

## 청동풍뎅이(*Anomala albopilosa*) 추출물의 항산화성 및 생리기능

윤원종<sup>1</sup> · 이정아<sup>1</sup> · 김지영<sup>1</sup> · 김상범<sup>2</sup> · 박수영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소  
<sup>2</sup>오현중학교

### Antioxidant Activity and Physiological Function of the *Anomala albopilosa* Extracts

Weon-Jong Yoon<sup>1</sup>, Jung-A Lee<sup>1</sup>, Ji-Young Kim<sup>1</sup>, Sang-Bum Kim<sup>2</sup> and Soo-Yeong Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-121, Korea  
<sup>2</sup>Ohyun Middle School, Jeju 690-061, Korea

#### Abstract

We analyzed antioxidant and physiological activities to investigate the functional effects of ethanol extracts of *Anomala albopilosa* imago and *A. albopilosa* larva. In order to effectively screen for anti-inflammatory agents, we first investigated the antioxidant activities such as DPPH radical scavenging capacity, superoxide radical scavenging capacity, xanthine oxidase inhibitory activity, and nitric oxide scavenging capacity of the *A. albopilosa* extracts. By the screening system, we found that *A. albopilosa* extracts had antioxidant activity which increased with increments of the extract concentration. Moreover, we examined the inhibitory effect of the *A. albopilosa* extracts on the production of anti-inflammatory factors that the nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production activated with LPS (1 µg/mL) in murine macrophage cell line RAW 264.7. *A. albopilosa* extracts potentially inhibited the iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. The inhibition of iNOS activity was correlated with the decrease in nitrite levels. Additionally, the PGE<sub>2</sub> production is markedly inhibited after a treatment with the *A. albopilosa* extracts.

**Key words:** *Anomala albopilosa*, imago, larva, antioxidant activity, anti-inflammatory effects

#### 서 론

현재까지의 유용생물자원활용에 대한 관심이나 연구는 주로 한약재와 같은 식물군에 대하여 집중되어 왔으며, 유용 곤충의 이용개발에 대해서는 전세계적으로도 그 관심도가 아주 낮은 형편이었다. 그러나 최근에 들어 곤충의 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, 민간 요법, 한의학의 시도에 의한 것들이다(1,2). 예로부터 한약재로 자주 이용

되어 온 곤충으로는 주로 굼벵이, 누에 등 약 30여종이 유용 곤충으로 이용되고 있다(3).

그 중 풍뎅이 유충인 굼벵이는 예로부터 제조(鱗鱗)라 하여 중국의 후한시대에 성립된 본초서인 신농본초경(神農本草經)에서 처음으로 “악혈혈어비기(惡血血瘀癥氣), 파절혈(破折血)로 옆구리의 견만통(堅滿痛), 월폐(月閉), 목중음부(目中音腐), 청에백막(靑翳白膜)을 치료한다.”라고 기술하였다. 본초습유(本草拾遺)에서는 “주로 적백유진(赤白游疹)을 발진(發疹)시키기 위하여 제조(躑躅)를 파쇄(破碎)하고 즙을 취하여 도부(塗敷)한다.”라고 하였다(4,5). 풍뎅이 유충인 굼벵이 중에서는 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충이 민간요법에서 널리 이용되고 있으며, 특히 건강보조용 약제로서 간질환에 효과가 있는 것으로 보고(6)가 되어 있다. 이러한 풍뎅이류는 세계적으로 약 2만 5천종이 알려져 있고 우리나라에는 총 13과 234종이 보고되고 있다(7). 한편 청동풍뎅이(*Anomala albopilosa*)는 딱정벌레목(Coleoptera), 풍뎅이과(Scarabaeidae)에 속하는 18~25 mm 크기의 식식

\*Corresponding author. E-mail: user111@jejuhidi.or.kr  
Phone: 82-64-720-2322, Fax: 82-64-720-2301

성(植食性) 곤충으로서 우리나라의 줄풍뎅이류(*Anomala*) 중에서 크고 흔한 종이다(8). 우리나라와 일본에만 서식하는 것으로 알려져 있으며 국내에서는 북부 지방보다 전남, 경남, 제주도 등의 남부 지방에 많이 분포하는 것으로 보고되어 있다(9).

따라서 본 연구는 지금까지 많은 연구가 이루어져 있지 않은 약용곤충 중에 치질, 천식, 월경불순, 파상풍, 견만통(堅滿痛) 등을 치료하는데 민간약제로 사용해 왔다고 보고된 제조(躋躑) 중 청동풍뎅이(*Anomala albopilosa*)의 추출물을 이용하여 항산화능을 측정 비교하고 항염증효과 등의 생리활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 청동풍뎅이 추출물의 조제

실험재료는 민간약제로 사용해 왔다고 보고된 풍뎅이류 중 청동풍뎅이(*Anomala albopilosa*)의 성충(imago)과 3령 유충(굼벵이, larva)을 동결 건조시킨 후 마쇄기로 갈아 각각의 미세말 시료 성충 28 g과 유충 37 g을 각각 80% 에탄올 500 mL에 침적하고 초음파를 이용하여 1시간씩 3회 추출하였으며, 그 후 상층액을 회수하여 감압 농축하여 성충 추출물 4.08 g, 유충 추출물 4.72 g을 수득하여 사용하였다.

### DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다(10). DPPH 약 2 mg을 EtOH 15 mL에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 12 mL에 DMSO 6.25 mL를 첨가한 후, 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 EtOH로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 그리고 용매 1 mL에 분말로 추출된 시료 1 mg을 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 DPPH 450  $\mu$ L에 시료용액 50  $\mu$ L를 넣어 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였는데, 대조군으로는 Sigma사의 butylated hydroxy anisole(BHA), ascorbic acid, trolox를 사용하였다.

### Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거활성 검색

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, 대조군으로는 allopurinol(Sigma)을 사용하였다. Superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법에 의해 측정하였다(11,12). 반응액으로는 각 농도별 시료(15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL)와 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer(pH 7.5) 100  $\mu$ L에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제

및 superoxide 소거활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

### Nitric oxide 소거활성 검색

자연적으로 nitric oxide(NO)를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside(SNP)를 사용하여 시료의 NO 소거활성을 검색하였다(13,14). 10 mM SNP 용액 200  $\mu$ L에 시료를 농도별(15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL)로 첨가하고 25°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess시약[2.5%(v/v) phosphoric acid에서 1%(w/v) sulfanilamide와 0.1%(w/v) naphylethylenediamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 NO 소거활성을 산출하였다. NO 소거활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

### 세포배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포를 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3~4일에 한번씩 계대배양을 시행하였다. Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* serotype O111:B4)를 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

### 세포독성평가

RAW 264.7 세포(1.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL)를 DMEM 배지에 시험 약물과 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분 원심분리하였다. LDH(lactate dehydrogenase) 활성을 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배지 50  $\mu$ L와 reconstituted substrate mix를 50  $\mu$ L를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50  $\mu$ L의 stop solution을 넣어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

### NO 생성 억제를 검색

RAW 264.7 세포(1.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 세포배양 상층액 100  $\mu$ L와 Griess시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100  $\mu$ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응

시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 serial dilution(1~100  $\mu\text{M}$ )하여 얻었다.

#### RNA 분리 및 RT-PCR

RAW 264.7 세포( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)를 18시간 전 배양을 하고, LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극을 주고 시료를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포로부터의 total RNA 추출은 TRI-reagent(MRC)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 이루어졌다. 1  $\mu\text{g}$ 의 total RNA를 oligo(dT)<sub>18</sub> primer, dNTP(0.5  $\mu\text{M}$ ), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase(2U)로 70°C에서 5 min, 37°C에서 5 min, 37°C에서 60 min, 그리고 70°C에서 10 min heating시킴으로써 반응을 중지시켰다.

Polymerase Chain Reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 4  $\mu\text{M}$ 의 5'과 3' primer, 10X buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250  $\mu\text{M}$  dNTP, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 unit Taq polymerase(Promega)를 섞고 distilled water로 전체를 25  $\mu\text{L}$ 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR cycle은 94°C/45초, 55~60°C/45초, 72°C/60초, 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

각 primer의 염기서열은 다음과 같다.

iNOS F 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'  
R 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'

$\beta$ -actin F 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'  
R 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'

#### Western blot analysis

RAW 264.7 세포( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)를 18시간 전 배양을 하고, LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극을 주고 시료를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2~3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 후 300  $\mu\text{L}$ 의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간 동안 lysis시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 30  $\mu\text{g}$ 의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane(BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TBST(TBS+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. COX-2의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-goat COX-2(BD biosciences)를

TBST 용액에서 희석(1:1000)하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-goat IgG(Amersham Co.)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TBST로 4회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 1분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

#### Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성 및 정량

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/mL)로 조제된 시험물질 50  $\mu\text{L}$ 와 450  $\mu\text{L}$ 의 LPS 최종농도(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. PGE<sub>2</sub>의 정량은 PGE<sub>2</sub> ELISA kit(R&D Systemes, Inc.)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r<sup>2</sup>값은 0.99 이상이었다.

#### 통계분석

실험결과는 SAS Program(statistical analysis system)을 이용하여 분석하였고, 평균치와 표준편차로 나타났다. 그룹간의 유의적인 통계차를 분석하기 위하여 p<0.05의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

#### 청동풍뎡이 추출물의 항산화활성

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다(10,15). Xanthine oxidase(xanthine: oxygen oxidoreductase, EC 1, 2, 3, 2)는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다. Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Xanthine oxidase에 의해 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래한다. 그러나 이 내인성 항산화 방어체계가 세포내 산화-환원 균형을 유지하는데 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스트레스가 일어나게 되며 이 산화스트레스는 직접적으로 세포내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포손상을 일으키는데 중요한 역할을 한다(16). 따라서 산소유리기의 자유기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것으로 사료된다.

청동풍뎡이(*Anomala albopilosa*) 성충 및 3령 유충 에탄

Table 1. Comparison of antioxidant potential of ethanol extract of *Anomala albopilosa*

Treatment	IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1)</sup>			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Nitric oxide scavenging activity
Imago ext.	280.02 ± 4.51**	469.42 ± 0.33*	> 500	> 500
Larva ext.	483.39 ± 5.75*	> 500	> 500	> 500
BHA <sup>2)</sup>	22.70 ± 0.61**	> 500	464.90 ± 1.71*	> 500
Ascorbic acid	3.90 ± 3.22**	> 500	> 500	> 500
Trolox	8.62 ± 2.20**	> 500	> 500	> 500
Allopurinol	NA <sup>3)</sup>	22.65 ± 0.35**	30.12 ± 0.17**	NA

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

<sup>2)</sup>Butylated hydroxy anisole. <sup>3)</sup>NA: not available method.

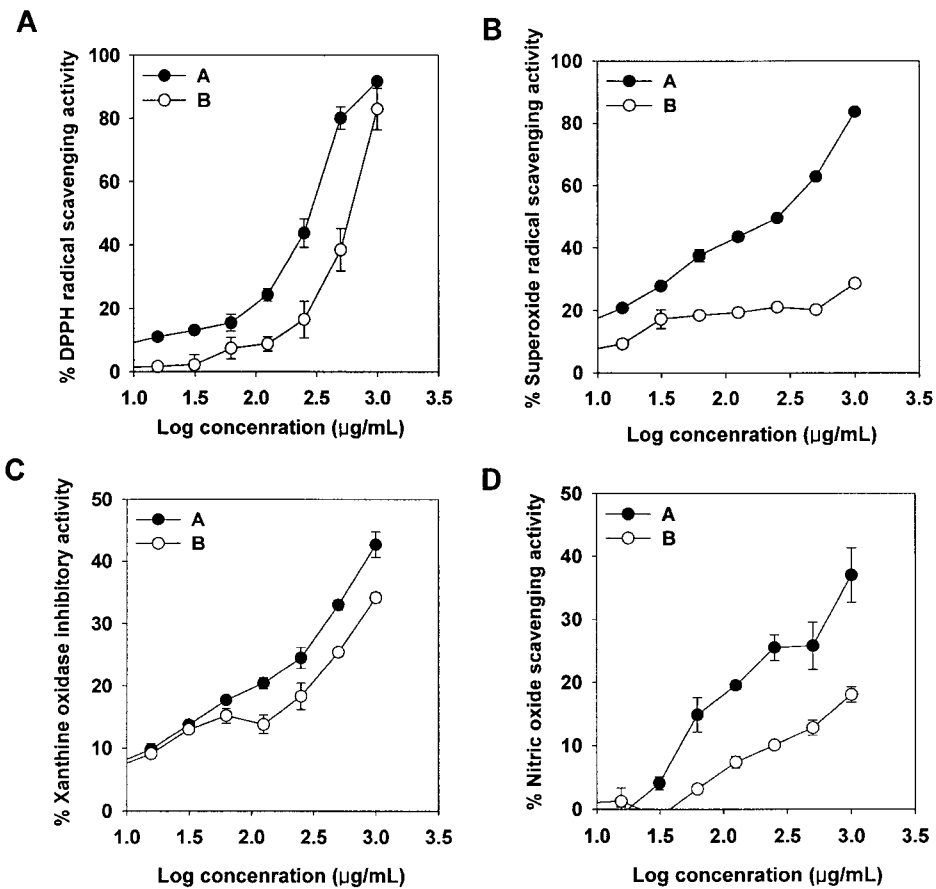


Fig. 1. Dose-dependent scavenging effect on DPPH radical, superoxide radical, nitric oxide and xanthine oxidase inhibitory activity by ethanol extracts of *Anomala albopilosa*. Data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

을 추출물의 항산화활성에 대한 결과를 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. DPPH의 free radical 소거활성은 성충 및 3령 유충 에탄올 추출물 모두에서 처리농도에 따라 농도 의존적으로 DPPH의 free radical 소거활성이 증가함을 보였으며 (Fig. 1-A), 성충 및 3령 유충 에탄올 추출물 각각의 IC<sub>50</sub>값은 280.02 μg/mL와 483.39 μg/mL로 나타났다(Table 1). 청동풍뎡이 에탄올 추출물들의 xanthine oxidase 저해활성과 superoxide radical 소거활성을 xanthine/xanthine oxidase system에 의해 측정하였다. 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에

탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해활성은 그다지 높게 나타나지 않았지만 각 추출물의 농도가 높아질수록 xanthine oxidase에 대한 저해효과도 높아졌으며(Fig. 1-C), superoxide radical 소거활성 또한 모두 농도 의존적으로 활성이 증가함을 보였다(Fig. 1-B). 성충 에탄올 추출물의 superoxide radical 소거활성의 IC<sub>50</sub>값이 469.42 μg/mL로 청동풍뎡이 성충 에탄올 추출물이 3령 유충 에탄올 추출물에서 보다 다소 높은 활성을 보였다(Table 1). 질소산화물(nitric oxide: NO)은 활성종으로서 세포독성이 강하며 다량의 NO

가 생성되면 nitrosation, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 이에 청동풍뎅이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물의 NO 생성저해 활성을 NO를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside(SNP)를 사용하여 아질산염(nitrite)의 양으로 NO 소거활성을 측정하였다. 청동풍뎅이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물의 NO 생성저해활성 역시 그다지 높게 나타나지 않았으나, xanthine/xanthine oxidase system에 의한 항산화 측정 결과와 마찬가지로 고농도로 갈수록 농도 의존적으로 다소나마 NO 생성저해활성이 높아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1-D). 최근 Park 등(2)의 약용곤충추출물을 대상으로 한 항산화능 결과 보고에서도 장수풍뎅이 등 다수의 곤충 추출물들이 높은 항산화능을 갖는다는 연구 결과와 마찬가지로 본 실험에서도 청동풍뎅이가 우수한 항산화활성 물질을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

#### 세포독성에 미치는 영향

LDH(lactate dehydrogenase)는 대부분의 세포에 존재하는 stable cytoplasmic enzyme으로 cytoplasmic membrane이 damage를 입으면 세포배양액으로 분비된다. 따라서 손상을 입은 세포가 분비하는 LDH activity를 측정하는 간편하고 간단한 colorimetric assay 방법이다. 본 실험에서는 LDH cytotoxicity detection kit를 사용하여 492 nm에서 activity를 측정하였다. RAW 264.7 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 청동풍뎅이 성충 및 3령 유충 에탄올 추출물과 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, LDH assay 방법을 이용하여 세포독성을 확인한 결과, 성충 추출물에서는  $250 \mu\text{g/mL}$  이상 처리시 세포독성을 보인 반면(Fig. 2-A), 유충 추출물에서는 세포독성이 처리 농도가 증가함에 따라 다소 독성을 나타냈으나  $500 \mu\text{g/mL}$  이하의 농도 처리구에서는 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2-B). 그러나

LPS가 첨가되지 않은 처리구( $1,000 \mu\text{g/mL}$ )에서도 세포독성이 다소 나타남으로써 다음의 항염증활성 등의 세포생리활성 실험은  $500 \mu\text{g/mL}$  이하의 농도에서 실시하였다.

#### Nitric oxide(NO) 생성억제 효과

NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(17-19). NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하여 calcium이나 calmodulin에 의존적인 형태인 constitutive NOS(cNOS)와 calcium에 비의존적으로 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되거나 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 cytokine에 의해 유도되는 형태인 inducible NOS(iNOS)의 형태가 있다(20-22).

LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만(23), 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(24,25). 이에 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 억제효과를 알아보았다. RAW 264.7 세포에 청동풍뎅이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 NO 생성 억제효과를 세포 배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태로 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을

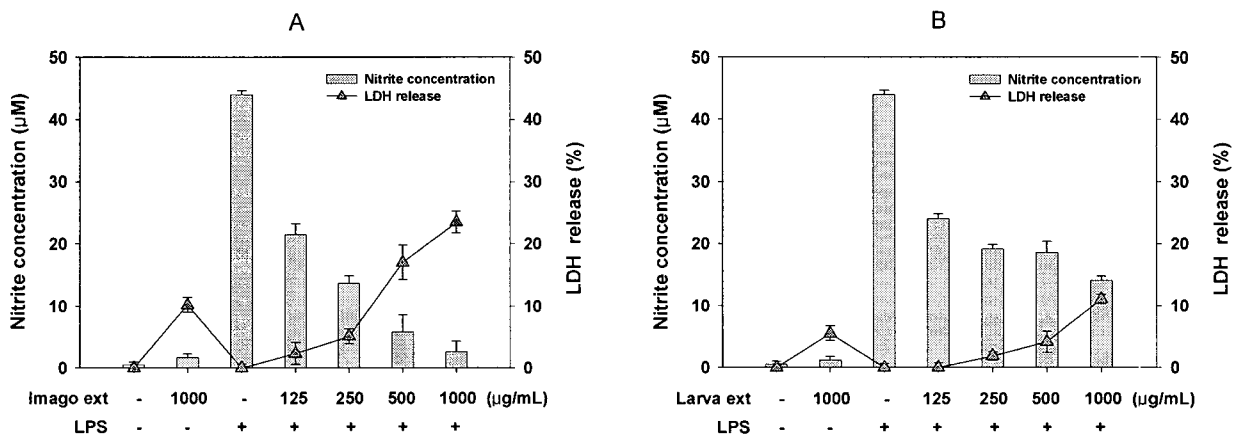


Fig. 2. The effects of ethanol extracts of *Anomala albopilosa* on cell viability and the production of nitric oxide in RAW 264.7 cells.

The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) in the presence of ethanol extracts of *A. albopilosa*. NO production was determined by ELISA method. Cell viability was determined using LDH method. Data represent the mean  $\pm$ SD of triplicate experiments.

확인할 수 있었으며, 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 동시에 처리한 시험구에서는 NO 생성량이 처리 농도별에 따라 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 그러나 결과에서 보듯이 청동풍뎡이 3령 유충 추출물 처리구(Fig. 2-B)에서보다 성충 에탄올 추출물 처리구 (Fig. 2-A)에서가 고농도로 갈수록 NO 생성 억제효과가 크게 나타났는데, 이러한 효과는 세포독성 작용에 의한 것으로 사료된다.

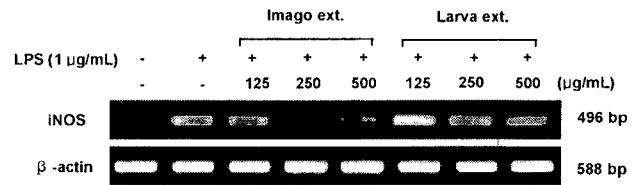
**iNOS 생성에 미치는 영향**

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도 되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(26,27).

RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 iNOS 생성에 대한 억제 정도를 RT-PCR를 통해 알아보았다. 그 결과 RT-PCR에 의한 유전자 발현은 처리 농도가 증가할수록 iNOS의 유전자발현이 강하게 억제되었다(Fig. 3).

**COX-2 발현에 미치는 영향**

다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성화에 의한 것이다. 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 농도별로 처리

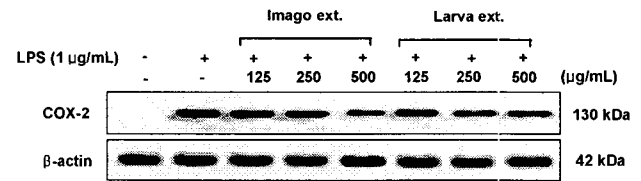


**Fig. 3. Inhibitory effect of ethanol extracts of *Anomala albopilosa* on the mRNA expression of iNOS in RAW 264.7 cells.**

The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of ethanol extracts of *A. albopilosa*.

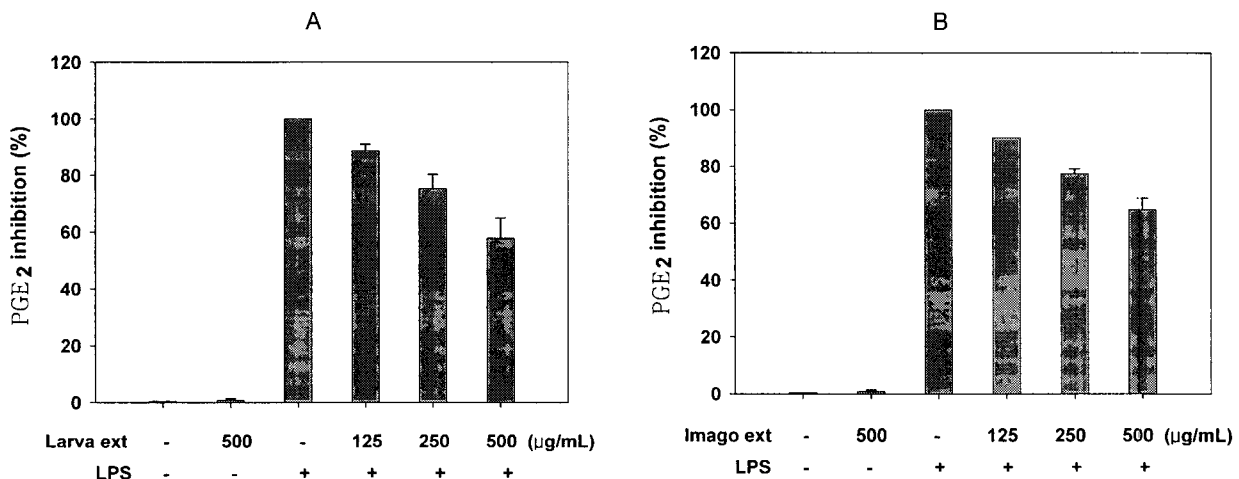
하여 COX-2 생성에 대한 억제 정도를 western blot을 통해 알아보았다. 그 결과, 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물에서 대조구인 LPS 단독 처리군에 비해 COX-2의 단백질 발현이 감소되는 경향을 나타내었다. 특히 청동풍뎡이 성충 추출물 500 µg/mL에서 강한 억제효과를 볼 수 있었다(Fig. 4).

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다(28). COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호,



**Fig. 4. Inhibitory effect of ethanol extracts of *Anomala albopilosa* on the protein level of COX-2 in RAW 264.7 cells.**

RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of ethanol extracts of *A. albopilosa* for 24 hr. COX-2 protein level was determined using immunoblotting method.



**Fig. 5. Inhibitory effect of *Anomala albopilosa* extracts on the PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) were stimulated by LPS (1 µg/mL) with ethanol extracts of *A. albopilosa* for 24 hr. Supernatants were then collected after 24 hr and PGE<sub>2</sub> concentration from supernatants was determined by ELISA method. Data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며(29), COX-2는 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>를 형성시킨다. PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 면역반응 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(30).

#### Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성에 미치는 영향

Macrophage RAW 264.7 세포에서 염증성 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 억제효과를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. RAW 264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)를 사용하여 PGE<sub>2</sub>의 생성을 유도한 후 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 확인한 결과(Fig. 5-A, B), 성충과 3령 유충 에탄올 추출물 모든 처리구에서 처리 농도가 증가할수록 그 억제효과도 유의적으로 높게 나타났으나, LPS를 첨가하지 않은 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물 각각의 단독 처리구에서는 PGE<sub>2</sub>의 생성억제 효과가 나타나지 않았다. 이는 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물에 의해 LPS에 의해 발현되는 PGE<sub>2</sub> 억제에 영향을 준다는 것을 의미하며, 이러한 결과는 COX-2의 생성억제가 PGE<sub>2</sub> 생성억제를 통한 것으로 여겨진다.

#### 요 약

산화적인 스트레스(oxidative stress)는 신경염증의 발병요인 중의 하나로 알려져 있다. 이에 본 연구는 약용곤충으로 알려진 청동풍뎡이(*Anomala albopilosa*) 성충과 3령 유충(굵뎡이) 에탄올 추출물을 대상으로 항산화활성을 비교 측정하였으며, 또한 대식세포인 RAW 264.7 세포에서의 NO의 생성억제 효과 및 세포독성 그리고 분자염증관련 인자인 iNOS, COX-2와 PGE<sub>2</sub> 생성 및 활성 억제제를 조사하여 항염증효과 등의 생리활성을 측정 비교하였다. 우선, 분자염증은 활성산소 관련 물질과 밀접한 관련이 있으므로 항산화 실험과 관련하여 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능, superoxide radical 소거능, xanthine oxidase 저해활성 그리고 nitric oxide 소거능에 대한 항산화활성 등의 assay를 실시하였다. 그 결과, 청동풍뎡이 에탄올 추출물은 항산화능을 갖고 있었으며, 3령 유충 추출물에서보다는 성충 추출물에서 다소 높은 항산화활성을 보여주었다. 또한 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 청동풍뎡이 성충과 3령 유충 에탄올 추출물을 처리하여 항염증관련 활성을 확인해본 결과, 고농도에서는 다소 세포독성을 나타냈지만 농도의존적으로 NO, iNOS, COX-2 그리고 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제효과가 나타났다. 이러한 결과는 유용곤충자원을 이용한 유효성분 추출을 통한 항산화 및 항염증 물질의 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-02-07) 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

#### 문 헌

1. Park KT, Lee JS. 1998. Review on insect resources for medical use in Kangwon province. *Kor J Apiculture* 13: 79-92.
2. Park JY, Heo JC, An SM, Yun EY, Han SM, Hwang JS, Kang SW, Yun CY, Lee SH. 2005. High throughput-compatible screening of anti-oxidative substances by insect extract library. *Korean J Food Preserv* 12: 482-488.
3. Kang I, Kim H, Chung C, Kim S, Oh D. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 479-484.
4. 박호용. 2004. 약용곤충의 효능과 처방. 한국생명공학연구원 · 한국생명공학협력센터. p 97-99.
5. 오창영, 등명노, 강병수, 신민교, 이장천. 2002. 동의약용동물학. 의성당, 서울. p 217-220.
6. Choi YH, Lee K, Yang MY, Jeong YM, Seo JS. 2006. Effect of larva extract of *Allomyrina dichitoma* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1349-1355.
7. Kim JI. 2001. *Economic Insects of Korea 10. COLEOPTERA (Scarabaeoidea)*. Nat'l Inst Agr Sci Tech. p 114-115.
8. Kim JI. 1998. *Insect Life in Korea*. Korea Insects Research, Korea Univ. p 65.
9. Cho BS. 1969. *Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea*. Vol. 10 Insecta (II). Ministry of Education. p 676.
10. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
11. Nishikimi M, Roa NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849-854.
12. Fridovich I. 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245: 4053-4057.
13. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-136.
14. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 748-755.
15. Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection. *Drug* 42: 569-605.
16. Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392: 291-299.
17. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
18. Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915-918.
19. Jaffrey SR, Snyder SH. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 417-440.
20. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. 1992. Molecular

- cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267: 6370-6374.
21. Liu RH, Hotchkiss JH. 1995. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review. *Mutat Res* 339: 73-89.
  22. Rockey DC, Chung JJ, McKee CM, Noble PW. 1998. Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. *Hepatology* 27: 86-92.
  23. Weis ZA, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
  24. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res* 17: 485-489.
  25. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. 2001. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res* 7: 431-438.
  26. Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J Plant Physiol* 160: 1025-1032.
  27. Tesuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *J Ethnopharmacol* 77: 209-217.
  28. Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, Choi JW, Lee KT. 2002. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 46: 343-347.
  29. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12013-12017.
  30. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Letters* 569: 321-326.

(2007년 2월 15일 접수; 2007년 5월 4일 채택)