

연구노트

## 자소엽 및 자소자의 염증조절 활성 비교

손형우<sup>1</sup> · 허진철<sup>2</sup> · 서명선<sup>3</sup> · 이상한<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>2</sup>경북대학교 식품생물산업연구소, <sup>3</sup>(주)송광매원

## Effects of *Perilla frutescens* L. on anti-oxidant and anti-inflammation activity

Hyeong-U Son<sup>1</sup>, Jin-Chul Heo<sup>2</sup>, Myung Sun Seo<sup>3</sup> and Sang-Han Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, and

<sup>2</sup>Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>SongKwangMaeWon Co., Ltd., Chilgok 718-852, Korea

### Abstract

It is recognized that *Perilla frutescens* L. (PFL) are useful for various diseases, including allergic disorders. To evaluate whether the PFL extract have potential in alleviating oxidant and inflammatory process, some *in vitro* antioxidant assays and *in vivo* DNFB-induced atopic assay were investigated. Extracts of PFL have potent anti-oxidant activity by DPPH or FRAP assay. By treatment of high temperature / high pressure extraction process of PFL seed, the activity was increased. Using a mouse animal model, we found that PFL extract reduces ear thickness and epithelial thickening and infiltration of immune cells inhibition. Collectively, the present results suggest that PFL can be used as an antioxidant and/or anti-inflammatory biomaterial, that should be proved to evaluate on mechanistic study and development of functional food.

**Key words** : *Perilla frutescens* L., anti-oxidant, anti-inflammation, atopy mouse model

### 서 론

자소는 중국이 원산지이며, 차조기 또는 소엽(蘇葉)이라고도 한다. 자소는 뛰어난 효능을 보이고 있는데, 특히 항산화 효과가 매우 강한 것으로 알려져 있다. 자소의 luteolin이 reactive oxygen species에 의한 신경세포의 손상을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이는 노인성 질환인 Parkinson's disease, Alzheimer's disease 질환에 이용될 수 있다는 보고가 있다(1). 자소씨의 오일 또한 불포화지방산이 다량 함유된 것으로 reactive oxygen species에 의한 뇌신경세포의 손상을 막는 것으로 알려져 있다(2). 자소의 항산화 활성은 이를 섭취한 연구에서 잘 나타나는데, 사람을 대상으로 10일간 자소를 섭취한 실험군에서 혈액 내 leutin과 beta-carotene이 증가한 것을 알 수 있었으며, 이는 지질

과산화를 감소시키는 것으로 알려져 있다(3).

자소의 또 다른 효능으로 염증억제 활성을 열거할 수 있다. RAW264.7 세포주(mouse macrophage cell line)에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 염증을 유도하는 IFN-beta-STAT1 경로를 억제하는 것으로 나타났다(4). 자소는 또한 염증과 관련한 알레르기성 비염(allergic rhinitis)에 항히스타민제보다 우수한 효과를 나타낸다고 하였으며(5), 이러한 자소 계열의 식물이 로즈마리산(romarinic acid)을 다수 함유하고 있어, 이를 이용하여 마우스 천식모델에서의 확인 결과 항알러지 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(6). 자소는 항산화 및 염증 이외에도 항암활성(7), 항균활성(8), 식균작용 증가(9) 등이 알려져 있다.

본 연구는 자소의 항산화 활성을 확인하고 이를 이용한 아토피 활성을 알아보고자 하였다. 항산화 활성을 가지는 많은 물질들이 항염증 활성을 가지는 것으로 알려져 있는데 (10,11), 본 연구에서는 이를 이용하여 자소의 항아토피에

\*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,  
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

관한 연구가 미진하여 본 실험을 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 시 료

실험에 사용된 자소는 송광매원에서 제공 받은 것으로 자소와 자소씨를 분리하여 추출과정을 거쳤다. 항산화 활성 실험을 위하여 자소와 자소씨를 각각 DW, 50% Ethanol 에 상온에서 24시간 추출과정을 거쳤으며, DW 추출물의 경우 자소와 자소씨를 121°C, 1.5 기압에서 15분간 추출과정을 거쳤다. 자소 추출원액(original)은 자소 원액을 실험에 사용하였으며, 용매는 시료와 용액의 비율을 1:1로 설정하여 추출과정을 거쳤다.

### DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay

각 추출물의 시료에 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 자소 및 자소씨 추출물과 DPPH solution 을 1/20의 비율로 해서 실온서 10분간 incubation한 후 517 nm (Victor3, Perkin Elmer)에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 아래와 같이 계산 하였다 (12).

$$\text{Inhibition}(\%) = \left[ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

(A : Absorbance O. D 517 nm)

### Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP 활성실험의 반응액으로 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s- triazine) : 20 mM의 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1의 비율로 혼합하여 실험직전에 만들었다. 반응액과 추출물을 각각의 비율로 혼합 한 후 10분간 상온에서 보관 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

### 마우스 동물모델을 이용한 항알러지 실험

마우스 동물모델을 이용한 알러지실험은 다음과 같이 실시하였다. 알러지의 대표적인 실험방법은 알러지성 피부염 모델이므로 이를 적용하였다. 면역반응 유도물질은 DNFB (dinitrofluorobenzene)를 처리하여 마우스의 귀에 염증반응을 유도한 다음, 자소 추출물을 처리하여 귀에서의 염증반응(inflammation)의 완화 정도를 확인하였다. 마우스는 샘타코(주)에서 5주령의 C57BL/6 수컷을 구입하여 사육장 내에서 약 일주일간 순화과정을 거쳤다. 실험 0일째 0.5% DNFB 50 µL를 복강에 각각 한 후, 일주일 후 1일 간격으로 3회 0.2% DNFB를 마우스의 귀에 처리하여 알러지를 유도하였다. 송광매원에서 제공받은 자소 추출물 20 µL를 실험진행 후 10일부터 15일까지 6회 매일 간격으로

마우스의 귀에 처리하였다. 이후 육안으로 DNFB 만을 처리한 군의 손상정도를 확인 한 다음, 사진 촬영 후 마우스 귀를 절취한 다음 10% formalin을 이용하여 고정하였다. 고정 이후 수세, 탈수, 파라핀 고정 등을 거쳐 약 6~7 µm의 두께로 파라핀 절편을 만들었다. 절편은 파라핀을 제거한 후 Hematoxyline (H), eosin (E)을 이용하여 HE 이중염색을 실시하였으며, 이후 현미경을 이용하여 관찰하였다(10).

### 통계처리

각 실험에 이용된 그룹 간 통계처리결과는 엑셀프로그램을 사용하여 SD (standard deviation) 값을 산정하여 error bar로 표시하였으며, student t-test의 검정에 값으로 p < 0.05 수준의 값을 산정하였다(14).

## 결과 및 고찰

### 자소의 항산화 활성 효과

자소 추출물을 이용하여 DPPH 항산화 활성을 알아보았다. 실험 결과 자소 DW 추출물, 자소 추출물, 자소 고온/고압 추출물, 자소 50% 에탄올 추출물, 자소씨 고온/고압 추출물에서 각각 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 반면 자소씨 50% 에탄올 추출물, 자소씨 DW 추출물에서는 상대적으로 활성이 적은 것으로 나타났으며, 모든 추출물에서 농도에 따른 항산화 활성의 증가를 알 수 있었다. 씨의 경우 또한 일반 자소 추출물과 같이 농도에 따른 항산화 활성의 증가를 알 수 있었지만, 자소잎 추출물에 비해서는 활성이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다. 흥미로운 점은 자소씨 DW 추출물의 경우 상온에서의 추출방법으로는 높은 항산화 활성이 나타나지 않으나, 고온/고압의 추출방법을 사용한 경우 항산화 활성이 강력하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이것은 자소씨 추출물이 오일 성분에 있는 항산화 물질이 고온/고압 하에서 추출물로 용출되어 나온 것으로 판단된다. 자소 추출물의 고농도에서 항산화 활성이 감소하는 원인으로는 실험자체의 특성에 의한 것으로 시료의 색깔로 인한 것으로 판단된다(Fig. 1).

FRAP을 이용한 항산화 활성 결과, 자소 DW 추출물, 자소 추출물, 자소 고온/고압 추출물, 자소 50% 에탄올 추출물, 자소씨 HI 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 반면 자소씨 50% 에탄올 추출물, 자소씨 DW 추출물에서는 상대적으로 활성이 적은 것으로 나타났으며, 모든 추출물에서 농도에 따른 항산화 활성의 증가를 알 수 있었다. DPPH 활성과 마찬가지로 자소씨 DW 추출물의 경우 실온의 추출방법으로는 높은 항산화 활성이 나타나지 않으나, 고온/고압의 추출방법을 사용한 경우 항산화 활성이 강력하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 자소씨 추출물의 항산화 활성이 추출 방법에 따라 항산

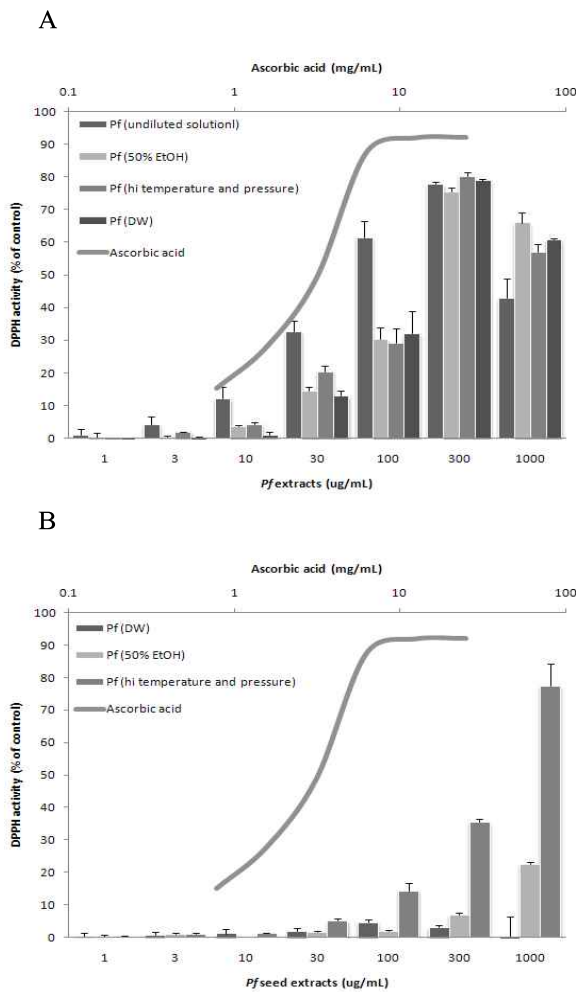


Fig. 1. Electron donation activity of *Perilla frutescens* L. (Pfl) extracts by DPPH assay (A, Pfl extracts; B, Pfl seed extracts). Data are denoted as means  $\pm$ (SD) of triplicate determinations.

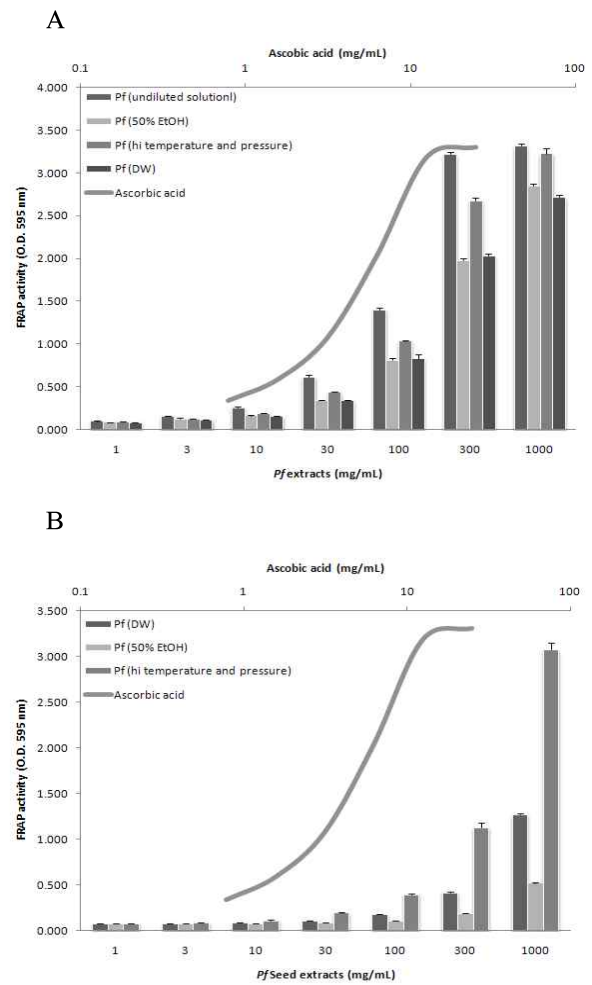


Fig. 2. Radical scavenging activity of *Perilla frutescens* L. (Pfl) extracts by FRAP assay (A, Pfl extracts; B, Pfl seed extracts). Data are denoted as means  $\pm$ (SD) of triplicate determinations.

화 활성의 차이를 확인 할 수 있는데, 이는 향후 자소씨의 이용에 있어 추출방법에 중요한 방법의 하나로 기대된다.

자소의 물과 에탄올 추출물을 이용한 항산화 활성 결과, 물 추출물에 비해 에탄올 추출물에서 보다 높은 항산화 활성을 확인 하였으며, ethyl acetate 분획물에서 더욱 높은 활성을 확인 할 수 있었다(15). 본 연구에서는 자소 추출물의 활성이 DW, 50% 에탄올에 다른 차이는 나타나지 않았지만 DW 추출물의 추출 환경에 다른 차이, 즉 고온/고압으로 추출한 것이 항산화 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 씨 추출물의 경우 더욱 큰 차이를 알 수 있었는데, 이는 시료가 가지는 특성에 기인한 것으로 판단되었다.

**아토피 억제활성**

자소 추출물을 이용하여 항아토피 활성을 마우스 동물 실험을 통해 확인 한 결과는 다음과 같다. 0.2 % DNFB를 처리한 군은 무처리군에 비해 귀의 손상이 크게 나타나며, 과도한 주름의 형성과 함께 두께 또한 크게 증가하는 것을

알 수 있었다. 반면 DNFB를 이용하여 아토피를 유도 한 후 자소 추출물을 처리한 경우 귀의 손상정도가 현저히 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 귀의 형태 또한 무처리 군과 비교하여서는 다소 손상이 있었으나, 아토피 유도군에 비해 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

아토피 유도에 의한 귀의 두께 변화를 알아본 결과, 무처리군에 비해 DNFB를 처리하여 아토피를 유발한 경우 약 4배의 귀의 두께가 두꺼워지는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 자소 추출물을 처리한 경우 약 3배 정도 증가에 그치는 것을 확인하였으며, 이는 약 30% 정도 두께의 감소를 나타내는 것으로 확인되었다. 귀 상피의 경우, 아토피를 유도한 군은 약 4배의 두께증가를 확인할 수 있었다. 반면, 자소 추출물을 처리한 군은 약 2.5배 증가하는 것에 그쳐 약 50% 정도 귀 상피 두께 증가를 완화시키는 것을 알 수 있었다.

DNFB는 면역반응을 유도하는 물질로 알려져 있다. 이를 이용하여 귀에 자가면역반응의 일종인 아토피를 유도한 후 자소추출물의 효능을 확인할 수 있었다. 면역반응이 유

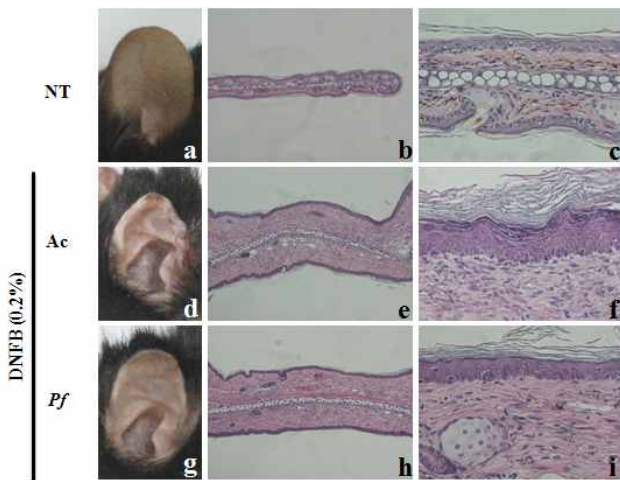


Fig. 3. *Perilla frutescens* L. (PFL) seed extract inhibits the dermatitis in mouse atopic models (photography a, d and g; HE staining at x100 b, e and h; HE staining at x400 c, f and i).

도되면 그 부위로 면역세포의 이동이 일어나는데 이때 면역 반응의 유도정도 및 이로 인한 손상정도에 따라 면역세포의 집중현상이 일어나므로 이를 H-E (Hematoxyline-Eosin) 염색을 통하여 확인해 보았다. 염증을 유도하지 않는 무처리 군에서는 염증을 유도하는 세포들이 거의 관찰되지 않지만, DNFB를 처리하여 염증을 유도한 경우 많은 수의 염증 세포들이 관찰 되는 것을 알 수 있었다. 반면, 여기에 자소추출물을 처리한 결과 면역세포의 수가 약 45% 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 백혈구의 일종인 eosinophil의 경우, DNFB에 의해 아토피가 유도된 군에 비해 약 65% 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

자가면역질환은 면역계의 이상으로 나타나는 질환으로 면역과민반응의 일종이다. 이는 T-세포에 의해 유도된다고

알려져 있는데, 영유아나 면역체계에 방어능력이 미약한 노령자에 대표적인 질환이 천식과 아토피이다(16). 이중 T-세포는 Th1과 Th2 세포로 분화를 하는데 정상인 경우 이 두 세포가 밸런스를 이루지만 천식환자들의 경우 Th2 세포의 비율이 높게 나타나며(17), 자소잎 추출물은 이러한 자가면역반응을 유도하는 Th2 세포를 억제하는 것으로 알려져 있다(18). 아토피는 천식과 함께 대표적인 자가면역질환으로 Th2 세포에 의해 유도되는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서 마우스 동물실험에서 자소 추출물에 의한 아토피 억제 활성을 확인 할 수 있었다. 자소는 항산화와 항염증이외에 항암(7), 우울증(19,20) 등의 여러 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 다양한 가공방법을 이용한 질환 예방소재 및 기능성 식품으로의 활용이 가능하리라 사료 된다.

## 요 약

자소는 여러 질환을 치료하는 식물로 알려져 있는데, 본 연구는 자소 추출물을 이용하여 항산화 활성 및 항염증 활성을 알아보았다. 자소 추출물을 이용한 DPPH, FRAP 실험 결과, 농도에 따른 항산화 활성을 확인할 수 있었으며, 자소추출물의 경우 고온/고압 추출시 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 마우스 동물모델을 이용한 항아토피 활성 결과 귀와 상피의 비후를 감소시키고, 면역세포의 침투현상을 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로, 자소는 항산화 및 염증완화 소재로 이용할 수 있음을 확인하였다.

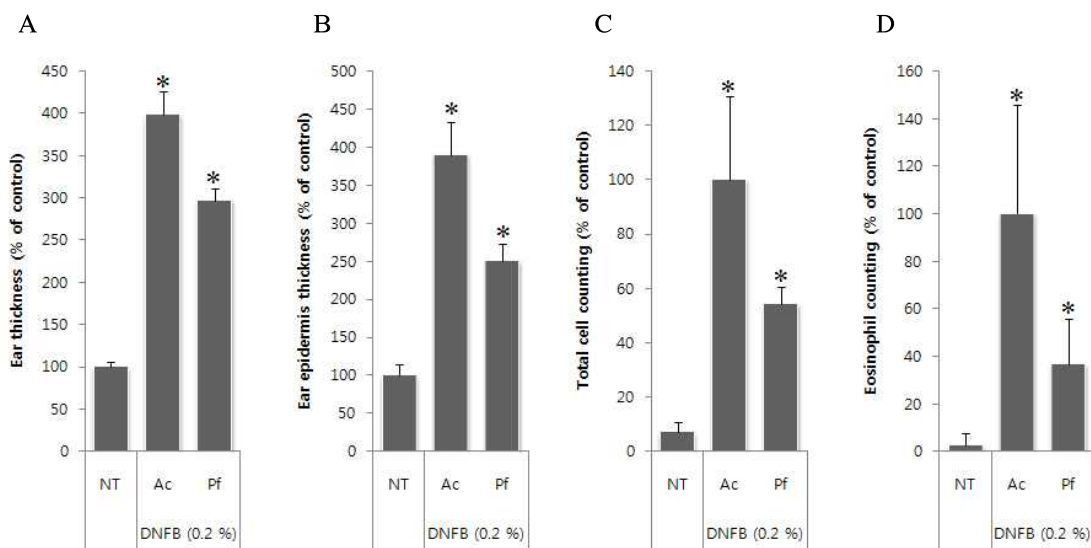


Fig. 4. Inhibition effects of *Perilla frutescens* L. (PFL) seed extract on ear thickness (A), ear epidermis thickness (B), total cell counting (C) and eosinophil counting (D) in DNFB-induced atopic models. \*P < 0.05 compared with only DNFB-induced group.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역산업공통기술개발사업의 지원(70004408-2009-02)으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. (2004) Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 25, 549-557
2. Eckert GP, Franke C, Nöldner M, Rau O, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Müller WE. (2010) Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *Pharmacol. Res.*, 61, 234-241
3. Schirmacher G, Skurk T, Hauner H, Grassmann J. (2010) Effect of *Spinacia oleracea* L. and *Perilla frutescens* L. on antioxidants and lipid peroxidation in an intervention study in healthy individuals. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 71-76
4. Jin CH, Lee HJ, Park YD, Choi DS, Kim DS, Kang SY, Seo KI, Jeong IY. (2010) Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon-beta-STAT-1 pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 860-867
5. Guo R, Pittler MH, Ernst E. (2007) Herbal medicines for the treatment of allergic rhinitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 99, 483-495
6. Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, Inoue KI, Sadakane K, Ichinose T, Yoshikawa T. (2004) Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin. Exp. Allergy*, 34, 971-977
7. Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. (2003) Inhibitory effect of Perilla leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 560-563
8. Yamamoto H, Ogawa T. (2002) Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 921-924
9. Simoniene G, Jurkstiene V, Jankauskiene K, Gailys V, Kevelaitis E, Venskutonis PR. (2005) The influence of common perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton) on non-specific cell-mediated immunity-phagocytosis activity. *Medicina (Kaunas)*, 41, 1042-1047
10. Heo JC, Park CH, Lee HJ, Kim SO, Kim TH, Lee SH. (2010) Amelioration of asthmatic inflammation by an aqueous extract of *Spinacia oleracea* Linn. *Int. J. Mol. Med.*, 25, 409-414
11. Heo JC, Woo SU, Kweon MA, Park JY, Lee HK, Son M, Rho JR, Lee SH. (2008) Aqueous extract of the *Helianthus annuus* seed alleviates asthmatic symptoms in vivo. *Int. J. Mol. Med.*, 21, 57-61
12. Heo JC, Park JY, Hwang JS, Park HC, Kang SW, Hwang SJ, Yun CY, Kwon TK, Lee SH. (2006) Comparison of *in vitro* antioxidant activity and cyclooxygenase-2 promoter inhibitory activity in *Harmonia axyridis* Pallas and *Coccinella septempunctata* Linne. *Korean J. Food Preserv.*, 13, 513-518
13. Heo JC, Park JY, Kwon TK, Chung SK, Kim SU, Lee SH. (2005) Development of high throughput screening techniques using food-borne library against anti-asthma agents. *Korean J. Food Preserv.*, 12, 267-274
14. Heo JC, Nam SH, Lee KG, Yeo JH, Yoon CS, Park CH, Nam SH, Son MS, Chung SK, Lee SH. (2009) Anti-immunomodulating activities in mycelial filtrates and culture broth of *Cordyceps ochraceostromat*. *Korean J. Food Preserv.*, 16, 253-258
15. Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kweon DJ, Choi UK. (2007) Antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo leaf. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 50, 327-333
16. Matsuzaki J, Tsuji T, Imazeki I, Ikeda H, Nishimura T. (2005) Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 38, 369-375
17. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. (2003) The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 454-462
18. Ishihara T, Okamoto I, Masaki N, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. (1999) Inhibition of antigen-specific T helper type 2 responses by *Perilla frutescens* extract. *Arerugi*, 48, 443-450
19. Tsuji M, Miyagawa K, Takeuchi T, Takeda H. (2008) Pharmacological characterization and mechanisms of the novel antidepressive- and/or anxiolytic-like substances identified from *Perillae Herba*. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 28, 159-167
20. Ito N, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. (2008) Antidepressant-like effect of 1-perillaldehyde in stress-induced depression-like model mice through regulation of the olfactory nervous system. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 16, 1-5