Journal of Radiation Industry 10(3) : 97~104(2016)

방사선 돌연변이 축엽자소와 야생종 축엽자소 초임계 추출물의 항염증 활성 비교

박한철[1,2] · 소양강[1] · 김진백[1] · 육홍선[2] · 진창현[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [2]충남대학교 식품영양학과

Comparison of Anti-inflammatory Activity of Extracts with Supercritical Carbon Dioxide from Radiation Mutant *Perilla frutescens* (L.) Britton and Wild-type

Hanchul Park[1,2], Yangkang So[1], Jin-Baek Kim[1], Hong Sun Yuk[2] and Chang Hyun Jin[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 56212, Republic of Korea*

[2]*Department of Food and Nutrition, Chungnam National University Daejeon 34134, Republic of Korea*

Abstract - In previous study, the radiation mutant *Perilla frutescens* (L.) Britton with a higher anti-inflammatory activity was selected. The extracts were obtained from the mutant and wild-type using a supercritical carbon dioxide technique. This study aimed to compare the anti-inflammatory activities between the mutant supercritical extract (MSE) and wild-type supercritical extract (WSE). The contents of isoegomaketone (IK) of MSE and WSE were measured through an HPLC analysis. MSE contained IK contents approximately 7-fold higher than those of WSE. To compare the anti-inflammatory activities of MSE and WSE, the expression levels of the mRNA and protein of pro-inflammatory mediators were measured in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. As a result, MSE inhibited the expression levels of the mRNA and protein of pro-inflammatory mediators, including inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) to a much greater extent than did WSE. Taken together, MSE had more IK contents and higher anti-inflammatory activities than WSE. Therefore, MSE is proposed based on its therapeutic potential in the prevention of inflammatory disease.

Key words : Radiation mutant, *Perilla frutescens* (L.), Supercritical carbon dioxide, Anti-inflammatory activity, Isoegomaketone

서 론

염증은 면역에 관여하는 세포 중에 하나인 대식세포(macrophage)가 주로 관여하는데, 화학적, 물리적 자극이나 외상, 박테리아에 의한 감염으로 인한 생리적 방어반응을 의미한다(Zamora *et al*. 2000). 병원성이 있는 그람음성균의 외막을 구성하는 물질인 LPS는 대식세포를 자극해 염증, 세포손상, 패혈성 쇼크 등과 같은 광범위한 내재면역반응을

* Corresponding author: Chang Hyun Jin, Tel. +82-63-570-3162, Fax. +82-63-570-3159, E-mail. chjin@kaeri.re.kr

야기한다(Puddu *et al*. 2010). 또한 대식세포는 LPS에 의해 활성화되어 IL-6, TNF-α, MCP-1과 같은 염증성 매개인자의 생성을 촉진한다(Reatz and Whitfield 2002).

Nitric oxide (NO)는 L-Arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성된 대사산물이다. 적정량의 NO는 신경세포와 내피세포에서 신경전달물질로서 기능을 하거나, 대식세포로 하여금 종양세포를 공격하게 하고, 박테리아로부터 세포를 보호한다(Salerno *et al*. 2002). NOS에는 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), iNOS의 동종효소들이 있으며, 이들 중 iNOS는 박테리아 감염과 같은 염증성 자극에 의해 발현되어 과량의 NO를 생성해 대식세포와 같은 면역세포를 공격하여 급성과민성염증반응을 유도하는 물질로서 작용한다(McCarteny-Francis *et al*. 1993).

축엽자소(*Perilla frutescens*)는 한국, 일본, 중국, 대만을 비롯한 동아시아에서 식재료로서 널리 사용하며, 약용으로도 사용되어왔다(Huang *et al*. 2014). 축엽자소 성분으로는 rosmarinic acid, luteolin, apigenin, ferulic acid, (+)-catechin, caffeic acid와 같은 폴리페놀(polyphenol)이 보고되어 있다(Peng *et al*. 2005). 특히 방사선 돌연변이 축엽자소는 essential oil 성분인 isoegomaketone (IK)와 perillaketone (PK)가 다량 함유되어 있다고 보고되었다(Park *et al*. 2011). IK와 PK는 방향성을 갖는 헤테로고리 화합물로 구조 내 이중결합의 유무에 따라 구분되며, 특히, IK는 NO, MCP-1, interferon-β (IFN-β)와 같은 염증성 인자의 억제효과가 있다고 보고되었다(Jin *et al*. 2010). 또한 IK는 항암(Cho *et al*. 2011; Kwon *et al*. 2014), 항알러지(Makino *et al*. 2003), 항비만(소 등 2015) 관련 효능도 보고되고 있는 등 연구방향이 다각화되고 있다.

일반적으로 천연물로부터 추출물을 얻고자 할 때 유기용매 추출법이 주를 이루며 독성이 강한 chloroform, hexane, ether 등의 유기용매가 사용되어왔다. 그러나 유기용매에 의해 추출물 변성이 일어날 수 있으며, 추출 후 유기용매 처리에 환경오염이 뒤따르고, 잔류용매에 의한 독성 문제가 발생하는 등의 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 초임계 유체 추출법이 친환경 대체 기술로 주목 받고 있다. 초임계 유체(supercritical fluid)란 임계점(critical point) 이상의 온도와 압력 조건에서 존재하는 유체로 액체와 기체의 중간적인 특성을 나타낸다. 점도와 표면장력이 낮아 침투가 용이하고, 특히 oil 상의 유효 성분 추출에 적합하다. 이산화탄소 초임계 유체는 독성이 없으며 재활용이 가능한 친환경 용매이며, 추출물과의 반응성이 적다(Palmer and Ting 1995; De Azevedo *et al*. 2008). 또한 비교적 저렴한 가격을 장점으로 식품, 화장품, 의약품의 제조 산업에서 널리 이용되고 있다(Coelho *et al*. 2003).

본 연구에서는 기존 연구에 널리 사용되는 유기용매 추출법을 대신하여 IK 추출에 적합한 초임계 추출법을 이용해 야생종 축엽자소와 방사선 돌연변이 축엽자소로부터 추출물을 얻어 이들의 IK 함량을 HPLC를 통해 비교하였으며 LPS로 염증반응을 유도시킨 RAW264.7 cells를 통해 항염증 활성을 비교, 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험에서 사용한 방사선 돌연변이 축엽자소는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에서 축엽자소 종자에 감마선을 200 Gy로 처리하여 돌연변이를 유발한 후, 안정화 시킨 품종이다. 돌연변이 축엽자소에 대한 감정은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선육종연구실 김진백 박사를 통하여 확인하였다.

2. 초임계 추출

축엽자소 시료는 지상부의 잎을 채취하여 음 건조한 후, 파쇄한 시료를 진공 밀봉하여 보관하였다. 실험용 크기의 초임계 유체 추출장비(Ilshin Autoclave Co.)에 각각의 시료 180 g을 넣고 50°C, 400 bar 조건에서 이산화탄소를 60 ml min^{-1} 속도로 흘려주면서 3시간 동안 추출하여 돌연변이 초임계 추출물(mutant supercritical extract, MSE)과 야생종 초임계 추출물(wild-type supercritical extract, WSE)을 얻었다. 이후 MSE와 WSE를 dimethyl sulfoxide에 녹여 농도별로 제조하여 실험에 사용하였다.

3. 시약

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였으며, penicillin-streptomycin solution (P/S)은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 1차 iNOS antibody는 BD science (San Diego, CA, USA)에서, β-tubulin antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 각각 구입하였으며, 2차 항체 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) conjugate는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Cytokine assay에 사용된 ELISA kit는 R&D system Quantikine (R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 이용하였으며, 세포독성을 측정하기 위해 사용된 cell viability kit는 DAEIL Lab (Seoul, Korea) 제품을 사용하였다. NO assay에 사용된 griess reagent는 Promega (Wisconsin, WI, USA), RT-PCR 수행에 사용된 cDNA synthesis kit와 SYBR은 Takara Bio Inc. (Shiga, Japan)사 제품을 이용하였다.

4. HPLC 분석

Agilent high performance liquid chromatograph 110 series system (Agient) 기기를 사용하였으며, column은 C18 TMC-Triart (250 × 4.6 mml, D, S-5 μm, 12 nm)를 사용하였다. 이동상은 A (water)와 B (acetonitrile)를 A : B (55 : 45-45 : 55)의 조건으로 하였다. Injection volume은 10 μl, column의 온도는 25°C, flow rate는 1.0 ml min^{-1}의 조건으로 수행하였으며, 254 nm의 파장에서 검출하였다.

5. 세포배양

본 실험에서 사용한 세포는 마우스 대식세포주 RAW 264.7 cells를 사용하였으며, 10% FBS와 1% P/S을 포함한 DMEM배지에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

6. 세포독성 실험

세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit를 이용하여 제조사 권장 실험방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 cells를 2×10^5 cells ml^{-1} 농도로 96 well plate에 24시간 배양한 뒤, MSE와 WSE를 최종농도 5, 10, 25 μg ml^{-1}가 되도록 처리하였다. 24시간 배양한 후, EZ-Cytox를 10 μl씩 첨가하여 4시간을 더 배양하였다. 이후 spectrophotometer (Benchmark Plus, Bio-Rad)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. NO assay

NO 생성량 측정은 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells를 96 well plate에 2×10^5 cells ml^{-1} 농도로 24시간 동안 배양하였다. MSE와 WSE를 최종농도 5, 10, 25 μg ml^{-1}가 되도록 처리하여 2시간 배양한 후, LPS를 1 μg ml^{-1}의 농도로 첨가하여 18시간 동안 추가 배양하였다. 이후 상층액을 취해 Griess reagent를 동일한 volume으로 처리한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. ELISA assay

IL-6, TNF-α, MCP-1와 같은 염증성 인자의 생성량을 알아보기 위해 ELISA kit를 이용하였다. RAW 264.7 cells를 2×10^5 cells ml^{-1} 농도로 6 well plate에 24시간 동안 배양한 후, MSE와 WSE를 각각 5, 10, 25 μg ml^{-1} 농도로 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 1 μg ml^{-1} 농도로 처리하여 4시간을 추가 배양한 뒤, 상층액을 취해 제조사의 권장 실험방법에 따라 염증성 인자의 농도를 측정하였다.

Table 1. Contents of IK in WSE and MSE

	IK (μg ml^{-1})[1)]
WSE	10.8 ± 0.30
MSE	76.0 ± 0.72

[1)] Each value presents the mean ± SD (n = 3).

Table 2. Primers sequences for Real Time-PCR Analysis

Target gene		5′ to 3′ direction
iNOS	Forward	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	Reverse	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC
IL-6	Forward	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAA
	Reverse	GCAAGTGCATCATCGTTGTTC
TNF-α	Forward	GCCACCACGCTCTTCTGTCTAC
	Reverse	GGGCTACAGGCTTGTCACTCG
MCP-1	Forward	GCATCTGCCCTAAGGTCTTCA
	Reverse	AAGTGCTTGAGGTGGTTGTGG
β-actin	Forward	TCCTACACCACACCAAACTGTGTGC
	Reverse	CTCCAATCTCTGCCTATCCGTCTC

iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis factor-α; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1. These primers are related to inflammatory mediators.

9. Real time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RAW 264.7 cells를 6 well plate에 2×10^5 cells ml^{-1} 농도로 24시간 동안 배양하였다. 이후 MSE와 WSE를 농도별로 처리하고 LPS를 1 μg ml^{-1} 농도로 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 이후 세포를 포집하여 RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용해 total RNA를 분리하였으며, 분리한 total RNA로부터 cDNA synthesis kit를 이용해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA은 SYBR과 primer (Table 2)를 혼합하여 Chromo4 real-time PCR detection system (Bio-Rad)을 이용해 94°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 30초의 조건을 50회 반복하여 real time PCR을 수행하였다.

10. Western blot을 통한 단백질 발현 분석

RAW 264.7 cells를 100 mm dish에 2×10^5 cells ml^{-1} 농도로 24시간 동안 배양하였다. 이후 MSE와 WSE를 각각 5, 10, 25 μg ml^{-1} 농도로 전처리하여 2시간 배양하였다. LPS를 1 μg ml^{-1} 농도로 추가로 처리한 뒤, 24시간 동안 추가 배양하였다. 세포를 포집하여 protease inhibitor cocktail (2 mM AEBSF, 0.3 μM aprotinin, 116 μM bestatin, 14 μM E-64, 1 μM leupeptin) (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma)를 포함한 NP40 cell lysis buffer를 처리하여 얼음에 30분간 방치한 후 단백질을 회수하였다. Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 단백질을 정량한 후, 30 μg의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 loading한 후 크기별로 분리하였

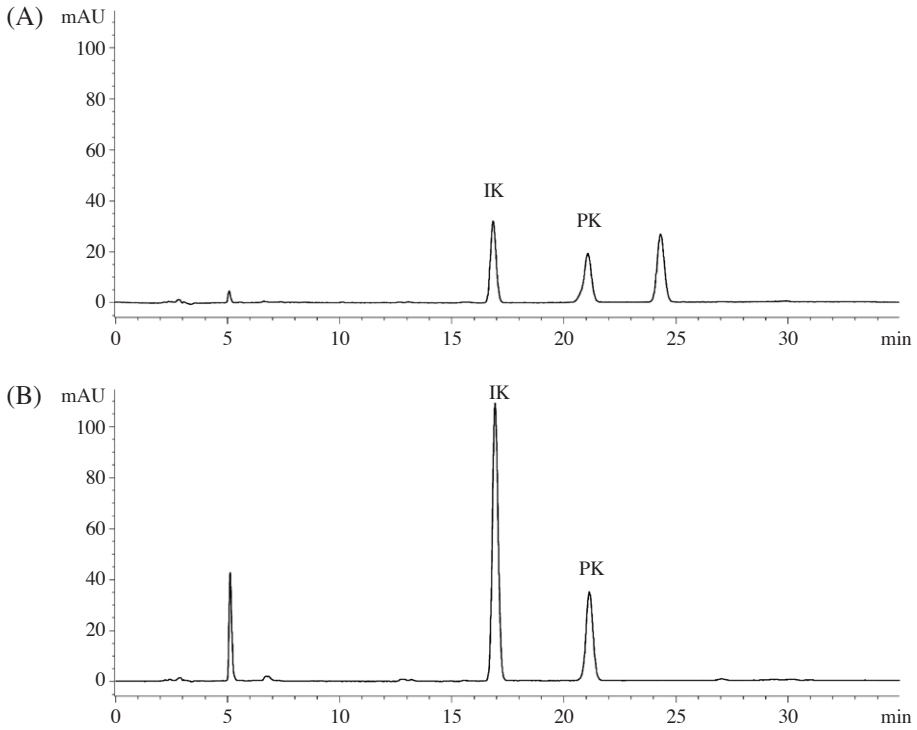

Fig. 1. HPLC chromatograms of (A) WSE and (B) MSE.

다. 이후 nitrocellulose membrane (Amersham biosciences, UK)에 transfer한 후, 5% skim milk와 TBS-T로 구성된 blocking buffer로 상온에서 2시간 동안 blocking을 하였다. 이후 1차 antibody로 iNOS antibody (1 : 1000)와 β-tubulin antibody (1 : 200)을 blocking buffer에 희석하여 4°C에서 overnight로 반응시킨 후 TBS-T buffer로 3회 세정하였다. Goat anti-rabbit IgG HRP-conjugate 2차 antibody를 blocking buffer에 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, TBS-T buffer로 3회 세정하였다. 이후 membrane에 Western blotting detection reagent (Amersham biosciences)를 처리하여 iNOS와 β-tubulin 단백질의 발현량을 확인하였다.

11. 통계처리

각 실험은 3회 이상 반복 실험을 통하여 값을 도출했으며, 실험결과는 mean±SD로 나타내었다. 두 실험군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test를 통해 $p<0.05$ 수준에서 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

1. HPLC를 통한 IK 함량 비교

MSE와 WSE에 함유된 IK 함량을 HPLC를 이용해 분석하였다(Fig. 1). Chromatograph의 면적값을 검량식에 대입하여 비교한 결과, WSE와 비교해 MSE에 IK가 약 7배 이상 많이 함유되어 있는 것을 확인했다(Table 1).

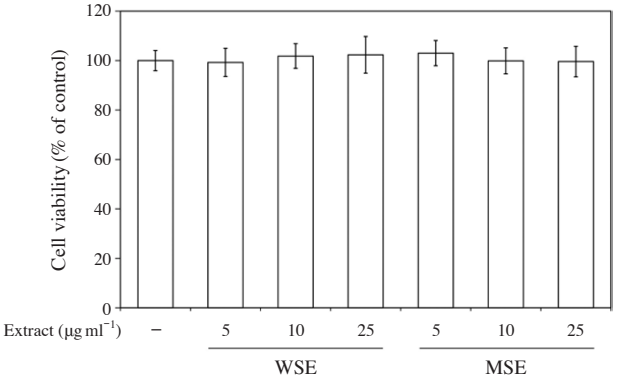

Fig. 2. Effects of MSE and WSE on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with the different concentration of MSE and WSE for 24 h. Cell viability was determined using Ez-cytox kit. Each value presents the mean±SD (n=6).

2. 초임계 추출물이 세포독성에 미치는 영향

MSE와 WSE의 RAW 264.7 cells에 대한 세포독성을 평가하기 위해 MSE와 WSE을 각각 5, 10, 25 μg ml^{-1} 농도로 처리하여 24시간 배양 후 확인한 결과, 본 연구에서 사용되

는 25 μg ml^{-1} 이하의 농도에서는 세포생존에 영향을 미치지 않았으며(Fig. 2), 향후 25 μg ml^{-1} 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

3. 초임계 추출물이 nitric oxide 생성과 iNOS mRNA 및 protein 발현에 미치는 영향

NO 생성량을 알아보기 위해 nitric oxide assay를 수행한 결과 LPS만 단독으로 처리했을 때 NO 생성량이 negative control에 비해 약 10배 이상 증가하였으며, MSE와 WSE을 농도별로 전처리하였을 때 양쪽 모두 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하였다. 특히 25 μg ml^{-1} 농도에서 MSE (67.9 %)가 WSE (33.9%)보다 약 2배 이상 높은 NO 생성 억제율을 보였다(Fig. 3A). 이러한 NO 생성량 감소가 iNOS의 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위해 RT-PCR과 Western blot을 수행하였다. RT-PCR 결과에서 LPS에 의해 iNOS mRNA 발현이 증가되었으며 WSE와 MSE를 처리 시, 양쪽 모두 농도 의존적으로 iNOS mRNA 발현을 억제하였다. 특히 25 μg ml^{-1} 농도에서 MSE (63.4%)가 WSE (29.4%)에 비해 더 우수하게 iNOS mRNA 발현을 억제했다(Fig. 3B). 또한 Western blot 결과에서 LPS에 의해 iNOS 단백질 생성량이 증가하였으며 MSE와 WSE에 의해 농도 의존적으로 iNOS 단백질 생성이 억제되었다(Fig. 3C).

4. 초임계 추출물이 염증성 cytokine과 chemokine 생성에 미치는 영향

LPS로 자극한 RAW 264.7 cells에서 MSE와 WSE가 염증성 인자(IL-6, TNF-α, MCP-1)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA를 수행한 결과, WSE와 MSE 모두 농도 의존적으로 염증성 인자의 생성량이 감소하는 경향을 보였다. 특히 동일한 농도에서 WSE와 MSE를 비교했을 때 WSE보다 MSE가 염증성 인자의 생성을 현저히 감소시켰다(Fig. 4). 또한 IL-6, TNF-α, MCP-1의 mRNA 발현량을 확인하기 위해 real time-PCR을 수행한 결과, MSE와 WSE 모두 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제하였으며, 같은 농도로 처리했을 때 WSE에 비해 MSE가 더 우수하게 염증성 인자의 mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 5).

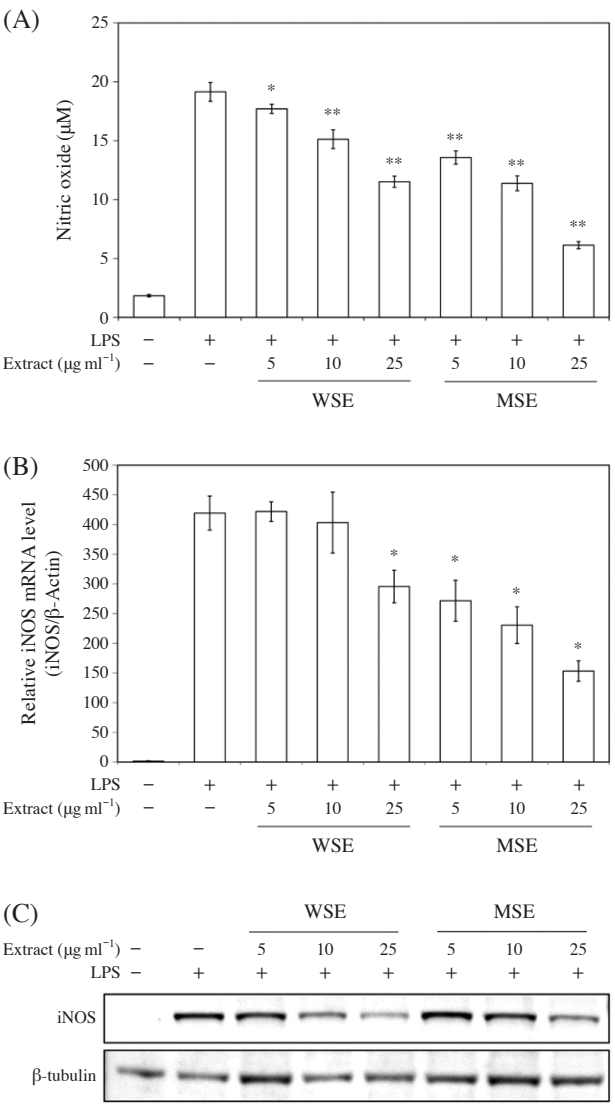

Fig. 3. Effects of MSE and WSE on (A) NO production, (B) iNOS mRNA expression levels and (C) iNOS protein level in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with the different concentration of MSE and WSE with or without LPS (1 μg ml^{-1}) for 24 hours. (A) NO production was determined using griess reagent. Each value presents the mean ± SD (n = 6). *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ vs. LPS alone. (B) iNOS mRNA expression levels were assessed by real time-PCR. Each value presents the mean ± SD (n = 3). *$p < 0.05$ vs. LPS alone. (C) iNOS protein levels were determined by Western blot analysis.

고 찰

iNOS는 LPS 자극에 의해 NO를 생성하는 반응을 촉매하며, iNOS에 의해 세포질에서 생산된 과량의 NO는 빠르게 세포 밖으로 방출되어 인접한 세포에도 영향을 미치며 조직손상, 부종, 만성적인 염증, 동맥경화, 당뇨, 염증성 장 질환, 자가 면역질환과 같은 증상을 야기한다(Murphy 1999; Kolios *et al*. 2004). 이에 WSE와 MSE의 항염증 효과를 확인하기 위하여 NO assay를 수행한 결과 LPS 자극에 의한 NO 생성이 저해되는 것을 확인하였으며, 동일한 농도에서 WSE와 MSE를 비교했을 때 IK가 다량 함유된 MSE가 WSE보다 더 높은 NO 생성 억제효과를 보였다. 또한 RT-PCR과 Western blot을 통해 분석한 결과 WSE보다 MSE 처리가 더 우수하게 iNOS mRNA와 iNOS 단백질의 발현을 억제하였다. WSE와 비교해 MSE가 더 우수한 NO 생성 억

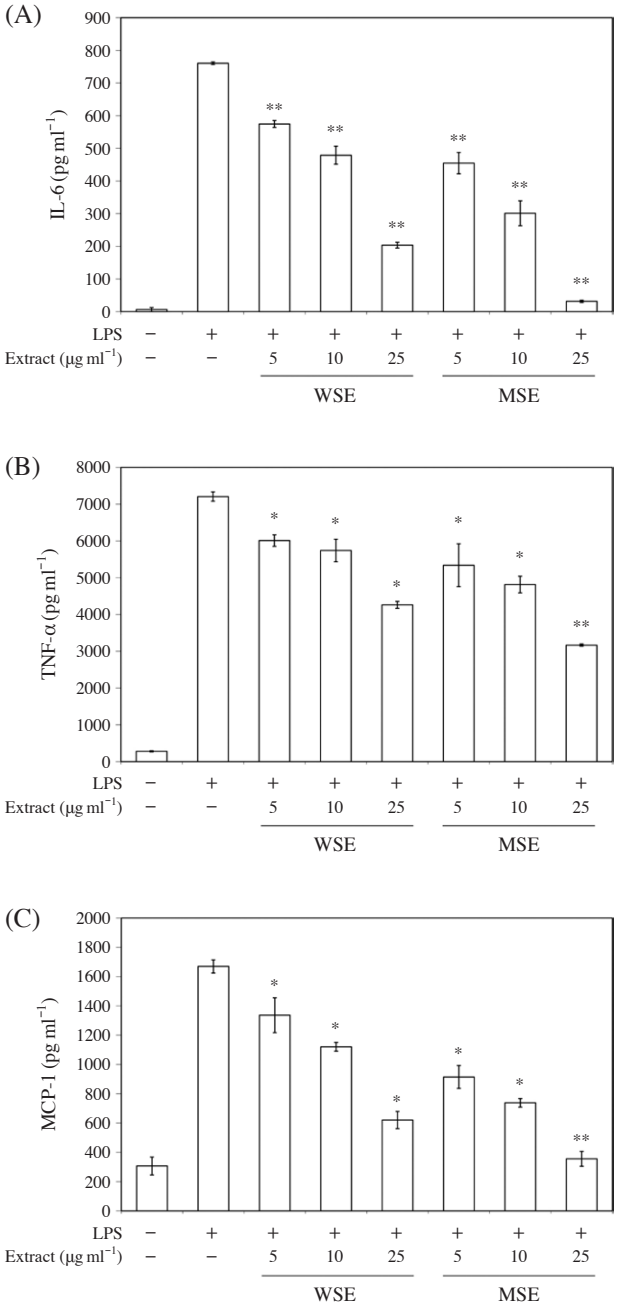

Fig. 4. Effects of MSE and WSE on (A) IL-6, (B) TNF-α, and (C) MCP-1 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with the different concentration of MSE and WSE with or without LPS (1 μg ml^{-1}). Culture media was collected at 4 hours after the LPS treatment. The productions of (A) IL-6, (B) TNF-α, and (C) MCP-1 in culture media were measured by ELISA assay. Each value presents the mean ± SD (n = 3). *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ vs. LPS alone.

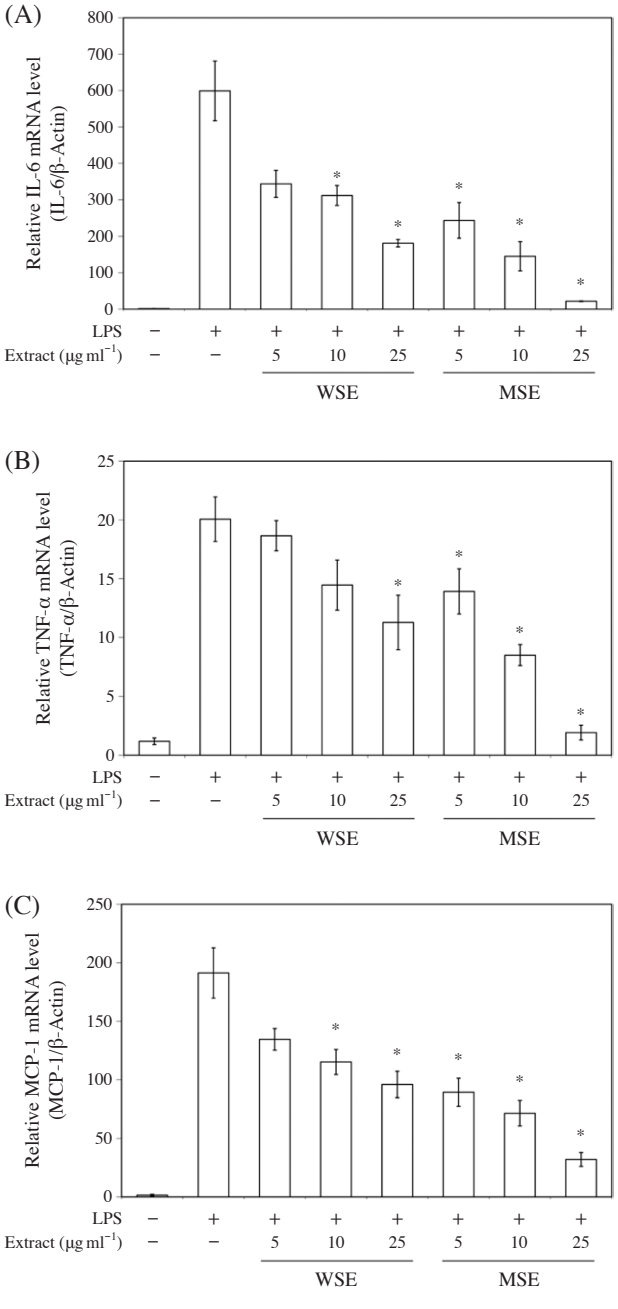

Fig. 5. Effects of MSE and WSE on (A) IL-6, (B) TNF-α, and (C) MCP-1 mRNA expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The mRNA expression levels of (A) IL-6, (B) TNF-α, and (C) MCP-1 were assessed by real time-PCR. Each value presents the mean ± SD (n = 3). *$p < 0.05$ vs. LPS alone.

제 및 iNOS 발현 억제 효과를 보이는 것은 추출물의 IK 함량 차이에 기인한 것임을 유추할 수 있다.

염증반응의 매개물질인 염증성 cytokine은 여러 면역반응과 연관되어 있으며, 염증 부위에서 그 농도가 증가하여 초기 염증 반응을 유도한다. 또한 B림프구의 항체 생산을 자극해서 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며 만성질환을 유발하기도 한다(Delgado *et al*. 2003). TNF-α는 대식세포를 자극하여 염증반응을 촉진하고, 림프구 활성화에 있어 co-stimulator로 작용하며(Yoshioka *et al*. 2004), IL-6는 항체생산과 T세포 활성화에 중요한 역할을 한다(Yao *et al*. 2014). MCP-1은 화학주성을 갖는 chemokine으로 단핵구

를 염증부위로 불러 모아 염증반응을 가속화시킨다(Libby 2006). 이에 WSE와 MSE의 처리가 LPS 자극에 의해 염증반응이 유도된 RAW264.7 cells에서 IL-6, TNF-α, MCP-1 단백질 생성과 mRNA 발현량에 미치는 영향을 실험한 결과 유의적으로 저해하는 것을 확인하였으며, 동일한 농도에서 WSE와 MSE를 비교했을 때 다량의 IK를 함유한 MSE가 WSE보다 더 높은 IL-6, TNF-α, MCP-1 생성 억제효과를 보였으며 이러한 결과는 IK 함량 차이에 의한 것임을 알 수 있다.

IK의 NO, MCP-1, IFN-β와 같은 염증성 인자의 생성억제 효과를 보고한 Jin *et al*.(2010)의 연구에서 IK를 농도별로 처리했을 때 iNOS의 발현과 염증성 cytokine의 생성을 유의적으로 저해했다고 보고했다. 이를 참고했을 때 본 연구에서 관찰한 항염증 효과는 추출물에 포함된 IK로 인한 것으로 사료된다. 따라서 HPLC 데이터를 통해 WSE와 MSE 간의 IK 함량을 비교한 결과 두 시료 간의 IK 함량 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 방사선 돌연변이 축엽자소와 야생종 축엽자소를 이산화탄소를 용매로 하여 초임계 유체 추출법을 이용해 추출물을 얻었다. 이를 HPLC를 이용해 IK 함량을 분석한 결과, WSE보다 MSE에 7배 이상 IK가 더 많이 함유되어 있음을 확인하였다. 또한 LPS로 자극한 RAW 264.7 cells에서 MSE와 WSE의 항염증 활성을 비교한 결과, 동일한 농도일 때 WSE에 비해 MSE가 iNOS와 IL-6, TNF-α, MCP-1의 발현을 더 효과적으로 억제하였으며 이러한 결과는 WSE와 MSE의 IK 함량 차이에 의한 것으로 사료되며, 이는 야생종 축엽자소 초임계 추출물보다 IK 함량이 높은 방사선 돌연변이 축엽자소 초임계 추출물이 염증성 매개질환의 예방물질로 더 적합한 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2016년도 한국원자력연구원의 연구개발 프로그램과 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(방사선기술개발사업, No. 2012M2A2A6010575).

참 고 문 헌

소양강, 조윤호, 남보미, 이승영, 김진백, 강시용, 정혜광, 진창현. 2015. 들깨 잎 추출물에서 분리한 Isoegomaketone (IK)의 항 비만 효능. 생약학회지. **46**(4):283-288.

Cho BO, Jin CH, Park YD, Ryu HW, Byun MW, Seo KI and Jeong IY. 2011. Isoegomaketone induces apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathway in Human DLD1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**(7): 1306-1311.

Coelho JAP, Pereira AP, Mendes RL and Palavra AMF. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction for *Foeniculum vulagare* volatile oil. *Flavour Fragr. J.* **18**(4):316-319.

Delgado AV, McManus AT and Chambers JP. 2003. Production of Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin 1-beta, Interleukin 2, and Interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to Substance P. *Neuropeptides* **37**(6):355-361.

De Azevedo ABA, Kieckbush TG, Tashima AK, Mohamed RS, Mazzafera P and De Melo SV. 2008. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*. **44**(2):186-192.

Huang BP, Lin CH, Chen YC and Kao SH. 2014. Anti-inflammatory effects of *Perilla frutescence* leaf extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Mol. Med. Reports* **10**(2):1077-1083.

Jin CH, Lee HJ, Park YD, Choi DS, Kim DS, Kang SY, Seo KI and Jeong IY. 2010. Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the Heme Oxygenase-1 induction and inhibiton of the Interferon-β-STAT-1 pathway. *J. Agric. Food Chem*. **58**(2):860-867.

Kolios G, Valatas V and Ward SG. 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* **113**(4):427-437.

Kwon SJ, Lee JH, Moon KD, Jeong IY, Ahn DU, Lee MK and Seo KI. 2014. Induction of apoptosis by isoegomaketone from *Perilla frutescens* L. in B16 melanoma cells is mediated through ROS generation and mitochondrial-dependent,- independent pathway. *Food Chem. Toxicol*. **65**:97-104.

Libby P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**(2):456S-460S.

Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito KI and Kano Y. 2003. Anti-allergic Effect of *Perilla frutescens* and its constituents. *Phytother. Res*. **17**(3):240-243.

McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl S. 1993. Suppression of Arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med*. **178**(2): 749-754.

Murphy MP. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics* **1411**(2):401-414.

Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. **6**(12):3051-3064.

Palmer MV and Ting SST. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem*. **52**(4): 345-352.

Park YD, Jin CH, Chio DS, Byun MW and Jeong IY. 2011. Biological evaluation of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* and its synthetic derivative as anti-inflammatory agents. *Arch*. *Pharm*. *Res*. **34**(8):1277-1282.

Peng Y, Ye J and Kong J. 2005. Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J*. *Agric*. *Food Chem*. **53** (21):8141-8147.

Puddu P, Latorre D, Valenti P and Gessani S. 2010. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals* **23**(3):387-397.

Raetz CR and Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu*. *Rev*. *Biochem*. **71**:635-700.

Salerno L, Sorrenti V, Giacomo C, Romeo G and Siracusa MA. 2002. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm*. *Design* **8**(3):177-200.

Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M and Yao Y. 2014. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol*. *Therapeu*. **141** (2):125-139.

Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Ikemizu S, Yamamoto Y, Shibata H, Nishibata T, Mukai Y, Okamoto T, Taniai M, Kawamura M, Abe Y, Nakagawa S, Nagata S, Yamagata Y and Mayumi T. 2004. Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-α improves its antitumor portency. *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. **315**(4):808-814.

Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol*. *Med*. **6**(5): 347-373.

Received: 5 June 2016
Revised: 1 July 2016
Revision accepted: 26 July 2016