

감마선을 이용한 육종 차조기의 항염증 효과

심부용^{1*} · 박정현² · 김성규² · 지중구^{3†}

^{1*}중부대학교 산학협력단, ²(주)에스에프씨바이오, ^{3†}중부대학교 한방건강관리학과
(2019년 6월 7일 접수: 2019년 6월 17일 수정: 2019년 6월 18일 채택)

Effects of anti-inflammatory on *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray

Boo-Yong Sim^{1*} · Jung-Hyun Park² · Sung-Kyu Kim² · Joong-Gu Ji^{3†}

^{1*}Industry Academic Cooperation Foundation, Joongbu University, ²SFC bio Co., LTD,
^{3†}Department of Oriental Health Care, Joongbu University

(Received June 7, 2019; Revised June 17, 2019; Accepted June 18, 2019)

요약 : 본 연구는 감마선을 이용한 육종 차조기 추출물을 통해 항염증 효능을 평가하고자 하였다. RAW 264.7 세포에서 MTT를 통해 세포 생존율을 평가하였으며, LPS로 유도한 RAW 264.7 세포에서 ROS, NO, 염증성 사이토카인, NF- κ B, COX-2 등을 ELISA, Luminex 및 PCR로 측정하였다. 그 결과, 육종 차조기 추출물은 25 μ g/ml 이하에서 세포독성이 없었으며, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 ROS, NO, 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성을 억제하였다. 또한, NF- κ B, COX-2의 발현을 감소시켜 육종 차조기 추출물은 뛰어난 항염증 효과를 보였다. 이와 같은 결과는 염증 매개체로 인해 발생하는 질환을 개선하기 위한 새로운 건강식품 및 치료제의 원료로 개발될 수 있다.

주제어 : 감마선, 안전성, 육종, 차조기, 항염증

Abstract : The purpose of this study was to confirmed anti-inflammatory effect the apple Induced by mutants with γ -Ray extract. Cell viability was assessed by MTT assay using RAW 264.7 cells. The extracts measured through changes in the levels of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), inflammatory cytokines, NF- κ B, and COX-2 on LPS-induced RAW 264.7 cells. All test results were analyzed by ELISA reader, Luminex and RT-PCR. In result, the extracts was not toxic below in 25 μ g/ml, and extracts was inhibited the productions nitric oxide, ROS, cytokines (IL-1b, IL-6, TNF-a), NF- κ B and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cells. Also, the expression levels were decreased on mRNA of NF- κ B and COX-2. In other words, *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts showed significant

[†]Corresponding author
(E-mail: jjg1970@joongbu.ac.kr)

anti-inflammatory effect. These results may be developed as a raw material for new health food and therapeutics to ease the related to the above mediators.

Keywords : anti-inflammatory, safety, Mutation breeding, *Perilla frutescens* var. *crispa* γ -Ray

1. 서론

전 세계적으로 천연물은 문헌과 연구 등을 통해 알려진 효능을 바탕으로 식·의약품, 화장품 등과 같이 일상생활에 밀접한 주된 자원으로 활용되고 있으나 수확 및 효능향상과 재배의 편리성 등 특정 효능을 극대화하기 위한 목적성에 따라 다양한 방법으로 육종(Mutation breeding)되고 있다. 육종은 크게 교배, 유전자변형, 돌연변이 등으로 나눌 수 있는데, 이 중 교배육종은 인공 교배를 통해 다른 품종간 암수를 교배하는 가장 보편적인 방법이며, 염색체변형 육종은 인위적으로 원하는 염기서열에만 작용하여 유전자를 편집하는 방법이다. 또한, 돌연변이육종은 방사선(X-ray, 감마선 등)을 통해 식물체 자체의 일부 유전자 변이가 진행되는 방법으로 다른 육종법에 비해 환경적 위해성 요소, 비용, 지적 재산권 분쟁 등 여러 문제요인이 적어 최근 들어 관련 연구가 증가하는 추세이다[1].

차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 일년생의 초본으로 들깨(*Perilla frutescens* var. *frutescens*)와는 같은 종의 서로 다른 변종으로 줄기의 길이, 잎의 색, 향, 종자 크기 등으로 구별되며, 들깨는 유료작물로, 차조기는 약용작물과 향신채 등으로 활용되고 있다[2]. 현재까지 알려진 차조기의 효능으로는 항산화, 항알레르기, 항균, 항암 및 당뇨 등이 알려져 있으며, 플라보노이드, 비타민 A, D, E, isogomaketone(IK) 등의 성분이 함유되어 있다[3,4]. 특히, IK는 perillaketone(PK) 성분과 함께 차조기 추출물의 주요한 성분 중 하나로 차조기 특유의 향을 내는 방향성 성분으로 항암을 비롯한 항염증, apoptosis 등에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다[5-7].

본 연구에 활용된 차조기는 200Gy의 감마선을 조사하여 방사선 육종을 진행함으로써 기존 차조기가 가지고 있는 isogomaketone 성분 함량을 10배 이상 높은 형질전환 천연물이며, 이전 연구[4,8]를 통해 메탄올 추출된 형질전환 차조기가

RAW 264.7 세포와 3T3-L1 세포에서 항염증 및 항비만 효과를 확인한 바 있으나 초임계 유체 추출을 활용하여 진행된 연구는 진행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 식·의약 소재로 활용이 상대적으로 적합한 초임계 유체 추출을 활용한 형질전환 차조기로 관절염, 아토피피부염, 크론병과 같은 염증성 질환에 관한 가능성을 다각도로 확인하고자 세포독성을 바탕으로 다양한 염증성 매개체 확인을 과학적으로 진행한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 조제

방사선 형질전환 차조기(이하, 육종 차조기)는 한국원자력연구원(Korea)의 방사선육종연구센터에서 수령한 건조물을 제분하여 추출(압력 400 bar, 온도 50°C), 분리(압력 40 bar, 온도 40°C), CO₂ 유량(550 ml-12 min)의 조건에서 총 3시간 동안 초임계 유체 추출을 진행하였다. 추출 후 수분을 제거한 원료를 -4°C에서 냉장 보관하며 실험에 이용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS : Welgene Co., Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., UK), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), CCK-8 (Dojindo, U.S.A), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였다. 또한, 기기는

CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2.3. 세포 배양

한국세포주은행 (Korea)에서 구매한 RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml에 넣어 부유시키고 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

2.4. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 새로운 배양액으로 교체한 후 육종 차조기 추출물을 각각 5, 10, 25, 50, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 CCK-8 solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하고 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.5. 활성산소 저해 효능 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 육종 차조기 추출물 5, 10, 25 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA를 10 μM 씩 처리하여 15분 동안 세포배양기에서 반응시켰다. 염색 후 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 PBS 400 μl 를 부유시켜 Flow cytometer를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 활성산소 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

2.6. 항염증 효능 측정

염증 관련 매개체 측정을 위한 시료를 확보하기 위해 12 or 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 육종 차조기 추출물 5, 10, 25 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 시료를 다음과 같은 방법에 따라 각각 활용하였다.

2.6.1. Nitric oxide(NO) 생성량

96 well plate에 배양한 시료를 nitric oxide detection kit의 구성 물질인 N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고 10분간 상온에서 반응시키고 N2 buffer 50 μl 를 추가하여 10분간 다시 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 NO 생성 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

2.6.2. 염증성 사이토카인(cytokine) 생성량

12 well plate에 배양한 시료를 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 cytokine kit의 스탠다드를 96 well plate에 25 μl 씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 25 μl 의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 25 μl 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 μl 를 넣고 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량을 측정하였다.

2.7. 유전자 발현 측정

2.7.1. RNA 추출

6 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 육종 차조기 추출물 5, 10, 25 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양

후, easy blue 1 ml와 chloroform 200 μ l를 넣고 혼합하여 원심분리한 상층액 400 μ l에 binding buffer 400 μ l를 넣어 다시 반응시킨 뒤 반응액 700 μ l를 column에 주입하여 원심분리하였다. 원심분리한 column에 washing buffer A와 B를 각각 700 μ l씩 순차적으로 넣어 원심분리한 뒤 elution buffer를 50 μ l 넣고 원심분리하여 추출된 total RNA를 확보하였다.

2.7.2. cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 total RNA 1 μ g이 되도록 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하여 첨가하였다. 첨가 후 45°C에서 60분 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후 95°C에서 5분 동안 반응하여 M-MLV RT를 불활성화한 다음 합성이 완료된 cDNA를 유전자 발현량 측정에 사용하였다.

2.7.3. 유전자 발현량 측정

합성이 완료된 cDNA를 증폭을 위하여 real-time PCR을 진행하였으며, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μ l, 각 primer 2 μ l, SYBR Green 10 μ l, DEPC-DW 5 μ l씩 넣어 다음과 같이 진행하였다. 94°C에서 2분 동안 반응한 다음 95°C에서 5초, 65°C에서 30초를 40회 반복하여 진행하였고 이후 유전자 발현량은 대조군 대비 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 Table 1과 같다.

2.8. 통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 측정하였으며 평균 값±표준편차(mean±S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05).

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

대식세포(macrophage)는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 최초로 병원체에 대응하는 면역세포로서 항원의 감시 및 이동, 식균작용 등을 담당하는 선천면역계의 중요한 세포이다[9]. 또한, T세포와 반응하여 T세포 활성을 조절하는 역할로 후천 면역계에도 관여하기에 염증 및 면역질환에 관한 가능성과 시료의 안전성을 확보하는 연구에 주로 활용된다[9].

본 연구에서 육종 차조기 추출물에 관한 연구 범위 설정을 위해 세포독성을 확인한 결과, 육종 차조기 추출물은 25 μ g/ml 농도 이하에서 대조군 대비 95% 이상의 생존율이 확인되었으며, 50 μ g/ml 이상에서는 독성이 확인되었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 박 등이 동일한 RAW 264.7 세포에서 육종 차조기의 메탄올 추출을 통해 진행한 독성 결과가 100 μ g/ml의 농도까지 안전성이 확보되었음을 보고한 결과보다 낮은 농도에서 독성이 나타난 점은 본 연구가 초임계 유체 추출로 진행

Table 1. The Sequences of Primers in This Study

Primer	size(bp)	F/R*	Sequences
NF- κ B	115	F	GGATCACATTTGCTTTGTGTTGTT
		R	CACAACCTTACAGTAGATGGCTAGAAAGG
iNOS	51	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
		R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
COX-2	130	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
		R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
β -actin	95	F	AGGAAATCGTGCGTGACAT
		R	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC

* F : forward, R : reverse

하였기에 발생한 결과로 해석되며, 초임계 유체 추출 시 안전성 확보 범위를 제공한 기초적 연구 자료로 활용될 수 있다.

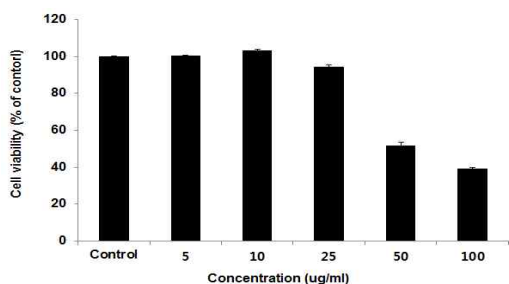


Fig. 1. Effect of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts. The cell viability in RAW 264.7 cells were measured using ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

3.2. 활성산소 생성량

면역 기전에서 대식세포는 인체에 병원 미생물, 바이러스와 같은 유해한 물질이 침투할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성 높은 독성 물질인 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생산하여 살균작용과 세포 상해작용을 유도하게 된다[10]. 하지만 활성산소는 역할 수행 후 원활하게 제거되지 않아 정상 세포에 작용하면 암, 심혈관계 질환, 염증, 노화 등을 유발하게 된다[11]. 따라서 활성산소는 인체 내 과도한 발생 시 다양한 질환을 유발하므로 과도하게 생산된 활성산소의 효과적인 저해 효능을 가진 원료는 질환 발병의 예방과 개선에 활용될 수 있다.

본 연구에서 육종 차조기 추출물에 대한 활성산소 저해 효능을 확인한 결과, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 약 28%, 61%의 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 과생성된 활성산소를 육종 차조기 추출물에서 유의적으로 저해시키는 것으로 볼 때 활성산소에

의해 발생한다고 알려진 암, 심혈관계 질환, 염증, 노화 등의 질환에 활용할 수 있는 원료로서의 가능성을 제시하고 있다.

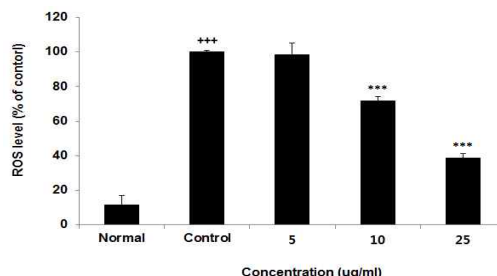


Fig. 2. Effect of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts on ROS levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 5, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) + LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts. The ROS levels in RAW 264.7 cells were measured using flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. Significance of results, $^{+++}p < 0.001$ compare to normal, $^{***}p < 0.001$ compare to control from three independent experiments.

3.3. NO 생성량

만성 염증 매개물질인 이산화질소(nitric oxide, NO)는 nNOS, eNOS, iNOS 등 3가지 합성 효소에 의해 L-아르기닌과 분자 산소로부터 합성된 물질로 많은 연구를 통해 과생성된 NO가 알츠하이머 및 파킨슨과 같은 신경계 장애뿐만 아니라 혈관 기능장애, 기타 염증과 관련된 질환을 유발하는 주요 원인으로 알려져 있다[12,13]. 이와 같은 과생성된 NO로 인한 질환이 발생할 경우, NO는 ROS와의 결합을 통해 인체 내 분자를 산화시켜 질환 발병이 가속화되므로 백혈구와 대식세포는 NO를 신속하게 제거하는 역할 수행을 통해 인체를 방어하게 된다[14,15].

본 연구에서 육종 차조기 추출물에 대한 NO 생성량을 확인한 결과, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 약 19%, 52%의 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 과생성된 NO를 대식세포가 제거 시 육종 차조기 추출물이

효과적인 도움을 주는 원료이며, 앞선 활성산소 생성량 억제 효능의 결과와 부합되는 점을 볼 때 육종 차조기 추출물이 신경계, 심혈관계, 만성 염증성 질환 등에 효과가 있는 원료임을 더욱 뒷받침하고 있다.

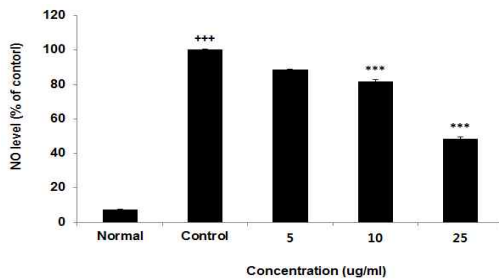


Fig. 3. Effect of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts on NO levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 5, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) + LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts. The NO levels in RAW 264.7 cells were measured using ELISA. The results were expressed as mean \pm S.D. Significance of results, $^{***}p < 0.001$ compare to normal, $^{***}p < 0.001$ compare to control from three independent experiments.

3.4. 사이토카인 생성량

사이토카인이란 백혈구에서 분비되는 단백 활성 물질로 IL-1, IL-6, TNF- α 등은 인체의 염증 발생에 관여하는 염증성 사이토카인이다[16]. 염증반응에서 IL-1 β 와 TNF- α 는 염증을 일으키는 주요인으로 작용하여 IL-1 β 는 발열, TNF- α 는 전신 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[16,17]. 또한, IL-6는 염증의 주된 지표로 사용되는 CRP(급성기단백)을 생산 촉진하고 면역세포의 성장과 분화에 관여한다[18]. 이와 같은 염증성 사이토카인은 아토피, 천식, 관절염, 알레르기 등의 질환을 유발하는 대표 매개체로 작용하게 되는데, IL-1 β 는 급성기 질환에서, IL-6와 TNF- α 는 만성기 질환에서 높은 생성량을 보이므로 효과적인 염증성 사이토카인의 생성 저해는 만성염증성 질환에 중요하다고 할 수 있다[19,20].

본 연구에서 육종 차조기 추출물에 대한 염증성 사이토카인 생성량을 확인한 결과, IL-1 β 는 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서, IL-6와 TNF- α 생성량은 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 육종 차조기 추출물이 급성 및 만성단계의 염증성 질환에 대한 대안으로 활용될 수 있으며, 더 나아가 염증성 사이토카인 중 상대적으로 IL-6 생성 억제를 크게 시키는 점은 IL-6가 주요 매개체로 평가받는 아토피피부염, 관절염 등에 큰 효과가 있을 것으로 사료된다.

3.5. 유전자 발현량

염증성 매개체의 유도는 전사인자의 활성화에 의해 일어나게 된다. Nuclear transcription factor-kappa-B (NF- κ B)는 세포 분화, 염증반응, 세포부착 등에 관련된 여러 유전자 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다[21]. 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 translocation 되어 표적 유전자의 promoter regions에 있는 κ B 결합 자리에 결합하여 iNOS, COX-2, TNF- α 그리고 IL-6 등 여러 염증 매개물질의 전사를 촉진한다[22]. 또한, 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통해 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등의 만성 염증 질환과 혈관 이완, 혈관 생성에도 관여한다[23,24].

본 연구에서 육종 차조기 추출물에 대한 NF- κ B와 COX-2의 유전자 발현을 확인한 결과, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 앞선 염증 매개체의 감소가 전사체인 NF- κ B의 감소를 통해 발생한 결과임을 보여주고 있어 육종 차조기의 항염증 효능이 기전적으로 설명되고 있으며, COX-2의 감소결과 역시 앞선 염증 질환에 대한 효과적 원료로서의 활용 가능성을 더욱 높이고 있다. 특히, 육종 차조기는 앞선 매개체 생성 감소 효능 결과를 바탕으로 연관성을 확인한 바, 관절염 질환의 치료제로 사용되는 COX-2 억제제의 역할과 유사함을 나타내고 있어 항관절염 효능을 나타내는 식·의약품 소재로써도 충분히 고려해 볼 수 있다고 판단되어 이 같은 가설은 추후 동물 실험을 통해 검증해보고자 한다.

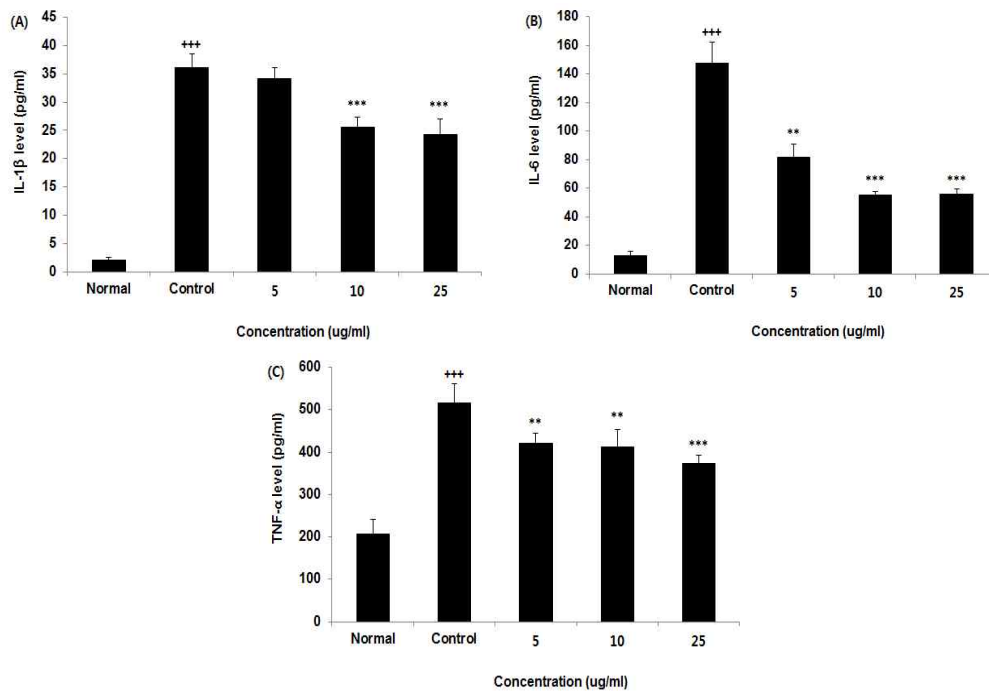


Fig. 4. Effect of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts on cytokine IL-1 β (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 5, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) + LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts. The amount of cytokine levels in supernatant was measured using Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D. Significance of results, $^{+++}p<0.001$ compare to normal, $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$ compare to control from three independent experiments.

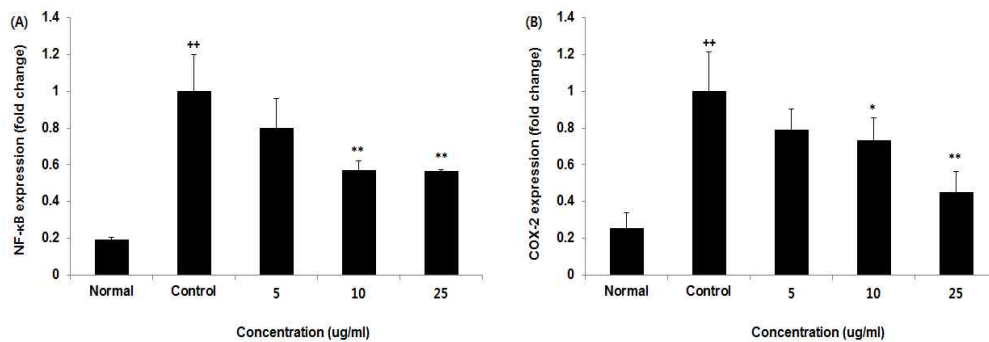


Fig. 5. Effect of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts on mRNA NF- κ B (A), and COX-2 (B) expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 5, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) + LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray extracts. The expression of mRNA in cell was measured using real-time PCR. The results were expressed as mean \pm S.D. Significance of results, $^{++}p<0.01$ compare to normal, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$ compare to control from three independent experiments.

4. 결론

본 연구는 방사선 형질전환 차조기의 초임계 유체 추출물(이하, 육종 차조기)이 염증성 질환의 식·의약품 소재로서 안전성과 가능성을 검증하고자 세포독성 및 항산화, 항염증 등과 관련된 대표 매개체에 관한 연구를 진행한 결과는 다음과 같다.

1. 육종 차조기는 RAW 264.7 세포의 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이하에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상에서는 독성이 확인되었다.
2. 육종 차조기는 과생성된 활성산소(ROS)와 일산화질소(NO) 생성을 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 유의성 있게 감소시켰다.
3. 육종 차조기는 염증성 사이토카인 생성을 IL-1 β 에서는 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서, IL-6와 TNF- α 는 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있게 감소시켰다.
4. 육종 차조기는 NF- κ B와 COX-2의 유전자 발현을 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 대조군 대비 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 육종 차조기는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이하에서 활용 가능하며, 10, 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 활성산소 및 염증 매개체의 감소가 효과적인 것으로 나타나, 본 연구결과에서 확인한 염증 매개체와 관련된 아토피피부염, 관절염, 심혈관질환 등에 효과가 있을 것으로 판단된다. 따라서 전임상 단계 중 안전성과 가능성 등을 확보한 본 연구를 통해 추후 이와 관련된 질환을 유도한 동물 실험을 통해 효능을 입증할 예정이다나, 이와 같은 연구결과는 육종 차조기가 식·의약품 소재로 충분히 활용 가치가 높은 소재임을 과학적으로 증명하였다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력관산업육성사업(2018-P0006184)으로 수행된 연구결과입니다.

References

1. S. H. Kim, S. Y. Kang, J. B. Kim, "Past, Present, and Future of Mutation Breeding", *SEED SCIENCE & Industry*, Vol.14, No.1, pp. 14-19, (2018).
2. Y. I. Lee, I. C. Shin, I. K. Lee, D. S. Kim, "Variation of Leaf Pigment Contents in Progenies of Perilla Mutants Induced by Gamma Ray", *Plant Breeding & Biotechnology*, Vol.31, No.2, pp. 110-113, (1999).
3. J. I. Lee, E. D. Han, S. T. Lee, H. W. Park, "Study on the evaluation of oil quality and the differences of fatty acid composition between varieties in perilla (*Perilla frutescens* Britton var. japonica Hara)", *Korean Journal of Breeding*, Vol.18, No.2, pp. 228-233, (1986).
4. Y. K. So, Y. H. Jo, B. M. Nam, S. Y. Lee, J. B. Kim, S. Y. Kang, C. H. Jin, "Anti-obesity effect of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Leaves", *Korean J. Pharmacogn*, Vol.46, No.1, pp. 1-6, (2015).
5. M. Hosoi, M. Ito, T. Yagura, R. P. Adams, G. Honda, "cDNA isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.27, No.12, pp. 1979-1985. (2004).
6. C. H. Jin, H. J. Lee, Y. D. Park, D. S. Choi, D. S. Kim, S. Y. Kang, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon- β -STAT-1 pathway", *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol.58, No.2, pp. 860-867, (2009).
7. B. O. Cho, C. H. Jin, Y. D. Park, H. W. Ryu, M. W. Byun, K. I. Seo, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone induces apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways in human DLD1 cells", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*,

- Vol.75, No.7, pp. 1306–1311, (2011).
8. Y. D. Park, Y. M. Lee, M. A. Kang, H. J. Lee, C. H. Jin, D. S. Choi, I. Y. Jeong, “Phytochemical profiles and in vitro anti-inflammatory properties of *Perilla frutescens* cv. Chookyoupjaso mutants induced by mutagenesis with γ -ray”, *Food science and biotechnology*, Vol.19, No.2, pp. 305–311, (2011).
 9. V. M. Ripoll, N. A. Meadows, L. J. Raggatt, M. K. Chang, A. R. Pettit, A. I. Cassady, D. A. Hume, “Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB”, *Gene*, Vol.413, No.1, pp. 32–41, (2008).
 10. H. S. Jung, Y. S. Song, K. H. No, Y. H. Jo, J. Y. Park, C. Y. Choi, T. Y. Kwon, “Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of Life Science*, Vol.13, No.3, pp. 333–342, (2003).
 11. H. S. Jung, K. H. Noh, H. Y. Cho, J. Y. Park, C. Y. Choi, T. W. Kwon, Y. S. Song, “Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Korean J Life Sci*, Vol.13, No.3, pp. 333–342, (2003).
 12. K. Kim, H. S. Yi, H. J. Yun, S. D. Park, “Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Cynomorium songaricum*”, *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol.23, No.6, pp. 1320–1331, (2009).
 13. L. Sobrevia, L. Ooi, S. Ryan, J. R. Steinert, “Nitric oxide: a regulator of cellular function in health and disease”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, Vol.2016, No.1, pp. 1–2, (2016).
 14. A. Mantovani, “Cancer: inflaming metastasis”, *Nature*, Vol.457, No.7225, pp. 36–37, (2008).
 15. I. P. Choi, “Oxygen free radical and Cancer”, *Hanyang Medical Reviews*, Vol.33, No.2, pp. 118–122, (2013).
 16. J. Furuzawa-Carballeda, M. I. Vargas-Rojas, A. R. Cabral, “Autoimmune inflammation from the Th17 perspective”, *Autoimmun Rev*, Vol.6, No.3, pp. 169–175, (2007).
 17. K. Nistala, H. Moncrieffe, K. R. Newton, H. Varsani, P. Hunter, L. R. Wedderburn, “Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers”, *Arthritis Rheum*, Vol.58, No.3, pp. 875–887, (2008).
 18. M. Feldmann, F. M. Brennan, R. N. Maini, “Role of cytokines in rheumatoid arthritis”, *Annu. Rev. Immunol*, Vol.14, No.1, pp. 397–440, (1996).
 19. H. Matthew, S. Kirk, “The anti inflammatory and antiviral effects of hydroxy chloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis”, *Arthritis Rheum*, Vol.39, No.1, pp. 157–161, (1996).
 20. J. S. Song, “Toward the cure of rheumatoid arthritis”, *The Korean Journal of Medicine*, Vol.69, No.6, pp. 581–589, (2005).
 21. S. J. Park, J. S. Shin, W. Cho, Y. W. Cho, E. M. Ahn, N. I. Baek, K. T. Lee, “Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by kaempferol-3-O- β -D-sophoroside through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells”, *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.39, No.2, pp. 95–103, (2008).
 22. S. F. Liu, A. B. Malik, “NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation”, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol.290, No.4, pp. 622–645, (2006).
 23. H. J. Rothkötter, R. Pabst, M. Bailey, “Lymphocyte migration in the intestinal

mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen”, *Veterinary immunology and immunopathology*, Vol.72, No.1-2, pp. 157-165, (1999).

24. M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, R. N. DuBois, “Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells”. *cell*, Vol.93, No.5, pp. 705-716, (1998).