

## Antioxidant activities and inhibitory effects on oxidative DNA damage of leaf from *Zelkova serrata* with ethyl acetate fractions and hot water extracts

Tae-Won Jang<sup>1</sup> · Jae-Ho Park<sup>1</sup> 

### 느티나무 잎 에틸아세테이트 분획물 및 열수 추출물의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 활성

장태원<sup>1</sup> · 박재호<sup>1</sup>

Received: 13 May 2016 / Accepted: 15 June 2016 / Published Online: 30 September 2016  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

**Abstract** Reactive oxygen species (ROS) has been played a critical role in damage of DNA. Recently, many effort is focusing to develop the natural antioxidants for controlling ROS. *Zelkova serrata*, Ulmaceae, is close as plants which are planted in front of Korea villages. Although *Zelkova serrata* is familiar with Koreans, those of antioxidant activities and protective effects on oxidative DNA damage haven't studied. We demonstrated antioxidant activities and inhibitory effects on oxidative DNA damage of Leaf from *Zelkova serrata* with ethyl acetate fractions (EA) and hot water extracts (HW). Between the extracts, EA showed higher activities in 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, 2,2'-azino-bis[3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid radical scavenging, Fe<sup>2+</sup> chelating and reducing power than HW. Also, those of total phenolic content are 56.63 and 51.61 mg/g respectively. In addition,  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay for inhibitory effect by oxidative DNA damage was both EA and HW has significant protective effect on oxidative DNA damage. The results suggested that leaf from *Zelkova serrata* with ethyl acetate fractions and hot

water extracts have surpassing potential as natural resources with antioxidant and inhibitory effect on oxidative DNA damage.

**Keywords** Antioxidant · DNA damage · Fe<sup>2+</sup> chelating · *Zelkova serrata*

### 서론

최근 고도로 발달한 사회로 인해 삶의 질이 높아지게 되었고, 인간은 건강하고 아름다운 삶을 유지하기 위해 많은 노력을 하고 있다. 특히 최근 연구들은 노화와 암 그리고 만성 질환 등과 같은 질병에 대한 예방 및 억제 치료를 중점에 두고 있다. 이와 같은 관심에 더불어 인체의 산화를 방지하여 노화 및 만성 질환 예방하는 항산화제에 대한 사람들의 인식이 증가하고 있다. 항산화제를 통해 인체 내에서 산화적 스트레스에 대한 방어 기전이 증대되고 질병에 대한 방어능력이 향상될 수 있다. 이러한 이유와 더불어 빠른 효과와 경제적인 측면이 효율적인 합성 항산화제가 질병의 예방과 치료를 위해 제안되었으나, 이들의 인체에 대한 다양한 부작용과 독성 등 안전성 측면에서 문제가 되고 있다. 이에 반해 인체에 대한 유해성이 낮은 천연 항산화제의 사용이 증대되고 있고(Warnholtz과 Münzel, 2000; Hwang 등, 2011), 천연 항산화제로 사용될 수 있는 식물의 항산화 물질에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 식물의 항산화 물질은 phenolics 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있고(Choe와 Yang 1982), 이 물질들은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대해 연쇄반응을 통해 alkyl radical 또는

Jae-Ho Park (✉)  
E-mail: parkjh@jwu.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, 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.

alkylperoxy radical에 수소를 공여하는 반응을 한다(Lee 등, 2006). 이러한 활성산소종은 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA에 이르는 비가역적인 변형과 파괴를 유래한다고 알려져 있으며 (Harold 등, 2007), 항산화제의 산화 반응의 억제를 통해 체내 radical의 반응에 대해 인체를 보호하고, 활성산소종에 의한 암, 동맥경화, 심혈관계질환 등 다양한 질병에 대한 억제작용을 한다 (Maxwell 1995). 이전 연구에서 금속에 대한 산화-환원은 페놀류 항산화 화합물과 결합하거나 복합체를 형성하여 결과적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 금속이온 간의 반응을 억제한다고 밝혔으며(Lee 등, 2002; Wei 등, 2006), 페놀류 화합물과 같은 항산화 물질은 수소이온이나 전자를 공여하므로써 ROS를 제어하여, DNA 산화적 손상에 대한 방어 효과를 보인다. 이와 같이, 펜톤 반응의 억제를 이끌어내는 항산화 활성은 철 이온의 환원반응을 발생 시키거나, OH<sup>-</sup>를 직접적으로 소거하므로 OH<sup>-</sup>에 의한 DNA 손상으로부터 supercoiled plasmid DNA의 구조를 보호한다 (Prakash 등, 2007). 느티나무(*Zelkova serrata*)는 평안남도 및 함경남도 이남에서 자라며 높이 26 m, 지름 3 m인 낙엽성 교목이다. 또한 생장이 빠르지만 저수지나 염분이 있는 곳에서는 생장이 어렵다(Lee 2003). 느티나무는 3-hydroxylated flavonoid C-glucosides (Hayashi 등, 1987), 7-hydroxy-3-methoxycadalrene (Kim 등, 2004)이 분석되었고, 최근까지 항진균 활성 및 항산화(Lee 등, 2000), 폐암 억제(Kim 등, 2004) 등의 연구가 진행되어 있다. 하지만 느티나무 잎의 항산화 활성 및 DNA 손상 억제에 대한 연구가 미흡하여, 본 연구를 통해 차후 느티나무 잎의 천연 항산화제로의 활용가능성 및 추출 방식에 따른 효과적인 이용 방법을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 느티나무 잎은 충청북도 괴산군 칠성면에서 채취하여, 중원대학교 생약자원개발학과에서 분류 및 동정한 것 (voucher number: JWU15-1)을 시료로 사용하였다.

### 시료 추출 및 용매분획

ethyl acetate 분획물(EA)을 얻기 위해 느티나무 잎을 동결건조한 후에 분쇄하여 분말화하였다. 분말화한 느티나무 잎을 초음파를 이용하여 80% methanol에 3일 동안 침출시킨 후, filter paper (Whatman NO. 2, Maidstone, UK)로 여과하였다. methanol 추출물을 40°C 이하의 증탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, JAPAN)로 농축한 후 분별 깔대기를 이용하여 petroleum ether, ethyl acetate 을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획 하였다. 이 중 ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 시료로 사용하였다. 열수 추출물(HW)을 얻기 위해 느티나무 잎을 동결건조한 후에 분쇄하여 분말화하였다. 분말화한 느티나무 잎을 증류수에 침출시켜 뜨거운 물에 용출하여 filter paper (Whatman NO. 2, UK) 로 여과하였다. 여과한 추출물을 freeze drier (Ilshin, Donducheon-si, Korea) 를 이용하여 건조시켜 시료로 사용하였다. 모든 시료는 실험 전까지 -27°C 냉동 보관하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용하였다.

### 기기 및 시약

본 연구에 사용된 High-performance liquid chromatography grade 의 methanol, petroleum ether, ethyl acetate 및 DMSO 는 SK chemicals (Seoul, Korea) 제품을 사용 하였고, 나머지 시약 은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA는 Promega (Madison, WI, USA) 에서 구입하여 사용하였다. 기타시약 및 기기는 별도 표기하였다.

### DPPH 라디칼 소거활성

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법(Bondet 등, 1997)을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300  $\mu$ M DPPH 를 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 (0.32, 1.6, 8, 40, 200  $\mu$ g/mL) 40  $\mu$ L에 DPPH solution 760  $\mu$ L 를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC, Seoul, Korea) 를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### ABTS 라디칼 소거활성

3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg 등의 방법(Van den Berg 등, 1999)을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7.4 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간 ABTS radical 을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 희석하였다. 각 농도별 추출물 40  $\mu$ L에 ABTS solution 760  $\mu$ L를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 활성

Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 활성은 Hsu 등의 방법(Hsu 등, 2006)을 참고하여 실험하였다. 각 농도별 추출물 40  $\mu$ L에 1 mM FeCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ L 와 증류수 700  $\mu$ L를 혼합하여 약 30초간 실온에서 반응하였다. 이 혼합물에 5 mM ferrozine 40  $\mu$ L을 첨가하여 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex를 유도하고 10분 후 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Reducing power

Reducing power는 Oyaizu의 방법(Oyaizu 1986)을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출물 100  $\mu$ L에 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.6) 250  $\mu$ L과 1% potassium hexacyanoferrate (III) 250  $\mu$ L을 혼합한 후, 50°C에서 20분 반응시킨 후 찬물로 냉각하여, trichloroacetic acid 250  $\mu$ L를 첨가하였다. 위 반응액을 2000g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400  $\mu$ L에 증류수 400  $\mu$ L 와 0.10% ferric chloride 16  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 총 페놀성 화합물 분석

총 페놀성 화합물 분석은 Folin-Denis의 방법(AOAC 1995)을 참고하여 측정하였다. 건조시료 1 g에 1% acetic acid/diethyl

ether 100 mL를 혼합하여 5분간 추출 후 상등액을 제거하였다. 잔여물과 70 % acetone을 혼합하여 50 mL를 만든 후 2시간 동안 교반 추출하였다. 상등액을 filter paper로 걸러낸 후, 70 % acetone으로 50 mL까지 정용하였다. 추출물 50 µL와 증류수 950 µL, folin 500 µL를 혼합한 후, 20 % sodium carbonate 2.5 mL를 넣어 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tannic acid를 사용하였고, 정량 직선방정식을 사용하였다.

**φX-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성**  
 φX-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung과 Surh의 방법(Jung and Surh 2001)을 참고하여 측정하였다. Ferric chloride (FeCl<sub>2</sub>)을 통한 산화적 스트레스는 각 농도별 추출물 40 µL와 4.5 mM FeCl<sub>2</sub> 60 µL와 증류수 700 µL를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응물 20 µL와 φX-174 RF I plasmid DNA 5 µL를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1 % agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다. Ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>)을 통한 산화적 스트레스는 각 농도별 추출물 40 µL와 1.5 mM FeSO<sub>4</sub>와 1.5 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 1:1로 혼합한 용액을 760 µL를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응물 20 µL와 φX-174 RF I plasmid DNA 5 µL를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1 % agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

**통계학적 분석**

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences)을 이용하여 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, ANOVA를 통한  $p < 0.05$  수준에서 Duncan 다중검정법(duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**느티나무 잎의 항산화 활성**

최근 활성산소종에 대한 관심이 높아지면서 활성산소종을 제어할 수 있는 항산화제에 대한 관심 또한 급증하고 있다. 활성산소종은 자유라디칼을 가지는 불안정한 상태의 산소종을 말하며 강한 반응성을 지닌다. 활성산소종은 체내 각종 세포 등의 여

러 대사과정에서 끊임없이 생성되고 인체를 보호하는 작용을 하지만 체내에서 생성되는 활성산소와 항산화효소와의 항상성이 깨지고 과다한 발생은 산화적 스트레스로 인한 노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 질병들을 야기하게 될 뿐만 아니라 세포자체의 구조나 기능의 손상과 변질을 유도한다(Halliwell 1995; Cho와 Sheen 2009; Lee 등, 2014). 이러한 유해 작용을 억제하기 위하여 항산화 기능을 하는 폴리페놀계 화합물을 함유하고 있는 식물자원에 대하여 많은 관심과 연구가 진행되고 있다(Lee 등, 2011). 페놀성 화합물은 킬레이팅 반응을 통해 금속이온들을 비활성화 시키고 superoxide-driven fenton reaction과 같은 활성산소종의 기원이 되는 반응들을 억제한다(Rice-evans 등, 1997; Arora 등, 1998). 페놀성 화합물의 다양한 항산화능력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬절단 항산화제(chain breaking antioxidants) 등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. DPPH 라디칼 소거 활성은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법이며, 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다(Que 등, 2006). 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하고, 농도의 준적으로 활성을 나타냈으며, 추출물 농도 200 µg/mL에서 87.08, 72.66 %로 에틸아세테이트 분획물의 활성이 더 높게 나타났고 IC<sub>50</sub> (Inhibitor concentration 50%) 값 또한 19.2 µg/mL, 25.5 µg/mL로, 에틸아세테이트 분획물의 활성이 더 높은 것으로 나타났다(Table 1). ABTS 라디칼 소거활성은 라디칼을 생성하는 ABTS가 존재 시, hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 빠른 항산화 반응에 의해 myoglobin radical을 감소시키는 기전이라고 할 수 있다. 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하고, 추출물 농도 200 µg/mL에서 99.50, 99.40 %로 EA와 HW의 활성이 모두 높게 나타났으며, IC<sub>50</sub>값은 5.5, 4.4 µg/mL로 열수 추출물의 활성이 더 높은 것으로 나타났다(Table 2).

항산화 활성 중에서 활성산소 또는 전자 공여능으로 인한 안정화 작용은 환원이라고 할 수 있다. 결과적으로 강한 환원력을 가진 물질은 뛰어난 전자 공여능을 뜻하는 것으로 지질과산화 과정과 같은 산화적 기작에서 2차적인 항산화제의 역할을 수행할 수 있다. 환원력 평가는 potassium ferricyanide reduction method를 이용하여 ferric-ferricyanide (Fe<sup>3+</sup>) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe<sup>2+</sup>)로 전환하는 환원력을 700 nm에서의 흡광도 값으로 표현한 것이다. 환원력에서의 흡광도는 자체적으로 시료의 환원력을 나타내며 높은 환

**Table 1** DPPH radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate*

Sample	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	200	40	8	1.6	0.32	
EA <sup>1)</sup>	87.0±0.02b	69.0±0.60c	22.6±0.20b	4.9±0.06c	2.7±0.04b <sup>3)</sup>	19.2
HW <sup>2)</sup>	72.6±0.90c	71.5±0.30b	23.4±0.40b	5.5±0.10b	0.9±0.30c	25.5
L-ascorbic acid	93.4±0.05a	88.2±0.04a	76.5±0.10a	20.8±0.04a	5.3±0.40a	5.0

<sup>1)</sup>EA: ethyl acetate fractions

<sup>2)</sup>HW: hot water extracts

<sup>3)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $p = 0.05$

**Table 2** ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate*

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	200	40	8	1.6	0.32	
EA <sup>1)</sup>	99.5 $\pm$ 0.09a	99.1 $\pm$ 0.50a	62.7 $\pm$ 0.70c	1.5 $\pm$ 0.80c	3.7 $\pm$ 0.20b <sup>3)</sup>	5.5
HW <sup>2)</sup>	99.4 $\pm$ 0.20a	98.9 $\pm$ 0.10a	76.4 $\pm$ 2.30b	20.0 $\pm$ 1.80b	4.3 $\pm$ 0.80b	4.4
L-ascorbic acid	99.1 $\pm$ 0.03a	98.1 $\pm$ 0.03a	96.1 $\pm$ 0.10a	41.9 $\pm$ 0.10a	6.9 $\pm$ 0.03a	2.3

<sup>1)</sup>EA: ethyl acetate fractions<sup>2)</sup>HW: hot water extracts<sup>3)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $p=0.05$ **Table 3** Reducing Power (O.D) of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate*

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	200	40	8	1.6	0.32
EA <sup>1)</sup>	0.84 $\pm$ 0.00c	0.81 $\pm$ 0.01a	0.32 $\pm$ 0.00a	0.13 $\pm$ 0.00a	0.07 $\pm$ 0.00b <sup>3)</sup>
HW <sup>2)</sup>	0.98 $\pm$ 0.01a	0.72 $\pm$ 0.01b	0.05 $\pm$ 0.00b	0.007 $\pm$ 0.00b	0.005 $\pm$ 0.00c
L-ascorbic acid	0.87 $\pm$ 0.00b	0.86 $\pm$ 0.00a	0.37 $\pm$ 0.00a	0.15 $\pm$ 0.00a	0.07 $\pm$ 0.00a

<sup>1)</sup>EA: ethyl acetate fractions<sup>2)</sup>HW: hot water extracts<sup>3)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $p=0.05$ **Table 4** Fe<sup>2+</sup> chelating activity (%) of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate*

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	200	40	8	1.6	0.32	
EA <sup>1)</sup>	73.9 $\pm$ 0.20b	56.9 $\pm$ 0.80c	27.8 $\pm$ 0.01b	7.2 $\pm$ 0.09b	2.7 $\pm$ 0.10b <sup>3)</sup>	31.3
HW <sup>2)</sup>	72.4 $\pm$ 0.09c	59.8 $\pm$ 0.30b	17.2 $\pm$ 0.05c	5.8 $\pm$ 0.10c	3.7 $\pm$ 0.50a	36.9
Deferoxamine	95.4 $\pm$ 0.10a	94.2 $\pm$ 0.08a	48.3 $\pm$ 0.03a	10.5 $\pm$ 0.10a	0.6 $\pm$ 0.03c	8.0

<sup>1)</sup>EA: ethyl acetate fractions<sup>2)</sup>HW: hot water extracts<sup>3)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $p=0.05$ 

원력을 가질수록 흡광도의 수치가 높게 측정 된다(Yoshino와 Murakami 1998; Hassas-Roudsari 등, 2009; Yeo 등, 2010). 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의 Reducing power는 에틸아세테이트 분획물보다 열수 추출물의 활성이 높았으며, 특히 열수 추출물은 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 유사한 환원력을 가진 것으로 보아 강한 항산화제로 평가된다(Table 3). Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 활성은 철 이온에 대한 시료의 킬레이팅 반응을 통해 산화반응을 일으키는 금속이온과 결합하여 금속이온의 그 반응성이나 결합성을 제어하는 역할을 한다. 생체 내의 철(iron, Fe) 이온의 과잉으로 야기될 수 있는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의한 단백질 발현에 대한 직접적인 손상과 DNA 산화적 스트레스, 세포의 노화와 손상을 야기하는 hydroxyl radical의 억제에 위한 Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 반응을 이용한 것이다(Stohs와 Bagchi 1995; Sakanaka 등, 2005). 대조구로는 Fe<sup>2+</sup> 킬레이트화 반응을 통해 Fe<sup>2+</sup> 과다 환자 치료에 사용되어 온 deferoxamine으로 비교 분석하였다(Sonakul 등, 1988; Zurlo 등, 1989; Oliveri 등, 1994; Oliver와 Brittenham 1997; Barman Balfour과 Foster 1999; Benz 2001). 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의 Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 활성을 측정 한 결과, 각 추출물의 농도가 높을수록 킬레이팅 활성이 높았으며, 추출물 농도 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 deferoxamine 95.40%과 비교하여 에틸아세테이트 분획물(73.96%)과 열수 추

출물(72.42%)로 에틸아세테이트 분획물의 활성이 더 우수한 것으로 나타났다(Table 4).

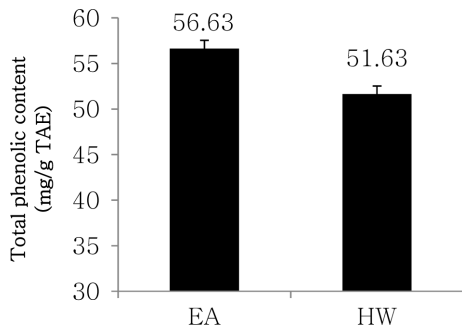
### 총 페놀성 화합물 함량 분석

활성산소종은 일반적으로 인체 내 세포에 손상을 입힘으로써 질병을 유발하고 노화를 촉진시킨다. 이러한 산화를 방지하기 위하여 천연 항산화제인 페놀성 화합물을 널리 이용하고 있다(Nijveldt 등, 2001). 따라서 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 그리로 안토시아닌 등의 총량인 페놀성 화합물 함량은 항산화 활성에서는 중요한 인자로 작용한다. 일반적으로 항산화 활성이 증가함에 따라 총 페놀성 화합물의 함량도 증가 한다(Park 등, 2007).

느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 분석한 결과(Fig. 1), 에틸아세테이트 분획물(56.63 $\pm$ 0.9 mg/g), 열수 추출물(51.62 $\pm$ 0.9 mg/g)으로 에틸아세테이트 분획물의 총 페놀성 화합물의 함량이 높았다. 총 페놀성 화합물의 함량은 농도별로 희석한 tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다.

### 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성

DNA 손상 억제 활성은 FeCl<sub>2</sub> (ferric chloride) 로 인한 산화적 스트레스와 FeSO<sub>4</sub> (ferrous sulfate) 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 fenton 반응에



**Fig. 1** Total phenolic contents of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate*. EA: ethyl acetate fractions. HW: hot water extracts. Each treatment was replicated three times

의한 산화적 스트레스로 평가하였으며,  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay로 평가하였다. 특히 DNA의 손상은 산화적 스트레스에 깊은 관련이 있으며, 암의 initiation 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 initiation 단계에서의 DNA 손상 억제제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다(Johnson 등, 1996).

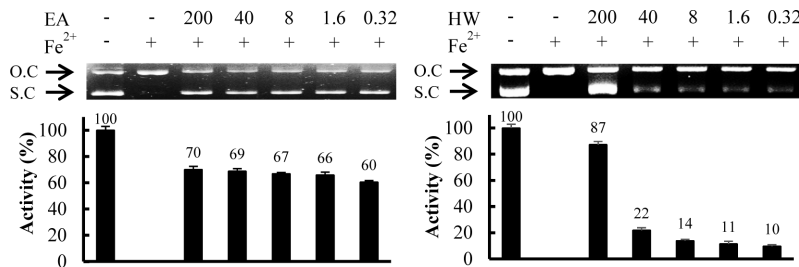
느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물의  $Fe^{2+}$ 에 의한 DNA 손상 억제 활성은 대조구와 비교하였을 때 추출물 농도별(200, 40, 8, 1.6, 0.32  $\mu$ g/mL) 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물 모두 DNA 손상 억제 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히 200  $\mu$ g/mL 농도에서 열수 추출물의 억제 활성은 85.8%로 높게 나타났다. 상대적으로 Ferrous sulfate

( $FeSO_4$ )를 이용한 산화적 스트레스에 의한 DNA damage는 대조구와 비교하였을 때 DNA 손상 억제 활성이 낮게 나타났다(Fig. 3).

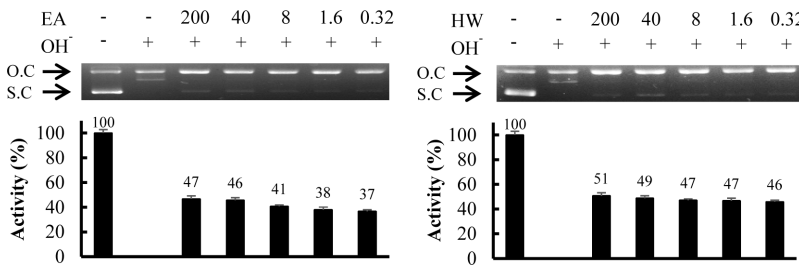
**초 록**

활성산소종은 DNA의 손상에서 중요한 역할을 한다. 최근 활성산소를 제어하고 조절하기 위해 천연항산화제를 개발하기 위해 많은 노력이 이루어지고 있다. 느티나무(*Zelkova serrate*)는 느릅나무과의 식물로 한국 마을 입구에 흔히 심어져 친숙한 식물이다. 하지만 느티나무의 항산화 활성 및 산화적 DNA 손상에 대한 방어효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물 및 열수 추출물의 항산화 활성 및 산화적 DNA 손상에 대한 억제활성을 확인하였다. 에틸아세테이트 분획물은 열수 추출물에 비해 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성,  $Fe^{2+}$  킬레이팅 활성 그리고 reducing power에서 높은 항산화 활성을 보였다. 또한, 페놀류 화합물 함량은 각각 에틸아세테이트 분획물은 56.63 mg/g 그리고 열수 추출물은 51.61 mg/g으로 분석됐다.  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA를 이용한 산화적 DNA 손상억제활성은 에틸아세테이트 분획물과 열수 추출물 모두 상당한 방어효과를 나타냈다. 따라서 느티나무 잎의 에틸아세테이트 분획물 및 열수 추출물은 뛰어난 항산화 활성 및 산화적 DNA 손상 억제 효과를 통한 천연 자원으로서의 잠재성을 보였다.

**Keywords** 느티나무 · 항산화 · DNA 손상 억제 ·  $Fe^{2+}$  킬레이팅



**Fig. 2** Inhibition activity of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate* against oxidative DNA damage by  $Fe^{2+}$ . EA: ethyl acetate fractions. HW: hot water extracts. O.C: open circular plasmid DNA. S.C: super-coiled plasmid DNA. Each treatment was replicated three times



**Fig. 3** Inhibition activity of ethyl acetate fractions and hot water extracts from leaf of *Zelkova serrate* against oxidative DNA damage by hydroxyl radical. EA: ethyl acetate fractions. HW: hot water extracts. O.C: open circular plasmid DNA. S.C: super-coiled plasmid DNA. Each treatment was replicated three times

**Acknowledgment** This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0025272).

## References

- AOAC (1995) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM (1998) Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *J Free Radic Biol Med* 24: 1355–1363
- Barman Balfour JA, Foster RH (1999) Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in betathalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs* 58: 553–578
- Benz EJ (2001) Hemoglobinopathies. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th edn. New York
- Bondet V, Brand Williams W, Berset C (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss U-Technol* 30: 609–615
- Cho IY, Sheen YY (2009) Effect of dioxin on the change of mitochondrial inner membrane potential and the induction of ROS. *J Environ Toxicol* 24: 33–41
- Choe SY, Yang KH (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol* 14: 283–288
- Halliwell B (1995) Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 49: 1341–1348
- Harold ES, Darrell EA, Evan IF, John AM (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 18: 567–579
- Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT (2009) Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanol and hot water extraction. *J Food Chem* 114: 717–726
- Hayashi Y, Ohara S, Takahashi T (1987) Isolation of new 3-hydroxylated flavonoid C-glucosides from the heartwood of *Zelkova serrata* Makino and other *Zelkova* species. *Mokuzai Gakkaishi* 33: 511–520
- Hsu B, Coupar IM, Ng K (2006) Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *J Food Chem* 98: 317–328
- Hwang JY, Lee HS, Han JS (2011) Protective effect of *Sasa borealis* leaf extract on AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. *J Food Sci Nutr* 16: 12–17
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 93: 11848–11852
- Jung Y, Surh Y (2001) Oxidative DNA damage and cytotoxicity unduced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol. a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic Biol Med* 30: 1407–1417
- Kim JH, Lee HJ, Kim GS, Choi DH, Lee SS, Kang JK, Chae C, Paik NW, Cho MH (2004) Inhibitory effects of 7-hydroxy-3-methoxy-cadalene on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Lett* 213: 139–145
- Lee CB (2003) The illustrated guide to Korean flora (I). Hangmunsa, Seoul
- Lee EK, Kwon WY, Lee JW, Yoon JA, Chung KH, Song BC, An JH (2014) Quality characteristics and antioxidant activity of vinegar supplemented added with *Akebia quinata* fruit during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1217–1227
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS (2002) Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J Agric Food Chem* 50: 6490–6496
- Lee JH, Lee BG, Park AR, Lee KJ, Choi DW, Han SH, Choi GP, Kim JD, Kim JC, Ahn JH, Lee HY, Shin IC, Park HJ (2011) *In vitro* antioxidant potential and oxidative DNA damage protecting activity of the ethanol extracts of *Cacalia firma* Komar. *Appl Biol Chem* 54: 258–264
- Lee SH, Choi DH, Lee HJ, Kang HY (2000) Studies on biological activity of wood extractives (II)-antimicrobial and antioxidative compound isolated from heartwood of *Zelkova serrata*. *J Korean Wood Sci Technol* 28: 32–41
- Lee YS, Joo EJ, Kim NW (2006) Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepistanuda*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1309–1314
- Maxwell SJ (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345–361
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418–425
- Oliver NF, Brittenham GM (1997) Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89: 739–761
- Oliveri NF, Nathan DG, MacMilan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A (1994) Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med* 331: 574–578
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* 44: 307–315
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Han JG, Chung HG (2007) Changes in antioxidant activity, total phenolics and vitamin C content during fruit ripening in *Rubus occidentalis*. *Korean J Plant Res* 20: 461–465
- Prakash CP, Garima U, Brahma NS, Harikesh B (2007) Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem* 104: 783–790
- Que F, Mao L, Pan X (2006) Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International* 39: 581–587
- Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *J Free Radic Res* 26: 381–398
- Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *J Food Chem* 89: 569–575
- Sonakul D, Thakerngpol K, Pacharee P (1988) Cardiac pathology in 76 thalassemia patients. *Birth Defects Orig Article Ser* 23: 177–191
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321–336
- Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A (1999) Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *J Food Chem* 66: 511–517
- Warnholtz A, Münzel T (2000) Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 1: 38–40
- Wei QY, Zhou B, Jun Y, Liu ZL (2006) Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-ed oxidative DNA damage. *Food Chem* 96: 90–95
- Yeo JS, Kim JS, Kim MO, Jeong HJ, Yu CY, Park DS, Kim MJ (2010) Comparative study of electron donating ability, reducing power, antimicrobial activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by sorghum bicolor extracts. *Korean J Food Sci Technol* 42: 598–604
- Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40–44
- Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti A, Di Palma A, Piga A, Melevendi C (1989) Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet* 2: 27–30