

SHORT COMMUNICATION

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 추출물의 항혈전 효능

최인학 · 유리 · 임연지 · 최규성 · 최성업¹⁾ · 황종익²⁾ · 손진성³⁾ · 정태호*

충부대학교 바이오융합학부, ¹⁾동남보건대학교 식품제약과, ²⁾고려대학교 의과대학,
³⁾HMO Health Dream Agricultural Association Corporation

Antithrombotic Efficacy of *Protaetia brevitarsis* Extract

In-Hag Choi, Ri Yu, Yeon-Ji Lim, Gyu-Sung Choi, Sung-Up Choi¹⁾, Jong-Ik Hwang²⁾,
Jin-Sung Son³⁾, Tae-Ho Chung*

Department of Companion Animal & Animal Resource, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

¹⁾Food and Pharmaceutical Science, Dongnam Health University, Suwon 16328, Korea

²⁾College of Medicines, Korea University, Seoul 02841, Korea

³⁾HMO Health Dream Agricultural Association Corporation, Chungnam 32146, Korea

Abstract

We aimed to evaluate antithrombotic efficacy of *Protaetia brevitarsis* extract during 21 days. Rats (SPF rat, weight 240~260 g) were divided into 16 groups (5 rats per group), they were: control group and *Protaetia brevitarsis* extract groups with dose of 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 500, 750, 1,000 mg/kg kg of body weight. Thromboplastin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPPT) as antithrombotic efficacy were tested in this animal experiment (at 7, 14 and 21 days). Overall, the administration dose of *Protaetia brevitarsis* extract over 50 mg/kg at 7, 14 and 21 days for PT and over 25 mg/kg at 7, 14 and 21 days for aPPT tended to be longer than that of other groups. In addition, the optimal administration doses of *Protaetia brevitarsis* extract to improve antithrombotic efficacy were 75, 100, 200 and 250 mg/kg at 7, 14 and 21 days for PT ($p < 0.05$) and 50 and 100 mg/kg at 7 days, 75 mg/kg at 14 days, or 50, 100, 200 and 250 mg/kg at 21 days for aPPT ($p < 0.05$). It can be concluded that *Protaetia brevitarsis* extract at optimal levels have antithrombotic efficacy.

Key words : Antithrombotic efficacy, *Protaetia brevitarsis* extract, PT, aPPT, Rat

1. 서론

우리나라는 서구화된 식습관과 인구의 고령화에 따라 심혈관계 질환이 급격하게 증가되는 추세에 있다. 이로 인한 심혈관계 질환의 대표적 증상인 혈전증은 내·외인

성 요인에 의해 비정상적으로 혈전이 증가하여 정상 혈류를 방해하여 발생하게 된다(Ryu et al., 2008). 현재 사용되고 있는 혈전질환의 예방과 치료제로는 항혈소판제, 항응고제 및 혈전용해제 등이 있으며, 특히 항혈소판제인 아스피린은 효과가 뛰어나지만 위장관 출혈과 궤양

Received 5 June, 2019; Revised 2 July, 2019;

Accepted 5 July, 2019

*Corresponding author: Tae-Ho, Chung, Department of Companion Animal & Animal Resource, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

Phone: +82-41-750-6283

E-mail: taehochung@daum.net

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

등의 부작용을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Preston et al., 2019). 혈전형성 예방을 위한 연구로는 혈소판의 활성화 및 응고 억제, 혈전의 용해 활성을 가진 천연물 성분에 대한 연구 등이 있다(Preston et al., 2019). 또한 혈전을 치료를 위한 새로운 관점은 곤충을 소재로 한 흰점박이꽃무지를 이용하는 것이다. 예를 들면, 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)는 주로 한국, 일본, 대만, 중국, 유럽에 분포되어 딱정벌레목 꽃무지과로 분류되는 완전변태곤충이다. 예로부터 한의학에서는 흰점박이꽃무지 유충을 굼벵이라 부르며, 간장병, 아구창, 파상풍, 이노작용 등에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Preston et al., 2019). 환경경영관점에서 흰점박이꽃무지는 단백질 풍부하고 불포화 지방산 중 혈압강화작용 및 여러 약리기전이 알려져 있는 oleic acid (omega-6)가 전체지방산 중 60% 이상을 차지한다. 이러한 영양적 특성 때문에 곤충농가의 수익사업으로 적용할 수 있다. 최근에는 식용으로 사용하기에도 문제가 없어서 건강기능식품으로 활용할 수 있다고 하였다(Kang et al., 2012). 현재 한국식품의약품안전청의 생약 데이터베이스에 등록되어 약용으로 이용이 가능하다(Jung et al., 2018). 그러나, 흰점박이꽃무지와 관련된 연구는 산란 및 생육특성, 에탄올 및 사염화탄소의 간 손상에 미치는 흰점박이꽃무지 추출물 예방효과 등이 보고 되어 있지만(Lee et al., 2015), 흰점박이꽃무지 추출물의 항혈전 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 흰쥐에 흰점박이꽃무지 추출물을 농도별로 투여하고 PT와 aPTT를 지표로 활용하여 항혈전 효능을 평가하였다.

2. 연구 방법

본 시험은 중부대학교 중부대학교 동물실험윤리위원회(IACUC-20190406-01-1904 24)의 승인 후 실시되었다. 본 시험에 이용된 실험동물은 무균환경에서 사육된 8주령 수컷 Sprague Dawley rat (SPF rat, weight 240~260 g)를 Samtako Bio(Osan, South Korea)로부터 총 80마리를 구입하였다. Rat(실험동물)은 1주일 동안 환경 적응을 위한 예비 사육과 그 후 3주 동안 사육을 MVCS (Micro Ventilation Cage System, Three Shine Inc., Daejeon, South Korea)에서 실시하였다. 사료와 음수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였고, 사육환경은

온도 22±2℃, 상대습도 50±10%로 유지하여 사육하였다. 처리군은 대조군을 포함하여 굼벵이 추출물 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 500, 750, 1,000 mg/kg 군 총 16처리군 이었다. 각 처리군은 Dawley rat 5마리씩 배치하였다. 충남태안영농조합법인으로부터 공급받은 흰점박이꽃무지의 유충은 어떠한 처리도 하지 않고 1주일 동안 냉동 건조하여 보관하였다. 냉동 건조된 유충들을 분쇄하여 가루형태로 만든 후, 흰점박이꽃무지 유충 분말 3.12 kg을 70% 에탄올 2 L와 3 차 증류수 2 L에 넣어 추출하였다. 이런 과정을 3회 반복하였고, 3겹 거즈와 여과지(Wathman No. 1)를 여과시켜 회수된 에탄올 추출물 총량은 6.55 L이었다. 흰쥐에서 혈액 채취는 7일, 14일 및 21일에 주사기를 이용하여 미정맥에서 실시하였다. 채취한 혈액은 4,500 rpm, 24℃에서 8분간 원심분리 하였다. 항응고 홀더 안에 샘플링 튜브(Chengdu Rich Science Industry Co Ltd., Chengdu, China)를 세팅 후 Sodium citrate 용액 B 50 μl를 첨가하였다. 주사기를 이용하여 채취한 450 μl 혈액을 즉시 항응고제와 혼합하였다. 혼합 혈액은 혈장을 분리하기 위해 3분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 또한 PT, aPTT 측정을 위해 혈장을 2배 희석하였다. 측정기기는 Coagulation Analyzer CG02NV(63-2, Aza Matsunagane, Iwate, Japan)를 이용하였다. Thromboplastin time (PT)시약은 CG series PT for animal (A&T Corporation, Kanagawa, Japan)를 사용하였으며 activated partial thromboplastin time (aPPT)시약은 CG series APTT for animal (A&T Corporation, kanagawa 252-086, Japan)를 사용하였다. 본 실험에서 얻어진 결과의 통계분석은 SPSS-PC+ 통계 package를 이용하여 실험군당 평균(mean)±표준오차(S.E)로 표시하였다. 대조군과 각 흰점박이꽃무지 추출물 투여군과의 상호비교는 Student's t-test를 시행하여 p<0.05에서 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

흰점박이꽃무지 추출물 투여에 따른 혈행 개선 여부를 평가하기 위해 혈액 응고 시스템의 PT와 aPTT를 측정된 결과를 Table 1과 2에 나타내었다. Prothrombin (PT)의 경우, 전체적으로 대조군과 저농도 흰점박이꽃무지

Table 1. Effect of *Protaetia brevitarsis* extract on prothrombin (PT) time (sec)

Day	C ¹	<i>Protaetia brevitarsis</i> extract (mg/kg)													
		0.1	0.5	1	2.5	5	10	25	50	75	100	200	250	500	750
7	12.1± 0.07	12.7± 0.57	12.4± 0.78	12.7± 0.92	12.9± 0.85	12.9± 0.00	12.9± 0.64	13.3± 1.91	14.0± 0.78*	15.4± 0.57**	15.6± 0.14*	15.6± 0.35*	15.5± 1.91	15.5± 7.85	15.7± 1.95
	13.1± 1.20	13.3± 0.57	13.0± 1.56	13.5± 0.14	13.3± 4.10	13.3± 0.21	13.0± 0.57	13.2± 0.64	13.0± 0.64*	14.7± 0.35*	15.2± 0.00*	15.6± 0.35**	15.4± 0.14	15.5± 0.00	15.4± 0.49
21	12.5± 1.56	12.9± 0.28	12.7± 0.49	12.9± 0.57	12.6± 0.28	12.6± 0.07	13.2± 0.21	13.4± 15.56	13.1± 0.14*	14.65± 1.91*	14.7± 2.69*	14.7± 1.84*	15.4± 0.07	15.2± 0.28	15.4± 0.57

¹C: Control group.

* p<0.05.

** p<0.01.

Table 2. Effect of *Protaetia brevitarsis* extract on activated partial thromboplastin time (aPTT) time (sec)

Day	C ¹	<i>Protaetia brevitarsis</i> extract (mg/kg)													
		0.1	0.5	1	2.5	5	10	25	50	75	100	200	250	500	750
7	13.7± 4.24	12.2± 1.91	10.7± 1.70	11.9± 4.24	14.7± 3.04	11.9± 0.42	14.7± 2.90	22.3± 1.91*	23.7± 4.24	21.9± 3.04*	22.3± 0.28	20.4± 1.34	19.3± 6.79	22.3± 15.56	20.7± 10.39
	10.7± 1.70	9.7± 3.11	12.9± 7.64	12.4± 0.99	13.3± 2.53	13.6± 1.70	14.3± 0.99	18.4± 0.42	19.5± 2.76*	20.4± 3.11	20.8± 0.71	19.9± 1.70	19.0± 0.28	19.3± 0.28	18.4± 2.19
21	12.8± 2.69	10.7± 0.99	11.0± 0.42	12.1± 3.11	10.7± 0.64	12.9± 1.20	13.7± 2.69	15.6± 0.42*	18.6± 2.62	19.4± 3.11*	20.2± 0.42*	19.6± 1.70*	19.2± 9.12	20.6± 0.71	20.2± 7.71

¹C: Control group.

* p<0.05.

추출물 투여군에 비해 흰점박이꽃무지 추출물 투여군 50 mg/kg 이상에서 연장되는 경향을 보였다(Table 1). 통계적 유의성은 공통적으로 7일, 14일 그리고 24일에서 흰점박이꽃무지 추출물 75, 100, 200 및 250 mg/kg 투여군에서 인정되었다($p < 0.05$ or 0.01). 이러한 결과는 흰점박이꽃무지 추출물 75~250 mg/kg 투여 농도가 혈액 응고를 지연시켜 혈행 장애 개선에 기여할 가능성이 있음을 시사한다. 나머지 투여군에서는 큰 영향을 주지 않았다.

aPTT 분석 결과(Table 2), 모든 투여군간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 7일에서는 흰점박이꽃무지 추출물 50과 100 mg/kg 투여군, 14일은 75 mg/kg 투여군 그리고 21일의 경우 50, 100, 200 및 250 mg/kg 투여군에서 통계적인 차이를 보여주는 것이 확인되어($p < 0.05$), 50 mg/kg 투여농도 이상에서 aPPT값의 연장효과가 plateau 구간이 형성되는 것으로 확인되었다. 이는 대체로 흰점박이꽃무지 추출물이 50~75 mg/kg 투여 7일차부터 지속적인 혈전형성 지연 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. PT의 결과와 마찬가지로 aPTT의 혈행 장애 개선에 적절한 투여량은 흰점박이꽃무지 추출물 50~100 mg/kg 범위로 짐작 가능하다. 또한, 통계적 유의성과 상관 없이 aPTT는 7일, 14일 및 21일에서 나타난 결과를 볼 때 대조군과 비교하면 흰점박이꽃무지 추출물 25 mg/kg 투여군에서도 혈전형성이 지연될 수 있는 가능성을 보여주었다. 일반적으로 PT와 aPTT는 혈액개선 평가를 위한 혈액 응고 지표로 제시되고 있다(Chung et al., 2011). PT는 외인성 응고계(extrinsic pathway)의 선별검사를 위해 Ca^{2+} 이 포함된 tissue-thromboplastin을 혈장에 넣어 응고 인자의 농도와 기능을 평가하는 방법이지만, aPTT는 내인성 응고계(intrinsic pathway)의 전반적인 기능 즉 응고기전의 전체적인 선별 검사로 알려져 있다(Chung et al., 2011). 본 연구에서 PT와 aPTT의 결과로 볼 때 흰점박이꽃무지 추출물의 적정 투여량을 찾았다는 점은 항혈전 효능이 있음을 보여주는 증거이다. 다른 이유로는 흰점박이꽃무지가 가지고 있는 항산화 활성과 흰점박이꽃무지로부터 분리된 인돌 알칼로이드(indole alkaloids) 성분이 혈행 개선 효과에 기여할 수 있을 가능성이 있다(Lee et al., 2017a ; Lee et al., 2017). Lee et al. (2017)에 의하면 흰점박이꽃무지로부터 분리된 인돌 알칼로이드는 다

섯개의 화합물로 구성이 되는데 화합물 1(5-hydroxy yindolin-2-one)과 2((1R,3S)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-b-carbo line-3-carboxylic acid)가 항혈전과 항혈소판 활성화 억제에 가장 중요한 역할을 한다고 하였다.

4. 결론

흰쥐에 흰점박이꽃무지 추출물을 농도별로 투여하고 PT와 aPTT를 지표로 활용한 항혈전 효능을 평가하였다. PT의 경우, 7일과 14일 그리고 24일에서 흰점박이꽃무지 추출물 75, 100, 200 및 250 mg/kg 투여군에서 혈행 장애 개선에 큰 영향을 주는 것을 확인하였다. aPPT는 7일에서 흰점박이꽃무지 추출물 50과 100 mg/kg 투여군, 14일은 75 mg/kg 투여군 및 21일의 경우 50, 100, 200 및 250 mg/kg 투여군에서 항혈전 효능에 크게 영향을 주었다. 따라서 흰쥐에 흰점박이꽃무지 추출물의 농도별로 투여 결과는 혈압강화작용 및 여러 약리기전이 알려져 있는 건강기능식품으로 활용할 수 있다는 환경영양관점의 실증적 근거가 될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

REFERENCES

- Chung, H. K., Shin, M. J., Cha, Y. J., Lee, K. H., 2011, Effect of onion peel extracts on blood lipid profile and blood coagulation in high fat fed SD Rats, Korean J. Food. Nutr., 24, 442-450.
- Jung, Y. J., Seo, Y. R., Kim, S. E., Kim, M. H., Hwang, J. H., Lee, J. Y., Park, J. K., 2018, "A Study on the biodiversity of Gyeongcheonseom island near the Sangju dam at Nakdong river, In Proceeding Korean Society Of Applied Entomology, 372-373.
- Kang, M. C., Kang, C. G., Lee, H. K., Kim, E. K., Kim, J. S., Kwon, O. S., Lee, H. K., Kang, H. J., Kim, C. H., Jang, H. S., 2012, Effects of fermented aloe vera mixed diet on larval growth of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe)(coleopteran: Cetoniidae) and protective effects

- of its extract against CCl₄ induced hepatotoxicity in Sprague - Dawley rats, *Entomol res.*, 42, 111-121.
- Lee, H. S., Ryu, H. J., Song, H. J., Lee, S. O., 2017a, Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Protaetia brevitarsis* larvae, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, 46, 1164-1170.
- Lee, J. E., Lee, A. J., Jo, D. E., Cho, J. H., Youn, K. J., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Jun, M. R., Kang, B. H., 2015, Cytotoxic effects of *Tenebrio molitor* larval extracts against hepatocellular carcinoma, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, 44, 200-207.
- Lee, J. I., Lee, W. H., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M. K., Bae, J. S., 2017, Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe), *J. Cell. Mol. Med.*, 21, 1217-1227.
- Preston, R. J. S., O'Sullivan, J. M., O'Donnell, J. S., 2019, Advances in understanding the molecular mechanisms of venous thrombosis, *Br. J. Haematol.*, 186, 13-23
- Ryu, H. Y., Heo, J. C., Hwang, J. S., Kang, S. W., Yun, C. Y., Lee, S. H., Sohn, H. Y., 2008, Screening of Thrombin Inhibitor and its DPPH Radical Scavenging Activity from Wild Insects, *J. Life. Sci.*, 18, 363-368.
-
- 최인학, 중부대학교 바이오융합학부 교수
wicw@chol.com
 - 유리, 중부대학교 바이오융합학부 학생연구원
kimfiizz97@gmail.com
 - 임연지, 중부대학교 바이오융합학부 학생연구원
fhfostlsghk@naver.com
 - 최규성, 중부대학교 바이오융합학부 학생연구원
kyusung324@naver.com
 - 최성업, 동남보건대학교 식품제약과 교수
cmax@dongnam.ac.kr
 - 황중익, 고려대학교 의과대학 교수
hjibio@korea.ac.kr
 - 손진성, HMO Health Agricultural Association Corporation
대표 songo2@hanmail.net
 - 정태호, 중부대학교 바이오융합학부 교수
taehochung@joongbu.ac.kr