

## Anti-oxidative and anti-proliferative activities of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L.

Man-Jin In<sup>1</sup> · Dong Chung Kim<sup>2</sup> 

### 유근피 아세톤 추출물의 항산화 및 암세포 증식억제 활성

인만진<sup>1</sup> · 김동창<sup>2</sup>

Received: 11 February 2016 / Accepted: 12 March 2016 / Published Online: 30 June 2016  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

**Abstract** An acetone extract in the cortex of *Ulmus pumila* L. was prepared to evaluate its anti-oxidative and anti-proliferative activities. The free radical scavenging activity ( $EC_{50} = 36.7 \mu\text{g/mL}$ ) and reducing power ( $EC_{50} = 53.2 \mu\text{g/mL}$ ) proportionally increased according to the extract concentration. The acetone extract possessed a potent anti-proliferative activity against human non-small cell lung cancer (A549,  $GI_{50} = 74.3 \mu\text{g/mL}$ ) and human colon cancer (SNU-C4,  $GI_{50} = 92.8 \mu\text{g/mL}$ ) cells in a dose-dependent manner, but was less effective with human normal cells (L132, human embryonic lung epithelial cell).

**Keywords** Acetone extract · Anti-oxidative · Anti-proliferative · *Ulmus pumila* L.

유근피(*Ulmus pumila* L.)는 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica*)의 코르크층을 벗긴 뿌리껍질을 건조한 것으로 예부터 종창, 관절염, 위궤양, 늑막염 등의 염증 치료를 위하여 널리 사

용되어 온 생약제이다(Lim 2010; Jeong과 Kim 2012). 유근피에는  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등의 식물성 스테롤과 tannin, 당체 등이 함유되어 있으며, 생리활성 성분으로는 플라보노이드계 물질인 (+)-catechin, (+)-catechin-5-O- $\beta$ -D-apiofuranoside와 진통 작용을 나타내는 성분인 friedelin, epifriedelanol, taraxerol 등이 알려져 있다(Matsuzaki와 Nara 1985; Son 등, 1989). 유근피 메탄올 추출물에서 분리한 플라보노이드 성분은 강력한 유리라디칼 소거능과 환원력을 가지고 있었고(Jung 등, 2008), 80% 에탄올 추출물은 뛰어난 항산화, 항고혈압 및 항염증 효과를 나타내었다(Lee 등, 2013). 또한 유근피 80% 메탄올 추출물에서 분리한 페놀성 화합물은 글루탐산에 의한 신경세포 독성으로부터 뇌신경을 보호하였고 그 생리활성 성분으로는 ulmicin이 알려져 있다(Lee와 Kim 2001). 유근피의 물 추출물에서 분리한 단백당체는 면역 조절 작용을 통해 항암 효과를 가지고(Lee 등, 2013), 메탄올 추출물은 사람의 위암과 대장암 세포에 대해 약한 수준의 증식 억제 작용을 나타낸다고 보고되었다(Yang 등, 1996). 또한 유근피의 메탄올 추출물은 선천성 면역을 활성화 시킴으로써 암세포의 전이를 억제하고(Kim 등, 2010), 다양한 용매로 추출한 유근피 추출물은 사람의 유방암 세포주인 MCF-7의 증식을 억제한다고 알려져 있다(Yang 등, 2007). 이렇듯 유근피는 약리효과가 우수한 천연 자원이며 추출 용매와 추출 조건에 따라 다양한 생리활성 물질을 분리하여 활용할 수 있다(Kim 등, 2015c). 하지만 유근피의 추출 용매는 주로 물, 메탄올, 에탄올 등의 비교적 극성 용매에 한정되어 있어 비극성 용매에서 추출 및 분획이 이루어지는 지용성 성분의 활용에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 예비실험을 통해 다른 추출 용매에 비해 비교적 항산화 및 암세포 증식억제 활성이 동시에 높게 나타난 유근피 아세톤 추출물을 시료로 하여 유리라디칼 소거능, 환원력 및 인체 암세포 증식억제 활성을 확인함으로써 유근피의 생리활성 소재로서의 활용도 향상에 기여하고자 하였다.

Dong Chung Kim (✉)  
E-mail: kimdc@chungwoon.ac.kr

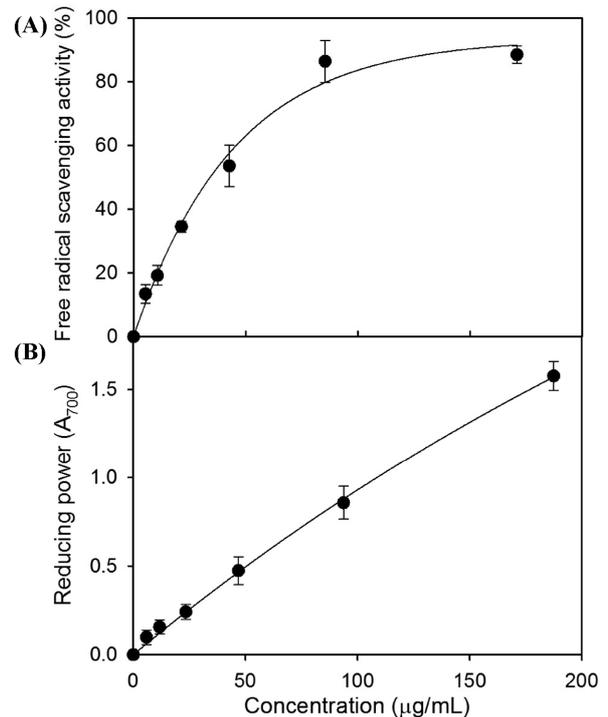
<sup>1</sup>Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 32244, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Integrated Materials Engineering, Chungwoon University, Incheon 22100, Republic of Korea

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.

열풍건조된 유근피를 약초명가(Hwaseong, Korea)에 구입한 후 분쇄(100–300  $\mu\text{m}$ )하여 사용하였다. 유근피 분말에 10배(w/w)의 아세톤을 추출용매로 넣고 항온 진탕조에서 1시간 동안 추출하였다. 추출된 용액은 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 감압 농축하여 아세톤이 제거된 유근피 추출물을 얻었다. 유근피 아세톤 추출물의 수율은 유근피의 중량 대비 아세톤 추출물의 중량으로 계산하였고, 총 페놀성 화합물의 함량은 표준물질로 chlorogenic acid를 사용하여 Folin-Ciocalteu 시약이 페놀성 화합물에 의하여 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색되는 방법(Folin과 Denis 1912)으로 측정하였다. 유근피 아세톤 추출물의 수율(Table 1)은  $3.9 \pm 0.15$  wt. %로 기존에 보고된 유근피의 물 추출 시 12.7% (Jeong과 Kim 2012), 메탄올 추출 시 15.2% (Jung 등, 2008), 80% 에탄올 추출 시 19.4% (Kim 등, 2015c)에 비해 낮게 나타났다. 유근피 아세톤 추출물의 수율이 낮게 나타난 것은 비극성 용매인 아세톤에서는 당류, 단백질, 다당체 등의 극성 분자들이 잘 추출되지 않는 것에 기인한다. 인삼의 경우에도 다양한 용매로 추출 시 수율이 메탄올에서 20.78%, 에탄올에서 9.34%, 아세톤에서 0.84%, n-헥산에서 0.41%로 추출 용매에 따라 큰 차이를 보여주었고 비극성 용매일수록 추출 수율이 낮게 나타났다(Choi 등, 1983). Table 1에서 보듯이 유근피 아세톤 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 유근피 100 g 당  $144.1 \pm 5.90$  mg chlorogenic acid equivalents (CAE)로 기존에 보고된 유근피 100 g 당 물 추출물과 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량인  $623.5 \pm 2.4$  mg과  $710.4 \pm 2.1$  mg에 비해서는 낮게 나타났다(Jeong과 Kim 2012). 일반적으로 물과 에탄올 용액에서 페놀성 화합물의 추출량이 많고 추출 용매의 비극성도가 커질수록 페놀성 화합물의 수율이 감소하는 경향을 나타낸다(In 등, 2014).

본 연구에서는 유근피 아세톤 추출물의 유리라디칼 소거활성과 환원력을 측정하였고, 대조 물질로 천연 항산화제인 비타민 C를 사용하였다. 안정한 유리라디칼 화합물인 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)를 이용하여 유리라디칼 소거활성(free radical scavenging activity)을 측정하였고(Blois 1958), ferric-ferricyanide ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 화합물에 전자를 공여하여 ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ )로 환원시키는 원리를 이용하여 환원력(reducing power)을 확인하였다(Oyaizu 1985). 유근피 아세톤 추출물의 유리라디칼 소거활성은 농도 의존적으로 증가하였고(Fig. 1A), DPPH 유리라디칼을 50% 소거하는 농도인  $\text{EC}_{50}$ 은  $36.7 \mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 1). 유근피 아세톤 추출물의  $\text{EC}_{50}$ 은 대조 물질인 비타민 C ( $\text{EC}_{50} = 51.4 \mu\text{g/mL}$ )에 비해서 다소 낮았고(Table 1), 식용 식물 중 모시잎 70% 에탄올 추출물의  $688 \mu\text{g/mL}$  (Nho 등, 2010), 곤드레 잎 추출물의  $87.1\text{--}111.19 \mu\text{g/mL}$  (Lee 등, 2006; Lee 등, 2011), 마늘 70% 에탄올 추출물의  $3.07 \text{ mg/mL}$  (Lee 등, 2012), 고구마잎 80% 에탄올 추출물의  $109\text{--}168 \mu\text{g/mL}$  (Li 등, 2012)보다도 낮게 나타나 유근피 아세톤 추출물은 매우 우수한 전자공여 능력을 보유하는 것으로 판단되었다. 유근피 아세톤 추출물의 환원력은 유리라디칼 소거능과 마찬가지로 농도에 비례하여 증가하였고(Fig. 1B), 반응액의 흡광도가 0.5가 되는데 필요한 농도인  $\text{EC}_{50}$ 은  $53.2 \mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 1). 유근피 아세톤 추출물의 환원력은 대조 물질인 비타민 C ( $\text{EC}_{50} = 37.1 \mu\text{g/mL}$ )에 비해 다소 낮았으나 혼합물로서는 우수한 환원력을 보유하는 것으로 사료된다(Table 1). 환원력이 보고된 다른 식물



**Fig. 1** (A) DPPH free radical scavenging activity and (B) reducing power of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L.. Data were means and SD of triplicate measurements

**Table 1** Yield, total phenolic content and anti-oxidative activity of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L.

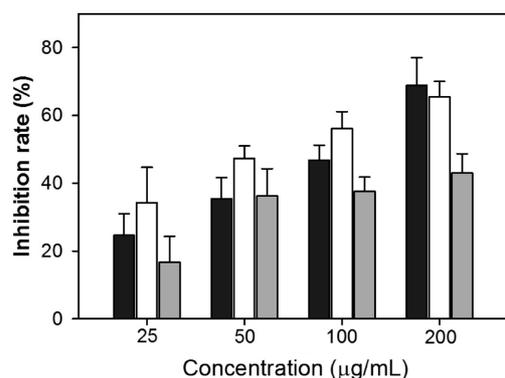
Yield (wt. %)	Total phenolic content <sup>2)</sup> (mg CAE/100 g)	EC <sub>50</sub> values <sup>3)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		Radical scavenging activity	Reducing power
$3.9 \pm 0.15$ <sup>1)</sup>	$144.1 \pm 5.90$ <sup>1)</sup>	36.7	53.2

<sup>1)</sup>Data were means and SD of triplicate measurements

<sup>2)</sup>Total phenolic content was expressed as chlorogenic acid equivalents (CAE)

<sup>3)</sup>EC<sub>50</sub> values for radical scavenging activity and reducing power are expressed as the effective concentrations at which DPPH free radicals are scavenged and at which the absorbance is 0.5, respectively. EC<sub>50</sub> values of vitamin C for radical scavenging activity and reducing power were  $51.4$  and  $37.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively

과  $\text{EC}_{50}$ 을 비교하였을 때도 모시잎 70% 에탄올 추출물의  $44.39 \mu\text{g/mL}$  (Kim 등, 2015a)과는  $\text{EC}_{50}$ 이 비슷하고, 복분자 60% 아세톤 추출물의  $871 \mu\text{g/mL}$ 과 오디 60% 아세톤 추출물의  $746 \mu\text{g/mL}$  (Jun 등, 2014), 자색고구마 70% 에탄올 추출물의  $236 \mu\text{g/mL}$  (Kim 등, 2015b)보다는  $\text{EC}_{50}$ 이 크게 낮아 유근피 아세톤 추출물은 매우 뛰어난 환원력을 보유하는 것으로 나타났다. 생체에서 생성된 활성산소와 유리라디칼은 세포의 구성성분인 DNA, 단백질 및 세포막 지질에 산화적 손상을 유발하여 돌연변이, 암, 자가면역질환, 고혈압 등의 만성질환을 야기하는 원인으로 작용하는데(Yen과 Chen 1995), 식물에 함유되어 있는 이차 대사산물인 페놀성 화합물은 그 구조에 존재하는 phenolic hydroxyl기에 의해 유리라디칼 소거능과 환원력을 가지게 된다(Amin과 Yazdnparsat 2007).



**Fig. 2** Effects of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L. on human non-small cell lung cancer (A549, black bar), colon cancer (SNU-C4, white bar) and embryonic lung epithelial (L132, gray bar) cells growth. Data were means and SD of triplicate measurements

**Table 2** GI<sub>50</sub> values of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L. and indole-3-carbinol

Human cell lines	GI <sub>50</sub> values <sup>1)</sup> (µg/mL)	
	Acetone extract	Indole-3-carbinol
Non-small cell lung cancer cell (A549)	74.3	42.6
Colon cancer cell (SNU-C4)	92.8	29.6
Embryonic lung epithelial cell (L132)	~200	59.2

<sup>1)</sup>GI<sub>50</sub> values represent the test-sample concentration that causes 50% growth inhibition of cells

본 연구에서는 인체 폐암세포(human non-small cell lung cancer cell, A549)와 대장암세포(human colon cancer cell, SNU-C4)를 대상으로 유근피 아세톤 추출물의 암세포 증식억제 활성을 측정하였다(In 등, 2014). 대조 물질로는 항암 활성을 가진 indole-3-carbinol을 사용하였고(Weng 등, 2008), 정상세포에 대한 독성은 인체 배아 폐 상피세포(human embryonic lung epithelial cell, L132)를 대상으로 하여 실험하였다(In 등, 2014). 유근피 아세톤 추출물 및 indole-3-carbinol 처리에 의한 세포의 증식 억제 활성은 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 사용하여 측정하였다(Itano 등, 2002; Lee 등, 2009). 인체 암세포와 정상세포는 Lee 등의 방법(2009)에 따라 배양하였고, 유근피 아세톤 추출물은 에탄올에 용해한 후 배지에 희석하여 처리하였는데 이때 최종 에탄올 농도가 0.1%를 넘지 않도록 하였다. 유근피 아세톤 추출물은 농도에 비례하여 인체 암세포의 증식을 억제하였으며(Fig. 2), 암세포의 증식을 50% 억제하는 농도인 GI<sub>50</sub>은 폐암세포(A549)에 대해서는 74.3 µg/mL로, 대장암세포(SNU-C4)에 대해서는 92.8 µg/mL로 나타났다(Table 2). 대조 물질인 indole-3-carbinol의 GI<sub>50</sub>은 폐암세포(A549)에 대해서 42.6 µg/mL이었고, 대장암세포(SNU-C4)에 대해서는 29.6 µg/mL이었다(Table 2). 유근피의 아세톤 추출물은 단일 물질인 indole-3-carbinol에 비해서 암세포 증식억제 활성이 다소 낮았으나 혼합물로서는 우수한 항암 활성을 나타내었다. Shoemaker 등(2005)은 항암 활성이 있는 것으로 알려진 황

해썹(*Artemisia argyi*)을 포함하는 12종의 중국산 허브 식물을 대상으로 다양한 인체 암세포에 대한 GI<sub>50</sub>값을 구하였는데 폐암세포(A549)에 대한 GI<sub>50</sub>이 161–1,456 µg/mL로 나타나 상대적으로 유근피 아세톤 추출물이 뛰어난 암세포 증식억제 활성을 가지고 있음을 보여주었다. 또한 유근피 아세톤 추출물은 ~200 µg/mL의 고농도에서 인체 배아 폐 상피세포(L132)의 생육을 절반 정도 저해하는 것(Table 2)으로 나타나 정상 세포에는 독성이 낮으면서 암세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 식물의 페놀성 화합물이 항암 활성을 가지고 있다는 것은 일반적으로 널리 알려져 있고, 폴리페놀의 항암 활성은 항산화, 세포자살 유도, 신생혈관 생성 억제 및 면역조절 작용에 기인하는 것으로 보고되고 있다(Lamoral-Theys 등, 2010).

이상의 결과에서 유근피의 비극성 용매 추출물에도 다양한 생리활성 성분이 존재함을 알 수 있었고, 유근피 아세톤 추출물의 우수한 유리라디칼 소거능, 환원력 및 인체 암세포에 대한 증식억제 활성을 확인함으로써 항산화 소재 및 항암 소재로서의 활용가능성을 보여주었다.

## 초 록

유근피 아세톤 추출물의 항산화 및 암세포 증식억제 활성을 확인하였다. 유근피 아세톤 추출물의 농도에 비례하여 유리라디칼 소거활성(EC<sub>50</sub> = 36.7 µg/mL)과 환원력(EC<sub>50</sub> = 53.2 µg/mL)이 증가하였다. 유근피 아세톤 추출물은 정상 세포인 인체 배아 폐 상피세포(L132)에는 독성이 낮으면서 농도에 비례하여 인체 폐암세포(A549, GI<sub>50</sub> = 74.3 µg/mL)와 대장암세포(SNU-C4, GI<sub>50</sub> = 92.8 µg/mL)의 증식을 효과적으로 억제하였다.

**Keywords** 아세톤 추출물 · 암세포 증식억제 · 유근피 · 항산화

## References

Amin A, Yazdparast R (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem 104: 21–29  
 Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1200  
 Choi KJ, Kim MW, Hong SK, Kim DH (1983) Effect of solvents on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxidant activities of extracts from white and red ginseng. J Korean Agric Chem Soc 26: 8–18  
 Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12: 239–243  
 In MJ, Chae HJ, Kim DC (2014) *In vitro* antioxidant and anticancer potential of n-hexane extract from ginseng marc. J Appl Biol Chem 57: 247–250  
 Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K (2002) Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3609–3614  
 Jeong KY, Kim ML (2012) Physiological activities of *Ulmus pumila* L. extracts. Korean J Food Preserv 19: 104–109  
 Jun HI, Kim YA, Kim YS (2014) Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. Korean Soc Food Sci Nutr 43: 381–388

- Jung MJ, Heo SI, Wang MH (2008) Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. Food Chem 108: 482–487
- Kim C, In MJ, Kim DC (2015a) *In vitro* antioxidant activity of ethanol extract from *Boehmeria nivea* L. leaves. Food Eng Prog 19: 76–81
- Kim DC, Kim C, In MJ (2015b) Antioxidant activities of extracts prepared from sweet potatoes with different flesh colors. J Appl Biol Chem 58: 21–24
- Kim HS, Cho JH, Lee JM, Lee CH, Jang JB, Lee KS (2010) Experimental studies on antimetastatic and immunomodulating effects of *Ulmus davidiana*. J Orient Obstet Gynecol 23: 1–11
- Kim JM, Cho ML, Seo KE, Kim YS, Jung TD, Kim YH, Kim DB, Shin GH, Oh JW, Lee JS, Lee JH, Kim JY, Lee DW, Lee OH (2015c) Effect of extraction conditions on *in vitro* antioxidant activities of root bark extract from *Ulmus pumila* L.. J Korean Soc Food Sci Nutr 44: 1172–1179
- Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufrasne F, Nève J, Dubois J, Kornienko A, Kiss R, Ingrassia L (2010) Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity. Curr Med Chem 17: 812–825
- Lee EH, Park CW, Jung YJ (2013) Anti-inflammatory and immunomodulating effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai extract on a macrophage cell line and immune cells in the mouse small intestine. J Ethnopharmacol 146: 608–613
- Lee MK, Kim YC (2001) Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. J Nat Prod 64: 328–331
- Lee SD, Yoo G, Chae HJ, In MJ, Oh NS, Hwang YK, Hwang WI, Kim DC (2009) Lipid-soluble extracts as the main source of anticancer activity in ginseng and ginseng marc. J Am Oil Chem Soc 86: 1065–1071
- Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Choi DS, Wang MH (2006) Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. Korean J Food Sci Technol 38: 571–576
- Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park SD (2011) Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 29–36
- Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee J, Jung HS (2012) Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 278–282
- Li M, Jang GY, Lee SH, Woo KS, Sin HM, Kim HS, Lee J, Jeong HS (2012) Chemical compositions and antioxidant activities of leaves and stalks from different sweet potato cultivars. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 1656–1662
- Lim YS (2010) Antioxidant effects of *Ulmus davidiana* extracts on various oil. Korean J Food Preserv 17: 107–116
- Matsuzaki T, Nara Y (1985) Antioxidative of tea leaf catechins. Nippon Nogeikaga Kogyo Kaishi 59: 129–134
- Nho JW, Hwang IG, Kim HY, Lee YR, Woo KS, Hwang BY, Chang SJ, Lee J, Jeong HS (2010) Free radical scavenging, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, and *in vitro* anticancer activities of ramie (*Boehmeria nivea*) leaves extracts. Food Sci Biotechnol 19: 383–90
- Oyaizu M (1985) Studies on products of browning reaction: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jap J Nutr 44: 307–15
- Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee SH, Cohen I, Campbell MJ (2005) *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. Phytother Res 19: 649–651
- Son BH, Park JH, Zee OP (1989) Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. Arch Pharm 21: 217–222
- Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS (2008) Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. Cancer Lett 262: 153
- Yang SJ, Cho SH, Cho SI, Na WM (2007) Anti-proliferative effect of *Ulmus pumilae* cortex extracts on MCF-7 cells. J Orient Obstet Gynecol 20: 35–44
- Yang YM, Hyun JW, Lim KH, Sung MS, Kang SS, Paik WH, Bae KW, Cho H, Kim HJ, Woo ER, Park H, Park JG (1996) Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants (III). Korean J Pharmacogn 27: 105–110
- Yen GC, Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43: 27–32