

약용곤충추출물 라이브러리를 이용한 항산화 활성의 초고속 검색

박자영 · 허진철 · 안상미 · 윤은영¹ · 한상미¹ · 황재삼¹ · 강석우¹ · 윤치영² · 이상한[†]
경북대학교 식품공학과, ¹농업과학기술원 농업생물부, ²대전대학교 생명과학과

High Throughput-compatible Screening of Anti-oxidative Substances by Insect Extract Library

Ja-Young Park, Jin-Chul Heo, Sang Mi An, Eun Young Yun, Sang Mi Han¹,
Jae-Sam Hwang¹, Seok-Woo Kang¹, Chi-Young Yun² and Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹AgroBiology Division, Rural Development Agency(RDA), Suwon 441-853, Korea

²Department of Biology, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

Abstract

Oxidant stress is well-known for a pivotal parameter related to neuro-inflammatory diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and ALS (Lou Gehrig's disease). In order to effectively screen for anti-inflammatory agents, we first established the infrastructure of high throughput screening for anti-oxidant agents from medicinal insect library extracted with water, methanol, ethanol, and dimethyl sulfoxide. By the screening system, we found that *Tenodera angustipennis* Saussure, *Pyrocoela rupa* Olivier and *Papilio maackii* Mntris had strong anti-oxidant activity. Moreover, *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* (Stoll) exhibited protection effects of cellular damage by treatment of an oxidant hydrogen peroxide. Together, the results suggest that some selected hits could be a potential agent against neuro-inflammation, although the *in vivo* studies should be clearly tested.

Key words : high throughput-compatible screening, antioxidant agents, library, insect

서 론

국민생활 수준의 향상과 의학기술의 발달로 평균 수명이 증가하면서 사회적으로 인구의 고령화 현상이 문제화되고, 노인건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 노화촉진의 원인으로 활성산소(oxygen free radicals)가 부각되고 있다. 활성산소는 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, O⁻), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical, ·OH) 및 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)와 같은 반응성이 큰 화합물로서 강력한 산화작용을 가지며 백혈구에서는 외부에서 침입한 세균을 산화시켜 살균시키는 유익한 작용을 한다. 그러나 이러한 활성산소가 생체방어계의 용량을 초과하게 되면 산화적 스트레스를 야기하고 과산화지질(lipid peroxide: LPO)이나

산화분해물을 생성함으로써 주변 조직들을 손상시켜 각종 암, 치매, 파킨슨 질환, 심혈관질환, 동맥경화 등의 질병을 일으킨다(1-4). 또한 조직세포의 기질뿐만 아니라 단백질과 DNA까지도 공격을 받으며, 과산화지질, 산화 단백질(oxidized protein: OP) 및 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)을 생성하면서 노화를 촉진한다고 보고되고 있다(5-7). 결국 노화는 조직세포에 대한 활성산소의 공격으로 진행되며, 특히 활성산소의 일종인 NO(nitric oxide)는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthases(NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포 내에서 2차 신호 전달자로서 중요한 역할을 한다(8). 따라서 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소를 억제하는 항산화 물질에 많은 관심을 가지고 있다(9-12).

현재까지의 유용생물자원활용에 대한 관심이나 연구는 주로 한약재와 같은 식물군에 대하여 집중되어 왔으며, 유용곤충의 이용개발에 대해서는 전세계적으로도 그 관심도가 아주 낮은 형편이었다. 그러나 최근에 이르는 곤충의

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

다양성과 활용성이 재인식됨과 동시에 농업과 생물산업의 기술개발에 곤충이 생물자원으로서 이용가능성이 높다는 확신을 갖게 되었다. 생물자원으로서의 곤충이용이란 천적으로서의 활용, 화분 매개충으로서의 이용, 생산적 이용, 약용 및 식용 등을 비롯하여 gene pool로서의 중요성 등이 강조될 수 있다. 특히 곤충을 약용으로 사용했다는 기록은 동서양을 통해 잘 알려져 온 사실이며 우리나라에서도 오래 전부터 한방이나 민간요법에서 곤충들이 약용으로 쓰이고 있으나, 과거의 참고자료나 고서들에 있는 한방제로서의 효용이나 용법은 대부분이 과학적 분석결과가 없이 경험, 민간요법, 한의학의 시도에 의한 것들이다(13).

한편, 사회적으로 건강·장수에 대한 관심이 높아지고 무병장수에 대한 욕구가 커지면서 의·약품이 아닌 가능성을 지닌 식품을 통하여 이를 해결하고자 노력하고 있다. 신약 개발과 비교하여 최근의 새로운 식품의약의 개발은 크게 두 가지의 관점에서 주목할 수 있다. 이는 시간과 비용의 측면이며, 자동화 (automation)와 HTS(high throughput screening) system은 이 두 가지 측면을 만족시킬 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다(14-15). HTS system의 최대 장점은 단위 시간에 동일한 방법의 실험을 많은 후보물질을 이용하여 할 수 있다는 점이며, 많은 수를 가진 96/384/1536 등의 microplate를 사용함으로써 보다 작은 공간에서 많은 양의 library 검색이 가능하다. 또한 liquid handler(예를 들면 nanohead)의 사용으로 적은 양의 reagent를 사용할 수 있는 장점도 있다(16). 이러한 과정을 자동화함으로써 이전의 고전적이고 수동적이었던 작업에 비교하여 시간의 절약과 가저울 수 있으며, 장비와 기구에 의해 실험의 정밀도를 높임으로써 그 비용을 크게 줄일 수 있는 이점이 있다(17).

따라서 본 연구는 분자염증과 관련한 산화적 스트레스를 억제하는 기능성 식품소재로서 곤충이 갖는 약용생물자원으로서의 중요성과 높은 이용가능성을 고찰하고자 시도하였으며, 이를 위해 먼저 (1)항산화제와 관련된 HTS system을 구축하고, 이를 이용하여 (2)식품소재 라이브러리로부터 활성이 인정되는 몇 가지의 추출물을 확보하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 곤충은 대전대 생명과학과로부터 제공 받았으며 실험에 사용된 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH: St. Louis, MO), ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ: Sigma), linoleic acid (Sigma), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox) 등이었다.

식품소재용 라이브러리의 조제

42여 종의 곤충을 각각 용매 별로 다르게 추출하여 약 168여 개의 library를 제작하였다. distilled water (DW), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, methanol을 이용하여 24시간 추출과정을 거쳤으며, DW 추출물은 섭씨 60℃에서 열수 추출하였다. 이후 HTS가 적용 가능한 96-well plate로 옮긴 다음 -20℃에 보관 후 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. A list of medicinal insect resources for anti-inflammatory agent screening

No.	Specie	Korean name	Conc. (mg/ml)
1	<i>Anax parthenope julius</i> Brauer	왕잠자리	260
2	<i>Orthetrum albistylum speciosum</i> (Uhler)	밀잠자리	100
3	<i>Statilia maculata</i> (Thunberg)	좀사마귀	120
4	<i>Tenodera angustipennis</i> Saussure	사마귀	210
5	<i>Tenodera aridifolia</i> (Stoll)	왕사마귀	340
6	<i>Velarifictorus aspersus</i> (Walker)	귀뚜라미	300
7	<i>Gryllotalpa orientalis</i> (Burmeister)	땅강아지	190
8	<i>Atractomorpha lata</i> (Motschulsky)	섬서구메뚜기	90
9	<i>Oxya japonica japonica</i> (Thunberg)	벼메뚜기	170
10	<i>Acrida cinerea cinerea</i> (Thunberg)	방아깨비	190
11	<i>Stethophyma magister</i> (Rehn)	끝검은메뚜기	80
12	<i>Gastrimargus marmoratus</i> (Thunberg)	콩중이	270
13	<i>Oedaleus infernalis</i> Saussure	팔중이	160
14	<i>Laccotrephes japonensis</i> Scott	장구애비	250
15	<i>Ranatra chinensis</i> Mayr	개아재비	220
16	<i>Muljarus japonicus</i> (Vuillefroy)	물자라	80
17	<i>Poecilocoris lewisi</i> (Distant)	광대노린재	100
18	<i>Meimuna opalifera</i> (Walker)	애매미	150
19	<i>Meimuna mongolica</i> (Distant)	쓰름매미	120
20	<i>Oncotympana fuscata</i>	참매미	440
21	<i>Cicindela (Cicindela) transbaicalica hamifasciata</i> Kolbe	참뜰갈알잡이	150
22	<i>Cybister (Meganectes) brevis</i> Aube	검정물방개	90
23	<i>Hydrophilus acuminatus</i> Motschulsky	물땡땡이	460
24	<i>Melolontha incana</i> (Motschulsky)	왕풍뎅이	180
25	<i>Allomyrina dichotoma</i> Linn	장수풍뎅이	860
26	<i>Anomala chamaeleon</i> Fairmaire	카메레온줄풍뎅이	40
27	<i>Trichius succinctus</i> (Pallas)	호랑꽃무지	50
28	<i>Gametis jucunda</i> Faldermann	풀색꽃무지	40
29	<i>Protaetia brevitarsis seulensis</i> (Kolbe)	흰점박이꽃무지	270
30	<i>Luciola lateralis</i> Motschulsky	애반딧불이	200
31	<i>Pyrocoela rupa</i> Olivier	늦반딧불이	240
32	<i>Coccinella (Coccinella) septempunctata</i> Linn	칠성무당벌레	60
33	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas)	무당벌레	110
34	<i>Moechotypa diphysis</i> (Pascocoe)	털두꺼비하늘소	360
35	<i>Oides decempunctatus</i> (Billberg)	열점박이벌말벌레	180
36	<i>Sipalinus gigas gigas</i> (Fabricius)	왕바구미	90
37	<i>Latoia consocia</i> (Walker)	장수췌기나방	100
38	<i>Papilio maackii</i> Mntiris	산제비나비	60
39	<i>Papilio xuthus</i> Linn	호랑나비	50
40	<i>Pieris rapae</i> (Linn)	배추흰나비	50
41	<i>Eurema hecabe</i> (Linn)	남방노랑나비	70
42	<i>Sasakia charonda</i> (Hewitson)	왕오색나비	40

High throughput-compatible screening 구축

HTS를 이용한 hit 검색을 위하여 한국생명공학연구원에 설치되어 운용하고 있는 시스템을 사용하였다. Liquid handler (CyBio, Jena, Germany), multi-label counter (VICTOR2, Wallac, Turku, Finland)와 robotic arm (Thermo-CRS, Burlington, Canada) 등이 사용되었다. 이 3종의 기기는 automation software (POLARA)로 조합되어 있어서 작은 공간에서 대량의 물질을 검색하기에 최적으로 설치되어 있으며, 아래의 여러 가지 assay를 신속하게 수행할 수 있었다.

DPPH radical scavenging assay

DPPH radical 소거활성능 측정은 Tagashira의 방법을 변형하여 실험을 하였다(18). 각 추출물의 시료 10 μ l를 0.2 mM DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 190 μ l에 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 sample의 radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Ferric ion reducing antioxidant power(FRAP) assay

실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer(pH 3.6, 300 mM): 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine): 20 mM의 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험 직전에 만들어 사용하였다. 반응액(190 μ l)과 추출물(10 μ l)을 혼합한 후 150초 간격으로 약 25분 간 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시간에 따른 상대적인 비교를 하였으며, 재로 별 활성정도는 15분 후의 값을 기준으로 하였다(19).

Hydroxyl radical (HO) scavenging assay

Hydroxyl radical 소거 활성은 Fe^{II} 와 H_2O_2 가 반응하는 Fenton 반응을 이용하여 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA(malondialdehyde)로 분해시킬 때 나오는 MDA를 530 nm에서 측정하였다. 반응액으로는 50 mM의 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 50 mM 2-deoxyribose를 1 : 1 : 2의 비율로 섞은 다음 반응액(190 μ l)과 시료(10 μ l)를 섞었다. 이후 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)와 50 mM H_2O_2 를 적당량 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 방치한 다음 TCA(trichloroacetic acid)와 TBA(2-thiobarbituric acid)를 반응물에 첨가하였다. 100°C에서 15분 동안 가열 후 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 정도는 시료를 넣지 않은 균을 대조군으로 % 비율로 나타내었다(20).

Linoleic acid에 대한 항산화 활성

Linoleic acid 항산화 활성 실험은 linoleic acid를 기질로

하여 과산화 지질을 억제하는 방법을 이용하여 실험에 사용하였다. 과산화지질 (Linoleic acid)에 의해 Fe^{II} 가 Fe^{III} 로 산화가 되고 이 때 Fe^{II} 의 반응물인 ammonium thiocyanate을 넣어 이를 ELISA에서 정량을 한 것이다. 반응은 과산화지질 (linoleic acid)에 의해 Fe^{II} 가 Fe^{III} 로 산화되게 되고 Fe^{III} 는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 정량한 것이다. 시료 (10 μ l)와 linoleic acid(100 μ l)를 혼합한 다음 50 mM sodium phosphate buffer(100 μ l)를 넣고 40-60°C의 암소에서 반응시켰다. 반응물은 각각 시간별로 취하여 반응을 정지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

Hydrogen peroxide (H_2O_2)에 의한 세포사멸 억제 실험

Hydrogen peroxide (H_2O_2)에 의한 세포사멸 억제 실험은 서울대 암세포은행에서 분양받은 SHSY-5Y cell line을 사용하였다. 배양액으로는 RPMI 1640 (Gibco, U.S.A)에 10% fetal bovine serum (Gibco)과 penicilline G(25 unit/ml), streptomycin(0.25% ng/ml)를 첨가하여 사용하였고 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기에서 하였다. MTT 정량분석은 Mosmann의 방법에 따라, 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 200 nL씩 96-well plate에 분주하고 각 시료를 1 nL씩 넣어 24시간 배양한 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다(22).

결과 및 고찰

본 연구는 두 가지 목적을 가지고 실험을 수행하였다. 그 중 하나는 천연에서 얻을 수 있는 약용곤충추출물로부터 신경염증과 관련한 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 물질을 찾는 것이며, 다른 하나는 이러한 실험을 대량으로 하기 위해 HTS 시스템을 이용하여 보다 빠른 시간에 보다 적은 비용으로 실험을 수행하는 시스템을 구축하는 것이었다. 먼저, 주변에서 용이하게 확보할 수 있는 42여 종의 약용곤충을 DW, DMSO, ethanol, methanol로 각각 추출하여 DPPH, FRAP, linoleic acid 항산화 assay, 그리고 hydroxyl radical 소거활성실험과 같은 항산화 실험을 HTS 시스템화하여 실시하였다. 그리고 MTT assay를 통해 hydrogen peroxide (H_2O_2)에 의한 세포손상을 억제하는 활성을 검토하였다.

DPPH 활성 실험은 매우 간단하면서도 강력한 항산화 검색 방법으로 널리 이용되고 있다. DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 화합물로서 그 자체가 매우 안정한 화합물인데 hydroxyl proton radical scavenger에 의해서 색이 바뀌는 성질을 이용한 것으로 눈으로 쉽게 그 활성을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, Optical Density(OD)를 측정하여 그 활성 정도를 비교할 수 있다. 실험 결과 DW 추출물에 있어

서는 사마귀(*Tenodera angustipennis* Saussure), 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma* Linn), 늦반딧불이(*Pyrocoela rupa* Olivier), 산제비나비(*Papilio maackii* Mntiris) 등이 상대적으로 높은 활성을 나타냈다. DMSO의 추출물에서는 활성이 낮게 나왔으나, 왕사마귀(*Tenodera aridifolia* (Stoll)), 물뽕뽕이(*Hydrophilus acuminatus* Motschulsky) 등에서 비교적 높은 활성을 나타냈다. Ethanol 과 methanol 추출물에서는 비슷하게 높은 활성 경향을 나타냈으며 특히 사마귀, 팔중이(*Odealeus infernalis* Saussure), 검정물방개(*Cybister* (*Meganectes*) *brevis* Aube), 장수풍뎅이, 늦반딧불이, 왕바구미(*Sipalinus gigas gigas*(Fabricius)), 산제비나비 등이 높은 활성을 보여 주었다. 추출물질에 따라 차이를 보였으나 비교적 높은 극성을 가진 용매인 ethanol과 methanol에 녹인 추출물에서 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈다(Fig. 1).

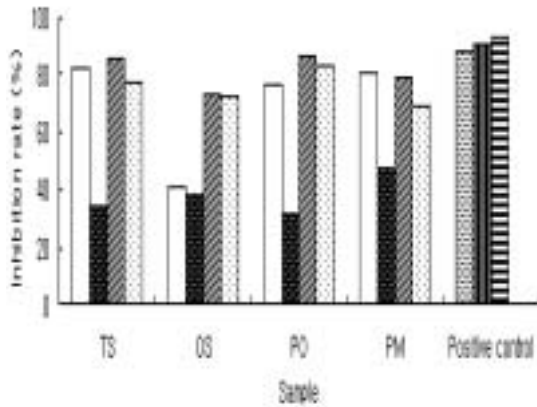


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity.

DPPH radical scavenging activity (%) of *Tenodera angustipennis* Saussure (TS), *Odealeus infernalis* Saussure (OS), *Pyrocoela rupa* Olivier (PO), *Papilio maackii* Mntiris (PM) ; DW (), DMSO (■), Ethanol (), Methanol () extracts, positive control ; Trolox (□), BHT (▨), BHA (▩).

FRAP 활성실험은 물질의 환원력을 측정하는 실험으로 ferric tripyridyltriazine (Fe^{III} -TPTZ) 복합체가 환원제 (antioxidant)에 의해서 파란색의 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{II} -TPTZ) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여 검색하고자 하는 화합물에 대한 환원력 (ferric reducing ability)를 보는 것이다. 실험 결과, methanol 추출물에서 전반적으로 높은 활성을 나타냈으며 그 중 왕잠자리, 물사마귀, 사마귀, 섬서구메뚜기, 벼메뚜기, 끝검은메뚜기, 팔중이, 늦반딧불이 등이 특히 높은 활성을 보였다. DW 추출물의 경우에는 좀사마귀, 사마귀, 왕사마귀, 방아깨비(*Acrida cinerea cinerea* (Thunberg)), 장수췌기나방, 호랑나비(*Papilio xuthus* Linn) 등이, DMSO 추출물의 경우는 사마귀, 왕사마귀, 팔중이, 계야재비(*Ranatra chinensis* Mayr), 장수췌기나방, 산제비나비, 호랑나비 등이, 그리고 ethanol 추출물에서는 왕잠자리(*Anax parthenope Julius* Brauer), 물사마귀, 사마귀, 팔중이, 장수풍뎅이, 늦반딧불이 등이 좋은 활성을 나타냈다.

전체적으로 추출 용매에 관계없이 활성이 높게 나온 것으로는 사마귀, 왕사마귀, 늦반딧불이 등이었으며, 이들은 수용성 비타민 E성분으로서 항산화 효과가 뛰어나 널리 사용되고 있는 Trolox 보다 더 좋은 활성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2).

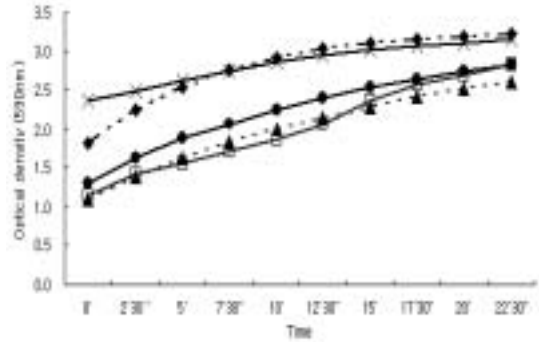


Fig. 2. Ferric ion reducing anti-oxidant power (FRAP) assay.

Ferric ion reducing anti-oxidant power (FRAP) assay of *Papilio xuthus* Linn in DW (PL:◆), *Tenodera angustipennis* Saussure in DMSO (TS:●), *Pyrocoela rupa* Olivier in Ethanol (PO:▲), *Anax parthenope Julius* Brauer in Methanol (AB:□), Trolox (×).

Hydroxyl radical 소거활성 실험은 2-deoxyribose 산화 방법을 이용하여 MDA 생성농도를 530 nm에서 측정하였다. Fe^{II} 와 H_2O_2 가 반응하는 Fenton 반응에 의해 생성되어진 hydroxyl radical이 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA (malondialdehyde)로 분해시키며 이 때 생성된 MDA는 세포막 지질성분인 불포화 지방산이 산화스트레스를 받으면 생성되는 대표적인 과산화지질 물질로서 세포 손상이나 세포막 구성 물질들의 변형을 야기시키는 원인이 된다. 실험을 통해 나타난 MDA 농도 변화를 살펴보면, 시료를 넣지 않은 것에 비해 methanol 추출물을 넣은 실험군의 농도가 대부분 낮게 나타난 것을 볼 수 있으며, 좀사마귀, 풀색꽃무지(*Gametis jucunda* Faldermann), 칠성무당벌레(*Coccinella septempunctata* Linn), 무당벌레(*Harmonia axyridis* (Pallas)), 열점박이별잎벌레(*Oides decempunctatus* (Billberg)), 남방노랑나비 등을 넣은 실험군에서는 추출용매에 상관없이 공통적으로 MDA 농도가 낮은 것을 볼 수 있다(Fig. 3). 이를 통해 약용곤충추출물이 혈중 과산화지질 수준을 저하시킨다는 것을 알 수 있다.

Linoleic acid 항산화 실험은 Takao방법과 linoleic acid를 기질로 하는 반응 시스템 (reaction system)에서 과산화물의 생성을 억제하는 Nakatani의 ferric thiocyanate 방법을 변형하여 사용하였다. 과산화 지질 (linoleic acid)에 의해 Fe^{II} 가 Fe^{III} 로 산화되게 되고 Fe^{III} 는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 정량한 것이다. 실험 결과, DW와 DMSO 추출물에서 좋은 활성을 보였다. DW 추출물의 경우 좀사마귀, 물뽕뽕이, 배추흰나비, 남방노랑나비, 왕오색나비(*Sasakia charonda* (Hewitson)) 등이 활성이 높게 나타났으며, DMSO 추출물

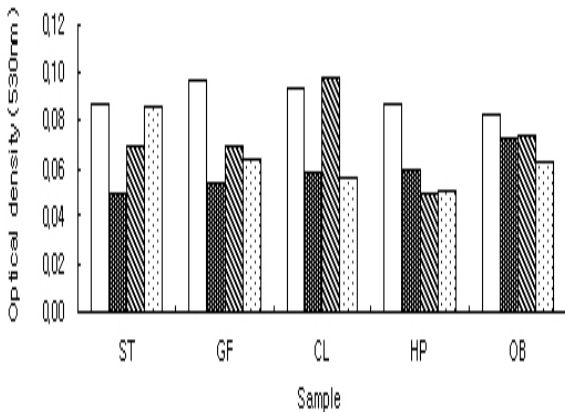


Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging activity.

Hydroxyl radical scavenging activity of *Statilia maculata* (Thunberg) (ST), *Gametis jucunda* Faldernmann (GF), *Coccinella septempunctata* Linn (CL), *Harmonia axyridis* (Pallas) (HP), *Oides decempunctatus* (Billberg) (OB) ; DW (), DMSO (■), Ethanol (), Methanol () extracts.

에 있어서는 사마귀, 왕사마귀, 방아깨비, 팔중이, 참뿔길앞잡이 등이 높은 활성을 보였다. 상대적으로 낮은 활성을 보인 ethanol과 methanol 추출물에 있어서는 사마귀, 왕사마귀 등이 좋은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이들은 강력한 항산화제인 BHA, BHT와 비교해 봤을 때 나온 산화 억제 효과를 보였다.

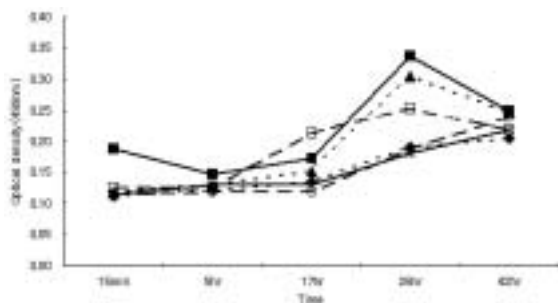


Fig. 4. Peroxidation inhibition activity.

Peroxidation inhibiting activity of *Sasakia charonda* (Hewitson) in DW (SH:◆), *Odealeus infernalis* Saussure in DMSO (OS:■), *Acrida cinerea cinerea* (Thunberg) in Ethanol (AT:▲), *Tenodera aridifolia* (Stoll) in Methanol (TS:□), BHT(※), BHA(○).

Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 매우 큰 확산성을 가지고 있으며, 거의 모든 부분에 존재하는 물질이다. 또한 빠르게 생체 내에서 여러 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있고, 세포막을 침투하여 세포의 신호전달과정에 이상을 일으키는 것으로 알려져 있다(23-25). Hydrogen peroxide에 의한 세포사멸을 억제하는 것으로 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. DW 추출물의 경우 섬서구메뚜기(*Atractomorpha lata* Motschulsky), 방아깨비, 팔중이, 무당벌레, DMSO 추출물의 경우 애매미(*Meimuna opalifera* (Walker)), 무당벌레, 그리고 ethanol과 methanol의 경우 좀사마귀, 사마귀, 왕사마귀, 늦방딴불이, 왕오색나비 등에서 세포사멸 억제 효과가 높게 나타났다(Fig. 5).

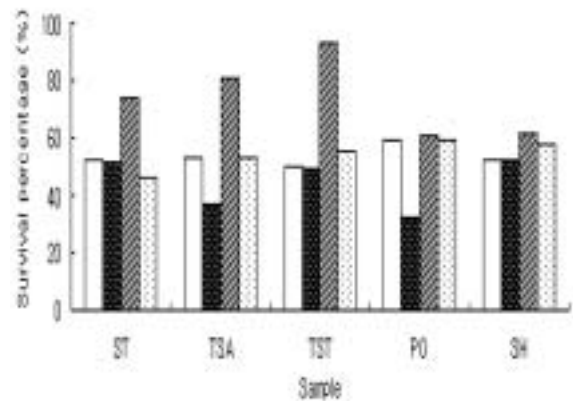


Fig. 5. MTT assay for protection effect by hydrogen peroxide.

Statilia maculata (Thunberg) (ST), *Tenodera angustipennis* Saussure (TSA), *Tenodera aridifolia* (Stoll) (TST), *Pyrocoela rupa* Olivier (PO), *Sasakia charonda* (Hewitson) (SH) ; DW () DMSO (■), Ethanol (), Methanol () extracts.

우리 몸에서는 세포 대사 과정을 통해 끊임없이 산소 유리기가 생성하고 있으며 또한 기본적으로 이러한 산소 유리기를 제거할 수 있는 항산화 기능을 가지고 있다. 그러나 현대 생활에서는 스트레스, 음주, 과식, 흡연, 자외선 등의 외부 요인에 의해 영향을 받아 산화 스트레스의 정도가 증가되어 인체의 자체적인 항산화 기능만으로는 증가된 산소유리기를 처리하기 어렵다. 따라서 그 대안으로 비타민 E, 비타민 C, 베타-카로틴, 셀레늄과 같은 추가적인 항산화 물질을 식품을 통해 섭취하는 것이 필요하다고 여겨진다. 더구나 일련의 단계로 진행되는 신경염증 반응, 특히 노인성 치매에 있어서의 산화 질소(nitric oxide)와 같은 산화 스트레스는 신경세포의 단백질, DNA, 지방 등의 대사에 영향을 주어 중추신경세포사를 유발시켜 기억력과 같은 정신기능을 퇴화시킨다. 이러한 관점에서 본 연구는 지금까지 많은 연구가 이루어져 있지 않은 약용곤충추출물로부터 산화스트레스 유발 물질인 superoxide를 억제하여 뇌 손상 억제와 보호 효과를 가져오는 식품소재를 HTS 시스템을 이용하여 알아보고자 하였다(26). 이상의 결과를 종합하면 HTS 스크리닝 시스템의 구축과 이 시스템을 사용하여 가장 뛰어난 항산화 활성을 가지고 분자염증에 유효하리라 판단되는 추출물질은 사마귀, 무당벌레였으며, 특히 무당벌레는 대량적으로 확보가 용이하다는 점이 향후 산업화에 매우 유리하다고 판단된다. 이에 위의 실험에서 나온 몇 가지 물질을 이용하여 더 구체적인 메커니즘에 대해 연구해 볼 계획이다.

요 약

산화적인 스트레스(Oxidative stress)는 신경염증의 발병 요인 중의 하나로 알려져 있다. 이에 본 연구는 약용곤충추출물을 이용하여 항산화 물질을 찾고자 초고속 적용가능한

스크리닝 방법을 적용하였다. 우선, 분자염증은 활성산소 관련 물질과 밀접한 관련이 있으므로 이들의 억제와 동반하는 추출물을 먼저 선별하였다. 항산화 실험과 관련하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), FRAP(Ferric ion reducing antioxidant power), HO (Hydroxyl radical) 소거, linoleic acid에 대한 항산화 활성 등을 assay하였고 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의한 세포사멸 억제 활성을 보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과, 사마귀, 늦반딧불이, 무당벌레에서 다른 library에 비교하여 항산화 활성이 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20050301-034-474-116-01-00)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Jim, L.M., Han, S.S. and Choi, Y.S. (2002) Antioxidant effects of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. Kor. J. Pharmacogn., 33, 359-363
2. Choi, S.I., Lee, Y.M. and Heo, T.R. (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 18, 282-288
3. Jung, S.J., Lee, J.H., Song, H.N., Seong, N.S., Lee, S.E. and Baek, H.I. (2004) Natural Products, Organic Chemistry ; Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Kor. Soc. Appl. Bio. Chem., 47, 135-140
4. Shin, K.A., Ko, Y.S. and Lee, Y.C. (1998) Antioxidant effects and characteristics of methanol extracts from perilla oils roasted for different time. Kor. J. Food Sci. Technol., 30, 1045-1050
5. Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: Free radical and tissue injury. Lab. Invest., 47, 412-426
6. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Sau, I.R.A., McCord, J.M. and Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med., 107, 526-545
7. Southorn, P.A. and Powis, G. (1988) Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. Mayo Clin Proc., 63, 390-408
8. Palmer, R.M., Ashton, D.S. and Moncada, S. (1988)

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature., 333, 664-666

9. Kubes, P. (2000) Inducible nitric oxide synthase; a little bit good in all of us. Gut, 47, 6-9
10. Hu, F., Lu, R., Huang, B. and Ming, L. (2004) Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected chinese medical plants. Fitoterapia, 75, 14-23
11. Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J.H. (2003) Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life Sciences, 73, 167-179
12. Kim, S.M., Cho, Y.S. and Sung, S.K. (2001) The antioxidant ability and nitrite scavenging activity of plant extracts. Kor. J. Food Sci. Technol., 33, 626-632
13. Park, K.T. and Lee, J.S. (1998) Review on insect resources for medical use in Kangwon province. Kor. J. Apiculture, 13, 79-92
14. Keseru, G.M. (2004) The role of high throughput screening in the early stage of drug research. Acta Pharm. Hung., 74, 5-10
15. Winkler, D.A. (2004) Neural networks as robust tools in drug lead discovery and development. Mol. Biotechnol., 27, 139-68
16. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Moore, T. and Posten, C. (2000) Miniaturization of a functional transcription assay in yeast (human progesterone receptor) in the 384- and 1536-well plate format. J. Biomol. Screen, 5, 71-6
17. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Zimmermann, P., Moore, T. and Posten, C. (2001) Evaluation of liquid handling conditions in microplates. J. Biomol. Screen, 6, 47-56
18. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. Free Radic. Res., 36, 177-87
19. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem., 48, 3396-402
20. Okada, Y., Okajima, H., Shima, Y. and Ohta, H. (2002) Hydroxyl radical scavenging action of capsaicin. Redox Rep., 7, 153-7
21. Mun'im, A., Negishim O. and Ozawa, T. (2003) Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. Biosci Biotechnol Biochem, 67, 410-4
22. Mosmann, T. (1978) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation

- and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63
23. Liu, S.Q., Saijo, K., Todoroki, T. and Ohno, T. (1995) Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nature Med.*, 1, 267-71
24. Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 272, 217-221
25. Han, H.J., Lee, Y.J., Park, J.Y., Kim, E.J., Lee, J.H. and Taub, M.L. (2005) Effect of EGF on H₂O₂-induced inhibition of alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of MAPK and AA release. *J. Cell Physiol.*, 20, 217-25
26. Lim, J.S. (2003) Studies on the treatment and prevention of dementia by green-tea extracts. *한의학논문집*, 12, 11-26
-

(접수 2005년 7월 1일, 채택 2005년 9월 30일)