쌍별귀뚜라미 열수 추출물의 대식세포 염증반응 및 NLRP3 인플라마솜 활성화 억제 효과

박보미¹ · 김소연¹ · 김영남² · 양승돈³ · 서원균⁴ · 한승연⁵ · 유영춘¹

¹건양대학교 의과대학 미생물학교실, ²(주)건강마을, ³(주)우제아이엠
⁴충주위담통합병원 통합의학연구소, ⁵건양대학교 의과대학 해부학교실

Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Gryllus bimaculatus* on Inflammatory Responses and NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages

Bomi Park¹, So Yeon Kim¹, Young Nam Kim², Sung Don Yang³,
Wongyun Seo⁴, Seung Yun Han⁵, and Yung Choon Yoo¹

¹Department of Microbiology and ⁵Department of Anatomy, College of Medicine, Konyang University

²Health Village Ltd., ³Wooje Research Institute for Integrative Medicine Ltd.

⁴Institute of Integrative Medicine and Research, Weedahm Integrative Hospital

ABSTRACT In this study, we investigated the inhibitory effect of the hot-water extract of *Gryllus bimaculatus* (HW-GB) on the inflammatory responses of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells and bone marrow-derived macrophages (BMDM), and partially demonstrated the intracellular mechanisms related to the anti-inflammatory activity of HW-GB. Treatment with HW-GB significantly inhibited the production of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that the expression of TNF- α , IL-6, and iNOS (an NO synthase) mRNAs prominently decreased after the HW-GB treatment. In addition, it was shown that HW-GB inhibited phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK), jun N-terminal kinase (JNK), and p38 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In the analysis of IL-1 β production from BMDM stimulated with LPS+ATP, HW-GB significantly reduced IL-1 β production in a dose-dependent manner through the downregulation of the expression of NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) and apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC) molecules. In the confocal analysis, it was also observed that HW-GB inhibited co-localization of both NLRP3 and caspase-1, and NLRP3 and ASC in LPS+ATP-stimulated BMDM. Collectively, HW-GB has a strong anti-inflammatory activity and hence can be considered an effective functional food candidate for the prevention and treatment of inflammation-related immune diseases.

Key words: *Gryllus bimaculatus*, inflammation, NLRP3, MAPK, caspase-1

서 론

현재 인류의 새로운 식량자원으로 제안되고 있는 소재 중 주목받고 있는 하나가 식용곤충이다(Lange와 Nakamura, 2021). 식용곤충은 영양가가 높고 친환경적이며 경제성이 높은 소재(van Huis 등, 2013; Belluco 등, 2013)이기 때문에 식용곤충의 해외 및 국내 시장 규모는 계속 확대되고 있다

(Dobermann 등, 2017; Baek 등, 2017). 최근 바이오소재로서의 식용곤충에 대한 기능적 및 약리학적 연구가 활발히 진행되고 있으며(Lee와 Kang, 2019), 특히 국내에서는 2000년부터 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*) 연구가 시작되어(Ahn 등, 2015), 만성 관절염 개선(Ahn 등, 2014), 항산화 및 항당뇨 효과(Cho 등, 2019), 간 기능 회복(Hwang 등, 2019), 면역조절(Seo 등, 2004) 등 다양한 효능이 보고

Received 29 November 2021; Revised 31 December 2021; Accepted 3 January 2022

Corresponding author: Yung Choon Yoo, Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, 1059, Gyebaek-ro, Seo-gu, Daejeon 35365, Korea, E-mail: yc_yoo@konyang.ac.kr

Author information: Bomi Park (Graduate student), So Yeon Kim (Graduate student), Seung Yun Han (Professor), Yung Choon Yoo (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되었다. 하지만 쌍별귀뚜라미에 관한 연구는 아직 초보적인 단계에 머물러 있어 다양한 생리활성 탐색과 작용기전 및 활성 성분 규명 등 많은 노력이 필요한 상황이다.

면역계는 외부 항원과 병원체로부터 생체를 보호하는 기능을 하며(Iontcheva 등, 2004), 특히 선천면역세포인 대식세포는 nitric oxide(NO)를 비롯하여 여러 종류의 사이토카인을 생성하여 면역기능을 조절한다(Kim 등, 2020; Su, 2002). 한편 대식세포는 NO와 전염증성 사이토카인으로 알려진 종양괴사인자(TNF- α)와 인터루킨-6(IL-6) 등을 생성하는데(Diefenbach 등, 1998), 이들은 염증매개인자로 불리며 다양한 염증 질환의 원인이 되기도 한다(Dumitru 등, 2000; Willoughby, 1975). 즉 염증은 항원의 제거와 감염억제 등에 필요한 면역반응이기도 하나, 자칫 과도하게 활성화되었을 경우에는 조직손상이나 각종 질환의 발병 요인으로 작용하기도 한다(Ferrero-Miliani 등, 2007). 그러므로 이들 염증매개인자의 생성경로를 차단하여 분비량을 억제하는 것은 염증매개 질환을 개선하고 치료하는 데 있어서 매우 중요하다(Heo 등, 2010; Stokes 등, 2002).

한편 인플라마솜(inflammasome)은 NOD-like receptor (NLR)의 하나로, 병원균의 침입이나 스트레스와 같은 위험인자에 의해 세포가 자극을 받았을 때 유발되는 여러 종류의 단백질에 의해 형성되는 복합체이다(Swanson 등, 2019). 인플라마솜에는 NAIP/NLRC4, NLRP3/6/7, AIM2/IFI16 등이 알려져 있으며(Zheng 등, 2020), 이 중에서 가장 많이 연구된 것은 NLRP3이다. NLRP3 인플라마솜은 3개의 분자로 구성되며, 센서 역할을 하는 NLRP3, 어댑터 작용을 하는 ASC, 그리고 효소 활성을 갖는 caspase-1 등이 결합(assembly)하여 약 700 kDa의 단백질 복합체를 형성한다(Swanson 등, 2019). NLRP3는 대식세포가 염증을 유도하는 자극원에 노출된 경우, 전구형 사이토카인인 pro-IL-1 β 와 pro-IL-18을 각각 활성화된 IL-1 β 와 IL-18로 전환시키는 효소인 caspase-1을 활성화시켜 염증을 유발한다(Swanson 등, 2019). 그러므로 NLRP3 인플라마솜의 활성화를 억제하는 것은 염증반응을 제어하는 중요한 타겟이 된다.

본 연구에서는 쌍별귀뚜라미의 항염증 효과를 조사하기 위한 목적으로 쌍별귀뚜라미 열수 추출물(HW-GB)을 이용하여 RAW 264.7 대식세포와 골수유래 대식세포(BMDM)의 염증반응에 대한 억제 효과를 측정하고, 이에 관련된 세포 내 작용기전을 해석하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

쌍별귀뚜라미 시료는 건조된 상태의 귀뚜라미 전충을 (주)건강마을(도시, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 쌍별귀뚜라미를 파쇄기로 분쇄하여 분말화한 후, 시료 10배량의 3차 증류수를 넣어 70~75°C에서 교반하면서 12시간 추출하였다. 추출물을 원심분리(5,000 rpm, 20분)하여 상등액을

을 분리하고, filter paper(Whatman No.1, GE Healthcare, Leuven, Belgium)로 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 준비된 시료(HW-GB)의 단백질량을 BCA법에 의해 측정한 결과 0.26 ± 0.04 g/g(약 26%)이었으며, 사용 시까지 -20°C에서 보관하였다.

세포 배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포(KTCC, Seoul, Korea)는 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하며, 80% 이상 자란 시점에서 계대 배양하였다(Kim 등, 2020). 골수유래 대식세포(BMDM)는 C57BL/6 마우스(Raon Ltd., Yongin, Korea)의 대퇴골 및 경골로부터 분리한 골수세포를 이용하여 분화시켰다(Billon 등, 2019). 골수세포를 30% L929 conditioned medium, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% Minimum Essential Medium NEAA 및 1% sodium pyruvate가 함유된 Iscove's Modified Dulbecco's Media 배지에서 6일간 배양한 후 배양된 세포를 실험에 사용하였다. 동물실험은 건양대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다(승인번호 P-21-06-A-01).

세포독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 HW-GB의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Kim 등, 2020). RAW 264.7 세포(5×10^4 cells/well)를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 안정화시키고 여러 농도의 HW-GB를 첨가하였다. 12시간 전처리 후 LPS(*E. coli* serotype O55:B5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 1 μ g/mL로 세포에 첨가하고 24시간 동안 처리하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 용액(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하고 2시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 반응시킨 후 상층액을 제거하고 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide로 녹여 microplate reader(ELx 800-PC, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 및 cytokine 정량

세포독성 측정과 동일한 조건으로 처리한 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 분비된 NO를 정량하기 위하여 Griess reagent 40 mg/mL를 well당 50 μ g씩 첨가하여 실온에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. NO 생성량은 농도별 표준곡선을 이용해 정량하였다. 상등액 내의 TNF- α 와 IL-6 생성량은 ELISA kit(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)을 이용하여 microplate reader(450 nm)에서 흡광도 측정을 통해 정량하였다. 한편 BMDM으로부터 IL-1 β 의 생성도 ELISA kit(BD Bioscience)을 통해 정량하였다. 분화가 끝난 BMDM(2×10^5 cells/200 mL/well)을 48 well에 분주하고 약 6시

간 동안 안정화시켰다. 안정화시킨 세포에 일정한 농도의 HW-GB를 5시간 동안 전처리한 후 각 세포를 LPS(1 µg/mL)로 2시간 동안 자극하였다. 그 후 ATP(5 mM)를 40분간 처리하고 세포의 상등액을 분리하여 IL-1β의 발현량을 측정하였다.

RT-PCR 분석법

RAW 264.7 세포(5×10^5 cells/well)를 다른 실험조건과 동일하게 6-well plate에 배양시키고 HW-GB를 농도별로 처리하였다. LPS를 처리하고 6시간 후에 상등액을 제거하였다. RNA 분리는 TRIzol reagent(iNtRON Biotechnology, Lynnwood, WA, USA)를 사용하였다. 정량한 RNA로부터 cDNA synthesis kit(Power cDNA synthesis kit, iNtRON Biotechnology, Kirkland, WA, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. iNOS, IL-6, TNF-α, β-actin용 PCR 프라이머는 Cosmo Genetech(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였고 각각의 프라이머 서열은 Table 1에 나타나 있으며, 각 밴드는 Chemiluminescence imaging system (BD Bioscience)을 사용하여 분석하였다.

Western Blot analysis

RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/well)를 다른 실험과 동일한 조건에서 배양한 후 HW-GB를 농도별로 처리하고, LPS 처리 10분 후에 상등액을 제거하였다. Cold PBS로 2회 세척한 후 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, protease와 phosphatase inhibitor cocktail로 lysis 시킨 후 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 10 min)하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 BCA protein assay kit(Sigma-Aldrich Co.)으로 정량하고 20 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE)에서 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 nolyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 2시간 동안 transfer 하였다. 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 하고 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK에 대한 항체인 rabbit monoclonal antibodies(BD Bioscience)를 1:5,000으로 희석하여 반응시켰다. 그 후 각 항체에 대한 2차 항체인

HRP(horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit IgG를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 TBST(TBS containing 0.05% Tween-20)로 5분씩 총 8회 세척한 뒤 ECL 기질과 반응시켜 Chemiluminescence imaging system(BD Bioscience)을 이용하여 밴드를 분석하였다. BMDM의 경우, 1×10^6 cells/mL의 농도로 6-well plate에 분주하고 HW-GB를 처리하였다. LPS 처리 2시간 후에 ATP를 40분간 처리한 다음 세포배양 상등액과 세포 pellet을 각각 따로 회수하였다. 상등액에 15 µL의 100% TCA, 72 µL의 10% cholic acid를 첨가하여 pellet을 만들고 cold acetone으로 세척하였다. 그 후 세포 pellet에 10 µL의 0.2 NaOH, 35 µL의 증류수를 $4 \times$ SDS-PAGE sample buffer 용액과 혼합한 후 5분간 끓였다. 또한 세포 pellet은 RAW 264.7 세포의 lysis와 동일한 방법으로 용해하여 단백질을 분리하였다. 상등액 내의 caspase-1과 IL-1β, 그리고 세포 내 pro caspase-1, pro IL-1b, ASC 및 NLRP3의 발현은 cell lysis 단백질을 이용하여 분석하였으며, 이들 분자에 대한 항체는 BD Bioscience사의 제품을 사용하였다.

공초점 현미경(Confocal Microscopy) 분석

NLRP3 활성화에 관여하는 분자들의 결합(assembly)은 공초점 현미경으로 확인하였다. 각 조건으로 처리한 BMDM 세포를 slide coverslip에서 배양한 후, 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 그 후 0.1% Triton X-100으로 투과시켜 PBS로 세척하고, goat anti-NLRP3(1:400, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-ASC(1:400, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) 또는 rabbit anti-caspase-1(1:400, Abcam) 항체로 반응시켰다. 3회 세척 후, 각 슬라이드를 공초점 현미경 분석을 위해 2차 항체인 Alexa 488 혹은 Alexa 594 antibody(Abcam)를 처리하고 4°C에서 7시간 동안 반응시켰다. 3회 세척 후, Hoechst 33342 (1:1,000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 3분 동안 실온에서 염색하였다. PBS로 다시 세척한 후 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

통계처리

본 연구에서 얻어진 실험 결과의 통계분석은 Student's

Table 1. Sequences of the primers for RT-PCR

Primer		Sequence
iNOS	Sense	5'-GTAGTGACAAGCACATTTGG-3'
	Anti-sense	5'-GGCTCCACTTTTCACTCTGC-3'
TNF-α	Sense	5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3'
	Anti-sense	5'-CTCCCTTTCAGAACTCAGG-3'
IL-6	Sense	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
	Anti-sense	5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'
β-actin	Sense	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'
	Anti-sense	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

two-tailed *t*-test 또는 Log-rank(Mantel-Cox) test를 이용하여 분석하였으며, $P < 0.05$ 이상을 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

세포독성평가

RAW 264.7 세포 염증반응에 대한 HW-GB의 염증 억제 활성을 측정하기 위하여 먼저 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통해 측정하였다. Fig. 1A에서 보이는 것과 같이 HW-GB는 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이후 실험에서는 독성이 없는 20 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 실시하였다.

NO 및 전염증성 사이토카인 생성 억제

대식세포가 LPS의 자극을 받게 되면 염증매개인자인 NO와 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 등이 다량으로 분비되어 염증을 유도한다(Kim 등, 2007; Kim 등, 2020). 그러므로 이들 염증매개인자의 생성억제는 항염증 활성의 중요한 지표가 된다. LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 NO,

TNF- α 및 IL-6 등 염증매개인자 생성에 대한 HW-GB의 억제 효과를 조사하였다. 그 결과 HW-GB의 처리에 의해 LPS 자극 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO, TNF- α 및 IL-6의 생성량이 HW-GB의 처리농도에 의존하여 유의하게 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 1B~D). 한편 LPS에 의한 대식세포 염증유도 과정에서는 세포 내에서 NO의 합성효소인 iNOS와 전염증성 사이토카인들의 mRNA 발현의 증가가 선행된다(Hwang 등, 2019). Fig. 1에서 나타난 HW-GB의 염증매개인자의 생성억제가 이들 분자의 mRNA 발현억제에 의한 것인가를 알아보기 위하여 이들 mRNA의 세포 내 발현량을 측정하였다. HW-GB를 처리한 군에서 iNO, TNF- α 및 IL-6 mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이들 결과로 HW-GB는 LPS 자극을 받은 RAW 264.7 대식세포 내 염증매개인자의 mRNA 발현을 저해하여 염증반응을 억제하는 것으로 추정되었다.

MAPK 관련 신호전달 억제

대식세포와 같은 면역세포가 자극원에 의해 자극을 받을 경우, 여러 신호전달계가 작용하여 활성화 또는 염증반응을 유도하게 된다. 이러한 신호전달계 중 ERK1/2, JNK 및 p38

Fig. 1. HW-GB inhibits the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were pre-treated with the indicated doses of HW-GB, and subsequently stimulated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cell growth and the level of NO, TNF- α , and IL-6 production in cell cultures were determined as described in Materials and Methods. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control (LPS-stimulated group) by Student's two-tailed *t*-test.

Fig. 2. HW-GB suppresses the expression of iNOS, TNF- α , and IL-6 mRNA in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Total RNAs of RAW 264.7 cells were collected 6 hr after LPS stimulation. The level of mRNAs of TNF- α (A), IL-6 (B), and I-NOS (C) was analyzed by RT-PCR using the primers described in Table 1. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with the control (LPS-stimulated group) by Student's two-tailed t -test.

등의 인산화효소로 구성된 MAPK는 serine-threonine 활성화 효소로, LPS 자극을 받은 대식세포에 있어서 염증유도에 중요한 매개인자로 작용한다(Lu 등, 2012). HW-GB의 항염증 활성이 MAPK 인산화 억제에 의한 것인가를 확인하기 위하여 ERK, JNK 및 p38 분자의 인산화를 측정하였다. LPS를 자극하고 15분 후에 세포 lysate를 이용하여 이들 분자의 인산화를 western blot에 의해 분석한 결과, HW-GB를 처리함으로써 염증 유도에 기여하는 3종류의 효소 분자의 인산화가 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다(Fig. 3). Fig. 1에서 Fig. 3까지의 결과를 종합해보면 HW-GB를 처리할 경우 LPS 자극에 의해 활성화는 MAPK 효소의 인산화가 억제되고, 이로 인해 NO 합성효소인 iNOS와 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현이 저해되며, 결과적으로 염증매개인자인 NO, TNF- α 및 IL-6의 생성이 감소되어 염증반응이 억제되었다는 것을 시사한다.

BMDM에서 IL-1 β 생성 억제

NLR의 하나인 인플라마솜은 외부 자극원에 의해 세포가 자극을 받았을 때 유도되는 여러 종류의 단백질 복합체이다(Swanson 등, 2019; Zheng 등, 2020). 대식세포가 염증인

자에 노출된 경우, 인플라마솜의 하나인 NLRP3는 caspase-1 효소를 활성화시켜 활성형 IL-1 β 와 IL-18을 생성하여 염증을 유발한다(Swanson 등, 2019). 그러므로 NLRP3 인플라마솜의 활성화 억제를 통해 IL-1 β 와 IL-18과 같은 염증성 사이토카인의 생성을 저해하는 것은 염증조절에 매우 중요한 기전이다. 위의 실험 결과에서 HW-GB가 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 대식세포의 염증반응을 억제하는 것이 확인되었으므로, 다음으로 HW-GB가 NLRP3 인플라마솜 매개 염증반응에 대해서도 억제 효과를 나타내는가를 조사하였다. HW-GB에 의한 NLRP3 인플라마솜 억제 활성은 골수세포로부터 분화시킨 BMDM을 LPS와 ATP로 자극하여 IL-1 β 의 생성을 유도하는 모델을 이용하였으며, 세포 배양액 중에 분비된 IL-1 β 의 양을 정량하여 HW-GB 처리군과 비교하였다. 또한 western blot 분석을 통해 NLRP3 인플라마솜 활성화에 관련하는 세포 내 단백질(NLRP3, ASC 및 caspase-1)의 발현 변화를 분석하였다. BMDM 세포에 LPS+ATP를 처리한 군에서 IL-1 β 의 생성이 현저하게 증가하여 NLRP3 활성화가 유도되는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 한편 HW-GB를 처리함으로써 LPS+ATP에 의해 생성된 활성형 IL-1 β 의 분비가 유의하게 억제되었으며, 이

Fig. 3. Treatment with HW-GB inhibits MAPK activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with various doses of HW-GB and stimulated by LPS (100 ng/mL) for 10 min. Cells were lysed with cell lysis buffer and then centrifuged. The protein (20 mg) of cell lysates was subjected to immunoblot analysis for detection of phosphorylated MAPK enzymes such as ERK (A), JNK (B), and p38 (C). Actin was used as an internal control. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control (LPS-stimulated group) by Student's two-tailed *t*-test.

러한 억제 활성은 HW-GB 처리농도에 의존적인 것으로 나타났다(Fig. 4).

Fig. 4. HW-GB inhibits the production of IL-1b from LPS + ATP-stimulated BMDM. BMDMs were primed with LPS (1 ng/mL) for 2 h and stimulated with ATP (5 mM) for 40 min as described in Materials and Methods. The level of IL-1b was determined using a ELISA kit. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control (LPS+ATP-stimulated group) by Student's two-tailed *t*-test.

NLRP3 인플라마좀 활성화 억제

NLRP3 인플라마좀은 센서 역할을 하는 NLRP3, 어댑터 작용을 하는 ASC, 그리고 효소 활성을 갖는 caspase-1 등 3종류의 분자가 결합(assembly)되어 약 700 kDa의 단백질 복합체를 형성한다. 그 후 pro-caspase-1(45 kDa)은 활성형 caspase-1(10 kDa)으로 전환되고, 이 효소가 pro-IL-1β(35 kDa)를 분비형 IL-1β(17 kDa)로 절단하여 세포 밖으로 분비하게 된다. 즉 NLRP3 인플라마좀 활성화에 의한 IL-1β 분비는 NLRP3, ASC 및 caspase-1 효소의 연속적 결합과 활성형 caspase-1 효소의 생성이 전제가 된다 (Swanson 등, 2019). BMDM 세포의 염증반응에서 IL-1β의 생성을 억제한 HW-GB의 항염증 활성이 caspase-1 효소의 활성화와 NLRP3 인플라마좀 결합의 억제와 관련되어 있는 가를 western blot을 통해 분석하였다. LPS+ATP로 자극한 BMDM 세포의 세포배양액 중의 IL-1β는 ELISA 정량 실험과 동일하게 억제되었으며, 또한 활성형 caspase-1 효소의 발현량도 함께 억제된 것으로 확인되었다(Fig. 5). 또한 NLRP3 인플라마좀 형성에 관여하는 3분자의 발현을 측정한 결과, NLRP3와 ASC의 발현량이 HW-GB의 처리농

Fig. 5. HW-GB suppresses the secretion of caspase-1 and IL-1b in culture supernatants of LPS+ATP-stimulated BMDM. The experimental conditions were identical with those of Fig. 4. Expression levels of caspase-1 (A) and IL-1b (B) were observed by western blot assay using cell lysate and culture supernatant of BMDM cells that pre-treated with various doses of HW-GB and stimulated with LPS + ATP. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control (LPS + ATP-stimulated group) by Student's two-tailed t -test.

도에 의존하여 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 한편 LPS + ATP로 처리한 BMDM 세포에서 NLRP3, ASC 및 caspase-1 등 3분자의 결합을 공초점 현미경을 이용하여 가시적 분석을 실시하였다. 먼저 NLRP3와 caspase-1의 결합을 검토한 결과, 정상세포에서는 관찰되지 않던 NLRP3와 caspase-1 분자의 co-localization(merge된 화면의 노란색 혹은 오렌지색 부분)이 LPS+ATP 자극에 의해 크게 증가하였으나, HW-GB 처리에 의해 이들 분자의 co-localization은 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7A). NLRP3와 ASC의 결합에 있어서도 동일하게, LPS+ATP 자극에 의해 증가한 두 분자에 의한 co-localization이 HW-GB 처리에 의해 뚜렷하게 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 7B). 이러한 결과는 HW-GB에 의한 IL-1β 분비 억제기전에는 NLRP3와 ASC의 발현억제를 통한 NLRP3 인플라마솜 활성화의 차단과 이로 인한 활성화형 caspase-1 효소의 생성억제가 관련되어 있음을 의미한다.

이상의 결과로부터 HW-GB는 대식세포의 염증반응에 있어서 MAPK 효소의 활성화를 통해 NO와 전염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-6)의 생성을 억제하는 것은 물론, NLRP3 인플라마솜의 활성화를 억제하여 IL-1β의 분비를

저해하는 항염증 활성을 지닌 것으로 확인되었다. 이는 HW-GB가 다양한 염증 질환의 개선 및 치료를 위한 기능성 식품 혹은 의약 소재로서 응용 가능한 유용한 바이오 소재임을 시사하는 것이다.

요 약

쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 전 세계 32종의 귀뚜라미 중 유일하게 식용으로 활용 가능한 종으로, 항산화 작용, 항당뇨 효과, 간 기능 회복 등 다양한 생리활성이 지닌 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 쌍별귀뚜라미의 열수추출물(HW-GB)을 이용하여 RAW 264.7 세포에서의 염증 억제 활성화와 골수유래 대식세포(BMDM)에서 NLRP3 활성화 억제에 의한 항염증 활성을 조사하였다. 그 결과 HW-GB은 독성이 없는 농도에서 염증매개인자인 NO를 비롯하여 TNF-α 및 IL-6 등 전염증성 사이토카인의 생성은 물론, NO 합성효소인 iNOS와 TNF-α 및 IL-6의 mRNA 발현도 억제하였다. 한편 HW-GB는 LPS 자극 RAW 264.7 세포 내 신호전달계에 있어서 ERK, JNK 및 p38과 같은 MAPK 효소의 인산화를 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한

Fig. 6. Treatment of HW-GB down-regulates the expression of NLRP3 and ASC in BMDM stimulated with LPS + ATP. BMDMs were pre-treated with the indicated doses of HW-GB, and stimulated with LPS + ATP. The expression of ASC (A) and NLRP3 (B) associated with NLRP3 inflammasome activation in LPS + ATP-stimulated BMDM was detected by immunoblot assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control (LPS + ATP-stimulated group) by Student's two-tailed t -test.

LPS+ATP로 자극된 골수유래 대식세포 염증반응에 대한 HW-GB의 억제 효과를 조사한 결과, HW-GB는 LPS+ATP로 자극된 BMDM 세포로부터의 IL-1 β 분비를 유의하게 억제하였으며, 이러한 IL-1 β 분비 억제 활성은 NLRP3와 ASC 분자의 세포 내 발현억제를 통한 NLRP3 인플라마좀 활성화의 저해에 의한 것으로 밝혀졌다. 종합해 보면 HW-GB는 높은 항염증 활성을 지닌 새로운 바이오 소재로서 염증 관련 질환의 예방과 치료에 유효한 식품 혹은 의약 소재로 응용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원(과제번호 20210656)과 2016년도 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업(Grant No. 316007-5) 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

Ahn MY, Han JW, Hwang JS, Yun EY, Lee BM. Anti-inflammatory effect of glycosaminoglycan derived from *Gryllus bimaculatus* (a type of cricket, insect) on adjuvant-treated chronic arthritis rat model. *J Toxicol Environ Health A*. 2014. 77: 1332-1345
Ahn MY, Hwang JS, Yoon HJ, Park K, Kim S, Kim EM. Fasting

conditions and dietary phenomena of edible cricket (*Gryllus bimaculatus*). *J Seric Entomol Sci*. 2015. 53:78-81.
Baek M, Hwang JS, Kim MA, Kim SH, Goo TW, Yun EY. Comparative analysis of nutritional components of edible insects registered as novel foods. *J Life Sci*. 2017. 27:334-338.
Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi CC, Paoletti MG, Ricci A. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013. 12:296-313.
Billon C, Murray MH, Avdagic A, Burris TP. ROR γ regulates the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2019. 294:10-19.
Cho HT, Sim KS, Kim Y, Chang MH, Kim T, Lee SH, et al. Anti-diabetic activity of edible insect *Gryllus bimaculatus* extracts in insulin-deficient diabetic mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:1165-1171.
Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, et al. Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*. 1998. 8:77-87.
Dobermann D, Swift JA, Field LM. Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutr Bull*. 2017. 42:293-308.
Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, et al. TNF- α induction by LPS is regulated post-transcriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 2000. 103:1071-1083.
Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol*. 2007. 147:227-235.
Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Ahn GN, Kang SM, Kang DH, et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin

A) NLRP3/caspase-1 co-localization

B) NLRP3/ASC co-localization

Fig. 7. HW-GB blocks the assembly of NLRP3, caspase-1 and ASC in LPS + ATP-stimulated BMDM. BMDM cells were cultured on slide coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde. The cells were permeabilized with 0.1 % Triton X-100, washed three times with PBS, and reacted with each antibody against NLRP3, ASC or caspase-1. After reaction with secondary antibody (Alexa 488 or Alexa 594 antibody) at 4°C for 7 h, the cells were stained with Hoechst 33342 (1:1,000) for 3 min at room temperature. After washing again with PBS, co-localization of NLRP3/caspase-1 (A) and NLRP3/ASC (B) was observed using a confocal microscope. The yellow and orange parts indicate the assembled state by co-localization of the two molecules.

isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010. 48: 2045-2051.

Hwang BB, Chang MH, Lee JH, Heo W, Kim JK, Pan JH, et al. The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure. *Nutrients.* 2019. 11:857. <https://doi.org/10.3390/nu11040857>

Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun.* 2004. 72:2312-2320.

Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull.* 2007. 30:2045-2051.

Kim SY, Lee KB, Cho YH, Jeong DY, Yang HJ, Ryu MS, et al. Inhibitory effect of the extract of cheonggukjang fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* SCGB 1 on LPS-induced inflammation and inflammatory diseases. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2020. 49:659-667.

Lange KW, Nakamura Y. Edible insects as future food: chances

and challenges. *J Future Foods.* 2021. 1:38-46.

Lee JT, Kang KO. A study on popularization and vitalization of edible insects by changing consumer perceptions and developing recipes: focus on college students in Seoul. *Food Service Ind J.* 2019. 15:49-68.

Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, et al. Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 2012. 12:175-181.

Seo DH, Hwang SY, Han J, Koh SK, Kim I, Ryu KS, et al. Immune-enhancing activity screening on extracts from two crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Teleogryllus emma*. *Entomol Res.* 2004. 34:207-211.

Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med.* 2002. 33:1026-1036.

Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002. 283:G256-G265.

Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome:

- molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019. 19:477-489.
- van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, et al. Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO, Rome, Italy.* 2013. p 67-88.
- Willoughby DA. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis.* 1975. 34:471-478.
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020. 6:36. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>