

Effect of Ethanol Extracts from Defatted *Perilla frutescens* on LPS-induced Inflammation in Mouse BV2 Microglial Cells

Sung-Gyu Lee* and Hyun Kang^{†,*}

Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University,
Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea

To evaluate the antioxidant and anti-neuroinflammatory effects of defatted *Perilla frutescens* extract (DPE) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV-2 microglial cells. Cell viabilities were estimated by MTT assay. LPS-stimulated BV-2 microglia were used to study the expression and production of inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), inducible NO synthase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2), and prostaglandin E₂ (PGE₂). Pretreatment with DPE prior to LPS treatment significantly inhibited excessive production of NO (10, 25, 50, 75, and 100 µg/mL) in a dose-dependent manner, and was associated with down regulation of expression of iNOS and COX-2. DPE also suppressed the LPS-induced increase in PGE₂ level (10, 25, 50, 75, and 100 µg/mL) in BV-2 cells. Therefore, DPE can be considered as a useful therapeutic and preventive approach for the treatment of several neurodegenerative diseases.

Key Words: Defatted *Perilla frutescens*, Anti-inflammatory activity, Microglial cells, INOS, COX-2

서 론

생활수준의 증가와 의료기술의 수준 향상으로 인간의 수명이 증가됨에 따라 노화관련 질병에 관한 관심이 높아지고 있으며, 특히 노화의 주된 원인으로 알려진 산화적 스트레스에 의해 발병되는 퇴행성 뇌질환에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Li et al., 1999). 인체 내에 활성산소가 과다하게 생성되면 항산화 시스템의 기능이 저하되면서 인체 내의 항산화계의 불균형이 발생하게 되고 이는 핵과 미토콘드리아의 DNA 합성 등의 세포기능을 방해하게 되어 세포가 사멸하게 된다(Klein and Ackerman, 2003).

미세아교세포(microglial cell)는 뇌 염증에 관여하는 주요 면역세포로, 뇌신경 시스템에서 숙주로부터의 방어와 조직재생에 주요한 역할을 한다(Kreutzberg, 1996). 그러나

미세아교세포의 과활성화는 염증과 같은 뇌손상 후 빠르게 일어나며, 퇴행성신경질환의 원인이 되고 있다(Chao et al., 1995). 미세아교세포의 만성적인 활성화와 이에 수반되는 염증 유도 인자들의 발현과 생성은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinsonism disease, PD), 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS) 등의 다양한 신경질환의 조직학적 지표로 증명되고 있다(Nakajima and Kohsaka, 1993; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Drew et al., 2003). 따라서, 미세아교세포로부터 분비되는 염증 매개물을 조절하는 것은 신경퇴행성 질환의 진행을 예방하거나 신경 손상의 치료를 위한 방법으로 제시되고 있다.

미세아교세포의 과도한 활성화는 lipopolysaccharides (LPS), β -amyloid related proteins, human immunodeficiency virus (HIV)의 외부 단백질인 gp120과 같은 물질들에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며, nitric oxide (NO), prosta-

Received: October 13, 2018 / Revised: December 10, 2018 / Accepted: December 13, 2018

*Professor.

[†]Corresponding author: Hyun Kang. Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea.

Tel: +82-41-550-3015, Fax: +82-41-559-7934, e-mail: hkang@dankook.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

glandin E₂ (PGE₂), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증성 매개 인자 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 분비를 촉진하여 신경독성을 유발한다(Galea et al., 1996; Laflamme and Rivest, 2001). LPS에 의한 신경염증반응은 독성물질로 작용하는 NO나 PG의 생성에 영향을 미치는 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 조절되기도 하는데 이러한 일련의 과정은 nuclear factor (NF)- κ B와 activator protein (AP)-1의 신호전달 조절 기전과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Colton, 2009; Park and Chun, 2016).

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)는 꿀풀과의 한해살이풀 또는 씨로서 중국 중남부, 일본, 동남아시아 등에서 재배되어 왔으며 우리나라 전역에서도 다양한 종의 들깨가 재배되고 있다(Ohara et al., 2003). 들깨는 불포화 지방산인 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid)이 90% 이상을 이루고 있어 체내에서의 소화 흡수가 빠르고 동물성 지방에서 다량 얻을 수 없는 필수 지방산도 충분히 공급받을 수 있다(Lee et al., 2002). 들깨의 용도를 보면 잎과 종실은 대부분 식용 및 약용으로 이용되고 있지만, 여러 가지 가공단계를 거쳐 천연식용색소, 화장품의 원료나 공업용 재료로도 활용되고 있다(Ohara et al., 2003). 지방산 이외의 들깨의 성분으로는 sesamol, sesamin, sesamolign 등의 lignan 화합물을 비롯한 여러 페놀성 화합물이 함유되어 있으며, 이들의 항산화 작용이 보고되고 있다(Hwang and Ko, 1980; Wang and Choe, 2012).

따라서 본 연구에서는 들깨 부산물의 이용가치를 높이는 방법으로 들깨박 추출물에서 항신경염증 활성이 있는지를 연구하는 것이 목적이었으며, 향후 기능성 식품 및 의약품으로서의 개발 가능성도 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 들깨박은 충북 음성 코메가 회사에서 생 들깨를 착유 후 남은 부산물을 수거하여 건조 후 사용하였다.

에탄올 추출물 제조

들깨박은 믹서기를 이용하여 조분쇄하여 시료 100 g에 대해 10배의 70% 에탄올을 넣어 3일 동안 추출한 후, 여과지(Whatman No. 2, Maidstone, England)를 사용하여 여과

하였다. 여과한 추출액을 감압농축기(N-1000S-WD, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축 후, 동결건조(FDU-1100, EYELA Co., Tokyo, Japan)하여 들깨박 추출물(defatted *Perilla frutescens* extract, DPE)을 제조하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

DPE의 총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다(Folin and Denis, 1912). DPE를 용액 1 mL에 녹이고 농도별로 희석 후, 희석한 샘플을 96 well-plate에 60 μ L씩 분주하였다. 증류수와 1:1 희석한 Folin 시약을 동량 첨가하고 3분간 반응시킨 후 10% sodium carbonate (Na₂CO₃)을 동량 넣고 1시간 동안 반응시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용한 표준곡선은 시료 측정 방법과 동일하게 측정하여 작성하였다.

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Nieva et al., 2000). DPE를 농도별로 희석한 시료 100 μ L와 80% 에탄올 860 μ L을 혼합한 혼합물에 10% aluminium nitrate (Sigma Co.) 20 μ L와 1 M potassium acetate (Sigma Co.) 20 μ L를 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량의 표준물질로 quercetin (Sigma Co.)을 동일한 방법으로 측정하여 함량을 구하였다.

세포주 배양

세포생존 및 항염증 효능 검증에 사용된 세포주는 미국 하버드 의과대학에서 분양받은 microglia cell line BV-2를 사용하였다. BV-2 세포는 RPMI1640 배지(Gibco, BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 μ g/mL penicillin (Gibco) 그리고 100 μ g/mL streptomycin (Gibco)을 첨가하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 세포가 80~90% 자랐을 때 계대 배양하였다.

세포생존율 측정

LPS 및 DPE가 세포생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 1 \times 10⁵ cell/mL 세포를 180 μ L씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 배양기에서 배양한 다음, DPE를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양한 후 배양액을 제거하고 0.5 mg/mL MTT가 함유되어 있는 배지 200 μ L를 첨가한 다음 4시간 동안 배양 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 μ L를 첨가하여 생성된 formazone 결정을 용해시킨 후,

microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 LPS를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

NO 생성저해 효과

DPE의 항염증 효능을 분석하기 위하여 염증 유발 인자인 LPS와 DPE를 각 농도별로 처리한 신경교세포에서 생산되는 NO를 억제하는 효능이 있는지 확인하였다. NO 측정은 24 well plate에 세포를 1×10^5 cell/mL을 seeding한 후, LPS와 DPE를 농도별로 첨가한 후, 24 h incubator에서 배양하였다. 그 후, 배양액과 Griess reagent (Sigma Co.)를 각각 100 μ L씩 동량 혼합하여 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 구입하여 실험하였다. 세포에 DPE를 처리하고 100 ng/mL의 LPS를 처리하였다. 18시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양된 배지를 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 100 μ L씩 loading하고, 여기에 1차항체 용액 50 μ L와 PGE₂ conjugate 50 μ L씩 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μ L씩 처리하여 30분간 반응시킨 후, stop solution을 50 μ L 처리한 후 450 nm에서 측정하였다.

Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 세포를 ice 상에서 tris buffered saline (TBS, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin 및 1 mM PMSF)를 첨가하여 4°C에서 30분간 추출하여 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리 후 상등액을 모았다. 추출된 단백질의 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량 후, 동일한 양의 단백질을 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시켰다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였고, 이 membrane을 항체의 비 특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk)에서 30분간 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체 (anti-iNOS, anti-COX2)를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1%

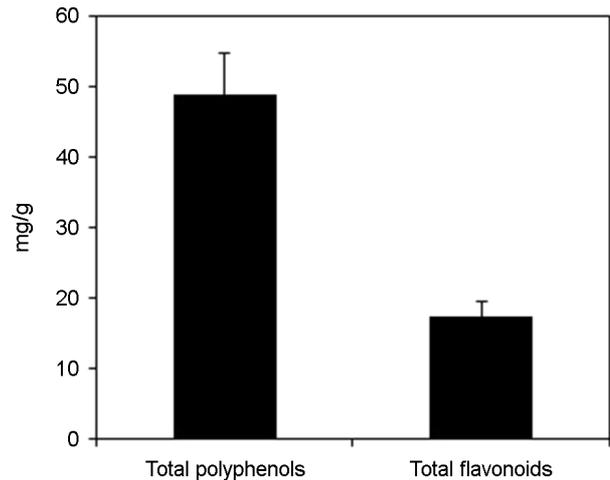


Fig. 1. Total polyphenols and flavonoids contents in DPE. Milligrams of total polyphenol content/g of samples based on gallic acid as standard. Milligrams of total flavonoid content/g of samples based on quercetin as standard. Each value is mean \pm S.D. (n=3).

Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 20 분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray 필름 상에서 단백질을 확인하였다.

통계처리

실험의 결과값은 SPSS Window program (ver. 10.0)을 이용하여 측정하였으며, 모든 측정값은 평균값 \pm 표준편차로 나타났다. 통계학적 분석은 student's *t*-test를 실시하였고, 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

폴리페놀 및 플라보노이드 함량비교

DPE에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 gallic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다 (Fig. 1). 그 결과, DPE의 총 폴리페놀 함량은 48.32 mg/g의 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 17.32 mg/g으로 함유하고 있음을 확인하였다.

세포생존율 측정

DPE가 세포생존에 끼치는 영향을 확인하기 위해 BV-2 세포주에 LPS와 DPE를 농도별로 처리하였다. 그 결과, LPS 100 ng/mL를 단독으로 처리하였을 때, 처리하지 않은 군에 비교하여 큰 차이가 없었다. 또한, LPS와 DPE를 같

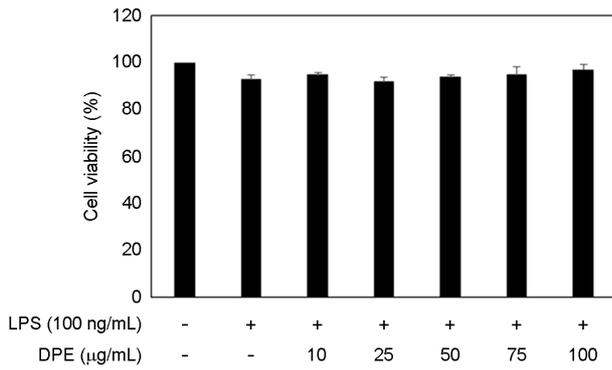


Fig. 2. Effect of DPE on cytotoxicity in BV-2 cells. DPE was treated with various concentrations in BV-2 cells for 24 h. Values are expressed as the mean \pm SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments.

이 처리하였을 때에도 10, 25, 50, 75, 100 μ g/mL 모든 농도에서 cell viability가 95% 이상으로 세포에 대한 독성이 없는 것을 확인하였다(Fig. 2).

DPE의 NO 생성저해 효과

DPE의 NO 생성저해 효과를 확인하기 위하여 LPS로 자극된 BV-2 세포주에 DPE를 10~100 μ g/mL 농도별로 처리한 후, NO의 생성농도를 확인하였다. LPS를 단독 처리하였을 때, NO 함량이 23.2 μ M로 증가되는 것을 확인하였다. 이에 반해, DPE를 처리하였을 때 10, 25, 50, 75, 100 μ g/mL의 농도에서 각각 17.5, 16.1, 13.2, 8.5, 4.3 μ M의 농도로 NO가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 50 μ g/mL 농도에서부터 NO의 생성량이 50% 이상 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량

본 연구에서 LPS로 유도된 BV-2 세포에서 DPE의 PGE₂ 생성량을 확인한 결과, DPE는 LPS만을 처리한 군에 비해 75, 100 μ g/mL 농도에서 유의성 있는 PGE₂ 생성량 감소가 확인되었다(Fig. 4).

iNOS와 COX-2 생성억제

DPE의 NO와 PGE₂ 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 효소를 확인하기 위하여 이들 효소의 세포 내 발현을 측정하였다. BV-2 cell에 DPE를 50, 100 μ g/mL 2개의 농도로 15시간 처리한 뒤, LPS로 20분 동안 자극하고 세포 내 단백질을 분리하여 웨스턴 블롯 분석 방법을 통하여 이

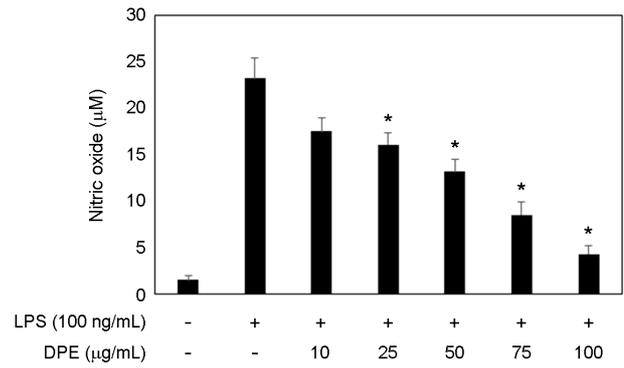


Fig. 3. Effect of DPE on NO production in BV-2 cells. DPE was treated with various concentrations in BV-2 cells for 24 h. Values are expressed as the mean \pm SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments. *Statistically significant difference from the LPS control group, as determined by the student's *t*-test as $P < 0.05$.

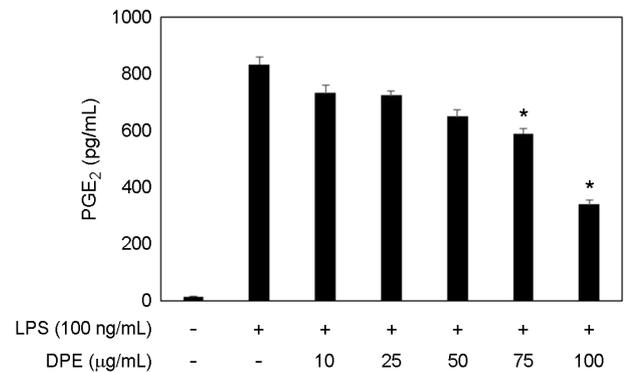


Fig. 4. Effect of DPE on PGE₂ production in BV-2 cells. DPE was treated with various concentrations in BV-2 cells for 24 h. Values are expressed as the mean \pm SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments. *Statistically significant difference from the LPS control group, as determined by the student's *t*-test as $P < 0.05$.

들 단백질의 발현을 확인하였다(Fig. 5). 그 결과 DPE의 처리농도에 비례하여 감소하는 것으로 확인되었다.

고 찰

뇌에서의 염증 반응이 만성적으로 지속이 되면 NO, ROS, 염증성 사이토카인이 분비되고 이러한 염증 유발물질들은 뇌세포를 퇴화시켜 여러 가지 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 신경교세포는 LPS 등과 같은 염증 유발물질에 노출이 되면 염증을 매개하는 물질을 생성하는 것으로 보고되었다(Boje and Arora, 1992; Chao et al., 1995;

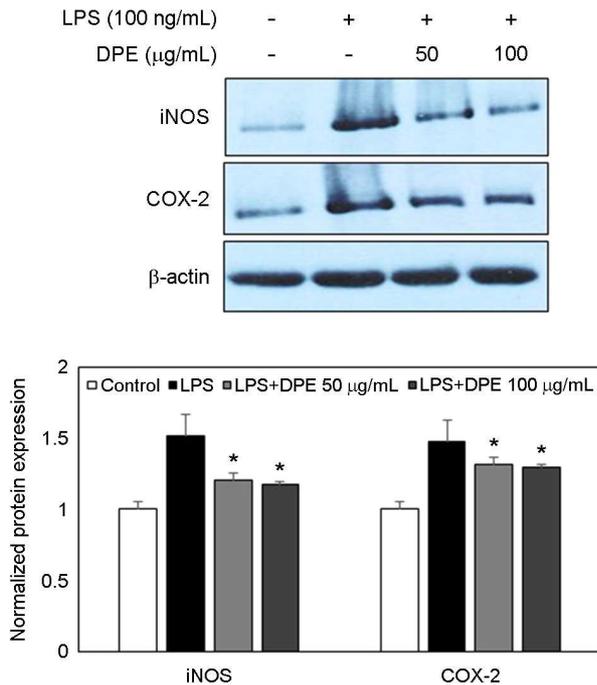


Fig. 5. Effect of DPE on iNOS and COX-2 protein expressional levels in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. The expression levels of iNOS and COX-2 production in the LPS-stimulated BV-2 cells by indicated concentrations (50, 100 μg/mL) of the DPE was monitored by western blot analyses with the specific antibodies against iNOS and COX-2. The internal control used was β-actin.

Hendriks et al., 2005; Glass et al., 2010).

기능성 물질의 대표적인 성분 중 하나인 폴리페놀계 화합물들은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (-OH) 기를 가진 방향족 화합물로서 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 항염, 항산화, 항암 등의 다양한 생리 활성을 가진다(Bors and Saran, 1987; Sato et al., 1996). 천연항산화제 및 항염증제의 역할을 하는 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 DPE에서 측정된 결과, 폴리페놀과 플라보노이드가 각각 48.32, 17.32 mg/g의 함량으로 포함되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 1). 본 연구에서 측정된 총 폴리페놀 함량은 Kim (2015) 등이 보고한 함량(222.6 mg gallic acid equivalent/100 g) 보다 약 21배 높은 수준으로 나타났다. 또한 Lee (1994) 등의 보고에서는 들깨를 포함한 8가지의 종실 품종에 따라 총 폴리페놀 함량이 약 120~2,060 mg gallic acid equivalent/100 g으로 나타나는 것을 보고하였다. 이와 같이 총 폴리페놀 함량의 차이는 각 연구마다 이용된 들깨의 품종, 재배 조건, 수확시기 등의 차이로 인해 함량 차이가 다양한 것으로 생각된다.

Microglia cell인 BV-2 세포는 뇌의 염증과 퇴행성 변화에서 중요한 역할을 하는 중추신경계 대식세포이며, 염증 발생 시 활성화된 microglia cell은 염증 매개물질인 prostaglandins (PG)과 nitric oxide (NO) 등을 발생시키게 된다(Hur et al., 2007). 특히, LPS와 같은 내독소가 중추신경계에 침투하게 되면 인지능력뿐만 아니라 바이러스성 뇌염으로 인한 기억력 감퇴와 언어능력의 저하가 발생되게 되는데 BV-2 세포는 이와 같은 질환 방이에 있어 중요한 세포라 할 수 있다(Seo et al., 2013). NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되는 2차신호 전달 물질로 뇌 기능과 신경보호, 신경변성 등에 연관되어 있다(Hong et al., 2002). 본 연구에서 LPS로 유도된 BV-2 세포에서 DPE의 NO 생성량을 확인한 결과, DPE는 LPS만을 처리한 군에 비해 10, 25, 50, 75, 100 μg/mL 모든 농도에서 농도의존적인 NO 생성량 감소가 확인되었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 DPE가 LPS에 의해 과 생성된 NO 생성량을 효과적으로 감소시킴에 따라 중추신경계에 바이러스 침투로 인한 염증성 뇌 신경 손상이 발생할 경우, 대식세포인 BV-2 세포를 통해 효과적으로 감소시킬 수 있음이 검증되었다.

PGE₂의 증가는 급성 염증단계에서 효과적이고 신속하게 감소가 되지 않을 경우, 염증 초기단계를 만성단계로 유도하게 되므로 PGE₂는 염증단계에서 가장 중요하다고 할 수 있다(Seo et al., 2013). 특히, 중추신경계에서 염증이 만성으로 진행될 경우에는 뇌 세포 손상을 바탕으로 신경병, 말초신경, 척수 및 대뇌피질의 변성을 통해 신체에 심각한 손상을 초래하게 된다. 본 연구에서 LPS로 유도된 BV-2 세포에서 DPE가 PGE₂ 생성량에 미치는 효과를 확인한 결과, DPE는 LPS만을 처리한 군에 비해 75, 100 μg/mL 농도에서 PGE₂ 생성량이 유의성 있게 감소되는 것을 확인되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 앞선 NO 생성량 감소 결과와 마찬가지로 DPE가 PGE₂ 생성량 역시 유의적으로 감소시킴에 따라 중추신경계의 염증 발생을 효과적으로 억제시켜 만성 염증단계로 진행되는 것을 효과적으로 개선시킬 수 있음이 입증되었다.

NO는 생리학적 합성조절에서 가장 중요한 역할을 하는데 이들은 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS (eNOS)와 같은 3가지의 형태로 존재한다(Yui et al., 1991). 그 중, iNOS는 염증조절을 일으키는 중요한 효소 중 하나이다(Korhonen et al., 2002). iNOS는 Ca²⁺ 비 의존성 경로를 통해서 장시간에 걸쳐 증가하여 다량의 NO를 형성한다(Vegeto et al., 2001). iNOS의 발현은 murine

macrophage, 내피세포, 평활근세포 및 심근세포 등 많은 세포에서 관찰되고 있다. 인간의 iNOS는 염증성질환이 있는 환자의 macrophage에서 다량의 NO를 생성하여 세균침입을 억제하거나 혹은 T-세포증식을 억제하여 국소 염증 반응을 하향시키는 방어에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다(Wang et al., 2002; Hanisch, 2002). COX는 COX-1과 COX-2로 존재하는데, 그 중 COX-2는 오직 TNF- α , IL-1 β 와 같은 사이토카인과 박테리아 독소 및 LPS와 같은 염증 신호에 반응하여 발현된다. 또한 COX-2는 PGE₂의 많은 양을 생성하며, 염증을 유도한다(Mitchell et al., 1995; Chen et al., 2001). 본 연구에서 iNOS와 COX-2 단백질은 LPS 처리 시 강하게 발현되었으나 LPS에 DPE 50, 100 μ g/mL를 함께 처리 시 iNOS와 COX-2의 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

본 연구 결과에서 보여준 DPE의 항신경염증 효과는 들깨박이 미세아교세포의 활성을 억제하여 신경 염증반응을 효율적으로 제어할 수 있는 기능성 소재로서의 가능성을 제시하였다. 그러나 향후 항신경염증 개선 소재로의 개발을 위해서는 뇌신경손상 동물모델을 이용한 들깨박 추출물의 유효성 검증과 효과에 대한 분자적 메커니즘 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 연구는 중소벤처기업부의 창업성장기술개발사업의 일환으로 수행하였음(S2539864, 국내 다유들깨 부산물로부터 광노화 소재 발굴 및 스킨디펜스 화장품개발).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*. 1992. 587: 250-256.
- Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Research Communications*. 1987. 2: 289-294.
- Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behavior and Immunity*. 1995. 9: 355-365.
- Chao CC, Hu S, Peterson PK. Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Critical Reviews in Neurobiology*. 1995. 9: 189-205.
- Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. 2001. 20: 3921-3926.
- Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of NeuroImmune Pharmacology*. 2009. 4: 399-418.
- Drew PD, Chavis JA, Bhatt R. Sex steroid regulation of microglial cell activation: relevance to multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003. 1007: 329-334.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. 1912. 12: 239-249.
- Galea E, Reis DJ, Fox ES, Xu H, Feinstein DL. CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *Journal Of Neuroimmunology*. 1996. 64: 19-28.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010. 140: 918-934.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*. 1999. 22: 219-240.
- Hanisch UK. Microglia source and target of cytokines. *Glia*. 2002. 40: 140-155.
- Hendriks JJA, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Research Reviews*. 2005. 48: 185-195.
- Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. 83: 153-159.
- Hur IH, Sim SY, KIM KJ. Anti-inflammatory effect of various solvent extract from *Atractylodes japonica* on Lipopolysaccharide-induced Inflammation in BV2 cells. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2007. 20: 36-46.
- Hwang SZ, Ko YS. Studies on the constituents of Korean edible oils and fats- part 4. Determination of sesamol in sesame and perilla seeds. *Korean Journal of Nutrition*. 1980. 13: 177-186.
- Kim SN, Son BR, Ju JH. Antioxidant activities of *Perilla frutescens* britton seed extract and its inhibitory effects against major

- characteristics of cancer cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2015. 44: 208-215.
- Klein and Ackerman. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *Journal Of Clinical Investigation*. 2003. 111: 785-793.
- Korhonen R, Lahti A, Hamalainen M, Kankaanranta H, Moilanen E, Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Molecular Pharmacology*. 2002. 62: 698-704.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*. 1996. 19: 312-318.
- Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram negative bacterial cell wall components. *The FASEB Journal*. 2001. 15: 155-163.
- Lee BH, Ryu SN, Kwak TS. Current status and prospects of quality evaluation in *Perilla*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2002. 47: 150-162.
- Lee JH, Lee S. Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. *Korean Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 1994. 26: 310-316.
- Li PA, Liu GJ, He QP, Floyd RA, Siesjo BK. Production of hydroxyl free radical by brain tissues in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. 27: 1033-1040.
- Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology*. 1995. 50: 1535-1542.
- Nakajima K, Kohsaka S. Functional roles of microglia in the brain. *Neuroscience Research*. 1993. 17: 187-203.
- Nieva, Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. 71: 109-114.
- Ohara K, Tommi U, Sato EF, Tazaki K. Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA. *Journal of Experimental Botany*. 2003. 54: 2635-2642.
- Park E, Chun HS. Green tea polyphenol Epigallocatechine gallate (EGCG) prevented LPS-induced BV-2 microglial cell activation. *Journal of Life Science*. 2016. 26: 640-645.
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996. 44: 37-41.
- Seo DS, Kang JK, Jeong MH, Kwon M, Park CB. Anti-diabetic Effects of *Isaria tenuipes* in OLETF Rats as an Animal Model of Diabetes Mellitus Type II. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 2013. 28: 152-157.
- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991. 266: 12544-12547.
- Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *Journal of Neuroscience*. 2001. 21: 1809-1818.
- Wang MJ, Lin WW, Chen HL. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience*. 2002. 16: 2103-2112.
- Wang SY, Choe EO. Oxidative stability and antioxidant changes in *perilla* seeds and *perilla* oil affected by UV irradiation. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2012. 44: 8-13.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.398>

Cite this article as: Lee SG, Kang H. Effect of Ethanol Extracts from Defatted *Perilla frutescens* on LPS-induced Inflammation in Mouse BV2 Microglial Cells. *Biomedical Science Letters*. 2018. 24: 398-404.