

들깨 잎 추출물의 항산화 및 신경세포 보호작용

이종임 · 진창배* · 류재하** · 조정숙#

동국대학교 의과대학, *한국과학기술연구원 생체대사연구센터, **숙명여자대학교 약학대학
(Received December 14, 2007; Revised April 14, 2008)

Antioxidant and Neuroprotective Effects of *Perilla frutescens* var. *japonica* Leaves

Jong Im Lee, Changbae Jin*, Jae-Ha Ryu** and Jungsook Cho#

College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju, Gyeongbuk 780-714, Korea

*Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

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

Abstract — The leaves of *Perilla frutescens* Britt. var. *japonica* Hara (Labiatae) are often used in gourmet food in several Asian countries. Two kinds of perilla cultivars, *Namcheon* (NC) and *Bora* (BR), have been respectively developed in Korea by the pure line of 'deulkkae' from the local variety and by the cross of 'deulkkae' and 'chajogi'. The present study evaluated and compared antioxidant and neuroprotective effects of the fractions prepared from the leaves of the two cultivars using cell-free bioassay systems and primary cultured rat cortical cells. We found that the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions from NC and BR leaves inhibited lipid peroxidation initiated in rat brain homogenates by Fe^{2+} and L-ascorbic acid. In contrast, only the spirit and butanol fractions from both cultivars exhibited 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Among the fractions tested, the butanol fractions from NC and BR leaves exhibited the most potent antioxidant properties, and the butanol fraction from BR was more potent than the NC fraction. In consistence with these findings, the butanol fractions from both cultivars protected primary cultured cortical cells from the oxidative damage induced by H_2O_2 or xanthine and xanthine oxidase, with the BR butanol fraction being more active. The butanol fractions from NC and BR did not produce cytotoxicity in our cultures treated for 24 h at the concentrations of up to 100 $\mu g/ml$. Taken together, these results indicate that the leaves of the two cultivars of *Perilla frutescens* exert antioxidant and neuroprotective effects, and that the butanol fraction from BR leaves exhibits the most potent antioxidative neuroprotection among the fractions tested in this study.

Keywords □ *Perilla frutescens*, neuroprotection, antioxidant, oxidative damage, cortical cells

들깨(*Perilla frutescens* Britt. var. *japonica* Hara)는 중국과 동아시아가 원산지인 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 초본이다.^{1,2)} 들깨의 종실은 기름으로 가공하여 식용으로 사용하거나 한방에서 강장, 해독 등의 목적으로 사용하고 있다.³⁾ 들깨의 잎은 독특한 향미와 맛을 지니고 있어 식용으로 주로 사용되고 있으며, anthocyanin 계열 색소 및 flavonoid 계열의 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 현재까지 알려진 들깨 잎의 생리활성으로는 물 추출물 또는 메탄올 추출물에서 확인된 소염작용,⁵⁾ 항알러지 작용,⁵⁻⁷⁾ 항돌연변이 작용,^{8,9)} 및 항산화작용^{8,10-12)} 등이 있다. 들깨 잎에 함유된 생리활성성분으로는 소염, 항알러지 및

항산화 작용이 보고된 rosmarinic acid^{7,13)}가 있으며, 그 외에도 luteolin, triterpene acids 등이 들깨의 생리활성에 기여하는 것으로 보고되었다.^{5,9,11)}

두 가지 품종의 들깨가 한국의 영남농업연구소에서 육성되었다. 남천(Namcheon, NC) 들깨는 재래종 들깨로부터 순계분리를 통해 육성된 품종이며, 보라(Bora, BR) 들깨는 들깨와 변종 관계에 있는 차조기(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* KUDO)와 일반 들깨를 교배하여 육성된 품종이다. 본 연구에서는 두 품종의 잎으로부터 극성에 따라 제조된 용매분획을 대상으로 지질 과산화 억제력 및 라디칼 소거능을 측정하여 들깨 잎의 항산화 작용을 평가하고, 두 품종의 활성을 비교하였다. 산화적 스트레스와 자유라디칼은 뇌허혈과 같은 급성 및 다양한 만성 퇴행성 신경질환에서 나타나는 신경세포의 손상에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{14,15)} 이에 본 연구에서는 들깨 잎

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 054-770-2419 (팩스) 054-770-2447
(E-mail) jscho@dongguk.ac.kr

의 분획이 각종 뇌질환에서 관찰되는 신경세포의 산화적 손상에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 일차 배양한 대뇌피질 신경세포에서 산화적 스트레스로 유발한 손상에 대한 작용을 측정하고, 두 품종을 비교하였다. 끝으로, 배양한 신경세포를 각 분획으로 장시간 동안 처리한 다음 세포독성이 유발되는지를 확인하였다. 그 결과, 두 품종 모두에서 항산화 및 신경세포 보호 작용이 관찰되었으며, 남천들깨보다 보라들깨 잎의 분획에서 더 강력한 항산화성 신경세포 보호작용이 관찰되었다. 본 연구에 사용된 분획 중에서 보라들깨 잎의 BuOH 분획은 자체에 의한 세포독성이 없었으며, 가장 강력한 활성을 발현하는 것으로 나타났다.

실험재료 및 방법

실험재료

임신된 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐와 수컷 SD 흰쥐는 대한실험동물로부터 구입하였으며, minimum essential media(MEM, with Earle's salt), fetal bovine serum(FBS) 및 horse serum(HS)은 Gibco BRL(Gaithersburg, USA)로부터, laminin, poly-L-lysine, glucose, L-glutamine, cytosine arabinoside, H₂O₂, xanthine, xanthine oxidase, 2-thiobarbituric acid(TBA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 세포배양 용기는 Falcon(Franklin Lakes, USA)에서 구입하였고, 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

들깨 잎 추출물 및 분획의 제조

본 실험에 사용한 들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) 잎은 경상남도 밀양시 영남농업연구소에서 채취한 남천들깨와 보라들깨의 잎을 사용하였다. 남천들깨와 보라들깨는 영남농업연구소에서 육성한 잎들깨 품종으로 남천들깨는 재래종 들깨로부터 순계분리를 통해 육성된 품종이며, 보라들깨는 차조기와 일반들깨를 교배하여 육성된 품종으로, 일반들깨에 비해 잎 뒷면에 anthocyanin 색소 발현이 매우 뛰어나 보라색이 진하게 나타나는 것이 특징이다. 차조기는 들깨속 식물로 들깨와는 변종관계에 있으며 차조기, 주름차조기, 앞푸른차조기, 푸른차조기, 푸른주름차조기 등 5변종으로 구분되며 보라들깨의 교배모본으로 쓰인 차조기는 유전자원 YPL199로 주름차조기였다.

음건한 남천들깨 잎 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 chloroform으로 추출하여 chloroform 가용분획(0.21 g)을 얻었다. 계속하여 물 층을 BuOH로 추출하여 BuOH 가용분획(2.45 g)을 얻었다. 동일한

방법으로 보라들깨 잎 50 g으로부터 주정 추출물(18 g)을 얻고, 주정 추출물 15 g으로부터 n-hexane 가용분획(3.37 g), chloroform 가용분획(0.36 g), BuOH 가용분획(2.68 g)을 각각 얻었다.

흰쥐 대뇌피질 신경세포의 일차 배양

임신 16~18일 된 SD 흰쥐의 태지에서 얻은 대뇌피질 신경세포의 배양은 Cho *et al.*^{16,17}의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 대뇌를 적출하여 피질 부분만을 분리하여 뇌막을 제거하고 잘게 자른 후 5% FBS, 5% HS, 2 mM L-glutamine 및 25 mM glucose를 함유한 MEM(with Earle's salts)에서 알코올 램프로 미리 구멍의 크기를 순차적으로 작게 한 3개의 파스테르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리한 다음, 상기 배양액에 현탁시켜 poly-L-lysine과 laminin으로 미리 코팅해 놓은 24-well 배양용기에 well당 4-5×10⁵의 밀도로 이식하였다. 세포는 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C 배양기에서 배양하였으며 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였다. 배양 1주 후 10 μM cytosine arabinoside로 24~48시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰으며,¹⁶⁾ 10~14일간 배양 후 실험에 사용하였다.

배양한 신경세포에서 산화적 신경세포손상 유발 및 약물 처리

배양한 대뇌피질 신경세포에서 산화적 손상 유발은 Jung *et al.*¹⁸⁾ 및 Dok-Go *et al.*¹⁹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 배양한 세포를 HEPES-controlled salt solution(HCSS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)으로 세척한 후, 100 μM H₂O₂로 5분 동안 처리하거나 0.5 mM xanthine과 10 mU/ml xanthine oxidase로 10분 동안 처리한 후 다시 HCSS로 세척하고 나서 25 mM glucose를 함유한 MEM 배양액으로 교환한 다음, 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C에서 20-24시간 동안 배양하여 신경세포손상을 유발하였다.

이와 같이 유발된 산화적 손상에 대한 각 분획의 영향을 연구하기 위해서는 배양한 신경세포에 각각의 손상 유발과 동시에 적정 농도의 분획을 적용하였다. 시험분획은 80~100 mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 다음 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 대조군 세포는 1% DMSO 용액으로 처리하였으며, 이는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.¹⁶⁾

세포의 손상 정도 측정

세포의 손상 정도는 MTT 환원법²⁰⁾에 의해 평가였으며, 위상차 현미경으로 세포의 형태학적 변화를 관찰하여 확인하였다. 실험결과는 용매만으로 처리한 대조군 세포에서의 MTT 환원력을 기준으로 하여 유발된 산화적 손상에 대한 백분율로 계산하여 세포생존율로 표시하였다.

지질 과산화 억제력의 측정

수컷 SD 흰쥐로부터 얻은 뇌 균질액에서 유도한 지질 과산화에 대한 각 분획의 작용은 Cho and Lee²¹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 일정양의 뇌 균질액과 10 μM Fe²⁺, 100 μM ascorbic acid 및 적정농도의 시험분획을 함유하는 반응액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, trichloroacetic acid와 TBA를 차례로 가하여 혼합하고 100°C에서 15분 동안 가열한 후, 원심분리하여 얻은 상등액의 흡광도를 VERSA_{max} microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 시험분획에 의한 지질 과산화 억제율은 다음 식을 이용하여 계산하였다. 이 때, 대조군은 시료 대신 DMSO로 처리하였다.

$$\text{억제율(\%)} = 100 \times \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{분획 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}$$

DPPH 라디칼 소거능의 측정

DPPH 라디칼에 대한 각 분획의 작용은 Cho and Lee²¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 메탄올에 용해시킨 150 μM의 DPPH와 적정농도의 시험분획을 함유하는 반응액을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 VERSA_{max} microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거율은 위의 식을 이용하여 계산하였다.

데이터 계산 및 통계 처리

각 실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 측정한 값으로부터 계산한 평균값±S.E.M.으로 나타내었으며, 50% 억제농도를 나타내는 IC₅₀ 값은 Prism(GraphPad Software Inc., USA)을 이

용하여 비선형 회귀분석법으로 계산하였다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 검정하여 *P*<0.05인 것을 유의하다고 간주하였다.

실험 결과

들깨 잎 분획의 지질 과산화 억제력

먼저, 남천 및 보라들깨의 잎으로부터 각각 제조한 분획을 대상으로 흰쥐의 뇌 균질액을 지질원으로 사용하여 Fe²⁺와 ascorbic acid로 유도한 지질 과산화에 대한 작용을 측정하였다. 그 결과, 남천과 보라들깨로부터 얻은 각 분획은 모두 농도 의존적으로 지질 과산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). Table I에 제시된 IC₅₀ 값으로부터 알 수 있는 바와 같이 네 분획 중에서는 BuOH 분획이 가장 강력하였고, hexane, chloroform, 주정의 순으로 나타났다. BuOH 분획을 제외한 분획에서는 두 품종 모두 유사한 정도의 지질 과산화 억제력을 발현하였으나, BuOH 분획의 경우 보라들깨가 남천들깨보다 더 강력한 지질 과산화 억제력을 나타내었다(Table I).

들깨 잎 분획의 DPPH 라디칼 소거능

남천과 보라들깨의 잎으로부터 얻은 분획의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, hexane 및 chloroform 분획에서는 DPPH 라디칼 소거능이 거의 관찰되지 않은 반면, 주정과 BuOH 분획에서는 현저한 DPPH 라디칼 소거능이 나타났으며, 그 중에서 BuOH 분획이 가장 강력하였다(Fig. 2 및 Table I). 두 품종을 비교한 결과, 주정의 경우 보라들깨가 남천들깨보다 더 강력한 소거능을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, BuOH 분획의 경우

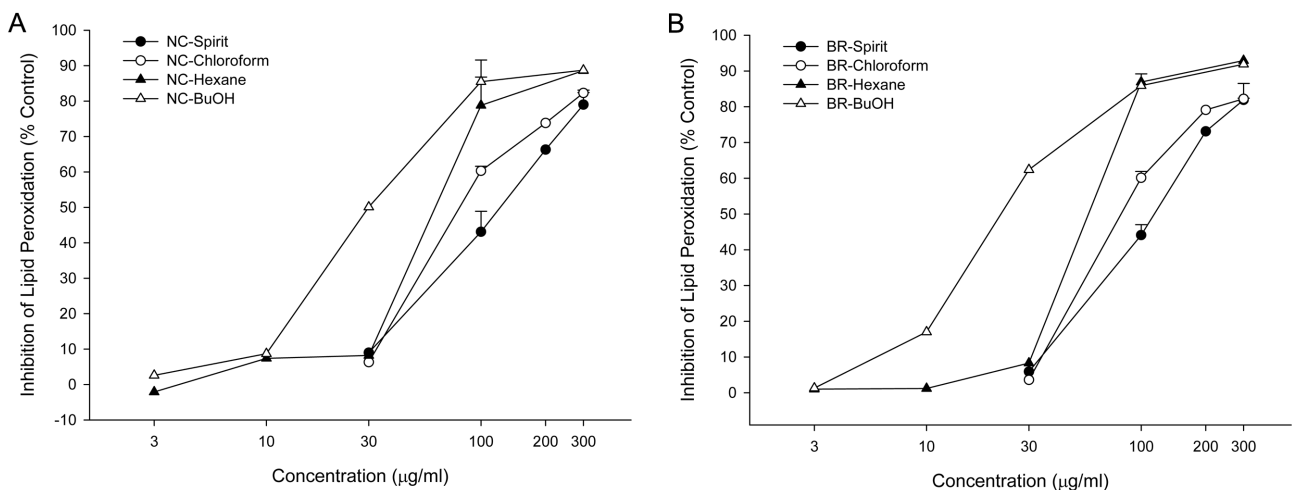


Fig. 1 – Inhibition of lipid peroxidation by the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon (NC) and Bora (BR). Lipid peroxidation was initiated by Fe²⁺ and ascorbic acid in the rat brain homogenates in the presence of the indicated concentrations of the fractions tested in this study. Data are expressed as percent inhibition of lipid peroxidation measured in the absence of the test samples. Each point represents the mean±S.E.M. from three measurements performed in duplicate.

Table 1 – IC₅₀ values^a of the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon and Bora

Fractions	Cultivars	Experimental conditions		
		Inhibition of lipid peroxidation	DPPH radical scavenging activity	Inhibition of H ₂ O ₂ -induced neuronal damage
Spirit	Namcheon	122.3±15.8	126.2±17.2	297.8±34.8 ^b
	Bora	120.4±10.5	98.6±7.3	180.9±33.4 ^b
Chloroform	Namcheon	92.2±1.3	N.D. ^c	177.1±72.9
	Bora	92.8±2.1	N.D. ^c	309.1±122.1
Hexane	Namcheon	65.3±10.5	N.D. ^c	303.1±51.5 ^b
	Bora	58.9±1.9	N.D. ^c	148.9±24.3 ^b
Butanol	Namcheon	32.5±0.5 ^b	22.9±3.4 ^b	108.5±6.2 ^b
	Bora	25.1±1.1 ^b	13.6±1.5 ^b	67.7±8.1 ^b

^aThe concentration (μg/ml) exhibiting 50% inhibition. IC₅₀ value was determined from the data of each experiment using GraphPad Prism as described in the Materials and methods, and expressed as the mean ± S.E.M. of three separate determinants.

^bP < 0.05, compared between the corresponding fractions of Namcheon and Bora.

^cNot determined.

통계적으로 유의하게 보라들깨가 남천들깨보다 더 강력한 소거능을 나타내었다(Table I).

들깨 잎 분획의 산화적 신경세포 손상 억제효과

다음으로 일차 배양한 대뇌피질 신경세포를 이용하여 남천과 보라들깨의 잎으로부터 제조한 분획이 신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 연구하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 남천으로부터 제조한 주정, hexane, chloroform 및 BuOH 분획은 배양한 신경세포를 H₂O₂로 처리하여 유발한 산화적 손상을 유의하게 억제하여 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 경우에도 BuOH 분획에서 가장 강력한 산화적 손상 억제효과가 관찰되었으며, IC₅₀ 값은 108.5 μg/ml이었다(Table I). 보라들깨 잎으로부터 제조한 분획의 경우에도 H₂O₂로

유발한 신경세포독성을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 3B), BuOH 분획이 가장 강력하여 67.7 μg/ml의 IC₅₀ 값을 나타내었다(Table I). H₂O₂로 유발한 산화적 신경세포손상에 대한 두 품종의 작용을 통계적으로 비교한 결과, 주정, hexane 및 BuOH 분획에서 보라들깨가 남천보다 더 강력한 억제작용을 나타내었다(Table I).

이번에는 배양한 신경세포를 xanthine 및 xanthine oxidase로 처리하였을 때 유발되는 산화적 손상에 대한 각 분획의 작용을 측정하였다. Fig. 4에 제시한 바와 같이 남천과 보라들깨로부터 제조한 BuOH 분획은 300 μg/ml의 농도에서 xanthine 및 xanthine oxidase로 유발한 산화적 손상을 유의하게 억제하는 것으로 나타나 대조군과 비교하여 세포생존율이 약 40% 정도까지 회복되었다. 보라들깨의 BuOH 분획은 같은 농도에서 남천보다

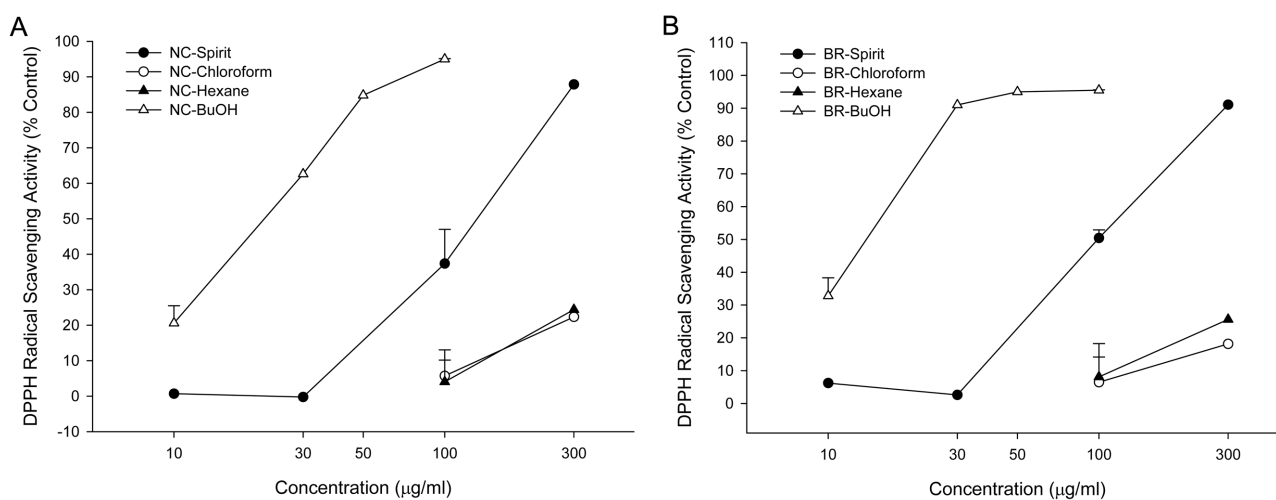


Fig. 2 – DPPH radical scavenging activity of the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon (NC) and Bora (BR). DPPH radical scavenging activities were determined in the presence of the indicated concentrations of the fractions tested in this study, as described in the Materials and methods. Data are expressed as percent control activity, measured in the absence of the test samples. Each point represents the mean ± S.E.M. from three measurements performed in duplicate.

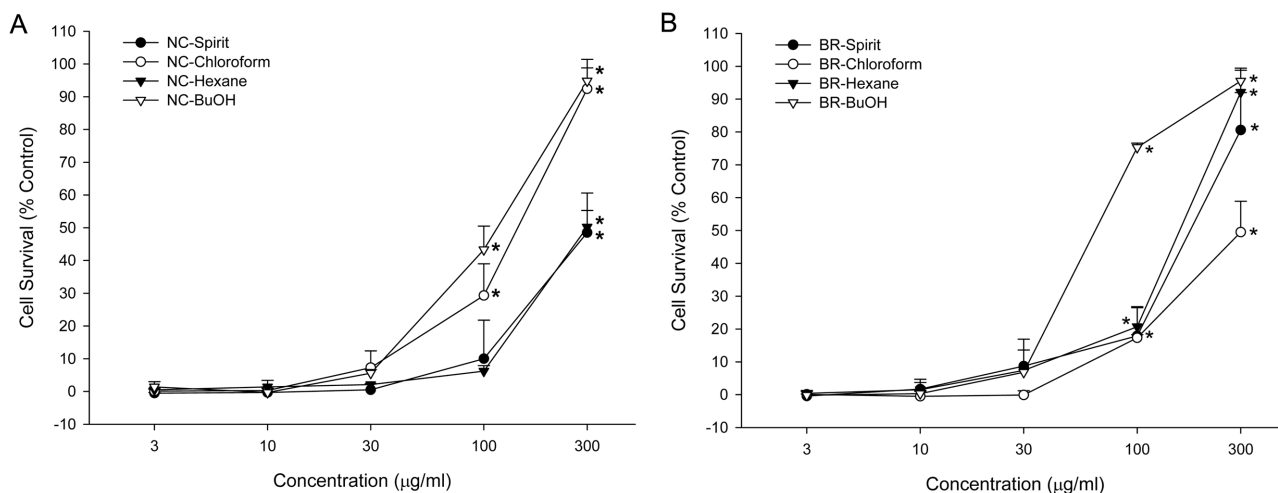


Fig. 3 – Effects of the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon (NC) and Bora (BR) on the oxidative damage induced by H₂O₂ in primary cultured rat cortical cells. The cultured cells were exposed to H₂O₂ (100 µM) for 5 min in the absence or presence of the indicated concentrations of the fractions tested in this study, and cell viability was assessed using the MTT reduction assay after incubation for 20~24 h at 37°C as described in the Materials and methods. Each point represents the mean ±S.E.M. from three different experiments performed in duplicate. *, *P*<0.05 vs the viability of the cells exposed to the respective oxidative insults in the absence of the test samples.

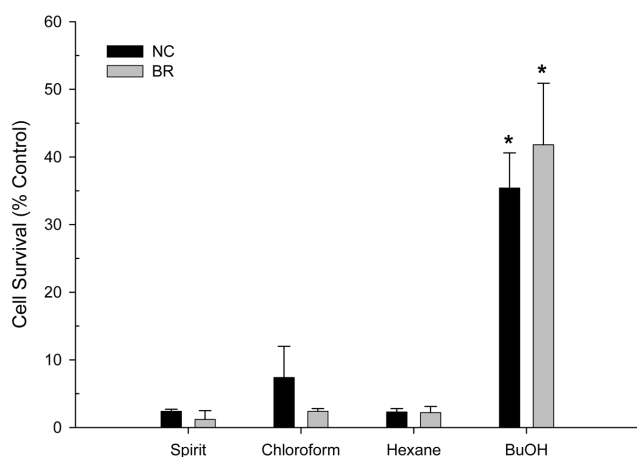


Fig. 4 – Effects of the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon (NC) and Bora (BR) on the oxidative damage induced by xanthine and xanthine oxidase in primary cultured rat cortical cells. The cultured cells were exposed to xanthine (0.5 mM)/ xanthine oxidase (10 mU/ml) for 10 min in the absence or presence of the fractions at the concentration of 300 µg/ml, and cell viability was assessed using the MTT reduction assay after incubation for 20~24 h at 37°C as described in the Materials and methods. Each point represents the mean ±S.E.M. from at least three different experiments performed in duplicate. *, *P*<0.05 vs the viability of the cells exposed to the respective oxidative insults in the absence of the test samples.

약간 더 우수한 세포생존율을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4). BuOH 분획을 제외한 다른 세 분획의 경우, 두 품

종 모두에서 매우 미약한 정도의 작용만이 관찰되었다(Fig. 4).

들깨 잎 분획 자체의 독성

끝으로, 남천과 보라들깨의 잎으로부터 제조한 각 분획을 농도별로 장시간(24 시간) 동안 일차 배양한 신경세포에 적용하였을 때 나타날 수 있는 독성을 측정하였다. 남천과 보라들깨에서 제조한 chloroform 분획은 가장 강력한 독성을 발현하는 것으로 나타나, 100 µg/ml의 농도로 적용한 경우 대조군과 비교하여 약 70~80% 정도의 세포생존율을 보였으며(Fig. 5A 및 B), 농도를 더 증가시켜 300 µg/ml로 적용한 경우 세포생존율은 약 10%에 불과하였다(data not shown). 또한, 보라들깨 잎의 hexane 분획도 100 µg/ml에서 유의한 독성을 나타내었으나(Fig. 5B), 남천 및 보라의 주정 추출물 및 BuOH 분획에서는 100 µg/ml 농도에서 유의한 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 5A 및 5B).

고 찰

본 연구에서는 경상남도 농업연구소에서 육성한 남천들깨와 보라들깨의 잎을 주정으로 추출한 추출물과 그로부터 극성에 따라 제조한 hexane, chloroform 및 BuOH 분획을 대상으로 지질 과산화 억제력 및 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고, 배양한 대뇌피질 신경세포를 이용하여 항산화성 신경세포 보호작용 및 분획자체의 독성을 연구하였다.

남천들깨와 보라들깨의 잎은 농도 의존적으로 지질과산화 억제력을 발현하였으며, 네 분획 중에서 가장 강력한 활성을 지닌

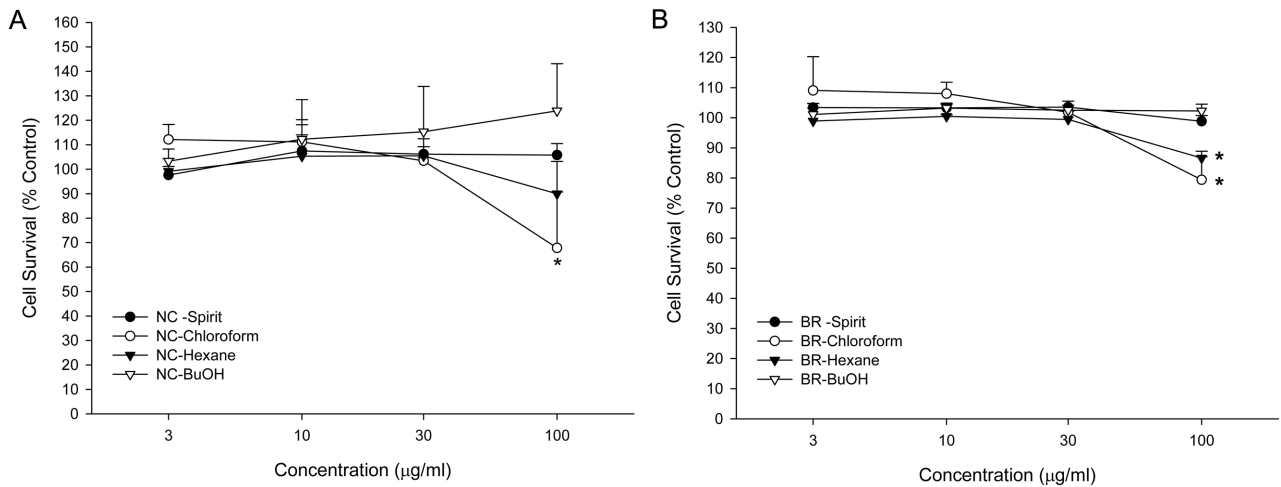


Fig. 5 – Effects of the spirit, chloroform, hexane and butanol fractions prepared from the leaves of Namcheon (NC) and Bora (BR) on the viability of primary cultured rat cortical cells. The cultured cells were exposed to the indicated concentrations of the fractions tested in this study for 24 h at 37°C, and cell viability was assessed using the MTT reduction assay as described in the Materials and methods. Each point represents the mean \pm S.E.M. from at least three different experiments performed in duplicate. *, $P < 0.05$ vs the viability of the cells incubated in the absence of the test samples.

BuOH 분획의 경우 남천보다 보라들깨가 더 강력한 작용을 나타내었다(Fig. 1 및 Table I). 또한, 남천과 보라들깨 잎의 BuOH 분획에서 가장 강력한 DPPH 라디칼 소거능이 확인되었으며, 이 경우에도 남천보다 보라의 분획이 더 강력한 소거능을 나타내었다(Fig. 2 및 Table I). Chloroform과 hexane 분획의 경우, 두 품종 모두에서 지질과산화 억제력이 확인되었으나 라디칼 소거능은 미미한 것으로 관찰되었다(Fig. 1, Fig. 2, Table I). 마찬가지로, 배양한 신경세포에서 H_2O_2 또는 xanthine과 xanthine oxidase로 유발한 산화적 손상에 대한 작용에서도 BuOH 분획이 가장 강력한 항산화성 신경세포 보호효과를 나타내었으며, H_2O_2 -유발 손상에 대한 작용은 남천보다 보라들깨가 유의하게 우수한 것으로 나타났다(Fig. 3, Fig. 4, Table I). 끝으로, 각 분획을 장시간 동안 배양한 신경세포에 적용하여 독성유발 여부를 관찰한 결과 BuOH 분획에서는 독성이 나타나지 않은 반면, 남천과 보라의 chloroform 분획 및 보라의 hexane 분획에서는 농도를 증가시켰을 때 유의한 독성이 관찰되었다(Fig. 5).

이상의 결과에서 두 품종의 들깨 잎의 항산화 및 신경세포 보호작용을 확인하였으며, 특히 보라들깨 잎에서 얻은 BuOH 분획은 자체에 의한 신경세포독성이 없을 뿐만 아니라, 남천보다 더 강력한 지질 과산화 억제력, 라디칼 소거능 및 산화적 신경세포 손상 억제작용을 발현함을 알 수 있었다. 이와 같이 MTT 환원법에 의해 측정된 연구결과는 위상차 현미경으로 관찰한 세포의 형태학적 변화와도 일치하는 것을 확인하였다(data not shown). 또한, 앞서 실험방법에서 기술한 바와 같이 본 연구에서는 신경세포의 손상에 대한 각 분획의 작용을 측정함에 있어서, 시료와 H_2O_2 또는 xanthine 및 xanthine oxidase를 일정시간 동안 동시

에 처리하고 나서 HCSS로 세척한 후 새로 첨가한 배양액에서 20~24시간 경과 후에 세포생존율을 평가하였기 때문에, 시료 자체의 색깔이 실험결과에 영향을 미칠 수 있는 가능성은 매우 적은 것으로 사료된다.

뇌는 산소의 소모가 많고, 불포화지방산을 많이 함유하고 있으며, 항산화 방어기전이 비교적 결핍된 장기이기 때문에 산화적 손상에 대하여 특히 민감하다고 알려져 있다.²²⁾ 더욱이 활성산소와 지질과산화는 뇌손상이나 뇌허혈을 비롯한 여러 퇴행성 신경질환의 병인에 있어서 중요한 역할을 한다.¹⁴⁾ 따라서, 보라들깨 잎의 BuOH 분획과 같이 지질 과산화를 억제하고, 자유라디칼을 소거하며, 신경세포의 산화적 손상을 억제할 수 있는 물질은 각종 산화적 스트레스에 의해 유발되는 신경질환에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다. 이를 위해서는, 강력한 항산화성 신경세포 보호작용을 발현하는 것으로 나타난 보라들깨 잎의 BuOH 분획에서 생리활성물질을 확인하고, 약리작용을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

들깨의 잎에는 각종 flavonoids, polyphenols 및 anthocyanins 등이 풍부한 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 특히 luteolin은 들깨 잎에 함유된 중요한 생리활성물질 중의 하나로 tumor necrosis factor- α 의 생성을 억제하고 항염 및 항알러지 작용을 나타내는 주요 활성성분으로 알려져 있다.^{5,23)} 또한, luteolin은 BV-2 microglia 세포에서 NO의 생성 및 iNOS의 발현을 억제함으로써 신경 염증질환에서 생성되는 과량의 NO로 인한 신경손상을 억제하는 것으로 보고되었다.²⁴⁾ 그러나, BuOH 분획에서는 유의한 NO 억제작용이 관찰되지 않았다는 연구결과²⁵⁾를 고려해 볼 때, 본 연구에서 관찰된 BuOH 분획에 존재하는 항산화 및

신경세포 보호작용은 luteolin 외의 다른 성분에 의한 작용일 가능성을 시사한다.

본 연구에서 사용한 보라들깨는 일반들깨에 비해 잎 뒷면에 anthocyanin 색소 발현이 매우 뛰어나 진한 보라색을 띠는 특징이 있다. 과일이나 채소, 꽃 등에 함유되어 있는 각종 anthocyanin은 항증식작용, 혈관 및 간 보호작용, 항염증 및 항산화작용 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{26,27} 본 연구자는 자색 고구마로부터 얻은 anthocyanin에서 항산화 및 신경세포 보호작용을 확인하여 보고한 바 있다²⁸. 이에 본 연구자는 들깨 잎의 anthocyanin과 함께 소염, 항알러지 및 항산화 활성 성분으로 알려진 rosmarinic acid^{7,13,29}를 대상으로 산화적 신경세포손상 억제작용을 평가하는 연구를 수행하고 있다. 또한, 보라들깨의 잎이 남천들깨 잎보다 더 강력한 생리활성을 나타내는 점을 고려하여, 각 품종으로부터 얻은 분획에 존재하는 이들 성분의 함량을 분석하고 분리하여 유효활성 성분 및 약리작용을 규명하는 연구를 수행할 예정이다.

결 론

본 연구에서는 경상남도 농업연구소에서 육성한 남천들깨와 보라들깨의 잎을 주성으로 추출한 주정 추출물과 그로부터 극성에 따라 제조한 hexane, chloroform 및 BuOH 분획을 대상으로 지질 과산화 억제력 및 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고, 배양한 대뇌피질 신경세포를 이용하여 항산화성 신경세포 보호작용 및 분획자체의 독성을 연구하였다. 그 결과, 지질과산화 억제작용은 각 품종으로부터 얻은 네 분획 모두에서 관찰된 반면, DPPH 라디칼 소거능은 주정 및 BuOH 분획에서만 확인되었으며, 남천 및 보라들깨 모두 BuOH 분획이 가장 강력한 항산화작용을 발현하였다. 두 품종의 항산화작용을 비교한 결과, 보라들깨의 BuOH 분획이 남천의 분획보다 유의하게 더 강력한 것으로 나타났다. 또한, 네 분획 모두 배양한 신경세포에서 유발한 산화적 손상을 유의하게 억제하였으며, 항산화작용과 마찬가지로 BuOH 분획이 가장 강력한 것으로 나타났다. 특히, 보라들깨 잎의 BuOH 분획은 남천보다 더 강력한 신경세포 보호작용을 나타내었으며, 100 µg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 자체에 의한 신경세포독성이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 가장 강력한 항산화 및 신경세포 보호작용을 발현하는 것으로 나타난 보라들깨 잎의 BuOH 분획 또는 그로부터 정제한 물질은 각종 산화적 스트레스에 의해 유발되는 뇌신경세포의 손상에 유용하게 작용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술

개발사업단의 연구비지원(PF06216-00)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Lee, J. I., Han, E. D., Lee, S. T. and Park, H. W. : 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 (1986).
- 2) Park, H.-S., Ahn, B. and Yang, C.-B. : Studies on the functional properties of sesame and perilla protein isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 343 (1990).
- 3) Kim, T. J. : *Natural Plant Resources in Korea*, Seoul National University Press (1996).
- 4) Yamazaki, M. and Saito, K. : Isolation and characterization of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in *Perilla frutescens* var. *crispa* by differential display. *Methods Mol. Biol.* **317**, 255 (2006).
- 5) Ueda, H., Yamazaki, C. and Yamazaki, M. : Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1197 (2002).
- 6) Shin, T. Y., Kim, S. H., Kim, S. H., Kim, Y. K., Park, H. J., Chae, B. S., Jung, H. J. and Kim, H. M. : Inhibitory effect of mast cell mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**, 489 (2000).
- 7) Makino, T., Furuta, Y., Wakushima, H., Fujii, H., Saito, K. and Kano, Y. : Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother. Res.* **17**, 240 (2003).
- 8) Lee, K.-I., Rhee, S.-H., Kim, J.-O., Chung, H.-Y. and Park, K.-Y. : Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J. Korean Soc. Food. Nutr.* **22**, 175 (1993).
- 9) Ueda, H., Yamazaki, C. and Yamazaki, M. : Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 560 (2003).
- 10) Zupko, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G. and Mathe, I. : Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Med.* **67**, 366 (2001).
- 11) Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kimura, Y., Hasegawa, J. and Nishino, H. : Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 85 (2004).
- 12) Han, H. S., Park, J. H., Choe, H. J., Son, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. and Choe, C. : Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *Korean J. Food Culture* **19**, 94 (2004).
- 13) Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, E., Nisimoto, Y. and Yoshino, M. : Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species

- in RAW264.7 macrophages. *Free Radic. Res.* **39**, 995 (2005).
- 14) Halliwell, B. : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609 (1992).
- 15) Behl, C. and Moosmann, B. : Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 182 (2002).
- 16) Cho, J., Joo, N. E., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D. and Kang, B.-S. : Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31 (2000).
- 17) Cho, J., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D., Lee, D. U. and Kang, B.-S. : NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci.* **68**, 1567 (2001).
- 18) Jung, Y.-S., Kang, T.-S., Yoon, J.-H., Joe, B.-Y., Lim, H.-J., Seong, C.-M., Park, W. K., Kong, J. Y., Cho, J. and Park, N. S. : Synthesis and evaluation of 4-hydroxyphenylacetic acid amides and 4-hydroxycinnamamides as antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2599 (2002).
- 19) Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee, J., Song, Y. S., Lee, Y. H., Jin, C., Lee, Y. S. and Cho, J. : Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* **965**, 130 (2003).
- 20) Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. : Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203 (1989).
- 21) Cho, J. and Lee, H.-K. : Wogonin inhibits excitotoxic and oxidative neuronal damage in primary cultured rat cortical cells. *Eur. J. Pharmacol.* **485**, 105 (2004).
- 22) Reiter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* **9**, 526 (1995).
- 23) Peng, Y., Ye, J. and Kong, J. : Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8141 (2005).
- 24) Kim, J. S., Lee, H. J., Lee, M. H., Kim, J., Jin, C. and Ryu, J. H. : Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells. *Planta Med.* **72**, 65 (2006).
- 25) Kim, J. Y., Kim, J. S., Jung, C. S., Jin, C. and Ryu, J.-H. : Inhibitory activity of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenging activity of extracts of *Perilla frutescens*. *Kor. J. Pharmacog.* **38**, 170 (2007).
- 26) Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P. and Tseng, T. H. : Protective effects of *Hibiscus* anthocyanins against *tert*-butyl-hydroperoxide-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 411 (2000).
- 27) Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. : Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1033 (1996).
- 28) Cho, J., Kang, J. S., Long, P. H., Jing, J., Back, Y. and Chung, K.-S. : Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 821 (2003).
- 29) Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K. I., Sadakane, K., Ichinose, T. and Yoshikawa, T. : Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 971 (2004).