

들깨 잎 추출물의 Nitric Oxide Synthase 저해활성 및 Peroxynitrite 소거활성

김재연 · 김지선 · 정찬식¹ · 진창배² · 류재하*
숙명여자대학교 약학대학, ¹영남농업시험장, ²KIST

Inhibitory Activity of Nitric Oxide Synthase and Peroxynitrite Scavenging Activity of Extracts of *Perilla frutescens*

Jae Yeon Kim, Ji Sun Kim, Chan Sik Jung¹, Changbae Jin², Jae-Ha Ryu*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

¹Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang 624-130, Korea

²Division of Life Sciences, Korea Institute of Science & Technology, Seoul 130-650, Korea

Abstract – Activated microglia by neuronal injury or inflammatory stimulation overproduce nitric oxide (NO) by inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, resulting in neurodegenerative diseases. The toxic peroxynitrite (ONOO⁻), the reaction product of NO and superoxide anion further contributes to oxidative neurotoxicity. We tried to evaluate the effects of two kinds of varieties of *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara on the NO production in lipopolysaccharide (LPS)-activated microglia. The perilla cultivars of *Namcheondeulkkae* (NC) and *Boradeulkkae* (BR) were developed by pure line from the local variety and by a cross between 'deulkkae' and 'chajogi', respectively. Spirit, hexane, chloroform and butanol fractions of the leaves of NC and BR inhibited the production of NO in LPS-activated microglia. The fractions of BR showed stronger activity than NC and the spirit extracts was the most potent in both cultivars. The solvent fractions of BR suppressed the expression of protein and mRNA of iNOS in LPS-activated microglial cells. Moreover, the extracts of NC and BR showed the activity of peroxynitrite scavenging in cell free bioassay system. These results imply that *Namcheondeulkkae* and *Boradeulkkae* might have neuroprotective activity through the inhibition of NO production by activated microglial cells and peroxynitrite scavenging activity.

Key words – *Perilla frutescens*, nitric oxide, peroxynitrite scavenging

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)는 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 한해살이 초본으로 중국 및 동아시아가 원산지이며, 우리나라에서는 통일신라시대부터 재배되었다는 기록이 있다.^{1,2)} 현재 국내에서는 용도에 따라 종실용 들깨와 잎만을 생산하기 위한 잎들깨용 품종이 개발되어 있다.³⁾ 들깨의 종실은 주로 기름으로 가공하여 사용하며 한방에서는 강장, 해수, 소화, 충독, 음중 및 옷의 해독 등에 사용한다.⁴⁾ 잎은 독특한 향미와 맛을 지니고 있어 주로 식용으로 쓰이며 anthocyanin계열 색소 및 flavonoid 계열의 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 들깨 잎에는 칼슘, 철, 인, 마그네슘 등의 미네랄과 비타민 A, C 및

tyrosine, lysine, linolenic acid 등의 식물성 영양소가 포함되어 있으며,⁶⁾ 들깨잎의 정유에서 farnesenes 등의 성분이 분리되었다.⁷⁾ 현재까지 알려진 들깨잎의 생리 활성으로는 메탄올 추출물의 항산화작용 및 항돌연변이 효과,⁸⁾ 위암세포 성장 억제 효과⁹⁾ 등이 있다. 또한 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성, xanthine oxidase 저해활성, DPPH 라디칼 소거를 통한 항산화 효과도 보고되었다.⁶⁾

Nitric oxide(NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역 기능 등의 역할이 알려져 있으며, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 정상적인 상황에서 생리적인 역할을 담당하는 constitutive NOS (cNOS)와 병리학적인 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)의 두 가지 형태로 크게 분류된다.^{10,11)} 그리고 cNOS

*교신저자(E-mail): ryuha@sookmyung.ac.kr
(FAX): 02-714-0745

는 다시 neuronal NOS(nNOS)와 endothelial NOS(eNOS)로 나누어진다. nNOS와 eNOS는 지속적으로 발현되며 Ca^{2+} 과 calmodulin 의존성으로 적은 양의 NO를 생성한다. nNOS는 주로 신경계에 존재하고 중추신경계에서 신경전달 기능을 담당하는 NO를 생성한다.¹²⁾ eNOS는 혈관내피세포에 주로 분포하며 혈관의 수축과 이완에 영향을 미쳐 혈압을 조절하는 기능을 담당하는 NO를 생성한다.¹³⁾ 반면에 iNOS는 Ca^{2+} 과 calmodulin 의존성이 없으며, 혈관내피세포나 근육세포를 포함한 다양한 조직에서 발견된다.¹⁴⁾ 대식세포나 신경소교세포에서 lipopolysaccharide(LPS), interferon- γ (IFN- γ), Alzheimer's amyloid peptide 등의 면역학적인 자극에 의해 iNOS가 유도된다.^{15,16)} iNOS는 원충, 세균이나 암세포를 사멸시키기 위한 숙주의 방어기전으로 다량의 NO를 만들어 내지만 정상 농도의 수천 배에 달하는 NO는 오히려 자가면역질환이나 만성염증의 원인이 되기도 한다.¹⁷⁾ 과량의 NO는 cyclooxygenase(COX)의 활성을 촉진시켜¹⁸⁾ prostaglandin 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키고¹⁹⁾ 패혈증 환자에게서 septic shock을 일으키는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ 또한 NO는 superoxide 음이온 (O_2^-)와 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성한다.²¹⁾ $ONOO^-$ 는 단백질 및 지질의 과산화물을 유도하고 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 반응 속도는 H_2O_2 의 수천 배에 이르며 신경세포에서 짧은 시간 동안 급속한 손상을 유발하는 것으로 보고되었다.²²⁾

신경소교세포는 신경 세포를 채우고 있는 액 내의 항상성을 유지하며 뉴런을 지지하고 보호, 유지하는 신경교세포의 일종이다. 중추신경계에서 대식세포와 같은 역할을 하며, 상해를 입은 신경조직으로 이동해 미생물이나 파괴된 세포의 잔재를 제거한다.²³⁾ 면역학적 자극에 의해 활성화된 신경소교세포는 NO나 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증 매개 물질을 생성하며, 이러한 작용은 여러 가지 신경 관련 질환의 병리학적인 원인과 관련이 있을 것으로 보인다.²⁴⁾ 그러므로 과도한 NO의 생성을 저해하고, $ONOO^-$ 를 소거하는 물질은 각종 산화성 뇌질환을 예방 또는 치료하는데 유용할 것으로 기대된다. 이에 본 연구에서는 남천들개 및 보라들개의 두 가지 품종의 잎 추출물에 대해 극성에 따른 용매분획을 실시하여, 각 용매 분획에 대한 NO 생성저해활성을 평가하고 iNOS 발현에 미치는 영향 및 peroxynitrite의 소거 활성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출 - 본 실험에 사용한 들개(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)잎은 경상남도 밀양시 영남농업시험장에서 채취한 남천들개(*Namcheondeulkkae*:NC)와 보라들개(*Boradeulkkae*:BR)의 잎을 사용하였다. 남천들개

와 보라들개는 영남농업연구소에서 육성한 잎들개 품종으로 남천들개는 재래종 들개로부터 순계분리를 통해 육성된 품종이며, 보라들개는 차조기와 일반들개를 교배하여 육성된 품종으로 일반들개에 비해 잎뒷면 anthocyanin색소 발현이 매우 뛰어나 보라색이 진하게 나타나는 것이 특징이다. 차조기는 들개속 식물로 들개와는 변종관계에 있으며 차조기, 주름차조기, 앞푸른차조기, 푸른차조기, 푸른주름차조기 등 5변종으로 구분되며 보라들개의 교배모본으로 쓰인 차조기는 유전자원 YPL199로 주름차조기였다. 음건한 남천들개 50 g을 주정 2 l를 사용하여 3회 반복하여 환류 냉각하면서 추출하고, 추출물을 감압 하에서 농축하여 주정 추출물 (16 g)을 얻었다. 극성에 따른 용매 분획을 얻기 위해 주정 추출물 15 g을 물에 분산하고 n-hexane으로 추출하여 n-hexane 가용분획 (3.17 g)을 얻고, 물 층을 다시 $CHCl_3$ 으로 추출하여 $CHCl_3$ 가용분획(0.21 g)을 얻었다. 계속하여 물 층을 BuOH로 추출하여 BuOH 가용분획(2.45 g)을 얻었다. 동일한 방법으로 보라들개 50 g으로부터 주정 추출물(18 g)을 얻고, 주정 추출물 15 g으로부터 n-hexane 가용분획(3.37 g), $CHCl_3$ 가용분획(0.36 g), BuOH 가용분획(2.68 g)을 각각 얻었다. 각종 용매 분획의 NO 생성저해활성은 LPS에 의해 활성화된 신경소교세포를 이용해 검정하였다.

BV-2 세포의 배양 및 시료의 처리 - 마우스의 신경소교세포인 BV-2 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Detroit, MI)이 포함된 DMEM 배양액(2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, penicillin 100 U/ml 및 streptomycin 10 μ g/ml 포함)으로 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하고, 1주일에 3번 계대배양하여 유지하였다.

BV-2 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM으로 1×10^5 cells/well로 하여 48 well plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고 FBS가 없는 새로운 DMEM 배지로 교환한 다음 lipopolysaccharide(LPS)를 0.1 μ g/ml이 되도록 처리하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% CO_2 incubator에서 20시간 배양하여 각 well의 배양액으로 유리된 NO를 NO_2^- 형태로 측정하였다.

Griess 시약을 이용한 NO의 정량 - 96 well plate에 각 well당 배양액 100 μ l씩을 취하고 Griess 시약(2.5% H_3PO_4 , 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine 용액)²⁵⁾을 150 μ l씩 가하여 10분 동안 발색시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선의 작성을 위해 sodium nitrite를 표준품으로 사용하였다.

Western blot을 통한 iNOS 단백질의 발현 - BV-2 세포를 10% FBS를 포함한 배양액으로 1.5×10^6 cells/60 mm dish로 분주한 뒤 24시간 동안 부착시키고 FBS가 없는 DMEM 배지로 교환한 후 media control, LPS 및 시료 처

리 균으로 나누어 처리한 후 20시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 1 mM PMSF를 포함한 lysis buffer(Cell Signaling, Beverly, MA)를 사용하여 세포를 용해시키고, 각 시료 별 세포질액 단백질 20 μ g을 Western blot용 시료로 사용하였다. 이 시료를 8% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 후, PVDF membrane에 transfer 하여 iNOS의 항체를 결합시키고 horseradish peroxidase linked type의 2차 항체를 결합시킨 후 ECL 검출시약(Amersham, Piscataway, NJ)을 이용한 chemiluminescence 방법으로 iNOS 단백질의 발현정도를 관찰하였다.

RT-PCR을 통한 iNOS mRNA의 발현 - BV-2 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM 배양액으로 1.5×10^6 cell/60 mm dish로 분주한 뒤 24시간 동안 부착시키고 FBS가 없는 DMEM 배지로 교환한 다음 media control, LPS 및 시료처리 균으로 나누어 처리한 후 4시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 1 ml Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 가하여 세포를 용해시켰다. 200 μ l의 CHCl_3 을 가한 뒤 원심분리하여 수층 200 μ l를 취하고 동량의 isopropanol을 가하였다. -20°C 에서 1시간 이상 보관하고 원심분리 후 미색 침전으로 얻어진 RNA에 super script transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 hexamer(Cosmo, Seoul, Korea)를 가한 후 42°C 에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA로 전환하였다. 얻어진 cDNA 2 μ l와 primer(iNOS; 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3', 5'-GGC-TGTCAGA GCCTCGTGGCTTTGG-3', β -actin; 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3', 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'), polymerase(Promega, Madison, WI)를 가한 후 DNA를 증폭하였다 (25 cycle: 94°C , 30초, 55°C , 30초, 72°C , 30초). 증폭된 DNA의 band를 확인하기 위해 2% agarose gel(0.01% ethidium bromide 포함)에 전개시켜 DNA image reader로 mRNA의 발현정도를 관찰하였다.

Peroxynitrite(ONOO^-)의 소거 활성 측정 - ONOO^- 소거 활성은 dihydro rhodamine 123(DHR 123, Molecular Probes, Eugene, OR)이 산화되면서 방출하는 형광을 측정함으로써 확인하였다.²⁶⁾ DHR 123 저장 용액은 5 mM 농도로 에탄올에 녹여 -20°C 에서 보관하였다. 반응 용 원충용액은 50 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride(pH 7.4)를 혼합하여 조제하였다. 이 완충용액에 5 μ M의 DHR 123과 100 μ M의 diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA)를 혼합한 뒤 10 μ l의 시료와 10 μ M의 ONOO^- (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI)를 첨가하고 5분간 방치 후에 형광을 측정하였다. ONOO^- 의 바탕용액은 0.3 N NaOH를 사용하였으며, 형광 측정시 여기파장은 485 nm, 방출파장은 530 nm를 사용하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, ONOO^- 소거 활성은 시료를

처리한 경우의 측정값에서 blank의 값을 빼서 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다. ONOO^- 용액의 농도는 흡광도 측정을 통해 결정하였다($\epsilon_{302} = 1970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

데이터분석 - 실험 결과는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였다. 두 그룹간의 유의성의 평가는 Student's *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

활성화된 신경소교세포에서의 NO 생성 저해활성 - LPS 처리에 의해 활성화된 신경소교세포에서 생성되어 배양액 중으로 유리된 NO의 농도를 NO_2^- 의 형태로 Griess 시약을 사용하여 정량하였다. 이는 NO가 매우 불안정하며 NO_2^- 형태로 즉시 변환되기 때문이다. LPS에 의해 활성화된 신경소교세포에서 NO의 생성이 8-10 μ M 수준으로 증가하였으며, 세포를 활성화할 때 시료를 동시에 처리하고 시료에 의해 NO의 생성이 감소하는 것을 평가하였다. 남천들개(NC)와 보라들개(BR)의 잎으로부터 제조한 용매 분획에 의한 NO 생성저해활성 실험 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 용매 분획의 최종 농도를 30 μ g/ml로 세포에 처리하였을 때 LPS를 단독으로 처리한 대조군에 대하여 남천들개의 주정, hexane, CHCl_3 , BuOH 가용분획은 각각 70%, 63%, 68%, 39%의 저

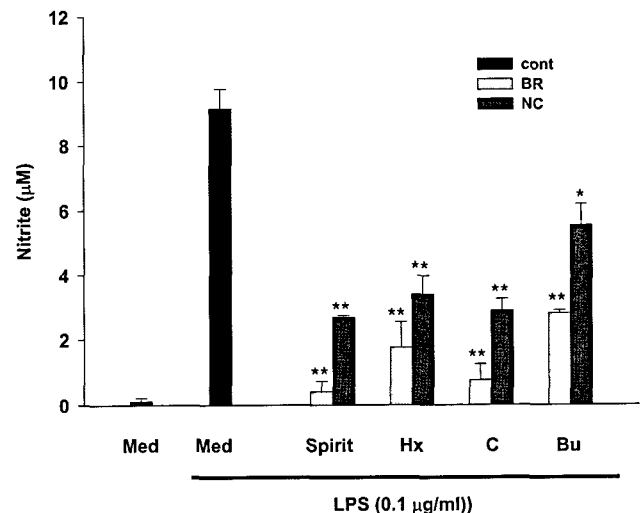


Fig. 1. Inhibition of NO production by the solvent fractions from leaves of Namcheondeulkkae (NC) and Boradeulkkae (BR) in LPS-activated BV-2 cells. Samples (30 μ g/ml) were treated during LPS-activation (0.1 μ g/ml) and the nitrite assay was performed after 20 hr incubation. Med:media control, spirit:spirit extract, Hx:hexane soluble fraction, C:chloroform soluble fraction, Bu:butanol soluble fraction. Results were expressed as mean \pm S.D. of three experiments. Values with asterisk represent significant (** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$) differences of NO production compared with LPS-control.

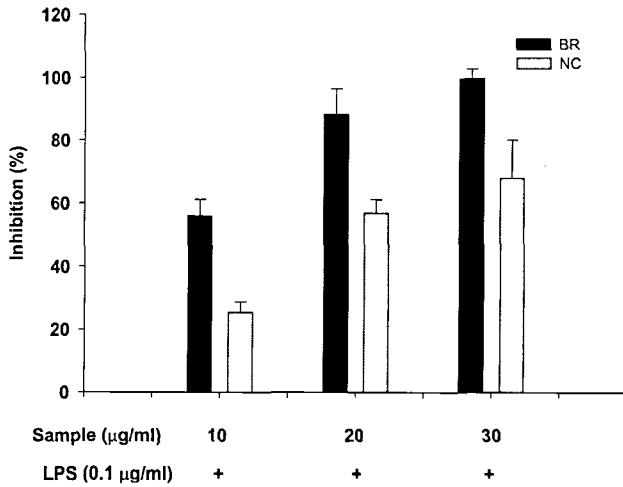


Fig. 2. Inhibition of NO production by spirit extract from leaves of Namcheondeulkkae (NC) and Boradeulkkae (BR) in LPS-activated BV-2 cells. Samples (10, 20, 30 µg/ml) were treated during LPS-activation (0.1 µg/ml) and the nitrite assay was performed after 20 hr incubation. Results are expressed as mean ±S.D. of three experiments.

해활성을 나타내었다. 보라들깨의 경우 같은 농도에서 주정, hexane, CHCl₃, BuOH 가용분획은 각각 95%, 81%, 91%, 69%의 저해활성을 나타내었다. 모든 용매분획에 대하여 동일하게 보라들깨가 남천들깨에 비해 NO 생성 저해활성이 강한 것을 확인하였다. 또한 다른 용매분획과 비교할 때 주정 추출물의 활성이 가장 우수하고, 특정 용매분획으로 집중적인 활성의 이행이 관찰되지 않았다. 들깨잎 추출물 중 NO 생성 저해활성이 가장 강한 주정 추출물의 농도변화에 따른 (30, 20, 10 µg/ml) 활성을 검토한 결과 (Fig. 2), 남천들깨와 보라들깨 모두 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해하였고 모든 농도에서 보라들깨의 활성이 남천들깨보다 강한 것을 확인하였다. 들깨잎 추출물들은 30 µg/ml 농도에서 세포에 대한 독성이 없음을 MTT법으로 확인하였다.

보라들깨 잎 용매 분획의 iNOS 단백질과 mRNA의 발현 억제 활성 - 들깨잎 추출물이 활성화된 신경소교세포에서 NO생성을 저해하는 활성기전을 밝히기 위해 NO 생성 저해 활성이 우수한 보라들깨의 용매 분획이 활성화된 신경소교세포에서 iNOS의 발현에 미치는 영향을 Western blot과 RT-PCR로 확인하였다. 보라들깨의 용매 분획을 활성화된 세포에 30 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 주정분획에 의해 iNOS 단백질과 mRNA의 발현이 가장 강하게 억제되는 것을 확인하였으며, hexane과 CHCl₃ 분획에서도 유의적인 활성을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 3, Fig. 4). 이와 같은 활성의 경향은 NO 생성 저해활성과 일치하는 것으로써, LPS에 의해 활성화된 신경소교세포에서 보라들깨의 NO 생성저해활성은 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현 억제에 의한 것임을 확인하였다. 식물에서 발견되는 다양한 anthocyanin

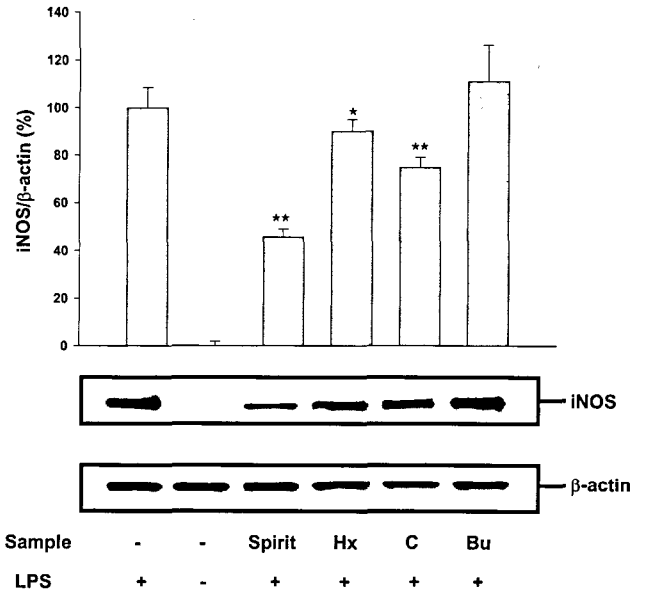


Fig. 3. Effects of the solvent fractions from the leaves of Boradeulkkae on the expression of iNOS protein in LPS-activated BV-2 cells. Cells were treated with samples (30 µg/ml) during LPS activation (0.1 µg/ml) for 20 hr. The protein expression level of iNOS was determined by Western blotting. Values with asterisk represent significant ($p < 0.05$) differences compared with LPS-media control. Spirit:spirit extract, Hx:hexane soluble fraction, C:chloroform soluble fraction, Bu:butanol soluble fraction.

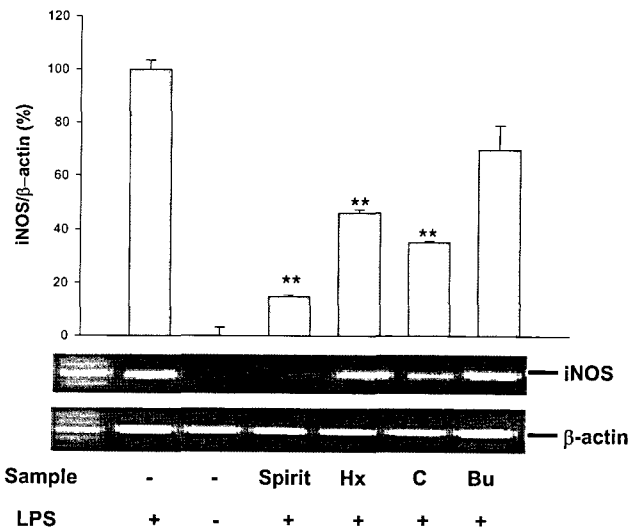


Fig. 4. Effects of the solvent fractions from leaves of Boradeulkkae on the expression of iNOS mRNA in LPS-activated BV-2 cells. Cells were pretreated with samples (30 µg/ml) for 30 min prior to LPS (0.1 µg/ml) treatment. After 4 hr of LPS treatment, iNOS mRNA levels were determined by RT-PCR based assays. Values with asterisk represent significant ($p < 0.05$) differences compared with LPS-media control. Spirit:spirit extract, Hx:hexane soluble fraction, C:chloroform soluble fraction, Bu:butanol soluble fraction.

은 iNOS 효소의 발현을 억제하여 NO 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 보라들개는 일반 들개에 차조기를 교배하여 육성한 것으로 anthocyanin의 함량이 강화되어 NO 생성 저해활성이 남천들개보다 더 강한 것으로 사료된다.²⁸⁾

보라들개 잎 추출물의 peroxynitrite 소거 활성 - 들개의 항산화작용에 대해서는 이미 많은 연구가 진행되었고,²⁹⁾ 들개 잎은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유라디칼을 소거하는 활성을 가진다고 보고되었다.⁶⁾

Peroxynitrite(ONOO⁻)는 과량의 NO와 superoxide 음이온에 의해 생성되며 단백질 및 지질의 과산화를 유발하고, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis 등의 중추 신경계 질환을 유발한다고 알려져 있다.³⁰⁾ 이와 같이 NO는 NO자체로서 보다는 peroxynitrite의 형태로 다양한 산화적 손상을 유발한다. NO의 생성단계는 iNOS의 발현 또는 효소활성을 저해함으로써 조절가능하며, 일단 생성된 NO는 ONOO⁻의 형태로 뇌조직 손상을 일으키므로, NO에 의한 다양한 신경계 질환을 예방 또는 치료하기 위해서는 ONOO⁻를 소거할 수 있는 물질이 유용하다. 보라들개 용매 분획의 ONOO⁻ 소거 활성을 DHR 123을 이용하여 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 모든 분획이 농도의존적으로 peroxynitrite를 소거하였으며, BuOH 분획의 소거 활성이 가장 우수하였다. 보라들개의 BuOH 분획은 30 µg/ml농도에서 iNOS의 단백질 또는 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 못하였으나, 분획들 중에서 peroxynitrite소거 활성은 가장 우수한 것으로 평가되었다. BuOH분획은 NO 생성단계를 차단하는 능력은 없으나, 0.5 µg/ml 농도에서

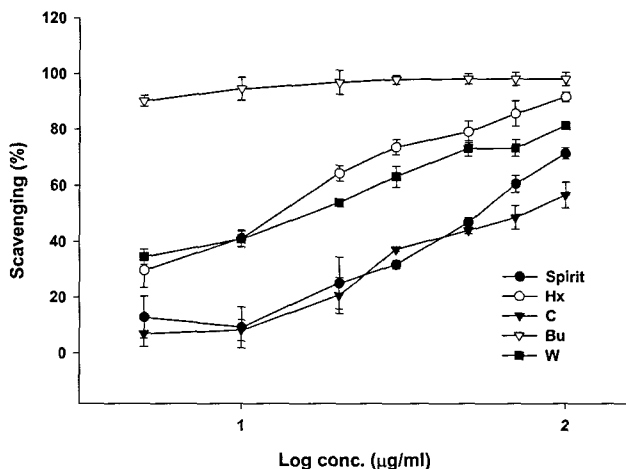


Fig. 5. Peroxynitrite scavenging activity of solvent fractions of Boradeulkkae (5, 10, 20, 30, 50, 70, 100 g/ml) in cell free system. The levels of ONOO⁻ was measured by monitoring the fluorescence from oxidation product of DHR 123. Values are expressed as the mean±S.D. of triplicate measurements. Spirit: spirit extract, Hx:hexane soluble fraction, C:chloroform soluble fraction, Bu:butanol soluble fraction, W:water soluble fraction.

87%의 ONOO⁻소거능력을 발휘하여, 일단 iNOS에 의해 생성된 NO로부터 유래한 peroxynitrite에 의한 유해작용을 차단하는 효과는 매우 우수한 것으로 평가되었다.

결론

남천들개와 보라들개의 잎을 각각 주정으로 추출하고, 주정 추출물로부터 극성에 따라 분획을 시행하여 n-hexane, CHCl₃, BuOH 가용분획을 얻었다. 각 분획에 대하여 LPS로 활성화한 신경소교세포에 의한 NO 생성저해활성을 평가하였다. 모든 분획이 30 µg/ml 농도에서 우수한 NO생성저해 활성을 나타내었으며, 보라들개가 남천들개에 비해 모든 용매 분획에서 더 우수한 활성을 보였다. 용매분획들 중에서는 주정 추출물이 가장 강하게 농도의존적인 NO 생성저해 활성을 나타내었다. Western blot과 RT-PCR 결과로부터 보라들개의 용매분획에 의한 NO 생성저해활성은 iNOS의 단백질과 mRNA의 발현 억제에 의한 것임을 확인하였다. 또한 보라들개의 분획들은 ONOO⁻를 소거하는 활성을 나타내었으며, 용매분획 중에서 BuOH 분획이 가장 강한 소거활성을 나타내었다. 이상의 결과들로 미루어볼 때 남천들개와 보라들개 잎은 iNOS발현을 억제함으로써 과도한 NO의 생성을 억제할 뿐만 아니라, NO에 의해 생성되는 ONOO⁻를 소거하는 작용을 통해, 산화적 손상에 의한 뇌신경질환을 예방, 치료하는데 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

사사

본 연구는 2005년 숙명여자대학교 약학연구소 특별연구비 및 21세기 프론티어사업 자생식물사업단의 연구과제(PF0320202-01) 지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Lee, J. I., Han, E. D., Lee, S. T. and Park, H. W. (1986) Study on the evaluation of oil quality and the differences of fatty acid composition between varieties in perilla (*Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara). *Korean J. Breeding* **18**: 228-233.
2. Park, H.-S., Ahn, B. and Yang, C.-B. (1990) Studies on the functional properties of sesame and perilla protein isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**: 343-349.
3. Choung, M. G (2005) Comparison of major characteristics between seed perilla and vegetable perilla. *Korean J. Crop Sci.* **50**: 171-174.
4. Kim, T. J. (1996) Natural plant resources in Korea, Seoul National University Press.

5. Yamazaki, M. and Saito, K. (2006) Isolation and characterization of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in *Perilla frutescens* var. *crispa* by differential display. *Methods Mol. Biol.* **317**: 255-266.
6. Han, H.S., Park, J.H., Choe, H.J., Son, J.H., Kim, Y.H., Kim, S. and Choe, C. (2004) Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *Korean J. Food Culture* **19**: 94-105.
7. Sakai, T. and Hirose, Y. (1969) Farnesenes isolated from the volatile oil of *Perilla frutescens* f. *viridis* Makino. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **42**: 3615.
8. Lee, K.-I., Rhee, S.-H., Kim, J.-O., Chung, H.-Y. and Park, K.-Y. (1993) Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**: 175-180.
9. Park, K.-Y., Lee, K.-I. and Rhee, S.-H. (1992) Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in salmonella assay system and on the growth of AZ -521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**: 149-153.
10. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 9265-9269.
11. Angus, J. A. and Cocks, T. M. (1989) Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* **41**: 303-352.
12. Boissel, J. P., Schwarz, P. M. and Forstermann, U. (1998) Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide* **2**: 337-349.
13. Busse, R. and Fleming, I. (1995) Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med.* **27**: 331-340.
14. Moilanen, E. and Vapaatalo, H. (1995) Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.* **27**: 359-367.
15. Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 87-94.
16. Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L. Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D. and Rossi, F. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**: 647-650.
17. Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, H., Nitsch, D., Pluss, C. and Walker, G. (1996) Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol. Int.* **20**: 51-58.
18. Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7240-7244.
19. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**: 749-754.
20. Wolfe, T. A. and Dasta, J. F. (1995) Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann. Pharmacother.* **29**: 36-46.
21. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250.
22. Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E. and Bast, A. (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 591-593.
23. Gehrmann, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G. W. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **20**: 269-287.
24. McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **21**: 195-218.
25. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
26. Kooy, N. W. and Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrodromamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 149-156.
27. Wang, J. and Mazza, G. (2002) Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 850-857.
28. 농작물 직무육성 신품종선정위원회 결과 보고서 (2001) 351-354, 농촌진흥청.
29. Nagatsu, A., Tenmaru, K., Matsuura, H., Murakami, N., Kobayashi, T., Okuyama, H. and Sakakibara, J. (1995) Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **43**: 887-889.
30. Szabo, C. (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* **6**: 79-88.

(2007년 3월 9일 접수)