

Cellular system에서의 깻잎의 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스 개선 및 항노화 효과

김현영¹ · 황보라² · Ting Ting Wu² · 조은주^{2*}

¹경남과학기술대학교 식품과학부, ²부산대학교 식품영양학과 및 노인생활환경연구소

The protective effect of *Perilla frutescens* from ONOO⁻-induced oxidative stress and antiaging effect under cellular system

Hyun Young Kim¹, Bo Ra Hwang², Ting Ting Wu², Eun Ju Cho^{2*}

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea,

²Department of Food Science and Nutrition & Research Institute of Ecology for the Elderly, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received on 31 August 2012, revised on 5 November 2012, accepted on 8 November 2012

Abstract : In this study, we investigated the antioxidative and antiaging activity of *Perilla frutescens* using LLC-PK₁ porcine renal epithelial cell and WI-38 human diploid fibroblast cell. The extract from *Perilla frutescens* showed strong protective effect against nitric oxide (NO) and superoxide (O₂⁻)-induced oxidative stress generated by sodium nitroprusside (SNP) and pyrogallol, respectively. The result showed that *P. frutescens* increased the cell viability and showed scavenging activity of NO and O₂⁻. In addition, the extract of *P. frutescens* exerted the protective effect against peroxynitrite (ONOO⁻) induced by 3-morpholinosydnonimine. It suggests that *P. frutescens* would have the protective role against ONOO⁻ itself and its precursors, NO and O₂⁻. Furthermore, the aging model of hydrogen peroxide (H₂O₂)-treated WI-38 human diploid fibroblast was employed to investigate the anti-aging effect of *P. frutescens*. H₂O₂-treated WI-38 cells showed the loss of cell viability, however before-treatment with *P. frutescens* to WI-38 cells under premature senescence could delay the cellular aging process. The present study suggests the antioxidative and antiaging potential against free radical-induced oxidative damage of *P. frutescens*.

Key words : *Perilla frutescens*, Oxidative stress, Antiaging, Free radical, ONOO⁻

I. 서론

Superoxide(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 lipid peroxy radical(LOO⁻) 등을 포함한 reactive oxygen species(ROS)와 nitric oxide(NO), nitrogen dioxide(NO₂⁻), peroxynitrite(ONOO⁻), alkyl peroxynitrites(LOONO)등을 포함한 reactive nitrogen species(RNS)의 과잉 생성과 항산화 방어 시스템 간의 불균형으로 산화적 스트레스가 유발되며(Lim, 2004), 이는 염증성질환 및 알츠하이머와 같은 만성 질환의 병리학적 진행과 노화과정에 있어 중요한 원인으로 생각되어지고 있다(Bokov et al., 2004; Gibson

and Huang, 2005; Rath and Haller, 2011). 특히 이러한 노화 관련 병리의 공통 요인으로 작용하는 O₂⁻와 NO가 반응하여 생성된 ONOO⁻는 전구체보다 훨씬 강력한 산화력을 지니고 있다. ONOO⁻는 특히 염증 시에 많이 생성되며 주로 매크로파지, 호중구, 내피세포에서 생성된다. 이는 지질과산화 또는 thiol등의 아미노산을 변형시키며, 에너지 대사, DNA손상 등의 손상을 초래한다(Patel et al., 1999; Rubbo et al., 1996).

ROS와 RNS에 의한 손상을 개선시키기 위한 항산화 방어 시스템에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 같은 생체 내의 활성산소 제거 효소에 의해 조절되는 항산화시스템(Andersen et al., 1997)과 주로 음식을 통해 섭취하는 β-carotene, 비타민 C, 비타민 E 등의 비효

*Corresponding author: Tel: +82-51-510-2837

E-mail address: ejcho@pusan.ac.kr

소적인 항산화 시스템이 존재한다(Nuttall et al., 1999; Peng et al., 2000). 최근 들어 산화적 스트레스가 다양한 질환의 원인이 되고 있음이 밝혀져 이를 개선시킬 수 있는 항산화제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데 특히 식품을 통해 섭취하는 천연 항산화제가 유해성은 적으면서 효과적인 것으로 여겨지고 있다(Kuhn, 2003; Warnholtz and Munzel, 2000).

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Herba)는 중국과 동아시아가 원산지인 꿀풀과에 속하는 일년생 초본이다. 깻잎의 잎은 독특한 향미와 맛을 지니고 있어 식용으로 쓰이며 안토시아닌 계열 색소 및 플라보노이드 계열의 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Yamazaki and Saito, 2006). 또한 잎에는 칼슘, 철, 인, 마그네슘 등의 미네랄과 비타민 A, C 및 tyrosine, lysine, linolenic acid 등의 식물성 영양소가 포함되어 있다. 현재까지 알려진 깻잎의 생리활성으로는 열수 추출물 또는 메탄올 추출물에서 확인된 소염작용(Ueda et al., 2002), 항알러지 작용(Makino et al., 2003; Ueda et al., 2002), 항돌연변이 작용(Lee et al., 1993; Ueda et al., 2003), 및 항산화작용(Lee et al., 1993; Han et al., 2004; Zupko et al., 2001) 등이 있으나, ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스 개선 및 항노화 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 깻잎의 ONOO⁻ 및 이의 전구체에 의한 산화적 스트레스 개선효과 및 항노화 효과를 세포 모델을 이용하여 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포와 시료 및 시약

본 실험에 사용한 들깨(*Perilla Frutescens* var. *japonica* Herba)의 잎은 밀양지역에서 생산된 남천 들깻잎을 사용하였다. LLC-PK₁(porcine renal epithelial cell)과 WI-38 cell(human normal fibroblast cell, population doubling level(PDL) 23, PDL = last PDL + log₂(collected cell number/seeded cell number))은 ATCC(Solon, Ohio, USA)에서, 배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 fetal bovine serum(FBS)은 Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였으며, basal medium eagle(BME)과 penicillin-streptomycin은

WelGene Inc. (Daegu, South Korea)에서 구입하여 사용하였고, 산화적 스트레스를 유도시키기 위해 사용한 sodium nitroprusside(SNP)는 Wako(Tokyo, Japan)사 제품을 사용하였고, pyrogallol, 3-morpholinostydonimine(SIN-1), H₂O₂와 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 시료의 methanol(MeOH) 추출물 제조

시료는 동결건조 한 다음 분말화하여, 시료 중량의 20배 MeOH로 12시간 동안 추출하였고 동일한 과정을 3번 반복하여 얻어진 추출물을 모은 후 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축하였다. 깻잎의 MeOH 추출물의 수율은 23.43% 이고, -80°C 냉동고에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양

LLC-PK₁ cell은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin 과 5%의 FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3 회 배지를 교환하고 배양 6~7일 경 phosphate buffered saline(PBS)으로 1차 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 4~5일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 계대수를 기록하여 계대수가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 배양하여 실험하였다.

WI-38 cell은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin 과 10%의 FBS가 함유된 BME을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한번 배지를 교환하고 flask 내부에 세포가 가득 찬 상태가 되었을 때 PBS로 1차 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액으로 부착된 세포를 분리하여 원심분리해서 집적된 세포를 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7 일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

LLC-PK₁ 세포가 flask 내부에 가득 찬 상태가 되면

96-well plate에 well당 1×10^4 cells/mL로 분주하여 2시간 배양한 후 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 NO, O₂⁻와 ONOO⁻ generator인 SNP(0.6 mM), pyrogallol(0.5 mM), SIN-1(1 mM)을 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발 후, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 1 mg/mL의 MTT 용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983). WI-38 세포가 flask 내부에 가득 찬 상태가 되면 PDL 29의 WI-38 cell을 96-well plate에 well당 5×10^3 cells/mL로 분주하여 2시간 배양하였다. 먼저 시료를 농도별로 24시간 처리한 후 산화적 스트레스에 의한 세포 노화를 유도하기 위해 H₂O₂(300 μM)를 1시간 처리한 후, 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다(Mosmann, 1983).

5. 통계분석

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군의 실험 결과는 one way ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 깻잎의 cellular system에서의 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스 개선효과

SNP는 NO 생성 화합물로서 neuroprotective agent로

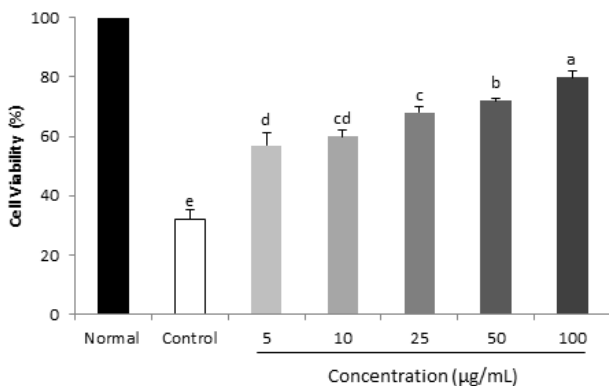


Fig. 1. Effect of *P. frutescens* on viability of LLC-PK₁ cells treated with SNP. Values are mean ± SD.

^{a-c}Means with the different letters on the bar graph are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

작용한다(Nunokawa and Tanaka, 1992). 또한 SNP는 말초 혈관확장제로 임상에서 고혈압성 응급상태의 치료제로도 사용된다. 본 연구에서는 활성 질소에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보기 위하여 LLC-PK₁ cell에 SNP 처리로 NO를 유발시켜서 산화적 스트레스를 가한 후 이에 대한 깻잎의 보호 효과를 세포 생존율로 확인하였다. SNP를 처리한 대조군은 정상군에 비해 세포 생존율이 30% 정도 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었다. 반면 깻잎을 처리한 군에 있어서는 세포 생존율이 농도 의존적으로 상승하였고 최종농도에서는 75% 이상의 세포생존율을 확인하였다(Fig. 1). 이는 깻잎이 NO 소거를 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 가지는 것을 알 수 있다.

Pyrogallol은 방향족 고리구조에 수산기가 3, 4, 5번에 결합된 구조를 갖는 페놀화합물로서 활성산소종인 O₂⁻인 생성제이며 H₂O₂의 전구물질이다. 세균, 토양 및 식물로부터 생산할 수 있다. Pyrogallol에 의해 생성된 O₂⁻는 NO와 결합하여 더욱 강력한 ONOO⁻을 형성한다. Fig. 2는 pyrogallol을 처리한 LLC-PK₁ cell에 대한 깻잎 추출물의 보호효과를 세포 생존율로 나타낸 결과이다. Pyrogallol만을 처리한 대조군의 경우 정상군에 비해 낮은 생존율을 보인 반면, 깻잎 추출물을 농도별로 처리한 군은 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하여 pyrogallol에 의한 LLC-PK₁ cell의 산화적 스트레스에 대해 개선 효과가 있음을 보여준다.

SIN-1은 NO와 O₂⁻를 생성하고 이들은 급속한 반응으로 ONOO⁻를 형성하며, 강력한 cytotoxic oxidants로 분해되기 때문에 독성 효과를 나타내게 된다. ONOO⁻는 protein,

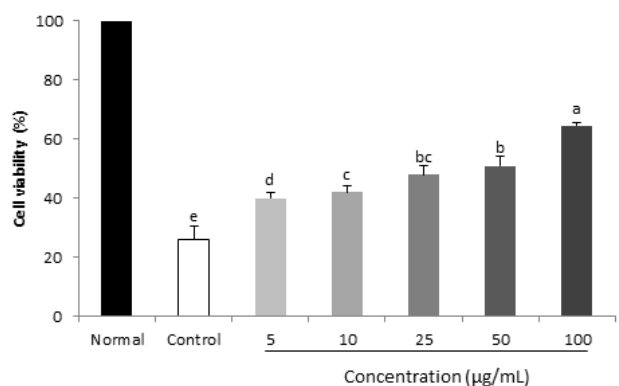


Fig. 2. Effect of *P. frutescens* on viability of LLC-PK₁ cells treated with pyrogallol. Values are mean ± SD.

^{a-c}Means with the different letters on the bar graph are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

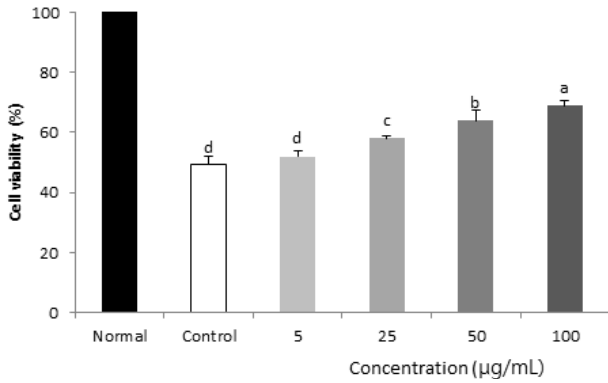


Fig. 3. Effect of *P. frutescens* on viability of LLC-PK₁ cells treated with SIN-1. Values are mean ± SD. ^{a-d}Means with the different letters on the bar graph are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

amino acid, DNA등과 반응하여 세포 및 조직손상을 야기할 뿐만 아니라 염증반응 및 동맥경화에 관여하고 NO signalling을 저해하여 여러 만성 질환에 발생에 관여한다 (Radi et al., 1991). 염증매개물질로 알려진 NO는 혈압 조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성된다(Galla, 1993). NO가 필요 이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응이 유발되어 조직손상 등의 유해한 작용을 나타낸다(McCartney-Francis et al., 1993). 본 연구에서는 LLC-PK₁ cell에 SIN-1을 처리하여 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 깻잎의 보호 효과를 세포 생존율을 통해 살펴보았다(Fig. 3). SIN-1만을 처리한 대조군은 세포 손상으로 생존율이 49.2%로 감소한 반면 깻잎을 농도별로 처리한 후 생존율이 농도 의존적으로 증가하여 100 µg/mL 처리 시 68.9%로 나타나 ONOO⁻에 대한 직접적인 소거능을 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 보이는 것으로 사료된다.

2. 세포 모델에서 급성 산화적 스트레스에 대한 항노화 효과

어린아이의 폐에서 유래한 WI-38 cell에 깻잎 추출물 및 분획물을 전 처리한 후 H₂O₂ 300 µM로 급성 산화적 스트레스에 대한 조기노화를 유도하여 세포 생존율을 측정함으로써 깻잎 추출물 및 분획물이 노화 예방 효과를 가지는 지에 대해 검토하였다.

깻잎추출물의 효과를 살펴보면 WI-38 cell에 H₂O₂만을

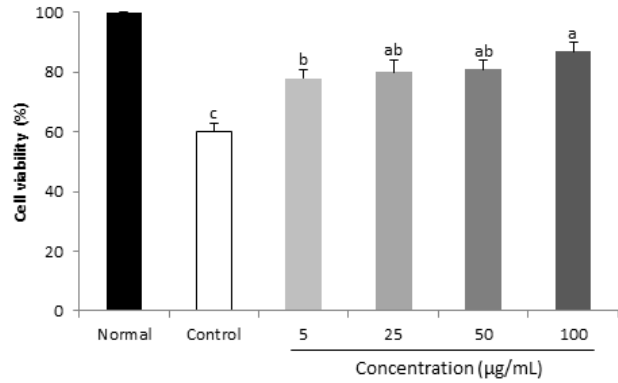


Fig. 4. Protective effect of *P. frutescens* from H₂O₂-induced premature senescence. Values are mean ± SD. ^{a-c}Means with the different letters on the bar graph are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

처리한 대조군의 경우 세포 생존율이 60%로 정상군에 비해 세포노화가 유도되었음을 확인 할 수 있었다. 반면 깻잎추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 상승한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 깻잎의 최종농도인 100 µg/mL에서는 85%의 세포 생존율을 보였다(Fig. 4).

IV. 결론

본 연구에서는 깻잎의 MeOH 추출물을 LLC-PK₁ cell과 WI-38 cell을 이용하여 ONOO⁻ 및 이의 전구체인 NO와 O₂⁻에 의한 산화적 스트레스 개선 및 항노화 효과를 살펴보았다. 깻잎추출물은 LLC-PK₁ cell을 이용한 세포 실험 모델에서 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호 효과는 물론 이의 전구체인 NO와 O₂⁻에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대해서도 우수한 보호효과를 보여 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다. 또한 WI-38 cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 조기노화에 의한 항노화 효과를 살펴본 결과에서도, 깻잎의 추출물은 감소된 세포생존율을 유의적으로 증가시켜 노화를 지연시키는 항노화 효과가 있음을 확인하였다.

참고 문헌

Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. 1997. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 43: 562-568.

Bokov A, Chauhuri A, Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and*

- Development. 125: 811-826.
- Galla HJ. 1993. Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angewandte Chemie International Edition* 32: 378-380.
- Gibson GE, Huang HM. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 26, 575-578.
- Han HS, Park JH, Choe HJ, Son JH, Kim YH, Kim S and Choe C. 2004. Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *Journal of the Korean Society of Food Culture* 19: 94-105.
- Kuhn M. Oxygen free radicals and antioxidants: An overview of now how antioxidants protect the body from disease. 2003. *American Journal of Nursing* 103: 58-62.
- Lee KI, Rhee SH, Kim JO, Chung HY and Park KY. 1993. Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 22: 175-180.
- Lim DG. 2004. Oxidative stress; reactive oxygen species and nitric oxide. *Korean Journal of Critical Care Medicine* 19: 2.
- Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K and Kano Y. 2003. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytotherapy Research* 17: 240-243.
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine* 178: 749-754.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Nunokawa Y, Tanaka S. 1992. Interferon- γ inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188: 409-415.
- Nuttall SL, Kendall MJ, Martin U. 1999. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians* 92: 239-244.
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 385-400.
- Peng J, Jones GL, Watson K. 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1598-1606.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288: 481-487.
- Rath E, Haller D. 2011. Inflammation and cellular stress: a mechanistic link between immune-mediated and metabolically driven pathologies. *European Journal of Nutrition* 50: 219-233.
- Rubbo H, Darley-Usmar V and Freeman BA. 1996. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chemical Research in Toxicology* 9: 809-820.
- Ueda H, Yamazaki C and Yamazaki M. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25: 1197-1202.
- Ueda H, Yamazaki C and Yamazaki M. 2003. Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26: 560-563.
- Warnholtz A, Munzel T. 2000. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit?. *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine* 1: 38-40.
- Yamazaki M and Saito K. 2006. Isolation and characterization of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in *Perilla frutescens* var. *crispa* by differential display. *Methods in Molecular Biology* 317: 255-266.
- Zupko I, Hohmann J, Redei D, Falkay G, Janicsak G and Mathe I. 2001. Antioxidant activity of leaves of salvia species in enzyme-dependent and enzyme-independent system of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Medica* 67: 366-368.