



쌍별귀뚜라미의 용매분획별 항산화 활성과 피부세포주 보호 효과

김 경 · 오윤신*
을지대학교 식품영양학과

The Antioxidant Activity and Protective Effects on Skin Cell Lines of Solvent Fractions from *Gryllus bimaculatus*

Kyong Kim, Yoon Sin Oh*
Department of Food and Nutrition, Eulji University

ABSTRACT

Oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) is a key mechanism of skin aging, and the use of antioxidants is an effective strategy to prevent the symptoms associated with ROS-induced skin aging. The components rich in polyphenolic compounds with antioxidative activity were identified by fractionating an aqueous ethanolic extract of *Gryllus bimaculatus* (AE-GBE) using solvent using hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water. Their ability to migrate H₂O₂-induced oxidative stress in human dermal fibroblasts (HDFs) was then evaluated. The butanol fraction of AE-GBE had the highest polyphenol content and antioxidant effect, followed by the ethyl acetate and water fractions, suggesting that the likely antioxidant components are polar components. Furthermore, the butanol, ethyl acetate, and water fractions effectively reduced intracellular ROS production and DNA damage in HDF cells caused by H₂O₂. Overall, these findings suggest that the butanol fraction of AE-GBE shows promise as a natural insect-derived antioxidant material, capable of suppressing oxidative stress by showing a stronger antioxidant effect under H₂O₂ stimulation than the other fractions.

Key Words : Edible insect, *gryllus bimaculatus*, solvent fraction, oxidative stress, antioxidant

1. 서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 생체 내의 불안정한 산소를 지칭하며 비라디칼종인 ¹O₂, H₂O₂와 라디칼종인 O₂^{•-}, •OH과 생체 성분과 활성산소종과의 반응에서 유래된 ROO•, RO•, ROOH 및 HOCl 등을 일컫는다. 활성산소는 피부세포 및 조직 손상을 주도하며 항산화 방어체계를 파괴함으로써 산화제와 항산화제 사이의 균형을 산화상태로 만든다. 계속된 비정상적 반응으로 생성된 과잉의 활성산소종은 노폐물, 염증 등을 만들어 내고 이로 인해 노화 촉진, 암, 만성염증 등의 발생 원인이 된다(Beckman et al. 1988; Frippiat et al. 2001). 특히 피부의 항산화 방어시스템의 불균형은 피부노화를 빠르게 진행시키며(Rittié & Fisher 2002; Mukherjee et al. 2006) 피부 가교 및 재생 역할을 하는 콜라겐 및 엘라스틴 등과 같은 세포외 기질 단백질(Extracellular matrix, ECM)의 손상 및 파괴를 유도한다. 우리 몸은 활성산소를 제거하는 항산화 효소가 자체적으로 생산되지만 20대에 비해 40대에서 50% 감소하며 60대에서는

90%까지 감소하는 것으로 보고된다(Remacle et al. 1992; Rizvi & Maurya 2007). 따라서 노화나 질병에 따른 항산화 효소의 적절한 관리를 위해 항산화 물질의 보충을 강조하고 있는 것이다. 주로 식이로 공급되는 항산화물질로는 비타민 A·E·C와 폴리페놀, 베타카로틴, 안토시아닌, 코엔자임 Q10, 글루타치온, 알파리포산 등이 있지만 체내에서 빠르게 소멸되기 때문에 식품으로 꾸준히 섭취해야하는 번거로움이 있다. 그리고 천연 항산화 물질이 활성산소에 의한 손상을 줄여주는데 반해 합성 항산화제는 과량 사용 시 몸에 남아 또 다른 산화물질을 바꾸는 작용을 해 발암성 물질로서 세포를 공격하는 독성을 나타낼 수 있다는 보고가 있어 사용에 있어 주의가 필요하다. 그리하여 오래전부터 식품이나 천연물에서 유래한 항산화제에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Branen 1975; Farag et al. 1989; Lee et al. 2011). 현재 까지 알려진 천연 항산화물질은 주로 식물의 색소성분들인 파이토케미컬을 중심으로 항산화, 항염증, 항암 및 항균 활성에 관한 연구가 대부분이다(Osborn-Barnes & Akoh 2003; Działo et al. 2016).

*Corresponding author: Yoon Sin Oh, Department of Food and Nutrition, Eulji University, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam, 13135, Korea
Tel: +82-31-740-7287 Fax: +82-31-740-7370 E-mail: ysoh@eulji.ac.kr

메뚜기목 귀뚜라미과(*Gryllidae*)에 속하는 아열대성 곤충인 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 ‘쌍별이’라는 애칭을 가진다. 쌍별귀뚜라미는 식용곤충 대상으로 승인되었으며, 세계적으로 식용곤충 붐이 일면서 쌍별귀뚜라미를 이용한 다양한 식용방법 및 기능성 보조제로서 활용가치가 높게 평가되고 있다(Ahn et al. 2015). 쌍별귀뚜라미는 3대 영양소 및 비타민을 보유하며, 특히 글루타치온(Glutathion)이 풍부해 알코올 해독을 돕는 식용 곤충으로 알려졌다(Park & Yun 2018). 현재까지 보고된 쌍별귀뚜라미의 약리학적 효과로는 관절염 개선, 항산화 및 항당뇨 효과, 간 기능 개선, 면역조절, 항광노화 등이 있다(Ahn et al. 2015; Chong et al. 2017; Hwang et al. 2019; Han 2021; Lim & Byun 2021).

곤충유래 추출물로부터 항산화 활성 효능에 대한 연구도 꾸준히 보고되고 있다. 식용으로 가능한 누에나방의 유충(*Bombyx mori*)은 다수의 연구에서 항산화 활성이 보고되었으며 (Liu et al. 2018; Wu et al. 2021), 장수풍뎡이 유충(*Allomyrina dichotoma* larvae) 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효능을 통해 광노화에 대한 항노화 소재로서 활용성을 검증하였다(Kim et al. 2024b).

쌍별귀뚜라미는 영양학적 가치뿐만 아니라 높은 항산화 효과로 코스메틱소재로서의 활용가능성에 대해서도 주목하고 있다(Kim et al. 2020). 최근 우리는 70% 에탄올 쌍별귀뚜라미 추출물이 미세먼지에 의한 피부의 염증반응을 완화하며 MMP 발현을 억제하여 콜라겐 생합성을 촉진할 수 있는 피부 항염증노화(anti-inflammaging) 소재로서의 가능성을 제시한 바 있다(Kim et al. 2023). 이에 본 연구는 쌍별귀뚜라미 용매 분획화별(solvent partition) 성분을 이용하여 항산화 기능을 중심으로 피부노화를 지연 및 예방하는 데에 어느 정도의 효능을 가지고 있는지를 고찰하여 피부노화에 대한 천연 항산화제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 시약

본 연구에 사용된 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 경상북도 예천군에 위치한 예천곤충마을에서 제공받아 사용하였다. 시료 추출에 사용된 Ethanol, Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, n-butanol은 모두 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)의 분석 등급(EMSURE, 순도 99%)을 사용하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), 1X Trypsin-EDTA solution, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 및 penicillin streptomycin은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하였고 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입했다 Folin-Ciocalteu's reagent, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 2',7'-dichloro

dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, USA)에서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Duchefa (Biochemie BV, Haarlem, Netherlands)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. AE-GBE 조 추출물의 조제 및 용매 분획(Solvent partition)

AE-GBE (aqueous ethanolic-*Gryllus bimaculatus* extract) 시료 추출 방법은 이전 연구 방법과 같다(Kim K et al. 2023). 유기용매 분획물의 제조는 AE-GBE를 10배량의 증류수에 용해 후 동량의 분획용 헥산(n-hexane), 클로로포름(CHCl₃), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(n-butanol)의 용매의 극성을 이용하여 순차적으로 추출하여 분획물을 얻고 모든 과정은 2-3회 반복 시행하였다. 용매 분획한 시료는 여과 후 농축 및 동결건조하여 4°C 이하로 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 총 페놀 함량 및 항산화 활성 측정

총 폴리페놀 함량 분석은 Folin-Ciocalteu 방법을 활용하여 측정하였다(Ainsworth & Gillespie KM 2007). 정량을 위한 표준 검정 곡선은 gallic acid를 사용하였다. 5 mg/mL 농도의 시료와 0.005-1 mg/mL 범위의 희석한 gallic acid 표준 용액을 100 μL씩 취한 후 Folin-Ciocalteu's phenol 시약 100 μL를 혼합한 후 암실에서 30분 동안 반응시키고 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE)인 mg으로 환산하여 총 폴리페놀 함량을 구하였다. DPPH free radical 소거능 측정은 Blois의 방법을 응용하여 측정하였다(Blois 1958). 메탄올 용액에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180 μL와 1, 5, 10 mg/mL의 농도로 용해한 추출물 20 μL를 혼합 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 vitamin C는 양성 대조군으로 사용하여 비교 실험하였다. 각 용액의 radical 소거능은 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었으며 각 시료의 radical 소거능 백분율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = 100 - (\text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

4. 세포 배양

Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal (HDFn, ATCC PCS-201-010)은 신생아 포피에서 분리한 세포주로 병원균, 피부 노화, 상처 치유, 유전자 전달 및 경과 증을 포함한 피부 질환에 사용된다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM에서 증식 및 유지하였다. 배양 배지는 3일마다 교체하고 세포가 80-90%에 도달하면 계대 배양하였다.

5. 세포 생존도 측정

시료의 세포 독성 평가는 MTT 시약을 이용하여 측정하였다(Vistica et al. 1991). 96 well plate (SPL Lifesciences, Gyeonggi, Korea)에 1.0×10^4 cell/well의 농도로 HDF 세포를 24시간 부착시킨 후 10-1000 mg/mL 사이의 6 개의 농도로 24시간 처리하였다. 산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과도 위와 같은 양의 HDF세포를 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤 시료를 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 1 mM H_2O_2 를 2시간 처리하였다. 반응 종료 후 DPBS로 2회 세척한 후 0.5 mg/mL MTT 시약을 100 L씩 분취하고 2시간 배양한 후 반응액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 녹이기 위해 2-propanol을 동량(100 mL) 첨가한 후 560 nm에서 흡광도(TECAN Group Ltd, Shanghai, China)를 측정하였다.

6. 세포 내 활성산소 측정

산화스트레스 유도 후 세포 내 활성산소의 분석을 위해 산화 환원에 민감한 형광 탐침 DCFH-DA를 사용하였다(Kim et al. 2024a). HDF 세포를 96-well black with clear flat bottom plate (Corning, Corning, NY, USA)에 2.0×10^4 cells/well의 농도로 분주 후 24시간 부착 후 시료를 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 1 mM H_2O_2 를 2시간 처리하였다. 세포는 DPBS로 3회 세척과정을 거친 뒤 10 μM DCFH-DA로 처리한 후 빛을 차단하고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 ex. 485 nm, em. 530 nm 파장의 fluorescent microplate reader (TECAN Group Ltd, Shanghai, China)를 사용하여 세포내 형광값을 측정하였다.

7. ELISA assay

HDF세포를 6 well plate에 5.0×10^5 cells의 농도로 분주하여 24시간 안정화 후 제시된 농도로 시료를 24시간 동안 처리하고 1 mM H_2O_2 를 2시간 처리하여 산화스트레스를 유발시켰다. DPBS로 세척 후 세포는 1× trypsin-EDTA 처리로 분리하고 세척한 후 세포에 200 μL 의 lysis buffer를 첨가하여 상온에서 30 min간 반응시킨 후 원심분리하였다. 상층액의 Cytoplasmic histone-associated DNA fragments는 사멸한 세포의 정량화를 위해 Cell death detection ELISA plus kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 분석하였다. 추출된 세포질 분획은 제조사의 방법에 따라 처리하였으며 상층액 20 μL 를 streptavidin이 코팅된 96 well plate에 옮기고 제시된 방법에 따라 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모

든 실험값은 mean±standard deviation (SD)로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 20.0 소프트웨어(IBM SPSS ver. 20.0.0 for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였다. 실험의 유의성은 일원 분산 분석(ANOVA)으로 검증하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)과 student's t test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 분석하였다. 항산화 활성과 페놀 함량 간의 상관관계는 피어슨 상관 계수를 계산하여 결정했다.

III. 결과 및 고찰

1. AE-GBE의 용매 분획별 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거 활성

70% 에탄올로 추출된 쌍별귀뚜라미 추출물(AE-GBE)을 이용하여 항산화 활성 성분을 파악하기 위해 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 분획화를 실시한 후, AE-GBE 및 그 용매별 분획물의 총 폴리페놀 함량과 항산화능을 평가하였다. <Table 1>에 표시한대로, AE-GBE 분획물의 총 폴리페놀 함량(mg GAE/g ex.)은 21.78 mg GAE/g이었으며 부탄올 분획물이 32.87 mg GAE/g으로 1.51배 높게 나타났고 물 분획물이 26.12 mg GAE/g순으로 나타났다. 다음으로 용매 분획물의 항산화 효과를 DPPH radical scavenging 활성의 IC_{50} 값(mg/mL)으로 비교한 결과 부탄올>에틸아세테이트>물 분획물 순서로 나타났다. 총 폴리페놀함량이 가장 높게 나타났었던 부탄올 분획에서 0.22 mg/mL의 IC_{50} 값으로 DPPH radical 소거능이 가장 높게 나타남에 따라 항산화 활성과 폴리페놀 함량 간의 상관관계가 높음을 확인할 수 있었으며 피어슨 상관계수(Pearson's correlation)로 나타난 결과 $r=0.809$ ($p < 0.05$)로 나타났다. AE-GBE의 용매별 분획화 결과를 통해, 항산화 활성을 가진 폴리페놀 성분은 비극성보다는 극성에 가까운 물질로 추정할 수 있으며 특히 부탄올 분획물의 항산화능의 IC_{50} 값은 조 추출물인 AE-GBE의 IC_{50} 값의 23배에 해당하는 수치이며 양성 대조군으로 사용된 대표적 항산화물질인 Vit. C의 IC_{50} 값의 1/5 수준으로 비교적 높은 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있다. 폴리페놀 화합물은 식물계의 2차대사산물로서 phenolic hydroxyl기를 가지므로 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합하여 산화 환원 반응 시 기질로 작용하여 다양한 생리활성을 나타내는 천연 항산화제로써 작용한다(Manach et al. 2005).

곤충류는 주로 식물을 먹이로 삼는 식식성(食植性, Phytophagous)으로 대사에 의해 페놀성 화합물이 합성되며 탈피, 경화 과정 중에도 생성이 된다고 보고된다(Nino et al. 2021).

장 등(2019)은 최근 한국에서 식품으로 허가된 4종의 식용 곤충 *Protaetia brevitarsis* 유충, *Allomyrina dichotoma* 유충, *Gryllus bimaculatus* 및 *Tenebrio molitor* 유충의 단백질 가수분해물의 5가지 다른 항산화 능력을 비교하였고 그

<Table 1> Total phenolic content and DPPH scavenging activity of the crude extract and solvent fractions from aqueous ethanolic *Gryllus bimaculatus* extract (AE-GBE)

Material	Total phenolics [†] (mg GAE/g of extract)	DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ [‡] (mg/mL)	Pearson's <i>r</i> [※]
AE-GBE (crude extract)	21.78±0.10 ^{bc}	5.06±0.19 ^c	0.809
- <i>n</i> -hexane fr.	3.10±0.16 ^d	14.61±0.30 ^b	
- chloroform fr.	5.06±0.16 ^d	25.98±0.69 ^a	
- ethyl acetate fr.	15.61±0.04 ^c	0.27±0.11 ^d	
- <i>n</i> -butanol fr.	32.87±2.30 ^a	0.22±0.04 ^d	
- water fr.	26.12±0.16 ^b	0.71±0.07 ^d	
vitamin C	-	0.04±0.00	

[†]Expressed as mg of gallic acid equiv/g of dry weight of residue.

[‡]Concentration of extract residue required to inhibit 50% of the control calculated from linear regression equation in semilogarithmic manner.

[※]Pearson's correlation analysis between total phenolic content and antioxidant activity of solvent fractions of ADLE measured by DPPH method. Each data value is mean±SD of three replicate experiments. The all data were analyzed statistically through Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

결과 *Gryllus bimaculatus* 가수분해물이 다른 식용곤충에 비해 높은 수준의 항산화 능력을 보임을 확인하였다(Jang et al. 2019). 선행된 연구결과에 따르면 쌍별귀뚜라미를 포함한 식용 곤충은 항라디칼 활성을 포함하여 금속 이온의 킬레이트화 능력과 환원력 억제 능력으로 항산화 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(Zielińska et al. 2017). 쌍별귀뚜라미의 경우, 분말과 분말 단백질 추출물에서 항산화 효능을 보이는 폴리페놀 함량이 식물성 더덕이나 당근만큼 풍부하며, 시스테인, 글루타티온, 방향족 아민, 아스포르브산 등이 풍부하여 DPPH 라디칼 소거능을 보임을 보고한 바 있다(Kim et al. 2020). 구 등의 연구에서는 쌍별귀뚜라미를 증류수와 이온화 칼슘 수용액으로 추출하여 항산화 활성을 평가하였을 때, 농도 의존적으로 항산화 활성을 나타내었으며, 에탄올로 유도한 간세포 독성을 억제시키는 결과를 보고하였다(Ku & Kim 2023). Di Mattia et al. (2019)은 매뚜기, 누에, 귀뚜라미에서 추출된 수용성 성분이 오렌지 주스의 5배에 해당하는 항산화능을 가진다고 발표했으며 곤충의 폴리페놀 함량에 비해 항산화능이 높게 평가되는데 이것은 곤충의 폴리페놀 성분 이외의 다른 물질에 기인할 수 있다고 추정하고 있다.

우리의 결과에서는 AE-GBE의 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 용매 분획물에서 비교적 높은 폴리페놀 함량과 함께 항산화 효과를 보임으로써 *Gryllus bimaculatus*의 항산화물질은 비교적 극성성분일 가능성을 제시하는 바이다.

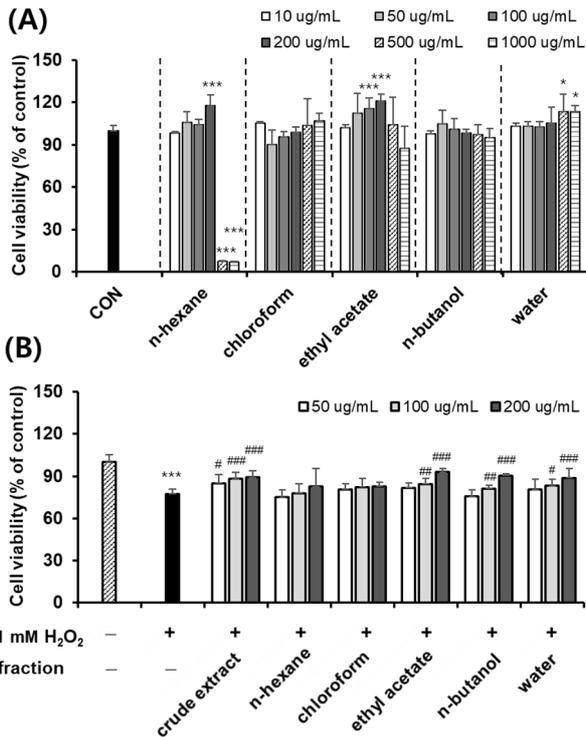
2. AE-GBE 용매별 분획물의 산화스트레스에 의한 세포독성 보호 효과

우리는 선행연구에서 HDF 세포에 AE-GBE 조추출물(crude extract)를 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 mg/mL의 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인하였을 때 세포독성은 없는 것으로 확인한 바 있다(Kim et al. 2023). 같은 농도 조건에서 5가지 용매분획물을 이용하여 세포독성을

조사한 결과, 핵산 분획물 500 mg/mL 이상의 농도 및 에틸아세테이트 분획물 1,000 mg/mL에서 세포독성을 가지는 것을 제외하고는 나머지는 농도 범위에서 독성은 나타나지 않았다(Figure 1A). 일부 용매 분획물의 처리가 세포의 증식을 촉진시키는 현상을 확인하였으며 이는 쌍별귀뚜라미의 풍부한 영양 성분에 기인하는 것으로 예상할 수 있다(Kim et al. 2020).

산화스트레스 조건은 Park 등의 보고를 참고하여 1 mM H₂O₂ 농도로 유도하였다(Park et al. 2019). <Figure 1B>에서 제시된 결과와 같이 H₂O₂로 유도한 산화 스트레스는 HDF 세포생존율을 약 22.6% ($p<0.001$ vs. CON) 저해하였다. 산화스트레스 세포 독성에 대한 AE-GBE 및 분획물의 보호 효과를 평가하기 위해 세포 독성을 나타내지 않으며 세포 증식에도 영향이 없는 농도인 50, 100, 200 mg/mL의 농도로 24시간 전 처리 후에 H₂O₂로 2시간 동안 스트레스 유도를 하였다. 그 결과 AE-GBE는 1 mM H₂O₂ 단독 처리군에 비해 세포 생존력을 50, 100, 200 mg/mL의 농도에서 각각 34.3% ($p<0.05$), 46.8% ($p<0.001$), 51.4% ($p<0.001$)로 나타났으며 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물은 농도 의존적(dose-dependent)으로 산화스트레스에 대한 세포보호효과를 보였다. 최근 Kim et al. (2024a)의 연구에서도 예쁜 꼬마선충을 모델로 쌍별귀뚜라미 용매추출물과 분획물에 대한 항산화 활성을 연구한 결과, 에틸아세테이트 분획물이 가장 우수한 항산화 효과를 나타냄을 보고하였다.

우리의 연구결과에서는 폴리페놀 함량은 부탄올 분획물이 가장 높았지만 항산화 활성은 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물 사이에 통계적 유의차가 없었다. 그리고 100, 200 mg/mL농도에서 HDF세포에 대한 세포증식 촉진효과와 함께, 스트레스 자극(H₂O₂)에 대한 세포생존율에서도 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물에서 비슷한 세포보호 효과를 나타내었다.

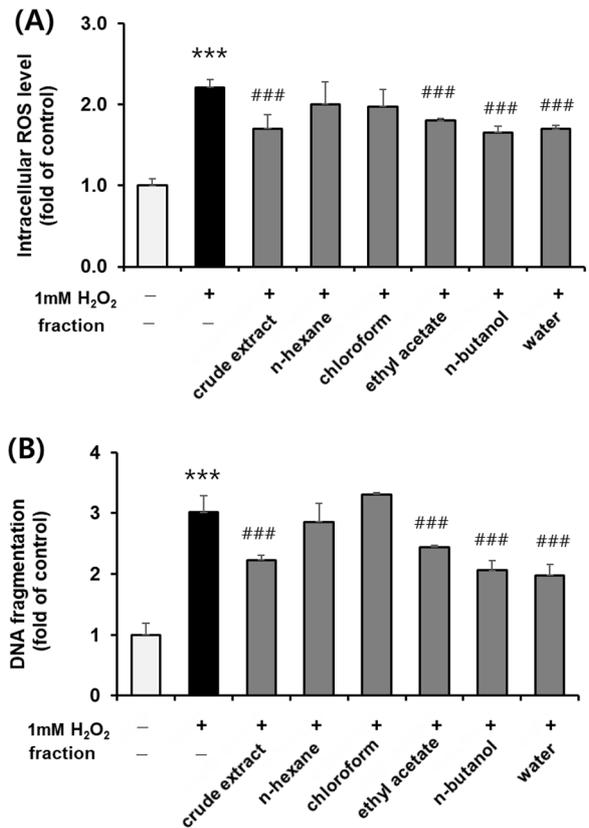


<Figure 1> The protective effect of AE-GBE fractions by solvent against oxidative stress-induced cytotoxicity in HDF cells.

(A) Cytotoxicity of AE-GBE and its solvent partition on HDF cells. HDF cells were treated with different concentrations of six points (10~1000 µg/mL). (B) Effect of AE-GBE and its solvent fractions on the hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in HDF cells. Cell viability was evaluated using MTT assay. The bar graph represents the mean±SD of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed, with *p<0.05 and ***p<0.001 indicating significant differences from the untreated control (CON), and #p<0.05, ###p<0.01, and ####p<0.001 indicating significant differences from the H₂O₂ treated only.

3. AE-GBE 분획물의 산화스트레스 유도에 대한 Intracellular ROS 소거 활성 및 DNA 손상 저해 효과

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포 내 활성 산소와 반응해 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 AE-GBE 및 용매별 분획물이 HDF 세포내 활성 산소종(ROS) 생성에 미치는 영향을 측정했다. <Figure 2A>에서와 같이 1 mM H₂O₂로 처리된 세포는 대조군과 비교하여 ROS 생성이 220% (p<0.001) 증가하였으며 AE-GBE 처리에 의해 42.0% (p<0.001) 유의하게 감소하였고 에틸아세테이트, n-부탄올, 물 분획물에서 각각 34.0% (p<0.001), 46.0% (p<0.001), 42.4% (p<0.001)의 ROS생성의 감소를 확인하였다. 이 결과는 앞선 <Table 1>의 폴리페놀 함량과 DPPH 소거능에 의한 항산화능 효과와 관련성이 있음을 알 수 있다. 과산화수소(H₂O₂)는 세포의 성장과 소멸 그리고 노화 등에 중요한 요소이나 산화적 스트레스에 의한 세포손상을 유발하는 대표적 인자 중 하나이다. 피부세포에 H₂O₂를



<Figure 2> Effect of AE-GBE and its solvent fractions on intracellular ROS production and DNA damage.

HDF cells were pretreated with AE-GBE and its solvent fractions at 100 µg/ml for 24 h, and then exposed to 1mM H₂O₂ for another 2 h. Cells were exposed to H₂DCFDA for 30 min. Treated cells were collected and DCF fluorescence was measured by fluore-spectrophotometer (A). The degree of DNA damage was analyzed using the Cell Death Detection ELISA kit (B). Data presented are the mean±SD (n=3-5). Statistical analysis was performed, with ***p<0.001 indicating significant differences from the untreated control (CON), and ###p<0.001 indicating significant differences from the H₂O₂ treated only.

처리한 경우 세포 내 높은 라디칼 농도를 유지하여 단백질 또는 DNA에 손상을 주게 되며 이는 세포외막, 세포내 구조 단백질, DNA를 산화시켜 구조적 변화로 인한 손상을 유발함으로써 세포사를 유도한다(Seifried et al. 2007). AE-GBE 및 그 용매 분획물이 HDF세포에서 산화적 스트레스에 의해 증가된 라디칼을 잠정적으로 소거함을 <Figure 2A>로부터 확인하였다. 또한 H₂O₂에 의해 일어나는 DNA 단편화(DNA fragmentation) 정도에 대한 AE-GBE 및 그 분획물들의 억제효과를 측정된 결과<Figure 2B>, 1 mM H₂O₂ 처리로 3.0 배 정도 증가(p<0.001)되었던 수치는 AE-GBE 처리에 의해 2.2배 정도로 낮아졌으며 이는 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 약 39.0% (p<0.001)억제되는 결과이다. 또한 수용성 성분의 극성 분획물인 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물에서 28.2, 47.12, 51.5%의 유의미한 DNA 단편화 억제효과를 보였다.

항산화제와 아미노산은 상호 연관되어 있으며, 펩타이드에 존재하는 유리 아미노산(예, 히스티딘, 아르기닌 및 라이신)은 산화를 유발하는 자유 라디칼을 억제할 수 있음이 보고되었다(Xia et al. 2012). Fashakin et al. (2023)의 결과에서는 쌍별귀뚜라미의 글루텔린 가수분해물이 가장 높은 항산화활성을 나타내었고, 아미노산 서열 분석결과 발린과 류신 같은 아미노산이 많고, 펩타이드 사슬에 티로신이 포함되어 있어 높은 항산화 활성의 원인이 되었다. 추후 추출물의 유효 지표성분을 분리, 정제하여 다양한 피부동물 모델에 적용해 그 효능 및 작용기전을 규명하는 후속연구를 통해 천연물 유래 신규 피부보호효과를 나타내는 후보물질 및 천연 항산화제 개발을 도출해 낼 수 있을 것이다.

IV. 요약 및 결론

활성산소종(ROS)는 질병 및 노화의 중요한 기전 중 하나이며 항산화제의 사용은 ROS 생성을 억제하는 효과적인 대안책 중의 하나이다. 쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물(AE-GBE)을 이용하여 항산화 활성과 함께 폴리페놀 화합물이 상대적으로 높은 성분을 조사하기 위해 핵산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물을 이용하여 용매별 분획화(solvent partition)를 시도하여 폴리페놀 함량 및 항산화능을 비교하고 각 용매별 분획물이 인간 진피 섬유아세포(HDF)에서 산화 스트레스를 방지하는 능력을 평가하였다. 그 결과, AE-GBE 부탄올 분획물이 가장 높은 폴리페놀 함량과 항산화 효과를 나타냈고, 에틸 아세테이트 분획과 물 분획물이 그 뒤를 이었다. 그리고 극성성분의 부탄올, 에틸 아세테이트, 물 분획은 HDF 세포에서 과산화수소로 인한 세포 내 ROS 생성 및 DNA 손상을 효과적으로 억제함으로써 피부세포보호효과를 보였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, AE-GBE의 부탄올 분획은 다른 분획물에 비해 과산화수소에 대항하여 높은 항산화 효과를 나타냄으로써 산화 스트레스를 억제하는 천연 곤충 유래 항산화 생체 재료로서 잠재력을 가지고 있음을 시사한다. 추후 구체적 성분 분석 및 항산화 관련 노화 매커니즘의 검증 등을 통해 새로운 항산화/항노화 식품 소재로서 잠재력을 확인하고자 한다.

저자정보

김 경(울지대학교 식품영양학과, 연구원, 0000-0001-9066-8204)

오윤신(울지대학교 식품영양학과, 교수, 0000-0003-3995-4429)

감사의 글

본 논문은 2024년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NO. RS-2024-00336513)을 받아 수

행된 결과의 일부로, 이에 깊은 감사를 드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Ahn MY, Hwang JS, Yun EY, Kim MJ, Park KK. 2015. Anti-aging Effect and Gene Expression Profiling of Aged Rats Treated with *G. bimaculatus* Extract. *Toxicol. Res.*, 31(2): 173-180
- Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.*, 2(4):875-877
- Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. 1988. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.*, 263(14):6884-6892
- Blois MS. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nat.*, 181(4617):1199-1200
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52(2):59-63
- Chong HS, Kim SY, Cho SR, Park HI, Baek JE, Kuk JS, Suh HJ. 2017. Characteristics of Quality and Antioxidant Activation of the Cookies adding with Mealworm (*Tenebrio molitor*) and Black Bean Powder. *J. Food Saf. Hyg.*, 32(6):521-530
- Di Mattia C, Battista N, Sacchetti G, Serafini M. 2019. Antioxidant Activities in vitro of Water and Liposoluble Extracts Obtained by Different Species of Edible Insects and Invertebrates. *Front Nutr.*, 6:106
- Dziabło M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. 2016. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(2):160
- Farag RS, Badei AZMA, El Baroty GSA. 1989. Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66(6):800-804
- Fashakin OO, Tangjaidee P, Unban K, Klangpetch W, Khumsap T, Sringarm K, Rawdkuen S, Phongthai S. 2023. Isolation and Identification of Antioxidant Peptides Derived from Cricket (*Gryllus bimaculatus*) Protein Fractions. *Insects*, 14:674
- Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 276(4):2531-2537
- Han JS. 2021. Nutritional Value and Anti-inflammation Activity of Misutkaru with Added *Gryllus bimaculatus* Powder.

- Asian J. Beauty Cosmetol., 19(3):467-476
- Hwang BB, Chang MH, Lee JH, Heo W, Kim JK, Pan JH, Kim YJ, Kim JH. 2019. The Edible Insect *Gryllus bimaculatus* Protects against Gut-Derived Inflammatory Responses and Liver Damage in Mice after Acute Alcohol Exposure. *Nutr.*, 11(4):
- Jang HY, Park CE, Lee SO. 2019. Comparison of antioxidant capacity of protein hydrolysates from 4 different edible insects. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 51(5):480-485
- Kim HJ, Mun J, Kang JS, Oh SH, Kim JH. 2024a. Antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of *Gryllus bimaculatus* in *Caenorhabditis elegans*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 56(1):46-54
- Kim K, Kim C-E, Baek D-J, Park E-Y, Oh YS. 2024b. Prevention of UVB-Induced Photoaging by an Ethyl Acetate Fraction from *Allomyrina dichotoma* Larvae and Its Potential Mechanisms in Human Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol.*, 25(14):7850
- Kim K, Lee C, Park E, Oh Y. 2023. Anti-skinaging effects of *Gryllus bimaculatus* on ERM-CZ100-exposed human diploid fibroblasts. *J. Nutr. Health*, 56(6):615-628
- Kim SH, Kim YK, Han JS. 2020. Antioxidant Activities and Nutritional Components of Cricket (*Gryllus bimaculatus*) Powder and Protein Extract. *Asian J. Beauty Cosmetol.*, 18(2):163-172
- Ku HB, Kim GN. 2023. Protective Effect of *Gryllus bimaculatus* Extract on Ethanol-induced HepG2 Cells. *J. East Asian Soc. Diet. Life*, 33(3):212-220
- Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, Choi JH, Lee ES, Noh HJ, Kim SY. 2011. Anti-inflammatory Activity of Medicinal Plant Extracts. *Korean J. Med. Crop. Sci.*, 19(4):217-226
- Lim HJ, Byun EH. 2021. Evaluation of Anti-Cancer Activity of *Gryllus bimaculatus* Water Extract on Non-Small Cancer Lung Cell via Apoptosis. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 26(4):453-458
- Liu HW, Wang LL, Tang X, Dong ZM, Guo PC, Zhao DC, Xia QY, Zhao P. 2018. Proteomic analysis of *Bombyx mori* molting fluid: Insights into the molting process. *J. Proteom.*, 173:115-125
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1 suppl):230s-242s
- Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. 2006. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin. Interv. Aging*, 1(4):327-348
- Nino MC, Reddivari L, Osorio C, Kaplan I, Liceaga A. 2021. Insects as a source of phenolic compounds and potential health benefits. *J. Insects Food Feed*, 7(7):1077-1087
- Osborn-Barnes HT, Akoh CC. 2003. Effects of alpha-tocopherol, beta-carotene, and soy isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 51(23):6856-6860
- Park C, Cha HJ, Hong SH, Kim GY, Kim Sm, Kim HS, Kim BW, Jeon YJ, Choi YH. 2019. Protective Effect of Phloroglucinol on Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Apoptosis through Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in HaCaT Human Keratinocytes. *Mar. Drugs*, 17(4):225
- Park S, Yun E. 2018. Edible Insect Food: Current Scenario and Future Perspectives. *Food Sci. Anim. Resour.*, 7(1):12-20
- Remacle J, Michiels C, Raes M. 1992. The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and degeneration. *Exs*, 62:99-108
- Rittié L, Fisher GJ. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.*, 1(4):705-720
- Rizvi SI, Maurya PK. 2007. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol. Biotechnol.*, 37(1):58-61
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.*, 18(9):567-579
- 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(10):2515-2520
- Wu X, He K, Velickovic TC, Liu Z. 2021. Nutritional, functional, and allergenic properties of silkworm pupae. *Food Sci. Nutr.*, 9(8):4655-4665
- Xia Y, Bamdad F, Gänzle M, Chen L. 2012. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chem.*, 134:1509-1518
- Zielińska E, Karaś M, Jakubczyk A. 2017. Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 52:306-312