

Hepatoprotective and Anticancer Activities of *Allomyrina dichotoma* Larvae

Ji-Eun Lee¹, Da-Eun Jo¹, An-Jung Lee¹, Hye-Kyung Park¹, Kumju Youn², Eun-Young Yun³, Jae-Sam Hwang³, Mira Jun² and Byoung Heon Kang^{1*}

¹School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan 689-798, Korea

²Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

³Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun 565-851, Korea

Received November 28, 2014 / Revised January 14, 2015 / Accepted March 9, 2015

Beetle larvae have been used as a traditional medicine to treat various human liver diseases. To prove the liver protective function of *Allomyrina dichotoma* larvae (ADL), we induced liver damage by the intraperitoneal injection of a hepatotoxic reagent, diethylnitrosamine (DEN), to C3H/HeN male mice and orally administered freeze-dried ADL powder. ADL powder lessened DEN-induced hepatotoxicity considering the reduced signs of acute and chronic hepatotoxicities, such as the ALP level in the blood serum, TUNEL-positive hepatocytes, ductular reactions, steatotic hepatocytes, and collagen deposition of the Masson's trichrome staining. In addition to hepatoprotection, the anti-cancer activity of ADL has been examined. The ADL powder was extracted with ethanol and then fractionated with hexane, ethyl acetate, and water by a solvent partition technique. The ethyl acetate fraction showed cytotoxicity to various cancer cells through induction of apoptosis and necrosis, as well as the perturbed metabolism of the cancer cell to trigger autophagy. Collectively, ADL contains bioactive substances that can protect hepatocytes from toxic chemicals and trigger cell death in cancer cells. Thus, further purification and analyses of ADL fractions could lead to the identification of novel bioactive compounds.

Key words : *Allomyrina dichotoma* larvae, anticancer activity, hepatocellular carcinoma, hepatoprotection

서 론

예로부터 동식물자원들은 다양한 질병들을 치료하기 위한 전통민간요법으로 널리 사용되어 왔으며, 전통적인 천연약용 자원들은 과학기술의 발전과 함께 질병을 치료할 수 있는 혁신적인 치료약물을 도출해 낼 수 있는 공급처로 활용되어 왔다[1, 20, 27, 40]. 특히, 향약물들의 예를 들어보면, 전체 향약물 중에서 절반정도가 천연물 혹은 그로부터 유래된 물질이라는 사실에서 알 수 있듯이 자연으로부터 얻을 수 있는 천연약용자원들에 대한 연구가 새로운 약물개발에 많은 기여를 하고 있음을 알 수 있다[5, 27]. 약리활성을 가지는 신물질을 탐색하기 위한 천연물에 대한 연구는 식물과 미생물 등을 대상으로 전세계적으로 이미 활발하게 진행되고 있고, 그 동안 이런 연구가 수행된 적이 없는 생명체들로 탐색범위가 점차 확대되어가고 있는 추세이다[20, 27].

곤충은 지구상에서 가장 크고 다양한 종족으로 알려져 있는데, 현재 확인된 종족만 약 100만종이 넘으며, 이는 실제의

절반에도 미치지 못한다고 예상될 정도로 다양한 환경에서 발견되고 있으며 독특한 생활사를 가지는 경우가 많다[2]. 곤충들은 각자가 살아가는 환경에 적응하고 생존하기 위해서 그들만의 독특한 생리조절 기전 및 물질들을 확보하는 방향으로 진화해 왔는데, 이와 같은 곤충의 생리활성물질들을 확보하게 된다면 새로운 약물후보물질이 될 수 있을 것으로 생각되어 왔다[30]. 뿐만 아니라, 곤충들은 일부 약용으로 전통적인 민간요법에서 이미 활용되어 왔기 때문에, 이들을 대상으로 생리활성을 가진 물질 발굴을 위한 연구의 필요성은 꾸준히 제기되어 왔다[3, 28].

장수풍뎡이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva, ADL)의 경우, 다양한 간질환에 대한 치료목적으로 우리나라를 포함하는 아시아국가들에서 전통적으로 활용되어 왔다[28, 41]. 장수풍뎡이 유충의 성분 및 생리활성에 대한 분석은 이미 진행된 적이 있는데, 유충에 대한 영양학적 성분분석 결과에서 유용한 필수불포화지방산의 함량이 높은 것으로 알려져 건강식품으로써의 가능성이 보고된 바가 있다[43]. 그리고, 생화학적인 생리활성 분석에서는 활성산소를 억제하는 항산화 효능이 보고가 되었고[37], 항비만[4] 및 항치매 효과도[17] *in vitro*에서 알려지고 있다. 다만, 관련 질병에 대한 연구들이 *in vitro*에서의 결과에 제한되어 있어, *in vivo* 및 임상에서의 유의성 있는 효과에 대한 연구는 더 필요한 것으로 생각된다. 또한, 장수풍뎡이로부터 항펩타이드[25] 및 탄수화물결합단백질인 렉틴(lectin) [35] 유전자들이 추출되어 보고된 적이 있다. 그러나,

*Corresponding author

Tel : +82-52-217-2521, Fax : +82-52-217-2639

E-mail : kangbh@unist.ac.kr

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.

현재까지 전통적으로 알려진 간보호 및 간암억제 활성화에 대한 연구가 장수풍뎡이를 대상으로 보고된 바가 없어 이에 대한 연구가 필요한 상황이다.

독성화합물질을 꾸준히 실험동물에게 처리하게 되면 지방간에서 간경화로 진행될 뿐만 아니라 최종적으로 간암까지 유발하여, 실제 간암환자의 암 발생을 모사할 수 있는 실험동물 모델이 알려져 있는데[16], 유전독성을 유도할 수 있는 diethylnitrosamine (DEN)이 그런 물질 중에서 가장 많이 활용되고 있는 물질의 하나이며, 간암환자에서 만성적으로 진행되는 간질환을 비슷하게 모사할 수 있다고 한다[29, 32]. DEN의 간손상을 유도하는 작용기전은, 간세포에서 발현되는 시토크롬 P450 (cytochrome P450)와의 반응으로 활성산소 생성을 촉진하게 되고 이때 발생하는 다량의 활성산소로 인해 간세포의 DNA 손상 및 세포죽음이 유도되어 결과적으로 간 손상을 유발되는 것으로 알려져 있다[39]. 만성적인 간질환에 대한 간보호 효능을 보거나 항암활성을 확인하고자 할 때, DEN으로 유도된 간독성 동물모델이 널리 활용되고 있다[8, 11, 16, 44].

본 연구에서는 동결 건조된 장수풍뎡이 유충분말을 이용하여 DEN으로 간 독성이 유도된 실험 쥐에서 간 보호 효과를 *in vivo*에서 활성을 검증을 하였고, 유충 추출물들을 대상으로 암세포에 대한 항암활성을 확인하였다.

재료 및 방법

장수풍뎡이(*Allomyrina dichotoma*) 애벌레 추출물의 분획

유기용매를 이용한 장수풍뎡이 애벌레 분말의 분획은 기존에 보고된 실험방법을 따랐다[42]. 간략히 설명하면, 실온에서 7일동안 12 L의 95% 에탄올(SIGMA, 미국)을 가지고 2차례에 걸쳐서 1.2 kg의 장수풍뎡이 분말(월드웨이, 연기군, 한국)로부터 추출물을 확보하였다[17]. 추출물을 필터하여 불용성물질을 제거한 후, rotary vacuum evaporator (EYELA, N-1100, 도쿄, 일본)로 용매를 제거하였다. 에탄올추출물(379.66 g)은 hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and H₂O를 이용하여 순차적으로 분획되었고 각각 313.90 g, 0.78 g, 24.80 g, 24.80 g 분획물을 확보하였다.

Diethylnitrosamine (DEN) 처리된 실험 쥐에서의 간 보호 효과

모든 동물실험은 UNIST 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: UNISTIACUC-13-015)을 거쳐 수행하였다. 실험에는 8주된 C3H/HeN 수컷 쥐(오리엔트바이오, 성남)를 사용하였다. 50 mg/kg diethylnitrosamine (Sigma) 혹은 phosphate buffered saline (PBS)를 매주 1회씩 복강주사하여 간 독성 모델을 제작하였고, 장수풍뎡이 유충 분말을 0.5g/kg 혹은 생리식염수를 주 5회씩 경구투여하여 간 보호 효과 실험을 진행하였다. DEN과 유충분말을 5주와 10주 동안 처리한 후, orbital

sinuses로부터 혈액 샘플들을 채취하여 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 측정하였다. DEN과 유충분말을 처리하고 13주가 지난 뒤에는 실험 쥐로부터 간 조직을 채취하여 조직화학적염색으로 분석하였다.

일차간세포 (primary hepatocyte) 추출

일차간세포는 8주된 BALB/c 쥐(효창사이언스, 대구, 한국)를 이용하여 기존의 보고대로 추출하였다[23, 33]. 간단히 설명하면, 마취된 쥐의 간에 콜라겐용액(collagenase solution)을 흘려보낸 후, 간 조직을 조각 내었고, 100 μm cell strainer (BD, 미국)를 이용하여 조직덩어리는 걸러 제거해 낸다. 걸러진 세포들은 M199/EBSS medium (Hyclone, 미국)를 이용하여 원심분리 및 resuspension을 몇 차례 반복하여 세척한다. Percoll (Sigma, 미국) gradient를 이용하여 세포파괴물(cell debris)와 non-parenchymal cells을 제거하여 간세포(hepatocyte)만 획득한다. 확보한 간세포를 몇 차례 세척한 후, 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 포함된 M199/EBSS medium에 resuspend하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한다.

세포생존률 및 아포토시스 유도능력 측정

96 well plate에 5×10³/well개의 세포를 밤샘 배양한 후, 24시간 동안 표시된 농도만큼의 추출물들을 처리하였다. 세포생존률측정을 위해서, 세포에 3(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리한 후, 형성된 포마잔 결정(formazan crystal)을 DMSO로 녹이고 595 nm에서의 흡광도를 Infinity M200 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 측정하였다. 흡광도 값은 대조군과 비교하여 생존백분율(percent viability)로 표시하였다. 실험은 최소 2번 매번 triplicate으로 수행하였다. 한편, 추출물들의 아포토시스 유도활성을 측정하기 위해서, 약물을 제시된 농도로 처리한 후, CaspaTag *in situ* apoptosis detection kit (Millipore, 미국)을 이용하여 DNA량(propidium iodide, red fluorescence)과 caspase 활성화 정도(DEVDase activity, green fluorescence)를 형광표지하였다. FACS Calibur™ system (BD Biosciences, USA)장비로 세포형광을 측정하였고, 측정결과는 FlowJo software (TreeStar, USA)를 이용하여 분석하였다.

TUNEL 염색

적출한 간 조직은 10% 포르말린 용액에 충분히 고정시킨 후 고정된 조직을 70, 80, 90, 95, 100% ethanol, xylene을 단계별로 사용하여 탈수와 투명화 과정을 거쳤고 포매하여 4 μm의 절편을 만들어 세포자멸사가 진행 중인 세포의 핵을 염색하기 위해 TUNEL 염색을 수행하였다. TUNEL kit는 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescent (Roche Diagnostic)을 사용하여 회사에서 제공하는 실험방법을 적용하였다. 조직은 물로 세척한 후 0.1% TritonX-100을 이용하여 세포 내 염색시약 투

과성을 높였으며 30분 실온에서 반응하였다. PBS로 세척한 후 Blocking solution을 20분간 실온에서 반응하였다. PBS로 세척한 후 TUNEL reaction mixture를 60분 동안 37°C에서 어둡게 하여 반응하였다. PBS로 세척한 후 조직을 DAPI가 포함된 mounting용액에 봉입하였으며 형광 현미경을 통하여 TUNEL positive cell (green color)을 관찰하고 중복되지 않게 field를 세어 %로 표시하였다.

H&E 염색

간 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 4 µm로 절편한 조직을 슬라이드에 부착시키고 xylene 용액에 탈파라핀 시킨 후, 100, 95, 90, 80, 70% 저농도의 알코올 과정을 거쳐 흡수하였다. 그 후 헤마톡실린 (hematoxylin)용액 5분, 흐르는 물로 10분 세척한 뒤 1% acid-alcohol에 30초, 에오신에 1분 동안 처리하여 조직 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 70, 80, 90, 95, 100% alcohol의 순서로 탈수과정을 거치고 마지막으로 xylene에 10분씩 2번 처리하여 투명과정을 거쳐 봉입하였다. 헤마톡실린과 에오신(eosin) (H&E) 염색 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

Masson's Trichrome 염색

간 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 4 µm로 절편한 조직을 슬라이드에 부착시키고 xylene 용액에 탈파라핀 시킨 후, 저농도의 알코올 과정을 거쳐 흡수 한 후 Bouin 용액 60°C에서 1시간 매염하였다. 그 후 정제수 5분, Weigert iron hematoxylin 용액 10분, 정제수 5분, Biebrich scarlet-Acid fuchsin 용액 5분, 정제수 5분, Phosphotungstic/ Phosphomolybdic acid 용액 10분, Aniline blue 용액 5분, 정제수 5분, 1% acetic acid 수용액 1분 과정으로 염색을 하였다. 이 실험은 Masson's Trichrome Stain Kit을 이용하였다(Polyscience, Inc.). 후처리 과정으로 알코올을 이용하여 각 1분씩 70%, 80%, 90%, 95%, 100%의 수분을 없애기 위한 탈수(dehydration) 과정 후 xylene을 이용하여 2회 10분씩 처리하여 알코올을 제거하는 과정을 거친 뒤 봉입하였다. 간 섬유화의 수치화는 imageJ 프로그램을 사용하였으며 중복되지 않게 field를 세어 %로 표시하였다.

Oxygen consumption rate (OCR) 분석

2×10^4 개의 HepG2세포를 XF analyzer (Seahorse Bioscience, 미국)용 plate에 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 포함된 M199/EBSS medium을 사용하여 밤샘 배양하였다. 세포의 산소소비량(oxygen consumption rate, OCR)을 측정하기 전에, bicarbonate-free medium으로 교체한 뒤, CO₂없이 세포배양기에서 1시간 배양하였다. 장수풍뎡이 추출물을 처리하기 전 20분 동안 세포의 basal level의 OCR 값을 측정한다. 장수풍뎡이 유충 추출물을 0.5 mg/ml로 처리하고, 약 1

시간 동안 OCR의 변화를 측정하였고, 후에 0.5 µM oligomycin, 1 µM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 1 µM rotenone, 1 µg/ml antimycin A 등의 4가지 호흡 사슬 억제제를 순서대로 처리하면서, 다시 OCR 변화량을 측정하였다. 측정결과는 Prism 5.0 (GraphPad, USA)을 통하여 분석하였다.

통계분석방법

MTT에서의 세포생존률과 xenograft 실험에서의 종양크기 평균값은 Prism 5.0 (GraphPad, USA) 분석 소프트웨어를 이용하여 unpaired *t*-test를 수행하였고, *p*-value가 0.05보다 작은 경우 의미 있는 차이라고 간주하였다.

결 과

장수풍뎡이 유충 분말의 경구투여가 DEN으로 유도되는 간 손상을 억제함

장수풍뎡이 유충 분말이 간 독성을 억제할 수 있는지 확인하고자 diethylnitrosamine (DEN)으로 유도되는 간 독성 모델에 유충분말을 경구투여하였다[22]. C3H/HeN 수컷 쥐에 DEN 50 mg/kg을 매주 1회 복강주사하여 간 독성을 유도하였고, 장수풍뎡이 유충분말은 주5회 500 mg/kg씩 경구투여하였다. 5주 및 10주후 혈액분석 소견으로는 alkaline phosphatase (ALP)의 혈액 중 농도가 장수풍뎡이 유충분말을 먹인 쥐에서 통계적으로 유의미한 수준으로(5주차 $p=0.008$, 10주차 $p=0.021$) 감소된 것을 확인하였다(Fig. 1A). 13주 동안 DEN과 장수풍뎡이 유충분말을 처리한 후, 실험 쥐들로부터 간을 적출하여 TUNEL염색으로 간세포의 아포토시스(apoptosis)를 분석하였다[19]. DEN만을 처리한 경우에 TUNEL positive 세포들이 증가된 반면에(Fig. 1B), DEN의 처리와 함께 장수풍뎡이 분말을 섭취한 쥐에서는 TUNEL positive 세포의 숫자가 유의미한 수준으로 감소되었다(Fig. 1C). 이와 같은 결과로부터, DEN으로 유도되는 간세포의 죽음이 장수풍뎡이 분말을 섭취함으로써 억제될 수 있음을 확인하였다.

장수풍뎡이 유충 분말에 의한 간 보호

장수풍뎡이 유충 분말의 간 보호 효능을 좀더 구체적으로 보기 위해서 H&E염색으로 실험동물의 간조직을 분석하였다. 먼저, DEN으로 인해 간세포의 세포질에 비정상적인 지방방울(lipid droplet)이 증가되었고(steatotic cell 증가), 세포질이나 세포핵이 비정상적으로 커지는 현상도 확인할 수 있었으며, 비정상적으로 duct의 형성이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 반면에, DEN과 함께 장수풍뎡이 유충분말을 경구투여한 경우에는 이와 같은 간 손상으로 인한 현상이 뚜렷하게 감소된 것을 확인하였다(Fig. 2A). 특히, duct의 숫자(Fig. 2B; $p<0.0001$)와 steatotic cell의 숫자(Fig. 2C; $p<0.0001$)가 유

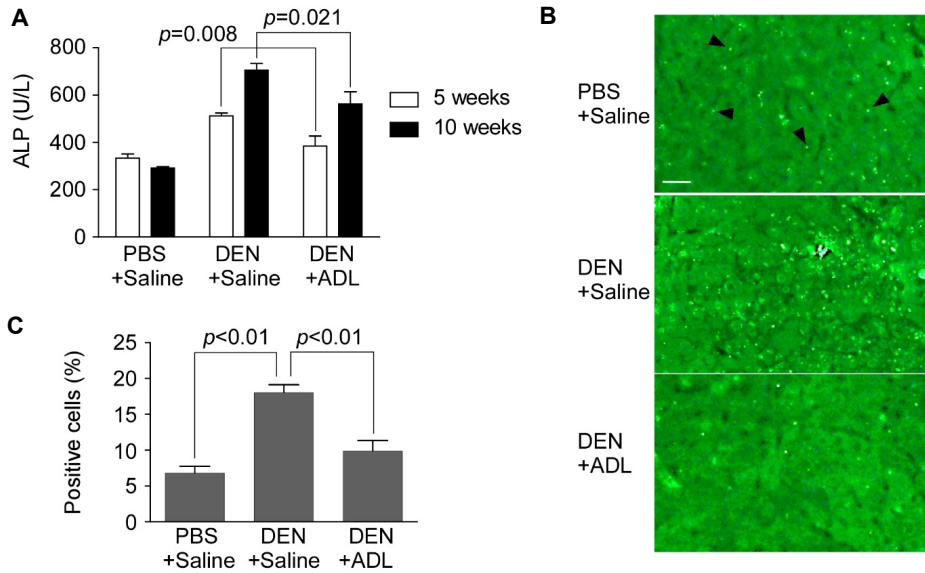


Fig. 1. Reduction of DEN-induced hepatotoxicity by ADL oral gavage. (A) Blood ALP activity. 50 mg/kg DEN or phosphate buffered saline (PBS) were treated through *i.p.* injection once a week, and 0.5 g/kg *Allomyrina dichotoma* Larva (ADL) powder or saline was administered 5 times a week via oral gavage to C3H/HeN male mice as indicated (n=10 for each group). Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured in the mouse blood sample. The data are mean \pm SEM. (B) TUNEL staining of liver tissues. After treatment of DEN and ADL as in (A), liver tissues were stained with TUNEL to show apoptotic cells. Scale bar, 25 μ m. 200X magnification. Arrow heads indicate example TUNEL-positive cells. (C) Percentage of TUNEL positive cells per microscopic field. TUNEL positive cells were counted from 20 microscopic fields. The data are mean \pm SEM.

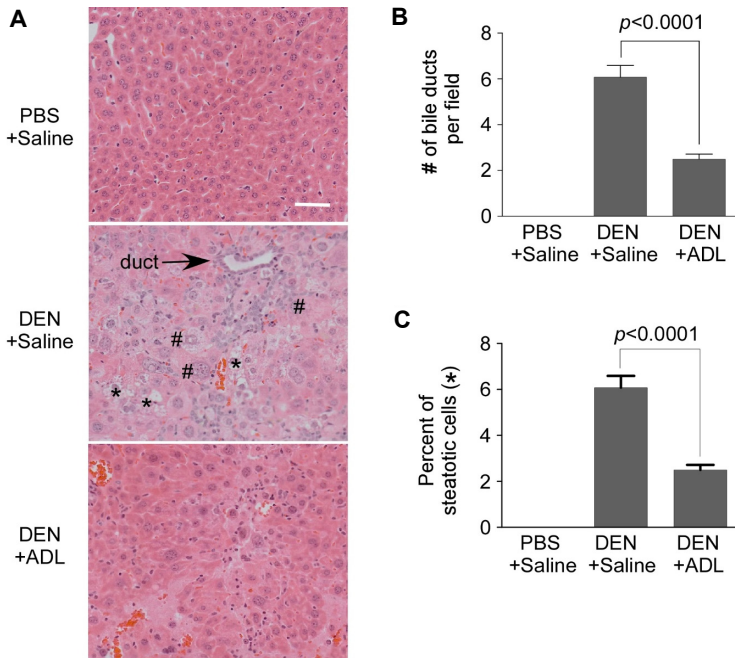


Fig. 2. Protection of liver damage by PBL oral gavage. (A) Histological analysis. The liver sections were histologically analyzed after 13 weeks of DEN and/or ADL administration. Abnormal duct was indicated. *,steatotic cells; #,enlarged cytoplasm or nucleus. Scale bar, 50 μ m. 200X magnification. (B) Quantification of the number of ducts. 20 microscopic fields were analyzed to count the number of ducts. The data are mean \pm SEM. (C) Percent of steatotic cells. Steatotic cells were counted from 20 microscopic fields. The data are mean \pm SEM.

의미한 수준으로 감소하였다. 간세포가 커지는 현상은 손상 받은 간에서 간세포가 재생될 때 나타나는 것으로 알려져 있고[18], 새로운 duct가 형성되는 ductural reaction [14] 및 steatosis도 간세포의 손상으로 나타나는 현상으로 이들이 심해지는 경우에 간경화 및 간암으로 진행될 수 있다고 보고되어 있다[9]. 따라서, 장수풍뎅이 분말의 경구 투여로 독성물질에 의

한 간 손상을 억제할 수 있고, 향후 만성적 간 손상으로 인한 간경화 및 간암의 발생 가능성도 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

장수풍뎅이 유충 분말에 의한 간섬유화 억제

DEN을 처리한 간 조직의 분석에서는 암의 형성을 확인할 수는 없었으나, 간 섬유화는 시작되었을 것으로 예상되어[12],

콜라겐(collagen)을 파란색으로 염색하여 세포질이나 근섬유 등과 구별할 수 있는 Masson's trichrome 염색방법으로 간 섬유화 조직의 유무를 분석하였다[24]. Phosphate buffered saline (PBS)가 처리된 대조군그룹에서는 미미한 수준에서 푸른색 염색을 확인할 수 있었으나, DEN이 처리된 그룹에서는 15%이상의 부위에서 푸른색으로 염색되는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). 반면에, 장수풍뎅이 유충분말을 경구투여한 그룹에서는 콜라겐염색이 유의미한 수준에서 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3B; $p<0.001$). 따라서, 유충분말의 간 보호 효능덕분에 DEN으로 유도되는 간 손상이 감소될 수 있었고, 장기간의 DEN처리로 인한 지속적인 간 손상으로 유도되는 간 섬유화 및 간 경화증도 감소될 수 있음을 확인하였다.

장수풍뎅이 유충 분획물의 항암활성

장수풍뎅이 유충분획물을 에탄올로 추출물을 만들고, 이 추출물에 대해서 hexane, ethyl acetate, water로 추가 분획물을 만들어 항암활성을 확인하였다. 다양한 조직으로부터 유래된 암세포주에 대해서 세포독성을 측정하였고, 실험에는 전립선 (22Rv1, PC3), 자궁경부(HeLa), 간(PLC/PRF5, Hep3B, SK-HEP-1, HepG2), 난소(SK-OV3), 폐(NCI-H460), 직장(HCT116), 유방(MDA-MB-231)으로부터 유래된 세포주들이 MTT 방법으로 사용되었다. 세가지 분획물들 중에서 ethyl acetate분획물은 거의 모든 암세포주에 대해서 2 mg/ml의 처리농도에서 강한 세포독성을 보여주었으나, hexane은 동일한 농도조건에서 약간의 세포독성을, water 분획물은 상당히 낮은 세포독성을 각각 보였다(Fig. 4A). 세포독성의 암세포 선택성을 확인하고자, 쥐의 간으로부터 유래한 일차간세포를 대상으로 세포독성 실험을 진행하였는데, 2 mg/ml의 최고농도조건에서 모든 분획물들이 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 4B). 이상의 결과를 바탕으로 장수풍뎅이 유충 분획물에서 암세포에 선택적으로 작용하는 독성성분이 들어 있다고 사료되며, 특히 ethyl

acetate분획물에서 그런 효과가 가장 큰 것을 확인하였다.

장수풍뎅이 유충 분획물의 세포독성 유도기전

분획물들이 어떻게 세포죽음을 유도하는지 확인하고자 대표적인 세포죽음기전인 아포토시스, 세포괴사(necrosis), 오토파지(autophagy) 중에서[7, 13], 아포토시스와 세포괴사를 측정할 수 있는 Sytox와 AnnexinV염색을 수행하여 flow cytometry로 분석하였다[26, 45]. 2 mg/ml의 처리조건에서 실험에 사용된 HepG2, PLC/PRF5, Hep3B 세포주들 모두에서 ethyl acetate분획물에서만 강한 세포죽음 활성을 확인할 수 있었던 반면에(Sytox positive, AnnexinV positive), hexane분획물에서는 약한 수준의 AnnexinV염색증가만이 있었고, 실제 죽은 세포의 비율이 미미한 수준의 증가만이 있었다(Fig. 5). Ethyl acetate분획물에서의 세포죽음 기전은 AnnexinV와 sytox의 염색이 동시에 증가되는 것으로 보여지나(Hep3B의 경우), AnnexinV positive 및 negative 세포의 구별이 불명확한 경우도 있어(HepG2, PLC/PRF5), 세포주에 따라 아포토시스와 세포괴사가 혼재된 형태로 유도되는 것으로 사료된다[31].

장수풍뎅이 유충 분획물의 세포대사 교란 능력

분획물들의 세포대사교란 능력을 확인하고자, 세포산소소모량(Oxygen consumption rate, OCR)을 측정하였다[34]. OCR의 측정을 위해서 XF analyzer (Seahorse)를 사용하였고, 기본 호흡량(basal respiration), ATP 합성, 최대호흡량은 oligomycin, FCCP, antimycin A/rotenone을 순차적으로 처리함으로써 계산하였다(Fig. 6A) [6]. 세포독성을 유도하지 않는 추출물 농도인 0.5 mg/ml이 사용되었고, 이런 농도조건에서 OCR에 전혀 영향을 주지 못했던 water 분획물은 실험에서 제외하였다. Ethyl acetate와 hexane분획물들에서 basal respiration의 변화는 없었고, ATP 합성정도는 ethyl acetate 및 hexane 분획물 모두에서 다소 감소시키는 하였으나, 최대 호흡량

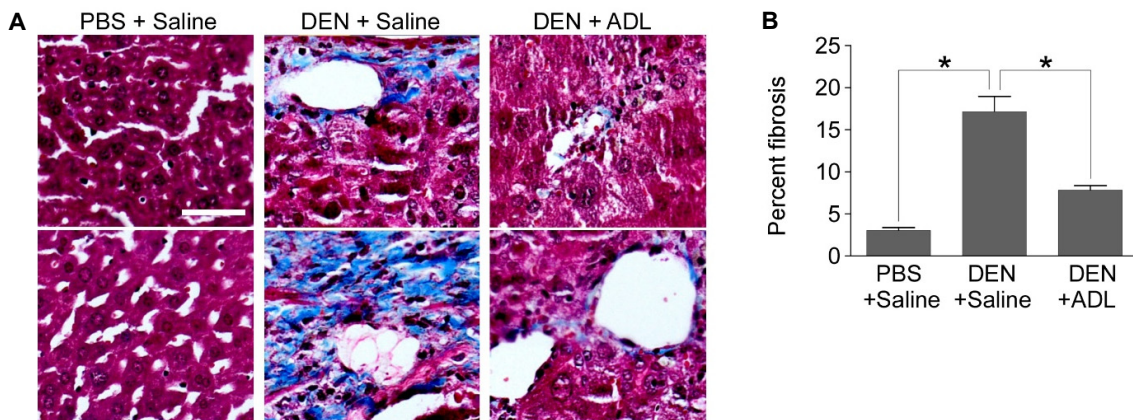


Fig. 3. Reduction of liver fibrosis by ADL oral gavage. (A) Masson's Trichrome staining. The mouse liver sections were stained by the Masson's trichrome protocol. Scale bar, 50 μ m. 200X magnification. (B) Percent fibrosis analysis. Blue staining in (A) were counted from 10 microscopic fields. The data are the mean \pm SEM. *, $p<0.001$

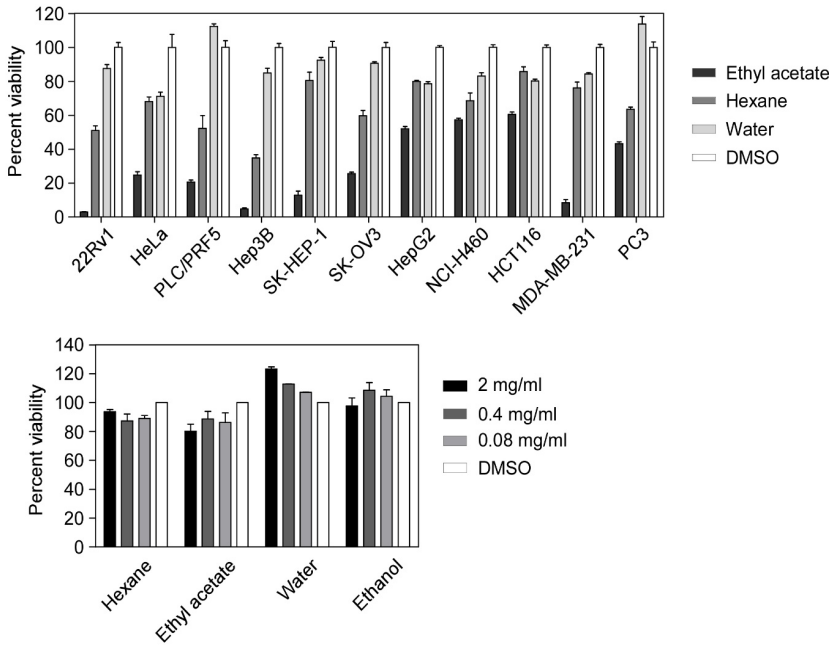


Fig. 4. Anticancer activity of ADL fractions. (A) Cytotoxicity effect of larval fractions on various cancer cells. Human cancer cells were treated with 2 mg/ml ADL fractions of ethyl acetate, hexane, and water for 24 hr. Cell viability was analyzed by MTT assay. Data are the mean \pm SEM from duplicated two independent experiments. (B) Cytotoxicity on the normal primary hepatocytes. Hepatocytes isolated from mouse liver were treated with the fractions as indicated for 24 hr and analyzed by MTT assay. Data are the mean \pm SEM from duplicated two independent experiments.

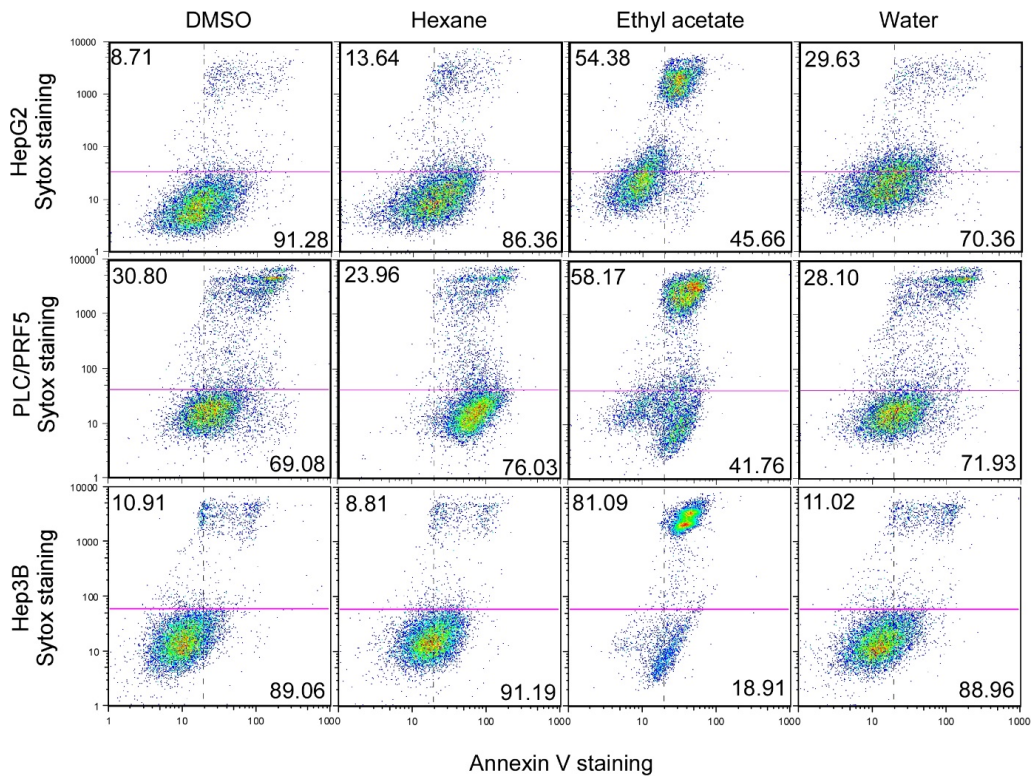


Fig. 5. Ethyl acetate induces apoptosis and necrosis. 2 mg/ml Hexane, ethyl acetate, and water fractions were incubated with hepatocellular carcinoma cells, HepG2, PLC/PRF5, and Hep3B for 24 hr. Cell surface-exposed phosphatidylserine and compromised plasma membrane were labeled with AnnexinV and Sytox, respectively. Cells were analyzed by flow cytometry.

에서는 ethyl acetate에서 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 6B). 이상의 결과로부터 ethyl acetate분획물이 세포대사작용에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었고, 이런 대사교란 현상이 세포죽음 유도와 연결되어 있는지 확인하고자[13], 오토파지 유도능을

western blot으로 분석하였다(Fig. 6C). 1 mg/ml의 농도조건에서 ethyl acetate분획물은 LC3-II form을 증가시켰으나(Fig. 6C), hexane과 water 분획물들은 LC3-II 형성에 영향이 없었다. LC3-II의 형성은 세포질에 존재하는 LC3-I이 lipid가 연결

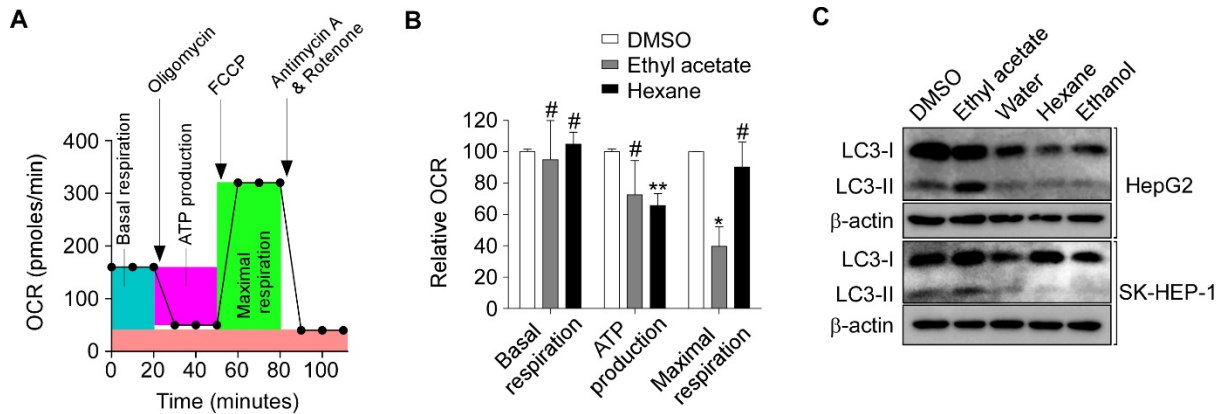


Fig. 6. Perturbation of cellular metabolism and autophagy induction by ethyl acetate fraction. (A) Schematic diagram of oxygen consumption rate (OCR) analysis. OCR was measured upon treatment of 0.5 μ M oligomycin, 1 μ M FCCP, 1 μ g/ml antimycin A and 1 μ M rotenone as indicated. The relative amount of basal respiration, ATP production, and maximal respiration was calculated. (B) Relative OCR. HepG2 OCR was analyzed after 0.5 mg/ml ethyl acetate or hexane treatment. The data are mean \pm SEM from triplicated two independent experiments. *, $p < 0.04$; **, $p < 0.05$; #, not significant. (C) Western blot analysis of LC3 conjugation. HepG2 and SK-HEP-1 cells were treated with 1 mg/ml fractions for 24 hr and analyzed by Western blotting.

된 형태로 바뀔 때 전기영동에서 이동속도가 달라지는 것을 검출하는 것으로 오토파지 유도의 가장 좋은 근거로 폭넓게 활용되고 있다[15]. 이상의 실험결과들로부터, ethyl acetate 분획물이 세포의 호흡대사를 교란할 수 있음을 확인하였고, 오토파지라는 대사교란으로 유도되는 세포죽음기전이 활성화되는 것을 확인하였다.

고 찰

Diethylnitrosamine (DEN)으로 유도된 간 독성 모델을 이용하여 장수풍뎅이 유충 분말에 대한 간 보호 효능을 *in vivo*에서 확인하였는데, 혈중 alkaline phosphatase 활성, 간 조직에서의 ductular reaction, 간세포에서의 지방축적 및 콜라겐 침착 등 DEN으로 인해 증가되는 급성 및 만성 간 손상 표지자들이 유충분말을 경구투여함으로써 감소되는 것을 확인하였다. 더불어, 에탄올을 이용한 유충분말 추출물을 추가로 분획하여 hexane, ethyl acetate, water 분획물들을 얻었고, 이 중에서 ethyl acetate 분획물에서 암세포에 대한 아포토시스, 세포괴사, 및 오토파지를 유도할 수 있는 세포독성이 있음을 확인하였다.

DEN은 발암물질로 알려져 있는데, 그 작용기전으로 활성산소의 생산을 높여 DNA 손상을 증가시킨다고 한다[16]. DEN을 반복적으로 계속 실험동물에 처리하게 되면 본 연구결과에서도 보여준 것처럼 지방간, 간경화가 유도될 수 있고, 이런 상황이 지속되는 경우에 최종적으로 간암으로 진행하게 되는데, 이는 간암환자에서 암으로 진행하는 전 단계에서 관찰되는 순차적인 간 손상과 유사하다고 알려져 있다[16, 39]. 본 연구에서 DEN을 13주 처리한 후, 간손상의 지표라고 할 수 있는 alkaline phosphatase (ALP)의 혈중농도, 간세포의

아포토시스 죽음 정도, ductular reaction, 간세포에 지방축적 등이 모두 증가되었고, 상당히 진행된 만성 간 손상인 간 섬유화도 확인할 수 있었다[16, 39]. 이와 같은 간손상의 지표들은 장수풍뎅이 유충분말의 섭취로 통계적으로 유의미한 수준에서 감소하는 것을 확인하였다. 비록 유충분말이 완벽하게 간독성을 억제하지는 못하였지만, DEN이 강력한 간독성을 유도한다는 것을 고려해보면 간 보호 효능이 충분히 있다고 결론을 내릴 수 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 간보호 효능을 최근 발표된 흰점박이꽃무지 유충 분말을 이용한 간보호 효능 분석실험과 비교해 보면[21], 혈액속의 ALP 수치와 조직학적 분석 결과들에서 장수풍뎅이 유충 분말이 흰점박이꽃무지 유충분말보다 다소 우세한 간보호 효과를 보여준다는 결론을 내릴 수 있다.

장수풍뎅이를 비롯한 몇몇 곤충추출물에서는 항산화물질이 포함되어 있다는 보고가 있는데[10, 36, 37], 유충분말의 간 보호 기전으로 분말에 포함된 항산화물질의 작용을 생각해 볼 수 있다. DEN의 독성은 간 세포 속의 시토크롬 P450와의 상호작용으로 인해 만들어지는 활성산소때문인 것으로 알려져 있는데[38], 유충분말 속의 항산화 성분이 DEN으로 인해 유발된 활성산소를 제거해 줘서 간세포의 생존에 필수적인 생체물질들의 불활성화를 막아주었기 때문에 간 보호 효과가 있었을 것으로 추측해 볼 수 있다.

유충분말에서 에탄올로 추출물을 만들어 낸 후, 이들을 다시 hexane, ethyl acetate, water 등의 용매로 추가 분획물을 얻었을 때, ethyl acetate에서만 세포죽음을 유도하고 물질대사를 교란할 수 있는 활성을 확인할 수 있었다. 반면에, 흰점박이꽃무지 유충의 분획물들을 대상으로 진행한 최근 연구결과에서는 ethyl acetate가 아닌 hexane 분획물에서 암세포에 대한

세포독성이 확인된 바 있다[21]. 이와 같이 서로 다른 화학특성을 가지는 추출용매에서 유사한 세포독성 활성을 확인하였다는 것은, 세포독성을 나타내는 생리활성 성분이 장수풍뎅이와 흰점박이꽃무지 사이에는 서로 다를 수 있음을 의미한다.

오토파지 유도활성은, 장수풍뎅이와 흰점박이꽃무지에서 공통적으로 ethyl acetate분획물에서 주로 관찰이 되었는데 [21], 이는 두 곤충유충에서 비슷한 화학적 특성을 가지는 오토파지 유도물질이 존재할 가능성을 제시한다고 사료된다. 따라서 장수풍뎅이 ethyl acetate분획물에 대한 추가 분리, 분획, 및 성분 분석을 하고, 다른 곤충추출물들과의 비교분석을 하여, 아포토시스, 세포괴사, 오토파지 등의 세포죽음 기전을 유도하는데 관련된 물질들을 분리 동정할 필요가 있다. 이를 기반으로 생리활성을 가진 새로운 물질을 확보하고, 알려지지 않은 세포신호전달기전도 밝혀 낼 수 있을 것으로 기대한다.

결론적으로, 장수풍뎅이 유충분말과 추출물로부터 간 보호 효과와 항암활성을 확인하였으며, 실험에 사용된 유충 분획물들에 대한 추가 분획과 분석으로 생리활성을 가진 물질발굴이 가능할 것으로 기대한다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 농업과학기술개발사업(과제번호: PJ008969)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Baker, D. D., Chu, M., Oza, U. and Rajgarhia, V. 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1225-1244.
- Berenbaum, M. R. and Eisner, T. 2008. *Ecology. Bugs' bugs. Science* **322**, 52-53.
- Cherniack, E. P. 2010. Bugs as drugs, Part 1: Insects: the "new" alternative medicine for the 21st century? *Altern. Med. Rev.* **15**, 124-135.
- Chung, M. Y., Yoon, Y. I., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2014. Anti-obesity effect of *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae ethanol extract on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Entomol. Res.* **44**, 9-16.
- Clardy, J. and Walsh, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* **432**, 829-837.
- de Groof, A. J. et al. 2009. Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol. Cancer* **8**, 54.
- Edinger, A. L. and Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663-669.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M. and Wagner, E. F. 2003. Liver tumor development. c-jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* **112**, 181-192.
- Farrell, G. C. and Larter, C. Z. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **43**, S99-S112.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 187-197.
- Finnberg, N., Silins, I., Stenius, U. and Hogberg, J. 2004. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. *Carcinogenesis* **25**, 113-122.
- Fuchs, B. C. et al. 2014. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **59**, 1577-1590.
- Galluzzi, L. et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107-120.
- Gouw, A. S., Clouston, A. D. and Theise, N. D. 2011. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* **54**, 1853-1863.
- He, C. and Klionsky, D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67-93.
- Heindryckx, F., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. 2009. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 367-386.
- Kim, M., Youn, K., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Ahn, M. R., Jeong, W. S. and Jun, M. 2014. Effects of solvent fractions of *Allomyrina dichotoma* larvae through the inhibition of in vitro BACE1 and beta-amyloid(25-35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Entomol. Res.* **44**, 23-30.
- Kim, R. D., Kim, J. S., Watanabe, G., Mohuczy, D. and Behrns, K. E. 2008. Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin. Intervent. Radiol.* **25**, 92-103.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol. Biol.* **887**, 41-47.
- Lachance, H., Wetzel, S., Kumar, K. and Waldmann, H. 2012. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. *J. Med. Chem.* **55**, 5989-6001.
- Lee, J. E. et al. 2014. Hepatoprotective and antineoplastic properties of *Protaetia brevitarsis* larvae. *Entomol. Res.* **44**, 244-253.
- Leenders, M. W., Nijkamp, M. W. and Borel Rinkes, I. H. 2008. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6915-6923.
- Li, W. C., Ralphs, K. L. and Tosh, D. 2010. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* **633**, 185-96.
- Meinen, S., Barzaghi, P., Lin, S., Lochmuller, H. and Ruegg, M. A. 2007. Linker molecules between laminins and dystroglycan ameliorate laminin-alpha2-deficient muscular dystrophy at all disease stages. *J. Cell Biol.* **176**, 979-993.
- Motobu, M., Amer, S., Yamada, M., Nakamura, K., Saido-Sakanaka, H., Asaoka, A., Yamakawa, M. and Hirota, Y. 2004. Effects of antimicrobial peptides derived from the beetle *Allomyrina dichotoma* defensin on mouse peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Vet.*

- Med. Sci.* **66**, 319-322.
26. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Hasko, G., Hawkins, B. J., Madesh, M. and 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.
 27. Newman, D. J. and Cragg, G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311-335.
 28. Pemberton, R. W. 1999. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **65**, 207-216.
 29. Qi, Y. et al. 2008. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **122**, 2682-2688.
 30. Ratcliffe, N. A., Mello, C. B., Garcia, E. S., Butt, T. M. and Azambuja, P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 747-769.
 31. Sawai, H. and Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 569-573.
 32. Schiffer, E. et al. 2005. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* **41**, 307-314.
 33. Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q. and Liu, M. 2012. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J. Vis. Exp.* **64**, e3917.
 34. Streeter, I. and Cheema, U. 2011. Oxygen consumption rate of cells in 3D culture: the use of experiment and simulation to measure kinetic parameters and optimise culture conditions. *Analyst* **136**, 4013-4019.
 35. Sueyoshi, S., Yamamoto, K. and Osawa, T. 1988. Carbohydrate binding specificity of a beetle (*Allomyrina dichotoma*) lectin. *J. Biochem.* **103**, 894-899.
 36. Suh, H. J. and Kang, S. C. 2012. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts of *Protaetia brevitarsis* Lewis (Coleoptera: Scarabaeidae) at different growth stages. *Nat. Prod. Res.* **26**, 510-517.
 37. Suh, H. J., Kim, S. R., Lee, K. S., Park, S. and Kang, S. C. 2010. Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. *J. Photochem. Photobiol. B* **99**, 67-73.
 38. Verna, L., Whysner, J. and Williams, G. M. 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* **71**, 57-81.
 39. Vesselinovitch, S. D. and Mihailovich, N. 1983. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.* **43**, 4253-4259.
 40. Wang, C. Y., Bai, X. Y. and Wang, C. H. 2014. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development. *Am. J. Chin. Med.* **42**, 543-559.
 41. Wu, P., Dugoua, J. J., Eyawo, O. and Mills, E. J. 2009. Traditional Chinese Medicines in the treatment of hepatocellular cancers: a systematic review and meta-analysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 112.
 42. Youn, K. and Jun, M. 2013. *In vitro* BACE1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med.* **79**, 1038-1042.
 43. Youn, K., Kim, J. Y., Yeo, H., Yun, E. Y., Hwang, J. S. and Jun, M. 2012. Fatty acid and volatile oil compositions of *Allomyrina dichotoma* Larvae. *Prev. Nutr. Food Sci.* **17**, 310-314.
 44. Zalatnai, A. and Lapis, K. 1994. Decreased hepatocarcinogenic effect of diethylnitrosamine in experimentally induced liver cirrhosis in rat: delay or inhibition? *Cancer Lett.* **79**, 1-7.
 45. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. and Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* **23**, 525-531.

초록 : 장수풍뎅이 유충의 간보호 효능 및 항암활성

이지은¹ · 조다은¹ · 이안중¹ · 박혜경¹ · 윤금주² · 윤은영³ · 황재삼³ · 전미라² · 강병현^{1*}
 (¹울산과학기술대학교 생명과학과, ²동아대학교 식품영양학과, ³농촌진흥청 곤충생물학과)

장수풍뎅이 유충은 간질환을 치료하기 위한 민간요법으로 전통적으로 많이 사용되어 왔다. 본 연구에서는 유충 분말의 간 보호 효능과 간암억제 효능을 검증하고자 연구를 수행하였다. 먼저 장수풍뎅이 유충의 간 보호 효과를 확인하고자, 간 독성 물질인 diethylnitrosamine (DEN)을 C3H/HeN 수컷 쥐에 복강 주사하여 간 독성 실험쥐 모델을 제작하였다. DEN으로 처리된 쥐에서는 혈중 alkaline phosphatase (ALP) 농도, TUNEL positive 간세포의 숫자, 간 손상으로 인해 형성되는 duct의 개수, 간세포에서의 지방축적, Masson's trichrome 염색에서 콜라겐 염색 정도 등, 급성 혹은 만성 간 손상과 관련된 지표들이 모두 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 장수풍뎅이 유충 동결건조 분말을 함께 경구투여하게 되면, 이와 같은 간 손상의 지표들이 통계적으로 유의미한 수준으로 감소하게 되는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 항암활성 유무를 검증하기 위해, 에탄올로 유충분말 추출물을 먼저 확보한 후, solvent partition 방법을 이용하여 에탄올 추출물을 hexane, ethyl acetate, water 분획물로 분리하였다. 이들 분획물들을 여러 종류의 암세포주에 처리하였을 때, ethyl acetate 분획물이 암세포들에 대해서 아포토시스와 세포괴사와 같은 세포죽음을 유도하는 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 더불어 ethyl acetate 분획물은 암세포의 대사를 교란할 수 있었고, 오토파지를 유도할 수 있는 활성을 가지고 있었다. 결론적으로, 장수풍뎅이 유충은 독성물질로부터 간을 보호할 수 있는 성분과 암세포에 대한 세포죽음을 유도할 수 있는 활성을 가지고 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 향후 분획물들에 대한 추가적인 성분 및 활성 분석 실험으로 약리활성을 가진 물질을 분리할 수 있을 것으로 기대하고 있다.