

들깨 추출물의 항산화 활성과 암세포 기본 특성에 대한 억제 효과

김시내 · 송보람 · 주지형

충북대학교 식품영양학과

Antioxidant Activities of *Perilla frutescens* Britton Seed Extract and Its Inhibitory Effects against Major Characteristics of Cancer Cells

Sinae Kim, Boram Song, and Jihyeung Ju

Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University

ABSTRACT The aim of the study was to investigate the antioxidant activities of ethanol extract of perilla seed (PSE) and its inhibitory effects against major characteristics of cancer cells, such as unrestricted growth and activated metastasis *in vitro*. The total polyphenol and flavonoid levels of PSE were 222.6 mg gallic acid equivalent/100 g and 285.7 mg quercetin equivalent/100 g, respectively. The radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power of PSE at concentration of 87.5 to 350 $\mu\text{g/mL}$ were 24~45% and 28~62%, respectively. Treatment of HCT116 colorectal carcinoma cells and H1299 non-small cell lung carcinoma cells with PSE dose-dependently inhibited growth by 18~94% (at concentration range of 87.5 to 350 $\mu\text{g/mL}$) and completely abolished colony formation (at concentration of 175 $\mu\text{g/mL}$). PSE was also effective in inhibiting migration of H1299 cells (by 30~37% at concentration range of 87.5 to 350 $\mu\text{g/mL}$) and adhesion of both HCT116 and H1299 cells (by 14~16% at concentration of 350 $\mu\text{g/mL}$). These results indicate that PSE exerts antioxidant and anti-cancer activities *in vitro*. It needs to be determined whether or not similar effects can be reproduced *in vivo*.

Key words: perilla seed, antioxidant activity, cancer cell growth, migration, adhesion

서 론

들깨(*Perilla frutescens* Britton)는 통화식물목 꿀풀과에 속하는 일년생 초본식물로 동남아시아 지역을 중심으로 그 종실이나 잎 그리고 종실을 착유하여 얻은 기름 등이 널리 소비되고 있다(1,2). 특히 들깨 종실의 경우는 한국인의 식생활에서 중요한 위치를 차지하고 있는 식품 중 하나라고 할 수 있는데 제5기 국민건강영양조사 결과에 의하면 종실류 중에서는 유일하게 조식유 섭취를 위한 주요 급원식품 30위 내에 포함된 바 있으며 그 순위는 들깨잎 또는 배추보다도 높은 것으로 보고되었다(3). 들깨의 생리활성과 관련해서는 들깨 추출물의 항돌연변이(4) 및 항염(5,6) 효과와 들깨유의 항산화(7), 체지방과 중성지방 감소(8), 대장종양 억제(9) 효과가 보고되었다. 또한 들깨박의 경우에는 항산화(10,11), 인지 기능 개선(12), 혈청 콜레스테롤 및 지질 감소 효과(13) 등이 보고되었다. 들깨에 함유되어 지질의 약 54%를 차지하고 있는 ω -3계 불포화지방산인 α -linolenic acid (14)의 경우는 혈압 감소(15), 혈전 개선(16), 동맥경화 예

방(17), 대장종양 발생 억제(18) 효과 등의 기능성이 보고되었다. 이 밖에도 들깨에 함유되어 있는 기능 성분으로 rosmarinic acid와 ursolic acid, oleanolic acid 등을 들 수 있는데, rosmarinic acid의 경우는 항산화(19), 항염(20,21), 간독성 감소(22), 항돌연변이(23), 항균(24), 항바이러스(20), 항알러지(25) 효과 등의 기능성이 보고되었고, triterpenoid에 속하는 ursolic acid와 oleanolic acid의 경우에는 항산화(26), 항염증(26), 종양성장 억제(27), 혈관신생성 억제(28) 등의 기능성이 보고되었다.

활성산소는 쌍을 이루지 못한 전자에 의하여 높은 반응성을 가지는 산소 원자나 분자로 정상적인 생리작용 중에 체내에서 발생되거나 방사능, 오염물질, 바이러스, 음주, 흡연, 스트레스 등과 같은 외부적인 요인에 의하여 생성된다(29). 활성산소는 체내 항산화 체계에 의하여 신속히 제거되어야 하는데 이러한 과정이 적절하게 일어나지 못하면 산화스트레스가 유발되어 암, 심혈관계 질환, 퇴행성 질환 등과 같은 만성질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(29).

암(cancer)은 비정상적인 세포들이 무한 증식하고 신체의 다른 부위로 전이되어 생명을 위협하는 질병이다(30). 전 세계적으로 보았을 때 암으로 인한 사망은 전체의 약 20%를 차지하고 있고(31) 국내에서도 암은 인구 10만 명당 사망률이 가장 높은 요인이다(32). 특히 대장암은 국내외에

Received 4 November 2014; Accepted 23 December 2014

Corresponding author: Jihyeung Ju, Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 362-763, Korea

E-mail: jujih@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2681

서 그 발병률과 사망률이 모두 높은 암종이며, 폐암은 다른 암종에 비하여 그 사망률이 매우 높다(32-34). 암은 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의하여 발병되는데 전체의 약 80~90%는 환경적인 요인에 의하여 발병된다고 알려져 있다(30). 암 전체의 약 1/3 정도는 환경적인 요인 중에서도 특히 식이적인 요소에 의하여 예방할 수 있는데, 특히 위암이나 결장암과 같은 소화기계 암의 경우에는 식습관의 개선을 통해 약 90%까지도 예방 가능하다고 보고된 바 있다(33). 이에 암을 예방하는 기능이 있는 식품 및 성분에 관한 연구가 국내외에서 매우 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 들깨의 에탄올 추출물을 제조하고 이를 이용하여 항산화 성분의 함량 및 항산화 활성을 분석하고자 하였다. 또한 들깨 에탄올 추출물이 암세포의 기본적인 특성에 미치는 영향에 대하여 인체 유래 암세포주를 이용하여 *in vitro* 수준에서 조사하고자 하였다. 이러한 연구는 앞으로 들깨가 *in vivo* 수준에서도 항산화 및 항암 활성을 가지는지 여부와 이러한 활성과 관련된 세부적인 작용기전을 연구하기 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

들깨 추출물의 제조 및 수율 측정

들깨는 충북 보은군에 위치한 보은농업협동조합에서 구입하여 사용하였다. 들깨는 분쇄하고(MU5300, TC Angel, Seoul, Korea) 동결건조(PH1316, IlshinBioBase, Yangju, Korea) 한 후 증량 대비 10배 용량의 70% 에탄올과 혼합하여 4시간 동안 교반(SHO-1D, Daihan Scientific Co., Seoul, Korea)하였다. 이어 3,000 rpm에서 3분간 원심분리(A320101, Gyrozen, Daejeon, Korea) 하여 얻은 상층액을 감압농축(NB-503CIR, N-biotek, Bucheon, Korea) 한 후 -70°C deep freezer(DF8514, IlshinBioBase)에 보관하면서 세포 처리에 이용하였다. 추출에 이용된 건조 들깨 시료의 무게 대비 에탄올 용매를 완전히 휘발시킨 후 잔여물의 무게를 %로 나타낸 수율은 3.3%였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법(35)을 일부 변형하여 측정하였다. 증류수 100 µL, 7.5% Na₂CO₃ 200 µL, Folin Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 35 µL, 들깨 추출물 60 µL를 혼합하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이어 반응액을 10,000 rpm에서 2분간 원심분리 하고 상층액을 취하였다. 이어 plate reader(Imark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma-Aldrich) 표준검량곡선을 이용하여 시료의 총 폴리페놀 함량(mg gallic acid equivalent/100 g dried leaf)을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(36)의 방법을 일부

변형하여 사용하였다. 들깨 추출물 30 µL, diethylene glycol 100 µL, 1 N NaOH 50 µL를 혼합하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 plate reader(Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin(Sigma-Aldrich) 표준검량곡선을 이용하여 시료의 총 플라보노이드 함량(mg quercetin equivalent/100 g dried leaf)을 산출하였다.

라디칼 소거 활성 측정

들깨 추출물의 radical 소거 활성을 측정하기 위해서 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich)법(37)을 이용하였다. 암소에서 준비한 1 mM DPPH와 들깨 추출물 시료(87.5, 175, 350 µg/mL)를 1:1로 혼합하고 30분간 암소에서 반응시킨 후 plate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성(%)은 {(대조구 흡광도 - 시료 흡광도) / 대조구 흡광도} × 100의 식을 이용하여 산출하였다.

철 환원력 측정

들깨 추출물의 철 환원력을 평가하기 위하여 Benzie와 Strain(38)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 먼저 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM 2,4,6-tripyridyls-triazine, 증류수에 용해시킨 20 mM FeCl₂·6H₂O를 사용 직전에 10:1:1의 비율로 혼합하였다. 이어 이렇게 제조된 혼합액 150 µL에 87.5, 175, 350 µg/mL 농도의 들깨 추출액 100 µL를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 plate reader를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 철 환원력(%)은 시료와 같은 농도의 ascorbic acid(Samchun Pure Chemicals Co. Ltd., Pyeongtaek, Korea)를 대조군으로 하여 (시료 흡광도 / 대조구 흡광도) × 100의 식을 이용하여 산출하였다.

암세포 배양 및 들깨 추출물 처리

HCT116 인간 대장암 세포주와 H1299 인간 폐암 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 이용하였다. HCT116 세포와 H1299 세포는 McCoy's 5A(Gibco, Rockville, MD, USA) 배지와 RPMI1640(Welgene Inc., Daegu, Korea) 배지를 각각 이용하여 10% FBS(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(Welgene Inc.)을 첨가한 후 배양(37°C, 95% 습도, 5% CO₂)하였다. 들깨 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO; Biosesang Inc., Seongnam, Korea)에 녹여 stock을 제조하였고 실험 직전에 배지를 이용하여 희석한 후 세포에 처리하였다.

암세포의 생존 측정

암세포의 생존 정도는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 이용하는 방

법에 따라 측정하였다(39). 세포 배양용 96-well plate (Corning Inc., Corning, NY, USA)에 HCT116 또는 H1299 세포(5×10^3 cell/well)를 분주하고, 24시간 후 87.5, 175, 350 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물을 함유한 serum-free 배지를 이용하여 72시간 또는 120시간 동안 처리하였다. 이후 0.5 mg/mL의 MTT(Sigma-Aldrich)를 함유한 배지로 갈아주고 4시간 동안 37°C에서 incubation 하였으며, 환원된 formazan dye는 배지를 제거한 후 DMSO를 첨가하여 녹여내었다. 이어 plate reader(Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 들깨 추출물이 처리된 세포의 생존 정도는 대조구의 생존 정도에 대비하여 %로 나타내었다.

암세포의 colony 형성 측정

암세포의 colony 형성 정도는 Hou 등(40)이 보고한 방법에 따라 측정하였다. 세포 배양용 6-well plate에 적은 수의 암세포(2×10^2 cell/well)를 분주하고 24시간 후 87.5, 175, 350 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물을 함유한 serum-complete 배지를 처리하였으며, 1주일 후 같은 농도의 들깨 추출물이 함유된 새로운 배지로 갈아주었다. 총 14일 처리 후 50% 에탄올 용액을 이용하여 제조한 0.05% methylene blue(Sigma-Aldrich)로 colony를 푸른색으로 염색하고 colony 수를 세었다. 들깨 추출물이 처리된 세포의 colony 수는 대조구 세포의 colony 수 대비 %로 나타내었다.

암세포의 이동 측정

암세포의 이동 정도는 Ju 등(41)이 보고한 방법에 따라 측정하였다. 세포 배양용 30 mm dish에 세포(1×10^4 cell/well)를 분주하고 70~80% confluence 시 pipette tip을 이용하여 평행한 세 줄을 긋어서 세포가 없는 빈 공간(wound)을 만들었다. 이어 87.5, 175, 350 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물을 함유한 serum-complete 배지를 처리한 후 대조구 및 각 처리구당 무작위로 9~15 영역을 선정하고, 24시간 후 동일한 영역에서 세포가 wound로 이동된 정도를 위상차현미경($\times 40$; Primo Vert, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다. Wound의 너비는 iSolution Lite software(IMT i-solution, Burnaby, Canada)를 이용하여 측정하였고, 각 영역에서 관찰되는 wound 너비의 중간 값을 선택하였다. 들깨 추출물이 처리된 세포의 이동 정도는 대조구 세포의 이동 정도 대비 %로 나타내었다.

암세포의 부착 측정

암세포의 부착 정도는 Matsuura 등(42)이 보고한 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 96-well plate(Corning Inc.)에 fibronectin(1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich)이 함유된 Hank's buffer(Welgene Inc.)를 넣고 37°C에서 2시간 동안 코팅하였다. 이어 0.5% BSA로 37°C에서 1시간 동안 blocking 한 후, 세포(1×10^3 cell/well)를 87.5, 175, 350 $\mu\text{g/mL}$ 농도의

들깨 추출물을 함유한 배지에 넣어 잘 섞어주고 세포 배양용 96-well plate(Corning Inc.)에 분주하였다. 1시간 후 plate 바닥에 부착된 세포를 0.2% crystal violet으로 10분간 염색하고 1% sodium dodecyl sulfate(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 녹여내었다. 이어 plate reader(Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 들깨 추출물이 처리된 세포의 부착 정도는 대조구 세포의 부착 정도 대비 %로 나타내었다.

통계분석

통계분석은 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였고, 모든 결과 값은 mean \pm SEM으로 나타내었다. 들깨 추출물의 처리 농도에 따른 암세포 생존, colony 형성, 이동, 부착 정도의 차이는 one-way ANOVA를 이용하여 분석한 후, $P < 0.05$ 일 때 사후 분석으로 Tukey's test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 단순한 두 군 간의 활성을 비교하기 위해서는 two-tailed Student's *t*-test를 실시하였다. 암세포의 생존, colony 형성, 이동, 부착에 대한 들깨 추출물의 억제 활성이 들깨 추출물의 농도에 의존적이었는지를 평가하기 위해 선형 및 곡선형 회귀분석을 실시하였고, $P < 0.05$ 일 때 유의적으로 농도 의존적 활성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

본 연구에 사용된 들깨 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 폴리페놀은 녹색 식물의 광합성 작용에 의하여 생성된 당의 일부가 변화한 2차 대사산물로 벤젠고리의 수소 중 2개 이상이 수산기로 치환된 항산화 물질이다(43). 플라보노이드는 식물이 함유하고 있는 노란색을 띠는 물질로 페놀 화합물에 속하면서 C6-C3-C6의 기본 구조를 가지는 화합물의 총칭이다(43). 본 연구 결과 들깨의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 222.6 mg gallic acid equivalent/100 g과 285.7 mg quercetin equivalent/100 g이었다. 본 연구에서 측정된 총 폴리페놀 함량은 농촌진흥청(43)이 보고한 함량(361.0 mg tannic acid equivalent/100 g)이나 Lee와 Lee(44)가 보고한 함량(830 mg tannic acid equivalent/100 g)보다는 낮은 수준이었다. Lee와 Lee(44)는 들깨를 포함하여 총 8종의

Table 1. Total polyphenol and flavonoid levels of PSE

	Total polyphenols (mg GAE/100 g dried leaf) ¹⁾	Total flavonoids (mg QE/100 g dried leaf) ¹⁾
PSE	222.6 \pm 4.6 ²⁾	285.7 \pm 12.2

¹⁾Total polyphenol and flavonoid contents are expressed as gallic acid equivalents (GAE) and quercetin equivalent (QE), respectively.

²⁾Each value is mean \pm SME of ≥ 3 determinations.

종실 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 약 120~2,060 mg gallic acid equivalent/100 g으로 보고하였는데, 그중 들깨의 총 폴리페놀 함량(830 mg tannic acid equivalent/100 g)은 호두나 해바라기 씨의 함량(2,020~2,060 mg tannic acid equivalent/100 g)보다는 낮았으나 흰깨나 호박씨 등의 함량(130~270 mg tannic acid equivalent/100 g)보다는 높은 수준이었다. 본 연구에서 측정된 총 플라보노이드 함량은 농촌진흥청(43)이 보고한 함량(198.3 mg rutin equivalent/100 g)보다 높은 수준이었고 Lee 등(45)이 보고한 총 15품종 들깨 메탄올 추출물의 함량(1.8~24.3 mg/100 g)보다는 현저하게 높은 수준이었다. 이와 같은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 차이는 각 연구마다 이용된 들깨의 종류, 재배 조건, 수확 시기, 추출 조건, 표준물질 종류 등이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 한편 Lee 등(45)은 rosmarinic acid와 rosmarinic acid-3-*O*-glucoside가 들깨 메탄올 추출물에서 발견되는 주요 페놀 성분이고 이들 성분의 함량은 약 1.7~1.8 mg/g으로 보고하였다.

라디칼 소거 활성 및 철 환원력

DPPH는 항산화 활성을 갖는 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 환원되면서 보라색에서 노란색으로 탈색되는 자유 라디칼이고(37) Fe³⁺는 항산화 물질에 의하여 Fe²⁺로 환원되는데(38), 이러한 원리를 이용하여 물질의 항산화 활성을 측정하는 방법이 널리 이용되고 있다. 87.5, 175, 350 µg/mL 농도의 들깨 추출물이 보인 DPPH radical 소거 활성은 각각 23.7, 40.0, 45.3%, 철 환원력은 각각 27.8, 36.0, 62.1%로 들깨 추출물의 농도가 증가할수록 활성이 증가하였다(Fig. 1). Lee 등(45)의 연구에서는 15품종의 들깨 메탄올 추출물(50 µg/mL)의 DPPH radical 소거 활성이 63~83% 범위로 보고된 바 있어 본 연구에서 이용된 농도보다 낮은 농도에서도 본 연구에서 관찰된 정도의 활성이 있었다. 이러한 결과는 두 연구에서 이용된 들깨의 종류 및 추출조건

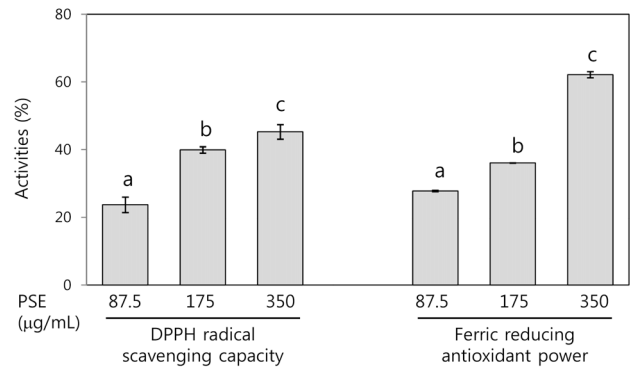


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power of PSE. All values are presented as % of the control in the mean±SEM of 3 determinations. Different letters (a-c) mean statistical differences among different concentrations at a respective time point by Tukey's test (*P*<0.05).

들이 다르기 때문인 것으로 추측된다. 활성산소종은 여러 세포신호전달경로를 활성화하여 암화과정에 기여하기 때문에 수많은 항산화 성분이 다양한 수준으로 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(29). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성을 가진 들깨 에탄올 추출물이 항암 활성 또한 나타내는 지 여부를 *in vitro* 수준에서 조사하고자 하였다.

암세포 성장 억제 활성

암세포가 정상세포와 구별되는 가장 기본적인 특징은 무제한적인 증식이라 할 수 있다(46). 따라서 본 연구에서 들깨 추출물의 *in vitro* 항암성을 평가하기 위하여 가장 먼저 들깨 추출물의 암세포 증식 억제 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. HCT116 대장암 세포와 H1299 폐암 세포에 87.5, 175, 350 µg/mL 농도의 들깨 추출물을 72시간 또는 120시간 동안 처리하였을 때 모든 처리 농도 및 시점에서 유의적인 암세포 증식 억제 활성을 보였다(18.2~94.1%, *P*<0.05). 이어 회귀분석을 실시한 결과 이와 같은

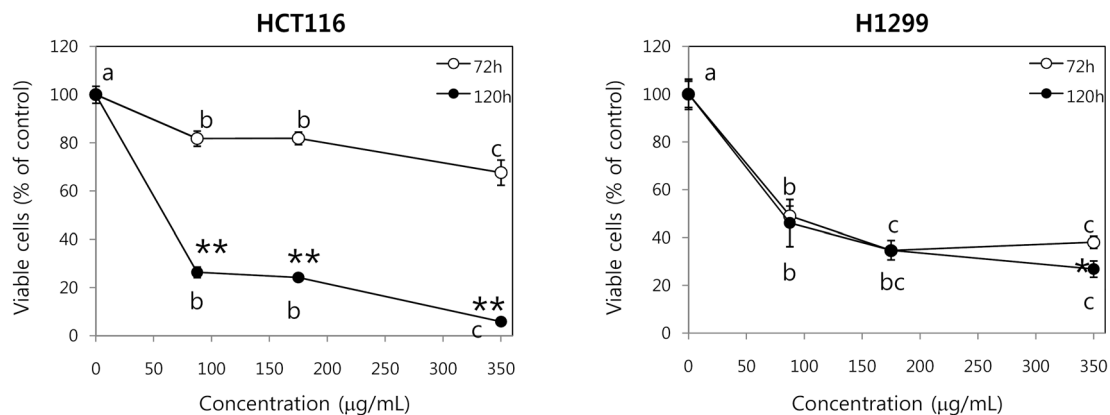


Fig. 2. Effect of PSE on the growth of human cancer cells. HCT116 and H1299 cells were treated with PSE at the concentrations of 87.5, 175, and 350 µg/mL for 72 h and 120 h. All values are presented as % of the control in the mean±SEM of ≥6 determinations. Different letters (a-c) mean statistical differences among different concentrations at a respective time point by Tukey's test (*P*<0.05). Asterisk means a statistical difference between two different time points at a respective concentration by two-tailed student *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.001).

들깨 추출물의 증식 억제 활성은 낮은 농도에서 그 활성이 높고 높은 농도로 갈수록 활성의 큰 차이를 보이지 않는 2차 곡선 유형의 농도 의존성이 있는 것으로 나타났다($R^2 > 0.8$, $P < 0.001$). 한편 들깨 추출물의 처리 시간이 길어짐에 따라 암세포의 증식을 억제하는 효과가 크게 증가하는 현상은 HCT116 세포에서 두드러졌는데 들깨 추출물이 120시간 시점에서 보인 증식 억제 활성(51.0~73.1%)은 72시간 시점에서 보인 활성(18.2~32.4%)보다 유의적으로 높았다($P < 0.001$). 들깨 추출물이 HCT116 세포에서 보인 증식 억제 활성은 H1299 세포에서 보인 증식 억제 활성보다 72시간 시점에서는 낮은 경향을 보였으나(18.2~32.4% in HCT116 vs. 51.0~61.9% in H1299), 92시간 시점에서는 오히려 높은 경향을 보였다(73.6~94.1% in HCT116 vs. 53.9~73.1% in H1299). 이와 같은 들깨 추출물의 암세포 증식 억제 활성은 250~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 호두씨 메탄올 추출물이 48시간 처리되었을 때 Caco-2 대장암 세포에서 보인 증식 억제 활성(약 20~35%)(47)보다 높은 수준이었으나 연구마다 사용된 세포 종류 및 처리조건 등이 다르기 때문에 직접적인 비교는 어려운 것으로 생각된다.

암세포 colony 형성 억제 활성

암세포의 colony 형성 정도는 암세포의 증식력과 함께 암 줄기세포의 중심 특징인 자기 재생력을 반영하는 것으로 알려져 있다(48). 본 연구에서는 들깨 추출물이 colony 형성 정도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 적은 수의 HCT116 과 H1299 세포에 들깨 추출물을 14일 동안 처리한 후 최종적으로 형성된 colony 수를 대조구에서 형성된 colony 수 대비 %로 나타내었다(Fig. 3). HCT116 세포의 경우에는 87.5 $\mu\text{g/mL}$ 나 175 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물이 처리되었을 때 colony를 전혀 형성하지 못하여 들깨 추출물에 의한 100% colony 형성 억제 활성이 나타났다. H1299 세포의 경우에는 87.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물이 처리되었을 때 대조구 colony 수 대비 50.5%의 colony만을 형성하였고, 175 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물이 처리된 세포의 colony 수는 대조구의 colony 수 대비 0.9%에 불과하여 들깨 추출물의 매우 큰 억제 활성이 관찰되었다($P < 0.05$). 회귀분석을 실시한 결과 H1299 세포에서 나타난 들깨 추출물의 colony 억제 활성은 선형의 농도 의존성이 있는 것으로 나타났다($R^2 = 0.97$, $P < 0.001$). 최근 유방암 줄기세포, 췌장암 줄기세포, 전립선암 줄기세포 등의 특성을 억제하는 활성이 있는 식품성분이 보고되고 있어(49-51), 앞으로 들깨 추출물 및 주요성분이 암 줄기세포에 미치는 영향과 작용기전 등에 대해서 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

암세포 이동 억제 활성

암세포는 초기에 자라던 일차 조직을 벗어나 주변 조직으로 침윤한 후 혈액이나 림프를 통해 다른 조직으로 전이하여 새로운 종양을 형성할 수 있는 능력을 가지게 된다(46). 이

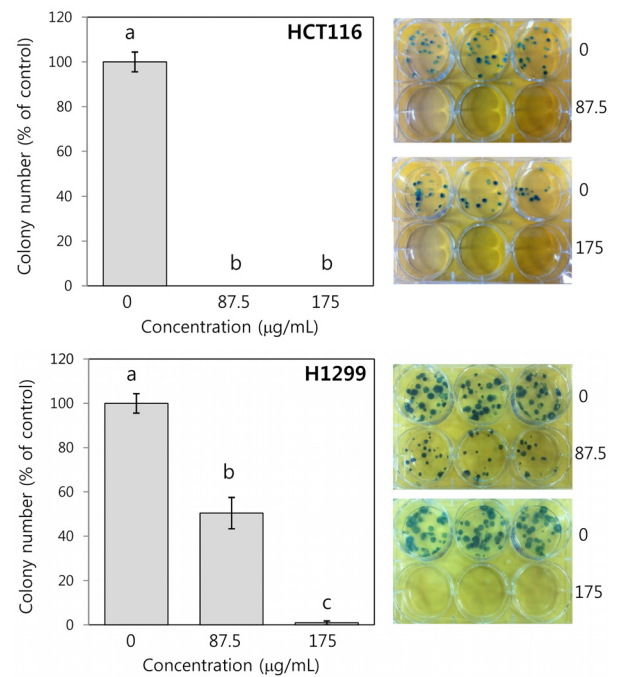


Fig. 3. Effect of PSE on the colony formation of human cancer cells. HCT116 and H1299 cells were treated with PSE at the concentrations of 87.5 $\mu\text{g/mL}$ and 175 $\mu\text{g/mL}$ for 14 days. All values are presented as % of the control in the mean \pm SEM of 3 determinations. Different letters (a-c) mean statistical differences among different concentrations by Tukey's test ($P < 0.05$).

러한 침윤 및 전이 과정에서 암세포가 획득하게 되는 중요한 특성 중 하나가 이동성의 증가이다(46). 따라서 본 연구에서는 들깨 추출물의 암세포 이동성에 대한 억제 활성을 조사하였다(Fig. 4). 예비 실험을 통하여 serum-complete 배지에 함유된 들깨 추출물이 24시간 이내로 처리되었을 때에는 HCT116 및 H1299 세포의 형태 및 증식에 유의적인 변화가 없는 것을 확인한 후(data not shown), 이동성 측정을 위한 세포 처리 시간을 24시간으로 선정하였다. 87.5~350 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 들깨 추출물이 처리되었을 때 HCT116 세포에서는 유의적인 이동 억제 활성이 나타나지 않았으나 H1299 세포에서는 유의적인 억제 활성이 나타났다(대조구 대비 29.6~36.9%, $P < 0.05$). 이러한 이동 억제 활성은 앞서 기술한 암세포의 성장 억제 활성이나 colony 형성 억제 활성 정도와 비교해보면 다소 낮은 수준이었는데, 이는 실험 방법마다 활성이 측정되는 시점이 다르기 때문인 것보다 부분적으로 관련이 있을 것으로 생각된다. 앞으로 들깨 추출물 처리에 의한 폐암 세포의 이동성 억제와 관련된 기전 연구와 들깨 추출물이 암세포의 침윤에 미치는 영향에 대한 연구 또한 필요할 것으로 생각된다.

암세포 부착 억제 활성

암세포의 침윤과 전이 과정이 일어나기 위해서 일차적으로 수반되는 현상 중 하나가 세포의 부착력 변화이다(46). 침윤 단계에서의 암세포는 정상세포에 비하여 세포와 세포

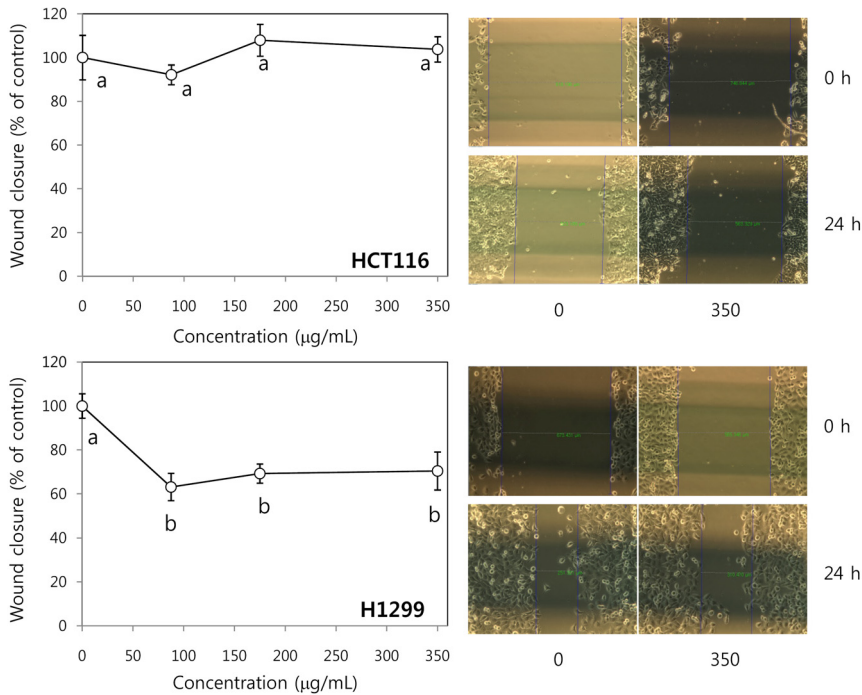


Fig. 4. Effect of PSE on migration of human cancer cells. HCT116 and H1299 cells were treated with PSE at the concentrations of 87.5, 175, and 350 µg/mL for 24 h. Representative wound areas from the control cells and the cells treated with 350 µg/mL of PSE were shown (×40). Different letters (a,b) mean statistical differences among different concentrations by Tukey's test ($P<0.05$).

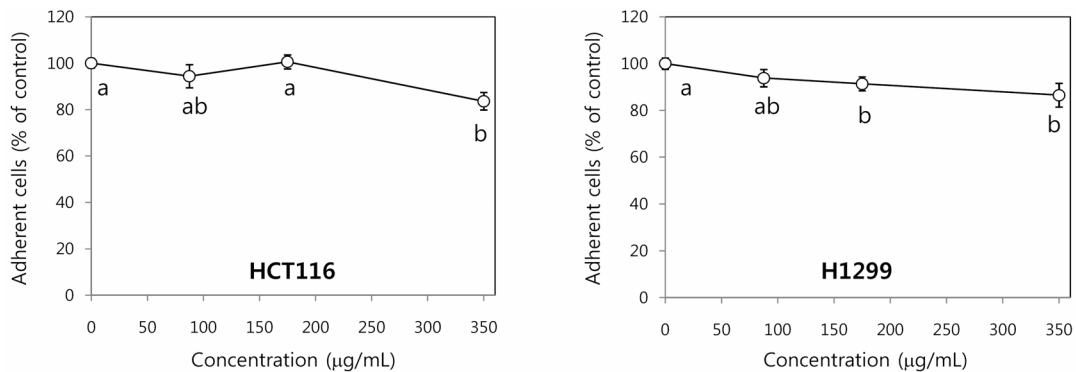


Fig. 5. Effect of PSE on adhesion of human cancer cells. HCT116 and H1299 cells were suspended in either PSE-containing (at the concentrations of 87.5, 175, and 350 µg/mL) or DMSO-containing serum-complete media and then incubated on fibronectin-precoated 96-well plates for 1 h. Different letters (a,b) mean statistical differences among different concentrations by Tukey's test ($P<0.05$).

간의 부착력은 감소하여 상호 결합력이 떨어지지만 세포와 세포 외 기질 물질 간의 부착력은 증가하는 것으로 알려져 있다(46). 본 연구에서는 세포의 기질(extracellular matrix)에 존재하는 대표적인 세포 부착 물질인 fibronectin (46)이 코팅된 세포 배양용 plate를 이용하여 암세포가 fibronectin에 부착되는 것을 들깨 추출물이 억제하는 정도를 측정하고자 하였으며 그 결과는 Fig. 5와 같다. HCT116 세포에서는 들깨 추출물의 가장 높은 처리 농도(350 µg/mL)에서 유의적인 부착 억제 효과가 나타났다(대조구 부착 정도 대비 83.6%; $P<0.05$). H1299 세포에서는 175 µg/mL와 350 µg/mL 농도의 들깨 추출물 처리에 의하여 세포 부착이 유의적으로 억제되었다(대조구 부착 정도 대비 86.5~91.4%; $P<0.05$). 이와 같은 들깨 추출물의 암세포 부착 억제 활성 또한 이동 억제 활성과 마찬가지로 암세포의 성장

나 colony 형성 억제 활성에 비해서는 다소 낮은 수준이었다. 들깨 추출물이 어떠한 기전으로 암세포의 부착을 억제하는지에 대한 세부적인 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 들깨 에탄올 추출물의 항산화 성분 함량 및 활성을 측정하고 들깨 추출물이 암세포의 주요 특징인 성장, colony 형성, 이동, 부착성 등에 미치는 영향을 *in vitro* 수준에서 분석하고자 하였다. 들깨의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 222.6 mg gallic acid equivalent/100 g과 285.7 mg quercetin equivalent/100 g으로 측정되었다. 들깨 추출물(87.5~350 µg/mL)의 DPPH radical 소거 활성은 24~45%, 철 환원력은 28~62%였다. 한편

87.5~350 µg/mL 농도의 들깨 추출물은 HCT116 대장암 세포와 H1299 폐암 세포의 성장을 18~94% 억제하는 농도 의존적 활성이 있었다. 또한 175 µg/mL 농도의 들깨 추출물은 HCT116과 H1299 세포에서 모두 colony 형성을 완전히 억제하는 활성이 있었다. 또한 들깨 추출물은 87.5~350 µg/mL 농도에서 H1299 세포의 이동을 30~37% 억제하였고, 가장 높은 농도인 350 µg/mL 농도에서는 HCT116과 H1299 세포의 부착을 14~16% 억제하였다. 이상의 결과를 통하여 들깨 추출물은 항산화 활성 및 암세포의 주요 특징을 억제하는 활성을 가지는 것으로 생각되며, 향후 이러한 연구 결과가 *in vivo* 수준에서 재현되는지 여부와 본 활성과 관련된 세부작용기전 또한 규명되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2010-0025311)으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee CB. 2003. *Coloured flora of Korea*. 1st ed. Hyang Mun Sa, Seoul, Korea. p 140.
- Kim TJ. 1996. *Korean resources plants IV*. Seoul National University Publisher, Seoul, Korea. p 60.
- Ministry of Health & Welfare. 2010. Korea Health Statistics: *Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES) V-1*. Ministry of Health & Welfare, Seoul, Korea. p 345-348.
- Park DS, Lee KI, Park KY. 2001. Antimutagenic effect of *Perilla frutescens* seed extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 900-905.
- Lee HA, Han JS. 2012. Anti-inflammatory effect of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *frutescens* extract in LPS-stimulated raw 264.7 macrophages. *Prev Nutr Food Sci* 17: 109-115.
- Lee Y, Song B, Ju J. 2014. Anti-inflammatory activity of perilla frutescens britton seed in RAW 264.7 macrophages and an ulcerative colitis mouse model. *Korean J Food Sci Technol* 46: 61-67.
- Kim KH. 2003. Antioxidative effect of various solvent extracts from roasted perilla oil. *Woosong Review* 8: 1-11.
- Okuno M, Kajiwara K, Imai S, Kobayashi T, Honma N, Maki T, Suruga K, Goda T, Takase S, Muto Y, Moriwaki H. 1997. Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *J Nutr* 127: 1752-1757.
- Narisawa T, Takahashi M, Kotanagi H, Kusaka H, Yamazaki Y, Koyama H, Fukaura Y, Nishizawa Y, Kotsugai M, Isoda Y, Hirano J, Noritoshi N. 1991. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid α -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci* 82: 1089-1096.
- Yoon SK, Kim JH, Kim ZU. 1993. Studies on antioxidant activity of ethanol extracts from defatted perilla flour. *Korean J Food Sci Technol* 25: 160-164.
- Cho HS, Ahn MS. 1999. Antioxidative effect of phenolic acids in defatted perilla flour on soybean oil. *Korean J Food Cookery Sci* 15: 55-60.
- Um MY, Choi WH, An JY, Kim SR, Ha TY. 2004. Effect of defatted sesame and perilla methanol extracts on cognitive function and antioxidant activity in SAMP8 mice. *Korean J Food Sci Technol* 36: 637-642.
- Rhie SG, Park YJ. 1991. Effect of the addition of defatted perilla on lipid metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 20: 72-77.
- National Academy of Agricultural Science. 2011. *Food composition table*. 8th ed. Rural Development Administration, Suwon, Korea. p 100.
- Paschos GK, Magkos F, Panagiotakos DB, Votteas V, Zampelas A. 2007. Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. *Eur J Clin Nutr* 61: 1201-1206.
- Holy EW, Forestier M, Richter EK, Akhmedov A, Leiber F, Camici GG, Mocharla P, Lüscher TF, Beer JH, Tanner FC. 2011. Dietary α -linolenic acid inhibits arterial thrombus formation, tissue factor expression, and platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1772-1780.
- Djoussé L, Pankow JS, Eckfeldt JH, Folsom AR, Hopkins PN, Province MA, Hong Y, Ellison RC. 2001. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr* 74: 612-619.
- Song JH, Park HS, Seo ES, Kim DY. 1994. Effect of different dietary fats on colon tumor incidence and *in vivo* cell proliferation in colonic mucosa of MNU-treated rats. *Korean J Nutr* 27: 552-562.
- Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J Agric Food Chem* 44: 131-135.
- Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3367-3370.
- 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.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. 2002. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med* 33: 798-806.
- Furtado MA, de Almeida LC, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat Res* 657: 150-154.
- Chakraborty D, Mandal SM, Chakraborty J, Bhattacharyya PK, Bandyopadhyay A, Mitra A, Gupta K. 2007. Antimicrobial activity of leaf extract of *Basilicum polystachyon* (L) Moench. *Indian J Exp Biol* 45: 774-748.
- Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K, Yasuda A, Natsume M, Baba S, Ichiishi E, Yoshikawa T. 2004. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med* 229: 247-254.
- Tsai SJ, Yin MC. 2008. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci* 73: H174-H178.

27. Hsu HY, Yang JJ, Lin CC. 1997. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett* 111: 7-13.
28. Sohn KH, Lee HY, Chung HY, Young HS, Yi SY, Kim KW. 1995. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Lett* 94: 213-218.
29. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
30. Kleinsmith LJ. 2008. *Principles of cancer biology*. 1st ed. Life Science Publishing Co., Seoul, Korea. p 16-63.
31. World Health Organization. 2012. *World health statistics 2012*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. p 80-81.
32. Statistics Korea. 2012. *2011 Cause of death statistics*. Statistics Korea, Daejeon, Korea. p 9-10.
33. Peter B, Bernard L. 2008. *World Cancer Report 2008*. International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland. p 42-43.
34. Ministry of Health and Welfare. 2012. *Ministry of health and welfare statistical year book 2012*. Ministry of Health & Welfare, Seoul, Korea. p 8-9.
35. Singleton VL, Rossi Jr JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
36. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
37. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT -Food Sci Technol* 28: 25-30.
38. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
39. Lambert JD, Lu G, Lee MJ, Hu J, Ju J, Yang CS. 2009. Inhibition of lung cancer growth in mice by dietary mixed tocopherols. *Mol Nutr Food Res* 53: 1030-1035.
40. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS. 2005. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 65: 8049-8056.
41. Ju J, Kwak Y, Hao X, Yang CS. 2012. Inhibitory effects of calcium against intestinal cancer in human colon cancer cells and Apc (Min/+) mice. *Nutr Res Pract* 6: 396-404.
42. Matsuura N, Miyamae Y, Yamane K, Nagao Y, Hamada Y, Kawaguchi N, Katsuki T, Hirata K, Sumi S, Ishikawa H. 2006. Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *J Nutr* 136: 842S-846S.
43. National Academy of Agricultural Science. 2009. *Tables of food functional composition*. 1st ed. Rural Development Administration, Suwon, Korea. p 201.
44. Lee JH, Lee S. 1994 Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. *Korean J Food Sci Technol* 26: 310-316.
45. Lee JH, Park KH, Lee MH, Kim HT, Seo WD, Kim JY, Baek IY, Jang DS, Ha TJ. 2013. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chem* 136: 843-852.
46. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
47. Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jerónimo C, Silva BM. 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem Toxicol* 48: 441-447.
48. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. 2006. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344.
49. Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, Cheng C, Tazi K, Ginestier C, Liu S, Dontu G, Wicha MS. 2010. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res Treat* 122: 777-785.
50. Srivastava RK, Tang SN, Zhu W, Meeker D, Shankar S. 2011. Sulforaphane synergizes with quercetin to inhibit self-renewal capacity of pancreatic cancer stem cells. *Front Biosci* 3: 515-528.
51. Tang SN, Singh C, Nall D, Meeker D, Shankar S, Srivastava RK. 2010. The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Mol Signal* 5: 14.