

산화적 스트레스에 대한 여주 (*Momordica charantia*) 추출물의 항산화 효과 및 세포사멸 억제 기전을 통한 신경세포보호효과*

김꽃별¹ · 이선아¹ · 허재혁^{1,2} · 김정희^{1,3†}

서울의료원 의학연구소,¹ 서울의료원 신경과,² 서울의료원 신경외과³

Neuroprotective effects of *Momordica charantia* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SK-N-MC cells*

Kkot Byeol Kim¹ · Seonah Lee¹ · Jae Hyeok Heo^{1,2} · Jung hee Kim^{1,3†}

¹Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

²Department of Neurology, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

³Department of Neurosurgery, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

ABSTRACT

Purpose: Many studies have suggested that neuronal cells protect against oxidative stress-induced apoptotic cell death by polyphenolic compounds. We investigated the neuroprotective effects and the mechanism of action of *Momordica charantia* ethanol extract (MCE) against H₂O₂-induced cell death of human neuroblastoma SK-N-MC cells. **Methods:** The antioxidant activity of MCE was measured by the quantity of total phenolic acid compounds (TPC), quantity of total flavonoid compounds (TFC), and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. Cytotoxicity and cell viability were determined by CCK-8 assay. The formation of reactive oxygen species (ROS) was measured using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. Antioxidant enzyme (SOD-1,2 and GPx-1) expression was determined by real-time PCR. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway and apoptosis signal expression was measured by Western blotting. **Results:** The TPC and TFC quantities of MCE were 28,51 mg gallic acid equivalents/extract g and 3.95 mg catechin equivalents/extract g, respectively. The IC₅₀ value for DPPH radical scavenging activity was 506.95 µg/ml for MCE. Pre-treatment with MCE showed protective effects against H₂O₂-induced cell death and inhibited ROS generation by oxidative stress. SOD-1,2 and GPx-1 mRNA expression was recovered by pre-treatment with MCE compared with the presence of H₂O₂. Pre-treatment with MCE inhibited phosphorylation of p38 and the JNK pathway and down-regulated cleaved caspase-3 and cleaved PARP by H₂O₂. **Conclusion:** The neuroprotective effects of MCE in terms of recovery of antioxidant enzyme gene expression, down-regulation of MAPK pathways, and inhibition apoptosis is associated with reduced oxidative stress in SK-N-MC cells.

KEY WORDS: *Momordica charantia* ethanol extract (MCE), antioxidant, MAPK pathway, apoptosis, SK-N-MC

서 론

급속한 인구 고령화는 노인의 신체적·정신적 건강 등 개인의 문제뿐만 아니라 보건의료, 정치, 경제 등 사회 전반에 걸친 변화와 새로운 위기를 초래하는 국가의 현안으로 부각되고 있다.¹ 인구 고령화에 따라 증가되는 노인성 질환 중 진료비 증가 폭이 가장 큰 질환은 특히 치매와 파킨슨병 (Parkinson's disease)인 것으로 보고되고 있다.² 알츠

하이머병 (Alzheimer's disease)과 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경변성질환 (neurodegenerative disease)의 주요 원인 중 하나는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 신경세포에 손상을 입히고 이로 인해 세포의 사멸을 일으키기 때문인 것으로 알려져 있다.³⁻⁵

ROS는 superoxide radical (-O₂), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (-OH) 등이 있으며, 환경적 요인

Received: July 20, 2017 / Revised: August 15, 2017 / Accepted: September 19, 2017

*This study was supported by grants of Seoul Medical Center Research Institute (#17-C21).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-2276-8601, e-mail: nostoi72@naver.com

© 2017 The Korean Nutrition Society

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.

이나 생활습관 또는 스트레스로 인해 생성되고 과다 생성되거나 축적이 계속되면 산화적 스트레스를 유발하며 이로 인한 세포 사멸 유도는 노화를 촉진되고 뇌질환, 심혈관계 질환, 당뇨, 암 등을 유발한다.^{6,7} 특히 뇌는 세포막에 불포화지방산과 철분, 구리, 아연 등의 금속이온이 풍부하고 산소 순환이 집중되기 때문에 산화되기 쉬우며, 산화적 손상으로 인한 순차적 신호전달에 의해 세포사멸이 일어난다. 또한 뇌 조직은 한번 손상 되면 기능적인 회복이 어렵기 때문에 산화적 스트레스 상태를 유도하는 ROS 생성을 억제 또는 감소시키는 것은 신경변성질환과 노화와 관련된 퇴행성 인지장애를 초래하는 신경세포의 손상 또는 사멸로부터 신경세포를 보호하는 질병예방차원에서 중요하다 할 수 있다.⁸⁻¹¹

생체 내에는 ROS의 독성을 최소화하고 세포를 보호하기 위한 항산화 방어시스템으로 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn superoxide dismutase (SOD2), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등의 항산화 효소를 가지고 있다.¹² 따라서 이 효소들의 발현 및 활성화 증가를 유도하는 것은 ROS로부터 세포를 보호하고 나아가 신경변성질환의 치료적 타겟이 될 수 있다.¹³

또한 다양한 *in vitro* 모델에서 H₂O₂를 이용하여 산화적 스트레스를 유도하는데, 유도된 산화적 스트레스에 의해 extracellular protein regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38을 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway가 활성화된다. 이 신호들은 apoptotic cell death의 중요한 조절자 중 하나로 산화적 스트레스에 의해 MAPK pathway가 활성화되면 결과적으로 뇌신경세포 사멸이 유도되고 이는 뇌질환 유발의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.^{13,14} 또한 산화적 스트레스 상태에서는 pro-apoptotic인자인 bax, caspase, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 등의 활성화 및 이 인자들의 활성화를 통한 세포내 pathway 기전을 통해 세포사멸이 초래된다.¹⁵⁻¹⁷ 따라서 MAPK pathway의 인산화를 억제시키거나 pro-apoptotic 인자들의 활성화를 억제하는 효과를 나타내는 천연소재 개발연구가 활발히 진행되고 있다.

여주 (*Momordica charantia* L.)는 인도, 중국, 중앙아메리카에서는 당뇨의 민간요법 치료제로써 사용되어지고 있는 박과의 덩굴식물로 비타민C, β-carotene, glucoside, saponin, alkaloid, terpene, protein, Fe, K 등을 함유한다.¹⁸ 미숙한 여주열매는 비타민C, 비타민A와 철 등의 주요한 공급원이 되고 있으며, 여주의 쓴맛에는 식물스테롤 배당체들과 많은 종류의 amino acid, galacturonic acid, citruline, pectin 등의 성분이 들어 있다. 특히 여주의 과실과 종자에

는 charantin 성분은 항 당뇨 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁻²² 여주의 건강 및 약리학적 특성은 광범위하게 연구되어왔으며, 지난 연구결과들은 여주가 항당뇨, 항바이러스, 진통효과, 콜레스테롤 수치의 감소, 항암효과 등 건강에 광범위한 영향을 준다는 것을 입증해왔다.²³ 그리고 여주추출물의 우수한 라디칼 소거능 결과를 통해 우수한 항산화특성이 보고되어 있으며,^{24,25} Sin 등²⁶의 연구에서는 여주추출물과 분획물이 LLC-PK1 cell에서 우수한 자유라디칼 소거능과 세포생존을 감소 억제 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 여주추출물의 항산화 특성과 그에 따른 세포보호효과에 대한 기전적인 연구는 진행되어있는 것이 없었다. 또한 여주의 phenol acid 성분 중 protocatechuic acid가 C6 glial cell에서 산화적 스트레스에 대한 개선효과가 있음을 보고²⁷하였으나 chemical을 구입하여 처리한 결과들이었다. 그 밖에 동물모델을 이용한 *in vivo* 연구들^{28,29}에서는 여주에서 추출된 polysaccharide성분이 출혈성뇌혈관질환과 허혈성뇌손상에 대해 뇌손상을 억제한다고 보고하고 있다.

SK-N-MC neuronal 세포는 높은 안정성과 동종성 (homogeneity) 등의 장점이 있어, 알츠하이머병을 포함한 신경변성질환의 발병 (pathogenesis)과 분자적 기전 연구를 위한 *in vitro* model로 널리 이용되어져왔다.^{30,31}

따라서 본 연구에서는 SK-N-MC 신경세포에 H₂O₂를 처리하여 유도된 산화적 스트레스에 대한 여주 추출물의 세포 보호효과 및 그 작용 기전을 확인하고자 한다.

연구방법

재료

Human neuroblastoma SK-N-MC 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockvill, VA, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)와 fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, antibiotics, HBSS는 Well gene (Daegu, Korea) 제품을 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 과산화수소 (H₂O₂)를 비롯한 일반 시약들은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Cell counting kit-8 (CCK-8) 시약은 Dojindo molecular technologies Inc. (Gaithersburg, MS, USA)의 제품을 사용하고, intracellular ROS assay kit는 Cell Biolabs, INC. (San Diego, USA)에서 구입하였다. TRizol (invitrogen, Groningen, Netherland)을 이용하여 RNA를 추출하였고, cDNA 합성은 TaKaRa (Shuzo Shiga, Japan)의 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit를 이용하였다. Real time RT PCR은 Roche

Diagnostics (Mannheim, Germany)의 Universal ProbeLibrary Probe와 LightCycler480 Probe Master를 이용하였다. Total JNK (JNK, #9252), phospho-JNK (p-JNK, #4668), total p38 (p38, #9212), phospho-p38 (p-p38, #9215), caspase-3 (#9665), cleaved caspase-3 (#9664), PARP (#9532), cleaved PARP (#9546), GAPDH (#2118) primary antibody와 anti-rabbit IgG-HRP (#7074), anti-mouse IgG-HRP (#7076) secondary antibody는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

여주 추출물의 제조 (*Momordica charantia* extraction)

여주는 충남 금산 (Geumsan, Korea)에서 생산되어, 건조된 여주를 구입하였다. 건조된 여주를 가루가 되도록 곱게 갈아 주었다. 가루가 된 건조 여주 4 g을 200 ml의 70% ethanol에 넣어 10분 동안 초음파 분쇄기를 이용하여 여주를 분쇄한 후, 150 rpm, 37°C에서 6시간을 보관한 후 상층액만 걷어낸 뒤, 다시 200 ml의 70% ethanol을 넣고, 150 rpm, 37°C에서 18시간동안 보관하였다. 이 때 앞서 걷어내었던 상층액도 함께 보관하였다. 추출한 용액들을 모두 합친 후 10분 동안 초음파 분쇄기를 이용하여 아래 가라앉은 여주를 분쇄하였다. 이 용액을 tube에 옮겨 담아 3,000 rpm에서 3분간 원심분리를 시켜주었다. 그 후 이 용액을 0.22 µm, PVDF syringe filter (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용해 여과하였다. 여과한 용액을 질소제너레이터를 이용하여 액체를 휘발시켰다. 용액이 모두 휘발되어 진액이 되면 소량의 100% ethanol을 이용해 재용해 시킨 후 다시 질소제너레이터로 시료를 건조시켰다. 미량의 시료가 얻어지면, 200 mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 재용해 시킨 후 -30°C 초저온냉동고에 저장하여 사용하였다.

여주 추출물의 총 폴리페놀 (total phenolic contents)과 총 플라보노이드 (total flavonoid contents) 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis's phenol method로 측정하였다.³² 추출한 시료 200 mg/ml을 10 mg/ml이 되도록 희석시킨 후, 이 희석한 시료 100 µl와 증류수로 11배 희석한 2N folin-ciocalteu reagent 750 µl를 함께 넣고 섞은 후 5분간 방치하였다. 그 후 4% Na₂CO₃ 750 µl를 넣어준 후 섞어서 빛을 차단하여 1시간동안 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 그려서 추출물의 총 폴리페놀의 함량을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량은 염화알루미늄의 비색법에 따라 측정하였다.³³ 추출한 시료를 methanol로 20배 희석하여

10 mg/ml이 되도록 만들었다. 시료 25 µl에 증류수 125 µl를 넣고 5% NaNO₂ 7.5 µl를 넣고 섞은 후 6분간 방치하였다. 그 후 10% AlCl₃ 15 µl를 넣고 다시 혼합한 후 5분간 방치하였다. 그 후 1M NaOH 50 µl를 넣은 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준물질로 사용하여 검량선을 그려서 추출물의 총 플라보노이드의 함량을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정 (DPPH radical scavenging activity)

추출물의 free radical 소거 활성을 측정하기 위하여 DPPH를 이용한 Blios의 방법을 사용하였다.³⁴ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 methanol에 용해시켜 0.1 mM DPPH용액을 만들었다. 이 용액 1 ml을 다양한 농도의 시료 1 ml에 넣어 잘 혼합해주고 상온에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 별로 DPPH radical을 50% 저해하는 농도인 IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration)을 구하였다. 대조구로 ascorbic acid의 활성을 측정하여 IC₅₀ 값을 측정하였다.

세포 배양

Human neuroblastoma cell line인 SK-N-MC 세포를 EMEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였다. 배양액은 48시간 주기로 교체하였으며, 여주추출물을 전 처리한 후 과산화수소 처리를 통해 산화적 스트레스를 유도하였다.

세포생존율 및 세포내 ROS 측정

생존율 측정은 CCK-8 assay kit를 이용하였다. SK-N-MC 세포를 2 × 10⁴ cell/100 µl로 96well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 여주추출물과 과산화수소를 농도별 시간별로 처리하였고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 CCK-8용액을 10 µl 처리하여 2시간 배양 후, 450 nm에서 microplate reader (Sunrise, Tecan, Grödig, Austria)를 이용하여 측정하였다. 최종 처리 농도를 정하고 여주추출물을 0, 1, 5, 10 µg/ml 농도로 각각 6시간동안 전 처리 후, 과산화수소를 500 µM로 18시간 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 CCK-8 시약을 이용해 여주추출물 농도별 세포생존율의 차이를 비교하였다.

세포내 ROS의 측정 정도를 정량하기 위해 SK-N-MC 세포를 4 × 10⁴ cell/100 µl로 96well plate에 분주하여 24시간 배양 후, 여주추출물을 농도별로 처리하여 37°C에서 6시간동안 배양하였다. 세포 배지를 제거하고 HBSS로 2회 세척 후, HBSS로 희석한 10 µM DCF-DA를 세포에 처리하

여 37°C에서 45분간 배양하였다. DCF-DA용액을 제거한 후 HBSS로 2회 세척한 후 과산화수소를 500 µM 농도로 처리하였고, 세포내 형광 광도의 변화를 형광광도계를 이용하여 485 nm와 530 nm에서 측정하였다.

Real time-reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

처리한 SK-N-MC 세포에서 trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였고, PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit를 이용하여 total RNA를 cDNA로 합성하였다. cDNA는 희석한 후 Table 1의 primer와 Universal ProbeLibrary Probe를 LightCycler 480 Probe Master에 함께 혼합하여 LightCycler 480 multiwell plate에 분주하여 LightCycler 480 (Roche Diagnostics Ltd. Rolkreuz, Switzerland) 장비를 이용하여 real time PCR분석을 실시하였다.

Western blotting analysis

처리한 SK-N-MC 세포에 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후 RIPA buffer (100 mM tris-HCL, 0.5% triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaCl, 10 mM sodium fluoride, protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였고, 단백질 농도는 BCA (Thermo scientific, Rockford, U.S.A) 방법으로 측정하였다. 정량된 시료에 5 X SDS sample buffer를 가하고 100°C에서 5분 끓인 후, 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 SDS-PAGE gel에 분리된 단백질은 PVDF membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)에 transfer 한 뒤 5% (w/v) skim milk powder (Sigma-Aldrich, USA)를 용해시킨 TBS-T용액으로 blocking을 실시하였다. 3% (w/v) fat-free BSA (Sigma-Aldrich, USA)를 용해시킨 TBS-T용액에 primary antibody를 1:1,000의 비율로 희석시켜 4°C에서 18 hr 동안 반응시켰고, TBS-T로 3회 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반

응시켰다. TBS-T로 3회 세척 후 ECL-western blotting substrate (Thermo scientific, Rockford, U.S.A)을 처리한 뒤 결과를 확인하였다.

통계분석

모든 측정값은 3회 이상 분석하였고, SPSS 20.0을 이용하여 student's t-test 또는 one-way ANOVA test 후 Duncan's test를 실시하여 p < 0.05 수준에서 대조군과 각 실험군 간의 유의성을 검증하였으며 모든 결과는 mean ± SD으로 표시하였다.

결 과

여주추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 및 라디칼 소거능 측정

70% 에탄올로 추출한 여주추출물 내 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정하였고, 추출물 g당 각각 28.51 ± 1.75 mg gallic acid와 3.95 ± 0.92 mg catethin이었다 (Table 2). 그리고 DPPH 라디칼 소거능 IC₅₀은 506.95 ± 31.29 µg/ml로 나타났다 (Table 3).

SK-N-MC cell의 세포생존율 관찰

SK-N-MC cell에 H₂O₂와 여주추출물 (MCE)을 처리하여 CCK-8 assay를 통해 세포생존율을 측정하였다 (Fig. 1). 산화적 스트레스를 유도하기 위한 H₂O₂ 처리 결과 200 µM 농도에서부터 유의적인 세포생존율감소를 보였다. 그러나 200 µM처리한 그룹에서 감소의 폭이 5% 내외 (94.5 ± 2.5%)로 미미하였고, 600 µM을 처리한 그룹에서는 약 56.0%의 세포 생존율을 보였지만 이는 IC₅₀에 가까운 농도로 여주추출물의 세포의 보호효과를 확인하기 위한 스트레스 상태를 유도하는 연구목적에는 부합한다고 판단하였다. 따라서 68.5 ± 1.5%의 세포생존율을 보이는 H₂O₂

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
SOD-1 (EF151142.1)	forward	5'-GCA TCA TCA ATT TCG AGC AG-3'
	reward	5'-CAG GCC TTC AGT CAG TCC TT-3'
SOD-2 (BC012423.1)	forward	5'-TGA ACG TCA CCG AGG AGA A-3'
	reward	5'-TGA AGA GCT ATC TGG GCT GTA A-3'
GPx-1 (M21304.1)	forward	5'-TTC CCG TGC AAC CAG TTT-3'
	reward	5'-AGG GAA TTC AGA ATC TCT TCG TT-3'
GAPDH (BC025925.1)	forward	5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'
	reward	5'-AGG CAC ATC GCT CAG ACA C-3'

Table 2. Total polyphenols and flavonoids contents of *Momordica charantia*

	Total polyphenols (mg Gallic acid/ extract g)	Total flavonoids (mg Catechin/ extract g)
<i>Momordica charantia</i> extract	28.51 ± 1.75	3.95 ± 0.92

Table 3. DPPH radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from *Momordica charantia*

	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ , µg/ml)
Ascorbic acid	28.51 ± 1.75
<i>Momordica charantia</i> extract	506.95 ± 31.29

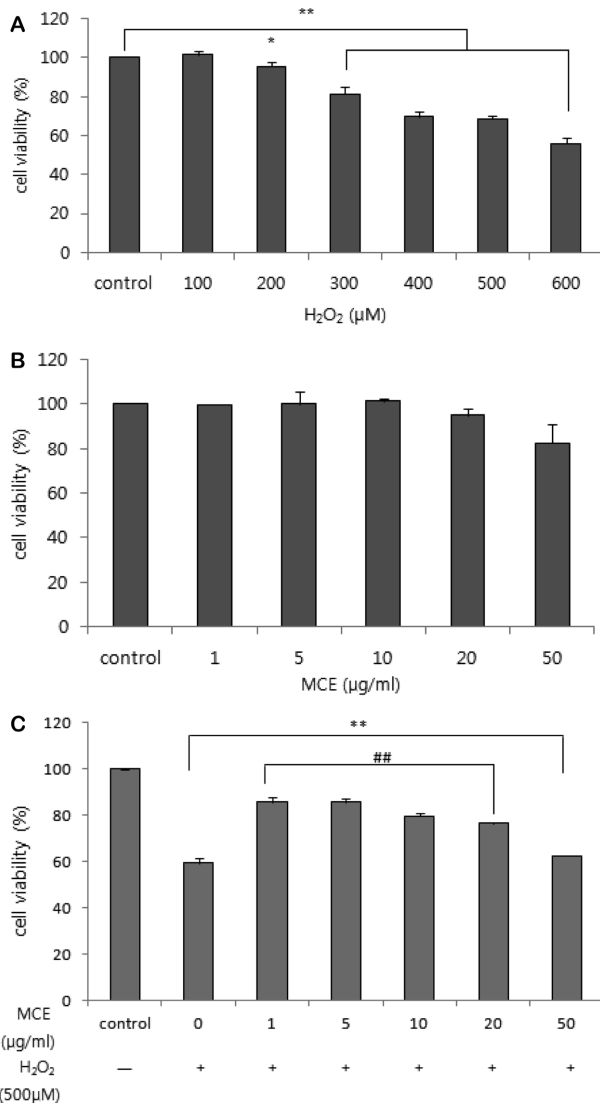


Fig. 1. Protective effects of *Momordica charantia* ethanol extracts (MCE) on H₂O₂-induced cell death and cytotoxicity in SK-N-MC cells. (A) Cell viability was determined by CCK-8 assay. SK-N-MC cell were treated with increasing concentrations (100~600 μM) of H₂O₂ 500 μM for 24 hr. (B) SK-N-MC cell were treated with increasing concentrations (1~50 μg/ml) of MCE for 24 hr. (C) The cell pretreated with MCE at the indicated concentration (1~50 μg/ml) for 6hr, and then treated with H₂O₂ for 18 hr. Value represent the mean ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with control. #p < 0.05 vs compared with H₂O₂ treated cell

500 μM을 최종 처리 농도로 정하였다 (Fig. 1A).

MCE를 처리한 결과 control과 비교하여 MCE의 처리가 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았다. MCE 20 μg/ml 농도 이상부터 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였지만, 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 1B).

산화적 스트레스로부터 MCE에 의한 세포보호효과를 확인하기 위해 MCE를 6시간동안 전 처리한 후, H₂O₂로 18

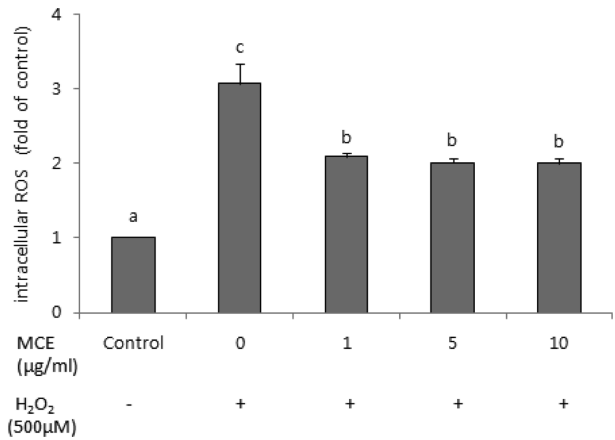


Fig. 2. Intracellular ROS scavenging activity of MCE. Cells were treated with H₂O₂ and/ or MCE as described in the legend of Fig. 1C. The generation of intracellular ROS was determined by DCF-DA methods using a fluorescence spectrophotometer with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively. Value represent the mean ± SD. Means with different letters (a-c) at each mRNA are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

시간동안 산화적 스트레스를 유도했을 때 세포생존율을 확인한 결과, MCE를 전 처리한 그룹 1, 5, 10, 20 μg/ml 농도에서 각각 85.8 ± 2.1, 85.9 ± 1.3, 80.5 ± 0.4, 76.5 ± 0.6%로 H₂O₂만 처리한 그룹 (59.6 ± 2.2%)보다 약 17~26%정도 세포생존율이 높은 것을 확인할 수 있었으며 통계적으로도 유의적인 결과가 나타났다 (Fig. 1C).

MCE처리에 의한 세포내 ROS 감소

세포생존율 결과를 바탕으로 MCE의 세포내 ROS에 대한 감소 효과를 확인하기 위해 세포내 ROS 측정 정도를 정량하였다. 측정 결과 아무것도 처리하지 않은 control과 비교하여 H₂O₂ 500 μM를 처리한 그룹에서 세포내 ROS가 약 3배 상승하였고, MCE를 1, 5, 10 μg/ml 농도로 전 처리한 그룹에서 H₂O₂ 500 μM 만 처리한 그룹과 비교하여 유의적으로 감소된 결과를 보였으며 그 값은 각각 control대비 2.1 ± 0.1, 2.0 ± 0.1, 2.0 ± 0.1배였다 (Fig. 2).

항산화효소 발현에 대한 MCE의 회복 효과

산화적 스트레스에 대한 체내 방어기전인 항산화효소에 대한 mRNA 수준에서의 발현을 real time PCR을 통해 비교하였다. 대표적인 항산화 효소인 SOD-1,2 (superoxide dismutase-1,2)와 GPx-1 (glutathion peroxidase-1)의 발현 정도는 Fig. 3에서와 같이 H₂O₂ 200 μM을 처리한 그룹에서 발현이 가장 낮았으며 MCE 전 처리에 의해 증가되었고 control수준으로 회복되는 것으로 나타났다.

MCE 5, 10 μg/ml 농도로 처리한 그룹에서 H₂O₂ 200

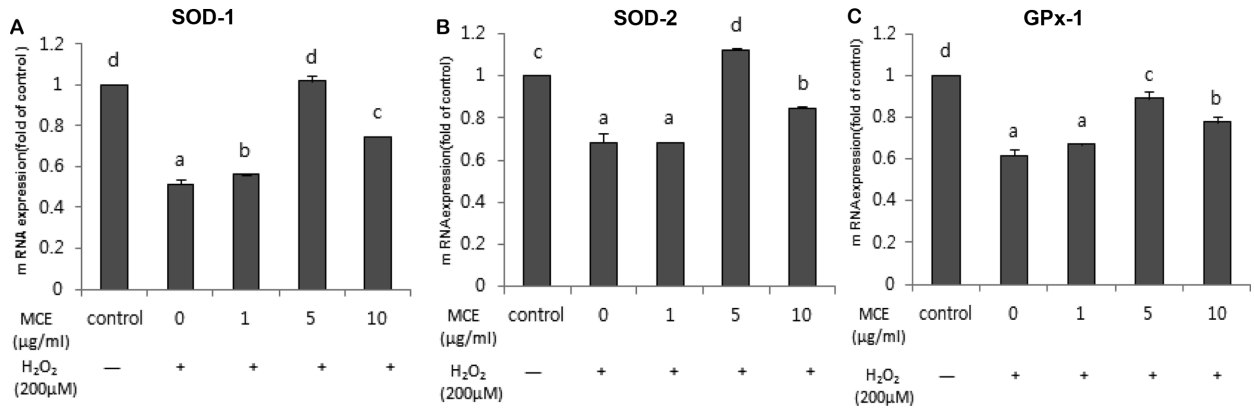


Fig 3. Effects of MCE on H₂O₂-induced mRNA expression levels of antioxidant enzymes in SK-N-MC cells. Cells were treated with H₂O₂ and/ or MCE as described in the legend of Fig. 1C. The mRNA levels of antioxidant enzymes were determined by real-time PCR analysis. (A) SOD-1, superoxide dismutase-1; (B) SOD-2, superoxide dismutase-2; (C) GPx1, glutathione peroxidase-1. Value represent the mean \pm SD. Means with different letters (a~d) at each mRNA are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

µM만 처리했을 때와 비교하여 통계적으로 유의적인 발현 증가를 보였으며, 특히 5 µg/ml 농도로 처리한 그룹에서는 control 수준으로 회복 하거나 그 이상으로 증가 (5 µg/ml 에서의 SOD-2 발현은 1.12 ± 0.0 배, Fig. 3B)되는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

MCE의 MAPK pathway의 인산화 억제

MAPK pathway인 ERK, JNK, p38의 인산화에 대한 억제 효과 여부를 확인하기 위하여 MCE를 6시간동안 전 처리한 후, H₂O₂로 18시간동안 산화적 스트레스를 유도한 후 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 단백질 발현을 비교하였다.

H₂O₂ 500 µM를 처리한 경우 control과 비교하여 MAPK pathway의 인산화정도가 증가되었지만, MCE 전 처리를 통해서 인산화가 억제 되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 MCE 5, 10 µg/ml에서 H₂O₂ 500 µM에 비해 유의적으로 낮은 인산화 정도를 나타냈으며, p38의 인산화보다 JNK의 인산화 억제에 더 효과적임을 알 수 있었다 (Fig. 4). 그러나 MAPK pathway 중 하나인 ERK의 경우 MCE 전 처리에 의한 인산화 억제 효과는 H₂O₂ 500 µM 처리한 그룹과 비교하여 유의적이지 않았다 (data not shown).

MCE의 apoptosis signal 억제 효과

Apoptosis signal에 대한 MCE의 효과 확인을 위해 caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved PARP의 단백질 발현을 비교하였다. H₂O₂ 500 µM 처리에 의해 cleaved caspase 3와 cleaved PARP의 발현이 증가되었고, MCE 전 처리 후 산화적 스트레스를 유도 했을 때 상대적

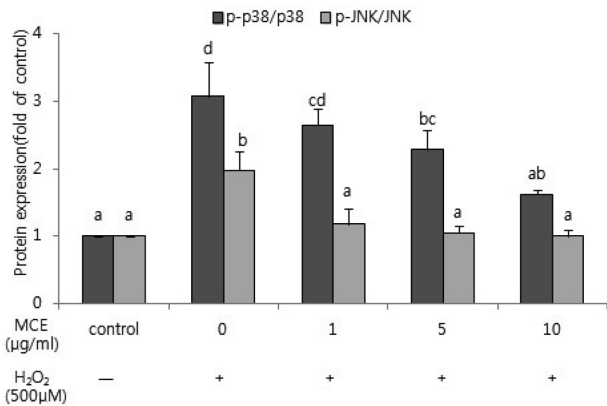
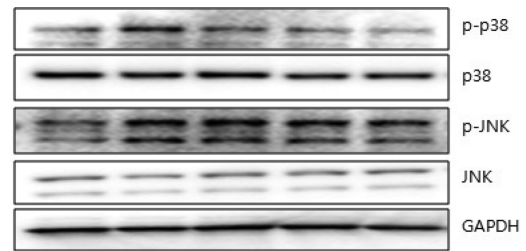


Fig. 4. Effects of MCE on H₂O₂-induced phosphorylation of MAPK (p38 and JNK). Pathway in SK-N-MC cells. Cells were treated with H₂O₂ and/ or MCE as described in the legend of Fig. 1C. The protein levels of MAPKs pathway signals were analyzed by western blotting, and normalizes to the GAPDH level. The density of each protein band was quantified by using Bio-1D imaging software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Value represent the mean \pm SD. Means with different letters (a~d) at each mRNA are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

으로 감소되는 결과를 나타내었으며 이는 MCE 전 처리가 산화적 스트레스에 의한 apoptosis를 억제한다는 결과를 나타낼 수 있다 (Fig. 5).

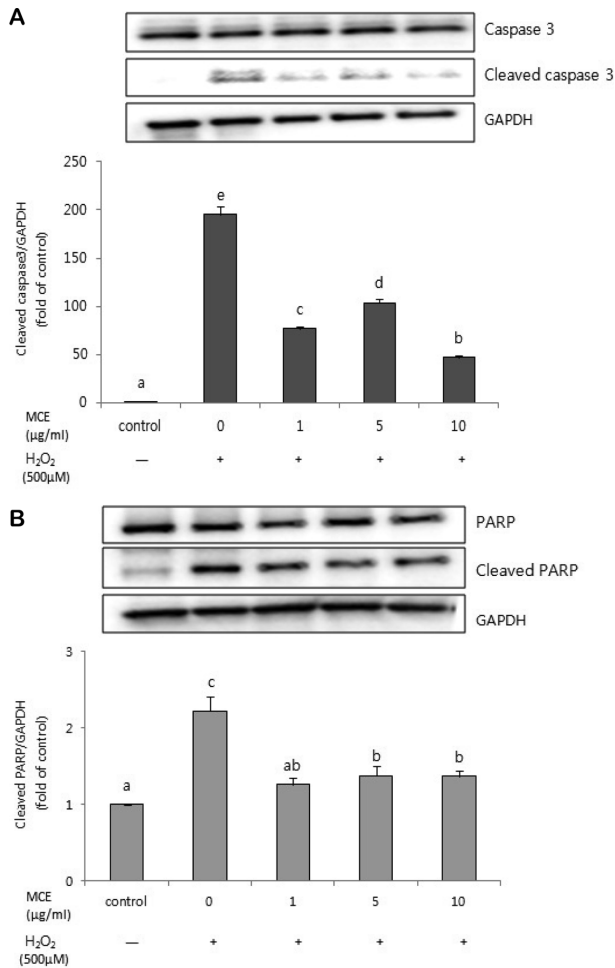


Fig. 5. MCE attenuates H₂O₂-induced cleavage of caspase-3 and PARP in SK-N-MC cells. Cells were treated with H₂O₂ and/or MCE as described in the legend of Fig. 1C. The protein levels of caspase-3, cleaved caspase-3 (A), PARP and cleaved PARP (B) were analyzed by western blotting, and normalized to the GAPDH level. Value represent the mean \pm SD. Means with different letters (a-e) at each mRNA are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

고찰

본 연구에 사용된 여주의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 측정 결과 70% 에탄올 추출물 g당 총 폴리페놀과 총 플라보노이드는 각각 28.51 ± 1.75 mg gallic acid와 3.95 ± 0.92 mg catethin로 나타났다. Kim 등²⁴의 연구에 따르면 여주열매의 열수추출물은 69.45 mg/g, 에탄올추출물은 70.87 mg/g의 폴리페놀을 함량을 보고하고 있으며, Lee²⁵의 연구에 의하면 에탄올추출물에서 총 폴리페놀은 36.08 mg/g, 총 플라보노이드는 15.66 mg/g으로 보고하였다. 본 연구의 여주추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 여주추출물을 이용한 타 연구와 차이가 있지만,

이는 천연소재의 특성상 사용된 시료의 품종, 재배지역 및 재배 시기의 차이가 있어서 차이가 있는 것으로 사료된다. 그리고 항산화 소재로 많이 사용되고 있는 야콘³⁵이나 레드비트³⁶ 등이 각각 9.6, 12.3 mg gallic acid의 총 페놀화합물 함량을 보고하고 있고, Kim 등²⁴의 연구결과에서도 흑두나 어성초와 같이 항산화능이 높다고 알려져 있는 식물 추출물에서 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 매우 낮거나 아예 검출되지 않았다고 보고하고 있다. 이에 본 연구에서 추출한 여주추출물은 항산화 작용이 뛰어난 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 비교적 높은 것으로 나타나 천연항산화제로써 이용가치가 충분하다고 판단된다.

DPPH 라디칼 소거능 측정방법은 시료의 자유 라디칼 소거 능력이나 수소 공여능력을 평가하는 방법으로 안정적이고 간단하며 재현성이 높아 널리 사용되는 라디칼 소거능 측정 방법으로 알려져 있으며,³⁷ 이 방법을 이용하여 본 연구의 여주추출물의 항산화능을 측정한 결과 라디칼 50%를 제거하는 농도인 IC₅₀이 506.95 µg/ml로 나타났다. Control로 이용된 비타민C의 라디칼 소거능 (IC₅₀ 6.46 µg/ml)보다 낮았지만, Kim 등²⁴의 연구결과에서도 여주열매의 열수추출물과 에탄올 추출물 500 µg/ml의 농도에서 38%와 62%의 라디칼 소거율을 보였고, Lee²⁵의 연구에서도 control인 비타민C와 70%에탄올 여주추출물에서 IC₅₀이 각각 0.12 mg/ml과 9.81 mg/ml로 본 연구와 비슷한 결과를 보고하였다. Sin 등²⁶의 연구에서는 여주추출물의 IC₅₀은 추출용매의 분획에 따라 68.40~354.62 µg/ml로 다양하게 나타났는데 이는 추출용매의 차이와 추출 조건의 차이에 기인하는 것으로 판단되며, Kim 등³⁸의 연구결과에서 항산화능이 우수하다고 보고하고 있는 관중, 쇠고기, 비수리, 감나무, 고비 등의 생약식물의 추출물의 라디칼 소거능은 추출물 100 mg/100 ml 농도에서 각각 79.50, 76.46, 75.69, 72.87%였다. 따라서 본 연구의 여주추출물이 높은 라디칼 소거능을 가지며 항산화능이 우수하다고 할 수 있다.

우수한 라디칼 소거능을 통해 항산화능력 확인된 여주추출물의 세포내 ROS 감소 및 세포 사멸에 대한 보호 효과를 확인한 결과, 여주추출물을 전 처리한 후 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 그룹이 H₂O₂만 처리한 그룹에 비해 세포생존율은 증가되고 세포내 ROS는 감소된 것을 확인하였다. 다양한 식품 추출물을 처리한 연구들^{11,39,40}에서 H₂O₂만 처리한 그룹에서 감소한 세포생존율과 증가한 세포내 ROS수준이 각 연구에 사용한 추출물을 처리하였을 때 control 그룹의 결과 수준으로 정상화되었으며, 이는 본 연구결과와 일치하였다.

여주 추출물이 H₂O₂치리에 의한 세포생존율 감소를 억

제하고 세포내 ROS 축적 정도 감소시키는 결과를 통해 세포보호효과가 있음을 1차적으로 확인하였고, 이에 대한 기전 확인을 위해 추가 실험을 진행하였다.

생체 내에 항산화 방어시스템으로 작동하는 4가지 항산화 효소 (SOD1, SOD2, CAT, GPx)들의 mRNA 발현에 대하여 여주추출물이 미치는 영향을 real time PCR을 통해 알아본 결과 H₂O₂ 200 µM 처리에 의해 발현이 감소되었던 SOD-1,2와 GPx-1의 발현이 여주추출물 전 처리에 의해 control수준으로 회복되거나 control보다 증가된 발현을 보였고 통계적으로도 유의하였다. 이러한 결과는 Choi 등³⁹의 연구에서 추출물인 corn milk maysin을 처리한 그룹에서 SOD-1,2, CAT, GPx-1 등의 항산화효소 mRNA 발현이 H₂O₂만 처리한 그룹과 비교하여 증가하였고 control 수준으로의 회복을 보이는 결과와 같은 경향이었으며, 도라지와 더덕추출물이 H₂O₂만 처리한 그룹과 비교하여 항산화효소의 mRNA 발현을 증가시킨다는 Kim 등¹²의 연구 결과와도 비슷한 결과였다. 본 연구 결과에서 여주추출물이 CAT의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았지만 (data not shown), 나머지 항산화 효소들 대부분에서는 발현 증가를 나타낸 것으로 보아 H₂O₂에 의한 세포내 항산화 방어 시스템의 mRNA 발현 감소를 여주추출물이 억제시킴으로써 세포보호효과를 갖는다고 할 수 있다. 그리고 일반적으로 항산화 효소 활성 또는 유전자 발현은 산화적 스트레스 상태에서 상승하는데, 본 연구에서는 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스 상태에서 항산화효소의 mRNA 발현이 control에 비해 감소하였다. 본 연구의 결과와 비슷한 결과를 보였던 H₂O₂ 200 µM 농도로 24시간동안 처리한 Choi 등³⁹의 연구에서는 H₂O₂에 대한 장시간 노출이 고농도의 산화적 스트레스 상태를 유도하였으며 이로 인한 세포 손상 때문일 것으로 설명하고 있으며, 본 연구결과도 동일한 이유일 것으로 사료된다.

그러나 본 연구의 세포생존율과 세포내 ROS 축적 정도를 정량한 실험과 같은 조건으로 (H₂O₂ 500 µM) 산화적 스트레스를 유도했을 때, SOD-2와 CAT의 발현은 여주추출물 전 처리에 의해 증가되기는 하였으나 증가의 정도가 약하였고 SOD-1과 GPx-1은 여주추출물 처리 유무와는 상관없이 발현이 감소하는 것으로 나타나는 등 (data not shown) H₂O₂ 500 µM 농도에서는 여주추출물의 세포내 항산화 방어 시스템에 대한 보호효과를 확인할 수 없었다. 이는 H₂O₂ 200 µM의 농도를 처리했을 때와 비교하여 상대적으로 더 강한 산화적 스트레스 상태가 지속되면서 세포에 심각한 손상이 발생되었고, 그 과정에서 산화적 스트레스에 대한 1차적 방어기전인 세포내 항산화 방어 시스템 역시 손상을 받았기 때문일 것으로 추측한다. H₂O₂

는 농도에 따라 세포에 미치는 영향이 달라진다는 보고들에서,⁴¹⁻⁴³ 포유류의 세포에서 매우 낮은 H₂O₂ 농도인 3~15 µM일 때는 25~45%로 성장을 자극시키는 mitogen으로서 작용하며, 120~150 µM의 농도에서는 일시적으로 성장을 억제시켜 에너지의 과잉 사용과 DNA손상으로부터 세포를 보호해주고, 500~1,000 µM에서는 산화적 손상이 나타나며 결과적으로 apoptosis를 일으키게 된다. 그리고 매우 높은 H₂O₂ 농도인 5.0~10.0 mM에서는 세포막 분해가 일어나고 단백질과 핵산이 변성되어 곧바로 necrosis가 일어난다고 하고 있다. 본 연구에서도 H₂O₂ 500 µM 농도에서는 세포에 산화적 손상이 일어나게 되어 항산화효소의 mRNA 발현에 대한 여주추출물의 보호효과를 관찰할 수 없었던 것으로 보인다.

포유동물세포에서 다양한 스트레스에 의해 활성화되는 MAPK pathway는 apoptosis에 관여하는 중요한 조절자 중 하나로, Chung 등⁴⁰의 연구에서 human brain neuroblastoma 세포에 H₂O₂ 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 JNK와 p38이 인산화 되었고, Pan 등⁴⁴의 연구에서도 ROS에 의한 apoptosis signal-regulating kinase (ASK1)의 활성화는 p38과 JNK를 활성화시키고 이것은 신경세포의 apoptosis를 초래 한다고 보고되어 있다. 본 연구의 여주추출물은 산화적 스트레스가 유도된 신경세포에서 p38, JNK의 인산화를 효과적으로 억제시켰다. Chung 등⁴⁰과 Park 등⁴⁵ 그리고 Jiang 등⁴⁶의 연구에서도 H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 신경세포에서 p38, JNK, ERK의 인산화가 증가되었고, 각 연구에서의 보호효과 평가를 위한 물질을 처리했을 때 p38, JNK, ERK의 인산화를 억제하는 결과를 보고하고 있다. 따라서 여주추출물이 MAPK pathway 중 특히 p38과 JNK의 인산화 억제를 통해 신경세포의 사멸을 억제하는 신경세포에 대한 보호효과를 나타낸다고 할 수 있다. 본 연구에서 MAPK pathway 중 ERK의 인산화 억제에는 유의한 결과를 보이지 않았다 (data not shown).

세포의 사멸은 활성형인 분절화된 caspase-3와 PARP (cleaved caspase-3와 cleaved PARP)에 의해 유도되고 세포의 응축이나 핵의 분해 등 구조적인 변화단계를 거쳐 조절된다.¹⁵⁻¹⁷ 본 연구에서도 H₂O₂에 의해 cleaved caspase-3와 cleaved PARP의 발현이 증가되었고, 여주추출물을 전 처리한 후 H₂O₂을 처리하여 산화적 스트레스를 유도했을 때 그 발현이 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 5A, B). 이 결과를 통해 H₂O₂에 의한 caspase-3와 PARP 의존성 세포사멸 유도를 여주추출물이 억제시켜주는 것을 확인하였다.

그러나 Fig. 4와 5에서와 같은 여주추출물에 의한 MAPK

pathway의 인산화 억제와 cleaved caspase-3와 cleaved PARP 발현 억제의 결과는 H_2O_2 200 μM 농도 조건으로 산화적 스트레스를 유도했을 때는 확인할 수 없었다 (data not shown). 이는 앞서 항산화효소들의 mRNA 발현결과에서 설명했던 바와 같이, H_2O_2 500~1,000 μM 에서 세포의 산화적 손상으로 인한 apoptosis가 일어나게 되므로 상대적으로 낮은 농도인 H_2O_2 200 μM 처리에서는 해당 기전들에 대한 발현변화 확인은 어려웠던 것으로 판단된다.

이상의 연구결과들에서 여주추출물의 우수한 항산화력과 신경세포 보호효과를 확인하였다. 세포보호효과의 기전으로는, 상대적으로 약한 산화적 스트레스 상태 (H_2O_2 200 μM)에서는 항산화효소의 발현 증가를 유도하여 세포내 항산화 방어시스템의 정상화를 통한 보호효과를 나타내고, 강한 스트레스 상태 (H_2O_2 500 μM)에서는 MAPK pathway의 인산화와 cleaved caspase-3 및 cleaved PARP의 발현을 억제하여 apoptotic cell death 억제제를 통한 보호효과를 나타낸다 할 수 있다. 본 연구는 여주추출물의 신경세포보호효과에 대한 기전적인 연구를 통해 여주추출물이 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상 및 사멸을 억제하는데 효과적이었으며, 나아가 신경변성질환의 예방 및 치료를 위한 기능성 소재로서의 가능성을 제시하였다. 위 연구 결과를 바탕으로 여주추출물이 본 연구에서 확인한 기전 외에 다양한 세포보호 기전에도 효과가 있을 것으로 사료되며 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

요 약

건 여주로부터 얻은 70%에탄올 추출물의 항산화 효과를 측정하고, H_2O_2 에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 알아보기 위해 human neuroblastoma cell인 SK-N-MC세포를 이용하여 실험을 수행하였다. 여주 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 28.51 mg gallic acid/extract g과 3.95 mg catechin/extract g 이었고, 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 (IC_{50})은 506.95 $\mu g/ml$ 이었다. 여주추출물을 신경세포에 전 처리한 후 H_2O_2 을 처리하여 산화적 스트레스를 유도했을 때, 여주추출물에 의해 세포생존율은 증가되었고 세포내 ROS는 감소되는 것을 확인하였다. 그리고 세포내 항산화 방어시스템인 항산화효소 (SOD-1,2와 GPx-1)의 mRNA 발현이 여주추출물 처리에 의해 control 수준으로 회복되거나 control 보다 증가되는 결과를 보였으며, ROS 의존적 세포사멸과 연관 있는 것으로 알려진 MAPK pathway 중 p38과 JNK의 인산화를 여주추출물이 억제하였다. 또한 cleaved caspase-3와 cleaved PARP의 발현도 여주추출물

의 처리에 의해 감소되었다. 본 연구 결과에서 70% 에탄올 여주추출물은 항산화효능이 우수하여 ROS를 직접적으로 제거할 뿐 아니라 세포내 ROS 축적을 억제시키는 효과를 보여주었다. 그리고 신경세포 내 항산화효소들의 발현 증가 기전과 p38, JNK의 인산화 억제 및 cleaved caspase-3, cleaved PARP의 발현 억제를 통한 세포사멸 억제 기전을 통해 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 제시하고 있다. 따라서 여주추출물은 산화적 스트레스에 의한 알츠하이머병이나 파킨슨병 등과 같은 신경변성질환 (neurodegenerative disease)에 대한 예방 및 치료제의 소재로써 이용가치가 충분한 것으로 사료된다.

References

1. Statistics Korea. Korean social trends 2016. Daejeon: Statistics Korea; 2016.
2. Kim HB. Current Status and Implications of disease studies related to aging. Seoul: Korea Institute of Science & Technology Evaluation and Planning; 2012.
3. Budzynska B, Boguszewska-Czubar A, Kruk-Slomka M, Skalik-Wozniak K, Michalak A, Musik I, Biala G. Effects of imipramine on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2015; 232(5): 931-942.
4. Hou CW, Chang SY, Jeng KC. Protective effect of a sesamin derivative, 3-bis (3-methoxybenzyl) butane-1, 4-diol on Abeta-stressed PC12 cells. *Arch Pharm Res* 2015; 38(4): 543-548.
5. Murakami S, Miyazaki I, Sogawa N, Miyoshi K, Asanuma M. Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. *Neurotox Res* 2014; 26(3): 285-298.
6. Kang SW. Role of reactive oxygen species in cell death pathways. *Hanyang Med Rev* 2013; 33(2): 77-82.
7. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 1997; 10(5): 485-494.
8. Heo HJ, Lee CY. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1984-1989.
9. Kim D, Chae HS, Kim NY, Jang A. Anti-oxidative activity and the protective effect of donkey's bone and skin extracts on SK-N-SH cell. *J Life Sci* 2013; 23(8): 1019-1024.
10. Kwon KH, Lim H, Chung MJ. Neuroprotective effects of bread containing *Cirsium setidens* or *Aster scaber*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2014; 43(6): 829-835.
11. Chung MJ, Park YI, Kwon KH. Neuroprotective effects of *Cirsium setidens*, *pleurospermum kamtschaticum*, and *allium victorialis* based on antioxidant and p38 phosphorylation inhibitory activities in SK-N-SH neuronal cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2015; 44(3): 347-355.
12. Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *codonopsis lanceolata* and *platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 2008; 40(6): 696-701.

13. Kim SM, Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Jang SJ, Kim SO, Chun MH, Do SI, Choo YK, Park YI. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sci* 2012; 90(21-22): 874-882.
14. Choi HN, Chung MJ, Park JK, Park YI. Neuroprotective effects of N-acetylglucosamine against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SK-N-SH cells by inhibiting the activation of caspase-3, PARP, and p38. *Food Sci Biotechnol* 2013; 22(3): 853-858.
15. Chen B, Yue R, Yang Y, Zeng H, Chang W, Gao N, Yuan X, Zhang W, Shan L. Protective effects of (E)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeine against hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Neurochem Res* 2015; 40(3): 531-541.
16. Garcimartín A, Merino JJ, González MP, Sánchez-Reus MI, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Benedí J. Organic silicon protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide effects. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14(1): 384-392.
17. Tian X, Guo LP, Hu XL, Huang J, Fan YH, Ren TS, Zhao QC. Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury and potential mechanisms in SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(3): 335-344.
18. Araba BG. Stimulation of protein biosynthesis in rat hepatocytes by extracts of *Momordica charantia*. *Phytother Res* 2001; 15(2): 95-98.
19. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(1): 123-132.
20. Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 96(3): 563-568.
21. Lee HJ, Moon JH, Lee WM, Lee SG, Kim AK, Woo YH, Park DK. Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions. *J Bio Environ Control* 2012; 21(4): 379-384.
22. Divya D, Hettiarachchy NS, Ganesh V, Kannan A, Rayaprolu S. Phenolic extracts from leaves of bitter melon (*Momordica charantia*) with antioxidant properties. *J Agric Sci Appl* 2013; 2(1): 28-34.
23. Tan SP, Kha TC, Parks SE, Roach PD. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: a review. *Food Rev Int* 2016; 32(2): 181-202.
24. Kim HW, Shin H, Hwang D, Lee J, Jeong H, Kim D. Functional cosmetic characteristics of *Momordica charantia* fruit extract. *Korean Chem Eng Res* 2015; 53(3): 289-294.
25. Lee YR. Nutritional components and antioxidant activity of dry bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2016; 45(4): 518-523.
26. Sin SM, Mok SY, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY. Protective effect of bitter melon (*Momordica charantia*) against oxidative stress. *Cancer Prev Res* 2011; 16(1): 86-92.
27. Choi JR, Choi JM, Lee SH, Cho KM, Cho EJ, Kim HY. The protective effects of protocatechuic acid from *Momordica charantia* against oxidative stress in neuronal cells. *Korean J Pharmacogn* 2014; 45(1): 11-16.
28. Gong J, Sun F, Li Y, Zhou X, Duan Z, Duan F, Zhao L, Chen H, Qi S, Shen J. *Momordica charantia* polysaccharides could protect against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting oxidative stress mediated c-Jun N-terminal kinase 3 signaling pathway. *Neuropharmacology* 2015; 91: 123-134.
29. Duan ZZ, Zhou XL, Li YH, Zhang F, Li FY, Su-Hua Q. Protection of *Momordica charantia* polysaccharide against intracerebral hemorrhage-induced brain injury through JNK3 signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res* 2015; 35(6): 523-529.
30. Lee KH, Lee SJ, Lee HJ, Choi GE, Jung YH, Kim DI, Gabr AA, Ryu JM, Han HJ. Amyloid β 1-42 ($A\beta$ 1-42) induces the CDK2-mediated phosphorylation of tau through the activation of the mTORC1 signaling pathway while promoting neuronal cell death. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 229.
31. Lee HJ, Ryu JM, Jung YH, Lee SJ, Kim JY, Lee SH, Hwang IK, Seong JK, Han HJ. High glucose upregulates BACE1-mediated $A\beta$ production through ROS-dependent HIF-1 α and LXR α /ABCA1-regulated lipid raft reorganization in SK-N-MC cells. *Sci Rep* 2016; 6: 36746.
32. Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. 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* 2009; 17(1): 15-20.
33. Hossain H, Shahid-Ud-Daula AF, Jahan IA, Nimmi I, Hasan K, Haq MM. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of *Spilanthes paniculata* growing in Bangladesh. *Int J Pharm Phytopharm Res* 2012; 1(4): 178-186.
34. Babu D, Gurumurthy P, Borra SK, Cherian KM. Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. *J Med Plant Res* 2013; 7(39): 2898-2905.
35. Park JS, Kim HS, Chin KB. The antioxidant activity of *Yacon* (*Polymnia sonchifoliata*) and its application to the pork patties as a natural antioxidant. *J Korean Soc Food Sci Anim Resour* 2012; 32(2): 190-197.
36. Lee JH, Chin KB. Evaluation of antioxidant activities of red beet extracts, and physicochemical and microbial changes of ground pork patties containing red beet extracts during refrigerated storage. *J Korean Soc Food Sci Anim Resour* 2012; 32(4): 497-503.
37. Yoo HG, Lee BH, Kim W, Lee JS, Kim GH, Chun OK, Koo SI, Kim DO. *Lithospermum erythrorhizon* extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress. *J Med Food* 2014; 17(11): 1189-1196.
38. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 2012; 44(3): 337-342.
39. Choi DJ, Kim SL, Choi JW, Park YI. Neuroprotective effects of corn silk maysin via inhibition of H₂O₂-induced apoptotic cell death in SK-N-MC cells. *Life Sci* 2014; 109(1): 57-64.
40. Chung MJ, Lee S, Park YI, Lee J, Kwon KH. Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. *Life Sci* 2016; 148: 173-182.
41. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 1999; 48(1): 41-47.
42. Saladino AJ, Willey JC, Lechner JF, Grafstrom RC, LaVeck M, Harris CC. Effects of formaldehyde, acetaldehyde, benzoyl perox-

- ide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 1985; 45(6): 2522-2526.
43. Kim AK, Kim JH. Alterations of antioxidant enzymes in responses to oxidative stress and antioxidants. *J Appl Pharmacol* 2001; 9(4): 249-257.
 44. Pan J, Chang Q, Wang X, Son Y, Zhang Z, Chen G, Luo J, Bi Y, Chen F, Shi X. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells. *Chem Res Toxicol* 2010; 23(3): 568-577.
 45. Park HR, Lee H, Park H, Jeon JW, Cho WK, Ma JY. Neuroprotective effects of *Liriope platyphylla* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15(1): 171-181.
 46. Jiang XW, Bai JP, Zhang Q, Hu XL, Tian X, Zhu J, Liu J, Meng WH, Zhao QC. Caffeoylquinic acid derivatives protect SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide-induced injury through modulating oxidative status. *Cell Mol Neurobiol* 2017; 37(3): 499-509.