

사마귀류 추출물의 생물학적 활성 비교

허진철 · 황재삼¹ · 강석우¹ · 윤치영² · 이상한[†]

경북대학교 식품공학과, 농업과학기술원 농업생물부, 대전대학교 생물학과

Comparison of Biological Activities in Crude Extracts of Mantis

Jin-Chul Heo, 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

¹*Division of Agricultural Biology, National Advanced Institute of Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea*

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

Abstract

In order to investigate the availability of insect resources for agrobiotechnological or medical purposes, we examined antioxidant (DPPH and FRAP assay) and cell viability by oxidant stress and NO inhibition assay by treatment of the extracts of *Statilia maculata* Thunberg, *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* Stoll. We found that *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* Stoll extract (DW, ethanol, methanol) had high levels of anti-oxidant activity, whereas *Tenodera aridifolia* Stoll extract showed increased cell viability by hydrogen peroxide and inhibition of NO production. These findings suggest that *Statilia maculata* Thunberg, *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* Stoll, extract have potentials to be developed for agrobiotechnology or medicinal use, indicating that mechanistic study including inhibition against molecular inflammation will show a possibility for the development of useful insect resources.

Key words : *Statilia maculata* Thunberg, *Tenodera angustipennis* Saussure, *Tenodera aridifolia* Stoll

1. 서 론

곤충은 지구상에서 가장 많은 종과 수를 유지하고 있는 생물로서 여전히 많은 부분에서 연구가 이루어지고 있는 생물군의 하나이다. 과거 곤충소재는 주로 식품과 약재 등에 많이 이용이 되어져 왔다(1).

곤충은 지구상에서 가장 많은 종의 수와 개체를 가지고 있으며, 뛰어난 환경 적응력으로 전 세계에 넓게 분포하고 있다. 최근 다양성이 풍부한 곤충자원을 이용하려는 많은 시도가 있는데 이는 곤충을 유용한 생물자원으로 인식됨과 함께 과학기술의 발전이 그 중심에 있다고 하겠다. 작게는 식품, 약재, 친환경

농업 등의 기초적인 것부터 시작하여 유용물질 생산, 인간의 질병연구 수단, 생물소재 개발, 약용곤충으로 이용, 고효율 효소 탐색, 생체활성물질의 탐색을 통한 바이오소재연구 및 신소재 개발 등 고도의 지식기반적 기술을 활용한 부분에도 넓게 연구되어 지고 있다 (2, 3, 4).

곤충은 예로부터 동양에서는 약용/식용으로 많이 이용이 되었는데 동의보감(東醫寶鑑)에 의하면 약 95종의 약용곤충(藥用昆蟲)이, 본초강목습유(本草綱目拾遺)에는 106종의 약용곤충이 기록되어 있다. 최근 생명공학기술의 발달은 곤충자원의 이용 가치를 다양화 시켜주고 있는데, 그중 주목받는 부분이 산업적으로 이용이다. 특히 곤충의 추출물은 전통적인 생약으로 이용이 되었는데 최근 이에 대한 효능 및 유효성분 분석연구는 최근 많은 연구가 진행되고 있다.

항산화 소재의 검색은 최근 공업화와 함께 급격히 증가하는 산화물에 대한 각종 생체 내 스트레스를 감소시키고자 하는데 그 목적이 있다. 산화물(-Ox)은 산업의 발달로 인해 날로 증가되는 경향을 보이고 있는데 특히 최근 급격히 늘어난 자동차 등에서 나오는 황산화물(SOx)과 질소산화물(NOx) 등은 호흡기로 들어와 각종 산화스트레스를 일으키는 것으로 알려져 있다. 대표적인 것 중의 하나가 면역계의 이상인데 이로 인해 자가면역반응(autoimmune disease)의 일환인 아토피(atopy), 천식(asthma), 비염(rhinitis)의 유발 원인 중의 하나로 최근 많은 연구결과가 보고되고 있다(5,6). 또한 산화물에 의한 질병은 생물의 체내에서 산화스트레스로 작용을 하게 되는데, 각종 호르몬, 사이토카인 등의 활성을 변화시켜 질병을 유발하며, 또한, 노화와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(7, 8, 9).

사마귀는 한방에서 당량자(螳螂子) 등으로 불리며, 이노제 등으로 쓰이고 있다. 본 연구는 사마귀 추출물을 이용하여 보다 과학적인 유용성을 발견하고자 하는데 그 목적이 있으며, 기능성 식품 및 약제의 소재로서 항산화활성을 기능적으로 검증하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 실험방법

재 료

본 실험에 사용된 재료인 사마귀는 2004년 9월경 영동군 심천면에서 채집을 하였다. 채집된 개체 중 1개체는 건조시켜 본연구실에서 확인용으로 stock하고 있다. 채집된 재료는 실험직전까지 -20℃에서 보관을 하였으며, 50 mL tube에 각 1g을 보존하였다. 추출 용매로 DW, DMSO, 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol) 등을 사용하였다. 추출 용매의 양은 0.5 g/ml의 양으로 추출 전에 막자사발 등을 이용하여 잘게 부수어 추출 하였으며, 용매에 따라 DW의 경우 60℃에서 24시간 동안의 열수 추출 과정을 거쳤으며, DMSO, 에탄올, 메탄올의 경우에는 24시간 동안 실온에서 shaking 과정을 거쳐 추출하였다(Fig. 1).

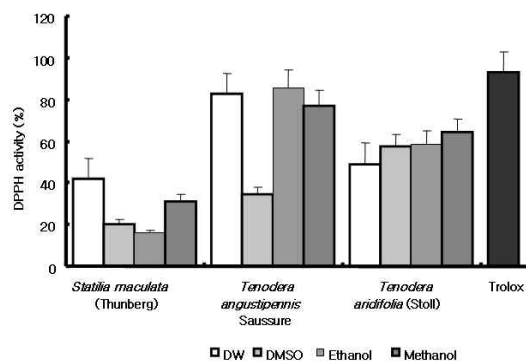


Fig. 1. Effect of the *Statilia maculata* (Thunberg), *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* (Stoll) on radical DPPH (□, DW; ■, DMSO; ▒, Ethanol; ■, Methanol extracts) radical scavenging assay.

DPPH assay

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. DPPH를 ethanol에 400 uM의 농도로 녹인 다음 DPPH를 190 μL 와 시료 10 uL를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음

과 같이 계산을 하였다(10).

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

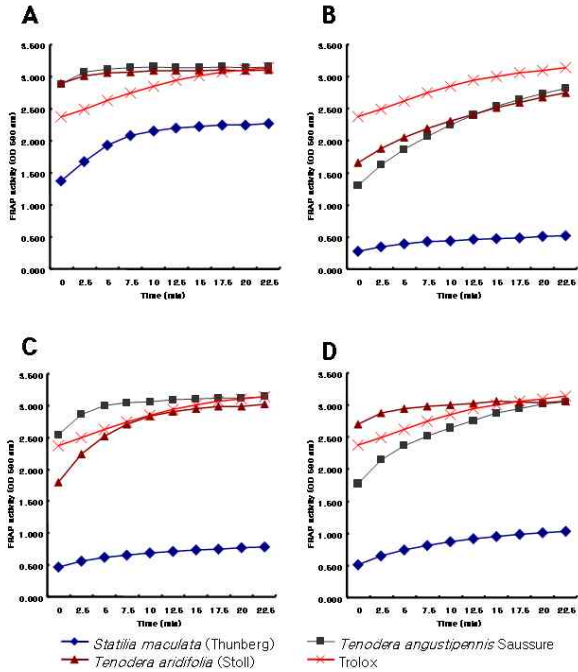


Fig. 2. Effect of the *Stabilia maculata* (Thunberg), *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* (Stoll) on radical FRAP radical scavenging assay (A, DW; B, DMSO; C, ethanol; D, methanol extracts). The antiradical activity was expressed by the remaining no treatment percentage for time dependent antioxidant activity (◆, *Stabilia maculata* (Thunberg); ■, *Tenodera angustipennis* Saussure; ▲, *Tenodera aridifolia* (Stoll); ×, Trolox).

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay는 화합물의 환원력 (ferric reducing ability)을 측정하는 것이다. 3.6의 낮은 pH에서 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. $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 와 acetic acid ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)를 이용하여 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM)를 만든다. 이후 HCl과 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 이용하여 TPTZ solution을 만들었다. 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 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액 (190 μL)와 추출물 (10 μL)을 혼합한 후 1.5분 간격으로 20분간 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(11).

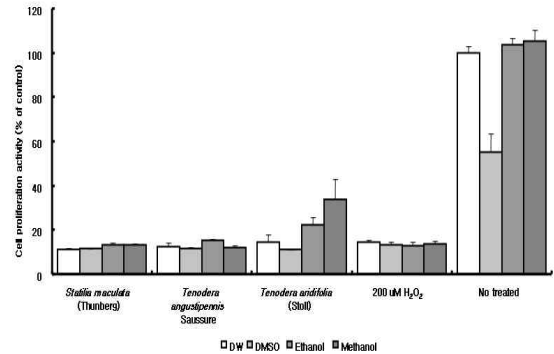


Fig. 3. Effect of the *Stabilia maculata* (Thunberg), *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* (Stoll) inhibited Oxident stress by H_2O_2 (□, DW; ■, DMSO; ■, Ethanol; ■, Methanol extracts).

Nitric oxide (NO) 활성 측정

NO 활성 측정은 lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml)에 의해 RAW264.7의 활성에 따른 산화질소의 생성량을 Greiss 반응을 수행하였다. 먼저 RAW264.7을 DMEM 배지에 FBS를 10% 첨가하여 배양한 다음, 96 well에 2×10^5 /well 단위로 세포를 분주하고, LPS를 넣어 세포를 활성화 시켰다. 상기 96 well에 산화질소 생성 억제능을 측정하기 위하여, DW, DMSO, Ethanol Methanol 및 상기 용매들과 사마귀류 추출물의 혼합물을 각각 2 μL /200 μL 를 추가로 첨가한 다음 36시간 동안 추가 배양 하였다. 상기 배양된 배지 100 μL 당 동량의 Greiss 시약(0.1% naphthylendiamine-dihydrochloride in water, 1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid)를 넣은 후 10 분간 반응 시킨 뒤, Victor3 (Wallac, Finland)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 총 산화질소의 값은 NaNO_2 를 이용하여 표준 정량 곡선을 구하고 이것을 바탕으로 각 흡광도로부터 직접 NO의 양을 정량적으로 구하였다.

산화스트레스에 의한 세포사멸 억제 실험

산화스트레스에 의한 세포의 손상의 억제효과를 알아보기 위하여 수용성의 tetrazolium salt를 포함한 CCK-2 kit(Dojindo, Japan)을 이용하여 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소(dehydrogenases)에 의해서 환원되는 formazan의 양을 450 nm에서 측정하였다. 산화스트레스는 H₂O₂를 이용하여 세포 사멸을 유도하였으며, 이때 사마귀류 추출물을 처리 한 후 세포의 생존율을 이용하여 각각의 후보물질 (hit)이 가지는 활성을 측정하였다(12). 활성 비율은 H₂O₂의 무처리군에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

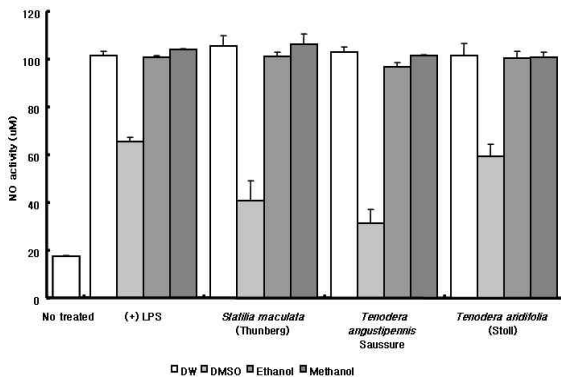


Fig. 4. Effect of the *Statilia maculata* (Thunberg), *Tenodera angustipennis* Saussure and *Tenodera aridifolia* (Stoll) inhibited NO production in Raw 264.7 cells by LPS (□, DW; ▨, DMSO; ▩, Ethanol; ■, Methanol extracts).

결과 및 고찰

산화물은 체내에서 산화스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있는데 여기에 대표적인 일례가 노화로 알려져 있다. 또한 산화물 중 활성산소는 인체에 매우 독성이 강한 물질로 생성과 동시에 superoxide의 저해 물질인 superoxide dismutase (SOD)에 의해서 독성이 사라지는 것으로 알려져 있다. 하지만 아주 적은 양의 활성 산소는 세포에 치명적인 영향을 미칠 수 있으며 이는 각종 질병으로 표출된다. 최근에 이에 대한 보완된 형태로 SOD의 기능을 가지는 식·음료를 이용해 보충을 하는 기능성 식품이 많이 보고되어 있으며, 시장 또한 많이 커지고 있다(13, 14).

DPPH, FRAP 활성실험을 이용하여 항산화 활성과

free radical 소거능을 측정하였다. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 radical로서, radical 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 상태로 존재한다. 실험 방법 또한 어렵지 않아 항산화와 관련한 실험에 많이 이용이 되고 있다. 기존에 알려진 항산화제인 Trolox (0.5 mM)를 표준시료로 하여 항산화 활성을 비교하였다. 실험 결과 DPPH 활성은 종별 추출용매별로 다양하게 나타났다. 활성이 높은 것으로는 사마귀 DW, ethanol, methanol 추출물로 나타났으며, 왕사마귀의 경우는 추출용매에 상관없이 고른 활성을 나타내었다. FRAP 활성의 경우 시간에 다른 활성 변화를 알아보았다. 모든 추출물에서 시간이 지남에 따라 활성이 조금씩 증가하는 것으로 나타났다. 다만 활성의 정도는 추출물의 종류와 용매에 따라 다양하게 나타났다. 사마귀와 왕사마귀 추출물에서 전반적으로 추출용매에 관계 없이 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성을 측정하기 위해서 대표적으로 알려진 DPPH와 FRAP 활성을 비교한 결과 실험 방법에 따라 활성 품목이 다소 차이를 보였다. 항산화 실험에서 용매에 따른 추출물의 항산화 활성이 매우 다양하게 나타나는 것을 알 수 있는데, 이는 추출 용매의 화학적 특성과 관련이 있는 것으로 PI(polarity) 값에 따른 차이로 사료 된다.

Reactive oxygen species (ROS)는 cellular metabolism에 매우 유해한 물질이다. 반면에 세포내 신호전달 및 조절 과정 중에 많은 부분을 담당하는 것으로 알려져 있다. Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 ROS의 일종으로 세포내에서 다양한 생리학적 조절(pathophysiological conditions) 부분을 담당하고 있는데 이는 염증 반응 (inflammation), nitric oxide (NO) 합성 등이 대표적이다(15, 16, 17). 산화물에 의한 영향으로 최근 천식과 관련된 보고서가 많이 나오는데, 산화물의 경우 주로 호흡기를 통하여 체내로 들어오게 된다. 이 경우 산화제의 농도가 높아지면 면역관련 세포인 Th1, Th2 세포의 비율에 차이가 생겨 천식으로 발전 할 수 있다고 한다. 뿐만 아니라 체내에서 정상수준을 벗어난 산화물은 각종 호르몬, 사이토카인 등에 영향을 주어 여러 종류의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(12, 18).

본 실험에서는 과산화수소(H₂O₂)를 이용하여 SH-SY5Y 세포주에 산화스트레스를 유도한 후 사마귀류

추출물을 처리하여 세포에서의 활성을 알아보았다. 실험 결과 왕사마귀 methanol 추출물에서 H₂O₂에 의한 산화스트레스를 다소 억제하여 세포의 생존율을 높이는 것으로 나타났다. 염증반응을 유도하는 NO의 활성 정도를 Raw 264.7 세포주를 이용하여 확인해 보았다. 실험결과 쯤사마귀와 왕사마귀의 DMSO 추출물에서 NO의 활성을 다소 억제하는 것으로 나타났다.

산화물의 억제제로는 체내에 SOD는 체내 신진대사의 능력에 따라 그 활성이 좌우가 된다. SOD는 산화제를 많은 경우 H₂O로 변환시켜 체내에 무해한 형태의 물질로 만든다. 최근 이러한 작용을 외부에서 보충해주는 형태의 항산화제에 대한 개발이 많이 진행 중에 있는데, 이러한 연장선에서 곤충자원은 천연물로서 오랫동안 이용되어져 오면서 부작용 또한 많은 검증과정을 거쳤다(19, 20). 산화제는 세포내에서 신호전달, 번역작용에의 관련 등 많은 부분을 담당하고 있다. 하지만 많은 경우 산화스트레스를 유발하여 각종 질병을 유도하는 것이 주지의 사실로서 이를 억제하기 위한 다양한 방법들이 보고되고 있다. 노화과정을 거치면서 산화스트레스를 제거해 주는 능력이 현저히 떨어지는 경향을 보이게 되는데 이를 대처하는 방법으로 항산화제를 섭취하는 방법이 있고, 이에 대한 개발 및 산업화된 시장이 성장하고 있다. 항산화제의 source로서는 식품에서부터 합성 화합물까지 많은 종류가 개발 되어 지고 있다. 개발 과정에서 효능과 안전성 부분에서 많은 노력이 필요한데, 특히 안전성 부분에 많은 시간이 들어가는 것이 사실이다. 최근에는 이러한 문제를 피하고자 과거부터 많이 이용되어진 식품, 한약재 등에서 원인물질은 연구하는 경향이 두드러지고 있다. 본 연구에 사용된 사마귀류는 예로부터 약제로 주로 이용되어져 왔다. 본 연구결과 사마귀류 추출물의 항산화 활성 또한 약재로서 그 기능을 가지는 것으로 보이며, 항암물질, 항혈전제, 항세균성 펩타이드 등 방대한 종류의 생물자원 이용화는 곤충의 역할을 증대시킬 것으로 추정된다.

요 약

한의학에서 사마귀는 여러 치료의 목적으로 사용이

되는 한약재이다. 본 연구는 사마귀의 항산화활성과 산화스트레스에 대한 억제활성을 검증하기 위하여 실시하였다. 사마귀 3종에 대하여 항산화활성과 과산화수소에 의한 세포사멸 억제 효과, NO 활성 억제 효과를 실시하였다. DPPH, FRAP 활성은 사마귀와 왕사마귀 추출물에서 높게 나타났다. H₂O₂를 이용하여 산화스트레스를 유도한 후 이의 억제활성을 비교하여 본 결과 왕사마귀 methanol 추출물에서 H₂O₂에 의한 산화스트레스를 다소 억제하여 세포의 생존율을 높이는 것으로 나타났다. 염증반응을 유도하는 NO의 활성 정도는 쯤사마귀와 왕사마귀의 DMSO 추출물에서 NO의 활성을 다소 억제하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Cudjoe, E., Wiederkehr, T.B. and Brindle, I.D. (2005) Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3- methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst.*, 130, 152-155
2. Mori, A., Yokoi, I., Noda, Y., and Willmore, L.J. (2004) Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies. *Acta. Med. Okayama.*, 58(3), 111-118
3. Sivagnaname, N., and Kalyanasundaram, M. (2004) Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 99, 115-118
4. El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I. and Zoheir, M.A. (2005) Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: Antioxidant role of vitamin C. *Food, Chem, Toxicol.*, 43, 1743-1752
5. Peden, DB. (2005) The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 115, 213-219
6. Rabinovitch, N., Zhang, L., Murphy, JR., Vedal,

- S., Dutton, SJ., and Gelfand, EW. (2004) Effects of wintertime ambient air pollutants on asthma exacerbations in urban minority children with moderate to severe disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 114, 1131-1137
7. Lee, I., Salomon, AR., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, LI., and Huttemann, M. (2005) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 280, 6094-6100
8. Nadeem, A., Chhabra, SK., Masood, A., and Raj, HG. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 111, 72-78.
9. MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207.
10. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., and Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free. Radic. Res.*, 36, 177-187
11. 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
12. Buyukozturk, S., Gelincik, A., Ozseker, F., Genc, S., Savran, F. O., Kiran, B., Yillar, G., Erden, S., Aydin, F., Colakoglu, B., Dal, M., Ozer, H. and Bilir, A. 2005. *Nigella sativa* (black seed) oil does not affect the T-helper 1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. *J Ethnopharmacol.* 100(3), 295-298.
13. Varshavskii, B.Ia., Trubnikov, GV., Galaktipmpva, LP., Koreniak, NA., Koledeznaia, IL., and Oberemok, AN. (2003) Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.*, 75, 21-24
14. Kinnula, VL., and Crapo, JD. (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 167, 1600-1619
15. Kitts, DD., and Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm.*, 9, 1309-1323
16. Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Wagner, KH., and Elmadfa, I. (2004) Tocopherol composition of deodorization distillates and their antioxidative activity. *Nahrung.*, 48, 34-37
17. Huang, HY., Chang, CK., Tso, TK., Huang, JJ., Chang, WW., and Tsai, YC. (2004) Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 55, 423-429
18. Trottein, F., Malleveay, T., Faveeuw, C., Capron, M. and Leite-de-Moraes, M. 2006. Role of the natural killer T lymphocytes in Th2 responses during allergic asthma and helminth parasitic diseases. *Chem. Immunol. Allergy.* 90, 113-127.
19. Li, N.G., Osakovskii, V.L. and Ivanova, S.S. (2003) Chemical composition and cryoprotective activity of ethanol extract from winter caterpillars *Aporia crataegi* L. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, 5, 547-552
20. Kou, J., Ni, Y., Li, N., Wang, J., Liu, L. and Jiang, ZH. (2005) Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 176-180