



In vitro anticancer and antioxidant effects of acetone extract of *Eucommia ulmoides* oliver leaves

Man-Jin In¹ · Eun Jeong Kim² · Dong Chung Kim²

두충잎 아세톤 추출물의 *in vitro* 항암 및 항산화 효과

인만진¹ · 김은정² · 김동청²

Received: 19 February 2018 / Accepted: 20 March 2018 / Published Online: 30 June 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract *In vitro* anticancer and antioxidant effects of acetone extract from leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver were investigated. The extraction yield and total phenolic content of the acetone extract were 1.13±0.033% (w/w) and 36.7±1.96 mg gallic acid equivalents/g-extract, respectively. GI₅₀ values of the acetone extract for human non-small cell lung cancer cells (A549), human colon cancer cells (SNU-C4), human cervical cancer cells (HeLa), and human embryonic lung epithelial cell (L132) were 53.4, 53.8, 88.3, and 153.9 µg/mL, respectively. The acetone extract effectively inhibited the proliferation of human non-small cell lung cancer (A549) and colon cancer (SNU-C4) cells in a concentration-dependent manner, but was less cytotoxic with human normal cells (L132). EC₅₀ values of the acetone extract for free radical scavenging, reducing power, and lipid peroxidation inhibition were about 2,000, 275.8, and 257.9 µg/mL, respectively. The acetone extract showed a potent reducing power and lipid peroxidation inhibitory activity in a concentration-dependent manner.

Keywords Acetone extract · Anticancer · Antioxidant · *Eucommia ulmoides* · Total phenolic

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

¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 32244, Republic of Korea

²Department of Chemical 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.

서론

두충(Du-zhong, *Eucommia ulmoides* Oliver)은 잎, 껍질, 줄기 및 열매의 뛰어난 약리 활성으로 인해 우리나라를 비롯한 동아시아 전역에서 널리 사용되어 온 생약재이다[1]. 두충에는 bisepoxyignan, monoepoxyignan 등의 리그닌 성분과 iridoid, 다당체, 스테로이드, 테르페노이드 등이 함유되어 있으며, 중요한 생리활성 성분으로는 quercetin, rutin, astragaloside, geniposidic acid 등이 알려져 있다[2,3,4].

두충잎차는 체지방을 감소시키고 에너지 대사를 촉진하는 것으로 알려졌다[5], 두충잎과 껍질의 물 추출물은 혈압을 낮추는 활성이 있었다[6]. 두충잎과 껍질의 물 추출물은 간에서 지방과 콜레스테롤의 합성을 억제함으로써 고지혈증의 완화에 도움을 주고, 두충잎 추출물은 동물 실험에서 체중 감량과 백색 지방 조직 감소 등의 항비만 효과가 있었다[7,8]. 민간에서 두충껍질의 물 추출물은 골다공증을 완화하는데 사용되어 왔는데 실제로 동물 실험에서 두충껍질 추출물이 조골세포를 활성화하고 파골세포를 감소시킴으로써 뼈의 용해를 억제한다고 보고되었다[9]. 또한 두충껍질의 물과 메탄올 추출물은 항균과 항염증 활성을 나타내었고[10,11], 물과 에탄올 추출물은 acetylcholinesterase 활성 억제를 통한 신경보호 작용[12]과 함께 간의 지방 축적을 억제함으로써 간 보호 효과를 가지고 있었다[13].

특히 두충잎은 껍질, 꽃, 열매에 비해 강한 항산화 활성을 가지고 있으며[14], 두충잎의 rutin, chlorogenic acid, ferulic acid 등의 페놀성 화합물이 항산화 활성을 나타내는 주요 물질로 보고되었다[5]. 두충잎 물 추출물은 껍질에 비해 우수한 지질과산화 억제 활성을 가지고 있었고[15], 또한 제2형 당뇨병을 유발한 쥐에서 적혈구의 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase의 활성을 촉진함으로써 과산화수소와 지질과산화물의 수준을 낮추는 항산화 활성을 나타내었다[16]. 두충의 잎, 껍질 및 씨앗을 에탄올로 추출하여 항산화 활성을 비교한 결과,

두충잎의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았고, 이와 비례하여 유리라디칼 소거활성, 환원력 및 지질과산화 억제활성도 두충잎 에탄올 추출물에서 높게 나타났다[17]. 두충잎의 물 추출물이 DNA와 같은 생체 고분자의 산화적 손상을 방지하는 항산화 활성을 가지고 있어 장기적으로 항암 효과를 나타낼 것으로 보고되었다[18].

일반적으로 천연물의 추출 용매로 물과 에탄올이 주로 사용되고 있어 비극성 용매에서 추출되는 지용성 성분에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 실제로 약용 식물의 지용성 추출물이 암세포의 증식을 효과적으로 억제한다는 많은 보고[19,20,21,22]가 있고, 두충잎의 경우에도 석유에테르 추출물이 *in vitro*에서 사람의 결장암세포(HCT-116)의 증식을 억제한다고 알려져 있어 [23], 이를 근거로 비극성 용매를 사용하여 두충잎의 지용성 추출물을 얻고 생리활성을 확인하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 예비실험을 통해 항암 활성이 뛰어난 것으로 나타난 두충잎의 아세톤 추출물을 대상으로 암세포 증식억제 활성을 확인하였고, 이와 함께 페놀성 화합물 함량, 유리라디칼 소거능, 환원력 및 지질과산화 억제능을 확인함으로써 두충잎의 생리활성 소재로서의 용도 확대에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

두충잎 분말은 그린내추럴(Jindo, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), ferric ferricyanide, α -tocopherol 및 indole-3-carbinol은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 인체 비소세포암세포(human non-small cell lung cancer cell, A549), 결장암세포(human colon cancer cell, SNU-C4), 자궁경부암세포(human cervical cancer cell, HeLa) 및 인체 배아 폐 상피세포(human embryonic lung epithelial cell, L132)는 American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)의 세포주를 배양하여 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 HyClone (Logan, UT, USA)의 제품을, Cell Counting Kit-8 (CCK-8)은 Dojindo (Kumamoto, Japan)의 제품을 사용하였다.

아세톤 추출물 제조

두충잎 분말은 60°C에서 4시간 건조한 후 재분쇄하여 100–300 μ m 크기의 입자만을 시료로 사용하였다. 두충잎 분말에 10배 (w/w)의 아세톤을 넣고 항온진탕조(Jeio Tech, Daejeon, Korea)를 사용하여 상온에서 2시간 동안 추출하였다. 상온에서 원심 분리(2,000 \times g, 5분)하여 상정액을 얻고 60°C에서 아세톤을 증발시켜 두충잎 아세톤 추출물을 제조하였다.

총 페놀성 화합물 함량

두충잎 아세톤 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu reagent를 사용하여 측정하였다[24]. 두충잎 추출물에 Folin-Ciocalteu 시약을 부가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 10% Na_2CO_3 용액을 넣고 상온에서 1시간 정치시킨 후 725 nm

에서의 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent (GAE)/g-추출물로 나타내었다.

In vitro 항암 활성

두충잎 아세톤 추출물의 암세포 증식억제 활성은 CCK-8을 이용하여 측정하였다[25]. 두충잎 추출물을 에탄올에 용해한 뒤 배지에 희석하여 사용하였고, 이때 에탄올의 최종 농도가 0.1% (v/v)이 초과되지 않도록 하였다. 암세포(A549, SNU-C4, HeLa)와 정상세포(L132)는 5% FBS와 penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지에서 5% CO_2 , 37°C의 조건으로 24시간 배양하였다. 이후 배양액을 신선한 배지로 교체한 뒤 희석한 두충잎 추출물을 농도별로 처리하고 동일 조건에서 배양하였다. 양성대조군인 indol-3-carbinol을 농도별로 처리하여 암세포 증식억제 활성을 비교하였다. 24시간 후 실험군과 대조군의 배양액을 제거한 후 각각 CCK-8 용액과 serum-free RPMI-1640을 첨가하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다[20]. 암세포 증식억제 활성(%)은 (대조군의 흡광도-실험군의 흡광도)/대조군의 흡광도 \times 100으로 계산하였다.

In vitro 항산화 활성

두충잎 아세톤 추출물의 유리라디칼 소거활성은 DPPH를 사용하여 측정하였다[26]. 농도별로 희석한 두충잎 추출물에 0.15 mM DPPH 용액을 첨가하고 상온에서 30분 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리라디칼 소거활성(%)은 (무첨가군의 흡광도-첨가군의 흡광도)/무첨가군의 흡광도 \times 100으로 계산하였고, 양성대조군으로 α -tocopherol을 사용하였다.

두충잎 아세톤 추출물의 환원력은 ferric ferricyanide를 사용하여 측정하였다[27]. 농도별로 희석한 두충잎 추출물에 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 과 0.2 M 인산 완충용액(pH 6.6)을 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 용액을 가하고 2,000 \times g에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 얻어 0.1% FeCl_3 용액을 가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 흡광도 값으로 나타내었고, 양성대조군으로 α -tocopherol을 사용하였다.

두충잎 아세톤 추출물의 지질과산화 억제활성은 linoleic acid의 산화에 의해 생성되는 과산화물의 측정법으로 확인하였다[28]. 농도별로 희석한 두충잎 추출물에 2.52 mg/mL linoleic acid와 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 4.0 mL을 혼합하여 45°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 시료를 채취하여 30% ammonium thiocyanate와 함께 75% ethanol 용액에 혼합한 후 실온에서 5분간 정치시키고 20 mM ferrous chloride를 첨가하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 정도는 흡광도 값으로 나타내었고, 양성대조군으로 α -tocopherol을 사용하였다.

통계처리

두충잎 아세톤 추출물을 처리한 시료에 대해 t-test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 세 번의 반복실험을 통해 얻어진 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

두충잎 아세톤 추출물의 수율 및 총 페놀성 화합물 함량

두충잎을 아세톤으로 추출하여 얻어진 고형분의 수율은 1.13±0.033% (w/w)로 매우 낮게 나타났다(Table 1). 일반적으로 천연물을 비극성 용매로 추출하는 경우 당류, 무기질 및 단백질 등의 극성 분자들이 잘 추출되지 않아 수율이 낮아진다[22]. 인삼과 홍삼을 메탄올, 에탄올, 아세톤 및 n-헥산으로 추출하였을 때 수율이 20.78에서 0.41%까지 비극성 용매로 갈수록 급격하게 감소하였다[29]. 두충잎 아세톤 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 추출물 g당 36.7±1.96 mg GAE (Table 1)로 기존에 알려진 두충잎 물 추출물의 페놀성 화합물 함량인 75.8–110 mg GAE/g에 비해서 2배 이상 낮게 나타났다[30]. 이러한 결과는 극성 용매에서 페놀성 화합물의 추출이 잘 되고 비극성 용매로 갈수록 수율이 낮아진다는 보고와 같은 경향을 보여주었다[21,22].

두충잎 아세톤 추출물의 in vitro 항암 활성

사람의 비소세포폐암(A549), 결장암(SNU-C4) 및 자궁경부암(HeLa) 세포를 대상으로 두충잎 아세톤 추출물의 in vitro 항암 활성을 확인하였다[21,22]. 암세포 증식억제 활성의 양성대조군으로는 항암 효과를 가진 물질인 indole-3-carbinol을 사용하였고[31], 정상세포에 대한 독성을 확인하기 위해 사람의 배아 폐상피세포(L132)를 사용하였다[21,22]. 두충잎 아세톤 추출물은 농도의 증가에 비례하여 사람의 비소세포폐암세포(A549), 결장암세포(SNU-C4) 및 자궁경부암세포(HeLa)의 증식을 억제하였다(Fig. 1). 암세포의 증식을 절반 억제하는 농도인 GI₅₀값은 비소세포폐암세포(A549)에서 53.4 µg/mL였고, 결장암세포(SNU-C4)에서 53.8 µg/mL로 암세포 증식억제 효과가 매우 높았지만, 자궁경부암세포(HeLa)에 대해서는 88.3 µg/mL로 상대적으로 낮게 나타났다(Table 2). 양성대조군인 indole-3-carbinol의 암세포 증식억제에 대한 GI₅₀값은 비소세포폐암세포(A549)에서 52.4 µg/mL, 결장암세포(SNU-C4)에서 30.3 µg/mL 및 자궁경부암세포(HeLa)에서 64.7 µg/mL로 두충잎 추출물에 비해 낮았다(Table 2). 따라서 두충잎 아세톤 추출물의 암세포 증식억제 활성은 단일 성분인 indole-3-carbinol에 비해 다소 낮게 나타났으나 두충잎 추출물이 여러 성분이 섞여있는 혼합물인 점을 고려한다면 항암 활성이 우수하다고 볼 수 있다[22]. 사람의 비소세포폐암세포(A549)에 대한 GI₅₀값을 비교하였을 때, 인삼의 n-헥산 추출물은 20.0 µg/mL이었고(In 등, 2014), 유근피 아세톤 추출물은 74.3 µg/mL이었다[22]. 또한 12종의 중국산 약용 식물의 수

Table 1 Yield and total phenolic content of acetone extract of *Eucommia ulmoides* leaves

Yield (%)	Total phenolic content ²⁾ (mg GAE/g)
1.13±0.033 ¹⁾	36.7±1.96 ¹⁾

¹⁾Data represent means and SD of triplicate measurements

²⁾Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE)

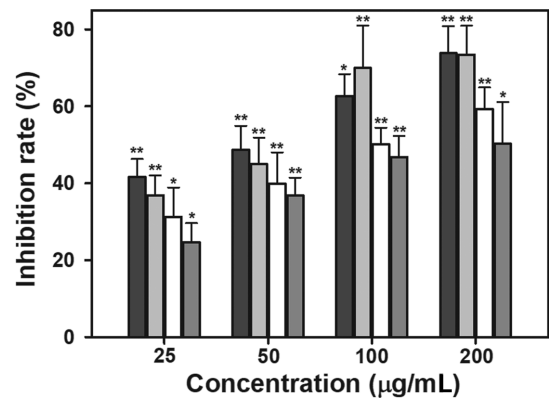


Fig. 1 Effects of acetone extract of *Eucommia ulmoides* leaves on human non-small cell lung cancer (A549, black bar), colon cancer (SNU-C4, gray bar), cervical cancer (HeLa, white bar), and embryonic lung epithelial (L132, dark gray bar) cells proliferation. Data were means and SD of triplicate measurements. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to the values for untreated control

용성 추출물들의 비소세포폐암세포(A549)에 대한 GI₅₀값은 161–1,456 µg/mL로 나타나[32], 두충잎 아세톤 추출물은 인삼의 지용성 추출물을 제외한 다른 천연 추출물들에 비해 상대적으로 우수한 in vitro 항암 활성을 가지고 있음을 보여주었다.

또한 두충잎 아세톤 추출물은 사람의 정상세포인 배아 폐 상피 세포(L132)에 대한 GI₅₀값이 153.9 µg/mL로 높게 나타나(Table 2), 정상 세포에 대한 독성이 상대적으로 낮으면서도 암세포에 대한 증식억제 활성이 우수함을 보여주었다. 식물로부터 얻어진 페놀성 화합물은 뛰어난 항암 활성을 가지고 있고[33], 페놀성 화합물의 항암 활성은 세포자살 유도, 세포주기 진행 억제, 신생혈관 생성 억제 및 전이 억제 작용에 의한 것으로 보고되었다[33,34]. 특히 페놀성 화합물 중 플라보노이드계 페놀화합물의 암세포 증식억제 활성이 우수하다고 알려져 있다[35]. 두충잎에는 뛰어난 항암활성을 가진 rutin과 quercetin이 플라보노이드계 페놀화합물의 주 성분을 이루고 있는데[30,36,37], 이들 중

Table 2 Inhibitory effect of acetone extract of *Eucommia ulmoides* leaves on cell growth

Human cell lines	GI ₅₀ values ¹⁾ (µg/mL)		
	<i>E. ulmoides</i> extract	Indole-3-carbinol ²⁾	
Cancer cell	Non-small cell lung cancer cell (A549)	53.4±2.33 ³⁾	52.4±4.49
	Colon cancer cell (SNU-C4)	53.8±16.1	30.3±7.00
	Cervical cancer cell (HeLa)	88.3±10.09	64.7±9.38
Normal cell	Embryonic lung epithelial cell (L132)	153.9±31.75	75.6±1.26

¹⁾GI₅₀ values represent the concentration of acetone extract that caused 50% growth inhibition of cells

²⁾Indole-3-carbinol was used as a positive control

³⁾Data represent means and SD of triplicate measurements

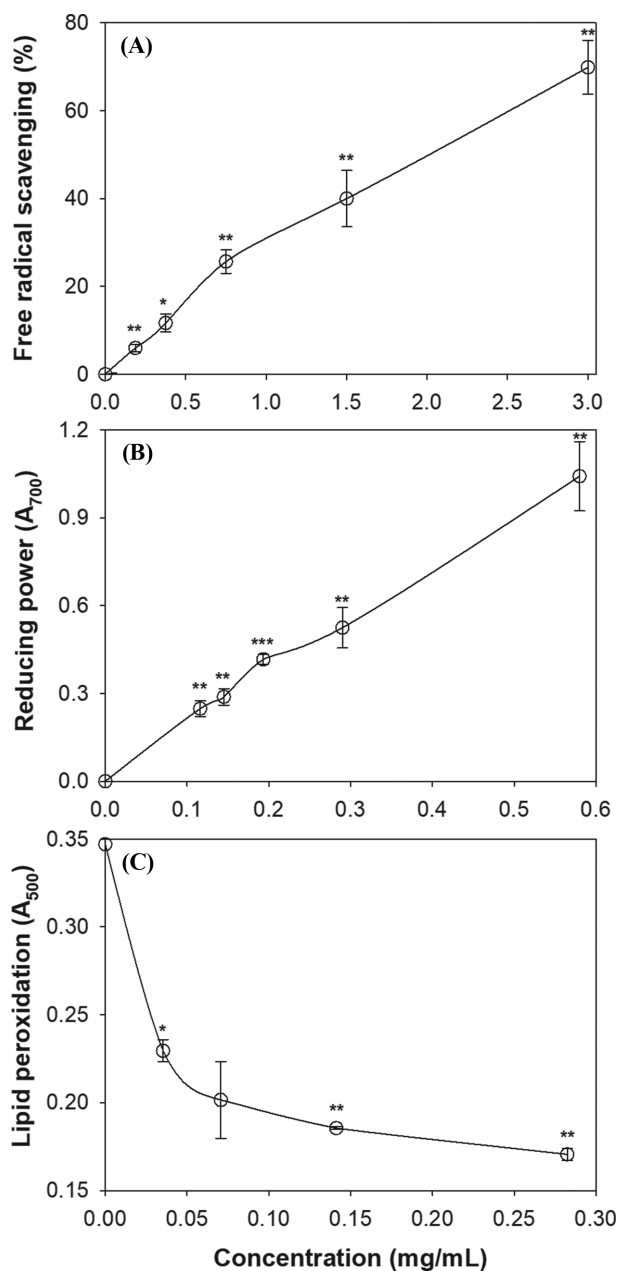


Fig. 2 *In vitro* antioxidant activities of acetone extract of *Eucommia ulmoides* leaves. (A) DPPH free radical scavenging activity, (B) Reducing power, (C) Lipid peroxidation inhibitory activity. Data were means and SD of triplicate measurements. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to the values for untreated control

물 보다는 유기용매에 잘 추출되는 소수성 페놀화합물인 quercetin 이 두충잎 아세톤 추출물의 압세포 증식억제에 크게 기여하는 것으로 사료된다[30,38].

두충잎 아세톤 추출물의 *in vitro* 항산화 활성

두충잎 아세톤 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 유리라디칼 소거활성, 환원력 및 지질과산화 억제활성을 측정하였고, 양성대조군으로 지용성의 천연 항산화제인 α -tocopherol을 사용

Table 3 Antioxidant effect of acetone extract of *Eucommia ulmoides* leaves

Antioxidant activity	EC ₅₀ values ¹⁾ (ig/mL)	
	<i>E. ulmoides</i> extract	α -tocopherol ²⁾
DPPH free radical scavenging activity	2,077.8±212.54 ³⁾	85.1±15.41
Reducing power	275.8±33.26	71.9±3.28
Lipid peroxidation inhibitory activity	257.9±27.54	126.7±16.20

¹⁾EC₅₀ values for free radical scavenging activity, reducing power, and lipid peroxidation inhibitory activity are expressed as the effective concentrations at which 50% of DPPH free radicals were scavenged, at which the absorbance is 0.5, and at which 50% of lipid peroxidation was inhibited, respectively

²⁾Alpha-tocopherol was used as a positive control

³⁾Data represent means and SD of triplicate measurements

하였다. 두충잎 아세톤 추출물의 DPPH 유리라디칼 소거활성은 농도에 비례하여 증가하였으나(Fig. 2A), DPPH 유리라디칼을 절반 소거하는 농도인 EC₅₀값이 ~2 mg/mL로 높게 나타나 소거 효과가 크지 않음을 알 수 있었다(Table 3). 두충잎 아세톤 추출물의 유리라디칼 소거에 대한 EC₅₀값은 양성대조군인 α -tocopherol의 EC₅₀값인 85.1 μ g/mL에 비해서 크게 높았고(Table 3), 다른 식물 추출물의 유리라디칼 소거에 대한 EC₅₀값과 비교 하여도 모시잎 에탄올 추출물의 688 μ g/mL [39], 곤드레잎의 물과 메탄올 추출물의 87.1–111.19 μ g/mL [40], 고구마잎 에탄올 추출물의 109–168 μ g/mL [41], 유근피 아세톤 추출물의 36.7 μ g/mL [22] 및 백연수잎 에탄올 추출물의 133.51 μ g/mL [42] 보다는 매우 높게 나타나 두충잎 아세톤 추출물의 유리라디칼에 대한 전자공여 능력은 낮은 것으로 확인되었다.

두충잎 아세톤 추출물의 환원력 역시 농도의존적으로 증가하였고(Fig. 2B), 반응액의 흡광도가 0.5일 때의 농도인 EC₅₀값은 275.8 μ g/mL이었다(Table 3). 두충잎 아세톤 추출물의 환원력에 대한 EC₅₀값은 양성대조군인 α -tocopherol의 71.9 μ g/mL에 비해 높았으나 두충잎 추출물이 혼합물인 점을 고려하면 우수한 환원력을 가지는 것으로 여겨진다(Table 3). 다른 식물 추출물의 환원력에 대한 EC₅₀값과 비교하였을 때 모시잎 에탄올 추출물의 44.39 μ g/mL [43]과 유근피 아세톤 추출물의 53.2 μ g/mL [22]에 비해서는 높았으나, 백연수잎 에탄올 추출물의 250 μ g/mL [42]과는 비슷하였고, 오디 아세톤 추출물의 746 μ g/mL [44], 복분자 아세톤 추출물의 871 μ g/mL [44] 및 자색고구마 에탄올 추출물의 236 μ g/mL [45]보다는 낮은 값을 가져 두충잎 아세톤 추출물의 환원력은 우수한 것으로 판단되었다.

두충잎 아세톤 추출물은 linoleic acid의 과산화를 농도의존적으로 억제하였고(Fig. 2C), 지질과산화를 절반 저해하는 농도인 EC₅₀값은 257.9 μ g/mL이었다(Table 3). 두충잎 아세톤 추출물의 지질과산화 억제에 대한 EC₅₀값은 양성대조군인 α -tocopherol의 126.7 μ g/mL에 비해 높았으나 역시 혼합물인 점을 고려하면 우수한 지질과산화 억제활성을 가지는 것으로 사료된다(Table 3). 백연수잎 에탄올 추출물의 경우 지질과산화 억제에 대한 EC₅₀값이 ~500 μ g/mL [42]인 것과 비교하여도 두충잎 추출물의 지질과산화 억제활성은 우수하였다. 두충잎 아세톤 추출물에 존재하는 비극성의 페놀성 화합물은 유리라디칼의 소거보다는 세포

막 지질의 산화적 손상을 억제하는데 효과적으로 여겨지며, 이는 두충잎의 플라보노이드계 페놀화합물의 주 성분인 quercetin이 유리라디칼 소거보다는 기름의 산화억제에 높은 상관관계를 가진다는 보고[30]와 유사성을 보여주었다.

이상의 결과에서 두충잎의 아세톤 추출물은 사람의 비소세포 폐암세포 및 결장암세포에 대한 뛰어난 증식억제 활성을 나타내었고, 환원력과 지질과산화 억제 능력이 우수하여 항암 및 항산화 소재로서의 활용가능성을 보여주었다.

초 록

두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)잎 아세톤 추출물의 *in vitro* 항암 및 항산화 활성을 조사하였다. 두충잎 아세톤 추출물의 수율은 1.13±0.033% (w/w)이었고, 총 페놀성 화합물 함량은 36.7±1.96 mg gallic acid equivalents/g-추출물로 나타났다. 세포증식을 절반 억제하는 추출물의 농도인 GI₅₀값은 사람의 암세포인 비소세포폐암세포(A549)에서 53.4 µg/mL, 결장암세포(SNU-C4)에서 53.8 µg/mL 및 자궁경부암세포(HeLa)에서 88.3 µg/mL이었고, 사람의 정상세포인 배아 폐 상피세포(L132)에서는 153.9 µg/mL로 나타났다. 두충잎 아세톤 추출물은 사람의 정상세포에는 낮은 독성을 나타내면서 농도에 비례하여 사람의 비소세포폐암세포(A549)와 결장암세포(SNU-C4)의 증식을 효과적으로 억제하였다. DPPH 유리라디칼을 절반 소거하는 추출물의 농도인 EC₅₀값은 2 mg/mL 정도로 높게 나타났고, 환원력의 EC₅₀값은 275.8 µg/mL, 지질과산화를 절반 저해하는 농도인 EC₅₀값은 257.9 µg/mL이었다. 유근피 아세톤 추출물은 농도에 비례하여 우수한 환원력 및 지질과산화 억제활성을 보여주었다.

Keywords 두충잎 · 아세톤 추출물 · 페놀성 화합물 · 항산화 · 항암

References

1. Kwan CY, Chen CX, Deyama T, Nishibe S (2003) Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action. *Vascul Pharmacol* 40: 229–235
2. Hong YK, Liu WJ, Li T, She SY (2013) Optimization of extraction of *Eucommia ulmoides* polysaccharides by response surface methodology. *Carbohydr Polym* 92: 1761–1766
3. He X, Wang J, Li M, Hao D, Yang Y, Zhang C, He R, Tao R (2014) *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol* 151: 78–92
4. Hussain T, Tan B, Oladele OA, Rahu N, Tossou MC, Yin Y (2016) Health-promoting properties of *Eucommia ulmoides*: a review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016: 5202908
5. Kulomaa A, Sirén H, Riekkola ML (1997) Identification of antioxidative compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. *J Chromatogr A* 781: 523–532
6. Greenway F, Liu Z, Yu Y, Gupta A (2011) A clinical trial testing the safety and efficacy of a standardized *Eucommia ulmoides* Oliver bark extract to treat hypertension. *Altern Med Rev* 16: 338–347
7. Choi MS, Jung UJ, Kim HJ, Do GM, Jeon SM, Kim MJ, Lee MK

- (2008) Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf extract mediates hypolipidemic action in hamsters fed a high-fat diet. *Am J Chin Med* 36: 81–93
8. Hirata T, Kobayashi T, Wada A, Ueda T, Fujikawa T, Miyashita H, Ikeda T, Tsukamoto S, Nohara T (2011) Anti-obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides*. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 1786–1791
9. Zhang R, Liu ZG, Li C, Hu SJ, Liu L, Wang JP, Mei QB (2009) Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *Bone* 45: 553–559
10. Kim BH, Park KS, Chang IM (2009) Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J Med Food* 12: 764–769
11. Tsai TH, Tsai TH, Wu WH, T JTP, Tsai PJ (2010) *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. *Food Chem* 119: 964–968
12. Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim SY, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY, Jang CG (2011) Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark on amyloid beta(25-35)-induced learning and memory impairments in mice. *Neurosci Lett* 487: 123–127
13. Jin CF, Li B, Lin SM, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ (2013) Mechanism of the inhibitory effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. cortex extracts (EUCE) in the CCl₄-induced acute liver lipid accumulation in rats. *Int J Endocrinol* 2013: 751854
14. Zhang Q, Su YQ, Yang FX, Peng JN, Li XH, Sun RC (2007) Antioxidative activity of water extracts from leaf, male flower, raw cortex and fruit of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Forest Products J* 57: 74–78
15. Yen GC, Hsieh CL (1998) Antioxidant activity of extracts from *Eucommia ulmoides* toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J Agric Food Chem* 46: 3952–3957
16. Park SA, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim DJ, Park HM, Park YB, Lee MK (2006) *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *J Med Food* 9: 474–479
17. Xu Z, Tang M, Li Y, Liu F, Li X, Dai R (2010) Antioxidant properties of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) extracts and their effects on color stability and lipid oxidation of raw pork patties. *J Agric Food Chem* 58: 7289–7296
18. Hsieh CL, Yen GC (2000) Antioxidant actions of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci* 66: 1387–1400
19. Yang SJ, Cho SH, Cho SI, Na WM (2007) Anti-proliferative effect of *Ulmi pumilae* cortex extracts on MCF-7 cells. *J Orient Obstet Gynecol* 20: 35–44
20. 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
21. 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
22. In MJ, Kim DC (2016) Anti-oxidative and anti-proliferative activities of acetone extract of the cortex of *Ulmus pumila* L. *J Appl Biol Chem* 59: 133–136
23. Kim JB, Park JR, Jeon JR, Cha MH (2001) Isolation and identification of anticancer compounds from *Eucommia ulmoides* leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 732–738
24. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243
25. 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
26. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200
27. Oyaizu M (1985) Studies on products of browning reaction: antioxidant

- activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 44: 307–315
28. Nakatani N, Kikuzaki H (1987) A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem* 51: 2727–2732
29. 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
30. Zhang Q, Su Y, Zhang J (2013) Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf. *Molecules* 18: 1857–1868
31. Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS (2008) Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett* 262: 153
32. 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
33. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M (2016) Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* 8: 552
34. Lamoral-Theys D, Pottier L, Dufresne 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
35. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM (2013) Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2821–2831
36. Dixit S (2014) Anticancer effect of rutin isolated from the methanolic extract of *Triticum aestivum* straw in mice. *Med Sci* 2: 153–160
37. Khan F, Niaz K, Maqbool F, Hassan FI, Abdollahi M, Venkata KCN, Nabavi SM, Bishayee A (2016) Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update. *Nutrients* 8: 529
38. Asgary S, Naderi GH, N Askari N (2005) Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol* 10: 88–90
39. 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: 383–390
40. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS, Jung HY (2011) Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 29–36
41. Li M, Jeong HS, Kim HS, Jang GY, Woo KS, Lee SH, Lee J, Sin HM (2012) Chemical compositions and antioxidant activities of leaves and stalks from different sweet potato cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1656–1662
42. Kim DC, In MJ (2017) Antioxidative ability of ethanol extract from the leaves of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *J Appl Biol Chem* 60: 185–190
43. Kim C, In MJ, Kim DC (2015) *In vitro* antioxidant activity of ethanol extract from *Boehmeria nivea* L. leaves. *Food Eng Prog* 19: 76–81
44. 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
45. Kim DC, Kim C, In MJ (2015) Antioxidant activities of extracts prepared from sweet potatoes with different flesh colors. *J Appl Biol Chem* 58: 21–24