

참외추출물이 스코폴라민 유도 기억상실 흰쥐의 인지능 회복에 미치는 효과

박상신 · 박나오미 · 강주익 · 신석철 · 이동웅*

동국대학교 경주캠퍼스 과학기술대학 바이오학부

Received March 26, 2009 / Accepted May 12, 2009

Cognition Enhancing Effect of Muskmelon (*Cucumis melo*) Extracts on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice. Sang-Shin Park, Naomi Park, Ju-Uk Kang, Suk-Chul Shin and Dong-Ung Lee*. *Division of Bioscience, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea* - The methanol extract of muskmelon (*Cucumis melo*) has been investigated for its cognition enhancing effects by evaluation of inhibitory activities on acetylcholinesterase, a degrading enzyme of acetylcholine, a brain neurotransmitter, and β -secretase, which forms the β -amyloid toxic protein from its precursor protein. A passive avoidance task, one of the animal model experiments for learning and memory, was also performed. As a result, the melon extract showed 15.8% and 35.3% inhibition on acetylcholinesterase and β -secretase, respectively, with a final concentration of 100 mg/ml. In the animal model test, melon extract significantly ($p < 0.05$) lengthened the step-through latency time by 22.7% compared to the control group, suggesting that melon extract has, indeed, an effect on cognition enhancement.

Key words : *Cucumis melo*, cognition, acetylcholinesterase, β -secretase, passive avoidance task

서 론

참외(*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino)는 박과(cucurbitaceae)에 속하는 식물로서 인도 및 아프리카 원산의 일년생 덩굴성 초본이다. 꽃은 6-7월에 피고 한꽃에 암술과 수술이 모두 들어있는 양성화이다. 참외의 익은 열매는 식용으로 하며 생약으로서의 동의보감에 과체(瓜蒂, 꼭지)를 부종, 황달 등에 처방하고, 첩과자(覬瓜子, 씨)를 위장병 등에 사용한다고 기록되어 있다. 참외의 과육에 대해서는 동의보감에 煩熱을 除하며 소변을 利하게 하고 입과 귀의 부스럼을 다스린다고 되어 있다. 한편, 실험적으로 검증된 참외추출물 또는 주요 성분인 cucurbitacin류의 효능으로는, 급성 간독성[24]이나 만성 간염[8]에 대한 간보호효과, 알코올성 간손상에 의한 황달 치료효과[21], 간암[8]을 비롯한 항암효과[20]와 항돌연변이효과[10], 면역증강효과[9], 이노효과[18], 항산화활성 및 항미생물활성[15], tyrosinase 저해활성[16] 및 trypsin 저해활성[6] 등의 다양한 효능이 보고되어 있으나 아직 본 연구와 관련된 기억증진효과에 관한 보고는 없다.

참외의 성분으로는 cucurbitacin B와 E [2], 휘발성 향기성분[5], 페놀류[17] 및 flavonoid 류[16] 등이 알려져 있다.

기억은 경험을 유지하고 어떤 방법으로 이것을 재현하는 기능을 말하는데, 기억력을 포함한 인지능력의 저하는 학습저하, 사회활동 위축, 이로 인한 삶의 질 저하 등을 초래하므로 사회적으로도 크게 문제시 되고 있다. 기억력 저하의 가장 대

표적인 질환이 치매인데, 여러 원인에 의해 의식장애 없이 자기유지나 사회생활에 심한 장애를 초래할 정도로 기억력, 사고력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등 전체적이고 복합적인 지적 기능의 저하가 후천적으로 일어난 '기질성 뇌중후군'을 통틀어 말한다. 흔히 Alzheimer's disease라고 일컬어지고 있는 대부분의 노인성치매는 그 발병원인에 대해서는 자세히 밝혀진 바 없으나 많은 동물실험 및 임상연구의 결과를 토대로 뇌중 acetylcholine량의 결핍[12]과 β -secretase에 의해 생성되는 β -amyloid 단백질에 의한 독성[22]이 주원인일 것으로 추정하고 있다. 이에 따라 기억장애를 치료하는 약물은 무스카린성 acetylcholine 수용체에 대한 효능제, acetylcholine 생성촉진제, acetylcholinesterase 저해제나 β -secretase 억제에 의해 독성단백질의 발현을 억제하는 약물들이 개발되고 있다[25].

한편, 체내 대사과정에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)도 Alzheimer병과 같은 뇌신경질환의 병태생리 현상의 원인이 되는 것으로 알려져 있어[4] ROS에 의한 뇌세포막의 지질과산화물을 억제하거나 ROS를 직접 소거하는 물질들은 기억상실을 방지하거나 치료할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

본 연구에서는 여러 가지 기억상실의 원인들 중에서 신경전달물질인 acetylcholine의 감소 및 뇌 독성 단백질의 생성에 초점을 맞추어 참외추출물의 acetylcholinesterase 억제활성을 측정하였고 β -amyloid 생성효소인 β -secretase 저해활성을 조사하였으며 동물모델 실험으로서 scopolamine으로 기억상실이 유도된 흰쥐를 이용한 수동회피시험(passive avoidance task)을 실시하여 참외추출물의 기억증진 효능을 검토하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2224, Fax : +82-54-742-9833

E-mail : dulee@dongguk.ac.kr

재료 및 방법

시료 제조

실험에 사용한 참외는 성주군 성주참외원에농협에서 구입하였으며 참외에서 과육을 분리하고 세절한 다음, 1 kg에 메탄올 500 ml를 가하고 가열하면서 추출하였다. 추출물을 여과한 여액을 rotary evaporator을 사용하여 농축하였으며 얻어진 조추출물을 동결건조기로 건조시켜 분말로 하여 각종 실험의 시료로 사용하였다.

시약, 기기 및 실험동물

지역상실제인 scopolamine, 효소활성 측정용 시약인 acetylcholinesterase, DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine iodide 및 양성대조 약물인 tacrine 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였으며 β -secretase 측정 kit는 PanVera Co. (Invitrogen, Madison, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 유기용매는 모두 국산 특급을 사용하였다. 동물시험의 방법으로 사용한 수동회피시험 (passive avoidance task)의 측정기기는 Gemini Avoidance System (San Diego Instruments, USA)을 사용하였고 흡광도는 Optizen 2120UV (Mecasys, Korea)로 측정하였으며 형광분석기(Fluorescence microplate reader)는 Gemini EM (Molecular Devices, USA)을 사용하였다. 실험동물은 미생물 monitoring에서 모두 음성을 나타낸 건강한 ICR (Institute of Cancer Research) 계 mouse (6주령) 중에서 25±3 g을 선별하여 사용하였으며 (주)대한바이오링크에서 구입하였다. 사육조건은 온도 22±2°C, 습도 50±2%, 그리고 명암은 12시간의 light/dark cycle을 유지하면서 사육하였다.

Acetylcholinesterase 활성 측정

추출물 및 분획의 acetylcholinesterase (AChE) 억제 활성 측정은 Ellman's coupled enzyme assay 방법[3]을 사용하여 측정하였다. 효소반응은 25±0.1°C 항온조 내에서 실행하였다. 기질, Ellman 시약 및 시료(10, 20, 50, 100 mg/ml)를 포함한 반응용액을 항온조 내에서 4분간 항온하고 효소액(AChE 10 unit/ 10 μ l)을 첨가하여 60초 동안 항온한 다음, 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 효소활성저해 효과는 시료검액 대신 동량의 완충액을 넣은 대조군의 흡광도(C.T.)와 시료검액을 넣어준 실험군의 흡광도(S.T.)를 이용하여 측정하였다. 이상의 실험을 3회 실시한 다음, 효소활성 저해율을 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - (\text{S.T./C.T.} \times 100)$$

β -Secretase 활성 측정

효소활성은 보고된 방법[11]에 따라 β -secretase (1.0 U/ml) 10 μ l, 기질인 750 nM Rh-EVNLDAEFK-Quencher/50 mM

ammonium bicarbonate 10 μ l 및 assay buffer (50 mM sodium acetate, pH 4.5)에 용해시킨 시료 10 μ l의 반응용액을 25°C 암실에서 60분 동안 반응시킨 후, 효소정지 반응용액 10 μ l를 가하였다. 반응용액에 530 nm를 조사한 후 590 nm에서 형광분석하였다. 효소활성의 저해율은 다음 식에 의하여 산출하였다. 이 식에서 C는 대조군(효소, 완충용액 및 기질)의 형광, C₀는 t=0 일 때의 대조군의 형광, S는 시료용액(효소, 시료용액 및 기질)의 형광, S₀는 t=0 일 때의 시료용액의 형광을 의미한다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - \{(S - S_0) / (C - C_0)\}] \times 100$$

기억증진 효과시험(수동회피시험)

컴퓨터로 모니터링이 되는 측정기기는 내부가 두 개의 방으로 구성된 상자(shuttle box, 53 cmW × 44 cmH × 33 cmD)의 가운데에 guillotine door가 있으며 바닥(grid floor) 전체에 전기쇼크(scrambled foot-shock)를 가할 수 있는 장치가 되어 있다. 각 실험군에는 추출물 500 mg/kg을 경구투여하였으며 양성대조약물로는 tacrine 2.5 mg/kg을 7일간 복강주사하였다. 마지막 투여 1시간 후, 기억상실약물인 scopolamine 1.0 mg/kg을 복강주사하고 30분 후에 실험을 실시하였다. 실험과정은 흰쥐를 1마리씩 한쪽 방에 넣고 15초간 탐색시간을 준 뒤, 위에서 조명과 소음을 가하면 가운데의 guillotine door를 통과하여 조용하고 어두운 옆의 쇼크실로 건너간다. 쥐가 쇼크실에 들어가면 자동적으로 guillotine door가 닫히면서 0.3 mA의 전기쇼크가 3초간 가해진다. 이러한 방법으로 training trial을 실시하여 120초간 쇼크실로 들어가지 않는 쥐는 실험 대상에서 제외시켰다. Retention trial에서는 training을 받은 쥐에 대하여 24시간 후에 반복하여 실험하였으며 이 때는 쇼크실 도달시간(step-through latency time)을 최대 300초(cut-off time)까지만 측정하였다.

통계 처리

모든 실험 data는 mean±S.E.로 표시하였으며 통계적 유의성은 Origin (Version 7.0) 프로그램을 이용하여 처리하였고 Student's *t*-test로 검정하여 P value로 나타내었다.

결과 및 고찰

Acetylcholinesterase 억제 활성

Acetylcholinesterase (AChE)는 고등 척추동물 및 무척추동물의 신경계에 존재하는 신경세포 synapse에서 화학적 신호전달 물질인 acetylcholine을 choline과 acetic acid로 가수분해하는 효소이다. AChE의 효소반응은 신경계에서 신호전달의 신속성이 요구되기 때문에 매우 높은 turn-over number를 보여주고 있다. 이러한 빠른 효소반응은 생물학적 기질을 이용하여 *in vitro*에서 실험적으로 측정할 수 없기 때문

에, AChE의 *in vitro* 검정은 상대적으로 반응속도가 매우 느리면서도 효소특이성을 지니고 있는 대체 기질인 acetylthiocholine을 이용하여 10~20분 정도 반응시키도록 설계되었다. 참외추출물은 AChE의 효소활성을 용량 의존적으로 저해하였는데, 최종 농도 100 mg/ml에서 15.8%의 효소활성 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). 치매치료제인 tacrine은 88.4%의 억제율을 보였다. Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine)은 AChE 저해제로서 간독성이 알려져 임상에서의 사용이 제한되어 있으나 동물실험에서는 positive control로 널리 사용하고 있다. 참외추출물의 AChE 효소억제 효과는 강하지는 않지만 동물실험에서 양호한 기억증진효과가 확인되었으므로 참외의 기억증진효과는 부분적으로 AChE 억제에 의한 뇌중 acetylcholine의 유지에 기인한 것으로 해석된다.

β-Secretase 억제 활성

기억상실을 특징으로 하는 Alzheimer 병의 원인중의 하나는 β-amyloid protein (Aβ)이 plaque 형태로 뇌에 침착되어 발생하기 때문인 것으로 알려져 있다. Aβ는 아직 결정구조가 확인되지 않은 amyloid precursor protein (APP)으로부터 secretase에 의해 분해되어 생성되는데 이때, β-secretase에 의해 아미노산 사슬이 먼저 절단된 다음, 절단된 사슬이 다시 γ-secretase에 의해 절단되어 39-42개의 아미노산으로 된 작은 peptide로 분해되는 것으로 보고되어 있다[23]. 이에 따라 일반적으로 뇌독성 단백질인 Aβ의 생성억제효과는 β-secretase의 저해활성을 평가하여 측정하고 있다. 본 실험에서는 참외추출물을 농도별로 사용하여 β-secretase 억제효과를 관찰한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 용량 의존적으로 효소활성을 억제함을 확인하였는데 최종 농도가 100 mg/ml일 때 35.3%의 억제활성을 나타내었다. 따라서 참외추출물은 Aβ plaque의 생성을 억제함으로써 Aβ에 의한 기억상실을 어느 정도 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

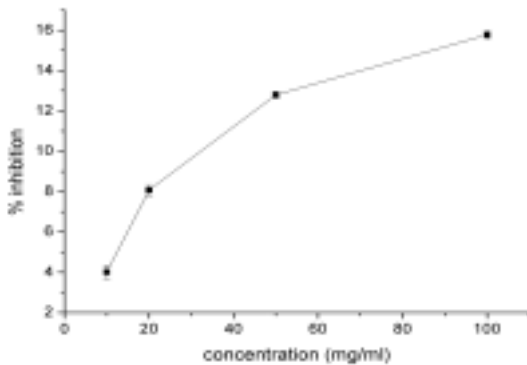


Fig. 1. Inhibitory effect of the melon methanol extract on acetylcholinesterase activity *in vitro*. Each value represents the mean±S.E. (n=3). Tacrine, a positive control, showed 88.5% inhibition at a dose of 2.5 mg/kg.

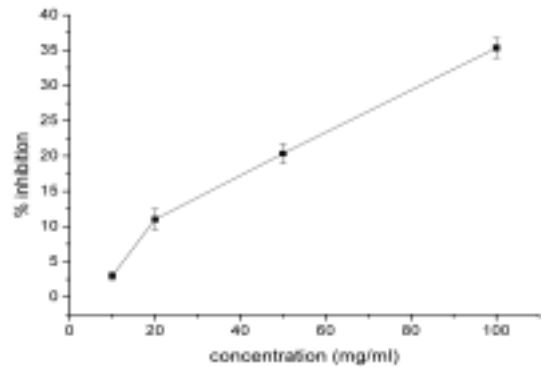


Fig. 2. Inhibitory effect of the melon methanol extract on β-secretase activity *in vitro*. Each value represents the mean±S.E. (n=3).

기억증진 효과

참외추출물이 *in vitro*에서의 효소활성도 시험에서 어느 정도의 효과를 나타내었으므로 기억증진효과를 동물모델시험에서 확인하였다. 실험동물을 이용한 학습과 기억증진효과 검색법에는 passive avoidance task [19], active avoidance task [7], water maze task [1], Y-maze task (spontaneous alternation behavior test) [14] 등이 있으며 이들 방법은 scopolamine으로 기억을 상실시킨 후, 약물의 기억증진효과를 보는 방법들이다. Scopolamine은 교감신경억제제로서 무스카린 수용체 길항제이며 콜린성 신경전달을 감소시켜 기억을 상실시키는 약물이다[13]. 본 실험에서는 실험의 정확도를 높이기 위하여 실험과정과 data를 컴퓨터로 control할 수 있는 avoidance test 기기를 사용하여 수동회피시험(passive avoidance task)을 실시하였다. 참외추출물을 흰쥐에 일주일간 투여한 후 시험한 결과, 실험군이 대조군에 비해서 쇼크실 이동시간(step-through latency time)이 유의적으로(p<0.05) 22.7% 늘어나 참외의 기억증진효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 양성대

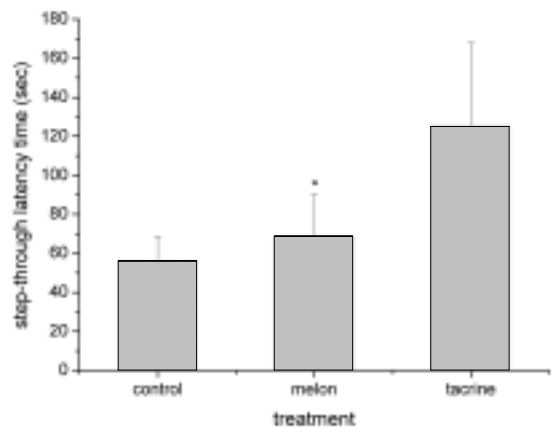


Fig. 3. Effect of the melon methanol extract and tacrine, a positive control, on scopolamine-induced amnesia in the passive avoidance task in mice. Data represent the mean±S.E. (n=14). *p<0.05 compared to control.

조약물인 tacrine은 대조군에 비해 2배 이상의 기억증진효과를 나타내었다.

참외의 주요 성분 중에서 cucurbitacin B와 E는 다양한 효능이 있음이 보고되어 있으나 기억증진과 관련하여 acetylcholinesterase 또는 β -secretase 활성검색이나 avoidance test 또는 maze test와 같은 동물모델실험에 관한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서 확인된 참외의 인지기능 증진효과가 이들 성분에 의한 것인지 아니면 또 다른 주요 성분인 flavonoid 류에 있는지에 관해서는 후속 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술재단의 2008년도 지역혁신인력양성사업의 연구비 지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Brun, V. H., K. Ytterbo, R. G. Morris, M. B. Moser, and E. I. Moser. 2001. Retrograde amnesia for spatial memory induced by NMDA receptor-mediated long-term potentiation. *J. Neurosci.* **21**, 356-362.
- Du, Q. Z., X. P. Xiong, and Y. Ito. 1995. Separation of cucurbitacin B and cucurbitacin E from fruit base of *Cucumis melo* L. by high-speed countercurrent chromatography. ACS Symposium Series, 593 (Modern Countercurrent Chromatography). *American Chemical Society* 107-110.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres Jr, and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Froelich, L. and P. Riederer. 1995. Free Radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for anti-oxidative treatment. *Arzneimittel-Forschung* **45**, 443-446.
- Kim, S. K., H. B. Park, Y. H. Kim, D. Y. Kim, and M. K. Kim. 1997. Volatile flavor components of oriental melon. *Hanguk Wonye Hakhoechi* **38**, 33-38.
- Lee, C. F. and J. Y. Lin. 1995. Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the melon *Cucumis melo*. *J. Biochem.* **118**, 18-22.
- Lim, D. K., Y. H. Oh, and H. S. Kim. 2001. Impairments of learning and memory following intracerebroventricular administration of AF64A in rats. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 234-239.
- Liu, Y. and W. Liu. 1992. Pharmacological and clinical studies on cucurbitacins. *Zhongcaoyao* **23**, 605-608.
- Liu, Y. and W. Liu. 1993. Immunopotentiating effects of cucurbitacin B in mice. *J. Chinese Pharm. Sci.* **2**, 121-126.
- Ohara, A. and N. Hiramatsu. 1997. Antimutagenic activity in extracts of plant foods. *Nippon Kasei Gakkaishi* **48**, 637-642.
- Park, I. H., S. Y. Jeon, H. J. Lee, S. I. Kim, and K. S. Song. 2004. A β -secretase(BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial culture of *Phelinus linteus*. *Planta Med.* **70**, 143-146.
- Polinsky, R. J. 1998. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Therap.* **20**, 634-647.
- Rush, D. K. and A. G. Cassella. 1988. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav. Neural Biol.* **50**, 255-274.
- Sarter, M., G. Bodewitz, and D. N. Stephens. 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacol.* **94**, 491-495.
- Shin, Y. S., J. E. Lee, I. K. Yeon, H. W. Do, J. D. Cheung, C. K. Kang, S. Y. Choi, S. J. Youn, J. G. Cho, and D. J. Kwoen. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of extract with water and ethanol of oriental melon (*Cucumis melo* L. var makuwa Makino). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 194-199.
- Shin, Y. S., J. E. Lee, I. K. Yeon, H. W. Do, J. D. Cheung, C. K. Kang, S. Y. Choi, S. J. Youn, J. G. Cho, and D. J. Kwoen. 2008. Antioxidant effects and tyrosinase inhibition activity of oriental melon (*Cucumis melo* L. var makuwa Makino) extracts. *J. Life Sci.* **18**, 963-967.
- Singh, R. S. and J. S. Chohan. 1978. Total phenols in the fruits of cucurbits and their relation to development of charcoal rot. *Indian Phytopathol.* **31**, 529-530.
- Singh, R. C. and C. S. Sisodia. 1970. Pharmacodynamic investigations into the diuretic activity of *Cucumis melo* seed (ether extract). *Ind. J. Med. Res.* **58**, 505-512.
- Ukai, M., T. Kobayashi, N. Shinkai, X. Shan-Wu and T. Kameyama. 1995. Dynorphin A-(1-13) potently improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **274**, 89-93.
- Wakimoto, N., D. Yin, J. O'Kelly, T. Haritunians, B. Karlan, J. Said, H. Xing and H. P. Koeffler. 2008. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* **99**, 1793-1797.
- Wei, F., H. Qu, H. Wang, S. Yang, and Y. Chang. 2005. Protective effects of cucurbitacin B on the acute alcohol liver injured jaundice. *Shipin Kexue* (Beijing, China) **26**, 487-489.
- Weldon, D. T., S. D. Rogers, J. R. Ghilardi, M. P. Finke, J. P. Cleary, E. O'Hare, W. P. Esler, J. E. Maggio, and P. W. Mantyh. 1998. Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS *in vivo*. *J. Neurosci.* **18**, 2161-2173.
- Yamin, G., K. Ono, M. Inayathullah, and D. B. Teplow. 2008. Amyloid β -protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease. *Current Pharm. Design* **14**, 3231-3246.
- Yang, S., Y. Chang, L. Zheng, Z. Wei, H. Qu, and S. Cao. 2005. Protective effects of cucurbitacin B on the acute liver injury induced by CCl₄. *Shipin Kexue* (Beijing, China) **26**, 524-526.
- Zhu, Y., K. Xiao, L. Ma, B. Xiong, Y. Fu, H. Yu, W. Wang, X. Wang, D. Hu, H. Peng, J. Li, Q. Gong, Q. Chai, X. Tang, H. Zhang, J. Li, and J. Shen. 2009. Design, synthesis and biological evaluation of novel dual inhibitors of acetylcholinesterase and β -secretase. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1600-1613.