

포제방법에 따른 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis* Seulensis) 추출물의 항염 및 미백활성에 관한 연구

성 경 아^{*,**} · 김 미 혜^{***} · 박 수 남^{*†}

*서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품종합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터
(주)라비오 소재과학연구소, *서라벌대학교 장례서비스경영과
(2016년 11월 28일 접수, 2016년 12월 6일 수정, 2016년 12월 12일 채택)

Anti-inflammatory and Whitening Effects of *Protaetia brevitarsis* Seulensis Extracts by Oriental Conversion Methods

Gyeong Ah Sung^{*,**}, Mi Hye Kim^{***}, and Soo Nam Park^{*†}

*Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

**LABIO, Seoul 08501, Korea

***Department of Funeral Service Management, Sorabol College, Gyeongbuk 38063, Korea

(Received November 28, 2016; Revised December 6, 2016; Accepted December 12, 2016)

요약: 본 연구에서는 화장품 신소재 개발을 위해 한의약적 포제법을 적용하여 흰점박이꽃무지 추출물을 제조하고 포제방법에 따른 항염 및 미백활성을 평가하였다. 모든 실험은 생(生), 1회 초법(炒法), 2회 초법(炒法), 3회 초법(炒法), 증법(蒸法)을 적용한 흰점박이꽃무지를 이용하였다. 각 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지의 용매별(80% 에탄올, 50% 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산) 추출물에 대한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 각각 85.5, 22.4, 37.0 및 19.4%의 효과를 나타내었다. 따라서 이후의 실험은 항산화 활성이 가장 큰 80% 에탄올 추출물을 이용하였다. 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지 추출물과 포제법을 적용하지 않은 추출물 모두 농도 의존적으로 항산화능을 나타냈으며, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 포제법을 적용한 3회 초법 및 증법은 superoxide dismutase (SOD)-like 활성이 각각 62.9 및 55.9%를 나타냈다. Lipopolysaccharide (LPS)로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지 추출물을 처리하였을 때, LPS를 단독으로 처리한 양성 대조군보다 포제법을 적용하지 않은 흰점박이꽃무지 추출물(38.0%), 1회 초법(41.0%), 2회 초법(69.8%), 3회 초법(70.1%), 증법(78.5%) 순으로 염증 매개물질인 NO· 생성이 유의적으로 감소하였다. 세포 내 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 생합성 저해 효과를 확인한 결과, 농도 의존적으로 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었다. 포제하지 않은 흰점박이꽃무지 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 α -MSH만 처리한 대조군과 비교하여 멜라닌 생합성을 90.7% 감소시켰다. 이상의 결과들은 항염이나 미백 활성이 있는 화장품 소재 개발에 포제법을 적용할 수 있음을 시사한다.

Abstract: In order to find new functional materials for the cosmetics application, we investigated anti-inflammatory and whitening effects of the *Protaetia brevitarsis* seulensis (*P. brevitarsis*) extracts, which were prepared by the various oriental conversion methods, as follows; fresh, roasted one time, roasted two times, roasted three times, and steamed. 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of the various solvent extracts (80% ethanol, 50% ethanol, ethyl acetate, hexane) of *P. brevitarsis* extracts were 85.5, 22.4, 37.0 and 19.4% respectively. The 80% ethanol

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

extract with the highest antioxidant activity was used for all experiments. In case of antioxidant activity test of the extracts, all the extracts showed the activities in concentration dependent manner regardless of the sample preparation methods. Superoxide dismutase-like (SOD-like) activities of the extracts roasted three times and steamed were 62.9 and 55.9%, respectively in 500 $\mu\text{g/mL}$. Effects of extracts on the inflammation of RAW 264.7 cell induced by lipopolysaccharide (LPS) showed decreasing tendency of $\text{NO}\cdot$ and prostaglandin E_2 (PGE_2) production; PBS fresh (38.0%), PBS roasted one time (41.0%), PBS roasted two times (69.8%), PBS roasted three times (70.1%), PBS steamed (78.5%). Intracellular tyrosinase and melanin biosynthesis inhibitory activities of the extracts were decreased in a concentration dependent manner. However, the fresh *P. brevitaris* extracts without the oriental conversion method showed 90.7% decrease compared to the control group treated with α -MSH alone at 500 $\mu\text{g/mL}$. Taken together, these results suggest the oriental conversion method can be applied in development of cosmetic materials in order to improve anti-inflammatory and whitening effects of the cosmetics products.

Keywords: *Protaetia brevitaris seulensis*, anti-inflammation, whitening, oriental conversion method, cosmetics

1. 서 론

피부가 자외선에 노출되면 피부에서는 다양한 종류의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 피부에서 생성되는 ROS의 종류로는 $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$ 및 $\text{NO}\cdot$ 등이 있다. 이들 ROS는 피부에 존재하는 효소적 항산화제 및 비효소적 항산화제에 의해 제거되지만 피부가 자외선에 계속 노출되면 피부에서는 과잉의 ROS가 생성된다. 이들 ROS는 피부 세포 및 조직을 손상시킴으로써 광노화를 촉진시킬 뿐만 아니라 피부 염증반응을 일으켜서 피부 손상 및 피부 질환을 야기시킬 수 있다.

피부 염증반응은 피부의 손상이나 노화에 있어서 주 원인 중의 하나로 알려져 있다. 이러한 염증은 체내 세포 및 조직에 어떤 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해졌을 때, 생체가 재생이나 회복 등을 위한 방어적 반응 과정의 일환이다[1]. 이 과정에서 ROS의 일종인 nitric oxide ($\text{NO}\cdot$)가 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되며 각종 생리 및 병리적 과정에 있어 중요한 역할을 담당한다[2-4]. 하지만 과도하게 생성된 $\text{NO}\cdot$ 는 혈관투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진시키거나 염증 매개체의 생합성을 통하여 급성 또는 만성 염증을 일으킴으로써 조직 손상 및 유전자 변이 등을 가져올 수 있다[5-7]. 염증성 cytokines이나 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 자극된 세포는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible NO synthase (iNOS)의 발현양이 증가한다. 이 효소들의 발현 증가는 prostaglandins E_2 (PGE_2)와 $\text{NO}\cdot$ 의 생성을 증가시킴으로써 다양한 염증성 질환을 야기시킬 수 있다[8]. 염증반응

에서 $\text{NO}\cdot$ 및 PGE_2 의 생성은 각각 iNOS와 COX-2에 의해 이루어진다[9-10].

자외선 및 ROS에 의한 피부에서의 멜라닌 생성은 피부의 흑화 현상의 원인이 되지만 한편으로는 자외선 및 ROS로부터 피부를 보호하는 역할을 담당하기도 한다[11]. 그러나 피부에 멜라닌이 과도하게 축적되면 기미, 주근깨 및 검버섯 등의 원인이 된다. 멜라닌 생성 과정은 멜라노사이트에서 핵심효소인 tyrosinase와 tyrosinase-related proteins (TRPs) 등에 의해 조절된다[12-13]. 멜라닌의 종류로는 pheomelanin과 eumelanin이 있다[14]. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA quinone과 DOPA chrome으로 산화시키는 단계에 참여하는 효소이다[15]. 기능성 화장품에서 미백소재 개발 연구는 tyrosinase의 저해활성뿐만 아니라 멜라닌 생성과정에 관여하는 각종 효소의 저해 활성, 이와 관련이 있는 유전자 발현과 멜라닌 생성을 세포 수준에서 관찰하고 인체 시험을 통해서 평가 확인하는 과정을 거친다. 최근에는 천연물을 이용한 미백 효능뿐만 아니라 주름개선 등 항노화 효능을 함께 갖는 복합 기능성 소재 개발에도 많은 관심이 모아지고 있다[16].

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitaris seulensis*)는 딱정벌레목 꽃무지과에 속하는 곤충으로 그 유충은 “굼벥이” 또는 제조(鱗蝮)로 알려져 있다. 그 전체 길이는 약 17 ~ 24 mm 정도의 식식성(植食性) 곤충으로 한국, 일본, 중국 및 유럽 등에 서식하는 것으로 알려져 있다[17-18]. 흰점박이꽃무지 유충은 동의보감에서는 간암이나 간염, 백내장 등의 성인병을 치료하는데도 효과가 있는 것으로 기록되어 있으며, 특히 간질환에 효능이 뛰어나 한방이나 민간요법에도 이용되어 온

것으로 알려져 있다[19]. 현재 흰점박이꽃무지에 대한 기능성 효능 연구로는 항균성 단백질, 간 손상 보호 및 항암 작용에 대한 보고가 있다[20-26]. 흰쥐를 대상으로 한 동물 임상실험에서는 그 안전성을 확인되었고 [27-29], 지질대사에 미치는 영향[30-31], 그리고 폐탄을 추출물에서 항산화 활성 등이 보고된 바 있다[32]. 최근에는 흰점박이꽃무지의 추출 용매별로 항염증 및 미백 활성에 관한 연구가 세포 수준에서 검토된 바 있다[33].

포제(炮製)란 한약의 전통적 가공 기술을 통칭한 것으로서 약재를 조제(調製)하고 제성(製成)하는 것으로, 한약재 또는 절편에 따라 그 처리방법은 매우 다양하다. 이러한 포제의 목적은 부작용 감소, 용해성 촉진, 약성 변화, 효능 증가, 효능 조절 및 비약용 부분 제거, 순도 증진 및 저장의 편리 등이 알려져 있다[34].

본 연구에서는 동의보감을 바탕으로 유용 곤충자원인 흰점박이꽃무지를 한의학적 포제방법을 적용하여 개발한 소재가 화장품 소재로서 화장품에 응용 가능한지를 알아보고자 하였다. 이를 위해 최적의 포제 방법 및 전처리 조건을 찾고 이로부터 조제된 추출물에 대한 항산화, 항염 및 미백 효능을 평가하였다. 따라서 기능성 화장품 소재 개발이 거의 대부분 식물추출물에 의존하던 종래 방식에서 벗어나 곤충을 이용한 새로운 화장품 소재를 개발할 수 있다는 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 기기 및 시약

ELISA reader (iMark microplate reader, BIO-RAD, USA)를 사용하였다. L-Tyrosine은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic 역시 Sigma (USA)에서 구입하였다. 그리고 그 외 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 효소로 사용된 tyrosinase (1000 units/mg solid)는 Sigma (USA), SOD assay kit-WST는 Dojindo Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)은 Gibco (USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), Griess 시약(1% (w/v) sulfani-

lamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 ascorbic acid 2-glucoside (AA-2G)는 Sigma (USA)에서 구입하였다.

2.2. 시료의 포제

실험에 사용된 흰점박이꽃무지는 정우당(Yeongcheon, Korea)에서 3령 유충을 구입하여 사용하였다. 포제법의 종류는 Table 1과 같다. 포제(炮製) 횟수는 “포제 건조”를 1회로 하여 동일 과정을 반복하였고 포제 과정은 구입한 흰점박이꽃무지 유충에 대하여 설정 온도 160 °C와 시간별(10, 20 및 30 min)로 100 g씩 각각 초법하였으며, 떡찜기 하부에 물을 넣고 설정 온도 110 °C에서 증기가 발생한 후 흰점박이꽃무지 유충을 찜솥에 올려놓아 증법(蒸法)하였으며 찜솥 내의 온도는 95 ~ 100 °C였고 3 min간 증법하였다. 건조과정은 자연 건조법으로 진행하였고 실리카겔로 2차 건조하였다. 실험에 사용된 시료는 생흰점박이꽃무지 유충, 1회 초법(炒法)한 것, 2회 초법(炒法)한 것, 3회 초법(炒法)한 것, 증법(蒸法)한 것을 각각 분쇄 가공하여 사용하였다.

2.3. 포제 방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물 제조

포제 처리한 각 시료들의 추출은 분쇄기로 분쇄한 다음 시료 20 g에 에탄올 50% 200 mL를 넣고, 25 °C에서 24 h씩 2회 반복 추출하였다. Kimble filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 미리 항량된 용기에 넣어 40 ~ 45 °C의 수온에서 rotary vacuum evaporator (JP/N 1000X, Eyela)를 사용하여 감압 농축하였다. 각각의 농축액을 자연 건조하여 건조시켰으며 공정은 Figure 1과 같다. 그 결과로 자연건조 추출물 포제 흰점박이꽃무지 에탄올 50% 추출물은 4.93 g (수율: 24.65%)을 얻었으며, 에탄올 80% 추출물은 2.66 g (수율: 13.30%)을 얻었다. 또한, 에틸아세테이트 추출물은 1.26 g (수율: 6.30%)을 얻었으며, 헥산 추출물은 1.19 g (수율: 5.95%)을 얻었다. 각 추출물을 70% 에탄올에 녹여 10 mg/mL의 stock 용액으로 제조한 뒤 4 °C에 보관하여 사용하였다.

Table 1. Type of Oriental Conversion Methods

Oriental conversion methods	Asistence material	Examples
Roasted method (炒法) A method of roasting uniformly to a certain extent by heating the medicine while keeping the fire centered evenly and continuing	土炒法 (Loess, 黄土)	土白朮 (<i>Atractylodes macrocephala</i> koidzumi with loess)
	釜炒法 (Bran, 麸)	煨葛根 (<i>Pueraria lobata</i> ohwi with bran)
	米炒法 (Rice, 米)	米黨參 (<i>Codonopsis pilosulae</i> radix with rice)
Broiled method (炙法) How to stir-fry the auxiliary ingredients into the drug together with a certain amount of liquid auxiliary material of the medicine	酒炙法 (Yellow wine, 黃酒)	酒當歸 (<i>Angelicae gigantis</i> radix with yellow wine)
	炒炙法 (Vinegar, 食醋)	炙大黃 (<i>Rheum palmatum</i> with vinegar)
	薑炙法 (Ginger juice, 生薑汁)	薑黃連 (<i>Coptis</i> sp. with ginger juice)
	蜜炙法 (Honey, 蜜)	蜜甘草 (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> fischer with honey)
Steamed method (蒸法) How to make steaming with adding or not adding auxiliary materials such as alcohol, vinegar etc to the medicine	鹽炙法 (Salt water, 鹽水)	鹽知母 (<i>Anemarrhenae</i> rhizoma with salt water)
	豆蒸法 (Bean soup, 一太汁)	製何首烏 (<i>Polygoni multiflora</i> radix with bean soup)
Boiled method (煮法) How to pour a proper amount of water and simmer together with adding or not adding auxiliary drugs	酒蒸法 (Yellow wine, 黃酒)	酒蒸黃精 (<i>Polygonatum sibiricum</i> rehd. with yellow wine)
	鹽煮法 (Salt water, 鹽水)	製附子 (<i>Aconitum carmichaeli</i> debeaux with salt water)
	薑煮法 (Ginger juice, 生薑汁)	薑半夏 (<i>Pinelliae tuber</i> with ginger juice)

2.4. 포제방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물의 항산화 평가

2.4.1. DPPH Assay를 이용한 Free Radical 소거 활성 시험
 DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로써, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자공여능을 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 흰점박이꽃무지 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하였다. 자유 라디칼 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도

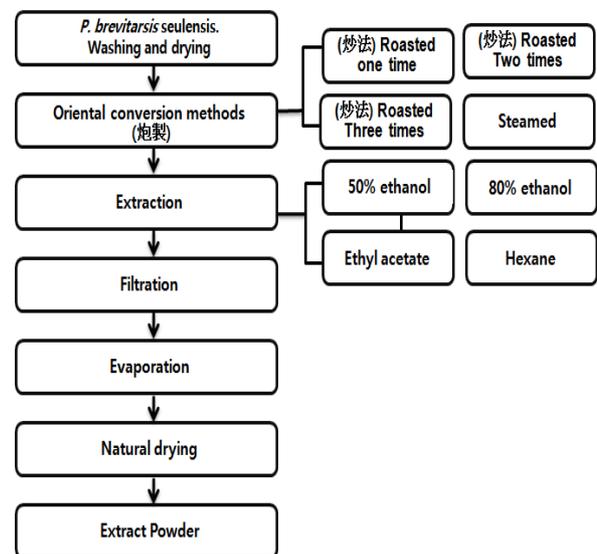


Figure 1. The extracting process of *P. brevitaris seulensis*.

Table 2. The Conditions for HPLC Analysis of Oleic Acid

Condition	
Instrument	Agilent 1260 HPLC
Column	Intersil SIL-100A (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Column temp.	40 °C
Detector	ELSD (evaporator temp: 40 °C, nebulizer temp: 40 °C)
Mobile phase	Isocratic (MeOH : Chloroform = 30 : 70)
Flow rate	1 mL/min
Run time	15 min
Injection volume	5 μL

(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μg/mL)로서 표기하였으며, 자유 라디칼(DPPH) 소거활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

2.4.2. SOD-Like 활성 측정

포제한 흰점박이꽃무지 추출물의 SOD 항산화효소 유사활성 측정은 Marklund 등의 방법에 따라 실행하였다. 시료는 이 추출물 0.5 g을 10 mL의 Tris-HCl buffer (pH 8.5)에 녹인 것을 사용하였다. 실험으로는 포제한 흰점박이꽃무지 추출물 0.2 mL에 Tris-HCl buffer (pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25 °C에서 10 min 방치 후, 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

$$\text{SOD like activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

2.5. HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지 지표 물질 분석

시료 중의 지표 물질(oleic acid) 함량분석을 위하여 대한약전(보건복지부 1997)의 방법을 응용하였으며, HPLC 분석의 전반적인 조건은 Table 2와 같다. 사용한 column은 Intersil SIL-100A (4.6 × 250 mm)이다. 검출기는 ELSD (evaporator temperature : 40 °C, Nebulizer temperature : 40 °C)로 실시하였으며 시료의 1회 주입량은 5 μL이었다. 이동상은 MeOH : chloroform (30 : 70)이며 유속은 1.0 mL/min이었다.

2.6. 세포활성 평가

2.6.1. 세포배양

B16F10 melanoma 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하여 사용하였고, 배지는 10% FBS를 포함한 DMEM배지를 사용하였으며, 온도 37 °C와 5%의 CO₂를 유지하는 incubator에서 배양하였다. 배지는 매 2일마다 교환하였으며, 세포의 밀도가 90%가 도달하기 이전에 계대배양하였다. 냉동 보관한 세포를 해동한 후 내지 5 ~ 6 passage까지만 사용하였으며, 사용 후 세포는 고압멸균 후 폐기하였으며, RAW 264.7 murine macrophage cell은 한국세포주 은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받아 1% penicillin-streptomycin과 10% FBS이 함유된 DMEM (Gibco, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.6.2. 세포독성 측정(MTT Assay)

RAW 264.7, B16F10 세포 모두 생존율 측정은 Carmichael의 방법(Carmichael *et al.*, 1987)에 의하여 실시하였다. 24-well plate에 logarithmic phase에 도달한 세포를 1.0 × 10⁵ cells/well의 농도가 되도록 조절하여 분주 후 24 h 배양하여 부착화 및 안정화를 시행하였다. 24 h 배양이 끝난 후 추출물의 최종 농도 10, 25, 50, 100, 200, 500 μg/mL 되게 용액에 희석하여 세포주에 처리한 후 24 h 동안 배양하였다. 배양 완료 후 각 well에 MTT 용액(5 mg/mL in PBS) 10 μL씩 첨가하여 37 °C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4 h 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan

결정을 DMSO에 잘 녹여서 96-well plate에 옮겨 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6.3. 항염 효능 평가

2.6.3.1. Nitric Oxide 생성 측정

NO·의 농도 측정에 의한 항염 활성 측정은 배양액 내의 nitrite 농도에 따라 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 2.0×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 18 h 동안 배양한 후 포제 흰점박이꽃무지 유충 추출물을 10, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 전처리하고 1 h 후에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 후 48 h 동안 배양하였다. 배양액과 동량의 Griess reagent를 가하고 10 min 동안 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO· 농도를 결정하였다.

2.6.3.2. Prostaglandin E₂의 측정

활성화된 대식세포로부터 분리되는 염증물질인 PGE₂의 양을 세포배양액으로부터 효소면역반응법(enzyme immuno assay; EIA)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포에 포제방법(生, 1회 炒, 2회 炒, 3회 炒, 蒸)에 따른 흰점박이꽃무지 추출물을 전 처리하고 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하여 18 h 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 배양액 내에 존재하는 PGE₂의 양을 측정하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96-well plate에 각각의 배양액을 100 μL 씩 loading한다. 여기에 primary antibody solution 50 μL 와 PGE₂ conjugate 50 μL 씩 첨가하여 4 °C에서 overnight시켰다. 기질용액을 200 μL 씩 처리하여 5 ~ 20 min 반응시킨 후, 50 μL 의 stop solution을 처리하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6.4. 미백 효능 평가

2.6.4.1. Melanoma Cell (B16F10)에서의 *In Vitro* Tyrosinase 저해 활성

B16F10 세포를 배양하여 24-well plate에 각 well당 세포를 1.0×10^5 cells/well로 각각의 세포생존율에 따라 농도를 처리한 후 48 h 배양하였다. 48 h 배양한 후 각 well을 10 mM PBS로 세척하였으며, 1% Triton

X-100을 함유한 10 mM PBS 100 μL 에 현탁시켰다. 현탁된 이 액을 vortexing 한 후 1000 rpm에서 5 min 동안 원심 분리하여 상등액을 활성측정 효소액으로 사용하였다. 96-well plate에 이 효소액을 40 μL 넣고 기질인 L-DOPA (2 mg/mL) 100 μL 를 첨가하였다. 37 °C에서 1 h 동안 반응을 진행시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율을 계산하였다(Roberts, 1969).

2.6.4.2. Melanoma Cell (B16F10)에서의 멜라닌 합성 저해활성

B16F10 melanoma 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6-well에 세포수 2.0×10^4 cells/well에 2 mL씩 첨가하고 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 배양하였다. 10 nM의 melanocyte stimulating hormone (α -MSH)와 함께 시료를 배지에 농도별로 처리하여 72 h 동안 추가 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 trypsin-EDTA으로 처리하여 세포 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet을 1.5 mL eppendorf tube로 옮겨 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet에 1 N NaOH 용액을 첨가하고 60 °C에서 1 h 동안 용해시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한 후 멜라닌 생성 저해율(%)을 계산하여 α -MSH만 처리한 대조군과 비교하여 상대적인 멜라닌 함량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

자외선 노출과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포 및 조직 손상과 더불어 노화를 가속화시킨다. 이러한 ROS에는 super oxide anion radical (O₂⁻), hydroxyl radical (·OH) 등이 있으며 이들과 생체분자와의 반응으로 생성된 유기 라디칼 (·OR 또는 ·OOR)과 같은 라디칼 종이 포함된다. 라디칼은 원자가 전자 오비탈에 쌍을 이루지 않은 홀 전자가 존재하여 에너지가 높고 반응성이 매우 크다. 라디칼은 세포막에서 지질 과산화반응을 개시하여 자동 산화 연쇄 반응 과정으로 세포를 손상시킨다[35].

흰점박이꽃무지 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 및 포제방법에 따른 영향을 측정한 결과 Figure 2과 같

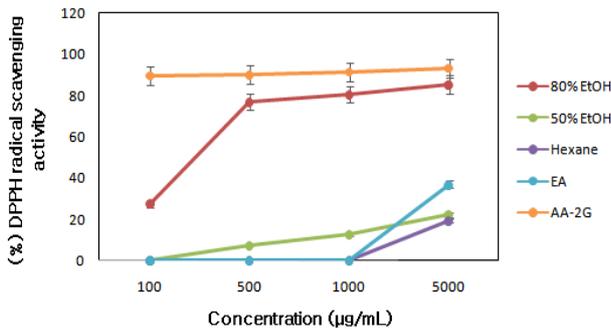


Figure 2. Free radical scavenging activities of fractions extracted from *P. brevitarsis seulensis* by the oriental conversion methods.

다. 추출물의 경우 5,000 µg/mL에서 에탄올 80%, 에탄올 50%, 에틸아세테이트, 헥산 추출물에서 각각 85.5, 22.4, 37.0 및 19.4%의 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 양성대조군인 AA-2G를 통해 농도의존적으로 항산화 활성이 증가함을 확인하였고, 이에 따라 추후 실험은 추출용매들 중 항산화능이 가장 높은 에탄올 80%를 선정하여 진행하였다.

3.2. SOD 유사활성 측정

항산화 효소 중의 하나인 SOD는 생체내에서 생성된 O₂^{•-}를 과산화수소로 전환 시키는 반응(2O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂)을 촉매하는 효소이다. 이어 SOD에 의해 생성된 H₂O₂는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환됨으로써 SOD가 활성산소로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다. 따라서 추출물 중에서 SOD 유사활성이 있으면 산화 방지뿐만 아니라 노화를 억제하는데도 기여할 수 있다. 흰점박이꽃무지 추출물의 각 포제방법에 따른 SOD 효소 활성에 대하여 측정하였다(Figure 3). 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지와 포제법을 적용하지 않은 흰점박이꽃무지 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 유의적으로 높은 SOD 유사 활성이 증가하는 경향을 나타냈다. 포제 흰점박이꽃무지 추출물의 경우 500 µg/mL에서 3회 초범이 62.9%, 증범, 포제적용 전, 2회 초범, 1회 초범 순으로 각각 55.9, 48.8, 40.0 및 25.5%를 나타내었으며, 이는 포제 SOD 유사활성에서 대조군에 비하여 포제법을 적용하지 않은 군의 활성(48.8%)과 비교하였을 때, 3회 초범적용 흰점박이꽃무지의 SOD 유사활성(62.9%)이 높음을 알 수 있었고, 증범 추출물 500 µg/mL에서는

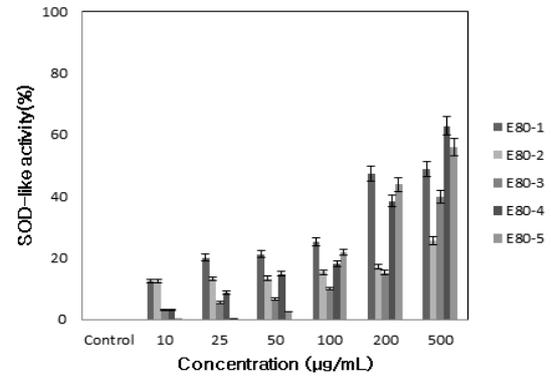


Figure 3. SOD-like activity of 80% ethanol extraction from *P. brevitarsis seulensis* by the oriental conversion methods.

* The conditions of *P. brevitarsis seulensis* (PBS)

E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

55.9% 이상 증가되었다. 2회 초범 및 1회 초범적용 흰점박이꽃무지 추출물의 SOD 유사활성은 각각 40.0%, 25.5%로 SOD 유사활성과 비교할 때 3회 초범(62.9%) 흰점박이꽃무지 추출물의 SOD 유사활성이 가장 높음을 알 수 있었다.

3.3. HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지 추출물의 지표물질 분석

흰점박이꽃무지 추출물은 특이적으로 유지 성분 함량이 매우 높다. 전체 지방산 중 올레산(oleic acid)의 함량이 가장 높으며, 주요 지방산으로는 올레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 리놀레산 및 스테아르산이 있다. 그 중 올레산(oleic acid)의 함량이 매우 높아 흰점박이꽃무지의 지표물질을 올레산(oleic acid)으로 선정한 선행 연구[36]를 바탕으로 포제에 따른 oleic acid의 HPLC 패턴 변화를 비교 분석하였다(Figure 4).

3.4. 세포 독성 시험(RAW 264.7, B16F10)

흰점박이꽃무지에 의한 macrophage 세포와 melanoma 세포의 생존율을 각각 MTT assay에 의해 확인한 결과를 Figure 5, 6에 나타냈다. 두 세포 모두 모든 분획물이 500 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 생존율을 나타내어 낮은 세포 독성을 확인하였다. 이하의 melanoma cell (B16F10)에서의 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생합성량, 미백관련 신호전달인자 측정은 생존율이

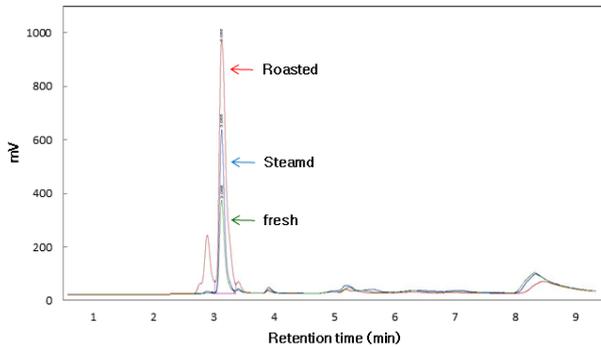


Figure 4. HPLC chromatograms of oleic acid.

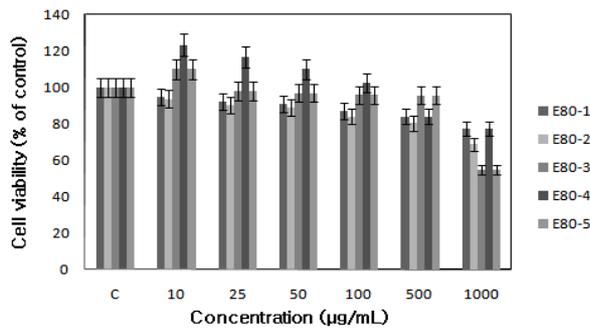


Figure 5. Cell viabilities of *P. brevitarsis seulensis* extracts obtained by the oriental conversion methods on macrophage cells (Raw 264.7). E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

80% 이상의 농도인 10, 50, 100, 200 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 확인하였다.

3.5. PGE_2 와 $\text{NO}\cdot$ 생성에 미치는 영향

염증 반응의 매개물질을 합성하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 유도는 nitric oxide ($\text{NO}\cdot$) 생성 등 염증반응과 밀접한 관련이 있으며, 염증성 사이토카인의 자극에 의해서도 다양한 세포에서 나타나기도 한다. 외부 자극에 의해 염증이 유발될 때는 COX-2가 일시적으로 과발현되어 프로스타글란딘의 과량 방출이 나타날 수 있다. 본 연구에서는 포제 흰점박이꽃무지 추출물이 항염증 효과가 있는지를 평가하기 위해 염증 매개인자의 변화를 관찰하였다. 포제 흰점박이꽃무지 추출물의 농

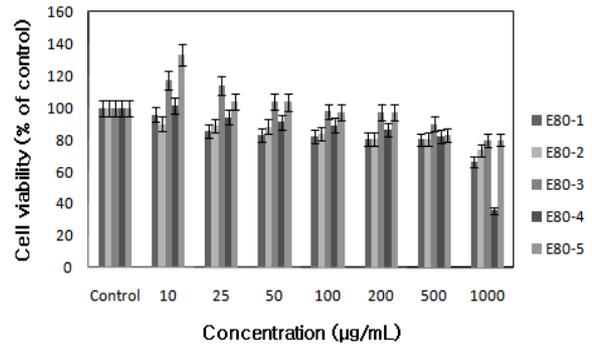


Figure 6. Cell viabilities of *P. brevitarsis seulensis* extracts obtained by the oriental conversion methods on melanoma cell (B16F10). E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

도는 세포독성을 나타내지 않는 500 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도를 실험에 사용하였다. 그 결과 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증 유발 후 포제 흰점박이꽃무지 추출물을 처리하였을 때 염증 매개물질이 감소하는 것으로 나타났다. LPS를 단독으로 처리한 양성 대조군보다 포제 흰점박이꽃무지 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 $\text{NO}\cdot$ 와 PGE_2 의 생성이 감소되는 것을 관찰하였다. 증법 적용한 포제 흰점박이꽃무지 추출물에서 $\text{NO}\cdot$ 생성의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 38.6 μM 의 $\text{NO}\cdot$ 생성 수준을 나타내었으며, PGE_2 의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 49.1 ng/mL의 수준으로 나타났다(Figure 7, 8). 기존 연구에 의하면 흰점박이꽃무지가 cytokine 및 염증 매개물질인 iNOS의 유의적 감소 및 항염증 효과의 기전으로 대식세포의 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성을 억제시키는 것으로 보고된 바 있다. 이러한 결과는 본 실험 결과와 비교할 때도 항염 측면에서 유의적인 관련성이 있음을 시사하였다.

3.6. Melanoma Cell (B16F10)에서의 Cellular Tyrosinase 저해 활성 측정

포제방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 melanoma 세포에서의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, Figure 9과 같이 나타났다. 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지 추출물과 포제법을 적용하지 않은 추출물 모두 전반적으로 농도 의존적인 tyrosinase 저해 활성을

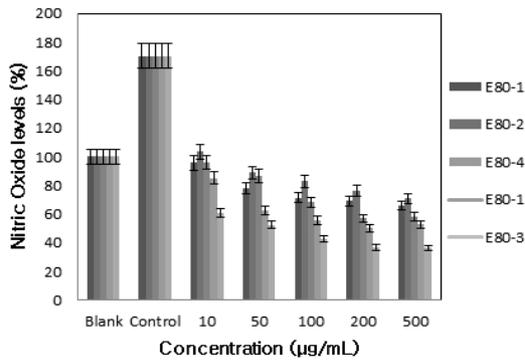


Figure 7. Effects of 80% ethanol extracts of *P. brevitarsis* seulensis obtained by the oriental conversion methods on NO[•] production in LPS-stimulated Raw 264.7 macrophages. NO[•] production was measured by the Griess reaction assay and expressed as a percentage of the control (LPS alone). Valid is the mean ± S.D. of the three independent experiments. (significant as compared to control.). E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

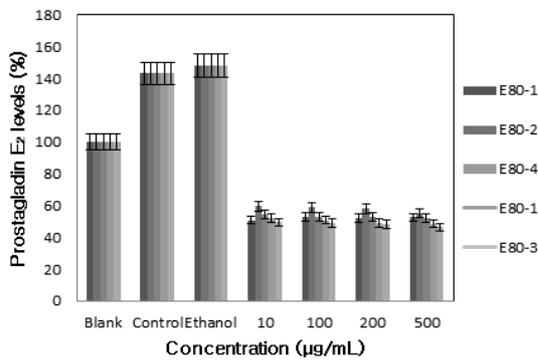


Figure 8. Effects of 80% ethanol extract *P. brevitarsis* seulensis on prostaglandin E₂ production in LPS-stimulated Raw 264.7 macrophages. PGE₂ production was measured by the Griess reaction assay and expressed as a percentage of the control (LPS alone). Valid is the mean ± S.D. of the three independent experiments. (significant as compared to control.). E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

나타내었다. 포제적용 전 흰점박이꽃무지 추출물은 모든 농도에서 포제법을 적용한 경우보다도 tyrosinase 저해 활성이 크게 나타났다.

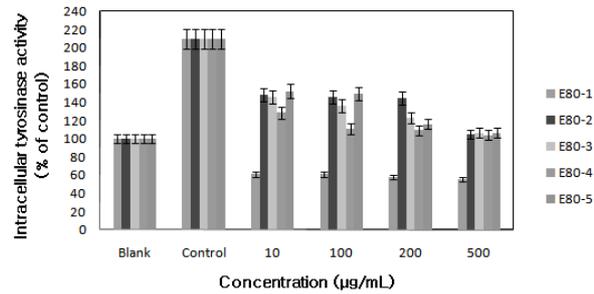


Figure 9. Changes of intracellular tyrosinase activities by 80% ethanol extract obtained from *P. brevitarsis* seulensis. Cells were incubated with presence or absence of α -MSH for 72 h. Then, cells were solubilized and then the tyrosinase activities were measured. Data are expressed as a percentage of the control (α -MSH alone) and presented as the mean of three independent experiments ± S.D. E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

3.7. Melanoma Cell (B16F10)에서의 Melanin 생합성 저해 활성 측정

포제방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 melanoma 세포에서의 melanin 생합성 저해효과를 확인한 결과, Figure 10과 같이 나타났다. 각각의 포제법을 적용한 추출물들은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 감소시켰다. 500 µg/mL 농도에서 포제적용 전 흰점박이꽃무지 추출물의 멜라닌 생합성 저해 효과가 가장 컸으며, 1회 초법, 증법, 3회 초법, 2회 초법 적용 순서로 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냈다.

4. 결 론

동의보감에서 기술된 바 있는 유용 곤충자원 중의 하나인 흰점박이꽃무지는 우리나라에서 약용곤충이로 가장 많이 활용되고 있으며, 한의약적으로 포제 방법에 따라 약성이 변하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 유충을 한의학적 포제방법을 적용하여 추출물을 만들고 이들에 대한 항산화, 항염 및 미백 관련 효능 평가를 함으로써 최적의 포제 방법 및 추출 조건을 도출하였다.

1) 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지의 용매별(80% 에

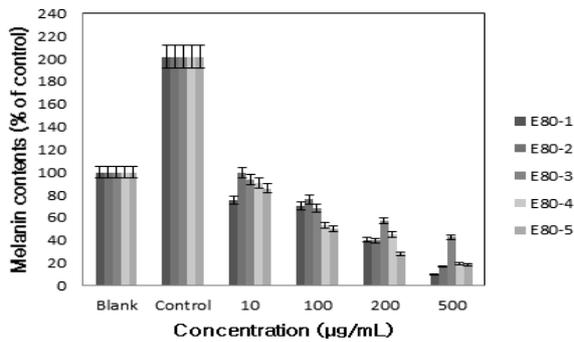


Figure 10. Changes of melanin contents by 80% ethanol extracts obtained from *P. brevitaris* seulensis in B16F10 melanoma cells. Cells were incubated with presence or absence of α -MSH for 72 h. Then, cells were solubilized and measured melanin contents. Data are expressed as a percentage of the control (α -MSH alone) and presented as the mean of three independent experiments \pm S.D. E80-1: 80% ethanol extract of fresh PBS, E80-2: 80% ethanol extract of PBS roasted one time, E80-3: 80% ethanol extract of PBS roasted two times, E80-4: 80% ethanol extract of PBS roasted three times, E80-5: 80% ethanol extract of PBS steamed.

탄올, 50% 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산) 추출물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성에서 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때 각각 85.5, 22.4, 37.0 및 19.4%의 효과를 나타내었으며, 에탄올 80% 추출물에서 85.5%의 높은 효과를 나타내어 양성대조군인 AA-2G (93.3%)와 유사하게 라디칼 소거활성이 큼을 확인하였다. 이후 항산화 활성이 가장 큰 80% 에탄올 추출물을 선정하여 추후 실험에 사용하였다.

- 2) 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지와 포제법을 적용하지 않은 추출물 모두 농도 의존적으로 SOD 유사 활성이 유의적으로 증가하였고, 그중에서 3회 초법 적용 흰점박이꽃무지의 SOD 유사활성(62.9%)이 가장 컸으며, 그 다음으로 증법적용 흰점박이꽃무지 추출물이 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 55.9%로 나타났다.
- 3) 흰점박이꽃무지에 의한 macrophage 및 melanoma 세포의 독성을 MTT assay에 의해 확인한 결과 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 80% 이상의 생존율을 나타내는 낮은 세포 독성을 확인하였다.
- 4) 포제법을 적용하지 않은 군과 포제법을 적용한 추출물 모두 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서도 nitric oxide 합성 저해능이 크게 나타났으며 농도 의존적으로 NO·의 생성을 억제하였다. 증법 적용 흰점박이꽃무지

- 추출물이 가장 높은 NO· 생성 저해효과를 보였고, 1회 초법, 포제법을 적용하지 않은 추출물, 2회 초법, 3회 초법, 증법 순서로 NO· 생성을 저해하였다.
- 5) LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 포제법을 적용한 흰점박이꽃무지 추출물을 처리하였을 때 염증 매개물질이 감소되는 것으로 나타났다. LPS를 단독으로 처리한 양성대조군보다 포제법을 적용한 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 유의적으로 감소함을 관찰할 수 있었다.
 - 6) 포제방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 melanoma 세포에서의 tyrosinase 저해 활성을 측정 한 결과, 포제적용 전 흰점박이꽃무지 추출물이 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 tyrosinase 저해 활성이 가장 크게 나타났다. 포제적용 전 흰점박이꽃무지 추출물은 모든 농도에서 포제법을 적용한 경우보다도 tyrosinase 저해 활성이 크게 나타났다.
 - 7) 포제방법에 따른 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성 저해효과를 확인한 결과, 포제적용 전 흰점박이꽃무지 추출물이 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 멜라닌 생합성 저해능이 가장 높게 나왔고, 1회 초법, 증법, 3회 초법, 2회 초법 적용 순서로 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냈다.

결론적으로, 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 추출물에 있어서 항염활성이 가장 큰 경우의 포제 조건은 증법 적용이었으며, 미백 활성은 포제법을 적용 안했을 때 비교적 크게 나타났다. 전반적으로 흰점박이꽃무지를 대상으로 항산화, 항염 및 미백 활성이 큰 포제 조건을 찾고 표준화시키면 포제전보다도 보다 우수한 효능을 갖는 추출물을 만들 수 있을 것으로 판단되었다. 이는 곤충 추출물도 화장품의 기능성 소재로 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

Reference

1. H. Kawamata, H. Ochiai, N. Mantani, and K.

- Terasawa, Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line, *Am. J. Chin Med.*, **28**(2), 217 (2000).
2. B. G. Lee, S. H. Kim, O. P. Zee, H. Y. Lee, J. W. Han, and H. W. Lee, Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two b-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*, *Eur. J. Pharmacol.*, **406**(3), 301 (2000).
 3. C. F. Nathan and J. B. Hibbs, Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Curr. Opin. Immunol.*, **3**(1), 65 (1991).
 4. B. H. Lee, D. S. Baik, S. U. Yun, J. M. Shin, J. H. Kim, S. Y. Yun, B. H. Kim, S. B. Kim, J. E. Shin, and I. H. Song, Peripheral nitric oxide activity in patients with liver cirrhosis, *Korean J. Med.*, **73**(3), 251 (2007).
 5. M. M. Mu, D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, L. Mori, T. Yoshida, and T. Yokochi, The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells, *J. Endotoxin. Res.*, **7**(6), 431 (2001).
 6. K. Y. Stokes, D. Cooper, A. Taylor, and D. N. Granger, Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**(8), 1026 (2002).
 7. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages, *Phytother. Res.*, **17**(5), 485 (2003).
 8. J. O. Park, J. O. Park, and C. G. Joo, A study on whitening and anti-inflammatory effects of *Eriobotrya japonica* leaf extracts with different extraction methods, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(2), 151 (2015).
 9. X. Jin, X. H. Zhang, and N. C. Zhao, Effects of petroleum ether extract of *Peucedanum praeruptorum* Dunn on rabbit trachea smooth muscles, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **19**(6), 365 (1994).
 10. Y. C. Huang, J. H. Guh, Z. J. Cheng, Y. L. Chang, T. L. Hwang, C. H. Liao, C. C. Tzeng, and C. M. Teng, Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives : involvement of I κ B α stabilization, *Eur. J. Pharmacol.*, **418**(1-2), 133 (2001).
 11. B. A. Gilchrest and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**(1), 35 (1999).
 12. V. J. Hearing and M. Jimenez, Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level, *Pigment Cell Res.*, **2**(2), 75 (1989).
 13. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**(14), 2902 (1991).
 14. T. Kobayashi, W. D. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa, and V. J. Hearing, Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu-to pheomelanogenesis, *J. Cell Sci.*, **108**(6), 2301 (1995).
 15. L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E. K. Kim, Mechanism of skin pigmentation, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **13**(4), 383 (2008).
 16. D. H. Nguyen, D. T. M. Nguyen, L. H. La, S. H. Yang, H. B. Lee, R. J. Kim, J. H. Shin, D. M. Kim, and E. K. Kim, Depigmenting effect of *Cinnamomum cassia* Presl in B16F10 melanoma cells, *Korean J. Chem. Eng.*, **24**(5), 827 (2007).
 17. H. G. Kim and K. H. Kang, Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*, *Korean J. Appl. Entomol.*, **44**(2), 139 (2005).
 18. H. G. Kim and K. H. Kang, Imago's flight and larval activities of *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaedia) and *Allomyrina dichotoma* (Coleoptera : Dynastinae), *Korean J. Appl. Entomol.*, **45**(2), 139 (2006).
 19. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigm. Cell Res.*, **13**(2), 60 (2000).
 20. D. H. Cho, Y. M. Cho, and J. I. Lee, Fruitbody formation of *Cordyceps militaris* in *Allomyrina dichotoma*

- ma* Linnaeus, *Korean J. Plant Res.*, **16**, 1 (2003).
21. H. G. Kim, K. H. Kang, and C. Y. Hwang, Effect of some environmental factors on oviposition and developmental characteristic of *Protaetia brevitarsis* is and *Allomyrina dichotoma*, *Korean J. Appl. Entomol.*, **44**(4), 283 (2005).
 22. H. Y. Park, S. S. Park, H. W. Oh, and J. I. Kim, General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory, *Korean J. Entomol.*, **24**, 1 (1994).
 23. H. C. Lee, S. G. Hwang, Y. K. Kang, H. O. Sohn, J. Y. Moon, H. B. Lim, B. H. Jeon, and D. W. Lee, Influence of *Protaetia brevitarsis* extract on liver damage induced by carbon tetrachloride and ethanol in rats, *Korean J. Life Sci.*, **11**, 405 (2001).
 24. S. Y. Lee, H. J. Moon, S. Kurata, T. Kurama, S. Natori, and B. L. Lee, Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*, *J. Biochem.*, **115**(1), 82 (1994).
 25. S. Y. Lee, H. J. Moon, S. Kurata, S. Natori, and B. L. Lee, Purification and cDNA cloning of antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(8), 1049 (1995).
 26. S. Y. Lee, H. J. Moon, S. Kawabata, S. Kurata, S. Natori, and B. L. Lee, A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia*: purification, sequencing and determination of disulfide pairs, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(3), 457 (1995).
 27. S. Y. Hwang, Y. G. Lee, S. G. Hwang, H. B. Lim, Y. I. Kim, K. H. Jang, B. H. Jeon, D. W. Lee, and H. C. Lee, Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rats, *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.*, **15**, 703 (2001).
 28. H. C. Lee, S. Y. Hwang, S. G. Hwang, B. H. Jeon, and D. W. Lee, Acute oral toxicity of *Protaetia brevitarsis* homogenate in rats, *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.*, **15**, 543 (2001).
 29. W. J. Yoon, J. A. Lee, J. Y. Kim, S. B. Kim, and S. Y. Park, Antioxidant activity and physiological function of the *Anomala albopilosa* extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**(6), 670 (2007).
 30. I. J. Kang, C. K. Chung, S. J. Kim, S. M. Nam, and S. H. Oh, Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in carbon tetrachloride administered rats, *Korean J. Electron Microsc.*, **31**(1), 9 (2001).
 31. Y. C. Yoo, B. H. Shin, J. H. Hong, J. Lee, H. Y. Chee, K. S. Song, and K. B. Lee, Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva, *Arch. Pharm. Res.*, **30**(3), 361 (2007).
 32. H. J. Suh and S. C. Kang, Antioxidant activity of aqueous methanol extracts of *Protaetia brevitarsis* Lewis (*Coleoptera*: Scarabaedia) at different growth stages, *Nat. Prod. Res.*, **26**(6), 510 (2012).
 33. E. S. Lee, Master's Thesis Dissertation, Daegu Haany Univ., Gyeongbuk, Korea (2015).
 34. J. S. Park, S. H. Park, I. S. Oh, Y. N. Chang, K. S. Bang, E. J. Byeon, and J. H. Lee, A comparative study of physiological activity of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer stems and leaves by processing methods, *Korean J. Plant Res.*, **26**(5), 539 (2013).
 35. S. H. Xuan, A. R. Kim, Y. J. Jeong, N. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidant and cellular protective effects of *Moringa oleifera* leaves extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(3), 217 (2016).
 36. E. Y. Yun, Evaluation of pharmacological action and toxicity of insect resources for development as food and medicinal material, *MAFRA*, 85 (2014).