 배양은 QR효소활성 측정시와 같은 조건하에서 수행하였으며, 1회 측정에 약 5 \times 10⁶cells를 사용하였다. 2개의 세포배양 plate(55cm², Corning)에 가득 자란 세포를 0.15M KCl-10mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.25)으로 씻은 후, 같은 용액 1ml를 가하여 cell scraper로 세포를 수집하고 ultrasonic cell disrupter에서 균질화하여 세포균질액을 제조하였다. 0.2ml 세포균질액과 0.76ml 반응액을 혼합하여 37°C에서 3분간 예열하고 기질로서 40 μ l 2mM benzo(a)pyrene을 가하여 60분간 반응시켰다. 즉, 최종 효소반응액 1ml에는 50 μ mol potassium phosphate buffer(pH 7.25), 0.39 μ mol NADH, 0.36 μ mol NADPH, 0.2ml cell extract, 80nmol benzo(a)pyrene(in 40 μ l methanol)이 함유하도록 하였다. 반응을 종결하기 위하여 4.25ml cold

hexane-acetone(3.25 : 1)을 가하고 37°C에서 10분간 반응물을 추출하였다. 유기용매층 1ml와 1.0N NaOH 3ml를 혼합한 다음, 1000×g에서 2분간 원심분리하고, 즉시 알카리층을 취하여 형광광도계(SFM-25, Kontron)에서 형광광도를 측정(Ex 398nm, Em 522nm)하여 상대적인 효소활성을 계산하였다.

항산화능의 측정

항산화능은 ferric thiocyanate법(9)으로 측정하였다. 시료를 무수에탄올에 최종 농도가 0.08% 되도록 용해시켜 제조하였으며, 비교군으로 α-tocopherol을 0.1% 농도로 제조하였다. 시료용액 2ml와 에탄올에 용해시킨 2.5% linoleic acid용액 2ml를 screw-cap vial에 넣고 0.05M phosphate buffer(pH 7.0) 4ml과 증류수 2ml를 가하여 빛을 차단한 상태로 40°C에서 보관하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 과산화물가를 측정하였다. 즉, 위의 혼합액 0.1ml을 취하여 여기에 75% ethanol 4.7ml과 30% ammonium thiocyanate 0.1ml을 첨가한 뒤 3.5% HCl에 녹여진 0.02M ferrous chloride 0.1ml을 넣고 정확히 3분 뒤 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

용매 및 TLC분획에 의한 세포내 quinone reductase 활성유도

볶은 들깨의 메탄올 추출물을 chloroform, ethylacetate, n-butanol 그리고 물로 분획하여 얻어진 시료의 QR

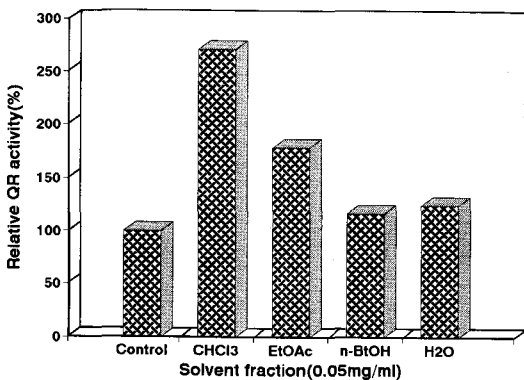


Fig. 1. Quinone reductase induction by different solvent fractions of 80% methanol extract of roasted and defatted perilla meal.

Hepal1c7 cells preincubated for 48hr were exposed to each solvent fraction at the concentration of 0.05 mg/ml for 24hr prior to enzyme assay. EtOAc and n-BtOH represent ethylacetate and n-butanol respectively.

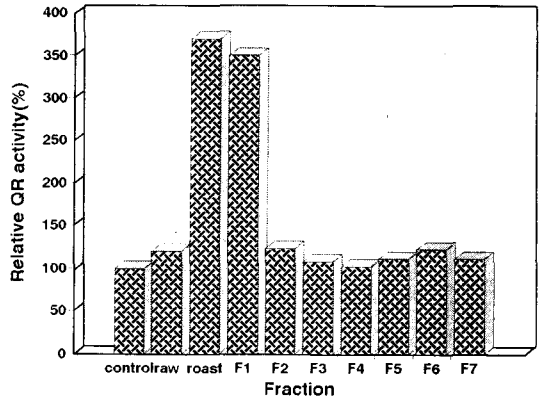


Fig. 2. Quinone reductase induction by TLC fractions of methanol(80%) extracts of roasted and defatted perilla meal.

Hepal1c7 cells preincubated for 48hrs were exposed to 0.05mg/ml of each TLC fraction for 24hr prior to enzyme assay. Preparative thin layer chromatography was performed using n-butanol : n-propanol : 2N ammonium hydroxide(10 : 60 : 30). R_f values of TLC fractions are as follows; F1=0.78, F2=0.57, F3=0.49, F4=0.39, F5=0.29, F6=0.19, F7=0.10. 0.5mg of each fraction was added to cell culture medium.

활성유도 결과는 Fig. 1과 같다. 각 분획을 hep1c7 세포에 0.05mg/ml 농도로 24시간 노출시킨 후 측정된 세포의 QR활성은 chloroform층에서 가장 높았으며, ethylacetate가 그 다음으로 높게 나타났다. 볶은 들깨에 존재하는 QR유도활성을 나타내는 성분을 preparative TLC로 분리하고, 자외선하에서 관찰된 band들을 분취하여 80% 메탄올로 추출하여 세포배양액에 첨가한 결과, R_f값이 0.8인 fraction 1이 대조군 보다 3.5배 더 높은 QR유도활성을 나타내었다(Fig. 2). 이와 같은 결과를 통해 볶은 들깨에는 암예방효소계 quinone reductase의 inducer가 존재하며, 이것은 비교적 비극성이 높은 물질일 것으로 추정된다.

Arylhydrocarbon hydroxylase(AHH) 효소활성

탈지들깨박의 메탄올추출물을 TLC로 분리하여 얻은 각 분획을 hep1c7 세포에 투여하여 24시간 노출시킨 다음, 1상 효소계의 지표효소인 AHH 활성을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. TLC에 사용된 볶은 들깨박의 메탄올 추출액의 경우 대조군이나 날들깨박의 메탄올 추출물 보다 6배나 높은 AHH유도활성을 나타내었다. 또한, TLC에서 분리한 분획중에서 R_f값이 0.8을 나타내는 fraction 1이 대조군 보다 9배 더 높은 AHH유도활성을 나타내었다.

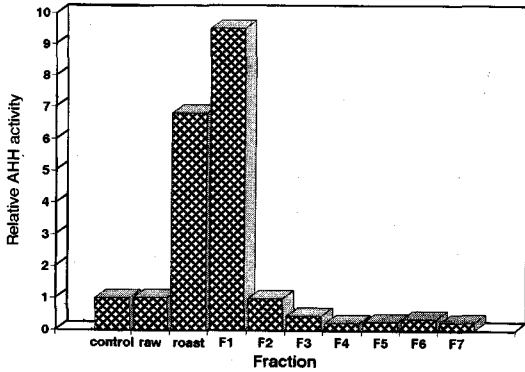


Fig. 3. Arylhydrocarbon hydroxylase induction by TLC fractions isolated from methanol(80%) extracts of roasted perilla.
See the description under Fig. 2 and methods and materials for AHH assay and TLC.

암예방지표효소의 inducer는 두가지 형태가 있다. 첫째, bifunctional inducer는 1상 효소계(예, AHH)활성을 유도할 뿐만 아니라, 2상 효소계(예, QR, GST)활성을 증가시킨다. Polycyclic aromatic hydrocarbons, azo dyes 그리고 flavonoids가 여기에 속한다. 둘째, monofunctional inducer는 AHH는 유도하지 않고 2상 효소계만을 선택적으로 유도하며, diphenols, thiocarbamates, 1,2-dithiol-3-thiones, isothiocyanates, cinnamates, coumarins 등이 여기에 속한다. 2상 효소계의 유도는 암예방과 밀접한 관련이 있지만, 1상 효소계는 많은 발암물질들의 활성화와 관련이 있기 때문에, 일반적으로 2상 효소계만을 선택적으로 유도하는 monofunctional inducer가 암예방물질로서의 유용성이 크다고 생각된다(23,24). 그러나 들깨박에 존재하는 QR inducer(s)의 효용가치는 발암물질 투여를 포함한 장기간의 동물실험을 거쳐 검증되어야 할 것으로 판단되며, 본 연구결과로부터 추정할 수 있는 것은 들깨박에 존재하는 성분에 의하여 해독효소계 활성이 증가되어 발암물질을 포함한 생체의 이물질(xenobiotics)의 전반적인 생체내 대사가 항진될 수 있다는 것이다.

TLC 분획의 항산화활성

QR효소활성은 많은 항산화물질에 의해서 유도되는 것으로 알려져 있다. 이렇듯 항산화성분은 QR 등 2상 효소계를 유도함으로써 암예방활성을 나타낼 가능성이 높다. 들깨박의 경우 항산화성분의 존재가 보고된 바 있고(9), 이들 성분의 하나와 QR유도성분이 일치할 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 TLC분획의 QR활성유도정도와 항산화활성패턴을 비교함으로써 위의 가설을

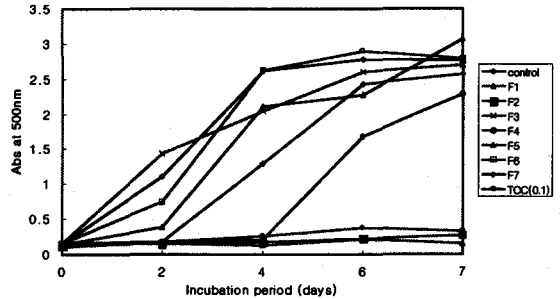


Fig. 4. Antioxidative activities of TLC fractions of perilla extracts.
See the description under Fig. 2 and methods and materials for antioxidative activity assay and TLC. TOC(0.1) represents 0.1%(w/v) α -tocopherol in working sample solution.

검증하고자 하였다. 즉, 볶은 들깨박의 메탄올 추출물을 preparative TLC으로 분리하고 각 띠(band)를 분취하여 80% 메탄올로 추출한 다음, 그 항산화능을 α -tocopherol과 비교하였다(Fig. 4). TLC분획 가운데 F1($R_f=0.8$)과 F2($R_f=0.7$)가 α -tocopherol 보다 더 높은 항산화능을 나타내었으며, 이러한 결과는 들깨박 추출물에서 높은 항산화 효과를 보고한 이전의 결과들(5-9)과 비교할 수 있다. 따라서, 볶은 들깨속에 존재하는 항산화물질은 F1과 F2에 존재하며, 따라서 이 물질은 비극성이 비교적 강한 물질일 것으로 판단된다. 지금까지 결과들을 종합해 보면 QR유도성분과 항산화성분이 동일성분일 개연성이 큰 것으로 추정된다.

요 약

볶은 들깨박에 존재하는 항암효소계 유도물질을 분리하기 위해 용매분획과 preparative TLC를 실시하여 이들에 대한 암예방지표효소인 quinone reductase와 AHH 유도활성을 조사하였다. 볶은 들깨박의 메탄올 추출물을 용매분획하여 QR을 측정할 결과 chloroform층에서 가장 높은 활성이 나타났다. 들깨박 메탄올 추출물을 TLC로 분리한 분획가운데 QR과 AHH유도활성은 F1($R_f=0.8$)에서 가장 높았으며, 항산화능은 F1($R_f=0.8$)과 F2($R_f=0.7$)에서 가장 강한 것으로 나타나 QR유도성분과 항산화성분이 동일성분일 가능성이 높은 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 농림부 첨단기술연구과제 연구비의 지원으로 수행된 결과의 일부로 사의를 표합니다.

문헌

1. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, 서울, p.659(1985)
2. Lee, K. M., Rhee, S. H., Park, K. Y. and Kim, J. O. : Antimutagenic compounds identified from perilla leaf. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 302(1992)
3. 김광혁, 장명웅, 박진영, 이숙희, 류태형, 선우양일 : 들깨잎에서 동정한 phytol의 항암 및 면역활성 증강효과. *한국영양학회지*, **26**, 379(1993)
4. 이경임, 이숙희, 김정옥, 정해영, 박진영 : 들깨잎 추출물의 항돌연변이 및 항산화 효과. *한국영양학회지*, **22**, 175(1993)
5. 이연재, 신동화, 장영상, 신재익 : 패모, 어성초, 쇠비름 및 들깨박 에탄올 추출물의 순차용매 분획별 항산화 효과. *한국식품과학회지*, **25**, 683(1993)
6. 김은희, 김동훈 : 탈지 콩, 참깨 및 들깨박의 에탄올 추출물의 공기름-물 기질에서의 산화억제. *한국식품과학회지*, **13**, 283(1981)
7. 윤석권, 김정환, 김재욱 : 탈지들깨박 ethanol 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지*, **25**, 160(1993)
8. 이기영 : 탈지들깨박에서 분리한 페놀화합물의 항산화 효과. *한국식품과학회지*, **25**, 9(1993)
9. Nagatsu, A., Tenmaru, K., Matsuura, H., Murakami, N., Kobayashi, T., Okuyama, H. and Sakakibara, J. : Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 887(1995)
10. Hirose, M., Akagi, K., Hasegawa, R., Yaono, M., Satoh, T., Hara, Y., Wakabayashi, K. and Ito, N. : Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]-pyridine(PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis by antioxidants in F344 female rats. *Carcinogenesis*, **16**, 217(1995)
11. De Long, M. J., Prochaska, H. J. and Talalay, P. : Induction of NAD(P)H : quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors : A model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 787(1986)
12. Benson, A. M., Batzinger, R. P., Ou, S-Y. L., Bueding, E., Cha, Y. N. and Talalay, P. : Elevation of hepatic glutathione-S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res.*, **38**, 4486(1978)
13. Benson, A. M., Cha, Y. N., Bueding, E., Heine, H. S. and Talalay, P. : Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydratase activities by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole. *Cancer Res.*, **39**, 2971(1979)
14. De Long, M. J., Dolan, P., Santamaria, A. B. and Bueding, E. : 1,2-Dithiol-3-thione analogs : Effects on NAD(P)H : quinone reductase and glutathione levels in murine hepatoma cells. *Carcinogenesis*, **7**, 977(1986)
15. Primiano, T., Egner, P. A., Sutter, T. R., Kelloff, G. J., Roebuck, B. D. and Kensler, T. W. : Intermittent dosing with oltipraz : Relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res.*, **55**, 4319(1995)
16. Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. and Talalay, P. : Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2394(1992)
17. Prochaska, H. J. and Santamaria, A. B. : Direct measurement of NAD(P)H : quinone reductase from cells cultured in microtiter wells : A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, **169**, 328(1988)
18. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. and Posner, G. H. : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli : Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2399(1992)
19. 김정상, 남영중, 김주원 : Mouse hepatoma 세포를 이용한 농산부산물로부터 quinone reductase활성물질의 탐색. *한국식품과학회지*, **27**, 972(1995)
20. Benson, A. M., Hunkeler, M. J. and Talalay, P. : Increase of NAD(P)H : quinone reductase by dietary antioxidants; Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 5216(1980)
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
22. Nebert, D. W. : Genetic differences in microsomal electron transport : the Ah locus. *Methods in Enzymol.*, **52**, 226(1978)
23. Talalay, P., De Long, M. J. and Prochaska, H. J. : Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8261(1988)
24. Prochaska, H. J. and Talalay, P. : Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.*, **48**, 4776(1988)

(1997년 1월 31일 접수)