

HaCaT 피부각질세포에서 들깨잎 추출물의 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과

지 나 · 송가락 · 길정하 · 박건영[†]

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Protective Effects of *Perilla frutescens* Britt var. *japonica* Extracts from Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes

Na Ji, Jia-Le Song, Jeung-Ha Kil, and Kun-Young Park[†]

Dept. of Food Science and Nutrition and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

The aim of this study was to investigate the protective effects of methanolic extract from perilla (*Perilla frutescens* Britt var. *japonica*) leaves (PLME) on oxidative injury from hydrogen peroxide (H₂O₂) in human HaCaT keratinocytes. Cells were co-incubated with various concentrations (0~200 µg/mL) of PLME for 24 hr, and then exposed to H₂O₂ (500 µM) for 4 hr. H₂O₂ significantly decreased cell viability (p<0.05). However, PLME provided protection from H₂O₂-induced HaCaT cell oxidation in a dose-dependent manner. To further investigate the protective effects of PLME on H₂O₂-induced oxidative stress in HaCaT cells, the cellular levels of lipid peroxidation, and antioxidant enzymes (including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and catalase (CAT)) were measured. PLME decreased cellular levels of lipid peroxidation, and also increased the activities of antioxidant enzymes. In addition, the antioxidant activities of PLME were also determined by DPPH and hydroxyl (·OH) radical scavenging assay, and major antioxidant compounds of PLME were measured by colorimetric methods. DPPH and ·OH radical scavenging activities of PLME increased in a dose dependent manner and was similar to the DPPH scavenging activity of ascorbic acid at 50 µg/mL; however PLME activities were stronger than ascorbic acid (50 µg/mL) in the ·OH scavenging assay. The amounts of antioxidant compounds, including total polyphenolics, total flavonoids, and total ascorbic acid from PLME were 52.2±1.1 mg gallic acid (GAE)/g, 33.7±4.7 mg rutin (RUE)/g, and 17.0±0.5 mg ascorbic acid (AA)/g, respectively. These results suggest that PLME has a strong free radical-scavenging activity and a protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress in the keratinocytes.

Key words: *Perilla frutescens* leave, HaCaT keratinocytes, oxidative stress, free radical scavenging activity

서 론

인체 피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있으며, 이 중 표피에 있는 각질세포(keratinocytes)는 외부 자극(화학 및 물리적)으로부터 신체를 보호하고, 체온 조절, 보습 유지 등의 작용을 한다. 하지만 각질세포는 이런 외부 자극에 의해 세포내에 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으킨다. 산화적 스트레스와 reactive oxygen species(ROS)는 다양한 기전을 통하여 암, 염증, 심장질환, 당뇨병, 비만 및 노화 등의 여러 가지 질병의 발생과 진행에 관여한다(1,2). 과산화수소는 직접적으로 피부 각질 세포 내에서 산화적 스트레스를 유발하며(3), 과량의 ROS는 세포막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 지질과산화물질인 malondialdehyde(MDA)를 생성한다. 세포 내에 많은 MDA가 축적되면 세포막에서 교차결합, 중합 및 변성이 일어나 이온 수송, 효소 활성 및 세포 표면의 부착상태를 변형시키며 DNA의 염기

와 반응하여 돌연변이성 병변을 일으킨다고 알려져 있다(4).

들깨(*Perilla frutescens* Britt var. *japonica*) 잎은 겨낭 밀양 등이 주요 산지이며, 한국인이 즐겨 먹는 채소로 다양한 비타민(A, B₂ 및 C)이 풍부하고 K, P, Ca, Mg 등 미네랄과 아미노산이 많이 함유되어 있다(5,6). 들깨잎에 관한 연구 결과에는 DPPH free radical(7), peroxyntirite(8) 소거효과와 지질과산화 억제효과(9), HMG-CoA 환원효소 및 angiotensin converting 효소와 nitric oxide 합성 효소의 저해효과(7,8)가 보고되었고 항균(10), 암세포의 증식억제효과(10-12), 항피부종양(13), 항염증(14), 항산화(15,16) 및 항돌연변이(15), 항바이러스(17) 등의 효과가 관찰되었다. 들깨잎의 대표적인 생리활성 성분으로는 rosmarinic acid(18), luteolin(19), lignan(20) 및 phytol과 eicosatrienoic acid(15) 등이 보고되어 있다.

이상과 같이 과거 연구에서 들깨잎의 항산화 효능에 대한 다양한 보고가 있어 왔으나 들깨잎의 피부미용에 대한 효능,

[†]Corresponding author. E-mail: kunypark@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

특히 피부의 전반적 노화의 억제에 대한 세부적인 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 들깨잎 메탄올추출물의 피부각질 세포 보호작용 및 항산화 효과를 확인하기 위하여 인체 피부 각질세포인 HaCaT 세포에서 과산화수소(H_2O_2)로 유발된 산화적 스트레스의 감소효과를 측정하였다. 세포의 지질과산화물질인 MDA의 생성 억제효과를 관찰하고, 세포내에 항산화 효소(SOD, CAT 및 GSH-px)의 활성을 측정하였다. 또한 들깨잎 메탄올추출물의 DPPH 및 $\cdot OH$ free radical 소거효과, 항산화 작용의 중요한 성분인 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 아스코르브산 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

본 실험에서 사용한 들깨잎은 경상남도 밀양 농수산물 시장에서 신선한 상태로 구입하여 실험하였다. 동결건조 된 들깨잎 10 g에 메탄올 200 mL를 가하여 24시간 동안 교반하고, 이를 3회 반복한 후 filter paper(Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 45°C에서 감압농축 하여 메탄올추출물을 얻었다(15). 농축된 들깨잎 메탄올추출물(PLME)을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 세포주는 인체 유래 피부 keratinocyte인 HaCaT 세포주(조선대학교 단백질소재연구센터에서 제공받음)로 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL, Paisley, UK)에 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)과 항생제를 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 의 배양기(Model 3154, Forma Scientific Inc, Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 세포는 T75 세포 배양용 flask(Nunc, Rochester, NY, USA)의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 PBS로 가볍게 세척한 다음, 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco BRL)를 처리한 후, 37°C에서 5분간 방치한 후 세포를 채집하였다. 계대 배양은 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

세포 생존율 측정

들깨잎 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) assay(21)를 수행하였다. 96 well plate(Nunc)에 1×10^4 cell/mL의 농도로 HaCaT 세포를 분주하여 배양기(37°C, 5% CO_2)에서 24시간 동안 pre-incubation시킨 후 농도별로 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTT시약을 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소 작용에 의해 환원되도록 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정에 DMSO를 첨가하

여 녹인 다음 microplate reader(Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과 측정

산화적 스트레스 요인에 의한 세포 손상 보호효과는 MTT법을 변형하여 측정하였다. 먼저 HaCaT 세포를 96 well plate에 1×10^4 cell/mL 분주한 후, 배양기(37°C, 5% CO_2)에서 24시간 동안 방치하여 세포를 부착시켰다. 세포가 부착된 후 농도별로 PLME를 처리하고 배양기에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 배양이 끝난 후 산화적 스트레스를 유발하기 위해 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 500 μM 의 과산화수소를 처리하고 배양기에서 4시간 동안 방치하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정에 DMSO를 첨가하여 녹인 다음 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화 측정

지질과산화물 생성 정도는 세포에 PLME를 처리한 후 24시간 배양시킨 다음, 과산화수소(500 μM)를 처리하여 4시간 방치하고 세포 배양액을 제거한 후 0.1 M의 PBS(pH 7.4)로 3번 세척하여 세포를 모아 sonication한 다음, 4°C, 10,000 rpm에서 약 15분간 원심분리 하였다. 세포 상층액에 25% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL와 0.67% thiobarbituric acid(TBA) 1 mL를 첨가하여 95°C에서 30분간 가열하였다. 그 후 *n*-butanol 4 mL를 첨가하여 섞은 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물은 MDA의 양으로 환산하여 계산하였다(22).

항산화 효소 측정

세포내에 항산화 효소는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 및 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성을 측정하였다. 세포에 농도별로 PLME를 처리하고 24시간 배양시킨 다음, 500 μM 의 과산화수소를 처리하여 4시간 방치하고, 세포 배양액을 제거한 후 0.1 M의 PBS(pH 7.4)로 3번 세척하여 세포를 모아 sonication한 다음에 4°C, 10,000 rpm에서 약 15분간 원심분리 하였다. Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 540 nm에서 세포내 단백질의 함량을 측정하고, 세포 상등액을 이용하여 항산화 효소의 활성을 측정하였다.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund와 Marklund(23)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM PBS(pH 8.2) 8.7 mL에 세포 상등액을 넣은 후 0.3 mL의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 UV/VIS spectrophotometer(UV-2401PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용해 325 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 계산하였다. CAT 활성도의 측정은 과산화수소를 기질로

사용하여 spectrophotometer로 240 nm 파장에서 과산화수소가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성을 측정하는 Nelson과 Kiesow(24)의 방법에 의하여 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 과산화수소를 nmol로 나타내었다. GSH-px 활성도는 Lawrence와 Burk(25)의 방법에 따라 340 nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율로 측정하였다. GSH-px 활성 1 unit은 1분당 1 unit의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다.

항산화 효과 측정

DPPH free radical 소거 효과는 Blois(26)의 방법을 응용하여 실행하였다. DPPH는 150 μ M의 농도로 메탄올에 녹여 사용하였으며, DPPH 용액 100 μ L에 여러 농도의 시료 100 μ L를 각각 혼합하여 암소에서 30분 반응시킨 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl free radical(\cdot OH) 소거 효과는 Chung 등(27)의 방법에 따라 10 mM FeSO₄-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA)에 10 mM의 2-deoxyribose와 여러 농도의 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의 H₂O₂를 첨가하여 Fenton 반응에 따라 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% TCA 1.0 mL와 1.0 mL의 1.0% TBA 용액을 첨가하여 100°C water bath에서 10분간 반응시킨 다음 냉각시킨 후 532 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

총 폴리페놀 함량

시료의 메탄올추출물 g당 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 측정하였다(28). 추출물 희석액 0.1 mL에 2% Na₂CO₃용액을 2 mL 첨가하고 3분 후 Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL를 혼합하고, 30분 동안 방치 후 750 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(GAE)(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 gallic acid 기준으로 환산하여 mg GAE/g 단위로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량

시료의 메탄올추출물 g당 총 플라보노이드 함량은 diethylene glycol 비색법(29)을 이용하여 정량하였다. 추출물 희석액 0.2 mL에 diethylene glycol 2 mL, 1 N NaOH 0.2 mL를 첨가하여, 37°C의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Rutin(RUN)(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 rutin 기준으로 환산하여 mg RUN/g 단위로 나타내었다.

아스코르브산 함량

시료의 메탄올추출물 g당 아스코르브산 함량은 2,6-di-

chlorophenolindophenol(DCPIP) 비색법(30)을 이용하여 정량하였다. 추출물 0.05 g에 1% metaphosphoric acid 용액을 10 mL 첨가하고 1시간 교반 후 여과하였다. 1 mL 여과액에 9 mL의 DCPIP를 혼합하고, 30분 후 515 nm에서 UV/ VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid(AA)(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 아스코르브산 함량을 ascorbic acid 기준으로 환산하여 mg AA/g 단위로 나타내었다.

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System(v9.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

세포독성

인체 유래 정상 피부각질세포 HaCaT는 피부 재생, 미백과 관련된 많은 실험에서 사용되고 있다(31). HaCaT 세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PLME를 농도별로 처리하고, 24시간 배양한 후에 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다. PLME는 50 μ g/mL부터 200 μ g/mL까지 약 90% 이상의 HaCaT 세포 생존율을 유지하였으며, 300 μ g/mL 이상의 농도에서는 HaCaT 세포에 대해 독성 효과를 나타냈다(p<0.05)(Fig. 1). 이상의 결과로 보아 적당한 농도(50~200 μ g/mL)의 PLME는 HaCaT 세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며, 따라서 다음에 진행된 실험에서는 50 μ g/mL부터 200 μ g/mL까지의 PLME를 사용하였다.

세포 생존율

H₂O₂는 심근세포, 연골세포, 피부 섬유아세포 등 다양한

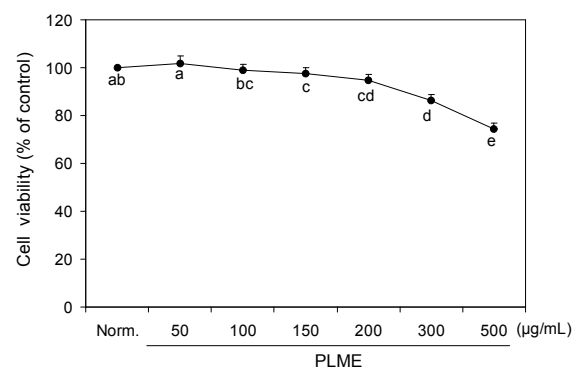


Fig. 1. Effects of perilla leaves methanolic extract (PLME) on cell viability of human HaCaT keratinocytes *in vitro*. ^{a-e}Mean values with different letters are significantly different (p < 0.05) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed mean \pm SD.

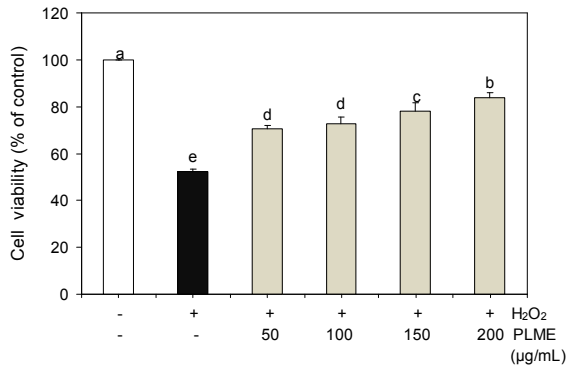


Fig. 2. Protective effect of perilla leaves methanolic extract (PLME) against oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in HaCaT keratinocytes. ^{a-e}Mean values with different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed mean \pm SD.

세포들의 세포자살을 유도한다(32). H_2O_2 에 의한 세포 독성이 PLME 처리에 의해 감소되는지 확인하기 위하여 MTT assay 방법으로 정상군과 H_2O_2 처리군, 그리고 H_2O_2 처리와 함께 PLME를 농도별로 처리한 군을 비교하였다. PLME를 24시간 동안 HaCaT세포에 처리한 후 500 μM 의 H_2O_2 를 4시간 동안 처리하였다. HaCaT세포에 H_2O_2 (500 μM)를 처리한 군에서는 세포 생존율이 49%로 정상군에 비해 세포손상이 유발되었음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 그러나 PLME를 세포에 농도별로 처리하였을 경우 H_2O_2 처리군에 비해 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다($p < 0.05$). 특히 200 $\mu g/mL$ 에서 81%로 정상군에 가까운 세포 생존율을 나타내어 H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스로 유발된 세포 손상에 대한 PLME의 보호효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

세포내 지질과산화물의 함량

지질과산화물은 세포의 산화적 스트레스로 인한 손상의 증거로 지질과산화의 반응생성물인 MDA를 triobarbituric acid reactive substance(TBARS)법으로 측정하여 PLME의 산화적 스트레스로 유발된 지질과산화 억제 효과를 확인하였다. HaCaT세포에 농도별로 PLME를 전처리한 후 H_2O_2 (500 μM)로 산화스트레스를 유도한 다음 지질과산화 정도를 측정함으로써 PLME의 지질과산화 억제 효과를 검토하였다. 정상군의 MDA 생성량은 0.63 ± 0.07 nM/mg protein인데 비하여 H_2O_2 처리군은 1.36 ± 0.03 nM/mg protein으로 나타나 정상군에 비해 2.2배 이상 높았다. 불포화지방산,

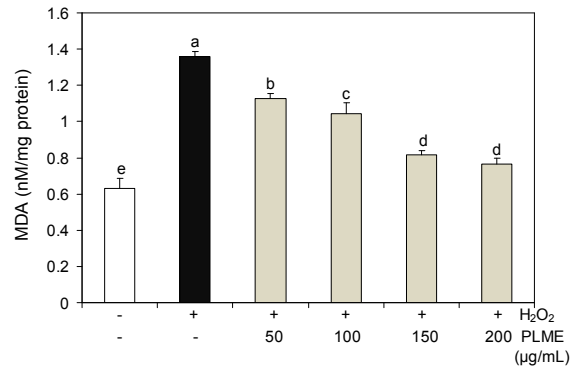


Fig. 3. Effects of perilla leaves methanolic extract (PLME) on lipid peroxidation in HaCaT keratinocytes exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2). ^{a-e}Mean values with different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed mean \pm SD. MDA: malonadehyde.

특히 세포막내에 많이 함유되어 있는 인지질은 free radical의 공격에 의하여 과산화되고 세포막이 파괴되면서 과산화물질이 증가된다. 불포화지방산이 과산화되면 hydroperoxide가 많이 생성된다. MDA는 hydroperoxide의 중요한 분해산물로서 MDA의 측정이 lipid peroxidation의 중요한 bio-marker로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 HaCaT세포에 농도별로 PLME를 전처리한 후 H_2O_2 (500 μM)를 처리하였을 때 H_2O_2 처리군에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 감소하여 세포손상에 의한 지질과산화물 생성이 PLME 처리에 의해 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 Lee 등(15)의 연구 결과에서는 PLME는 *in vitro*에서 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 로 유발된 ICR 마우스의 간 조직에서 MDA의 생성 억제 효과를 가진다고 보고하였다. 따라서 깻잎은 항산화효과를 나타내므로 산화와 관련된 여러 가지 퇴행성 질병의 예방에 도움을 줄 것으로 생각된다.

세포내 항산화효소 활성

500 μM 의 H_2O_2 으로 처리한 HaCaT세포에서 PLME가 항산화효소 SOD, CAT 및 GSH-px의 활성에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. HaCaT세포에 500 μM H_2O_2 를 처리하였을 때 SOD, CAT와 GSH-px의 활성이 현저히 감소되었다. SOD는 항산화 방어체계의 첫 번째 단계에서 독성이 강한 O_2^- 를 H_2O_2 로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소이며, 정상군의 SOD 활성은 21.3 ± 0.3 unit/mg protein, H_2O_2 처리군은 7.8 ± 0.7 unit/mg protein으로 나타났다. 그러나 PLME

Table 1. Effects of perilla leaves methanolic extract (PLME) on antioxidant enzyme activities in peroxide hydrogen (H_2O_2) treated HaCaT keratinocytes

	Normal	H_2O_2 (500 μM) + PLME ($\mu g/mL$)				
		0	50	100	150	200
SOD (unit/mg protein)	21.3 ± 0.3^a	7.8 ± 0.7^c	11.1 ± 0.1^d	12.7 ± 0.6^c	13.8 ± 0.5^b	14.3 ± 1.0^b
GSH-px (unit/mg protein)	5.6 ± 0.5^a	2.1 ± 0.3^d	2.5 ± 0.1^d	3.0 ± 0.3^c	3.5 ± 0.3^{bc}	3.9 ± 0.5^b
CAT (umole/mg protein/min)	5.1 ± 0.3^a	1.4 ± 0.2^d	1.6 ± 0.1^d	2.1 ± 0.4^c	2.5 ± 0.1^c	3.1 ± 0.1^b

Mean values with different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. All data were expressed mean \pm SD. SOD, superoxide dismutase; GSH-px, glutathione peroxidase; CAT, catalase.

를 농도별로 처리한 결과, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 11.1 ± 0.1 unit/mg protein 수준으로 SOD 활성이 회복되었으며, 농도가 100, 150, 200으로 증가됨에 따라 H_2O_2 처리군과 대조하여 그 활성의 회복 정도가 농도 의존적이면서 유의적($p < 0.05$)으로 증가되었다. GSH-px는 H_2O_2 와 환원형 glutathione으로부터 산화형 glutathione과 물을 생성하는 반응을 촉매시켜 생물체내의 과산화적 손상을 방지하는데, 정상군의 GSH-px 활성은 5.6 ± 0.5 unit/mg protein, H_2O_2 처리군은 2.1 ± 0.3 unit/mg protein으로 나타난 반면, PLME를 농도별로 처리한 실험군의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 3.0 ± 0.3 unit/mg protein 수준으로 GSH-px 활성이 회복되었으며 150 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 그 회복 정도가 농도 의존적이면서 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였다. 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군 역시 2.5 ± 0.1 unit/mg protein으로 나타나 H_2O_2 처리군에 비해 증가하는 양상을 보였다. CAT는 SOD로 인해 생성된 H_2O_2 를 물과 산소로 전환하는 작용을 촉매하는데, 정상군의 CAT활성은 5.1 ± 0.3 $\mu\text{mole/mg protein/min}$ 이었으며, H_2O_2 처리군은 1.4 ± 0.2 $\mu\text{mole/mg protein/min}$ 으로 나타났다. 이에 비해 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 2.1 ± 0.4 $\mu\text{mole/mg protein/min}$ 수준으로 CAT 활성이 회복되었으며 150 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 그 회복 정도가 농도 의존적이면서 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였다. 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 PLME 처리군에서도 1.6 ± 0.1 $\mu\text{mole/mg protein/min}$ 수준으로 H_2O_2 처리군에 비해 증가하였다. 따라서 본 연구에서는 HaCaT세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 SOD, CAT 및 GSH-px 등 항산화 효소들의 활성이 떨어졌으나 PLME를 동시에 처리하였을 때에는 모든 항산화 효소의 활성이 회복되어 산화적 스트레스가 유발된 세포의 손상이 완화되었다.

DPPH 및 hydroxyl($\cdot\text{OH}$) radical 소거 효과

DPPH는 짙은 자주색을 나타내며, 그 자체가 질소 중심의 radical로 radical전자의 비원재화에 의해 안정한 구조의 radical로 존재한다(33). DPPH radical 소거 능력은 식물 추출물과 식품의 항산화능력을 측정하는 대표적 방법으로써 PLME의 측정 결과는 Fig. 4와 같다. PLME는 농도 의존적으로 DPPH free radical 소거능이 증가함이 관찰되었다. 특히 천연 항산화제인 아스코르브산(50 $\mu\text{g/mL}$)은 DPPH radical 소거능이 약 60%로 나타났는데, PLME(50~200 $\mu\text{g/mL}$)는 아스코르브산(50 $\mu\text{g/mL}$)과 비슷한 효과를 보였다. 이는 DPPH radical 소거능에 대한 Chou 등(34)의 연구 결과와 비슷하다.

또한 hydroxyl radical은 활성산소 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크며, 이 hydroxyl radical은 세포막 분해, 단백질 분해, 지방산화, DNA 손상, DNA 손상으로 유발된 돌연변이 등을 일으켜 세포의 정상기능을 파괴시키고 세포 사멸을 초래하게 된다. PLME의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거 능력 측정 결과는 Fig. 5와 같다. 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도에서 PLME의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거 능력은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 천연 항산화제인

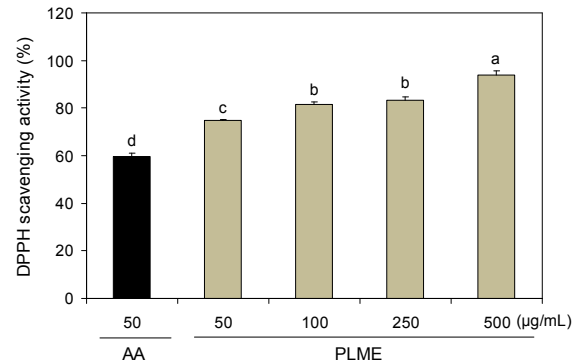


Fig. 4. DPPH free radical scavenging activity of perilla leaves methanolic extract (PLME). ^{a-d}Mean values with different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed mean \pm SD. AA: ascorbic acid.

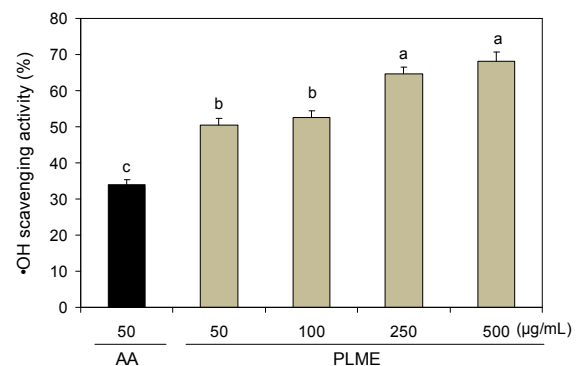


Fig. 5. Hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) radical scavenging activity of perilla leaves methanolic extract (PLME). ^{a-c}Mean values with different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed mean \pm SD. AA: ascorbic acid.

아스코르브산의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능(34%)과 비교하였을 때 높게 나타났다.

총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 아스코르브산 함량

폴리페놀물질은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가지고 있으며 항산화, 항균, 항암, 항당뇨 및 심장질환 예방 효과 등의 다양한 생리활성을 가진다(35,36). 플라보노이드는 식물에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소로 페닐기 2개가 C_3 사슬을 매개하여 결합한 탄소골격구조로 되어 있고, 항균, 항암, 항바이러스, 항염증 및 항알레르기 등 다양한 생리활성을 가지고 있으며, 생체 내에서 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다(37). 아스코르브산 또한 우수한 항산화 능력을 가지고 있다. PLME가 함유하고 있는 항산화물질인 폴리페놀류, 플라보노이드류, 아스코르브산의 함량을 측정 한 결과, 총 페놀류 화합물은 52.2 ± 1.1 mg GAE/g, 총 플라보노이드 화합물은 33.7 ± 4.7 mg RUE/g, 아스코르브산의 함량은 17.0 ± 0.5 mg AA/g으로 나타났다(Table 2). 이는 Kim 등(38)과 Meng 등(39)의 연구에서 보고한 총 폴리페놀

Table 2. Total polyphenolics, total flavonoid and ascorbic acid contents of perilla leaves methanolic extract (PLME)

Sample	Antioxidant compounds		
	Total phenolics (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg RUE/g)	Ascorbic acid (mg AA/g)
PLME	52.2±1.1	33.7±4.7	17.0±0.5

All data were expressed mean±SD. GAE, gallic acid; RUE, rutin; AA, ascorbic acid.

류 함량(38.0±6.7~54.8±2.1 mg/g)과 유사한 결과를 보였고, Kim 등(38)의 결과(38.0±6.7 mg/g)와 비교하였을 때 총 폴리페놀류 함량이 높게 나타났다. 한편 한국산 들깨잎은 중국산 들깨잎과 비교하였을 때 총 폴리페놀류 함량이 높게 나타났다(34,39). 총 플라보노이드류의 측정 결과는 Chou 등(34)과 Meng 등(39)의 연구 결과(29.2±3.3 mg/g)와 비슷하게 나타났다. 따라서 이러한 항산화물질(폴리페놀류, 플라보노이드류, 아스코르브산)을 많이 함유하고 있는 들깨잎을 이용하여 식품이나 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

들깨잎 메탄올추출물(PLME)이 가지는 산화적 스트레스 개선효과를 확인하기 위하여 H₂O₂으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 피부 각질세포의 보호효과를 조사하였다. 또한 PLME의 항산화 능력을 확인하기 위하여 DPPH, hydroxyl free radical 소거능 및 총 항산화물질(페놀류, 플라보노이드류 및 아스코르브산) 함량을 조사하였다. H₂O₂(500 µM)에 의한 산화적 스트레스가 유발된 HaCaT세포에 PLME를 처리한 결과, 농도 의존적으로 세포의 생존율이 증가하였고, 세포 지질과산화물질 MDA의 생성효과는 PLME 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다. 또한 H₂O₂로 인하여 세포내 항산화효소인 SOD, GSH-px와 CAT 등의 활성이 감소된 HaCaT세포에 PLME를 처리했을 때, 이들 효소의 활성이 농도 의존적으로 증가되었다. PLME의 DPPH와 hydroxyl radical 소거능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가함을 알 수 있었다. 50 µg/mL 이상 농도의 PLME의 DPPH 소거능은 60%의 저해율을 나타낸 천연항산화제인 아스코르브산(50 µg/mL)과 유사한 효과를 보였고, ·OH radical 소거능은 아스코르브산(50 µg/mL)보다 높은 결과를 나타냈다. 또한 PLME가 함유하고 있는 항산화물질인 폴리페놀류, 플라보노이드류, 아스코르브산의 함량을 측정한 결과 총 페놀류화합물은 52.2±1.1 mg GAE/g, 총 플라보노이드화합물은 33.7±4.7 mg RUE/g, 아스코르브산의 함량은 17.0±0.5 mg AA/g으로 나타났다. HaCaT 세포에서 H₂O₂에 의해 발생하는 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 측정한 결과 PLME는 세포 사멸을 방지하고, 세포 지질과산화물질(MDA)의 생성을 억제하여 세포내 항산화효소의 활성을 증가시키는 효과를 가지는 것으로 보

인다. 이상의 결과로 들깨잎 메탄올추출물은 인체 피부각질 세포에 대한 보호 작용과 *in vitro*에서의 항산화 능력이 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Halliwell B, Gutteridge JM. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8: 89-193.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545.
- Applegate LA, Noel A, Vile G, Frenk E, Tyrrell RM. 1995. Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. *Photochem Photobiol* 61: 285-291.
- Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
- Lee KI, Rhee SH, Kim JO, Chung HY, Park KY. 1999. Anticancer activity of phytol and eicosatrienoic acid identified from perilla leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1107-1112.
- Kim ES, Im KJ. 1977. A study on oxalic acid and calcium content in Korean foods. *Korean J Nutr* 4: 104-110.
- Hyun KW, Kim JH, Song KJ, Lee JB, Jang JH, Kim YS, Lee JS. 2003. Physiological functionality in Geumsan perilla leaves from greenhouse and field cultivation. *Korean J Food Sci Technol* 35: 975-979.
- Kim JY, Kim JS, Jung CS, Jin CB, Ryu JH. 2007. Inhibitory activity of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenging activity of extract of *Perilla frutescens*. *Kor J Pharmacogn* 38: 1-24.
- Oh SI, Lee MS. 2003. Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1344-1350.
- Jo MJ, Min KJ. 2007. Antimicrobial activity against oral microbes and growth-inhibitory effect of oral tumor cell of extract of *Perilla* and *Mugwort*. *Korean J Env Hlth* 3: 115-122.
- Park KY, Lee KI, Rhee SH. 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.
- Kwak CS, Yeo EJ, Moon SC, Kim YW, Ahn HJ, Park SC. 2009. Perilla leaf, *Perilla frutescens*, induces apoptosis and G1 phase arrest in human leukemia HL-60 cells through the combinations of death receptor-mediated, mitochondrial, and endoplasmic reticulum stress-induced pathways. *J Med Food* 12: 508-517.
- 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.
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H. 2004. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-pro-

- moting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 85-90.
15. Lee KI, Rhee SH, Kim JO, Chung HY, Park KY. 1993. Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 175-180.
 16. Saita E, Kishimoto Y, Tani M, Iizuka M, Toyozaki M, Sugihara N, Kondo K. 2012. Antioxidant activities of *Perilla frutescens* against low-density lipoprotein oxidation *in vitro* and in human subjects. *J Oleo Sci* 61: 113-120.
 17. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, Oishi I, Inami R, Yamane M, Nakamura M, Murata H, Nakanishi T. 1998. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biol Pharm Bull* 21: 829-833.
 18. Okuda T, Hatano T, Agata I, Nishibe S. 1986. The components of tannic activities in Labiatae plants. I. Rosmarinic acid from labiatae plants in Japan. *Yakugaku Zasshi* 106: 1108-1111.
 19. Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 25: 1197-1202.
 20. Ryu JH, Son HJ, Lee SH, Sohn DH. 2002. Two neolignans from *Perilla frutescens* and their inhibition of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 649-651.
 21. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 47: 5875-5879.
 22. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric-reactive substance in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biol Med* 4: 155-161.
 23. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 24. Nelson DP, Kiesow LA. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 49: 474-478.
 25. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
 26. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 27. Chung SK, Osawwa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 118-123.
 28. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
 29. NFRI. 1990. *Manuals of quality characteristic analysis for food quality evaluation (2)*. National Food Research Institute, Skuba, Japan. p 61.
 30. Klein BP, Perry AK. 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J Food Sci* 47: 941-945.
 31. Park HJ, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Gallo RL, Cho DH. 2007. Adrenocorticotropin hormone stimulates interleukin-18 expression in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127: 1210-1216.
 32. Yuan J, Murrell GC, Trickett A, Wang M. 2003. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblast. *Biochim Biophys Acta* 1641: 35-41.
 33. Soare JR, Dinis TC, Cunha AP, Almeida LM. 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Res* 26: 469-478.
 34. Chou HJ, Kuo JT, Lin ES. 2009. Comparative antioxidant properties of water extracts from different parts of beefsteak plant (*Perilla frutescens*). *J Food Drug Anal* 17: 489-496.
 35. Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, D'Archivio M, Masella R. 2007. Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities. *Ann Ist Super Sanita* 43: 406-416.
 36. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. 2006. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 66: 2500-2505.
 37. Cushnie TP, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26: 343-356.
 38. Kim DH, Kim YC, Choi UK. 2011. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Staphylococcus aureus* using evolutionary operation factorial design technique. *Int J Mol Sci* 12: 2395-2407.
 39. Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. 2009. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules* 14: 133-140.

(2012년 11월 8일 접수; 2012년 12월 14일 채택)