



Cognitive improvement effects of *Momordica charantia* in amyloid beta-induced Alzheimer's disease mouse model

Seung Mi Sin^{1,2} · Ji Hyun Kim² · Eun Ju Cho³ · Hyun Young Kim²

여주의 amyloid beta 유도 알츠하이머질환 동물 모델에서 인지능력 개선 효과

신승미^{1,2} · 김지현² · 조은주³ · 김현영²

Received: 14 July 2021 / Accepted: 24 August 2021 / Published Online: 30 September 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract Accumulation of amyloid beta (A β) and oxidative stress are the most common reason of Alzheimer's disease (AD). In the present study, we investigated the cognitive improvement effects of butanol (BuOH) fraction from *Momordica charantia* in A β ₂₅₋₃₅-induced AD mouse model. To develop an AD mouse model, mice were received injection of A β ₂₅₋₃₅, and then orally administered BuOH fraction from *M. charantia* at doses of 100 and 200 mg/kg/day during 14 days. In the T-maze and novel object recognition test, administration of BuOH fraction from *M. charantia* L. at doses of 100 and 200 mg/kg/day improved spatial ability and novel object recognition by increased explorations of novel route and new object. In addition, BuOH fraction of *M. charantia*-administered groups improved learning and memory abilities by decreased time to reach hidden platform in Morris water maze test. Oral administration of BuOH fraction from *M.*

charantia significantly inhibited lipid peroxidation and nitric oxide levels in the brain, liver, and kidney compared with A β ₂₅₋₃₅-induced control group. These results indicated that BuOH fraction of *M. charantia* improved A β ₂₅₋₃₅-induced cognitive impairment by attenuating oxidative stress. Therefore, *M. charantia* could be useful for protection from A β ₂₅₋₃₅-induced cognitive impairment.

Keywords Alzheimer's disease · Amyloid beta · Cognition · *Momordica charantia* · Oxidative stress

서론

알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)은 공간인지능력, 물체인지능력, 학습·기억력 등 전반적인 인지능력 손상을 특징으로 하는 대표적인 신경퇴행성질환이다[1,2]. AD는 뇌내 amyloid beta (A β) plaque 형성, 타우 단백질 축적, 콜린성 신경장애, 신경염증반응 등 다양한 원인에 의해 발병하는 것으로 알려져 있다[2,3]. 특히 아밀로이드 전구 단백질로부터 유래된 39-43개의 아미노산 펩타이드 형태인 A β 는 AD의 대표적인 원인으로 알려져 있다[4].

뇌내 A β 는 신경세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도하는 것으로 보고되었다[5]. 과다한 A β 축적으로 인한 신경독성은 뇌에서 reactive oxygen species (ROS)를 생성하고, 이는 reactive nitric species (RNS)의 일종인 nitric oxide (NO) 생성을 증가시킨다[5,6]. 산화적 스트레스로 인해 과생성되어진 ROS 및 RNS는 뇌 신경세포막의 지질과산화물을 유도하여 신경세포의 구조적 기능적 손상을 초래한다[6]. 뿐만 아니라, A β 로

Hyun Young Kim (✉)
E-mail: hyunyoung.kim@gnu.ac.kr

¹Anti-Aging Research Group, Gyeongnam Oriental Anti-Aging Institute, Sancheong 52215, Republic of Korea

²Department of Food Science, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

³Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, 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.

인한 산화적스트레스는 DNA 및 RNA 손상, 단백질 변형, 신경세포 사멸 등을 유도하여 결국 뇌 인지능력의 손상을 일으킨다[7]. 따라서 국내외 많은 연구에서 독성과 부작용이 적은 천연물 유래 소재로부터 AD 예방 및 개선용 소재로서의 가능성을 찾고자 한다[8,9].

여주(*Momordica charantia* L.)는 박과에 속하는 덩굴성 한해살이풀으로, 한국, 중국 및 일본에서 약용식물로 널리 이용되고 있다[10]. 여주는 glucoside, saponin, alkaloid, oil, tri-terpene, steroid, vitamin C, beta-carotene 등의 생리활성성분을 함유하고 있으며, 항산화, 항염증, 항당뇨, 항암, 항균 효능 등의 체내 효능이 보고되었다[10-14]. 특히 여주 추출물은 산화적 손상이 유도된 신경세포에서 항산화 효소 발현 등의 조절을 통해 신경세포 보호 효능을 나타내었으며, scopolamine으로 단기 기억력 손상이 유도된 동물 모델에서 기억력 개선 효능이 보고된 바 있다[15,16]. 사전 연구를 통해 여주의 다양한 추출물 및 분획물로부터 염증 및 산화적 스트레스 개선 효능을 확인한 결과, butanol (BuOH) 분획물이 우수한 NO 생성 억제 효능을 나타내어 활성분획물을 확인하였다[17,18]. 그러나 AD의 대표적인 원인으로 알려진 A β 유도 인지능 손상 동물모델에서 여주 활성분획물인 BuOH 분획물의 인지능 개선 효능에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 A β 로 인지능 손상이 유도된 AD 동물 모델에서 여주 BuOH 분획물의 인지능 개선 효과에 대해 알아보하고자 한다.

재료 및 방법

시료

2010년 경상남도 함양군에서 생산된 여주를 함양군영농조합법인(Hamyang, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 동결건조시킨 여주(1 kg)를 methanol로 12시간 동안 3회 반복 추출하여 methanol 추출물(305.5 g)을 얻었으며, 용매분획을 실시하여 얻어진 BuOH 분획물(9.2 g)을 얻어 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

A β_{25-35} , malondialdehyde (MDA), griess reagent, NaNO₂는 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Thiobarbituric acid (TBA)는 Lancaster Synthesis (Ward Hill, NY, USA)에서, phosphoric acid와 1-butanol은 Samchun Pure Chemical, Co (Gyeonggi, Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였다. 흡광도는 microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) 기기를 사용하여 측정하였다.

실험동물 및 실험군의 배치

5주령의 ICR 마우스(25-28 g, 수컷, 계통: CrIjOri:CD1) 28마리를 (주)오리엔트바이오(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 1주일간 사육 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 사육실의 온도 및 습도는 각각 20±2 °C, 50±10%를 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다. 실험동물은 퓨리나(조단백질 단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6%) 고형사료와 음용수를 정수한 물을 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 정상군(normal군), A β_{25-35} 를

처리하여 인지능 손상을 유도한 군(control군), A β_{25-35} 처리 후 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg 혹은 200 mg/kg 위내투여군으로 총 4군으로 나누어 실험을 진행하였으며, 각 군당 7마리씩 배치하였다. 실험 종료 전 14일간 normal군과 control군은 음용수를, 여주 BuOH 분획물군은 음용수에 녹인 여주 BuOH 분획물을 각각 100 mg/kg/day 또는 200 mg/kg/day의 농도로 존대와 주사기를 이용하여 일정한 시간에 위내투여하였다. 모든 실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: PNU-2010-000142) 하에 수행되었다.

실험동물의 인지능 손상 유도

인지능 손상을 유도하기 위해 사용된 A β_{25-35} 는 실험 직전 생리식염수에 5 nM의 농도로 희석한 뒤, 37 °C에서 72시간 동안 응집시켜 실험에 사용하였다. Laursen과 Belknap 방법(1986)에 따라 ICR 마우스에 A β_{25-35} 를 주입하여 AD 동물 모델을 유도하였다[19]. 26-Gauge needle이 달려있는 10 μ L Hamilton microliter syringe로 각 실험동물의 정수리[bregma (두개골 계측점)에서 caudal (꼬리쪽) 방향으로 0.5 mm, midline (정중선)에서 오른쪽으로 1.0 mm]에 2.2 mm 깊이로 A β_{25-35} 5 μ L의 양을 약 30초 동안 주입하여 인지능 손상을 유발하였다. Normal군의 경우 동일한 방법으로 생리식염수를 주입하였다.

T-미로 실험

검정색 아크릴로 제작된 T형 미로는 출발 상자, 왼쪽 통로, 오른쪽 통로로 구성되어있으며, 오른쪽 통로에는 분리할 수 있는 차단 문을 설치하였다. 실험 하루 전날 차단 문으로 T-미로의 오른쪽 통로를 막고, 왼쪽 통로는 개방한 상태로 실험동물을 출발시점에서 출발시켜 10분간 자유롭게 탐색하도록 하였다. 24시간 뒤, 차단 문을 제거하여 왼쪽 통로와 오른쪽 통로를 개방하고 실험동물을 출발시점에서 출발시켜 10분 동안 왼쪽 통로(old route)와 오른쪽 통로(new route)에 들어간 횟수를 각각 기록하였다. 매 실험이 끝날 때마다 70% ethanol로 T형 미로를 소독하면서 실험을 진행하였다[20].

물체인지실험

실험 하루 전날 검은색 아크릴로 만든 박스 내에 크기와 모양이 똑같은 물체(A1과 A2)를 배치한 뒤, 실험동물을 배치시켜 10분간 두 물체를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 24시간 뒤 두 물체 중 하나의 물체를 모양과 크기가 다른 새로운 물체로 바꾸고(A1과 B), 실험동물을 10분간 기존 물체(old object, A1)와 새로운 물체(new object, B)를 자유롭게 탐색하도록 하고 각각의 탐색 횟수를 기록하였다. 매 실험이 끝날 때마다 70% ethanol로 물체인지실험 박스를 소독하면서 실험을 진행하였다[21].

수조미로실험

수조(지름 150 cm, 높이 30 cm)를 균등하게 사등분하고, 벽면에는 공간단서(visual cue)로 서로 다른 표식을 부착시켰다. 한 구역의 중앙에 물의 수면으로부터 1 cm 아래에 원형 도피대(지름 9 cm)를 위치시키고, 22±2 °C의 물을 채운 뒤 실험동물이 직접 도피대를 찾을 수 없도록 흰색 물감(Poster color, ShinHan) 첨가하였다. 실험동물을 각 사분면의 중앙에서 출발시킨 뒤, 60초

간 자유롭게 수조를 탐색하도록 하였다. 만일 60초가 경과하여도 실험동물이 도피대를 찾지 못하면 실험자가 실험동물을 도피대로 유도하여 15초간 도피대 위치와 공간단서를 인식시켰다. 이는 하루에 4시간 간격으로 3번씩 3일 동안 도피대의 위치를 인식할 수 있도록 학습시켰다. 4일째에는 실험동물의 인지능력을 확인할 수 있는 세가지 실험을 실시하였다. 첫 번째 실험은 흰색 물감을 탄 수조에 도피대(hiddenplatform)를 위치시키고 60초 간 실험동물이 도피대에 찾아가는 시간을 각각 측정하였다. 두 번째 실험은 흰색 물감을 탄 수조에서 도피대를 제거하고, 60초 내에 실험동물이 도피대가 있었던 사분면에 머문 시간을 측정하였다. 세 번째 실험은 흰색 물감을 타지 않은 수조에 도피대(exposed platform)를 위치시키고 60초 이내에 마우스가 도피대에 찾아가는 시간을 측정하였다[22].

지질과산화 함량 측정

실험동물의 뇌, 간, 신장 조직을 homogenizer를 이용하여 생리식염수로 균질화 시킨 뒤, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 조직 상층액을 얻었다. 각 조직 상층액에 1% phosphoric acid와 0.67% TBA용액을 첨가한 뒤, 45분간 boiling 시켰다. 각 반응물에 1-butanol을 첨가한 뒤, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 뒤 얻은 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물 생성량은 MDA 표준곡선을 이용하여 산출하였다[23].

NO 생성량 측정

실험동물의 뇌, 간, 신장 조직을 생리식염수를 이용하여 균질화 시킨 상층액 150 µL와 증류수 130 µL을 혼합한 뒤, griess reagent를 동량으로 첨가하여 빛을 차단한 후 실온에서 반응시켰다. 30분 뒤, 각 반응물을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 NaNO₂ 표준곡선을 이용하여 산출하였다[24].

통계분석

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test ($p < 0.05$)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다. 각 군내 두 지표의 비교는 Student's *t*-test ($p < 0.05$)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

T-미로 실험은 실험동물인 mouse가 새로운 공간에 대한 호기심이 많은 동물인 점을 착안하여 고안한 실험으로, 실험동물의 자발적인 선택은 탐구적인 행동 측정에 이용된다[20]. 본 연구에서 사용된 Aβ₂₅₋₃₅ 유도 AD 동물 모델은 old route와 new route를 탐색하는 비율에 차이를 나타내지 않아 공간인지능력

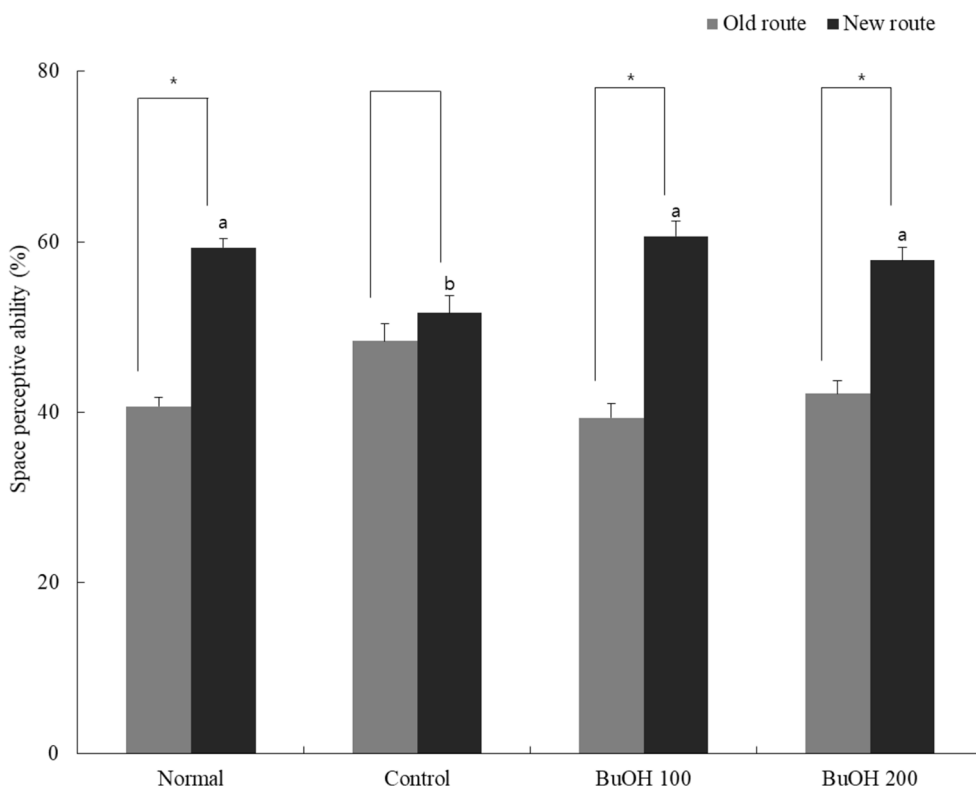


Fig. 1 Spatial alternation test in the T-maze test. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of water; BuOH 100, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means ± SD. ^{a,b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. *The space perceptive abilities for old and new routes are significantly different as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$)

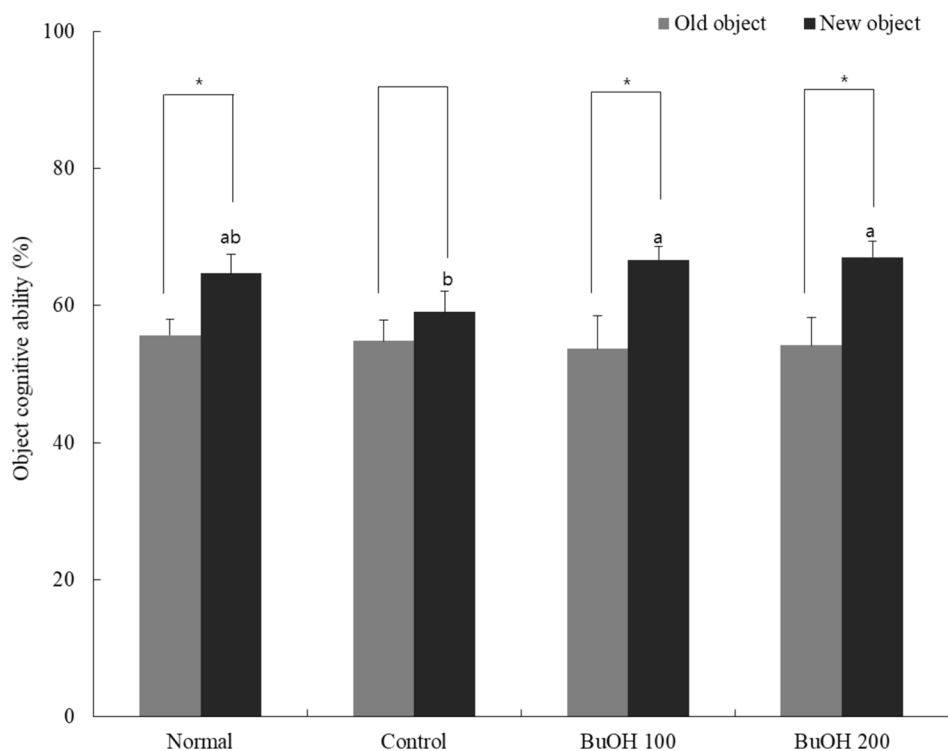


Fig. 2 Object recognition test in novel object recognition test. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of water; BuOH 100, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means \pm SD. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. *The space perceptive abilities for old and new objects are significantly different as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$)

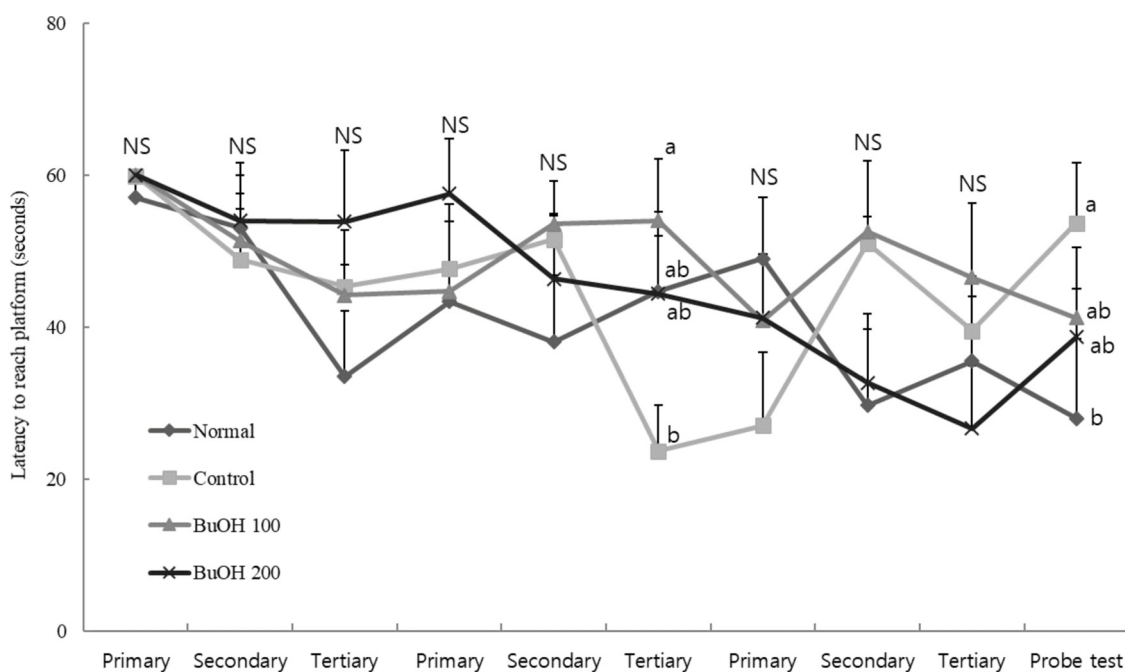


Fig. 3 Effect of butanol fraction from *Momordica charantia* on spatial learning and memory impairment in mice by injection of $A\beta_{25-35}$ in Morris water maze test. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of water; BuOH 100, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means \pm SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NS, non-significance

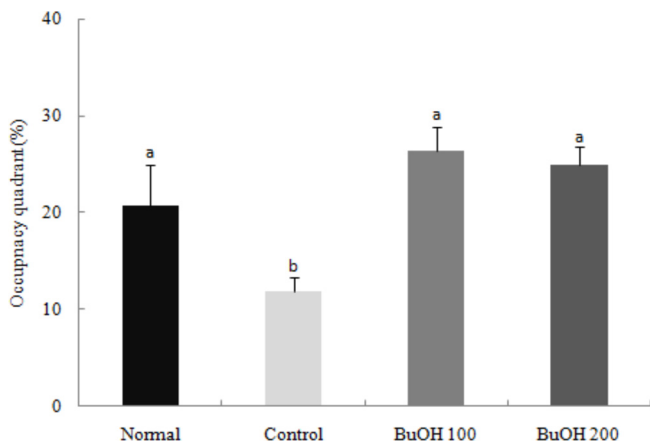


Fig. 4 Effect of butanol fraction from *Momordica charantia* on memory impairment in mice by injection of $A\beta_{25-35}$ in Morris water maze test. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of water; BuOH 100, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means \pm SD. ^{a,b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

손상이 유도됨이 보고되었다[25]. 따라서 본 실험에서 T-미로 실험을 이용하여 AD 동물모델에서 여주 BuOH 분획물의 공간인지능력 개선 효과를 확인하고자 하였다(Fig. 1). $A\beta_{25-35}$ 를 주입

하여 AD를 유도한 control군의 경우 old route와 new route를 탐색하는 비율이 각각 48.36%와 51.64%로 new route에 대한 인지도의 차이를 나타내지 않아 공간인지능력이 손상된 것을 확인 할 수 있었다. 반면 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 농도 투여군의 경우 new route를 인지하는 비율이 각각 60.65% 및 59.29%의 수치로 증가하여 new route를 탐색하는 비율이 control군에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 따라서 여주 BuOH 분획물 투여는 새로운 공간을 탐색하는 비율 증가를 통해 $A\beta_{25-35}$ 로 인해 손상된 공간학습능력에 대한 개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

물체인지실험은 mouse의 새로운 물체에 대한 자연스러운 호기심을 이용하여 물체를 탐지하는 횟수를 기록하여 물체인지능력을 측정하는 실험이다[21]. 실험동물에 동일한 두 물체를 제시했을 경우 통상적으로 두 물체를 만지는 횟수가 비슷하나, 24 시간 뒤 새로운 물체를 제시하면 자연스럽게 호기심이 유발되어 새로운 물체를 만지는 비율이 더 커지게 된다[21]. 본 실험에서 물체인지실험을 이용하여 AD 동물모델에서 여주 BuOH 분획물의 물체인지능력 개선 효과를 확인하였다(Fig. 2). $A\beta_{25-35}$ 에 의해 AD가 유도된 control군에서는 기존 물체와 새로운 물체를 탐색하는 정도가 각각 54.82% 및 59.05%로 두 물체 간 인지도의 차이를 나타내지 않아 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 물체인지능력 손상이 유도되었음을 알 수 있었다. 반면 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군에서는 새로운 물체를 탐색하는 비율이 각각 66.68% 및 67.06%의 수치를 나타내어 새로운 물체에 대한 접촉 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 여주 BuOH 분획물 투여는 AD 동물모델에서 새로운 물

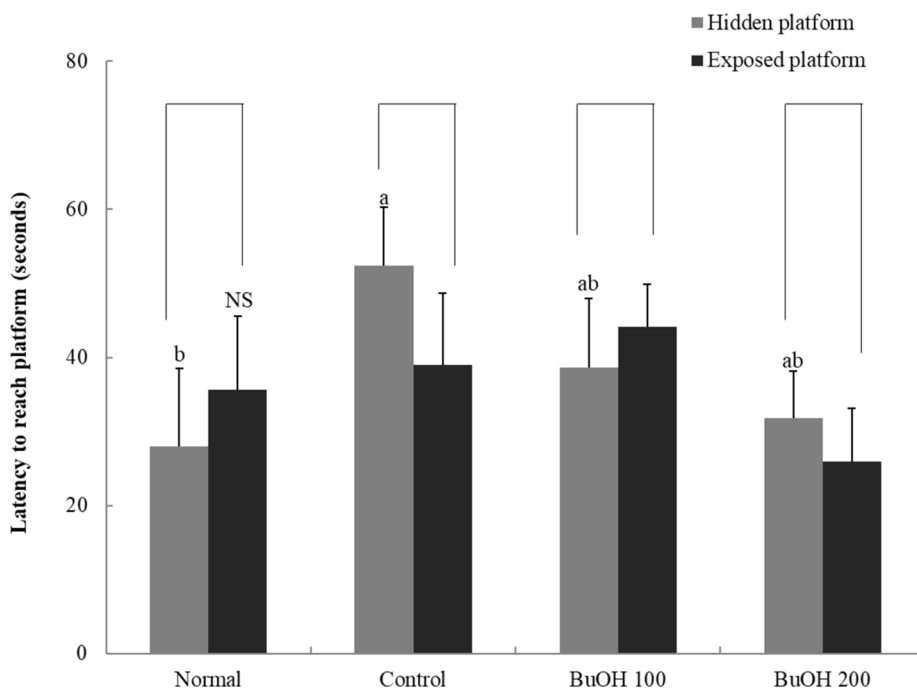


Fig. 5 The latency to reach hidden and exposed platform in Morris water maze test. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of water; BuOH 100, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means \pm SD. ^{a,b,c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NS, non-significance

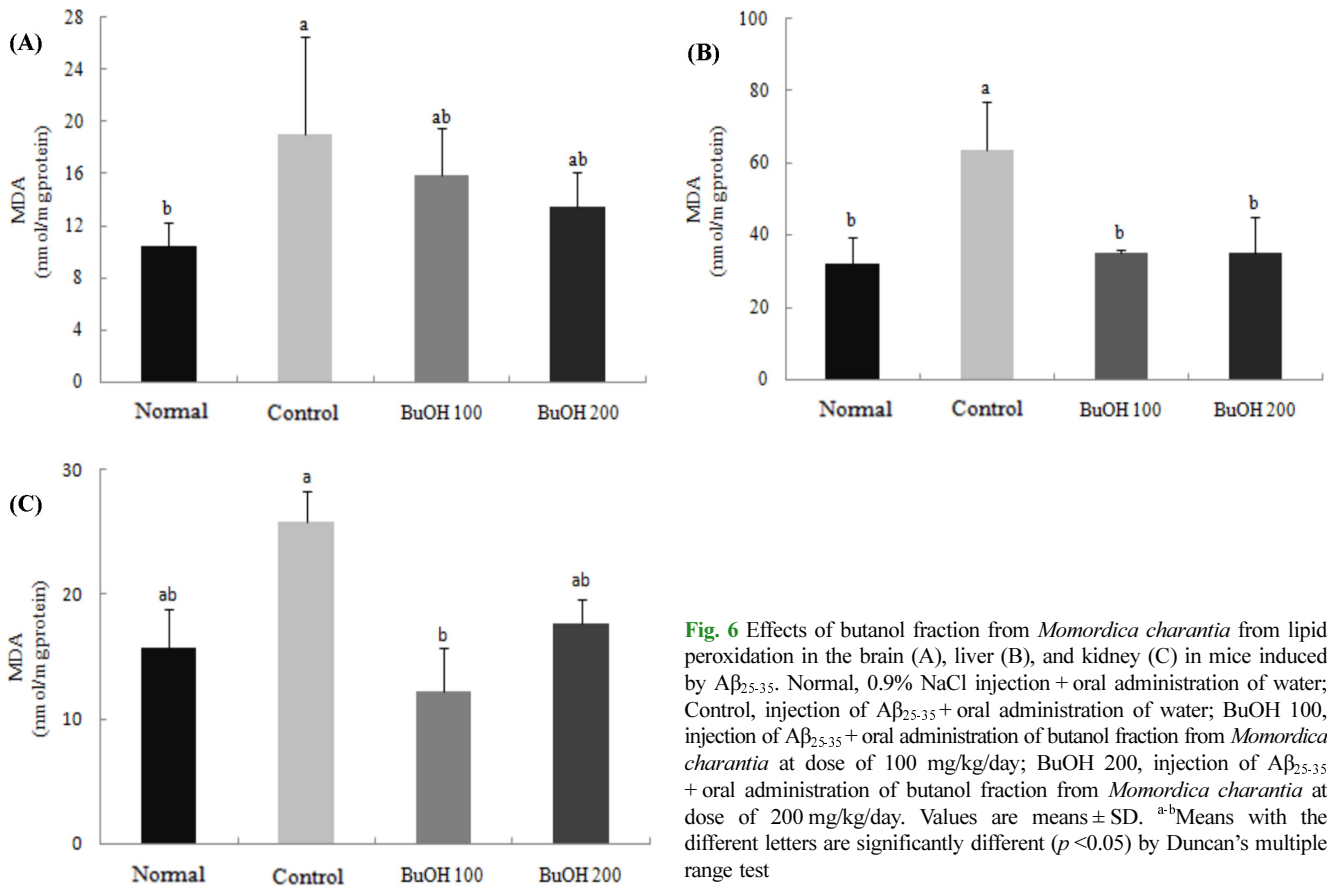


Fig. 6 Effects of butanol fraction from *Momordica charantia* from lipid peroxidation in the brain (A), liver (B), and kidney (C) in mice induced by $A\beta_{25-35}$. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of water; BuOH 100, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of $A\beta_{25-35}$ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means \pm SD. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

체에 대한 탐색 비율이 증가하여 물체인지능력 개선 효과가 있음을 알 수 있었다.

수조미로실험은 실험동물의 학습·기억력을 측정하기 위한 실험으로, 수조의 벽면에 있는 공간단서들을 이용하여 위치를 인지하고 반복을 통해 학습·기억력을 측정하는 실험이다[22]. 본 연구에서 수조미로실험을 통해 AD 동물모델에서 여주 BuOH 분획물 투여가 학습 및 기억력 개선에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 하루 3번씩 3일동안 공간인지 훈련을 실시한 뒤 4일째 실험한 결과(Fig. 3), 훈련을 반복할수록 normal군은 숨겨진 도피대를 찾아가는 시간이 감소하였으나 control군은 normal군에 비해 감소하지 않아 $A\beta_{25-35}$ 로 인해 학습·기억력 손상이 유발된 것을 알 수 있었다. 반면 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 농도로 투여한 군의 경우 control군에 비해 숨겨진 도피대를 찾아가는 시간이 감소하였다. 4일째 실험에서 도피대를 치우고 도피대가 있던 사분면에 mouse가 머문 시간의 비율을 측정한 결과(Fig. 4), normal군의 경우 20%인 반면 AD를 유도한 control군의 경우 11.8%의 수치를 나타내었다. 이를 통해 control군은 normal군에 비해 도피대가 있던 사분면에 머문 시간이 감소하여 학습·기억력이 손상된 것으로 사료된다. 또한 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군의 경우 도피대가 있던 사분면에 머문 비율이 각각 26.3% 및 25.0% 수치를 나타내어, 도피대가 있던 사분면에서 도피대를 찾기 위해 머문 시간이 증가하여 학습·기억력 개선 효과를 나타내었다. 또한 실험동물이 도피대를 찾아가는 것

이 학습·기억력이 아닌 운동능력 또는 시각능력에 의한 것인지를 알아보기 위해, 실험동물이 수영하면서 도피대를 직접 볼 수 있도록 실험한 결과(Fig. 5), 모든 군에서 노출된 도피대를 찾아가는 시간에 대한 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 실험동물이 도피대를 찾아가는 것이 운동능력 또는 시각능력에 의한 것이 아니라 학습·기억력에 의한 것임을 확인 할 수 있었다. 이전연구에서 여주로부터 분리한 활성물질인 protocatechuic acid는 $A\beta_{25-35}$ 로 AD를 유도한 동물 모델에서 공간인지, 물체인지 및 학습·기억력 개선 효과를 나타내었다[26]. 따라서 여주는 기억력 및 인지기능 개선 효능이 있는 것으로 사료된다.

뇌에서 $A\beta$ 로 인한 신경독성은 산화적 스트레스를 일으키고, 이는 뇌의 지질과산화물을 유도하여 구조적·기능적 손상을 초래한다[27]. 이전 연구에 의하면 AD 환자와 동물의 뇌에서 지질과산화 반응 결과 생성되는 물질인 MDA 함량이 유의적으로 증가하였다[28,29]. 따라서 MDA 함량은 지질과산화로 인한 산화적 스트레스 정도를 측정하기 위한 대표적인 지표로 알려져 있다[29]. 본 연구에서는 AD 동물모델에서 산화적 손상에 대한 개선 효과를 확인하기 위해 실험동물의 뇌, 간, 신장 조직 내 MDA 생성량을 측정하여 여주 BuOH 분획물의 지질과산화 억제 효과를 확인하였다. 뇌 조직의 MDA 측정 결과(Fig. 6A), control군의 경우 18.98 nmol/mg protein의 수치를 나타내어 normal군에 비해 유의적으로 증가하여 지질과산화가 유도되었음을 확인하였다. 반면 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군의 경우 각각 15.88 및 15.42 nmol/mg

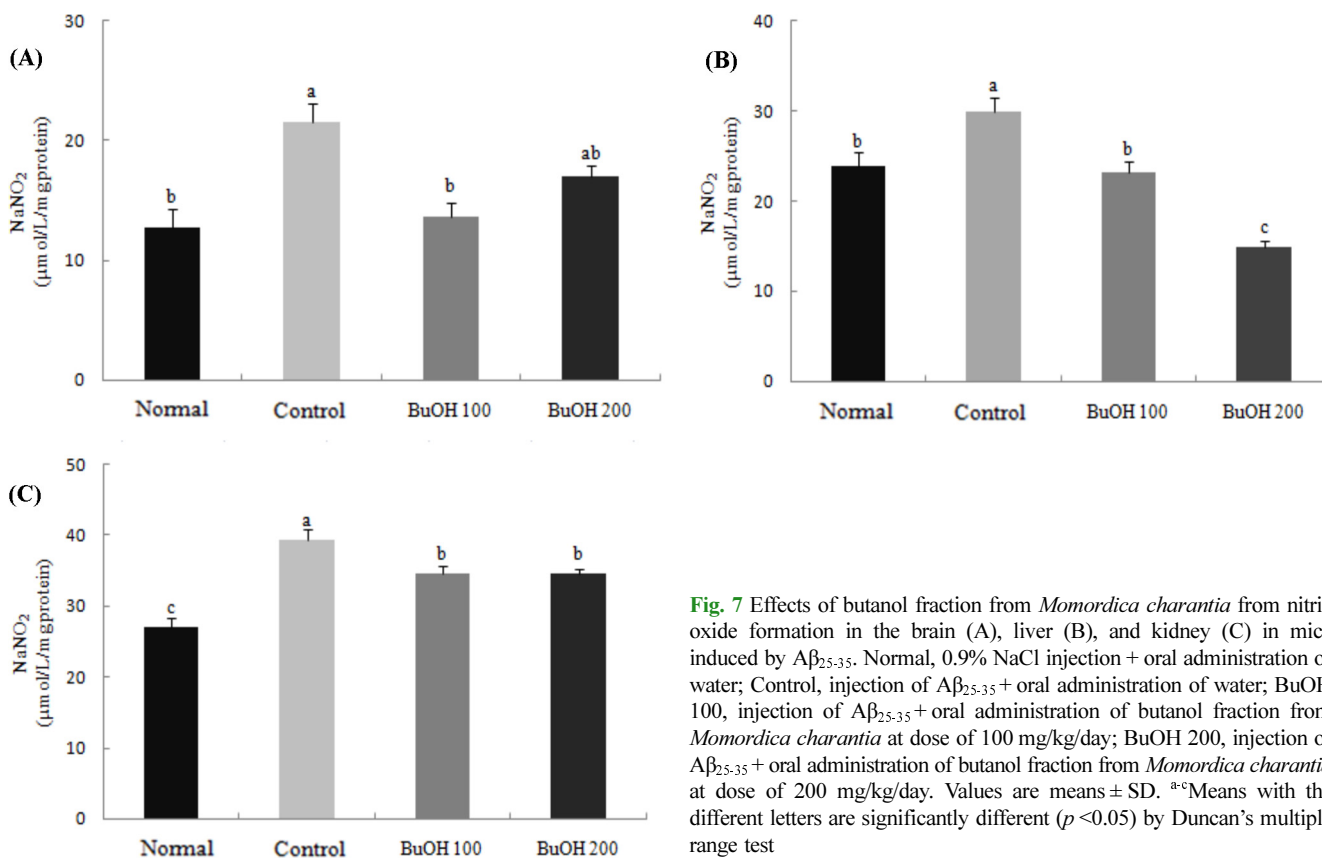


Fig. 7 Effects of butanol fraction from *Momordica charantia* from nitric oxide formation in the brain (A), liver (B), and kidney (C) in mice induced by Aβ₂₅₋₃₅. Normal, 0.9% NaCl injection + oral administration of water; Control, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of water; BuOH 100, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 100 mg/kg/day; BuOH 200, injection of Aβ₂₅₋₃₅ + oral administration of butanol fraction from *Momordica charantia* at dose of 200 mg/kg/day. Values are means ± SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different (*p* < 0.05) by Duncan’s multiple range test

protein의 수치를 나타내어 control군에 비해 MDA 수치가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 간 조직의 MDA 생성량을 측정된 결과(Fig. 6B), normal군은 32.18 nmol/mg protein의 수치를 나타낸 반면 control군에서는 64.33 nmol/mg protein의 수치를 나타내어 유의적으로 MDA 생성량이 증가하였다. 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군의 간 조직 내 MDA 생성량 측정 결과 각각 34.83 및 35.03 nmol/mg protein으로 control군에 비해 유의적으로 감소한 수치를 확인하였다. 신장 조직의 MDA 생성량을 측정된 결과(Fig. 6C), 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군의 신장 내 MDA 생성량 측정 결과 각각 12.24 및 17.64 nmol/mg protein의 수치를 나타내어 control군(25.81 nmol/mg protein)에 비해 감소하였다. 이전 연구에 의하면, 당뇨병 치매 동물 모델에 여주 추출물 처리 시 뇌 내 mitochondrial TBARS 생성량을 억제시켜 본 연구와 유사한 결과를 확인할 수 있었다[30]. 뿐만 아니라, 산화적 손상을 유도한 신경세포에 여주 추출물 처리 시 ROS 생성량 감소 및 항산화 효소 활성 증가를 나타내어, 산화적 손상에 대한 신경세포 보호 효과가 보고되었다[31,32]. 따라서 본 연구 결과를 통해 여주 BuOH 분획물은 실험동물의 뇌, 간, 신장 조직에서 지질과산화 개선을 통해 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

NO는 정상적인 상태에서 혈관 확장, 혈소판 응집 억제, 신경 전달, 염증반응 조절 등의 역할을 수행한다[33]. 그러나 NO가 과다하게 생성되었을 경우, peroxynitrite를 형성하여 뇌 조직에 손상을 일으킨다[34]. 특히 Aβ₂₅₋₃₅를 유도한 AD 동물의 뇌에서

NO가 과다하게 생성되어 인지능 및 기억력 손상을 초래하는 것으로 보고되었다[29]. 따라서 본 연구에서 뇌, 간, 신장 조직 내 NO 생성량을 측정하여 여주 BuOH 분획물의 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다. 뇌 조직에서의 NO 함량 측정 결과(Fig. 7A), AD를 유도한 control군은 21.53 μmol/L/mg protein의 NO 함량을 나타낸 반면 여주 BuOH 분획물 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 투여군은 각각 13.68 및 17.05 μmol/L/mg protein의 수치를 나타내어 control군에 비해 뇌 조직에서 NO 생성을 억제시켰다. 간 조직에서 NO 측정 결과(Fig. 7B), control군은 29.95 μmol/L/mg protein의 수치를 나타낸 반면 여주 BuOH 분획물 투여군은 control군에 비해 농도유적으로 NO 수치를 감소시켰다. 신장 조직에서 NO 측정 결과(Fig. 7C), control군은 39.32 μmol/L/mg protein의 수치를 나타내었고, 여주 BuOH 분획물을 투여한 군에서는 이보다 낮은 수치를 나타내어 NO 생성을 감소시켰다. 따라서 AD 동물모델에서 여주 BuOH 분획물 투여는 뇌, 간, 신장 조직에서 NO 생성을 억제시켜 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 신경염증을 유도한 신경교세포에 여주 활성물질인 protocatechuic acid 처리 시 NO 생성량을 유의적으로 억제시켰다[35]. 또한 산화적 손상을 유도한 신경세포에 여주 polysaccharide를 처리 했을 때 NO 생성량을 유의적으로 감소시켜, 여주 polysaccharide의 신경세포에서 산화적 스트레스 개선 효과가 보고되었다[36]. 따라서 여주는 뇌 내 산화적 스트레스에 대해 NO 생성 억제 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 AD 동물모델에서 여주 BuOH 분획물의 투

여 시 공간인지능력, 물체인지능력, 학습·기억력 개선 효과를 나타내었으며, 특히 이는 뇌, 간, 신장 조직에서 지질과산화 및 NO 생성 억제를 통한 산화적 스트레스 개선 효과로 인한 것임을 알 수 있었다. 따라서 여주는 AD 예방 및 개선용 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

초 록

뇌 내 amyloid beta (A β) 축적으로 인한 신경독성은 산화적 스트레스를 야기하여 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 여주(*Momordica charantia* L.)의 활성분획물인 butanol (BuOH) 분획물의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 AD 동물모델에서 인지능 개선 효과에 대해 연구하였다. T-미로 실험 및 물체인지실험을 통해서 여주 BuOH 분획물 100 및 200 mg/kg/day 농도 투여군은 AD를 유도한 control군에 비해 유의적으로 새로운 경로와 물체를 탐색하는 비율이 감소되어 공간인지 및 물체인지능력 개선 효과를 확인하였다. 수중미로실험을 통해 학습·기억력에 미치는 효과를 측정할 결과, 여주 BuOH 분획물 투여군은 훈련을 반복할수록 숨겨진 도피대를 찾아가는 시간이 감소함을 통해 학습·기억력 개선 효과를 나타내었다. 여주 BuOH 분획물이 산화적 스트레스 개선 효과에 미치는 효과를 확인하기 위해 뇌, 간, 신장 조직에서 지질과산화 함량 및 nitric oxide(NO) 생성량을 측정하였다. 여주 BuOH 분획물을 처리한 군은 A β ₂₅₋₃₅를 주입한 control군에 비해 유의적으로 뇌, 간, 신장 조직에서 지질과산화 함량 및 NO 생성량이 감소되어 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다. 따라서 본 연구는 여주 BuOH 분획물이 A β ₂₅₋₃₅ 유도 AD 동물 모델에서 산화적 스트레스 개선을 통해 인지능력 개선 효과를 나타냄을 확인하였으며, 이에 따라 여주는 AD 예방 및 개선용 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

Keywords 산화적 스트레스 · 아밀로이드 베타 · 알츠하이머 질환 · 여주 · 인지능

감사의 글 이 논문은 2020~2021년도 경상국립대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M (2019) Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* 14: 5541–5554. doi: 10.2147/IJN.S200490
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388: 505–517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1
- A Armstrong R (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57: 87–105. doi: 10.5114/fn.2019.85929
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38: 1205–1235. doi: 10.1038/aps.2017.28
- Chaignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 14: 450–464. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.014
- Chen Z, Zhong C (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 30: 271–281. doi: 10.1007/s12264-013-1423-y
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S (2015) The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol* 24: 325–340. doi: 10.5607/en.2015.24.4.325
- Long JM, Holtzman DM (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179: 312–339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001
- Ishiura S, Yoshida T (2019) Plant-based vaccines for Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 95: 290–294. doi: 10.2183/pjab.95.020
- Gürbüz I, Akyüz C, Yesilada E, Sener B (2000) Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *J Ethnopharm* 71: 77–82. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00178-6
- Oyedapo OO, Araba BG (2001) Stimulation of protein biosynthesis in rat hepatocytes by extracts of *Momordica charantia*. *Phytother Res* 15: 95–98. doi: 10.1002/ptr.682
- Grover JK, Yadav SP (2004) Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharm* 93: 123–132. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.035
- Jia S, Shen M, Zhang F, Xie J (2017) Recent advances in *Momordica charantia*: functional components and biological activities. *Int J Mol Sci* 18: 2555. doi: 10.3390/ijms18122555
- Dandawate PR, Subramaniam D, Padhye SB, Anant S (2016) Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chin J Nat Med* 14: 81–100. doi: 10.1016/S1875-5364(16)60002-X
- Kim KB, Lee S, Heo JH, Kim J (2017) Neuroprotective effects of *Momordica charantia* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SK-N-MC cells. *J Nutr Health* 50: 415–425. doi: 10.4163/jnh.2017.50.5.415
- Joshi A, Soni P, Malviya S, Kharia A (2017) Memory enhancing activity of *Momordica charantia* by scopolamine induced amnesia in rats. *IJCAP* 2: 11–18
- Sin SM, Mok SY, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY (2011) Protective effect of bitter melon (*Momordica charantia*) against oxidative stress. *Cancer Prev Res* 16: 86–92
- Sin SM, Mok S-Y, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY (2012) Anti-inflammatory effect of bitter melon (*Momordica charantia*) in RAW 264.7 cell. *Cancer Prev Res* 17: 56–61
- Laursen SE, Belknap JK (1986) Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 16: 355–357. doi: 10.1016/0160-5402(86)90038-0
- Montgomery KC (1952) A test of two explanations of spontaneous alternation. *J Comp Physiol Psychol* 45: 287–293. doi: 10.1037/h0058118
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1: 1306–1311. doi: 10.1038/nprot.2006.205
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47–60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Schmidt HH, Warner TD, Nakane M, Förstermann U, Murad F (1992) Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 41: 615–624
- Lee AY, Hwang BR, Lee MH, Lee S, Cho EJ (2016) *Perilla frutescens* var. *japonica* and rosmarinic acid improve amyloid- β ₂₅₋₃₅ induced impairment of cognition and memory function. *Nutr Res Pract* 10: 274–281. doi: 10.4162/nrp.2016.10.3.274
- Choi JR, Kim JH, Lee S, Cho EJ, Kim HY (2020) Protective effects of protocatechuic acid against cognitive impairment in an amyloid beta-

- induced Alzheimer's disease mouse model. *Food Chem Toxicol* 144: 111571. doi: 10.1016/j.fct.2020.111571
27. Butterfield DA, Boyd-Kimball D (2018) Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 62: 1345–1367. doi: 10.3233/JAD-170543.
 28. Butterfield DA, Lauderback CM (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 32: 1050–1060. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00794-3
 29. Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73–82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711
 30. Malik ZA, Singh M, Sharma PL (2011) Neuroprotective effect of *Momordica charantia* in global cerebral ischemia and reperfusion induced neuronal damage in diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 133: 729–734. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.061
 31. Kim KB, Lee S, Kang I, Kim JH (2018) *Momordica charantia* ethanol extract attenuates H₂O₂-induced cell death by its antioxidant and anti-apoptotic properties in human neuroblastoma SK-N-MC cells. *Nutrients* 10: 1368. doi: 10.3390/nu10101368
 32. Nerurkar PV, Johns LM, Buesa LM, Kipyakwai G, Volper E, Sato R, Shah P, Feher D, Williams PG, Nerurkar VR (2011) *Momordica charantia* (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 8: 64. doi: 10.1186/1742-2094-8-64
 33. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 4: 3–24. doi: 10.1093/humupd/4.1.3
 34. Picón-Pagès P, García-Buendía J, Muñoz FJ (2019) Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865: 1949–1967. doi: 10.1016/j.bbdis.2018.11.007
 35. Kim J-H, Choi JR, Cho EJ, Kim HY (2020) Protective effect of protocatechuic acid, phenolic compound of *Momordica charantia*, against oxidative stress and neuroinflammation in C6 glial cell. *J Korean Med Obes Res* 20: 10–19. doi: 10.15429/jkomor.2020.20.1
 36. Gong J, Sun F, Li Y, Zhou X, Duan Z, Duan F, Zhao L, Chen H, Qi S, Shen J (2015) *Momordica charantia* polysaccharides could protect against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting oxidative stress mediated c-Jun N-terminal kinase 3 signaling pathway. *Neuropharmacology* 91: 123–134. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.020