

리기테다 소나무 솔방울의 항산화 활성 및 산화적 DNA 손상에 대한 억제 효과

최지수¹, 장태원², 민영실³, 이만효⁴, 박재호^{5*}

¹중원대학교 제약공학과 학생, ²안동대학교 생약자원학과 학생, ³중원대학교 제약공학과 교수, ⁴경북바이오산업연구원 팀장, ⁵*중원대학교 제약공학과 및 중원대학교 국제유기농산업연구소 교수

Antioxidant Activity and DNA Protective Effect against Oxidative Stress of *Pinus rigida* x *taeda* Cone

Jisoo Choi¹, Taewon Jang², Youngsil Min³, Manhyo Lee⁴, Jaeho Park^{5*}

¹Student, Dept. of Pharmaceutical Science, Jungwon University

²Student, Dept. of Medicinal Plant Resources, Andong National University

³Professor, Dept. of Pharmaceutical Science, JungWon University

⁴Team Leader, Hemp Promotion Project Team, Gyeongbuk Institute for Bio Industry

⁵Professor, Dept. of Pharmaceutical Science & Institute of International Agricultural Research, JungWon Univ.

요약 활성산소종이 DNA를 손상하고 암을 유발하는데 기인하는 것으로 밝혀지면서 활성산소를 제거하기 위한 항산화 물질 개발 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 리기테다 소나무 솔방울 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효과 및 산화적 스트레스에 의해 야기된 DNA 손상 보호 효과를 조사하기 위해 수행되었다. 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성, 환원력, Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 평가하였으며, 항산화 활성과 연관된 총 페놀 및 비타민 C의 함량도 분석하여 식물 화학물질을 확인하였다. 산화적 DNA 손상 억제 효과는 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 절단 분석법을 이용하여 측정하였다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성은 농도 의존적으로 나타났다. 환원력과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 200 μ g/ml에서 각각 $77.32 \pm 2.28\%$, $64.09 \pm 1.01\%$ 의 활성을 나타냈다. 또한, 리기테다 소나무 솔방울은 산화적 스트레스에 대한 plasmid DNA 보호 효과를 보였다.

주제어 : 리기테다 소나무 솔방울, 항산화, DPPH, ABTS, ϕ X-174 RF I plasmid DNA

Abstract Reactive oxygen species (ROS) damage DNA and cause cancer. Therefore, the research is being conducted on the development of antioxidants for the removal of ROS. This study was performed to investigate antioxidant activity and protective effect against oxidative DNA damage using ethyl acetate fractions from the cone of *Pinus rigida* x *taeda* (ERT). The antioxidant activity was evaluated using the DPPH, ABTS radical scavenging assay, reducing power assay, and Fe²⁺ chelating assay. Also, the contents of phenolic compounds and vitamin C related to antioxidant activity were analyzed to confirm phytochemicals. The DNA protective effect against oxidative stress was confirmed by the ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay. As a result, ERT showed DPPH and ABTS radical scavenging activities in a concentration-dependent manner. The results of reducing power and Fe²⁺ chelating activities were $77.32 \pm 2.28\%$ and $64.09 \pm 1.01\%$ at 200 μ g/ml. Also, ERT showed a DNA protective effect against oxidative stress.

Key Words : Cone of *Pinus rigida* x *taeda*, Antioxidant, DPPH, ABTS, plasmid DNA

*Corresponding Author : Jae-Ho Park(parkjh@jwu.ac.kr)

Received September 9, 2020

Revised October 6, 2020

Accepted November 20, 2020

Published November 28, 2020

1. 서론

인체에는 산화 촉진물질과 산화 억제물질이 균형을 이루고 있지만 음주, 흡연, 환경오염 등의 여러 가지 요인에 의해 균형이 무너지게 되면 인체는 산화적 스트레스에 노출된다. [1,2]. 인체 내 대사과정 중에 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 산화적 스트레스가 발생되며, 활성산소종은 반응성이 강하여 지질, 단백질 및 핵산 등을 손상 시킬 수 있다. 이로 인하여 인체의 세포와 조직의 손상을 유발하여 노화 및 암 등 다양한 질병을 초래할 수 있다. [3,4]. 또한, 활성산소종은 DNA를 손상시켜 세포사멸을 유도하고 암을 유발하는 종양 promotor로서 작용한다는 것이 밝혀졌다 [5,6]. 그러므로 인체의 손상을 보호하기 위한 활성산소종의 제거는 매우 중요하며 인체에 부작용이 없으면서 항산화 효능을 가진 천연자원 소재를 찾기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [7-9]. 천연자원에서 얻을 수 있는 항산화 물질은 식물이 자외선, 해충, 독소 등 외부환경으로부터 보호하기 위해 생산하는 화학물질인 phytochemical로 phenolic 및 flavonoid 계통의 화합물이 대표적이다. 이 물질들은 활성산소종과 화학적인 연쇄반응을 통해 수소를 공여하여 라디칼을 안정화시켜 제거함으로써 체내 활성산소 제거에 도움을 주는 것으로 알려져 있다 [10,11]. 소나무과에 속하는 리기테다 소나무 (*Pinus rigida x taeda*)는 형질 및 생장이 좋지 않은 리기다 소나무를 테다 소나무와 교잡을 통해 개량한 소나무이며, 소나무과 식물은 항산화 및 항염증에 효과가 있다고 알려진 다양한 페놀 화합물과 camphene, α -pinene, β -pinene 등의 terpene계의 정유 성분들을 함유하는 것으로 보고되었다 [12-14].

최근 적송 소나무 솔방울의 항산화 활성 및 항균효능, 잣나무 솔방울에서 추출한 phytoncide의 항염증 효과가 보고됨에 따라 솔방울의 생리활성 관한 연구적 가치가 증가하고 있다 [15-17]. 현재까지 리기테다 소나무의 생리활성에 관한 연구로는 수피의 항산화 활성 및 proanthocyanidin 함량 분석에 대한 연구가 진행되었으며 [18], 본 연구에서는 리기테다 소나무 솔방울 에틸아세테이트 분획물(ERT)의 항산화 활성 및 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 억제 활성을 확인하고자 한다.

2. 연구방법

2.1 실험재료

본 연구에 사용된 리기테다 소나무 (*Pinus rigida x taeda*) 솔방울은 국립산림품종관리센터에서 제공받아 시료로 사용하였다.

본 연구에 사용된 ethanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, ethyl acetate 및 petroleum ether는 SK chemicals (HPLC grade, Korea) 제품을 사용하였으며, 나머지 시약은 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약 및 기기는 별도 표기하였다.

2.2 실험 시료 추출 및 분획

실험에 사용된 리기테다 솔방울은 분쇄한 건조 시료 50.0 g을 80% methanol 3 l로 72시간 침지한 후 그 잔여물을 여과하였다. methanol 추출물은 rotary evaporator (N-1110S, Eyela, Japan)로 40°C에서 농축한 후, 분별 깔대기를 이용하여 petroleum ether, ethyl acetate 순서로 3회 이상 반복하여 분획하였다. 리기테다 솔방울 ethyl acetate 분획층을 rotary evaporator로 농축하여 -27°C에 보관하였고, 실험 전에 DMSO에 용해하여 사용하였다.

2.3 항산화활성

2.3.1 DPPH 라디칼에 대한 소거 활성

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거 활성은 Bondet 방법을 참고하여 측정하였다 [12]. DPPH solution은 300 μ M DPPH를 515 mm의 흡광도에서 1.00이 되도록 ethanol을 이용하여 제조하였다. DPPH solution 760 μ l와 농도별 추출물 (0.32, 1.6, 8, 40, 200 μ g/ml) 40 μ l를 혼합하여 37°C에서 20분 반응시키고, UV/Visible 분광 광도계 (Human Cop, Xma-3000PC, Seoul, Korea)로 515 mm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성은 DMSO를 처리한 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 소거 활성은 다음 계산 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

2.3.2 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성

시료의 ABTS 라디칼 소거 활성은 Van den Berg 등의 방법을 참고하여 측정하였다 [13]. ABTS solution은 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (2,2'-azino-bis)를 혼합하여 24시간 동안 형성시킨 ABTS⁺을 734 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 증류수로 희석하였다. ABTS solution을 760 μ l와 농도별 추출물 40 μ l를 혼합한 후 20분간 37°C에서 반응시켜, UV/Visible 분광 광도계로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성은 DMSO를 처리한 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성은 다음 계산식으로 %를 구하였다.

소거 활성(%) = {1-(추출물 첨가구의 흡광도/추출물 무첨가구의 흡광도)} \times 100

2.3.3 환원력 평가

환원력은 Oyaizu의 방법을 참고하여 측정하였다 [14]. 농도별 추출액 100 μ l에 1% potassium hexacyanoferrate (III) 250 μ l와 동량의 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.6)를 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시켰다. 이 혼합물을 4°C에서 5분간 냉각하고 trichloroacetic acid (TCA) 250 μ l과 혼합하였다. 위 혼합액을 2000 g에서 5분간 원심 분리 하한 상등액 400 μ l에 동량의 증류수와 0.10% ferric chloride 16 μ l를 첨가한 혼합물을 UV/Visible 분광 광도계로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.4 Fe²⁺ 킬레이팅 활성

시료의 Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 확인하기 위해 Hus 방법을 참고하여 실험하였다 [15]. 1 mM FeCl₂ 40 μ l와 농도별 추출물 40 μ l에 증류수 700 μ l를 첨가하여 약 30초간 반응하였다. 이 반응물에 5 mM ferrozine 40 μ l를 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하고 UV/Visible 분광 광도계로 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe²⁺ 킬레이팅의 활성(%)은 다음과 같은 식으로 구하였다.

Fe²⁺ 킬레이팅 활성(%) = {1-(추출물 첨가구의 흡광도/추출물 무첨가구의 흡광도)} \times 100

2.4 총 페놀성 화합물 및 비타민 C 분석

2.4.1 총 페놀성 화합물 분석

Folin-Denis 방법을 참고하여 총 페놀성 화합물을 분석하였다 [16]. 건조된 리기테다 소나무 솔방울 시료 1 g에 1% acetic acid/diethyl ether 혼합액 100 ml를 혼합하여 5분간 추출 후 상등액을 제거하였다. 잔여 물에 70% acetone을 첨가하여 50 ml로 정용한 뒤, 2시간 동안 교반 추출하였다. 여과한 상등액을 70% acetone으로 50 ml 정용하였다. 추출물 50 μ l와 증류수 950 μ l 및 folin 500 μ l를 혼합한 후, 20% sodium carbonate 2.5 ml를 넣고 40분간 실온에서 정치시켰다. 상등액을 UV/Visible 분광 광도계로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 표준품으로 하여 정량 직선 방정식을 사용하여 정량하였다.

2.4.2 비타민C 함량 분석

비타민C 함량 분석은 Jagot and Dani의 방법을 참고하여 분석하였다 [17]. 건조 시료 0.5 g를 10 ml 증류수에 혼합하여, 4500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 추출하였다. 여과한 추출물 200 μ l와 trichloroacetic acid (TCA) 800 μ l를 혼합하여 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상등액 500 μ l, 증류수 1.5 ml 및 Folin 200 μ l를 혼합하여 10분간 상온에서 반응시키고, UV/Visible spectrophotometer로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid (LAA)를 표준품으로 하여 정량 직선 방정식을 사용하여 정량하였다.

2.5 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

2.5.1 Ferric chloride (FeCl₂)을 통한 산화적 스트레스 농도별 추출액 40 μ l와 2.5 mM FeCl₂ 60 μ l와 증류수 700 μ l를 혼합하여 37°C에서 15분 반응하였다. 혼합액 20 μ l와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l를 혼합하여 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합하여 1% agarose gel로 전기영동하였다. 전기영동된 DNA band를 ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 사진 촬영하였다. Band의 density는 imageJ software 1.51K (National Institutes of Health)를 이용하여 분석하였다.

2.5.2 Ferrous sulfate(FeSO_4)을 통한 산화적 스트레스
1.5 mM FeSO_4 와 1.5 mM hydrogen peroxide (H_2O_2)를 1:1로 혼합한 용액 760 μl 을 농도별 추출액 40 μl 과 혼합하여 37°C에서 15분간 반응하였다. 혼합액 20 μl 와 $\phi\text{X-174 RF I}$ plasmid DNA 5 μl 를 혼합하여 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합하여 1% agarose gel로 전기영동하였다. 전기영동된 DNA band를 ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 사진 촬영하였다. Band의 density는 imageJ software 1.51K (National Institutes of Health)를 이용하여 분석하였다.

2.6 통계학적 분석

모든 결과는 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.)을 사용하여 분석되었으며 평균 \pm 표준 편차로 표시하였다. 모든 실험은 3 회 이상 수행되었으며 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석한 다음 Tukey의 사후 검정을 사용하여 여러 그룹의 평균을 비교했습니다. 그룹 간 비교는 student's t-test를 통해 유의성을 나타내었다.

3. 연구 결과 및 고찰

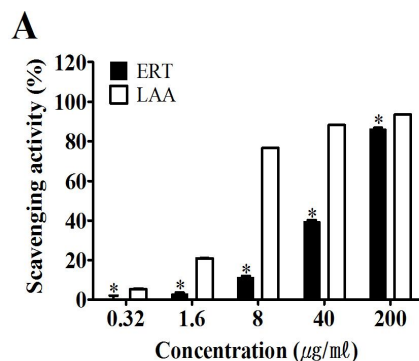
3.1 항산화 활성

활성산소종은 인체 내 대사과정으로 생성되는데, 이러한 활성산소종은 높은 반응성을 가진다. 이러한 특성에 의해 단백질 분해, 지질 과산화 및 DNA 손상 등에 이르는 산화적 스트레스를 일으켜 염증, 암 및 노화를 일으킨다 [25, 26]. 따라서 산화적 스트레스로부터 방어하기 위한 활성산소종의 경감은 매우 중요하다. 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성을 측정하였으며, 높은 항산화 활성을 나타내는 L-ascorbic acid를 대조군으로 사용하였다 [27,28]. ERT의 DPPH 라디칼 소거 활성은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $86.12 \pm 1.05\%$ 로 나타났으며 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig 1A). IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) 값은 43.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타났으며 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. ERT의 ABTS 라디칼 소거활성은 농도 의존적으로 증가하였으며 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $88.59 \pm 2.67\%$ 로 나타났다 (Fig 1B). 특히, 1.6, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군

으로 사용된 L-ascorbic acid보다 높은 소거활성을 나타냈다. IC_{50} 값은 10.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 L-ascorbic acid (10.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 비교하였을 때 유사한 소거활성을 나타냈다. DPPH와 ABTS 소거활성은 유의적인 상관관계를 갖지만 DPPH는 free 라디칼이고 ABTS는 cation 라디칼로 항산화 물질에 따라 반응에 차이가 있다 [29, 30]. L-ascorbic acid와 소거 활성을 비교하였을 때 ERT는 ABTS 라디칼에서 소거능이 더 효과적인 것으로 확인되었다.

환원력 평가는 항산화 활성을 가진 물질이 전자를 환원시킴으로써 노란색의 화합물이 청색으로 전환되는 기작으로 항산화 활성을 측정하는 지표로 이용된다. L-ascorbic acid (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 환원력을 100%로 하였을 때 ERT의 환원력은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $77.32 \pm 2.28\%$ 의 활성을 나타냈으며 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 1C).

생체 내의 생리 과정에서 철 (Iron, Fe)이온의 과잉은 hydrogen peroxide와의 Fenton 반응을 일으키고 이로 인해 hydroxyl 라디칼이 생성된다. Hydroxyl 라디칼은 산화적 스트레스를 유발하여 DNA 손상시키고 세포 노화, 세포 사멸의 원인이 된다 [31,32]. Fe^{2+} 킬레이팅 활성은 Fe^{2+} 와 ferrozine이 결합하면 붉은색을 띠게 되는데, Fe^{2+} 에 대해 킬레이팅 효과를 가진 물질이 존재하면 Fe^{2+} - ferrozine 복합체의 형성을 방해하여, 결과적으로 발색이 저해되고 그 흡광도를 측정하여 킬레이팅 효과를 확인한다 [33]. 대조군은 철 이온이 과다 축적된 환자에게 사용되는 deferoxamine을 이용하여 분석하였다 [34]. ERT의 Fe^{2+} 킬레이팅 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군 deferoxamine ($95.5 \pm 0.08\%$)과 비교하여 ERT는 $64.09 \pm 1.01\%$ 의 활성을 나타냈다 (Fig. 1D).



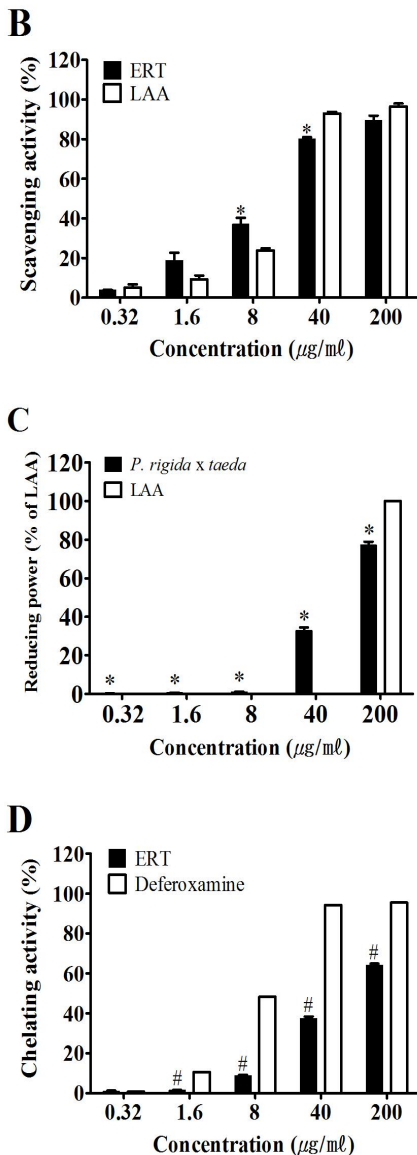


Fig 1. DPPH radical scavenging assay (A), ABTS radical scavenging assay (B), Reducing power assay (C), and Fe²⁺ chelating assay (D) of ethyl acetate fractions from Cone of *Pinus rigida x taeda*. Values are expressed as the means±SD of three independent experiments. *p<0.05 vs. L-ascorbic acid. #p<0.05 vs. deferoxamine. ERT : Ethyl acetate fraction from the cone of *Pinus rigida x taeda*. LAA : L-ascorbic acid.

3.2 총 페놀성 화합물 및 비타민C 함량 분석

식물은 페놀, 페놀산, 플라보노이드 같은 폴리페놀 화합물이 함유되어있어 phenolic hydroxyl기가 수소를 공여하거나 페놀 고리 구조의 공명 안정화를 일으켜 항산화 활성을 나타낸다 [22]. 그러므로 페놀 화합물은 항산화, 항균 및 항암 활성 등의 생리활성과 연관성이 있으며 페놀 화합물 함량이 높을수록 항산화 효과도 증가하는 경향을 나타낸다 [36, 37]. 총 페놀성 화합물 함량은 tannin acid를 표준 곡선으로 이용하여 측정하였으며, tannin acid의 표준 곡선은 $y = 0.0127x + 0.1012$ 로 나타났다. 이를 통해 ERT의 총 페놀성 화합물 함량은 10.81 ± 0.79 mg/g으로 분석되었다. 비타민 C 함량은 L-ascorbic acid를 표준 곡선으로 이용하였으며, ERT의 비타민 C 함량은 0.26 ± 0.04 mg/g으로 분석되었다. 이전 연구에 따르면, 강한 항산화 활성을 나타내는 미선나무의 페놀성 화합물 및 비타민 C의 함량이 17.03 ± 0.3 mg/g, 5.35 ± 0.19 mg/g로 보고 되었으므로 그 상관관계가 매우 밀접하다고 보인다 [38].

Table 1. Total phenolic compounds and Vitamin C content of ERT.

Sample	Total phenolic compounds (mg/g)	Vitamin C (mg/g)
ERT	10.81 ± 0.79	0.26 ± 0.04

Values are expressed as the means±SD of three independent experiments. ERT : Ethyl acetate fraction from the cone of *Pinus rigida x taeda*.

3.3 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 억제 활성

산화적 스트레스로 인한 DNA의 손상은 정상 세포에 돌연변이를 일으켜 발암 개시점으로 작용하기 때문에 DNA의 산화적 손상 억제력은 중요하다 [39]. ϕ X-174 RF I plasmid DNA를 이용한 산화적 스트레스에 대한 손상 억제 활성은 Jung 방법으로 평가하였으며, Fenton 반응으로 생성된 hydroxyl 라디칼 또는 철 이온으로 인하여 손상을 받으면 plasmid DNA는 supercoiled (S.C) 형태에서 open-circular (O.C) 형태로 전환된다 [40]. 무처리 대조군 (lane 1)의 S.C band density를 100%로 하였을 때, Fe²⁺와 hydroxyl 라디칼 처리군에서는 DNA 분절로 인해 O.C형태로 전환된 것이 확인되었다. 이러한 조건에서 ERT는 산화적 손상을 억제하여 O.C형태로의 전환을 저해하였다 (Fig

2A). 특히 ERT 농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 금속 킬레이팅 작용에서는 $48.34 \pm 0.46\%$ 의 억제 활성을 나타냈었으나 hydroxyl 라디칼에서는 $94.7 \pm 2.29\%$ 의 억제 활성을 나타낸 것으로 보아 hydroxyl 라디칼에 대한 소거 활성이 더 효과적인 것으로 확인되었다 (Fig. 2B). 이는 hydroxyl 라디칼을 제거하는 물질과 금속이온을 제거하는 물질이 다르기 때문이며 [41], hydroxyl 라디칼 소거 활성에 비해 금속이온을 킬레이팅 할 수 있는 물질의 함량이 낮은 것으로 추정된다.

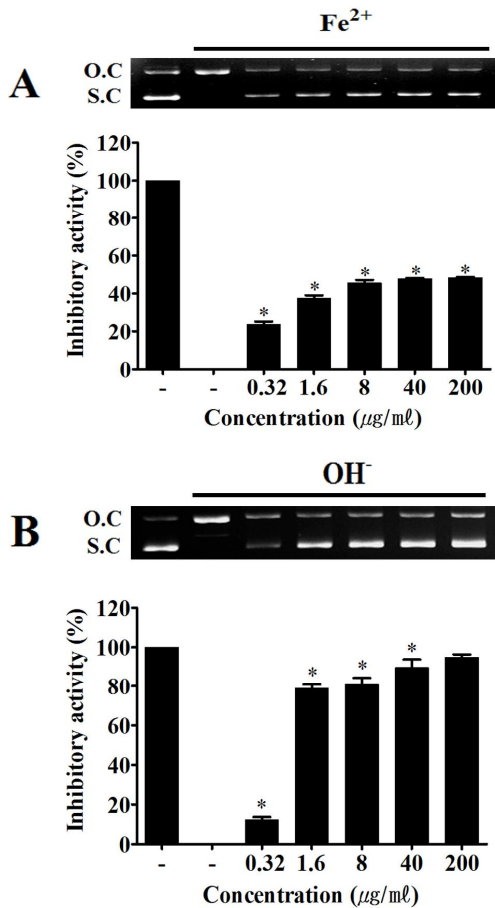


Fig 2. Protective effect of ERT on oxidative DNA damage using $\phi\text{X-174}$ RF I plasmid DNA. (A) Fe^{2+} ion DNA damage. (B) OH^{\cdot} radical DNA damage. Values are expressed as means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ as compared with the non-treated control. O.C: Open circular; S.C: Super-coiled

4. 결론

본 연구는 리기테다 소나무 솔방울의 항산화 활성 및 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 억제 활성을 평가하기 위해 수행되었다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 $86.12 \pm 1.05\%$, $88.59 \pm 2.67\%$ 의 활성을 나타냈으며, 특히 ABTS 라디칼 소거 활성 IC_{50} 값은 대조군 L-ascorbic acid (10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 비교하여 10.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 높은 소거 활성을 나타냈다. 환원력과 Fe^{2+} 킬레이팅 활성은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 $77.32 \pm 2.28\%$, $64.09 \pm 1.01\%$ 의 활성을 나타냈으며, 페놀성 화합물은 10.81 ± 0.79 mg/g, 비타민 C의 함량은 0.26 ± 0.04 mg/g으로 분석되었다. 또한, hydroxyl 라디칼에 의한 plasmid DNA의 손상 억제 효과는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 94.7%로 높은 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 결과적으로, 본 연구를 통하여 리기테다 소나무 솔방울은 페놀성 화합물을 함유하고 있어 높은 항산화 활성을 나타냈으며, 산화적 스트레스를 유발하는 hydroxyl 라디칼을 소거함으로써 DNA손상에 대해 높은 억제 활성을 나타낸 것을 확인하였다.

REFERENCES

- [1] S. D. Aust, C. F. Chignell, T. M. Bray, B. Kalyanaraman & R. P. Mason. (1993). Free radicals in toxicology. *Toxicology and applied pharmacology*, 120(2), 168-178. DOI : 10.1006/taap.1993.1100
- [2] S. J. Stohs. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 6(3-4), 205-228. DOI : 10.1515/JBCPP.1995.6.3-4.205
- [3] L. J. Marnett. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370. DOI : 10.1093/carcin/21.3.361
- [4] S. R. Maxwell. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49(3), 345-361. DOI : 10.2165/00003495-199549030-00003
- [5] A. N. T. Kong et al. (2001). Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 231-241. DOI : 10.1016/S0027-5107(01)00182-8
- [6] H. Wiseman & B. Halliwell. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species:

- role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(1), 17-29.
DOI : 10.1042/bj3130017
- [7] S. J. Jenog, J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee & N. I. Baeg. (2004). Natural Products, Organic Chemistry ; Screening for Antioxidant Activity of Plant Medicinal Extracts. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 47(1), 135-140.
- [8] H. O. Boo, S. J. Hwang, C. S. Bae, S. H. Park & W. S. Song. (2011). Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Korean Journal of Plant Resources*, 24(1), 105-112.
DOI : 10.7732/kjpr.2011.24.1.105
- [9] B. C. Cha & E. H. Lee. (2007). Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 38(1), 31-36.
- [10] M. Asensi, A. Ortega, S. Mena, F. Feddi & J. M. Estrela. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(5-6), 197-216.
DOI : 10.3109/10408363.2011.631268
- [11] Y. S. Lee, E. Y. Joo & N. W. Kim. (2006). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 35(10), 1309-1314.
DOI : 10.3746/jkfn.2006.35.10.1309
- [12] B. S. An et al. (2013). Anti-inflammatory effects of essential oils from *Chamaecyparis obtusa* via the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Molecular medicine reports*, 8(1), 255-259.
DOI : 10.3892/mmr.2013.1459
- [13] J. H. Kuk, S. J. Ma & K. H. Park. (1997). Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 29(2), 204-210.
- [14] A. Otto, B. R. Simoneit & V. Wilde. (2007). Terpenoids as chemosystematic markers in selected fossil and extant species of pine (*Pinus*, Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154(1), 129-140.
DOI : 10.1111/j.1095-8339.2007.00638.x
- [15] T. W. Jang, S. H. Nam & J. H. Park. (2016). Antioxidant activity and inhibitory effect on oxidative DNA damage of ethyl acetate fractions extracted from cone of red pine (*Pinus densiflora*). *Korean Journal of Plant Resources*, 29(2), 163-170.
DOI : 10.7732/kjpr.2016.29.2.163
- [16] K. H. Jeong et al. (2014). Anti-bacterial effects of aqueous extract purified from the immature cone of red pine (*Pinus densiflora*). *Textile Coloration and Finishing*, 26(1), 45-52.
DOI : 10.5764/TCF.2014.26.1.45
- [17] S. Kang et al. (2016). Phytoncide extracted from pinecone decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol*, 26(3), 579-87.
DOI : 10.4014/jmb.1510.10070
- [18] C. S. Ku, J. P. Jang & Mun, S. P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science*, 53(6), 524-528.
DOI : 10.1007/s10086-007-0896-6
- [19] V. Bondet, W. Brand-Williams & C. Berset. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 609-615.
- [20] R. Van den Berg, G.R. Haenen, H. Van den Berg & A. Bast. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517.
DOI : 10.1016/S0308-8146(99)00089-8
- [21] M. Oyaizu. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
DOI : 10.5264/eiyogakuzashi.44.307
- [22] B. Hus, I. M. Coupar & K. Ng. (2006). Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm. *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*, 98(2), 317-328.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2005.05.077
- [23] AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Washington DC. Association of Official Analytical Chemists.
- [24] S. K. Jagota & H. M. Dani. (1982). A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Analytical biochemistry*, 127(1), 178-182.
DOI : 10.1016/0003-2697(82)90162-2
- [25] H. E. Seifried, D. E. Anderson, E. I. Fisher & J. A. Milner. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(9), 567-579.
DOI : 10.1016/j.jnutbio.2006.10.007
- [26] K. S. Kasprzak. (1995). Possible role of oxidative

- damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer investigation*, 13(4), 411-430.
DOI : 10.3109/07357909509031921
- [27] M. Lu, B. Yuan, M. Zeng & J. Chen. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44(2), 530-536.
DOI : 10.1016/j.foodres.2010.10.055
- [28] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, & D. H. Byrne. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.
DOI : 10.1016/j.jfca.2006.01.003
- [29] M. Y. Lee, M. S. Yoo, Y. J. Whang, Y. J. Jin, M. H. Hong & Y. H. Pyo. (2012). Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 44(5), 540-544.
DOI : 10.9721/KJFST.2012.44.5.540
- [30] S. Meir, J. Kanner, B. Akiri & S. Philosoph-Hadas. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(7), 1813-1819.
DOI : 10.1021/jf00055a012
- [31] S. Sakanaka, Y. Tachibana & Y. Okada. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food chemistry*, 89(4), 569-575.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2004.03.013
- [32] S. J. Stohs & D. Bagchi. (1995). Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med* 18(2), 321-336.
DOI : 10.1016/0891-5849(94)00159-H
- [33] X. Huang, J. Dai, J. Fournier, A. M. Ali, Q. Zhang & K. Frenkel. (2002). Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(1), 84-92.
DOI : 10.1016/S0891-5849(01)00770-5
- [34] T. Tanaka, N. Muto, Y. Ido, N. Itoh & K. Tanaka. (1997). Induction of embryonal carcinoma cell differentiation by deferoxamine, a potent therapeutic iron chelator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1357(1), 91-97.
DOI : 10.1016/S0167-4889(97)00016-5
- [35] A. Ardestani & R. Yazdanparast. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. *Food chemistry*, 104(1), 21-29.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2006.10.066
- [36] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliiger, & O. I. Aruoma. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
DOI : 10.1016/0278-6915(95)00024-V
- [37] C. Rice-Evans, N. Miller & G. Paganga. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
DOI : 10.1016/S1360-1385(97)01018-2
- [38] T. W. Jang, & J. H. Park. (2017). Antioxidative activities and whitening effects of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum*. *Journal of Life Science*, 27(5), 536-544.
DOI : 10.5352/JLS.2017.27.5.536
- [39] J. E. Klaunig et al. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, 106(suppl 1), 289-295.
DOI : 10.1289/ehp.98106s1289
- [40] Y. J. Jung, & Y. J. Surh. (2001). Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(12), 1407-1417.
DOI : 10.1016/S0891-5849(01)00548-2
- [41] E. Graf & J. W. Eaton. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 61-69.
DOI : 10.1016/0891-5849(90)90146-A

최 지 수(Jisoo Choi)

[정회원]



- 2018년 2월 : 중원대학교 생약자원 개발학과 (이학사)
- 2020년 2월 : 중원대학교 생약자원 개발학과 (이학석사)
- 관심분야 : 세포생물학, 분자생물학, 분석화학
- E-Mail : bryant511@naver.com

장 태 원(Taewon Jang)

[정회원]



- 2015년 2월 : 중원대학교 생약자원 개발학과 (이학사)
- 2017년 2월 : 중원대학교 생약자원 개발학과 (이학석사)
- 2017년 9월 ~ 현재 : 안동대학교 생약자원학 박사과정

- 관심분야 : 세포생물학, 분자생물학, 분석화학
- E-Mail : jtw2111@hanmail.net

민 영 실(Young Sil Min)

[정회원]



- 1992년 2월 : 중앙대학교 (약학사)
- 2001년 2월: 중앙대학교 (약학석사)
- 2004년 2월: 중앙대학교 (약학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 중원대학교 제약공학과 조교수

- 관심분야 : 건강, 운동, 생리활성물질, 식생활
- E-Mail : youngsil31@jwu.ac.kr

이 만 효 (Manhyo Lee)

[정회원]



- 1999년 2월 : 경남대학교 식품공학 (공학사)
- 2001년 2월 : 경남대학교 식품미생물학 (공학석사)
- 2004년 8월 : 경남대학교 식품생명공학 (공학박사)

- 2005년 1월 ~ 현재 : 경북바이오산업연구원 팀장(책임연구원)
- 관심분야 : 발효공학, 천연물소재학
- E-Mail : manhyo@hanmail.net

박 재 호(Jaeho Park)

[정회원]



- 1998년 2월 : 안동대학교 자원식물학과(농학사)
- 2000년 2월 : 안동대학교 생물학과 (이학석사)
- 2004년 2월 : 안동대학교 생물학과 (이학박사)
- 2010년 3월 ~ 현재 : 중원대학교 제약공학과 교수

- 관심분야 : 약용식물학, 천연물소재학
- E-Mail : parkjh@jwu.ac.kr