

귀뚜라미의 수용성 및 알콜 추출물의 간보호 효과

안미영* · 이용우 · 류강선 · 이희삼 · 김익수 · 김진원 · 이용기 · 김은선 · 김영식¹

농업과학기술원 잠사곤충부, ¹서울대학교 천연물과학연구소

Protective Effects of Water/Methanol Extracts of Cricket on the Acute Hepatic Damages in the ICR-mice Induced by Administration of CCl₄

Mi Young Ahn*, Yong Woo Lee, Kang Sun Ryu, Heui Sam Lee, Iksoo Kim, Jin Won Kim, Yong Ki Lee, Eun Sun Kim and Yeong Shik Kim¹

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA
¹Natural Products Research Institute, Seoul National University

Water and methanol extracts of cricket were examined for their liver protective effects against CCl₄-intoxication in ICR-mice. Serum transaminases (S-GOT and S-GPT), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione-S-transferase (GST) activities and TBARS (Thiobarbiturate-reactive substances) content were measured for evaluation of liver protective effects. The activities of GOT, GPT, LDH and hepatic content of lipid peroxide after CCl₄-treatment were higher than normal control but those levels decreased to 74, 50, 101 and 40%, respectively, by the treatment of cricket methanol extract. The anti-fatigue effects of water and methanol extracts investigated by an acute weight-loaded forced swimming test showed significantly prolonged swimming time in the mice administered cricket extracts. These results suggest us that water/alcohol extract of *G. bimaculatus* may be used as a liver protective food.

Key words: cricket, hepatoprotective effect, anti-fatigue effect, antilipidperoxidation

서 론

귀뚜라미(귀뚜라미과; SCAPSIPEDUS ASPERSUS; 슬 슬蟋蟀(促織), 本草綱目)는 여름철 밤에 날개를 마찰하여 울음소리를 내는 정서곤충으로 알려져 있다. 왕귀뚜라미는 과수나 각종 묘목을 갉아먹는 해충으로 구워서 어린아이의 경기에 사용하면 효과가 있으며 해열제로 사용하기도 하였다. 일본 애히메겐과 오이따 등지에서는 성충을 설사와 이질병에 사용하였고 또 장티프스에는 눌러서 짠 즙액을 술에 타 마셨으며, 또꾸지마에서는 엑기스를 해열제로 사용하는 습속이 있다. 옛날 17세기경 유럽에서는 귀뚜라미의 침출액을 결석을 치료하는 약 또는 이뇨제로 사용한 기록이 있고 자마이카에서는 삶은 다리를 이뇨제로 사용하였다고 한다. 이 외에도 방광의 신경마비 또는 수요관의 경련, 심장성 수종, 노인의 소변불통 및 부인의 난산 등에 사용한다⁽¹⁾.

최근 곤충산업의 태동으로 소수 농가에서 대량 사육되고

있다. 안 등⁽²⁾은 귀뚜라미를 이용한 축산물 사료에 첨가시 영향을 조사하였다. 그 결과 귀뚜라미는 오메가-3계열 지방산을 포함한 불포화 지방산이 풍부하여 귀뚜라미를 사료에 첨가 급여시 계육에서 필수지방산을 비롯한 다가불포화 지방산의 증가되었고(12~23%) 소량의 EPA 증가, 육질의 향미와 육색의 명도 및 황색도 증가로 육질이 향상되었다고 보고하였다. 또한 계란의 고소한 맛의 증가와 생계란의 비린 맛 감소를 발표한 바 있다. 이와 같은 일련의 연구로 귀뚜라미의 생리활성⁽³⁾을 재고해 보고 새로운 용도를 모색하고자 귀뚜라미 수용성 및 메탄올(알콜) 추출물의 간기능 개선에 관한 실험을 착수하였다.

간장장애에 대하여 임상적으로 효과가 인정되는 약물은 소수에 불과하므로 현재까지 간장장애에 대해 유효한 천연약물 탐색이 많은 연구자에 의해 이루어지고 있다. 이와 같은 연구의 일환으로 사염화탄소(CCl₄)에 의한 실질적 간장장애에 기인하는 혈청 중의 GOT, GPT, LDH 수치의 급격한 증가에 대한 보호 효과를 지표로 하는 방법이 있다. 종래 간질환 치료제로서는 현재 간기능 보조제, 항바이러스제, 간세포 촉진제, 면역억제제, 섬유화억제제, 비폐닐디메틸디카르복실레이트, 인터페론 등이 사용되고 있으나, 간질환의 치료 효과를 나타내지 못하고 부작용 및 재발의 위험이 높아 새로운 간질환 치료제가 요구되는 실정이다⁽⁴⁾.

*Corresponding author : Mi Young Ahn, Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, 61 Sudun-dong, Kwonsun-gu, Suwon 441-100, Korea

Tel: 82-31-290-8434

Fax: 82-31-295-2176

E-mail: amy@rda.go.kr

귀뚜라미는 지방(오메가-3, 오메가-6 등 다가 불포화지방산을 다수 함유), 단백질과 키틴/키토산을 높은 농도로 함유하였기에²⁾ 간보호효과 즉 급성간염 유발 시 보호효과, 과산화지질(노화)억제 효과와 지구력테스트를 통한 강정효과를 조사하여 앞으로 건강보조식품으로 개발하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출

귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*) 200 g를 동결 건조하여 62.5 g를 얻고 이를 양분하여 증류수와 메탄올에 각각 침출하였다. 30분간 2번 초음파 투과 후 Whatman filter paper로 여과 후 동결 건조하여 건조물을 얻어 수득률을 계산하였다. 수득률은 수용성 추출물이 귀뚜라미 건조물 대비 14.81%, 메탄올 침전물이 13.09% 이상이었다.

실험동물

평균 무게 28±1 g인 6주령 ICR 웅성 생쥐를 한 군당 15 마리씩 실험군을 나누어 정상대조군은 olive oil를 투여하였고, 사염화탄소를 50 mg/kg 복강투여한 후 30분 후에 귀뚜라미 수용성 추출액 20 mg/kg을 생리식염수에 녹여, 메탄올 추출액 20 mg/kg, silymarin 2 mg/kg은 olive oil에 녹여 복강투여하였다. 도태 전 6시간 절식을 실시하고 다음날 안와정맥에서 채혈한 후 간조직을 적출하였다.

혈중 GPT, GOT, LDH 활성측정

안와정맥에서 채혈한 혈액을 4°C에서 30분 방치한 후 3000 ×g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 영동제약 GOT, GPT, LDH kit를 사용하여 혈청 중의 GOT, GPT 및 LDH 활성을 Reitman-Frankel의 방법⁵⁾에 의하여 측정하였으며 간보호 효과(protective potency)는 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{간 보호효과(\%)} = \frac{\text{CCl}_4 \text{ 처리군} - (\text{약물} + \text{CCl}_4) \text{ 처리군}}{\text{CCl}_4 \text{ 처리군} - \text{정상군}} \times 100$$

과산화지질 측정

채혈 후 간을 적출하여 0.9% 생리식염수에 세척하고 -70°C에서 24시간 보관한 다음 homogenizer로 균질화시키고 9000 ×g에서 30분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 post mitochondrial supernatant에서 과산화 생성물인 thiobarbituric acid reactive subatances(TBARS)를 thiobarbituric acid법⁶⁾에 의하여 측정하였으며 지질의 과산화정도를 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 측정하였다.

Glutathione S-transferase 활성측정⁷⁾

간을 66 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하여 균질화 시킨 다음 12,500×g에서 15분간 원심분리하였다. 50 μL glutathione (30 mM), 50 μL 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(30 mM) 및 500 μL potassium phosphate buffer(pH 7.4)가 담긴 시험관에 600 μL post mitochondrial 상등액을 가하여 혼합한 후, 340 nm에서 즉시 흡광도의 변화를 2분 동안 측정하여 ΔE/min를 계산하였다.

항피로 효과

귀뚜라미 추출물의 항피로 효과의 측정은 Toshitsugu Morimura의 급성체중부하 강제 수영법⁸⁾를 실시하여 항피로 능력을 측정하였다. 즉, 시료 100 mg/kg 및 200 mg/kg과 tocopherol(100 mg/kg)을 1일 1회 3일간 연속하여 경구투여하고 최종 시료투여 후 24시간만에 마우스의 꼬리에 체중에 따른 tail factor를 부착시킨 다음 35°C의 항온조에서 강제 수영을 관찰하였다.

단백질 함량 측정

단백질 양은 bovine serum albumin을 대조로 하여 Bradford 방법으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다⁹⁾.

통계처리

분석결과의 통계는 실험군 당 평균치와 표준편차(오차)로 계산하였고 군간의 차이는 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

귀뚜라미 물 추출물과 메탄올 추출물 제조

귀뚜라미를 식품으로 사용하였을 때 물추출물과 알콜추출물이 바람직하다는 견지에서 물과 알콜추출을 실시하였다. 이 때, 수득률은 수용성 추출물이 귀뚜라미 건조물 대비 14.81%, 메탄올 추출물이 13.09% 이상이었다.

사염화탄소 유발 급성 간염에 대한 귀뚜라미 수용성 및 메탄올 추출물의 간보호 효과

급성간염에 대한 귀뚜라미의 수용성 및 알콜추출물이 미치는 영향을 조사하고자 사염화탄소 처리로 간세포의 손상으로 혈청으로 유리되는 GOT, GPT와 LDH 수치가 각각 238.3, 260.8과 1062.4(IU/L serum)으로 증가되었다. 귀뚜라미의 메탄올 추출물(20 mg/kg)을 복강투여한 군에서는 GOT, GPT와 LDH 수치가 각각 74.0, 132.6, 272.4(IU/L serum)로 감소되어, 귀뚜라미 메탄올 추출물은 대조구에 비해 74, 50, 101%의 간독성 회복효과를 나타냄을 알 수 있었다. CCl₄를 복강투여함으로써 증가된 귀뚜라미 물추출물(20 mg/kg)을 복강투여시에도 유의적인 감소수치를 나타내었다. 귀뚜라미 물추출물과 메탄올 추출물의 GOT, GPT, LDH치 저하효과가 silymarin보다 다소 우수하였다(Table 1).

과산화지질 생성억제 효과 및 간의 글루타치온 해독능력 검정

귀뚜라미 물 추출물과 알콜 추출물투여에 대한 CCl₄ 유도 증가되는 지질과산화의 산물인 malondialdehyde 생성억제에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 사염화탄소 투여에 의하여 간독성이 유발되어 지질과산화물이 14% 증가됨을 알 수 있었다. 즉 사염화탄소 투여로 증가된 TBARS 함량은 419.9 μmole/g of tissue이었고, 귀뚜라미 메탄올 추출물을 20 mg/kg 투여시 TBARS 함량이 313.1 μmole/g of tissue로 96% 감소하였다. 귀뚜라미 메탄올 추출물의 지질과산화 억제효과는 silymarin(2 mg/kg)을 투여한 것보다 다소 좋음을 알 수가 있었다. 사염화탄소(CCl₄)에 의한 세포막 손상의 주된

Table 1. Effects of water/methanol extracts of cricket on glutamic-oxaloacetic, glutamic-pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase activities in the mice induced acute liver injuries by CCl₄¹⁾

CCl ₄ (mg/kg)	Treatment test materials	Dos (mg/kg)	GOT (IU/L serum) (protective potency %)	GPT (IU/L serum) (protective potency %)	LDH (IU/L serum) (protective potency %)
0	Olive oil(Control)	0	17.6 ± 1.9 (100)	3.7 ± 0.5 (100)	278.4 ± 47.6 (100)
50	CCl ₄	0	238.3 ± 96.4 (0)	260.8 ± 90.2 (0)	1062.4 ± 370.3 (0)
50	Silymarine	2	118.7 ± 44.4 (54)	203.1 ± 71.3 (22)	501.7 ± 202.1 (72)
50	H ₂ O fraction	20	88.9 ± 45.5 (68)	127.0 ± 63.7 ²⁾ (52)	411.1 ± 210.5 ²⁾ (83)
50	MeOH fraction	20	74.0 ± 23.7 ²⁾ (74)	132.6 ± 59.9 ²⁾ (50)	272.4 ± 90.1 ²⁾ (101)

¹⁾Values represent mean ± S.D. of 15 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered intraperitoneally at 30 min after injection of CCl₄.

²⁾Significantly different from negative control(CCl₄ group) at p<0.01 by Student's t-test.

Table 2. Effects of water and methanol extracts of cricket on lipid peroxide contents and glutathione S-transferase activity in the mice treated with carbon tetrachloride¹⁾

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment test materials	Dose (mg/kg)	TBARS (μmole/g of tissue, %)	GST (nmole/mg protein/min, %)
0	Olive oil (Control)	0	365.4 ± 5.76 (100)	257.0 (100)
50	Reference	0	419.9 ± 10.78 (0)	241.8 (0)
50	Silymarine	2	366.1 ± 22.64 (99)	244.4 (28)
50	H ₂ O fraction	20	343.5 ± 11.32 (140)	275.4 (163)
50	MeOH fraction	20	313.1 ± 0.72 ²⁾ (196)	210.7 (73)

¹⁾Values represent mean ± S.D. of 15 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered intraperitoneally at 30 min after injection of CCl₄.

²⁾Significantly different from positive control (silymarine group) at p<0.05 by Student's t-test.

결과는 지질과산화로 활성산소종(reactive oxygen species: O₂⁻, H₂O₂, ·OH)에 의한 인지질막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산[polyunsaturated fatty acid(PUFA)]의 수소원자를 제거함으로써 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 carbon radical이 분자 재배열을 일으켜 conjugated diene을 형성 후 peroxy radical(ROO·)을 생성, 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성되는 데 lipid hydroperoxide는 분해되어 malondialdehyde(MDA) 등의 알데히드를 생성한다^(10,11). 본 실험에서 귀뚜라미 수용성 및 메탄올 추출물의 투여에 의해서 TBARS의 생성을 정상군 대비 40%이상 억제함을 보였다.

또한 간의 독성물질 투입시 활성화되어 해독에 관여하는 대표적인 효소인 글루타치온 에스 트랜스퍼라제(glutathione S-transferases)⁽¹²⁾의 활성을 사염화탄소 유발 30분 후 귀뚜라미 추출액을 Table 2와 같이 투여했을 때 수용성 추출물에서 63%의 효소활성 증가를 보여주었다. 귀뚜라미의 물 또는 알콜 추출물의 경우 TBARS의 비율이 올리브 투여군을 대조로 한 것보다 더 낮은 비율을 나타내는 데 귀뚜라미는 잡식성으로 사람이 먹다 버린 음식 찌꺼기(상한 음식도 포함)를 먹거나 풀밭에 사는 벌레 및 풀을 먹으면서 생존·번식한 관계로 아마도 귀뚜라미추출물 중에 과산화지질 분해력이 우수한 것이 포함되었을 것으로 사려되어질 수 있다.

항피로 효과

귀뚜라미 추출물의 시료를 마우스에 연속 경구투여 후, 강제 수영을 관찰한 결과 대조군의 평균수영시간은 10.6분 분포를 보였다. 물 추출물 및 메탄올 추출물 투여시 항피로효

과를 살펴보면, 물 추출물의 경우는 100 mg/kg 투여시 16.2분, 200 mg/kg 투여시 25.5분, 알콜 추출물의 경우에도 100 mg/kg 투여시 16.0분, 200 mg/kg 투여시 33.6분으로 현저

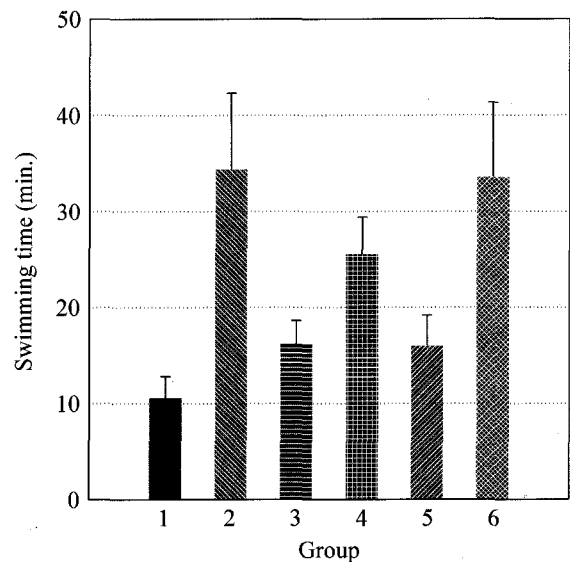


Fig 3. Effect of water and methanol extracts of *Gryllus bimaculatus* on swimming times in mice.

1, control; 2, tocopherol 100 mg/kg; 3, water extract 100 mg/kg; 4, water extract 200 mg/kg; 5, methanol extract 100 mg/kg and 6, methanol extract 200 mg/kg. Forced swimming was performed 24 h after the administration of test subatances (one time/day for 3 days). Each value representd the mean ± SE of 15 mice.

*Significantly different from control at p<0.05 by Student's t-test.

한 수영시간 증가를 보여 매우 유의성 있는 항피로 효과를 나타내었다. 특히 메탄올 추출물(200 mg/kg) 투여시 대조군에 비하여 3배 이상의 수영시간 연장효과를 보여 강력한 항 피로효과를 보였다(Fig. 3). 대조 단일 약물인 α -tocopherol acetate(100 mg/kg)의 2배 투여량인 귀뚜라미의 조추출물(200 mg/kg)에서 거의 대등한 항피로 효과를 나타낸 것은 토코페롤이 단일물질임을 감안할 때 α -tocopherol acetate에 비해 다소 떨어지지만 상당한 항 피로 효과를 나타내었다고 할 수 있다. 이상의 실험결과에서 볼 때 귀뚜라미 추출물들이 강제수영에 대하여 건디는 힘을 증가시키는 작용이 있다.

요 약

귀뚜라미의 곤충산업의 발달로 대량체화 사육된 귀뚜라미의 새로운 용도 개발의 일환으로 귀뚜라미의 간보호 효과를 조사하였다. 사염화탄소로 6주령의 ICR 웅성 생쥐에 급성간염을 유발시킨 후 귀뚜라미 물 추출물(20 mg/kg) 및 메탄올 추출물(20 mg/kg)을 각각 투여하여 GOT, GPT, LDH 간혈청 효소 활성을 조사한 결과 귀뚜라미 메탄올 추출물은 대조군에 비해 GOT, GPT, LDH치가 74, 50, 101% 감소하였다. 지질과산화 억제 정도는 귀뚜라미 물추출물 및 메탄올추출물이 정상군 대비 40%이상의 억제 효과를 나타내었다. 또한 강제수영법에 의한 귀뚜라미 추출물의 항피로 효과를 측정시 대조군에 비해 메탄올 200 mg/kg에서 현저한 수영시간 증가를 보여 양성대조군인 토코페롤 100 mg/kg 수준의 유의성 있는 항피로 효과를 나타낸 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 귀뚜라미의 수용성 및 알콜추출물은 간보호 효과를 가지는 건강보조식품으로서 개발 가능성을 가짐을 알 수 있다.

문 헌

1. Kim, C.H. Insect and Human. pp. 110-111. Kyungbuk University Press, Daegu (1989)
2. Ahn, M.Y., Ryu, K.S., Park, B.Y., Kim, D.W., Kim, I. and Kim, S.H. Effect of cricket on the chicken and its egg. Korean J. Poult. Sci., 27: 197-202 (2000)
3. Moon, C.K., Ahn, M.Y. and Chung, J.H. Protective effects of some polysaccharides on the acute hepatic damages of ICR-mice induced by administration of carbon tetrachloride and D-galactosamine. Yakhak Hoeji 29: 43-49 (1985)
4. Cui, Z., Ahn, M.Y., Lee, Y.B. and Ryu, K.S. Materia Medica from Insects, pp. 22-23. Shinilbooks, Seoul (2002)
5. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am. J. Clinic. Pathol. 28: 56-63 (1957)
6. Groot, H. and Noll, T. The crucial role of oxygen partial pressures in haloalkane free radical mediated lipid peroxidation. Biochem. Pharmacol. 35: 15-19 (1986)
7. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139 (1974)
8. Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffi blomhoffii* BOIE. V. Anti-fatigue effect on the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats. Biol. Pharm. Bull. 19: 62-66 (1996)
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
10. Recknig, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 19: 145-208 (1967)
11. Logani, M.K. and Davis, R.E. Lipid peroxidation. Lipids 15: 485 (1979)
12. Kalplowitz, N., Aw, T.Y. and Ookhtens, M. The regulation of hepatic glutathione. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25: 715-744 (1985)

(2001년 10월 5일 접수; 2002년 8월 10일 채택)