

갈색거저리 유충 추출물의 간암세포에 대한 세포독성 효능

이지은¹ · 이안중¹ · 조다은¹ · 조주형¹ · 윤금주² · 윤은영³ · 황재삼³ · 전미리² · 강병헌¹

¹울산과학기술대학교 생명과학과

²동아대학교 식품영양학과

³농촌진흥청 곤충산업과

Cytotoxic Effects of *Tenebrio molitor* Larval Extracts against Hepatocellular Carcinoma

Ji-Eun Lee¹, An-Jung Lee¹, Da-Eun Jo¹, Ju Hyeong Cho¹, Kumju Youn², Eun-Young Yun³,
Jae-Sam Hwang³, Mira Jun², and Byoung Heon Kang¹

¹Department of Biological Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology

²Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University

³Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA

ABSTRACT Various natural products or their derivatives, mostly originating from plants, fungi, and bacteria, have been exploited as therapeutic drugs to treat various human diseases. In addition to previously explored organisms, research on natural compounds has now expanded into unexamined living organisms in order to identify novel bioactive substances. Here, we determined whether or not the larval form of the mealworm beetle *Tenebrio molitor*, a species of darkling beetle, contains cytotoxic substances that exclusively affect cancer cell viability. Ethanol extract and its solvent partitioned fractions, hexane and ethyl acetate fractions, showed anticancer effects against various human cancer cells derived from the prostate (PC3 and 22Rv1), cervix (HeLa), liver (PLC/PRF5, HepG2, Hep3B, and SK-HEP-1), colon (HCT116), lung (NCI-H460), breast (MDA-MB231), and ovary (SKOV3). Cell death induced by the fractions was a mix of apoptosis, necrosis, and autophagy. The hexane fraction was administered intraperitoneally to nude mice bearing a hepatocellular carcinoma SK-HEP-1 and showed inhibition of tumor growth *in vivo*. Therefore, we concluded that worm extracts contain cytotoxic substances, which can be enriched by proper fractionation protocols, and further separation and purification could lead to the identification of novel molecules to treat human cancers.

Key words: *Tenebrio molitor*, anticancer activity, extract fractionation, hepatocellular carcinoma

서 론

자연으로부터 확보할 수 있는 천연물들은 질병을 치료하기 위해 예로부터 꾸준히 활용해 왔고, 이를 기반으로 약리활성을 가진 물질들이 분리, 동정되어 치료약품으로 상업화되기도 하였다(1). 암과 같은 난치성 질환을 가진 환자를 치료하기 위한 약물 중 절반 정도가 천연물로부터 유래되었을 정도로 이미 자연 속 천연물들은 인류에 의해 광범위하게 활용되고 있다(2,3). 우수한 약리활성을 가지는 신 물질 발굴을 위해 식물, 곰팡이, 미생물 등을 대상으로 하는 천연물질 연구가 계속되어 왔으며, 최근 들어서는 이런 연구가 극한환경에서 살아가는 생명체와 그 동안 연구가 부족했던 종족들을 대상으로 확대되어 가고 있는 실정이다(1,3,4).

곤충은 약 100만 종 이상 보고되어 있고 100만 종 이상이 아직 보고되지 않은 상태로 남아있다고 예측될 정도로 지구 상에서 가장 크고 가장 다양성이 풍부한 종족으로 알려져 있다(5). 척추동물, 식물, 미생물 등과 진화적으로 상당히 다르기 때문에 과학자들은 곤충들이 그들만의 특수한 환경에 적응하도록 독특한 구조를 가지는 화합물질을 만들어 내는 방향으로 진화했을 것으로 예상하고 있으며, 이들을 잘 발굴할 경우 약물로 개발될 수 있는 약리활성을 가진 물질을 확보할 수 있다고 추론해왔다(6). 더불어 곤충은 질병을 치료하거나 회복을 돕기 위한 민간요법으로 이미 여러 지역에서 널리 활용되어 왔음에도 불구하고(7) 곤충으로부터 약리활성을 가진 신 물질을 탐색하기 위한 연구는 아시아권 일부 국가들에서만 제한적으로 진행되어 왔기 때문에 생리활성물질을 발굴하기 위해서는 더 체계적인 연구가 필요한 상황이라 할 수 있다(8).

암세포 특이적인 신호전달 기전에 대한 연구는 수많은 항암약물 타겟 단백질 발굴과 그에 대한 저해물질개발로 이어

Received 2 October 2014; Accepted 5 January 2015

Corresponding author: Byoung Heon Kang, Department of Biological Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan 689-798, Korea
Email: kangbh@unist.ac.kr, Phone: +82-52-217-2521

져 왔으나 여전히 효과적인 항암약물은 부족한 상황이다(9). 항암약물 개발을 위한 비용이 꾸준히 증가하고 있는 것과는 반대로 암 치료약물로서 임상허가를 받는 신규약물건수는 지속적으로 떨어지고 있다고 한다(10). 이렇듯 항암약물 개발은 위험이 크고 약물 개발 성공률이 다른 질병과 비교해서 현저히 낮기 때문에(11,12) 경제적이고 신속한 항암약물 개발 전략이 필요하고 천연물질, 특히 그동안 많은 연구가 진행되지 않은 종족인 곤충으로부터 새로운 물질을 발굴하는 전략은 꾸준히 그 필요성이 제안되어 왔었다(6,8).

암세포들은 다양한 스트레스 조건에서도 살아남기 위해서 암세포로 진화해 가는 과정(tumorigenesis)에서 세포죽음을 적극적으로 억제하는 특이적인 신호전달기전을 획득하게 되어 프로그램된 세포죽음기전인 아포토시스(apoptosis), 활성산소 등으로 유도되는 세포괴사(necrosis), 자식작용인 오토파지(autophagy)를 비롯한 다양한 세포죽음기전을 억제하는 것으로 알려져 있다(13). 따라서 무한히 복제하면서 세포분열을 촉진하고 다른 조직으로 전이하며 면역시스템을 회피할 수 있는 특성과 더불어 세포죽음을 회피하는 암세포의 성질은 중요한 약물 타겟이 되어 왔으며, 여전히 서로 다른 기전으로 작용하는 죽음유도물질들이 개발되고 있는 상황이다(14).

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 거저리과에 속하는 곤충으로 애벌레는 간암을 포함하는 간질환을 치료할 목적으로 우리나라를 포함하는 아시아 국가들에서 전통적으로 사용되어 왔다(15). 갈색거저리 애벌레에 대한 영양학적인 성분분석으로 칼슘이나 마그네슘과 같은 미네랄과 불포화지방산과 같은 유용한 영양성분의 함량이 높다는 보고가 있었고(16,17), 3,000 mg/kg/day 용량을 실험쥐에 한 달간 섭취하였을 때도 뚜렷한 독성이 없음을 동물실험을 통해 규명하여 식품으로써 활용이 가능하다는 선행연구도 있었다(18). 약리활성 측면에서는 갈색거저리 추출물질이 치매에 효과가 있다는 보고(17)와 갈색거저리 유래 단백질이 항박테리아 및 항곰팡이 활성을 가지고 있다는 연구 결과가 있었으나(19,20), 항암활성에 대한 선행연구는 진행된 적이 없었다. 본 연구에서는 갈색거저리 애벌레 추출물을 대상으로 항암활성을 *in vitro* 및 *in vivo*에서 진행하여 새로운 항암물질 발굴 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

갈색거저리 애벌레 추출물의 분획

유기용매를 이용한 갈색거저리(*T. molitor*) 애벌레 분말의 분획은 기존에 보고된 실험방법을 따랐다(21). 간략히 설명하면 실온에서 7일 동안 12 L의 95% 에탄올(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 가지고 2차례에 걸쳐서 1.2 kg의 갈색거저리 분말(Worldway Co., Chungnam, Korea)(17)로부터 추출물을 확보하였다. 추출물을 필터하여 불용성물질을 제거한 후 rotary vacuum evaporator

(EYELA, N-1100, Tokyo, Japan)로 용매를 제거하였다. 에탄올 추출물(379.66 g)은 hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O를 이용하여 순차적으로 분획되었고 각각 313.90 g, 0.78 g, 24.80 g, 24.80 g의 분획물을 확보하였다.

Primary hepatocyte와 cardiomyocyte의 추출

Primary hepatocyte는 8주된 BALB/c 쥐(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 기존의 보고대로 추출하였다(22,23). 간단히 설명하면 마취된 쥐의 간에 collagenase solution을 흘려보낸 후 간 조직을 조각내었고, 100 μ m cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 조직 덩어리는 걸러 제거해 낸다. 걸러진 세포들은 M199/EBSS medium(Hyclone, Waltham, MA, USA)을 이용하여 원심분리 및 resuspension을 몇 차례 반복하여 세척한다. Percoll(Sigma-Aldrich Co.) gradient를 이용하여 cell debris와 non-parenchymal cells을 제거하여 hepatocyte만 획득한다. Hepatocyte를 몇 차례 세척한 후 10% fetal bovine serum(Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 M199/EBSS medium에 resuspend 하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한다. Primary cardiomyocyte는 생후 2일된 쥐(BALB/c)로부터 기존의 보고를 따라서 추출하였다(24). 간략히 설명하면 적출된 심장은 잘게 조각내어진 후 0.05% trypsin-EDTA(Gibco) 용액으로 옮겨진다. 심장 조직은 0.25% trypsin-EDTA 용액 속에서 4분 동안 37°C에서 incubation 한 후, 20% fetal bovine serum을 포함하는 DMEM/F12(Gibco)를 처리하여 trypsin을 불활성화시킨다. 앞선 trypsin digestion과 불활성화 과정을 3회 반복한다. 세포 suspension은 1% gelatin-coated plates에 담고 3시간 동안 incubation 한다. 3시간 뒤에 plate 표면에 붙지 않은 세포들은 제거하고 72시간 뒤에 배지를 갈아준 뒤 세포를 모아서 숫자를 측정한 후 96 well plate로 옮겨 실험에 사용하였다.

세포생존률 및 아포토시스 유도능력 측정

96 well plate의 well 하나당 5×10^3 개의 세포를 overnight 배양한 후 24시간 동안 표시된 농도만큼의 추출물들을 처리하였다. 세포생존률 측정을 위해서 세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리한 후, 형성된 crystalized formazan을 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹이고 595 nm에서의 흡광도를 Infinite M200 microplate reader(TECAN, Männedorf, Switzerland)로 측정하였다. 흡광도 값은 control과 비교하여 percent viability로 표시하였다. 실험은 최소 2번 반복되었고 매번 triplicate로 수행하였다. 한편 추출물들의 아포토시스 유도활성을 측정하기 위해서 약물을 제시된 농도로 처리한 후 CaspaTag *in situ* apoptosis detection kit(Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 DNA 양(propidium iodide, red fluorescence)과 caspase 활성화

정도(DEVDase activity, green fluorescence)를 형광 표지하였다. FACSCalibur system(BD Biosciences) 장비로 세포형광을 측정하였고, 측정 결과는 FlowJo software (ver.9.4.11, TreeStar, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험쥐를 이용한 *in vivo* 항암활성 검증

실험쥐를 이용한 실험은 UNIST 동물윤리위원회의 승인을 받았다(승인번호: UNISTIACUC-13-015). 1×10^7 개의 간암세포주 SK-HEP-1을 멸균된 200 μ L PBS에 resuspend 하여 8주된 수컷 BALB/c nu/nu 실험쥐(Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan)의 양쪽 엉덩이의 피하에 주사하였다. 종양이 자리를 잡고 자라기 시작하여 종양의 크기가 평균 180 mm³까지 도달하게 되면 약물주사를 시작하였는데, 실험쥐는 무작위로 2개의 그룹으로 나누어 2개의 종양을 가진 쥐 3마리를 하나의 그룹이 되도록 하였다. Hexane 분획물과 DMSO를 20% Cremophor EL(Sigma-Aldrich Co.)을 포함하는 PBS에 녹여서 복강주사를 실시하였다. 실험쥐들은 1 g/kg hexane 분획물을 15일간 매일 투여 받았다. 복강주사에 사용한 hexane 분획물의 양은 실험쥐의 몸무게를 5% 이상 감소시키지 않는 용량이다. 종양의 크기는 caliper로 측정되었고, 종양의 부피는 다음과 같은 수식으로 계산되었다; $V = 1/2 \times (\text{width})^2 \times \text{length}$.

통계분석 방법

MTT에서의 세포생존률과 xenograft 실험에서의 종양 크기 평균값은 Prism 5.0(GraphPad, La Jolla, CA, USA) 분석 소프트웨어를 이용하여 unpaired *t*-test를 수행하였고, *P*-value가 0.05보다 작은 경우 의미 있는 차이라고 간주하였다.

결과 및 고찰

갈색거저리 유충 에탄올 추출물의 세포독성 활성

갈색거저리 유충의 항암활성을 알아보기 위해 에탄올을 이용해서 함유된 물질을 추출하여 실험하였다. 항암활성 분석을 위해서는 정상세포에 대해서는 제한적인 세포독성을 보이는 반면에 암세포에서는 높은 세포독성을 가질 수 있는지 평가하여야 한다. 이를 위해서 실험쥐의 간과 심장으로부터 정상세포라고 할 수 있는 primary hepatocyte와 cardiomyocyte를 분리하였고, 에탄올 추출물에 대한 세포독성은 암세포주(Hep3B)에 대한 효과와 비교하였다. 2 mg/mL의 에탄올 추출물은 간암세포주인 Hep3B에 대해서는 50% 이상 되는 세포독성을 유도할 수 있음을 MTT 분석으로 확인하였다(Fig. 1A). 반면에 정상세포주인 primary hepatocytes는 동일한 농도의 추출물에 대해서 미미한 수준의 세포독성만이 유도되었으나 primary cardiomyocyte는 암세포주보다 더 많은 세포독성이 관찰되었다(Fig. 1A). 따라

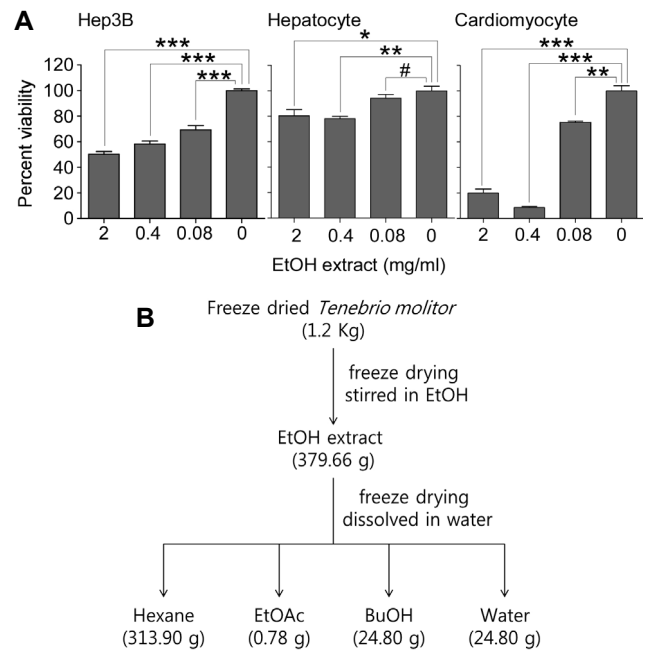


Fig. 1. Cytotoxic activity of ethanol extract from *Tenebrio molitor*. (A) Cytotoxic activity of ethanol (EtOH) extract. Hep3B, hepatocyte, and cardiomyocyte were treated with EtOH extract as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay. ****P*<0.0001, ***P*<0.001, **P*<0.05; #, not significant. (B) Fractionation scheme for EtOH extract. EtOH extract was further fractionated as described in Materials and Methods.

서 갈색거저리 에탄올 추출물은 간암세포주와 정상심근세포에서 모두 세포독성을 보이는 비특이적인 세포독성을 가지고 있다.

Hexane과 ethyl acetate 분획물의 항암활성

에탄올 추출물은 다양한 물질의 혼합물이므로 추가적인 분획으로 암세포 특이적인 세포독성 활성을 높일 수 있는지 실험하였다. 에탄올 추출물을 hexane, butanol, ethyl acetate, 물을 이용하여 liquid-liquid partition으로 분획하였다. 379.66 g 에탄올 추출물로부터 313.90 g hexane, 0.78 g ethyl acetate, 24.80 g butanol, 24.80 g 물 분획물들을 확보할 수 있었다(Fig. 1B). 분획물들을 암세포주에 처리하고 세포독성 정도를 측정하였을 때 hexane과 ethyl acetate 분획물들은 세포독성을 유도하는 활성을 보였고, 이는 에탄올 추출물의 암세포에 대한 독성과 거의 비슷한 수준의 활성이었다(Fig. 2A). 반면에 butanol과 물 분획물들은 최고 농도인 2 mg/mL에서도 암세포에 대한 세포독성이 미미한 수준이었다(Fig. 2A). 실험 결과에서 ethyl acetate 및 butanol 분획물에서 100% 이상의 활성을 볼 수 있는데, 이는 세포증식의 증가 때문은 아니었으며 곤충 분획물 속에 포함되어 있는 항산화 물질이 MTT 시약을 직접 환원시켜서 나타나는 현상으로 예상된다(25,26). 다음으로 전립선암(PC3, 22Rv1), 자궁경부암(HeLa), 간암(PCL/PRF5, HepG2, Hep3B, SK-HEP-1), 직장암(HCT116), 폐암(NCI-H460),

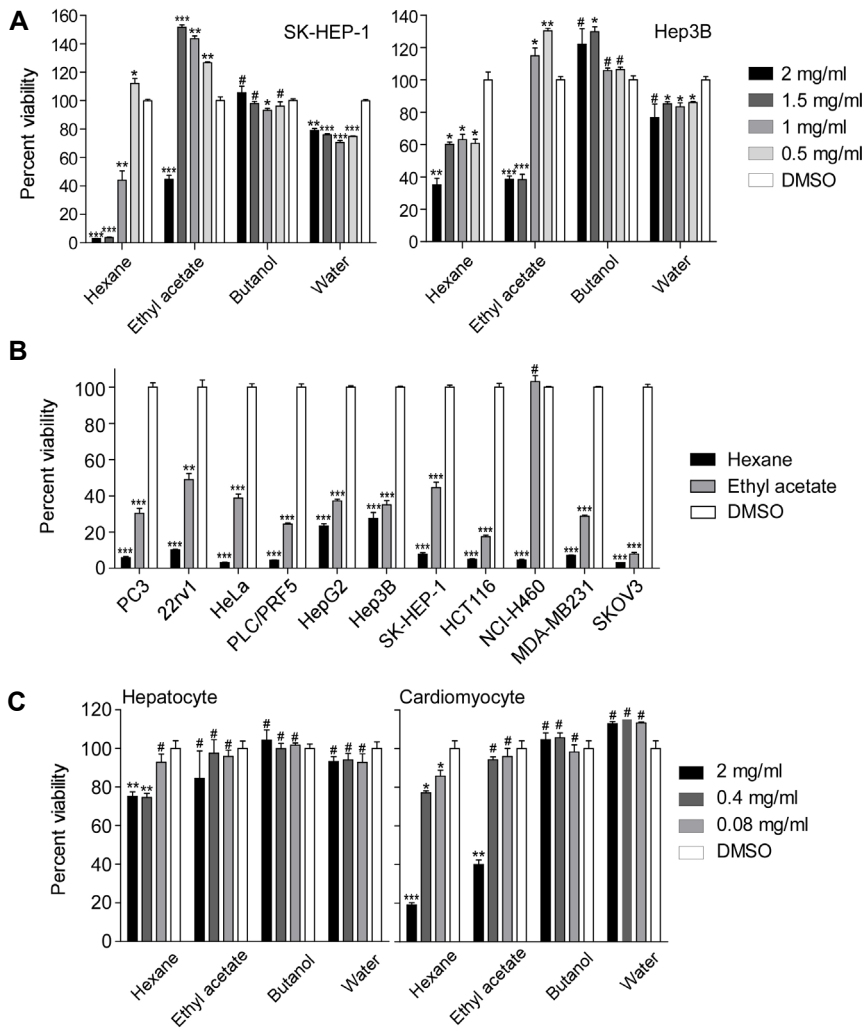


Fig. 2. Anticancer activity of hexane and ethyl acetate fractions. (A) Cytotoxic activity of the fractions. Hepatocellular carcinoma cell lines, SK-HEP-1 (left) and Hep3B (right) were incubated with hexane, ethyl acetate, butanol, and water fractions as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay. (B) Cytotoxic activity of hexane and ethyl acetate fractions. Hexane and ethyl acetate fractions were administered to human cancer cells from prostate (PC3 and 22Rv1), cervix (HeLa), liver (PLC/PRF5, HepG2, Hep3B, and SK-HEP-1), colon (HCT116), lung (NCI-H460), breast (MDA-MB-231), and ovary (SKOV3) for 24 hours at a concentration of 2 mg/mL. Cells were analyzed by MTT assay. (C) Cytotoxic effect of fractions on normal cells. Cardiomyocytes and hepatocytes isolated from mouse heart and liver were incubated with hexane, ethyl acetate, butanol, and water fractions as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay. To determine *P* values, percent cell viability of hexane, ethyl acetate, butanol, or water fraction was compared with control (DMSO) sample. ****P*<0.0001, ***P*<0.001, **P*<0.05; #, not significant.

유방암(MDA-MB-231), 난소암(SK-OV3) 환자로부터 유래된 다양한 암세포주에 대한 세포독성 평가를 실시하였는데, hexane과 ethyl acetate 분획물들은 실험에 사용된 모든 암세포주에 대해서(ethyl acetate의 NCI-H460에 대한 효과만 예외) 좋은 세포독성을 보여주었다(Fig. 2B). 전반적인 활성을 비교해 보면 hexane 분획물에서 ethyl acetate 분획물보다는 좋은 세포독성을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). Hexane과 ethyl acetate 두 종의 분획물들 모두에서 primary hepatocyte와 cardiomyocyte 정상세포에 대한 세포독성효과에서는 에탄올 추출물을 처리했을 때보다 약화되어 있었고, 특히 암세포주와 비교해보면 상대적으로 정상세포에 대한 세포독성은 뚜렷하게 감소되어 있었다(Fig. 2C). 암세포주에 대한 세포독성이 가장 좋았던 hexane 분획물의 경우에는 cardiomyocyte에 대한 독성이 에탄올 추출물과 비교해서 약 5배 가까이 약화되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 따라서 hexane과 ethyl acetate 분획물에는 에탄올에 들어있던 암세포 특이적인 세포독성 활성은 여전히 함유되어 있으나 비특이적으로 정상세포에 독성을 유발하는 물질은 희석된 것으로 추정할 수 있으며, 이는 hexane

분획물에 대한 구성성분 분석 및 추가 물질 분획을 통해 암활성을 띠는 물질을 분리 동정할 수 있는 가능성을 제시하는 결과로 사료된다.

Hexane과 ethyl acetate 분획물의 세포죽음 유도기전

분획물들에 의한 세포기전 분석을 위해서 대표적인 세포죽음 기전이라고 할 수 있는 아포토시스, 세포괴사, 오토파지 유도능력을 측정하였다(27,28). 이를 위해 분획물들을 암세포주에 처리한 후 Annexin V와 Sytox 염색으로 세포죽음과 phosphatidyl serine의 세포표면으로의 노출 정도를 확인하였다(29). 세포가 죽게 되면 증가하게 되는 Sytox 염색은 hexane 분획물을 처리한 세포주에서 뚜렷하게 관찰되었으나 다른 분획물에서는 주어진 농도 조건에서 미미한 수준이었다(Fig. 3A). Sytox에 염색된 세포들 중에서도 약 70% 정도는 Annexin V negative인 necrotic 세포들이었고, 나머지가 아포토시스에 의해서 phosphatidyl serine을 세포표면에 노출하고 있는 Annexin V positive 세포들이었다(30). Hexane 처리된 세포에서 초기 아포토시스에서 보이는 Sytox negative, Annexin V positive 세포는 관찰되

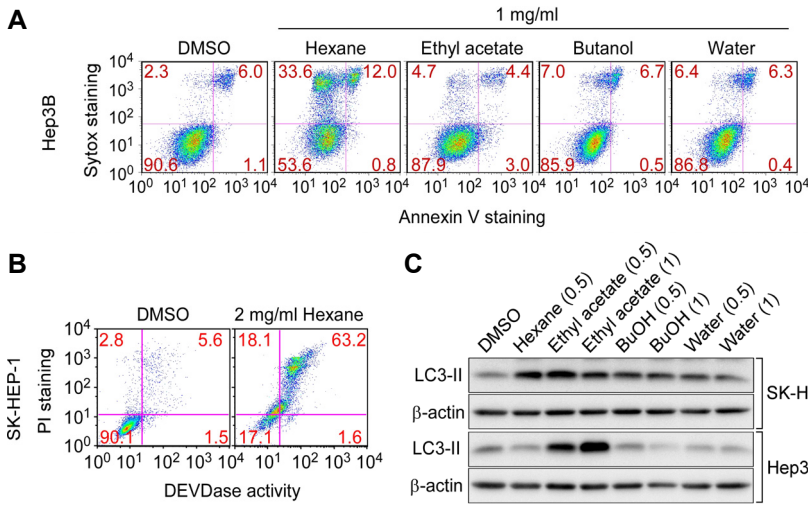


Fig. 3. Biochemical analysis of the fractions. (A) Flow cytometric analysis of Hep3B. Hep3B cells were incubated with hexane, ethyl acetate, butanol, and water fractions (1 mg/mL) for 24 hours. The cells were labeled with Sytox and Annexin V and analyzed by flow cytometry. (B) Flow cytometric analysis of SK-HEP-1. 2 mg/mL hexane fraction was incubated with SK-HEP-1 for 24 hours. The cells were analyzed by flow cytometry. (C) Autophagy induction. The fractions were incubated with SK-HEP-1 and Hep3B as indicated (mg/mL) for 24 hours and analyzed by western blotting.

지 않았다(Fig. 3A). 이는 Sytox, Annexin V로 동시에 염색된 세포들도 세포괴사의 결과물일 가능성을 배제할 수는 없음을 의미한다(31). Propidium iodide(PI)와 caspase activity(DEVDase) 활성 측정에서도 앞선 결과와 유사하게 hexane 분획물에서만 double positive 세포 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 다음으로 오토파지 유도능을 보기 위해서 오토파지 유도의 근거로 활용되는 microtubule-associated protein light chain 3(LC3) 단백질이 phosphatidylethanolamine(PE) conjugation이 되어서 나타나는 LC3-II 형태의 증가가 있는지를 western blotting으로 확인하였다(Fig. 3C)(32,33). 실험에 사용된 서로 다른 두 종의 암세포주에서 ethyl acetate 분획물은 LC3-II 형성을 증가시켰으나 hexane 분획물의 경우에는 SK-HEP-1 세포주에 대해서만 LC3-II를 증가시켰다. 결론적으로 hexane 분획물은 대표적인 세포죽음 형태인 아포토시스, 세포괴사, 오토파지를 모두 활성화시킬 수 있으며, ethyl acetate 분획물의 경우에는 상대적으로 오토파지 유도활성이 우수하다고 사료된다.

Hexane 분획물과 항암제와의 병용요법

현재의 항암치료는 서로 다른 기전으로 작용하는 항암약물들을 낮은 dose로 함께 투여하여 항암효능은 높이고 원치 않는 부작용은 최소화하는 방향으로 진행되고 있다(34). 더불어 항암치료를 받는 환자들은 곤충 추출물들을 단독으로 치료목적을 위해 복용하기보다는 치료를 도와주기 위한 보조식품으로 활용되고 있기 때문에 hexane 분획물에서 확인한 암세포에 대한 독성이 다른 항암물질들과 함께 상승효과를 보일 수 있는지 실험하였다. 현재 임상에서 널리 활용되고 있는 DNA cross-linker(cisplatin)(35), topoisomerase II inhibitor(doxorubicin)(36), microtubule-stabilizer(taxol)(37), tyrosine kinase inhibitor(sorafenib)(38)를 hexane 분획물과 함께 간암세포주에 처리하였다. 최적의 약물 상승효과 조건을 잡기 위해서 다양한 농도 조건에서

실험을 반복하여 단독 투여로는 너무 높은 활성을 보이지 않으면서 두 가지 약물을 병용으로 처리하였을 때 뚜렷한 상승효과를 보이는 농도 조건을 설정하였다. Taxol(Fig. 4A), sorafenib(Fig. 4B), doxorubicin(Fig. 4C)에서 hexane 추출물과 함께 간암세포주에 처리되었을 때 통계적으로 유의미한 수준에서 세포독성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, cisplatin의 경우에는 hexane 분획물과의 상승효과를 볼 수 없었다. 이와 같은 실험 결과들로부터 hexane 분획물은 병용요법에 쓰이는 다른 세포독성 항암약물들이 하듯이 기존 항암제에 의해서 유도되는 세포의 스트레스 신호전달 기전을 더욱 증폭시켜 암세포에 대한 독성을 높일 수 있음을 확인하였다. 따라서 hexane 분획물로부터 항암성분이 확보될 수 있다면 폭넓은 활용이 가능하리라 사료된다.

Hexane 분획물의 *in vivo*에서의 항암활성

Hexane 분획물의 *in vivo*에서의 항암활성을 확인하고자 간암세포주의 하나인 SK-HEP-1 세포주를 BALB/c nu/nu 실험쥐의 피하에 이식하여 종양을 만들었다. Hexane 분획물을 종양이 형성된 쥐에 처리하는 동안 종양성장은 충분히 억제되었고, 처리를 중단하자 종양성장이 다시 재개되었다(Fig. 5A). 따라서 주어진 실험 조건에서 hexane 분획물을 투여하는 동안 통계적으로 유의미한 수준으로 종양성장을 억제할 수는 있으나(Fig. 5B) 암세포를 완벽하게 죽이지는 못하는 것으로 결론을 내렸다. Hexane 분획물을 15일 동안 처리하고 즉시 측정된 몸무게는 통계적으로 무의미한 수준으로 서로 비슷한 값을 보여주었다: 약물을 처리하기 이전과 비교해서 평균 약 1.2% 정도의 몸무게 감소만이 확인되었다(Fig. 5C). 결론적으로 실험쥐를 대상으로 한 xenograft 실험에서도 hexane 추출물은 뚜렷한 부작용 없이 유의미한 수준의 종양성장 억제능력을 보여주었다. 보다 좋은 항암활성을 가지는 물질을 확보하기 위해서는 hexane 분획물로부터 추가 분획물을 확보하거나 활성을 가지는 물질을 분리하는 실험이 필요하다.

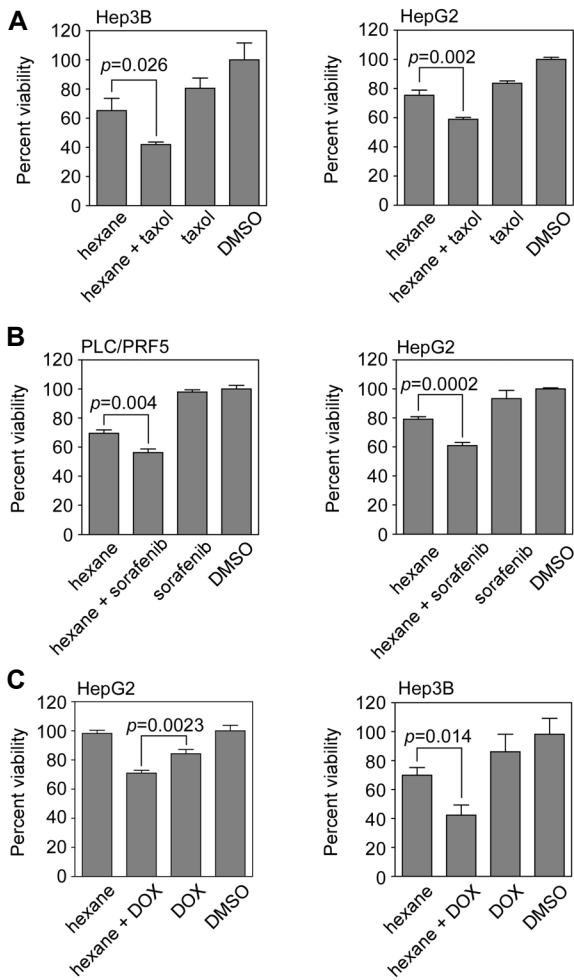


Fig. 4. Combination of hexane fraction with cancer drugs. (A) Combination of taxol and hexane fraction. Hep3B and HepG2 were incubated with 0.2 mg/mL hexane fraction and 2 μ M (Hep3B), 1 μ M (HepG2) taxol as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay. (B) Combination of sorafenib and hexane fraction. PLC/PRF5 and HepG2 were incubated with 0.2 mg/mL hexane fraction and 10 μ M sorafenib as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay. (C) Combination of doxorubicin and hexane fraction. Hep3B and HepG2 were incubated with 0.2 mg/mL hexane fraction and 5 μ M doxorubicin (DOX) as indicated for 24 hours and analyzed by MTT assay.

요 약

본 연구에서 우리는 갈색거저리 유충 추출물의 암세포 선택적인 세포독성 활성을 암세포주를 대상으로 하는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험으로 증명하였다. 먼저 갈색거저리 유충의 에탄올 추출물은 정상세포라 할 수 있는 primary hepatocyte에 대한 독성은 미미하였으나 암세포주들에 대한 세포독성과 함께 다른 정상세포인 primary cardiomyocyte에 대한 독성도 가지고 있었다. 에탄올 추출물을 hexane, butanol, ethyl acetate, 물을 이용하여 liquid-liquid partition으로 추가로 분획, 구성물질들을 분리하였고 이들 분획물 중에서 hexane 분획물은 다양한 암세포들(PC3, 22Rv1, HeLa, PLC/PRF5, HepG2, Hep3B, SK-HEP-1, HCT116, NCI-H460, MDA-MB231, SKOV3)에 대한 독성을 유지하면서 cardiomyocyte에 대한 독성이 상당히 줄어들었다. 0.4 mg/mL 에탄올 추출물이 cardiomyocyte를 대부분 죽이는 독성을 보였으나 동일조건에서 hexane 분획물은 약 20% 정도의 세포독성만을 보여주어 독성이 상당히 감소된 것을 확인하였다. 이렇게 비특이적인 세포독성이 물질분리 및 분획을 함으로써 줄어들 수 있다는 것을 확인하였다. 두 번째로 hexane과 ethyl acetate 분획물들이 아포토시스, 세포괴사, 오토파지와 같은 대표적인 세포죽음 기전들을 활성화시킬 수 있는 것으로 확인하였다. 더불어 hexane 분획물의 세포죽음 유도활성은 현재 임상에서 널리 처방되고 있는 항암물질들과 함께 간암세포주에 처리되었을 때 항암활성을 증대시킬 수 있는 것으로 확인하였다. 이와 같은 실험 결과를 바탕으로 갈색거저리 유충 추출물들이 단독으로 혹은 다른 세포독성 약물들과 함께 항암활성을 가질 수 있음을 확인하였다. 마지막으로 hexane 분획물의 항암활성을 *in vivo* xenograft 실험쥐 모델에서 확인하였는데, 간암세포주인 SK-HEP-1을 이식한 실험쥐에서 hexane 분획물을 15일간 복강주사 하였을 때 종양의 성장을 뚜렷하게 억제하는 것을 확인하였고, 앞선 정상세포에 대한 제한적인 영향과 일치하게 몸무게의 감소 등 부작용이라 할 수 있는 증상은 확인되지 않았다. 이상의 결과들을 종합하면 갈색거저리 유

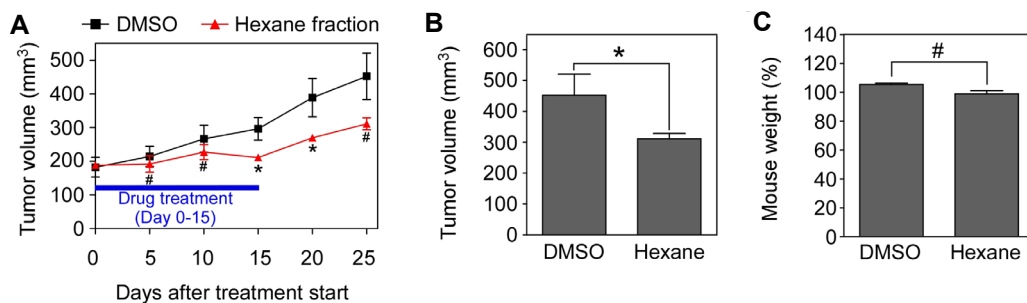


Fig. 5. *In vivo* anticancer activity of hexane fraction. (A) Tumor volume measurement. SK-HEP-1 cells were subcutaneously implanted in nude mice as described in Materials and Methods. When tumor size reached around 180 mm³, 1 g/kg hexane fraction and DMSO vehicle were administered via *i.p.* as indicated. The tumor size was measured with calipers. (B) Tumor volume. At the end of experiment, tumor volume was compared with each other. (C) Mouse body weight change. After 15 days of hexane fraction treatment, average mouse body weight was compared. $*P<0.05$; $\#$, not significant.

충 추출물의 항암활성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인할 수 있었으며, 새로운 항암활성을 가지는 물질 발굴을 위해 추가적인 분획과 물질 분석이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(과제번호: 311006-3)과 농촌진흥청 농업과학기술개발사업(과제번호: PJ008969)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Lachance H, Wetzel S, Kumar K, Waldmann H. 2012. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. *J Med Chem* 55: 5989-6001.
- Clardy J, Walsh C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829-837.
- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75: 311-335.
- Bruix J, Sherman M. 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53: 1020-1022.
- Berenbaum MR, Eisner T. 2008. Ecology. Bugs' bugs. *Science* 322: 52-53.
- Ratcliffe NA, Mello CB, Garcia ES, Butt TM, Azambuja P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 747-769.
- Dossey AT. 2010. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Nat Prod Rep* 27: 1737-1757.
- Cherniack EP. 2010. Bugs as drugs, Part 1: Insects: the "new" alternative medicine for the 21st century? *Altern Med Rev* 15: 124-135.
- Lord CJ, Ashworth A. 2010. Biology-driven cancer drug development: back to the future. *BMC Biol* 8: 38.
- Kamb A, Wee S, Lengauer C. 2007. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov* 6: 115-120.
- Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE, Workman P, Al-Lazikani B. 2013. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 12: 35-50.
- Menendez JA, Joven J, Cufí S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferreros C, Cuyàs E, Martin-Castillo B, López-Bonet E, Alarcón T, Vazquez-Martin A. 2013. The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle* 12: 1166-1179.
- Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M. 2013. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* 17: 12-29.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Pemberton RW. 1999. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 65: 207-216.
- Simon E, Baranyai E, Braun M, Fábíán I, Tóthmérész B. 2013. Elemental concentration in mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) during metamorphosis. *Biol Trace Elem Res* 154: 81-87.
- Youn K, Yun EY, Lee J, Kim JY, Hwang JS, Jeong WS, Jun M. 2014. Oleic acid and linoleic acid from *Tenebrio molitor* larvae inhibit BACE1 activity *in vitro*: molecular docking studies. *J Med Food* 17: 284-289.
- Han SR, Yun EY, Kim JY, Hwang JS, Jeong EJ, Moon KS. 2014. Evaluation of genotoxicity and 28-day oral dose toxicity on freeze-dried powder of *Tenebrio molitor* Larvae (yellow mealworm). *Toxicol Res* 30: 121-130.
- Moon HJ, Lee SY, Kurata S, Natori S, Lee BL. 1994. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J Biochem* 116: 53-58.
- Lee YJ, Chung TJ, Park CW, Hahn Y, Chung JH, Lee BL, Han DM, Jung YH, Kim S, Lee Y. 1996. Structure and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 6-11.
- Youn K, Jun M. 2013. *In vitro* BACE1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med* 79: 1038-1042.
- Li WC, Ralphs KL, Tosh D. 2010. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol* 633: 185-196.
- Shen L, Hillebrand A, Wang DQ, Liu M. 2012. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J Vis Exp* 64: 3917.
- Sreejit P, Kumar S, Verma RS. 2008. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44: 45-50.
- Suh HJ, Kang SC. 2012. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts of *Protaetia brevitaris* Lewis (Coleoptera: Scarabaeidae) at different growth stages. *Nat Prod Res* 26: 510-517.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51: 2515-2520.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Núñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovskiy B, Melino G, Kroemer G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19: 107-120.
- Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16: 663-669.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. 2007. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2: 2295-2301.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
- Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G, Zhivotovskiy B, Fiers W, Grooten J, Declercq W, Vandenabeele P. 2001. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* 8: 829-840.
- Mizushima N, Yoshimori T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542-545.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M,

- Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90: 1383-1435.
34. Kummar S, Chen HX, Wright J, Holbeck S, Millin MD, Tomaszewski J, Zweibel J, Collins J, Doroshow JH. 2010. Utilizing targeted cancer therapeutic agents in combination: novel approaches and urgent requirements. *Nat Rev Drug Discov* 9: 843-856.
35. Siddik ZH. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265-7279.
36. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229.
37. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. 2003. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22: 7280-7295.
38. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5: 835-844.