

랫드에서의 *t*-BHP 유발 산화스트레스에 대한 기능성 들깨잎 열수 추출물의 간 보호 효과

양성용 · 강정한 · 이광원*

고려대학교 생명과학대학 식품공학부

Protective Effect of Functional *Perilla frutescens* Hot-water Extract Against *tert*-butyl hydroperoxide-Induced Liver Oxidative Damage in Rats

Sung-Yong Yang, Jeong-Han Kang and Kwang-Won Lee*

Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University
(Received October 31, 2012/Revised March 3, 2013/Accepted May 8, 2013)

ABSTRACT - *Perilla frutescens* usually dieted in East Asian country such as Korea and Japan. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *perilla* leaves have been founded. In previous study, we confirmed that caffeic acid, major compound of *perilla*, was accumulation by sucrose aqueous solution and thus antioxidant effect of *perilla* was enhanced. In this study, we investigated the protective effect of functional *perilla* leaves extract (PLE) against *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP) induced-oxidative hepatotoxicity. The pretreatment with PLE (250, 500 and 1000 mg/kg b.w.) for 5 days before a single dose of *t*-BHP (i.p.; 0.5 mmol/kg) significantly lowered the serum levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase dose-dependently. And we confirmed that the indicators of oxidative stress were remarkably reduced in the liver, such as the glutathione contents and malondialdehyde, marker of lipid peroxidation. Pathological histology of the rat livers tissues showed that PLE reduced the hepatocyte degeneration and neutrophilic infiltration of liver induced by *t*-BHP. These results suggest that functional *perilla frutescens* has the protective effect of liver against *t*-BHP-induced oxidative hepatic stress in rats.

Key words: functional *perilla frutescens*, liver, *tert*-butyl hydroperoxide, oxidative damage, protective effect

서 론

들깨(*Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara)는 꿀풀과의 일년생 초로 동아시아 지역, 특히 일본과 한국에서 많이 섭취되고 있다¹⁾. 특히 최근에는 웰빙에 대한 관심과 더불어 찜채소로서 소비량이 증가하고 있으며, 재배 기술의 발달을 통하여 다양한 품종의 보급과 연중 생산이 가능해졌다²⁾.

본 연구진은 선행연구를 통하여 들깨잎 열수 추출물을 이용하여 산화스트레스에 의한 랫드의 간 손상 보호 효과를 확인 하였으며³⁾ 들깨잎 추출물로부터 caffeic acid (CA)를 분리·동정하였으며 CA가 세포 내의 항산화 물질인 glutathione (GSH)를 생합성하는 γ -glutamylcysteine syntetase (γ -GCS) 효소의 활성을 증가시키고, 간 세포 내 GSH 함

량을 증가시킴으로써 산화스트레스에 대한 보호 활성을 확인하였다⁴⁾. CA는 phenolic compound로 다양한 식물체에 존재하며 항산화⁵⁾, 항암⁶⁾, 항염증⁷⁾ 효과도 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 설탕물 처리로 재배한 기능성 들깨잎은 일반적으로 재배한 들깨잎에 비하여 caffeic acid 함량이 증가하며 GSH의 증가를 통하여 산화스트레스에 대한 간 보호 활성이 증가함을 확인하였다⁸⁾.

산화스트레스는 빠르게 변화하는 현대 사회를 살아가는 인간에게 나타나는 대표적인 질병의 원인이 되는 것으로 공해물질 및 오염물질, 잘못된 식습관 또는 정신적 스트레스 등에 의하여 유발된다. 특히 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)는 산화스트레스를 직접적으로 유발하는 물질로 널리 알려져 있으며⁹⁻¹³⁾, 세포 내에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)를 생성하고¹⁴⁾ 이는 다양한 질병들의 기본적인 원인으로 작용하여 노화, 암¹⁵⁾, 면역저하^{16,17)}의 매개자 역할을 한다. 최근 ROS에 대하여 다양한 연구들이 보고되고 있으며, 특히 간, 신장 등의 인체 기관에 미치는 산화스트레스에 대한 연구는 많이 이루어지고 있다^{18,19)}.

*Correspondence to: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong 5-ga, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

이에 본 연구진은 랫드에 설탕물 처리를 통하여 재배한 기능성 들깨잎 추출물(*Perilla frutescens* leaves extract; PLE)의 산화스트레스에 대한 간 보호 효과를 과학적으로 확인하고, 간 보호 활성을 기대할 수 있는 최적의 투여 농도를 확인하였다. 본 연구는 기능성 들깨잎 추출물을 농도에 따라 투여함으로써 *t*-BHP로 간에 유발된 산화스트레스에 대해 어떠한 영향을 미치고, 보호효과를 가질 수 있는지 규명하여 추후 기능성 후보소재로 개발하는데 지표로 활용될 것이다.

재료 및 방법

시험물질 및 열수 추출물 조제

본 실험에 사용된 기능성 들깨잎은 영남농업기술시험장에서 분양받은 종자를 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2010년 9월에 파종하여 11월에 온실재배 후 수확한 것을 -70°C 로 보관하여 시료로 사용하였으며, 선행연구를 통해 재배조건을 달리하여 일반 들깨잎보다 항산화력 및 생리활성성분 함량이 가장 우수했던 175 mM 설탕물 재배 들깨잎을 사용하였다.

들깨잎을 동결건조하여 건물을 얻은 후, 30 g의 들깨잎 건물에 1 L의 증류수를 넣어서 3시간 동안 환류 추출 후 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

시험 동물 및 사육환경

시험 동물은 7~8 주령의 Sprague-Dawley rat (SD rat)을 (주) 샘타코에서 구입하여 사용하였다. 먼저 1주일간 검역 및 순화를 실시 한 후 건강하다고 판정된 것 중 체중이 260 ± 5 g인 것을 선별하여 시험에 사용하였다. 사육 조건은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명 시간 12시간 (08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux, 환기회수 10~20 회/hr로 설정된 환경에서 랫드 사육상자(225 W × 200 L × 180 H mm)당 1마리를 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물 실험은 고려대학교 동물 윤리 규정(KUIACUC-20100319-2)을 따라 진행하였다.

실험그룹과 투여물질

실험 그룹은 총 5개의 그룹으로, 아무것도 처리하지 않은 대조군, *t*-BHP 를 처리하여 산화스트레스를 유발한 음성 대조군, PLE 250, 500, 1000 mg/kg b.w. 의 농도로 경구 투여 후 *t*-BHP를 처리한 그룹이다. 각 그룹의 랫드는 무작위적으로 배정하였으며 PLE투여는 임상적용경로와 같이 경구로 투여하였다. PLE를 농도별로 1일 1회 6일간 같은 시각에 투여하였고, 마지막 날인 6일째 되는 날 *t*-BHP (0.5 mmol/kg b.w.)를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 대조군 그룹에는 *t*-BHP 대신 생리식염수를 복강 주사하였다.

혈액 및 간 조직 적출

랫드에 복강 주사 후 18시간이 경과하였을 때 랫드를 CO_2 로 마취시킨 후 혈액학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였다. 간 조직은 적출 후 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 한 후 분석 전까지 -70°C 에 보관하였다.

Reduced glutathion (GSH) 측정

간 조직 50 mg을 1.17% KCl을 함유한 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 1 mL에 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄한 후, 상등액을 얻는다. 이 조직분쇄 상등액에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)를 더한 후 100 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 잘 혼합하고 5분후에 412 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 이때 상등액 대신 GSH 표준품의 농도별 값을 구하여 검량곡선을 그린 후 시료의 GSH 함량(mM/g protein)을 측정하였다.

지질과산화물(Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 측정

GSH 측정과 같이 조직분쇄 상등액에 trichloroacetic acid buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 mL를 첨가한 후 잘 섞어준다. 그리고 95°C 수조에서 30분 동안 반응시킨 후에 상온에서 식힌 후 원심분리(1000 rpm, 10min) 하여 상층액을 얻어내고, 분광광도계를 이용하여 535 nm 에서 측정하였다²⁰⁾. 이 때, TBARS의 표준곡선은 1,1,3,3-tetraethoxypropane의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) 당량의 표준곡선을 계산한 후 이에 따른 측정치를 MDA 농도(mmol/g protein)으로 표기 하였다.

혈액생화학적 수치 검사

혈액은 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 얻은 혈장으로 혈액학적 수치를 측정하였다. 혈액학적 수치는 lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) kit를 Simens로부터 구입하여 측정하였다²¹⁾.

조직병리학적 검사

간 조직을 10% 포르말린에 고정시킨 후, 탈수와 청명과정을 거쳐 파라핀 왁스로 포매하였다. 포매된 조직은 4 μm 두께로 박절한 후 유리 슬라이드에 부착시키고 Hemaxoylin-Eosin (H&E)로 염색하여 광학현미경으로 간 조직 손상 정도를 관찰하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며 SAS version 9.3 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하여

Tukey's studentized range test 방법을 이용하여 일원분산분석으로 유의차 검정을 실시하였고 $p < 0.05$ 이상의 경우에만 그룹 간 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

혈액생화학적 간 보호 활성

기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 활성을 관찰하기 위하여 간 기능의 혈액학적 지표인 AST와 ALT 효소 활성을 측정하였다. AST와 ALT는 간 손상을 확인하는 대표적인 효소로서 간세포의 괴사와 간조직의 파괴에 따라 간 손상이 발생할 경우 혈중으로 유리되어 활성이 증가하게 된다. LDH 효소는 세포막의 투과성과 조직의 형태 변화를 나타내는 지표로 간 손상이 진행될수록 활성이 증가하게 된다^{22,23}.

SD rat의 혈액으로부터 혈청을 분리하여 ALT, AST 그리고 LDH 효소 활성을 측정하였을 때 *t*-BHP를 처리한 음성 대조군에서 정상 대조군에 비하여 2.15, 2.95, 1.24배 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 ALT와 AST의 경우 기능성 들깨잎 추출물을 250 mg/kg b.w. 처리하였을 때 *t*-BHP 처리군에 비하여 0.80, 0.73배 감소한 것을 확인하였으며 투여 농도에 따라 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 1000 mg/kg b.w. 처리하였을 때 정상 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 정상 수준으로 회복시켰다. 하지만 LDH의 경우 250, 500 mg/kg b.w.에서 *t*-BHP와 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만 감소하는 경향을 나타내었으며 1000 mg/kg b.w. 투여 그룹에서는 ALT, AST와 마찬가지로 *t*-BHP만 처리한 음성 대조군에 비하여 유의적인 차이를 나타내며 0.75배 감소하는 것을 확인하였다(Table 1). 따라서 혈액생화학적 측면에서 볼 때, 기능성 들깨잎 추출물은 투여 농도에 따라 산화스트레스에 의한 간 손상으로부터 보호 활성을 나타내었다.

간 조직의 GSH 함량 측정

GSH는 자유 라디칼이나 과산화물에 의해 유발된 산화스트레스에 의한 손상을 막아주는 생체 내 항산화물질이다²⁴. GSH는 특히 간에 많이 존재하는 효소로, 외부에서

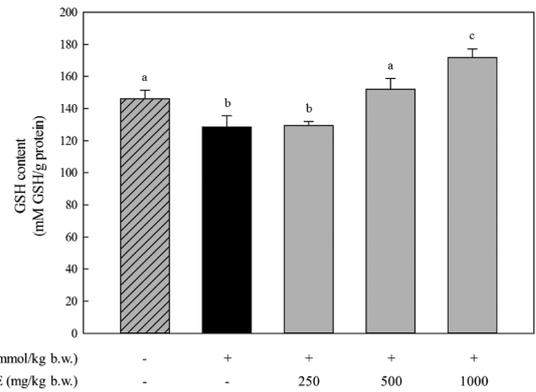


Fig. 1. Effects of pre-treatment with PLE on reduced glutathione induced by *t*-BHP in rats liver tissues. The results represent means \pm SD ($n = 3$). Means with different small letters (a, b, c) are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's studentized range tests.

들어온 독성 물질을 체외로 배출시키는 작용을 할 뿐만 아니라, 면역작용과 세포손상을 막아주는 매우 중요한 항산화 물질이다²⁵. GSH는 체내에서 자유 라디칼에 의해 산화적 형태인 GSSG로 변형되어 세포와 조직을 산화스트레스로부터 보호하고 GSH reductase에 의하여 GSSG는 다시 GSH로 환원된다²⁶.

SD rat을 이용한 본 시험에서 정상 대조군(146.0 ± 5.4 mM GSH/g protein)에 비해 *t*-BHP만 처리한 음성 대조군(128.6 ± 6.8 mM GSH/g protein)은 GSH가 감소하였다. 이는 간 조직에서 *t*-BHP에 의해 유발된 산화스트레스로 인해 간 조직의 GSH가 산화되어 GSSG로 바뀌면서 GSH가 많이 감소된 것으로 판단된다(Fig. 1). 기능성 들깨잎 추출물을 250 mg/kg b.w. 처리한 그룹(129.3 ± 2.6 mM GSH/g protein)에서는 음성 대조군에 비해 GSH 함량이 증가하지 않았지만, 500 mg/kg b.w. 투여한 그룹(151.9 ± 6.8 mM GSH/g protein)은 정상 대조군 수준으로 GSH 함량이 증가하였다. 또한 1000 mg/kg b.w. 처리군(171.9 ± 5.2 mM GSH/g protein)에서는 유의적으로 정상 대조군보다 높은 GSH 함량을 나타냈다. 기능성 들깨잎 추출물을 투여한 그룹은 GSH 함량이 농도 의존적으로 증가한 것으로 나타났으며, 특히 500 mg/kg b.w. 투여군부터 *t*-BHP에 의해 유발된 산화스트레

Table 1. Effects of PLE on serum enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) in rats treated *t*-BHP

Treatment ^{†)}	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (U/L)
Control	138 \pm 18.2 ^a	24 \pm 0.6 ^a	2287 \pm 41.3 ^a
<i>t</i> -BHP (0.5 mmol/kg b.w.)	298 \pm 31.3 ^b	71 \pm 11.1 ^b	2855 \pm 41.1 ^b
PLE (250 mg/kg b.w.) + <i>t</i> -BHP (0.5 mmol/kg b.w.)	238 \pm 6.1 ^c	52 \pm 4.0 ^c	2851 \pm 91.9 ^b
PLE (500 mg/kg b.w.) + <i>t</i> -BHP (0.5 mmol/kg b.w.)	213 \pm 6.0 ^{cd}	50 \pm 7.2 ^c	2389 \pm 261.5 ^{ab}
PLE (1000 mg/kg b.w.) + <i>t</i> -BHP (0.5 mmol/kg b.w.)	166 \pm 20.5 ^{ad}	37 \pm 2.6 ^{ac}	2044 \pm 312.6 ^a

^{†)}Animals were pre-treated with different concentration of PLE by gastric tube for 5 consecutive days before the administration of *t*-BHP. The rats were sacrificed 18 h later. Then, the serum AST, ALT, and LDH were determined. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's studentized range tests.

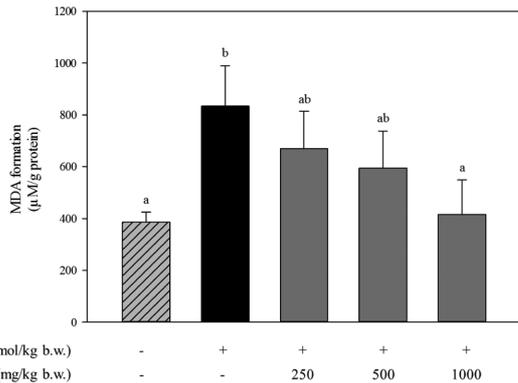


Fig. 2. Effects of pre-treatment with PLE on lipid peroxidation induced by *t*-BHP in rats liver tissues. The results represent means ± SD (n = 3). Means with different small letters (a, b, c) are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's studentized range tests.

스에 대한 간 보호 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 아무것도 처리하지 않은 정상상태의 대조군 그룹보다 기능성 들깨잎 추출물 1000 mg/kg b.w. 투여 그룹이 유의적 차이를 나타내며 더 높은 GSH 함량을 나타내 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 활성이 매우 높음을 확인할 수 있었다.

간 조직의 지질과산화 측정

간 손상의 지표로 간 조직의 지질과산화 생성물인 MDA를 측정하여 산화스트레스로 인한 간 조직 손상에 대하여 기능성 들깨잎 추출물의 보호 효과를 측정하였다. 지질과산화물은 ROS나 자유라디칼 등의 산화스트레스에 의하여 조직 내 인지질 세포막의 수소 원자가 제거되어 조직이 손상되며 생기는 것이다. 지질과산화 생성물은 세포막의 투과성을 증가시켜 혈액의 손실 및 단백질 변화를 유발하

여 동맥경화, 고혈압, 심장병 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다²⁷⁾.

t-BHP만 처리한 음성 대조군은 매우 높은 MDA 함량을 나타내며 이를 통하여 *t*-BHP에 의하여 간 조직에 지질과산화가 발생했음을 확인할 수 있다. 음성 대조군은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군의 MDA(385.6 ± 39.7 μM/g protein)보다 2.17배 많은 MDA의 양 834.0 ± 154.7 μM/g protein을 나타내었다. 하지만, Fig. 2에서 보듯이 *t*-BHP와 함께 기능성 들깨잎 추출물을 투여한 그룹에서 MDA 수준은 감소하는 경향을 보이며 250, 500, 1000 mg/kg b.w. 처리군은 각각 669.2 ± 145.0, 595.1 ± 142.6, 415.9 ± 133.8 μM/g protein의 MDA 생성량을 보였다. 기능성 들깨잎 추출물 250, 500 mg/kg b.w. 투여군의 경우 음성 대조군인 *t*-BHP 처리군에 비하여 유의적인 수준의 차이를 나타내지 않았으나, 1000 mg/kg b.w. 투여군의 경우에는 음성 대조군과 유의적인 수준은 나타내며 간 보호 활성을 나타내었다. 또한 이 그룹의 경우 정상 대조군과 비슷한 수준의 MDA 생성량을 나타내며 *t*-BHP에 의한 간 손상으로부터 정상 수준으로 회복시켰다. 이는 앞선 항산화 바이오 마커들과 더불어 기능성 들깨잎 추출물의 산화스트레스 대한 간 보호 효과를 확인 할 수 있었다.

조직병리학적 간 손상 측정

적출한 간 조직을 H&E 염색을 통해 조직의 손상 정도를 확인하였다. 정상 대조군의 경우 간 조직의 세포와 핵이 모두 선명하게 나타났으며 세포의 괴사가 발견되지 않았다. 하지만, *t*-BHP만 처리한 음성 대조군의 경우 간 세포의 괴사(화살표)와 간 조직의 손상을 쉽게 확인할 수 있었다(Fig. 3). 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 처리하였을 때 특별히 간 세포의 괴사나 조직의 손상이 조직학적

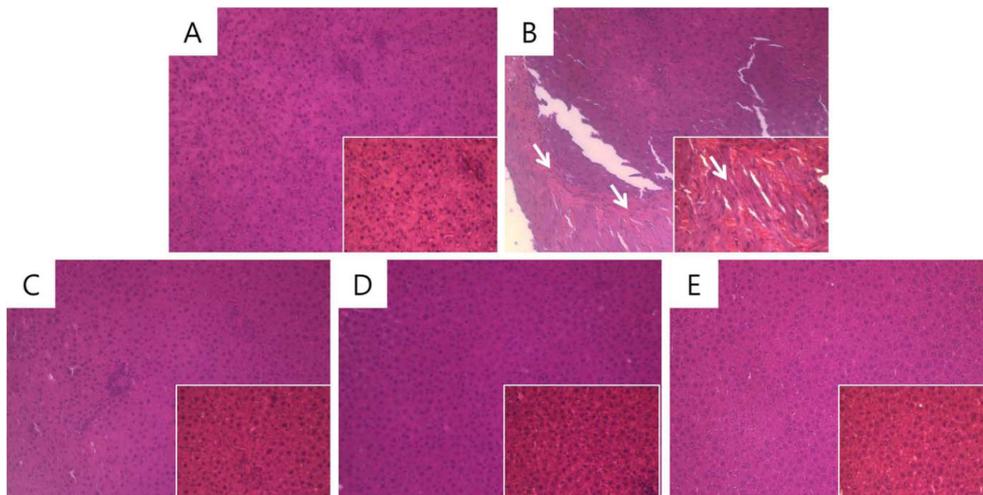


Fig. 3. Effect of PLE pre-treatment on *t*-BHP induced liver damage. A, Control (n = 6); B, Rats treated with *t*-BHP (0.5 mmol/kg) showed liver cell death (arrow); C, Rats pretreated with 250 mg/kg of PLE and then *t*-BHP; D, Rats pretreated with 500 mg/kg of PLE and then *t*-BHP. E, Rats pretreated with 1000 mg/kg of PLE and then *t*-BHP. Hematoxylin/eosin staining; magnification × 200, × 400.

검정에서 관찰되지 않았으며, 고배율로 확인하였을 때에도 간 세포의 핵이 모두 선명하게 정상 상태로 관찰되었다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물을 투여하였을 때 산화스트레스에 의한 간 세포의 괴사를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구진은 선행연구⁸⁾에서 설탕물 처리를 통하여 재배한 기능성 들깨잎이 기존 들깨잎에 비하여 항산화활성과 주요 지표 물질이 증가함을 확인하였다. 설탕물을 이용하여 재배하였을 때 들깨잎 추출물의 주요 지표 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량이 증가하였으며 DPPH 라디칼 소거능, ABTS scavenging activity 등의 실험을 통하여 항산화 활성이 증가함을 확인하였다. 본 연구는 설탕물 처리를 통하여 재배한 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 기능을 투여 농도에 따라 확인함으로써 *t*-BHP에 의한 간 손상 보호 모델에 적용하였다. 본 연구를 통하여 추후 다양한 간 손상 모델에 기능성 들깨잎 추출물을 적용할 수 있을 것으로 사료되고 또한 간 보호 메커니즘 규명에도 활용될 수 있을 것으로 보인다.

위의 연구 결과를 종합하면 *t*-BHP는 간 조직에 산화스트레스를 통하여 간 손상을 유발하게 되며, 기능성 들깨잎 추출물을 투여하였을 때 간 손상을 억제함을 확인하였다. 기능성 들깨잎 추출물의 농도에 따라 간 보호 활성이 증가함을 확인하였으며, 특히 500, 1000 mg/kg b.w.의 농도로 투여하였을 때 정상 대조군 수준으로 회복하였다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물은 간 손상에 대한 보호 또는 개선 효과가 있음을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 농림수산물식품기술기획평가원(111021-03-1-HD110)에 의해 이루어진 것이며 고려대학교 CJ식품안전관의 장비 및 시설을 사용하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

요 약

t-BHP는 대표적인 산화스트레스에 의한 간 손상 모델이며, 본 연구자는 랫드에 기능성이 강화된 기능성 들깨잎 추출물(*P. frutescens* leaf extract, PLE)을 250, 500 또는 1000 mg/kg body weight (b.w.)으로 6일간 경구 투여하고 *t*-BHP의 복강 주사로 간 손상을 일으킨 후 기능성 들깨잎 추출물이 간에서 산화스트레스를 얼마나 억제하여 주는지를 혈액의 간 손상 지표인 lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST) 그리고 alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였으며, 간 조직에서 항산화 바이오 마커인 reduced glutathione (GSH), 지질과산화물의 척도인 malondialdehyde (MDA)를 통해서 측정하였다.

산화스트레스에 의한 간 손상시 GSH는 아무것도 처리

하지 않은 정상 대조군(146.0 ± 5.4 mM GSH/g protein)에 비해 *t*-BHP로 산화스트레스를 유발한 그룹에서 128.6 ± 6.8 mM GSH/g protein로 감소하였다. 반면 기능성 들깨잎 추출물을 250, 500 그리고 1000 mg/kg b.w. 을 투여한 그룹에서는 129.3 ± 2.6 mM GSH/g protein, 151.9 ± 6.8 mM GSH/g protein, 171.9 ± 5.2 mM GSH/g protein로 농도 의존적으로 GSH 함량이 회복되는 경향을 나타내며, 500 mg/kg b.w. 투여군부터 정상 대조군의 GSH 함량과 비슷한 수준을 나타내었다.

또한, 간 조직에서 산화스트레스에 의하여 발생한 지질과산화물을 측정하였을 때 *t*-BHP에 의하여 산화스트레스만 유발한 그룹은 834.0 ± 154.7 μM/g protein 로 정상 대조군의 385.6 ± 39.7 μM/g protein 보다 2.17배 높은 MDA를 생성한 것으로 지질과산화가 많이 일어난 것을 확인하였으나, 기능성 들깨잎 추출물을 투여한 그룹의 MDA의 생성량은 669.2 ± 145.0, 595.1 ± 142.6, 415.9 ± 133.8 μM/g protein 로 농도에 따라 감소하는 경향을 확인하였다. 랫드의 간 조직에서, 독성을 유발하는 *t*-BHP를 복강 투여 후 기능성 들깨잎 추출물을 경구 투여하였을 때 지질과산화의 지표인 MDA의 감소와 항산화의 지표인 GSH 함량이 증가하였다.

조직병리학적 확인을 위하여 간 조직을 H&E 염색 후 광학현미경으로 관찰하였을 때, *t*-BHP만 처리한 음성 대조군의 경우 간 세포의 괴사와 조직의 변형을 확인할 수 있었지만 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 경우 모두 정상 상태의 조직을 관찰할 수 있었다.

위의 결과들을 종합하였을 때, *t*-BHP가 간에서 산화스트레스를 유발하여 간 손상을 야기시키고, 간 조직의 인 지질 막 손상을 줄 수 있으며, 기능성 들깨잎 추출물은 간 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Lee, J.I., Han, E.D., See, 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 bar. japonica Hara.). *Korean J. Breed.* **18**, 228-233 (1986).
2. Hyun, K.W., Kim, J.H., Song, K.J., Lee, J.B., Jang, J.H., Kim, Y.S. and Lee, J.S.: Physiological functionality in heumsan *Perilla* leaves from green house and field cultivation. *Korean J. Food. Sci. Food Sci. Nutr.* **35**, 975-979 (2003).
3. Kim, M.K., Lee, H.S., Kim, E.J., Won, N.H., Chi, Y.M., Kim, B.C. and Lee, K.W.: Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **45**(9), 1738-1744 (2007).
4. Park, H.Y., Nam, M.H., Lee, H.S., Jun, W., Hendrich, S. and Lee, K.W.: Isolation of caffeic acid from *Perilla frutescens* and its role in enhancing gamma-glutamylcysteine synthetase

- activity and glutathione level. *Food Chem*, **119**(2), 724-730 (2010).
5. Nardini, M., Natella, F., Gentili, V., Di Felice, M. and Scaccini, C.: Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: An *in vivo* study. *Arch. Biochem. Biophys*, **342**(1), 157-160 (1997).
 6. Fesen, M.R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J. and Kohn, K.W.: Inhibition of Hiv-1 Integrase by Flavones, Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape) and Related-Compounds. *Biochem. Pharmacol*, **48**(3), 595-608 (1994).
 7. Johnson, A.A., Marchand, C. and Pommier, Y.: HIV-1 integrase inhibitors: A decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr. Top. Med. Chem*, **4**(10), 1059-1077 (2004).
 8. Yang, S.Y., Hong, C.O., Lee, H., Park, S.Y., Park, B.G. and Lee, K.W.: Protective effect of extracts of *Perilla frutescens* treated with sucrose on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem*, **133**(2), 337-343 (2012).
 9. Lee, K.J., Choi, C.Y., Chung, Y.C., Kim, Y.S., Ryu, S.Y., Roh, S.H. and Jeong, H.G.: Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, **147**(3), 271-282 (2004).
 10. Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T. and Tseng, T.H.: *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol*, **40**(5), 635-641 (2002).
 11. Rush, G.F., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W.R.: Organic Hydroperoxide-Induced Lipid-Peroxidation and Cell-Death in Isolated Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharm*, **78**(3), 473-483 (1985).
 12. Valentao, P., Carvalho, M., Carvalho, F., Fernandes, E., das Neves, R.P., Pereira, M.L., Andrade, P.B., Seabra, R.M. and Bastos, M.L.: *Hypericum androsaemum* infusion increases *tert*-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity *in vivo*. *J. Ethnopharmacol*, **94**(2-3), 345-351 (2004).
 13. Yen, G.C., Yeh, C.T. and Chen, Y.J.: Protective effect of *mesona procumbens* against *tert*-butyl hydroperoxide-induced acute hepatic damage in rats. *J. Agr. Food Chem*, **52**(13), 4121-4127 (2004).
 14. Liochev, S. and Fridovich, I.: Superoxide is responsible for the vanadate stimulation of NAD(P)H oxidation by biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys*, **263**(2), 299-304 (1988).
 15. Feig, D.I., Reid, T.M. and Loeb, L.A.: Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Res*, **54**(7), 1890s-1894s (1994).
 16. Chapple, I.L.C.: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol*, **24**(5), 287-296 (1997).
 17. Wiseman, H. and Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J*, **313**, 17-29 (1996).
 18. Poli, G.: Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med*, **21**(3), 49-98 (2000).
 19. Forbes, J. M., Coughlan, M.T. and Cooper, M.E.: Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, **57**(6), 1446-1454 (2008).
 20. Lee, Y.T., Chiang, L.Y., Chen, W.J., and Hsu, H.C.: Water-soluble hexasulfobutyl[60]fullerene inhibit low-density lipoprotein oxidation in aqueous and lipophilic phases. *P. Soc. Exp. Biol. Med*, **224**(2), 69-75 (2000).
 21. Reitman, S. and Frankel, S.: A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. *Am. J. Clin. Pathol*, **28**(1), 56-63 (1957).
 22. Kaczor, J.J., Ziolkowski, W., Popinigis, J. and Tarnopolsky, M.A.: Anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle from children and adults. *Pediatr. Res*, **57**(3), 331-335 (2005).
 23. Yadav, P., Sarkar, S. and Bhatnagar, D.: Action of *Capparis decidua* against alloxan-induced oxidative stress and diabetes in rat tissues. *Pharmacol. Res*, **36**(3), 221-228 (1997).
 24. Townsend, D.M., Tew, K.D. and Tapiero, H.: The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother*, **57**(3-4), 145-155 (2003).
 25. Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B.: Acetaminophen-Induced Hepatic Necrosis. IV. Protective Role of Glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **187**(1), 211-217 (1973).
 26. Recknagel, R.O.: Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev*, **19**(2), 145-208 (1967).
 27. Singal, P.K., Beamish, R.E. and Dhalla, N.S.: Potential Oxidative Pathways of Catecholamines in the Formation of Lipid Peroxides and Genesis of Heart-Disease. *Adv. Exp. Med. Biol*, **161**, 391-401 (1983).