

## *Perilla frutescens* Sprout Extracts Protected Against Cytokine-induced Cell Damage of Pancreatic RINm5F Cells via NF- $\kappa$ B Pathway

Da Hye Kim<sup>1</sup>, Sang Jun Kim<sup>1</sup>, Seung-Il Jeong<sup>1</sup>, Kang-Yeol Yu<sup>1</sup>, Chun Jin Cheon<sup>2</sup>, Jang-Ho Kim<sup>3</sup> and Seon-Young Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

<sup>2</sup>Aenong Association, Jeonju 55441, Korea

<sup>3</sup>Department of Integrated Bio-Resource Science, General Graduate School of Jeonju University, Jeonju 55069, Korea

Received October 17, 2016 / Revised February 28, 2017 / Accepted March 23, 2017

*Perilla frutescens* (L.) Britton var. sprouts (PFS) is a plant of the labiatae family. The purpose of this work was to assess the preventive effects of PFS ethanolic extracts (PFSEs) on cytokine-induced  $\beta$ -cell damage. Cytokines, which are released by the infiltration of inflammatory cells around the pancreatic islets, are involved in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. The combination of interleukin-1 $\beta$  (IL-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induced formation of reactive oxygen species (ROS). Accumulation of intracellular ROS led to  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis. PFSEs possess anti-oxidant activity and thus lead to downregulation of ROS generation. Cytokines decrease cell viability, stimulate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), and induce the production of nitric oxide (NO). PFSEs prevented cytokine-induced cell viability in a dose-dependent manner. Incubation with PFSE resulted in significant reduction in cytokine-induced NO production that correlated with reduced levels of the iNOS and COX-2 protein expression. Furthermore, PFSE significantly decreased the activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) by inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation in RINm5F cells. In summary, our results suggest that the protective effects of PFSE might serve to counteract cytokine-induced  $\beta$ -cell destruction. Findings indicate that consumption of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. sprouts alleviates hyperglycemia-mediated oxidative stress and pro-inflammatory cytokine-induced  $\beta$ -cell damage and thus has beneficial anti-diabetic effects.

**Key words** : Cytokines, diabetes, NF- $\kappa$ B, *Perilla frutescens*, RINm5F

### 서 론

서구화된 식습관과 생활환경의 변화 및 운동부족으로 인하여 당뇨병, 뇌혈관질환, 심혈관계질환, 암 등의 각종 성인병의 발병률이 증가하고 있는 추세이다[16]. 그 중 당뇨병의 유병률이 급속히 증가함과 동시에 다양한 합병증으로 인한 당뇨병환자의 사망률이 증가하였고, 이미 우리나라 4대 사망원인 중 하나로 자리 잡아 국민건강을 위협하고 있다[14]. 당뇨병의 종류로는 인슐린 부족으로 인한 유전적 요인과 바이러스, 혹은 유해화합물 등의 원인으로 췌장의 베타 세포에서 인슐린분비가 감소하는 제 1형 당뇨병[9]과 인슐린 저항성, 베타세포 기능부전에 의한 인슐린 결핍으로 발생하는 제 2형 당뇨병이 있으며, 이중 제 1형 당뇨병은 인슐린의 절대적 결핍으로 발병이

급속하게 진행되고 여러 합병증을 유발한다고 알려져 있다 [12].

당뇨병 환자에서는 혈당이 높게 유지되면서 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species)가 과다하게 생성되는 것으로 밝혀졌다[4, 10]. 이러한 산화적 스트레스는 정상세포에서 유리기의 생성과 항산화 방어 시스템의 활성 균형을 이루고 있어 조직이나 세포에 손상을 주진 않지만[16] 당뇨병 환자에서는 혈당이 높아져 체내 유리기가 과다 생성되고, 항산화 시스템의 방어기능이 저하되어 균형이 깨지면서 산화적 스트레스가 과다하게 발생하게 된다[1, 4]. 즉, 활성 산소의 과다한 생성은 당뇨병을 포함한 여러 질환의 병인에 영향을 주므로 높아진 혈당을 조절함과 동시에 체내의 항산화능을 향상시키는 것이 당뇨병의 예방 및 치료에 도움이 된다고 보고되고 있다.

췌장 베타 세포 손상으로 인하여 췌장 소도 주위로 면역세포들이 침습하여 종양괴사인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 인터루킨-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )와 같은 염증 매개 사이토카인을 분비하게 된다[2, 3, 20]. 이러한 자극에 의해 염증 반응의 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키며 그 결과 inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 증가시키고[5, 7], 이로 인해 산화 질소(NO, nitric oxide)를 과다하게 형성하여

#### \*Corresponding author

Tel : +82-10-7625-4016, Fax : +82-63-711-1051

E-mail : seon02@jami.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

췌장 베타 세포를 파괴시킨다고 알려져 있다[8, 9, 20]. 최근에 췌장 베타 세포의 성장과 증식이 당뇨병의 예방과 치료에 영향이 있다는 연구가 보고되면서 당뇨 발병 시기에 베타 세포의 파괴를 막는 천연 식물 소재 기능성 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[18, 21].

우리나라에서 오래 전부터 주요 유지작물의 하나로 재배해 온 들깨(*Perilla frutescens* L. Britton)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 일년생 초본이다[15, 19]. 이전 연구들을 통해서 들깨 잎은 다양한 방법으로 추출되어 불포화지방산을 비롯한 필수지방산, 플라보노이드 등과 지용성 비타민에 속하는 A, D, E들의 함량이 높게 함유되어 있다[26]. 지금까지 들깨를 이용하여 항암, 항염증, 항산화 및 항 알레르기 등과 같은 다양한 연구가 이루어져 왔으나[17, 26] 당뇨병에 관한 연구는 미미한 수준이다. 새싹채소는 성체에 비하여 비타민, 무기질, 미네랄, 효소 등 유용한 영양소들을 많이 함유되어있고 들깨의 어린 싹의 경우 실내 또는 온실 조건에서 10일 이내의 짧은 생육기간과 재배과정에서 농약을 피할 수 있다는 이점을 지니고 있다. 들깨 새싹은 종자 및 성숙기에 비하여 항산화 효과를 내는 폴리페놀, 플라보노이드, 비타민 등 물질의 함량이 높아 생리활성 물질이 증가되는 것으로 밝혀져 있다[17].

이에 본 연구에서는 췌장 베타 세포주인 RINm5F 세포를 이용하여 들깨 새싹 추출물의 항산화 효과를 확인하고, 활성산소 생성 억제 와 독성에 의한 방어효능 및 기전 분석을 통해 들깨 새싹의 당뇨에 유의한 효능을 연구 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 추출물 제조

본 실험에 사용된 들깨 새싹(*Perilla frutescens* sprout, PFS)은 전라북도 진안군 진안읍 영농조합인 애농으로부터 제공받았다. 건조된 새싹은 분말화하고 3 kg을 칭량하여 40% 에탄올 30 ml을 혼합하여 70°C에서 5시간 동안 교반하여 1회 추출한 후 처음 원료 3 kg에 다시 40% 에탄올 30 ml을 새로 넣어 70°C에서 5시간 동안 2회 추출하였다. 추출 완료 후, 추출물을 여과지(110 mm, 2호, Advantec, Japan)로 감압 여과한 후 여과된 추출물을 감압 농축 시킨 뒤 동결건조기(Lyoph-Pride Series, Ilshin, Korea)로 건조하여 분말 형태로 회수하였다. 회수한 추출물(PFSE)은 -80°C에서 보관하면서 사용하였다. 실험 진행 시 추출물을 디메틸설폭사이드(DMSO, dimethyl sulfide)에 녹여서 사용하였다.

### 세포배양

본 연구에서는 미국세포주은행(ATCC, American Tissue Culture Collection, USA)에서 구입한 백서 췌장 베타 세포주인 RINm5F를 사용하였다. 10% 우태혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 unit/ml의

페니실린, 100 mg/ml의 스트렙토마이신 및 5.5 mM 글루코스가 함유된 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지를 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3~4일 간격으로 계대 배양하면서 유지시켰다. 실험을 위해서는 배양된 세포를 인산완충식염수(Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7.2)로 2회 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 분리시켜 5×10<sup>4</sup> cell/ml 농도가 되도록 하여 2일 정도 안정화시켜 사용하였다.

### 항산화효능

항산화 효능은 Arnao [1]의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 자유 라디칼 소거능을 분석하기 위해 시료액 20 µl과 DPPH 용액 80 µl를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 517 nm에서 분광광도계(Perkin Elmer, Victor2 1402 Multilabel counter)로 측정하였다. 들깨 새싹 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50%로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC<sub>50</sub> (The half maximal inhibitory concentration)값으로 나타내었다. IC<sub>50</sub>을 도출하기 위한 들깨 새싹 추출물의 농도범위는 0.001~100 mg/ml로 설정하였고, 9 개의 농도로 나누어 분석하였다. 활성비교를 위하여 수용성 비타민의 하나인 아스코르빈산(Ascorbic acid, Sigma-Aldrich)을 양성대조군으로 사용하였다.

ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Sigma-Aldrich] 라디칼 소거능은 Van den Berg등의 방법[24]을 변형하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM 과황산칼륨(Potassium persulfate, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 용액을 혼합하여 암소에서 약 12시간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도가 1±0.1이 되도록 희석한 ABTS 용액을 사용하였다. ABTS 희석용액, 285 µl와 각 농도별 시료 15 µl를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이 때 양성대조군은 수용성 비타민 E 유도체인 Trolox® (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 결과 값은 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 라디칼의 소거능을 백분율(%)로 나타내었다. IC<sub>50</sub>을 산출하기 위한 들깨 새싹 추출물의 농도범위는 DPPH 라디칼 소거능과 같은 범위로 설정하였다.

수퍼옥시드 디스무타아제(SOD, superoxide dismutase) 유사 활성은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였으며 결과는 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 IC<sub>50</sub>을 확인하였다.

### 세포생존율 측정

세포생존율 측정을 위하여 96-well plate에 췌장 베타 세포를(RINm5F) 1.0×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 두 그룹으로 나누어 들깨 새싹 추출물을 농도별로 첨가하여 1시간 동안 전처리 한 뒤 한쪽 그룹에는 사이토카인(5

ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$ )을 처리하여 48시간 배양하였다. MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, Madison, WI, USA] 용액을 10  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

#### 산화질소(nitric oxide, NO) 소거능 측정

산화질소 생성에 대한 백소순 추출물의 효과를 알아보기 위하여 들깨 새싹 추출물(100, 200, 400, 1,000  $\mu$ g/ml)을 농도별로 처리하고 1시간 뒤에 사이토카인을 처리한 다음 24시간 동안 반응시켰다. 96-Well plate에 각 실험군의 배지 100  $\mu$ l와 그리스 시약[Griess reagent, 1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution]을 동량으로 혼합하고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm 파장에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 산화질소 생성량은 NaNO<sub>2</sub>를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

#### 세포내 활성산소(ROS) 측정

들깨 새싹 추출물의 세포내 활성산소 소거능을 측정하기 위하여 췌장 베타 세포를(RINm5F) 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 들깨 새싹 추출물 농도별(100, 200, 400, 1,000  $\mu$ g/ml)로 1시간 전처리 후 사이토카인을 처리하고 배양기에서 24시간 반응시켰다. 세포를 인산완충식염수로 세척한 다음 DCF-DA (2,2'-dichlorofluorescein diacetate, 50  $\mu$ M, Sigma-Aldrich)를 30분간 처리하였다. 다시 인산완충식염수로 세척한 다음, 형광현미경(TE2000-U, Nikon, Japan)으로 분석하였다. DCF 형광강도에 대한 정성적 분석은 Image J로 수치화하였다.

#### Western blot에 의한 단백질 발현의 분석

들깨 새싹 추출물과 사이토카인을 처리하고 24시간 후 세포를 수집하여 2-3회 인산완충식염수로 세척한 후 100  $\mu$ l의 차가운 RIPA 버퍼를(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 120 mM sodium chloride, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin) 첨가하여 30분간 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 단백질 정량 키트(BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Schwerte, Germany)를 사용하여 정량 하였다. 50  $\mu$ g의 단백질을 8-12% SDS-PAGE로 분리하여, 이를 PVDF membrane (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에 이동시켰다. 항체와 단

백질 간의 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 2.5% skim milk (in TBST) 용액에서 1시간 동안 교반 하였다. Blocking시킨 membrane은 일차 항체[anti-iNOS, anti-COX-2, anti-phospho-IkBa, anti-IkBa, anti-phospho-NF-kB, anti-NF-kB, Cell Signaling Inc. USA; anti- $\beta$ -actin, SantaCruz Biotechnology, Inc. USA]를 TBST 용액에서 1:2,500으로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시킨 후, TBST로 15분씩 5번 세척하였다. 이차항체(anti-mouse IgH, goat-anti-rabbit IgG linked with horseradish peroxidase, SantaCruz Biotechnology)를 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액과 반응시킨 후 Gel Documentation chemiluminescent imaging system (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)으로 단백질 발현을 확인하였다. 상대적 단백질 발현량은 ATTO Densitograph (ATTO Corporation) 프로그램을 사용하여 정량 하였다.

#### 통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 SigmaPlot 프로그램(v10. 0, San Jose, CA, USA)를 이용하였고, 유의성 검정은 ANOVA (one-way analysis of variance) 및 Student's t-test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### 들깨 새싹 추출물의 항산화 활성

들깨 새싹 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH, ABTS, SOD법을 이용하였다. DPPH는 산화된 형태에서 자유라디칼이 전자를 공여해주는 물질에 의해 전자를 얻고 환원되어 진한 자주색의 DPPH가 diphenyl picrylhydrazine으로 탈색되는 것을 이용하여 항산화 효과를 확인하는데 널리 이용되고 있다[1, 24]. 들깨 새싹 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과 0.05 $\pm$ 0.01 mg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈다(Table 1).

ABTS법을 이용한 라디칼 소거 활성은 산화유도체인 과황산칼륨(potassium persulfate)과의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용하여 개발된 방법이다. 들깨 새싹 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub>를 측정된 결과 DPPH 라디칼 소거능과 동일하게 0.05 mg/ml으로 확인되었다(Table 1).

SOD는 생체 내에서 슈퍼옥시드(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 소거에 관여하는 효소이며, 생체내에서 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 스트레스를 초래하게 되므로 이런 현상을 억제하기 위해 SOD와 유사한 역할을 하는 SOD 유사활성물질을 이용하여 슈퍼옥시드의 반응성 억제를 확인하였다. 들깨 새싹 추출물의 SOD 유사활성을 측정된 결과 0.02 mg/ml에서 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다(Table 1).

Table 1. DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity and SOD activity of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. sprouts extracts (PFSE)

Sample*	DPPH (IC <sub>50</sub> *, mg/ml)	ABTS (IC <sub>50</sub> *, mg/ml)	SOD (IC <sub>50</sub> *, mg/ml)
PFSE	0.05±0.01**	0.05±0.00**	0.02±0.00**
PC	0.01±0.00**	0.01±0.00**	-

\*IC<sub>50</sub> value in the concentration (µg/ml) of sample required for 50% inhibition.

\*\*Each value represents mean ± SD (n=3).

산화적 스트레스는 비만과 인슐린 저항성, 고혈압 등의 질환과 연관 되어 있다. 일반적으로 천연물에 존재하는 많은 종류의 생리 활성 물질은 페놀성 화합물로서 항산화 능력을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 들깨 새싹 추출물의 DPPH 법과 ABTS법을 이용한 항산화 활성은 양성 대조구인 아스코빈산과 Trolox®와 유사한 농도 범위에서 항산화능이 있음을 확인하였다. SOD법으로 분석한 들깨 새싹 추출물의 항산화 활성 또한 DPPH, ABTS법으로 분석한 결과와 유사한 농도 범위에서 효과를 나타내었다.

**들깨 새싹 추출물의 세포내 활성산소 생성 억제 효과**

사이토카인 자극 후 유도되는 세포내 활성산소(ROS)와 산화질소(NO)는 췌장 베타 세포의 손상에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 특히, 활성산소는 인슐린 합성을 억제하고 세포 사멸을 유도시키는 것으로 보고되었다[4, 7, 20]. 또한 베타 세포에는 수퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD), 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase, GPX), 카탈라제(catalase), 티오리독신(thioredoxin) 등과 같은 산화-환원 반응을 조절하여 활성산소를 해독시켜 항산화 효과를 가지는 효소의 상대적 농도가 적기 때문에 베타 세포에서 활성산소 농도가 급속히 상승하게 되고 쉽게 손상을 일으킬 만한 농도에 이르게 된다. 즉, 활성산소의 과다한 생성과 활성산소에 대한 세포 내의 적

절한 방어 기전에 문제가 생길 경우, 당뇨병을 포함한 여러 질환의 병인에 직접적 혹은 간접적으로 관여할 것으로 생각된다.

세포 내 활성산소 증가는 DCF-DA의 산화에 의한 형광도의 변화로써 측정하였다. DCF-DA는 세포 내 활성산소를 측정하는 대표적인 물질이며, 세포막을 통과하여 비 형광성 DCFH로 탈 아세틸화되며, DCFH는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, peroxide, peroxynitrite와 같은 여러 활성산소 중에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 되는 원리를 이용하여 측정하였다[22]. 사이토카인(TNF-α, IFN-γ, IL-1β)을 처리하였을 때 발생하는 세포 내 활성산소 생성에 대한 들깨 새싹 추출물의 생성 억제 효능을 판단하였다. 그 결과 사이토카인을 처리한 군에서는 활성산소 생성량이 대조군과 비교하여 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 산화적 스트레스가 유발되었음을 알 수 있었다. 들깨 새싹 추출물을 처리한 군에서는 농도가 높아질수록 활성산소 생성이 사이토카인 처리군 보다 현저하게 감소되는 것을 현미경으로 확인하였으며(Fig. 1A) 정량한 결과에서도 유의한 억제 효능이 확인되었다(Fig. 1B).

**들깨 새싹 추출물의 세포 생존율에 대한 방어 효과**

들깨 새싹 추출물을 췌장 베타 세포에 농도별로(100, 200, 400, 1,000 µg/ml) 전처리 한 뒤 사이토카인을 처리하고 48시

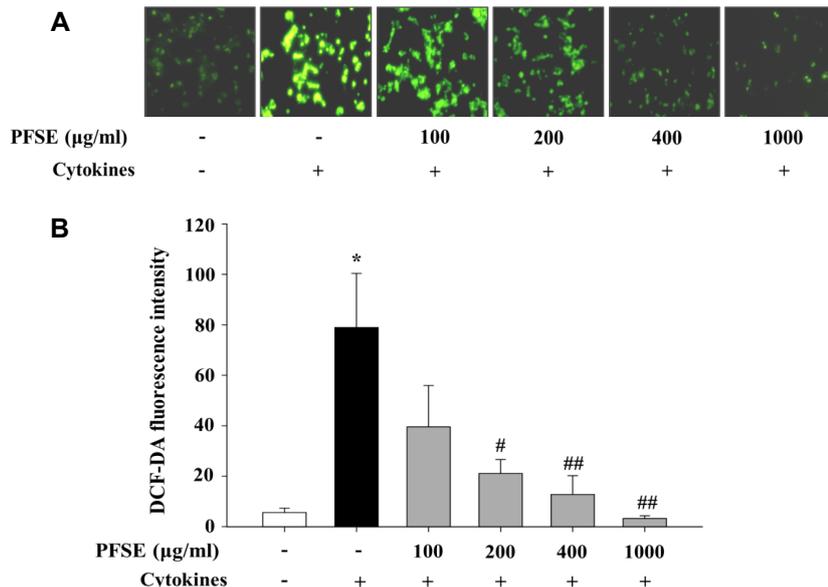


Fig. 1. The effect of PFSE on cytokines-induced ROS generation. Cytokines (TNF-α 10 ng/ml, IFN-γ 10 ng/ml, and IL-1β 5 ng/ml) and PFSE (100, 200, 400, and 1,000 µg/ml) were treated in RINm5F cells for 24 hr. (A) Cytokines-induced increase in ROS production in RINm5F. On the other hand PFSE dose-dependently decreased ROS production. ROS levels were measured using DCF fluorescence. Original magnification, ×200. (B) Images were quantified by Image J (NIH, Bethesda, MD). Values for ROS production are means ± SD from three independent experiments and normalized to percentage of control. \*p<0.05 versus blank; #p<0.05, ##p<0.01 versus cytokines.

간 동안 배양하였다. 세포생존율은 MTS를 이용하여 측정함으로써 세포생존율에 미치는 시료의 효능을 판단하였다. 그 결과 사이토카인을 처리한 군에서는 세포 생존율이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해서 52% 감소하였으나 100, 200, 400, 1,000 µg/ml의 들깨 새싹 추출물을 전 처리한 군의 세포 생존율은 각각 59, 71, 90, 95%로 나타나 사이토카인을 처리한 군에 비해서 농도가 증가할수록 방어율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 들깨 새싹 추출물을 단독으로 처리한 군의 세포 생존율은 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않아 시료 자체의 독성은 없는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

**들깨 새싹 추출물의 산화질소 합성 및 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향**

1형 당뇨병의 발생 원인중의 하나가 염증성 사이토카인에 의해 만들어진 산화질소인데[5, 8] 사이토카인에 의한 산화질소의 생성을 억제하여 췌장 베타 세포의 파괴를 예방하는 천연물이나 약물의 개발이 1형 당뇨병 치료제의 한 방법으로 이용되고 있다. 산화질소는 불안정하여 아질산염과 질산염으로 쉽게 전환되며 산소와 만나면 매우 독성이 높은 peroxynitrite를 형성한다[4, 7, 20]. 또한 췌장 소도 주위로 침습한 면역 세포들에 의해 생성된 종양괴사인자-α (TNF-α)와 인터루킨-1β (IL-1β) 등 염증 매개 사이토카인은 iNOS 및 COX-2의 발현을 증가시키면서 산화질소 생성을 증가시킨다고 보고되어 있다[8, 20]. 췌장베타 세포에 들깨 새싹 추출물을 농도별로 전 처리한 후 사이토카인을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 먼저 수용액에서 안정된 상태로 존재하는 아질산염을 측정하였고 산화질소를 발생시키는 유전자로 알려진 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 관찰하기 위하여 면역블롯을 시행하였다.

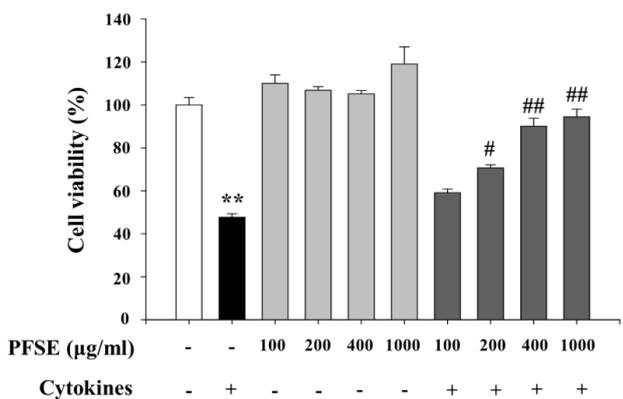


Fig. 2. Protective effects of PFSE on cytokines-induced decrease of viability in RINm5F cells. Cells ( $1 \times 10^4$ ) were pretreated with indicated concentrations of PFSE for 1 hr, and then treated with cytokines for 48 hr. Cell viability was determined by MTS assay. Each values are means  $\pm$  SD from three independent experiments and normalized to percentage of control. \*\* $p < 0.01$  versus blank; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  versus cytokines.

약물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 사이토카인을 처리한 군의 산화질소 생성량과 iNOS와 COX-2 단백질 발현양은 유의하게 증가하였으나 들깨 새싹 추출물의 전처리 농도가 높아 질수록 사이토카인에 의한 산화질소 생성과 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3). 따라서 들깨 새싹은 염증 매개 사이토카인의 조절을 통하여 산화질소 생성 억제 효능을 나타낸 것으로 사료된다.

**들깨 새싹 추출물의 p-NF-κB, p-IκB 단백질 발현 조절 효능**

췌장 베타 세포 또는 췌장 소도에서 세포분열, 세포고사, 세포증식 등을 조절하는 다양한 유전자의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자 중의 하나가 NF-κB이다. NF-κB는 염증반응과 관련된 유전자의 promoter에 결합하며 사이토카인 및 lipopolysaccharide (LPS) 등에 대한 노출에 의해 활성화되어[5] iNOS 및 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. NF-κB family는 일반적으로 p65/RelA, c-Rel, RelB, NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52) 5종으로 구성되어 있으며, 대부분 세포내에서 동중 혹은 이종 이량체를 형성한다. NF-κB는 정상 상태에서는 세포질에 존재하며 IκBa (inhibitor NF-κB)와 결합되어 핵 안으로 이동하는 것을 방해하고, 활성화되면 IκBa의 아미노산 잔기 중 Ser32, Ser36이 인산화되어 유비퀴틴에 의한 단백질 분해 기전이 활성화되며 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2의 활성 유도 및 염증관련 사이토카인의 합성에도 관여한다[2, 6]. NF-κB family 중 p65/RelA는 당뇨에서 췌장 베타 세포 손상에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[25]. p65/RelA는 염증성 사이토카인에 의한 산화 스트레스로 인산화되어 신호전달 활성화를 유도하며, 이때 p65의 아미노산 잔기 중 Ser529, 536, 276의 인산화에 의해 핵으로 이동하여 단백질간 상호작용 등을 유도하는 것으로 알려져 있다[25]. NF-κB p65는 serine 인산화에 의한 활성화 기전 이외에 tyrosine 인산화에 의해서도 활성화되는 것으로 알려졌다. 산화 스트레스에 의한 NF-κB의 tyrosine 인산화를 유도하는 대표적인 tyrosine kinase는 c-Src로 보고된 바 있다[11]. 본 연구에서는 들깨 새싹 추출물이 NF-κB p65와 IκBa의 Ser536과 Ser32에 대한 인산화 활성화에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 4). p-IκBa (Ser32)는 췌장 베타 세포에서 음성대조군인 사이토카인만 처리한 군에서 발현이 증가되었으며 들깨 새싹 추출물을 농도 별로 처리하였을 때, 400 µg/ml의 농도에서부터 Iκ-Ba (Ser32)의 인산화를 유의하게 억제하였다. 반면 p-NF-κB p65 (Ser536)의 발현 증가에 대한 들깨 새싹 추출물의 효능 분석 결과 200 µg/ml 농도부터 유의한 억제능을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 들깨 새싹 추출물이 사이토카인에 의한 IκBa와 NF-κB의 인산화 억제를 통해 단백질 분해 활성을 조절하여 베타 세포 손상을 보호하는 것으로 해석된다(Fig. 4).

이상의 결과를 종합하면, 들깨 새싹 추출물은 사이토카인에 의한 췌장 베타 세포에 대한 생존율을 농도에 따라 증가시킬

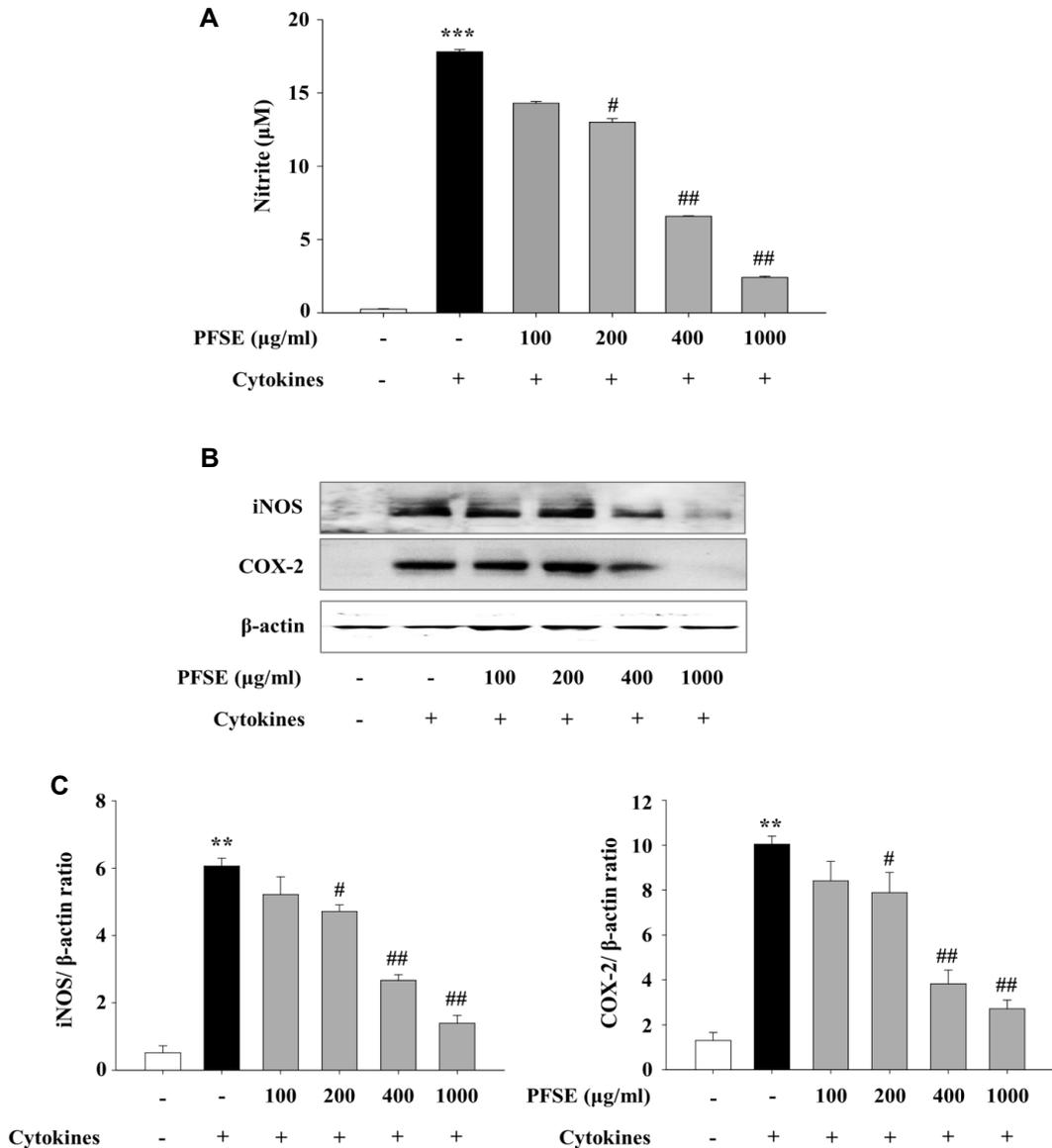


Fig. 3. Inhibitory effects of PFSE on cytokines-induced nitric oxide production and iNOS or COX2 overexpression. RINm5F cells were pretreated with indicated concentrations of PFSE for 1 hr, and then followed by cytokines for 24 hr. (A) NO production was determined in culture supernatant using Griess reagent. (B) Expression of iNOS and COX-2 were determined by Western blotting. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. (C) Quantification of the target protein bands relative to β-actin. Each values are means ± SD from three independent experiments. \*\**p*<0.01 versus blank; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 versus cytokines.

과 더불어 사이토카인에 의한 췌장 베타 세포내 활성 산소 증가 억제 효능 및 산화질소 증가에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통해 산화질소 생성을 조절하였다. 염증성 사이토카인에 의한 iNOS 및 COX-2의 활성을 조절하는 NF-κB의 인산화가 들깨 새싹 추출물에 의해 억제되는 것으로 미루어 들깨 새싹 추출물은 당뇨에 의한 염증성 사이토카인 증가 시 NF-κB 활성 기전 조절을 통해 산화질소 생성과 췌장 베타 세포의 손상을 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 들깨 새싹 추출물의 유효성분이 함유된 용매 분획물 혹은 분리 정

제물은 본 결과에서 제시된 농도보다 낮은 수준에서도 우수한 효능을 보일 것으로 예상된다. 결과적으로 들깨 새싹은 당뇨 예방에 어느 정도의 유익한 효과를 기대할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 2015년도 지역주력산업육성(R&D) 기술개발 사업(과제번호: R0004380)의 연구 수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

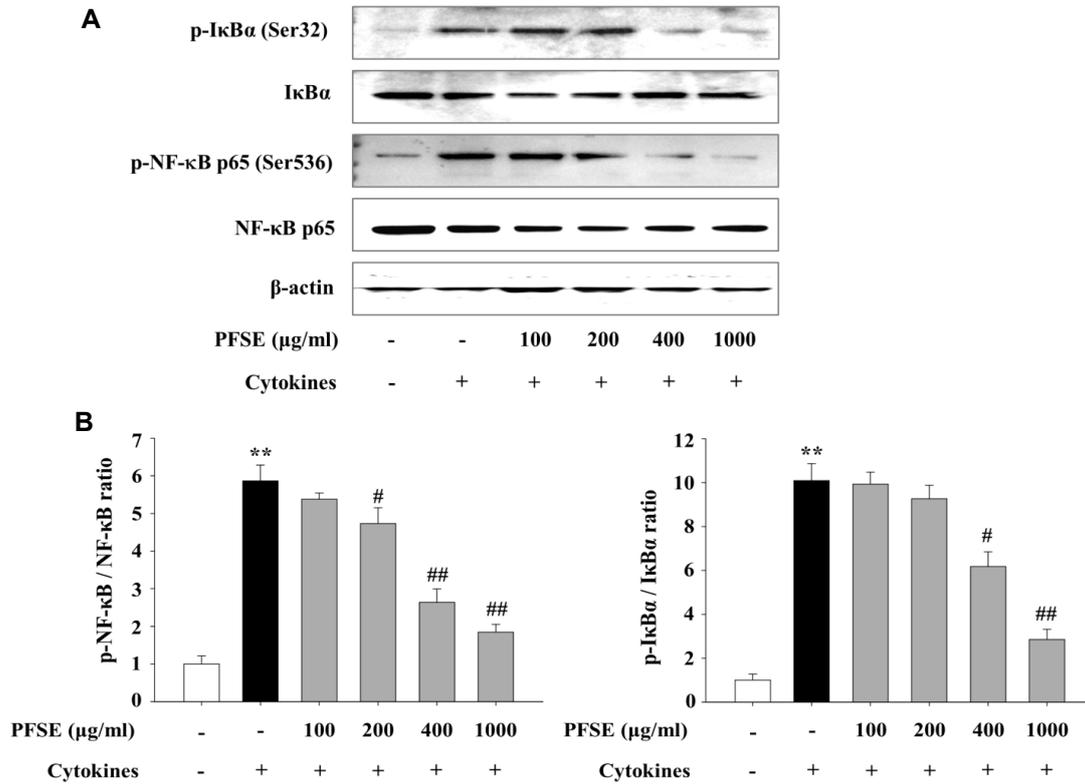


Fig. 4. Inhibition effect of PFSE on the expression of NF-κB activation and IκBα phosphorylation in cytokine-induced RINm5F cells. (A) The RINm5F cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were pretreated with indicated concentrations of PFSE for 1 hr, and then followed by cytokines for 24 hr. Expression of p-IκB-α, IκB-α, p-NF-κB and NF-κB were determined by Western blotting. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. (B) Quantification of the target protein bands relative to β-actin. Each values are means ± SD from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  versus blank; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  versus cytokines.

### References

- Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* **73**, 239-244.
- Baeuerle, P. A. and Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179.
- Baldwin, A. S. Jr. 1996. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-681.
- Baynes, J. W. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175-195.
- Celec, P. 2004. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed. Pharmacother.* **58**, 365-371.
- Eizirik, D. L., Flodström, M., Karlén, A. E. and Welsh, N. 1996. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **39**, 875-890.
- Eizirik, D. L., Sandler, S., Welsh, N., Cetkovic-Cvrlje, M., Nieman, A., Geller, D. A. and Hellerström, C. 1994. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *Clin. Investigator.* **93**, 1968.
- Eppens, M. C., Craig, M. E., Cusumano, J., Hing, S., Chan, A. K., Howard, N. J. and Donaghue, K. 2006. Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 1300-1306.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. and Grodsky, G. M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **23**, 599-622.
- Fan, C., Li, Q., Ross, D. and Engelhardt, J. F. 2003. Tyrosine phosphorylation of IκBα activates NF-κB through a redox-regulated c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **278**, 2072-2080.
- Foulis, A. K., Liddle, C. N., Farquharson, M. A., Richmond, J. A. and Weir, R. S. 1986. The histopathology of the pancreas in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* **29**, 267-274.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U. and Shaw, J. E. 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **103**, 137-149.
- Ha, K. H. and Kim, D. J. 2016. Current status of managing diabetes mellitus in Korea. *Kor. J. Intern. Med.* **31**, 845-850.

15. Heci, Y. 2001. Valuable ingredients form herb perilla: a mini review. *Innov. Food Technol.* **29**, 32-33.
16. Jacob, R. A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* **15**, 755-766.
17. Jeong, S. I., Kim, H. S., Jeon, I. H., Kang, H. J., Mok, J. Y., Cheon, C. J., Yu, H. H. and Jang, S. I. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Perilla frutescens*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 87-93.
18. Kim, E. K., Kwon, K. B., Han, M. J., Song, M. Y., Lee, J. H., Lv, N. and Park, B. H. 2007. Inhibitory effect of *Artemisia capillaris* extract on cytokine-induced nitric oxide formation and cytotoxicity of RINm5F cells. *Int. J. Mol. Med.* **19**, 535-540.
19. Lee, J. K. and Ohnishi, O. 2003. Genetic relationships among cultivated types of *Perilla frutescens* and their weedy types in East Asia revealed by AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **50**, 65-74.
20. Mandrup-Poulsen, T. 2003. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1433-1440.
21. Park, C. H., Kim, D. I., Shin, E. J., Lee, G. D., Kim, J. O., Kim, K. S. and Hong, J. H. 2008. Effect of *Bulnesia sarmienti* ethanol extract on plasma levels of glucose and lipid in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Food Sci.* **40**, 455-459.
22. Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P. and Sinha, R. P. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **397**, 603-607.
23. Southern, C., Schulster, D. and Green, I. C. 1990. Inhibition of insulin secretion by interleukin 1 $\beta$  and tumour necrosis factor  $\alpha$  via an L arginine dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS lett.* **276**, 42-44.
24. Van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H. and Bast, A. A. L. T. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **66**, 511-517.
25. Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V. and Chariot, A. 2005. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **50**, 43-52.
26. Yu, H., Qiu, J. F., Ma, Li. J., Hu, Y. J., Li, P. and Wan, J. B. 2016. Phytochemical and phytopharmacological review of *Perilla frutescens* L. (Labiatae), a traditional edible-medicinal herb in China. *Food Chem. Toxicol.* doi:10.1016/j.fct.2016.11.023.

## 초록 : 들깨 새싹 추출물의 췌장 RINm5F 세포에서 NF- $\kappa$ B 경로를 통한 사이토카인에 의한 손상 예방 효과

김다혜<sup>1</sup> · 김상준<sup>1</sup> · 정승일<sup>1</sup> · 유강열<sup>1</sup> · 천춘진<sup>2</sup> · 김장호<sup>3</sup> · 김선영<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>재단법인 전주농생명소재연구원, <sup>2</sup>영농조합법인 애농, <sup>3</sup>전주대학교 생명자원융합과학과)

들깨(*Perilla frutescens* (L.) Britton var.) 새싹은 꿀풀과에 속하는 1년생 초본이다. 본 연구의 목적은 들깨 새싹 에탄올 추출물이 사이토카인으로 유도된 췌장 베타 세포 손상에 대한 예방 효과를 평가하기 위함이다. 췌장 소도 주위에 염증 세포 침습으로 의해 분비되는 사이토카인은 1형 당뇨병의 발병원인에 해당된다. 인터루킨-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 종양괴사인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 사이토카인은 활성산소 형성을 유도한다. 세포 내 활성산소 축적은 췌장 베타 세포 기능장애와 세포사멸을 이끈다. 들깨 새싹 추출물은 항산화 효과를 증가 시켰으며 활성산소 생성을 억제하였다. 사이토카인은 세포생존율을 감소시켰고, iNOS와 COX-2의 발현을 증가시키고 산화질소 생성을 유도하였다. 들깨 새싹 추출물은 사이토카인으로 유도된 세포생존율 농도 의존적으로 예방하였다. 또한, 사이토카인에 의한 산화질소 생성과 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 증가를 억제하였다. 더 나아가 들깨 새싹 추출물은 췌장 베타 세포주(RIN-m5F)에서 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 억제를 통해서 NF- $\kappa$ B의 활성화를 상당히 감소시켰다. 요약하자면, 본 연구 결과는 들깨 새싹 추출물이 사이토카인으로 유도된 췌장 베타 세포 손상에 대한 보호 효과를 가지고 있다는 것이 확인되었다. 결과적으로 들깨 새싹은 혈당 증가에 의한 산화 스트레스와 염증성 사이토카인에 의한 베타 세포 손상을 완화하여 당뇨에 유익할 것으로 사료된다.