



## 산화적 스트레스에 대한 여주(*Momordica charantia* Linn.)잎의 항산화 활성 및 간세포 보호능

전아영<sup>1</sup> · 천원영<sup>1</sup> · 윤지민<sup>1</sup> · 김대중<sup>2</sup> · 김영화<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>경성대학교 식품생명공학과 대학원생, <sup>2</sup>국립농산물품질관리원 시험연구소 연구사, <sup>3</sup>경성대학교 식품응용공학부 교수

### Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn.) Leaves against Oxidative Stress

Ahyeong Jeon<sup>1</sup>, Wonyoung Cheon<sup>1</sup>, Jimin Yoon<sup>1</sup>, Dae-Jung Kim<sup>2</sup>, Younghwa Kim<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University

<sup>2</sup>Experiment research institute, National Agricultural Products Quality Management Service

<sup>3</sup>School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoong University

#### Abstract

This study examined the bioactive compound content and the antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) leaves. The content of vitamin C, beta-carotene, and total carotenoids was 69.77, 45.68, and 65.08 mg/100 g, respectively. To investigate the antioxidant capacity, bitter melon leaves were extracted using various concentrations of ethanol (60, 80, or 100%). Highest content of total polyphenols (18.07 mg gallic acid equivalent/g) and flavonoids (4.53 mg catechin equivalent/g) was found in the 100% ethanolic extract of the leaves (E100). Also, the E100 extract showed the highest levels of 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities. Reducing power was also the highest (39.21 mg Trolox equivalent/g) in E100 extract. The E100 extract effectively inhibited lipid peroxidation by 91.45% compared to the control group. Also, the E100 extract showed a cytoprotective effect against oxidative stress in HepG2 cells and decreased the generation of intracellular reactive oxygen species. These results suggest that bitter melon leaves could be regarded as a potential source of natural antioxidants.

Key Words : Bitter melon leaf, radical scavenging activity, hepatoprotective effect, intracellular reactive oxygen species, antioxidant

#### 1. 서 론

최근 식생활과 생활환경의 패턴 변화 등으로 현대인들의 노화 등 각종 성인병의 원인이 되는 활성산소가 주목받고 있다. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 생명체가 산소를 이용해 호흡하는 과정에서 자연적으로 발생하는 부산물로 반응성이 높아 세포 내 단백질 및 지질과 반응하여 이들의 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다(Halliwell & Gutteridge 1990). 체내에서는 이에 대한 방어 기전으로 산화억제물질을 생성하여 대부분의 활성산소종을 소멸시키지만(Lee 2014), 활성산소가 과도하게 생성되게 되면 산화적 스트레스에 의해 지질, 단백질, DNA 변성, 세포막의 파괴 등을 야기한다(Leibovitz & Siegel 1980). 또한 활성산소는 지질을 산화시켜 과산화 지질을 유발하고 이러한 과산화 지질

반응은 간세포의 산화적 손상 기작 중 하나로 보고된 바 있다(Reddy et al. 2008). 체내에서 발생하는 산화적 스트레스에 대한 방어 물질을 항산화제라고 하며, 이는 대사과정 중 생성되는 활성산소에 의한 지질 과산화 반응을 억제하여 동맥경화, 심혈관계 질환, 염증, 당뇨 등의 예방에도 효과가 있다고 보고되어 있다(Emerit & Chaudiere 2008).

여주(*Momordica charantia* L.)는 아시아, 아마존, 동아프리카 및 카리브와 같은 열대지역에서 서식하는 1년생 박과 식물로(Boo et al. 2009), 브라질, 중국, 인도, 말레이시아 등의 국가에서는 전통적인 약재로 사용해왔다(Grover & Yadav 2004). 여주는 vitamin C, 미네랄 및 beta-carotene 등 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있으며(Cha et al. 2008), 그 중 flavan-3-ol 유도체와 phenolic acids는 주된 활성 성분으로 보고되어 있다(Choi et al. 2014; Ahn et al. 2015). 여

\*Corresponding author: Younghwa Kim, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoong University, Busan, 48434, Republic of Korea  
Tel: +82-51-663-4652 Fax: +82-51-622-4986 E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

주는 항당뇨, 항암, 항염증, 항바이러스, 항산화 등 다양한 생리학적 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kang et al. 2018). 여주잎은 예로부터 각종 차와 음료, 건강 식품 등으로 이용되고 있으며(Boo et al. 2009), 우리나라에서는 식품원료로 등록이 되어있다(Food safety Korea 2020). 현재 지구온난화로 인한 기후변화로 우리나라에서 여주의 재배가 수월하며 그 기능성에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 여주뿐만 아니라, 여주잎에도 vitamin C, beta-carotene, luteolin, gallic acid, quercetin, ferulic acid, cinnamic acid 등의 생리활성 물질 및 항산화 성분을 함유하고 있다(Zhang et al. 2009). 또한, 여주잎 추출물은 효과적인 항염증(Huang et al. 2015) 및 항암 효과(Limtrakul et al. 2004)를 보여주었다. 그러나 여주잎을 활용한 생리활성에 대한 연구는 여주 열매에 비해 미흡하며, 특히 간세포 보호 작용에 관한 연구는 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 여주잎 추출물의 항산화 활성과 간세포에서의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 알아보고자 하였다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 여주잎은 충남 부여군에서 재배된 것을 재배농가로부터 제공받아 사용하였으며, 수세 후 건조하여 동결 건조 하였고, 이를 냉동보관 하였다. 또한 dimethyl sulfoxide (DMSO), butylated hydroxytoluene (BHT), Folin-ciocalteu's reagents, *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP),  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 및 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. Gallic acid는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. 또한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사(Lafayette, CO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 여주잎 ethanol 추출물 제조

본 연구에 사용한 추출물을 제조하기 위해 여주잎을 수세 및 건조하여 동결 건조 후 분쇄하였다. 동결 건조된 분말 2 g을 칭량한 후 ethanol 농도별 100배 부피의 용매를 사용하여 18시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과 후 감압농축기(EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 잔사를 얻었고 이를 DMSO에 녹여 추출물을 제조한 후 실험에 사용하였다.

### 3. Vitamin C 분석

여주잎의 vitamin C 함량은 기존 보고된 방법에 의해 진

행하였다(Phillips et al 2010). 시료 2 g에 5% MPA (meta-phosphoric acid) 용액[1 mM ethylenediaminetetraacetate disodium salt, 5 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine 첨가] 30 mL를 첨가하고 균질화하였다. 이후 10분간 3,000 rpm으로 원심분리 하여 상등액을 50 mL로 정용하였다. 추출물은 0.45  $\mu$ m filter (Whatman Inc., Maidstone, UK)로 여과하여 HPLC/DAD (Chromaster 5000 series, Hitachi)를 분석에 사용하였다. 이동상으로 0.05% formic acid 용액을 사용하였으며 유속은 0.7 mL/min, column (Mightysil RP-18, 250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 온도는 40°C로 설정하였다.

### 4. Carotenoid 및 beta-carotene 분석

여주잎의 총 carotenoid 함량은 AOAC (2016) 및 Gmez et al. (2020)의 방법을 변형하여 분석을 진행하였다. 시료 1 g에 6% pyrogallol 10 mL를 첨가한 후 5분간 sonication 한 뒤, 60% KOH 8 mL를 첨가하고 환류냉각관을 연결하여 75°C에서 진탕 추출하였다. 이후 ice에서 냉각시킨 후, 2% NaCl 20 mL 및 hexane-ethylacetate 용액 15 mL를 첨가하고 진탕하였다. 상등액만 얻어 50 mL로 정용한 후 추출물을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 HPLC/DAD 분석에 사용하였다. 이동상으로 acetonitrile : methanol : dichloromethane = 70:10:30과 acetonitrile : methanol : dichloromethane = 75:20:5 용액을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min, column (YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>, 250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, YMC Co., Tokyo, Japan) 온도는 40°C로 설정하였고 450 nm에서 검출하였다.

### 5. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 측정

여주잎의 총 폴리페놀의 함량은 Folin & Denis (1912)의 방법을 응용하여 사용하였다. DMSO에 희석한 여주잎 ethanol 추출물 50  $\mu$ L에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL와 50% Folin-ciocalteu's reagents (Sigma Chemical Co.) 100  $\mu$ L를 첨가한 후 5분간 방치하였고 이를 750 nm에서 흡광도를 측정하였다(Thermo Scientific Ltd, Lafayette, CO., USA). 총 폴리페놀의 표준물질은 gallic acid (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)를 사용하였고, 결과 값은 mg gallic acid equivalent (GAE)/g으로 표시하였다.

여주잎에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 알아보기 위해 Zhishen et al. (1999)의 방법을 응용하여 실험하였다. DMSO에 희석한 여주잎 ethanol 추출물 250  $\mu$ L에 증류수 1.250 mL를 첨가한 후 5% NaNO<sub>2</sub> 75  $\mu$ L와 5분간 암소에서 반응시켰다. 이후 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 150  $\mu$ L 첨가하고 5분 후, 1 M NaOH 1 mL를 가하여 반응액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량 확인을 위한 표준물질은 catechin (Sigma Chemical Co.)을 사용하였고, 결과 값은 mg catechin equivalent (CE)/g으로 표시하였다.

6. 라디칼 소거능 측정

여주잎의 DPPH 라디칼에 대한 환원력 측정을 위해 DMSO에 희석된 여주잎 추출물 50 µL에 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL를 가하여 진탕한 후 암소에서 30분간 방치하고 ELISA reader기를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois 1958). 또한 ABTS 라디칼 소거능을 측정하기 위해 7.4 mM의 ABTS 용액과 2.6 mM의 potassium persulfate를 혼합한 후 암소에서 24시간 방치하여, 735 nm에서 흡광도가 1.0 정도가 되도록 희석한 후 실험에 사용하였다. 여주잎 추출물 20 µL에 희석된 ABTS 라디칼 용액 1 mL를 가하여 혼합한 후 30분간 방치하였다. 이후 ABTS 라디칼 소거능은 735 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

7. 환원력 측정

여주잎의 환원력 측정은 Oyaizu (1986)의 방법을 응용하였다. 여주잎 ethanol 추출물 250 µL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 250 µL를 첨가하고 1% potassium ferricyanide 250 µL를 혼합한 후 50°C 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 그 후 10% trichloroacetic acid 용액을 250 µL 첨가하고 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 상등액 500 µL에 동량의 증류수와 0.1% ferric chloride 200 µL를 가한 후 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 결과 값은 mg trolox equivalent (TEAC)/g residue로 표시하였다.

8. 지질 과산화 저해능 측정

여주잎의 지질 과산화 저해 활성은 Siriwardhana et al. (2003)의 방법을 변형하여 측정하였다. DMSO로 희석한 각 농도별 추출물 1 mL에 2.5% linoleic acid emulsion 및 ethanol 2 mL와 phosphate buffer (pH 7.0) 10 mL를 가한 후 혼합액이 20 mL가 되도록 증류수로 정용하였다. 빛을 차단한 40°C 수조에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 0.1 mL의 반응액에 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL와 ethanol 3.7 mL, 0.02 M ferrous chloride와 3.5% HCl 0.1 mL를 가하여 혼합하였다. 이후 반응액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. BHT는 본 실험에서 양성대조군 시료로 사용하였다. 결과 값은 시료를 넣지 않은 대조군의 지질 과산화 흡광도 값을 이용하여 계산하였다.

9. 시료 독성 및 간세포 보호능 측정

HepG2 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, CL-173, Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 1% penicillin과 10%의 FBS를 함유한 DMEM을 사용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. HepG2 세포는 96 well plate의 각 well당 3×10<sup>4</sup>개의 세포를 seeding하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 100% ethanol로 추출한 여주잎 추출물을 농도별(3.125, 6.25 12.5, 25 µg/mL)로 처리하여 24시간 후 시

료의 독성을 알아보았다. 또한 배양된 세포에 여주잎 추출물과 TBHP를 희석하여 200 µL씩 세포에 6시간 동안 처리한 후 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 측정하였다. 산화적 스트레스에 대한 세포의 생존율은 MTT assay로 측정하였으며, 각 well에 MTT 시약(5 mg/mL)을 20 µL씩 가하고 2시간 동안 37°C에서 방치하였다. 이후 formazan은 DMSO에 녹여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Yeon et al. 2013).

10. 세포 내 활성산소종 측정

본 연구에서는 Lee et al. (2017)의 방법을 변형하여 세포 내 생성된 활성산소종의 양을 형광물질인 2'-7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 확인하였다. HepG2 세포 (1×10<sup>5</sup> cells/well)를 black 96 well plate에 24시간 배양한 뒤 100% ethanol로 추출한 여주잎 추출물을 농도별(3.125, 6.25 12.5, 25 µg/mL)로 DMEM에 녹여 2시간 동안 전처리하였다. 이후 각 well에 1 mM TBHP를 첨가하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 1시간 후 배지를 모두 제거하고 25 µM의 DCFH-DA를 함유한 DMEM을 40분간 처리하였다. 반응 후 200 µL의 phosphate-buffered saline으로 세포를 2회 세척한 후 Hank's balanced salt solution을 가해 빛이 들어오지 않도록 하여 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 2시간 후 synergy HTx (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용해 여기파장 485 nm와 방출파장 530 nm에서 세포 내 활성산소종 함량을 측정하였다.

11. 통계분석

본 연구 결과는 모두 2회 이상의 반복 실험을 수행한 값이며, 결과 값은 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 통계분석은 SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며, one-way ANOVA로 분석하여 Tukey's test를 통해 p<0.05 수준에서 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 여주잎의 기능성 성분 분석

본 연구에서는 여주잎의 vitamin C 및 beta-carotene의 함량을 분석하였고, 그 결과를 <Table 1>에 나타내었다. 여주잎의 vitamin C의 함량은 69.44 mg/100 g이었고, beta-carotene의 함량은 43.68 mg/100 g으로 나타났다. 또한, 총

<Table 1> Contents of vitamin C, beta-carotene and total carotenoids in bitter melon leaves (mg/100 g fresh weight)

| Components        | <i>Momordica charantia</i> Linn. leaves |
|-------------------|---|
| Vitamin C         | 69.44±0.94                              |
| β-Carotene        | 43.68±0.52                              |
| Total carotenoids | 65.08±0.00                              |

Values are means of duplicate determinations±standard deviation.

&lt;Table 2&gt; Phenolic compounds contents of ethanol extracts of bitter melon leaves

| Solvent      | Total polyphenols (mg GAE <sup>1)</sup> /g residue) | Total flavonoids (mg CE <sup>2)</sup> /g residue) |
|--------------|---|---|
| 60% ethanol  | 8.65±0.34 <sup>c</sup>                              | 3.55±0.06 <sup>c</sup>                            |
| 80% ethanol  | 11.92±0.18 <sup>b</sup>                             | 4.04±0.28 <sup>b</sup>                            |
| 100% ethanol | 18.07±0.25 <sup>a</sup>                             | 4.53±0.06 <sup>a</sup>                            |

<sup>1)</sup>GAE: Gallic acid equivalent.

<sup>2)</sup>CE: Catechin equivalent.

Values are means of triplicate determinations±standard deviation.

Means with different superscripts in the same column are significantly different by One way ANOVA followed by Tukey's test.

&lt;Table 3&gt; Free radical scavenging activity of ethanol extracts of bitter melon leaves

| Samples (2.5 mg/mL) | ABTS radical scavenging capacity (%) | DPPH radical scavenging capacity (%) | Reducing power (mg TEAC <sup>1)</sup> /g residue) |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 60% ethanol         | 57.48±1.76 <sup>b</sup>              | 59.33±2.34 <sup>b</sup>              | 31.91±0.47 <sup>b</sup>                           |
| 80% ethanol         | 60.22±0.21 <sup>ab</sup>             | 65.17±2.12 <sup>b</sup>              | 38.48±0.21 <sup>a</sup>                           |
| 100% ethanol        | 64.28±2.25 <sup>a</sup>              | 70.30±2.07 <sup>a</sup>              | 39.21±0.91 <sup>a</sup>                           |

<sup>1)</sup>TEAC: Trolox equivalent.

Values are means of triplicate determinations±standard deviation.

Means with different superscripts in the same column are significantly different by One way ANOVA followed by Tukey's test.

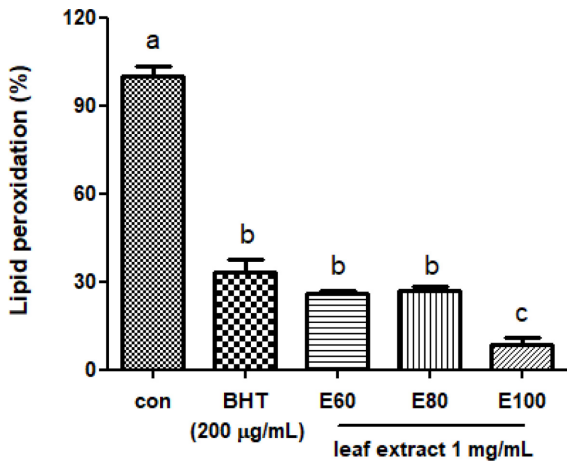
carotenoids 함량은 65.08 mg/100 g으로 나타났다. 식물의 잎은 무기질과 vitamin A 및 vitamin C가 풍부하며(Choi 2003), 그 중 vitamin C는 체내 철의 흡수를 도울 뿐만 아니라 콜라겐의 합성에 관여하여 뼈의 형성에도 반드시 필요한 영양소로 보고되어 있다(Cha & Oh 1996). beta-Carotene은 생체 내에서 시각 기능, 세포 증식 및 분화 조절, 면역 기능 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Holick et al. 2002). 기존 연구에서 올리브잎의 경우 vitamin C의 함량이 36.64 mg/100 g, 월계수잎에서는 13.86 mg/100 g의 vitamin C가 검출되었다고 보고된 바 있다(Lee et al. 2005). 이는 여주잎이 다른 잎과 비교했을 때 다량의 vitamin C를 함유하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, Karaman et al. (2018)은 여주의 부위에 따라 beta-carotene 함량이 5.657-11.675 mg/100 g이 검출된다고 보고된 바 있다. 따라서 여주잎은 여주 생과보다 더 많은 beta-carotene을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

폴리페놀은 대표적인 천연 항산화 물질 중 하나로써 폴리페놀 함량은 식품의 항산화능을 결정짓는 중요한 인자로 작용한다(Dragsted 2003; Perron & Brumaghim 2009). 폴리페놀 화합물은 식물에 널리 분포되어 있으며 항산화, 항염증, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내고 항산화 활성과 높은 상관관계를 보여주는 것으로 보고되어 있다(Kim et al. 2011a). 본 연구에서는 ethanol 농도별 여주잎 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 알아보았고 분석한 결과는 <Table 2>에 나타내었다. 여주잎 추출물의 총 폴리페놀 함량은 100% ethanol 추출물이 18.07 mg GAE/g residue이었고, 이는 60% ethanol 추출물(8.65 mg GAE/g residue) 및 80% ethanol 추출물(11.92 mg GAE/g residue)보다 높은 폴리페놀 함량을 보여주었다. 또한 총 플라보노이드 함량은 100%

ethanol 추출물(4.53 mg CE/g residue)이 80% ethanol 추출물(4.04 mg CE/g residue)과 60% ethanol 추출물(3.55 mg CE/g residue)보다 높은 플라보노이드 함량을 함유하고 있는 것으로 나타났다. Kang et al. (2018)은 진산 여주 100% ethanol 추출물의 총 폴리페놀 함량을 1.16 mg/100 g으로 보고하였고, Hwang (2018)은 동결 건조된 여주보다 잎의 폴리페놀 함량이 약 2.8배 높다고 하였다. 따라서 본 연구 결과를 통해 국내 여주잎의 영양학적 가치와 천연 항산화제로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

## 2. 라디칼 소거능 및 지질 과산화 억제능 측정

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 플라보노이드 등의 기타 페놀성 물질에 대한 항산화 지표로서 환원력이 클수록 라디칼 소거능이 높은 것으로 알려져 있다(Kang et al. 1995). 본 연구에서는 여주잎 ethanol 추출물의 생리활성 효과를 평가하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, 환원력 및 지질 과산화 억제능을 측정하였으며, 그 결과를 <Table 3>에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 100% ethanol 추출물(70.30%)에서 80% ethanol 추출물(65.17%)과 60% ethanol 추출물(59.33%)보다 높게 나타났다. ABTS 라디칼 소거능은 100% ethanol 추출물(64.28%)이 80% ethanol 추출물(60.22%) 및 60% ethanol 추출물(57.48%)보다 높았으나 80% ethanol 추출물과 유의적인 차이는 없었다. 여주잎의 환원력 또한 100% ethanol 추출물과 80% ethanol 추출물에서 높게 나타났다. Lee (2007)는 가죽나무잎 ethanol 추출물에서의 DPPH 라디칼 소거능이 17.47%를 나타낸다고 보고하였으며, Kim et al. (2020)은 귀리 잎 ethanol 추출물에서의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 각각 25.37% 및 35.07%를 나타낸

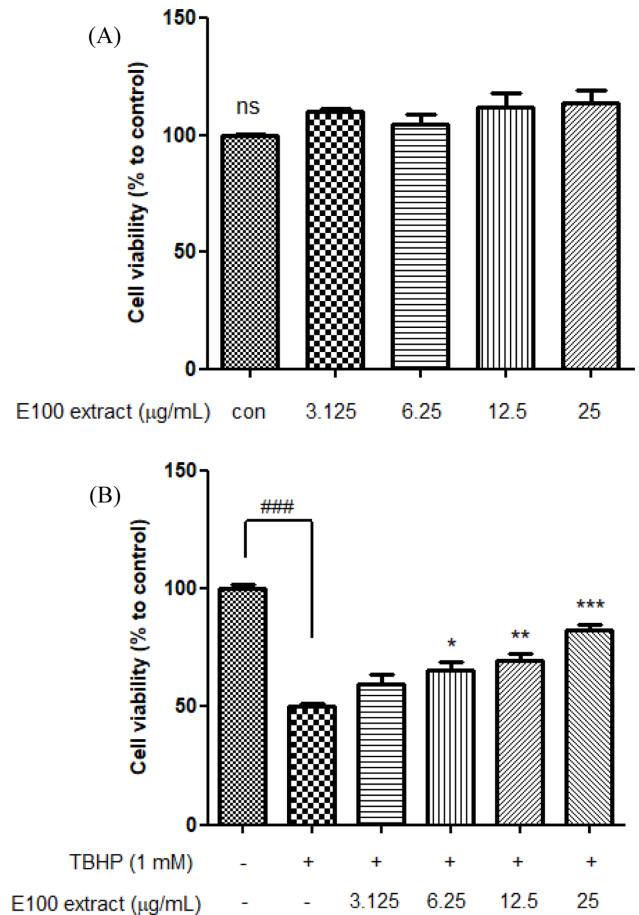


<Figure 1> Effect of various ethanol extracts of bitter melon leaves on lipid peroxidation.

The values are means±standard deviation (n=3). <sup>a-c</sup>Means with different letters are significantly different (p<0.05). con, control; BHT, butylated hydroxytoluene; E60, 60% ethanol extract; E80, 80% ethanol extract; E100, 100% ethanol extract.

다고 보고하였다. 따라서 다른 잎 ethanol 추출물의 라디칼 소거능과 비교했을 때, 여주잎 ethanol 추출물은 우수한 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인하였고 전반적으로 100% ethanol 추출물의 항산화 활성이 가장 우수하였다.

생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 자유라디칼에 의해 과산화 반응이 개시되고 이는 연쇄적으로 진행된다(Lee et al. 2003). 그러므로 자유라디칼에 의한 과산화 반응은 세포막의 투과성을 높여 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하는 것으로 알려져 있다(Huang et al. 1994). 따라서 본 연구에서는 여주잎 ethanol 추출물의 지질 과산화 저해능 확인을 위한 실험을 진행하였으며, 그 결과를 <Figure 1>에 나타내었다. 여주잎 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 과산화 지질이 생성되어 지질 과산화 저해능이 점차적으로 감소하였다. 모든 추출물이 1 mg/mL 농도에서 유의적으로 지질 과산화를 억제하였으며, 2.5 시간이 지난 후 시료를 첨가하지 않은 대조군을 100%로 하였을 때 이에 비하여 60% ethanol 추출물은 73.77%, 80% ethanol 추출물은 72.90%, 100% ethanol 추출물은 91.45%의 저해능을 나타냈다. 양성대조군으로 사용한 BHT는 200 µg/mL 농도에서 66.52%의 저해능을 나타냈다. Kim et al. (2011b)의 연구에서 왕취뽕나무잎 추출물을 첨가한 후 시간이 지남에 따라 과산화 지질의 생성이 억제되었음을 보고한 바 있다. 또한 Oh & Kim (2019)의 연구에서는 울금 ethanol 추출물의 지질 과산화 저해능을 50.79%로 보고하였다. 따라서 본 연구 결과, 여주잎은 우수한 라디칼 소거능 및 지질 과산화 저해활성을 가진 것을 알 수 있었고, 천연 항산화제로서의 가치가 높을 것으로 기대할 수 있다.

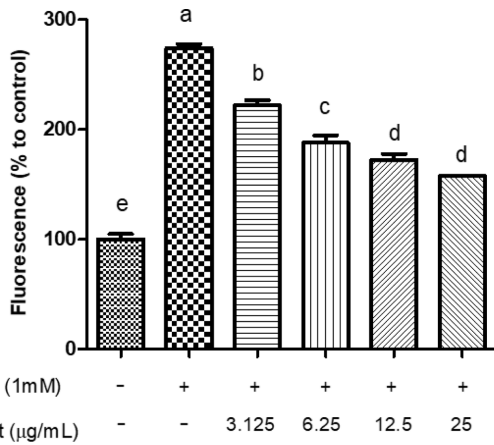


<Figure 2> Effect of 100% ethanol extract of bitter melon leaves on cytotoxicity (A) and protective effects against oxidative stress (B) in HepG2 cells.

Each value was expressed as the means±standard deviation (n=3). ###p < 0.001, significant difference compared with control. \*, \*\*, \*\*\*p<0.05, 0.01 and 0.001, respectively, significant difference compared with TBHP-treated group (by ANOVA, p<0.05). con, control; E100, 100% ethanol extract.

### 3. 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 작용

본 연구에서 진행된 여주잎 ethanol 추출물의 항산화 활성 결과를 바탕으로, 100% ethanol 추출물의 항산화 활성이 가장 우수함을 확인하였다. 따라서 간세포에서 여주잎 100% ethanol 추출물 처리에 의한 세포 생존율 및 TBHP에 의한 보호능을 측정한 결과를 <Figure 2>에 나타내었다. 그 결과 세포 생존율은 100% ethanol 추출물 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도에서 각각 104.50, 98.53, 101.89, 102.65%로 나타나, 여주잎에 의한 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다. 또한, 산화적 스트레스에 의한 세포 보호능은 100% ethanol 추출물 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도에서 각각 63.12, 69.74, 73.89, 87.44%로 나타났다. 이는 대조군인 TBHP 처리군(50.19%)보다 모두 유의적으로 높은 생존율로, 그 중 25 µg/mL의 농도에서 산화적 스트레스에 대해 가장 높은 생존율을 보여주었다. 따라서 TBHP 처리로 인해 발생



<Figure 3> Effect of 100% ethanol extract of bitter melon leaves on intracellular reactive species oxygen in HepG2 cells. Each value was expressed as the means±standard deviation (n=3). <sup>a-e</sup>Means with different letters are significantly different (by ANOVA, p<0.05).

한 산화적 스트레스의 증가를 여주잎 ethanol 추출물이 감소 시킴으로써 간세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 기존 연구에서 flavonoid의 함량이 높다고 알려진 양파 추출물은 TBHP에 의해 유도된 간세포 독성을 유의적으로 감소시켰다(Rhim & Lim 2005). 또한 Kim et al. (2014)의 연구에서도 산국의 잎 및 줄기의 추출물이 산화적 스트레스로 인한 세포 손상으로부터 농도 의존적으로 세포 생존율을 증가시키는 것으로 보고한 바 있다.

세포의 생존과 사멸 및 산화-환원 반응 유지에 중요한 역할을 하는 활성산소는 세포의 대사 과정 중 생성되는데, 보통 활성산소는 생명체의 항상성 유지기작을 통해 조절된다(Halliwell & Gutteridge 1990). 그러나 과잉 생성된 활성산소는 세포 및 조직에 산화적 스트레스를 주며 인슐린 저항성 증가 및 급성 염증반응 유도 등 다양한 질환을 일으킨다(Hurrell & Hsu 2017). 따라서 세포 내 활성산소의 축적은 살아있는 세포의 산화적 손상 지표로 알려져 있다. 본 연구에서는 여주잎 ethanol 추출물의 활성산소 생성 억제능을 측정하기 위해 실험을 진행하였고, 그 결과를 <Figure 3>에 나타내었다. 100% ethanol 여주잎 추출물을 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도별로 세포에 처리하였을 때 활성산소종의 발생이 각각 221.92, 187.87, 171.92, 157.55%였으며, TBHP 처리군(273.56%)보다 모두 유의적으로 활성산소의 생성을 억제시키는 것으로 나타났다. Cheon et al. (2019)의 보고에 따르면, 산화적 스트레스를 유도시킨 세포에 구아바 잎 추출물을 처리했을 때 TBHP 단독 처리군에 비해 133%로 유의적인 활성산소 억제능을 나타내었다. 이러한 활성산소종의 형성 억제는 glutathione, superoxide dismutase, catalase 등의 세포 내 항산화 효소의 발현 및 활성 증가와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Kwon et al. 2019). 따라서

여주잎 추출물은 산화적 스트레스에 의한 활성산소 생성을 억제함으로써 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

#### IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 여주잎의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과를 알아보았다. 여주잎은 vitamin C (69.44 mg/100 g), beta-carotene (43.68 mg/100 g) 및 총 carotenoids (65.08 mg/100 g)를 풍부하게 함유하고 있었다. 또한 여주잎을 ethanol 농도에 따라 추출하여 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 100% ethanol 추출물에서 각각 18.07 mg GAE/g residue 및 4.53 mg CE/g residue로 가장 높게 나타났다. 여주잎 추출물의 라디칼 소거능과 환원력 또한 100% ethanol 추출물에서 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능이 각각 64.28 및 70.30%이었으며 60 및 80% ethanol 추출물에 비하여 높은 라디칼 소거능을 보여주었고 환원력은 100% ethanol 추출물에서 가장 높게 나타났으나 80% ethanol 추출물과 유의적인 차이가 없었다. 지질 과산화 저해능은 100% ethanol 추출물이 91.45%로 가장 높게 나타났고, 80% ethanol 추출물은 72.90% 및 60% ethanol 추출물은 73.77%의 억제 효과를 나타내었다. 간 세포에서 TBHP로 유도한 산화적 스트레스에 대하여 여주잎 추출물 최대 87.44%의 세포 보호 효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 여주잎 추출물은 농도 의존적으로 활성산소종의 생성을 효과적으로 억제시켰다. 본 연구 결과, 여주잎은 우수한 항산화 활성과 간세포 보호 효과를 나타냈으며, 천연 항산화제로서 활용 가능성을 보여주었다.

#### 저자 정보

- 전아영(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 000-0003-3721-753X)
- 천원영(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 0000-0002-5578-3693)
- 윤지민(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 0000-0002-0341-6736)
- 김대중(국립농산물품질관리원 시험연구원, 농업연구사, 0000-0001-8324-5502)
- 김영화(경성대학교 식품응용공학부, 교수, 0000-0003-4186-887X)

#### 감사의 글

이 성과는 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2017R1C1 B1008236)이며, 일부 2020년도 Brain Busan 21 플러스 사업에 의하여 지원되었고, 이에 감사드립니다.



## Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

- Ahn MJ, Yuk HJ, Lee HY, Hwang CE, Jeong YS, Hong SY, et al. 2015. Effect of the enhanced biological activities and reduced bitter taste of bitter melon (*Momordica charantia* L.) by roasting. *J Agric Life Sci.*, 49:107-119
- AOAC. 2016. Official methods of analysis of the AOAC. Association of Official Agricultural Chemists International, Gaithersburg, MD, USA, chapter 45, pp 9-10
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200
- Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. 2009. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Med Crop Sci.*, 17:15-20
- Cha JY, Kim YT, Kim HS, Cho YS. 2008. Antihyperglycemic effect of stem bark powder from paper mulberry (*Broussonetia kazinoki* Sieb.) in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J Med Food.*, 11:499-505
- Cha MN, Oh MS. 1996. Changes in mineral content in several leaf vegetables by various cooking methods. *Korean J Soc Food Sci.*, 12(1):34
- Cheon W, Seo D, Kin Y. 2019. Antioxidative and hepatocyte protective effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves cultivated in Korea. *Korean J Food & Nutr.*, 32(1):33-40
- Choi JR, Choi JM, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY. 2014. The protective effects of protocatechuic acid from *Momordica charantia* against oxidative stress in neuronal cells. *Korean J Pharmacogn.*, 45:11-16
- Choi YH. 2003. Changes in vitamin C and minerals content of Perilla leaves by different cooking methods. *Korean J Soc Food Cookery Sci.*, 19(2):174-180
- Dragsted LO. 2003. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res.*, 73:112-119
- Emerit J, Chaudiere J. 2008. Free radicals and lipid peroxidation in cell pathology. In handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press. pp 177-185
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. *J Biol Chem.*, 12:239-249
- Gómez R, Campos DA, Oliveira A, Aguilar CN, Madureira AR, Pintado M. 2020. A chemical valorisation of melon peels towards functional food ingredients: Bioactives profile and antioxidant properties. *Food Chem.*, 335:127-579
- Grover JK, SP Yadav. 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharm.*, 93:123-132
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186:1-85
- Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. 2002. Dietary carotenoids, serum beta-carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *Am J Epidemiol.*, 156:536-547
- Huang MT, Osawa T, HO T, Rosen RT. 1994. Food phytochemicals for cancer prevention. *J Am Chem Soc.*, 50:71-73
- Huang WC, Tsai TH, Huang CJ, Li YY, Chyuan JH, Chuang LT, Tsai PJ. 2015. Inhibitory effects of wild bitter melon leaf extract on *Propionibacterium aces*-induced skin inflammation in mouse and cytokine production *in vitro*. *Food & Func.*, 162:1-42
- Hurrell S, Hsu WH. 2017. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.*, 40:257-262
- Hwang ES. 2018. Comparison of antioxidant capacity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity between bitter melon (*Momordica charantia*) fruit and leaf extract. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 8:189-193
- Kang JR, Kang MJ, Kim GW, Shin JH. 2018. Physicochemical characteristics and physiological activity of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) from different regions. *Korean J Food & Nutr.*, 47:253-262
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food & Nutr.*, 27:978-984
- Karaman K, Dalda-Sekerci A, Yetisir H, Gulsen O, Coskun OF. 2018. Molecular, morphological and biochemical characterization of son Turkish bitter melon (*Momordica charantia* L.) genotypes. *Ind Crops Prod.*, 123:93-99
- Kim HJ, Seleshe S, Ameer A, Kim BJ, Park JG, Kang SN. 2020. Antioxidant and antimicrobial activity in oat (*Avena sativa* L.) leaf extracts and its effect on the characteristics of emulsion sausage. *J Agric Life Sci.*, 54(2):83-92
- Kim YS, Hwang JW, Park PJ, Jeong JH. 2014. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Chrysanthemum boreale* on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 43(1):60-66

- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011a. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang Cells. *Korean J Food & Nutr.*, 40(11):1525-1531
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011b. Antioxidant activities of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 40(12):1642-1647
- Kwon DK, Son YJ, Park H. 2019. The effect of acetic acid fermented onion vinegar supplementation and acute swimming exercise on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of rats fed a high-fat diet. *Korean J Sports Med Acronym.*, 28:875-884
- Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, Seo YW. 2003. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Korean J Soc Biotechnol Bioeng.*, 18:165-169
- Lee KM, Kwon TY, Kang U, Seo EK, Yun JH, Nho CW, Kim YS. 2017. Tussilagonone-induced Nrf2 pathway activation protects HepG2 cells from oxidative injury. *Food Chem Toxicol.*, 108:120-127
- Lee OH, Lee HB, Lee J, Son JY, Rhee SK, Kim HD, Kim YC, Lee BY. 2005. Chemical properties of olive and bay leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 34(4):503-508
- Lee SN. 2014. The antioxidant effect of rutin in human dermal fibroblasts damaged by reactive oxygen species. *Korean J Aesthet Cosmetol.*, 12(6):831-836
- Lee YS. 2007. Physiological activities of ethanol extracts from different parts of *Ailanthus altissima*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 36:389-394
- Leibovitz BE, Siegel BV. 1980. Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Gerontol.*, 35:45-56
- Limtrakul P, Khantamat O, Pintha K. 2004. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 54:525-530
- Oh DY, Kim HS. 2019. Evaluation of oxidation inhibition and nitrogen oxide scavenging activity from *Curcuma longa* L. extracts. *J Korean Appl Sci Technol.*, 36(1):13-22
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn J Nutr Diet.*, 44:307-315
- Perron NR, Brumaghim JL. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.*, 53:75-100
- Phillips KM, Tarrago-Trani MT, Gebhardt SE, Exler J, Patterson KY, Haytowitz DB, Pehrsson PR, Holden JM. 2010. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J Food Compos Anal.*, 23:253-259
- Reddy BS, Reddy RKK, Reddy BP, Ramakrishna S, Diwan PV. 2008. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.*, 46:3429-3442
- Rhim TJ, Lim SC. 2005. The hepatoprotective and antioxidative effects of onion (*Allium cepa*) extracts in rat hepatocyte primary culture. *Korean J. Plant Res.*, 18(1):52-60
- Siriwardhana N, Lee KW, Jeon YJ, Kim SH, Haw JW. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Technol Int.*, 9:339-346
- Yeon SH, Ham H, Sung J, Kim Y, Namkoong S, Jeong HS, Lee JS. 2013. Antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 42:1525-1532
- Zhang M, Hettiarachchy NS, Horax R, Chen P, Over KF. 2009. Effect of maturity stages and drying methods on the retention of selected nutrients and phytochemicals in bitter melon (*Momordica charantia*) leaf. *J Food Sci.*, 74:C441-C448
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64:555-559
- Food safety Korea. 2020. Available from: <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/foodMaterial/foodMaterialDB.do>, [accessed 2020. Oct. 03]