



대식세포를 이용한 수벌 번데기 추출물의 염증 억제 활성

김효영, 우순옥, 김세건, 방경원, 최홍민, 문효정, 한상미*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Anti-inflammatory Activities of Drone Pupae (*Apis mellifera* L.) in Macrophages

Hyo Young Kim, Soon Ok Woo, Se Gun Kim, Kyeong Won Bang, Hong Min Choi, Hyo Jung Moon and Sang Mi Han*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract

Macrophages play important roles in host immune defense. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages induce the expression of inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS), which stimulates NO production. In the present study, we evaluated the inhibitory effect on NO production from drone pupae (*Apis mellifera* L.) in LPS-induced RAW264.7 macrophages. The methanol extract and its subsequent fractions of drone pupae were prepared using several solvents with different polarities. The methanol extract and its fractions did not exhibit cytotoxicity to RAW264.7 cells but did inhibit cell viability at the hexane fraction. Moreover, the compounds significantly inhibited NO production except butanol fraction. These results indicate that ethyl acetate fraction has the properties of anti-inflammation, suggesting drone pupae may be a candidate for functional materials.

Keywords

Apis mellifera, Drone pupae, Nitric oxide, Macrophage

서 론

염증(inflammation)은 물리적인 상처나 미생물에 감염되었을 때 손상된 조직을 재생하고 신체를 방어하기 위해 일어나는 선천성 면역(innate immunity)반응으로 알려져 있다(Medzhitov, 2008). 하지만 지속적인 염증반응은 제2형 당뇨병이나 자가면역질환 및 종양 등 각종 질환의 발병 요인으로 작용하기도 한다(Hofseth and Ying, 2006). 대식세포(macrophage)는 선천면역을 담당하는 주요세포로 LPS, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)과 사이토카인 등에 의해 활성화되어 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 등의 염증성 사이토카인과 nitric

oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증인자들의 생성에 관여한다(Akira *et al.*, 2006). Nitric oxide synthase (NOS)는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)와 inducible NOS (iNOS) 세 개의 isoform 형태로 존재한다. 그 중에서 iNOS는 interferon- γ , LPS 및 전염증성 사이토카인의 자극을 통해 L-arginine으로부터 nitric oxide (NO) 생성을 촉진시키는 효소로 알려져 있다(Guo *et al.*, 2012).

NO는 free radical인 활성질소종(reactive nitrogen species: RNS)의 일종으로 superoxide 음이온(O₂⁻)과 쉽게 반응하고 독성이 강한 산화제인 peroxyntirite (ONOO⁻)를 생성하여 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을

일으킨다(Radi *et al.*, 1991). 따라서 NO 생성을 억제하는 천연물 소재는 항염증 치료제 개발을 위한 방편으로 관심이 높다고 할 수 있다.

최근 지구온난화로 인한 가축이나 어류 등의 생산량 감소로 인해 단백질 공급에 차질이 생길 것으로 예상된다. 유엔식량농업기구(FAO)에서는 육류 대체품으로 곤충섭취를 대안으로 제시하였다(van Huis *et al.*, 2013). 식용곤충은 식용을 목적으로 하는 곤충을 말하며 일반적으로 조단백질, 조지방, 식이섬유 및 비타민 등을 함유하고 있어 미래 식량자원으로 주목받고 있다(Bukkens, 1997). 현재 네덜란드, 덴마크를 중심으로 곤충식품을 식량자원으로 이용하기 위한 노력이 이루어지고 있으며 우리나라에서도 7종의 곤충(누에, 메뚜기, 백강잠, 갈색거저리 유충, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충, 쌍별귀뚜라미)이 식품원료로 등록된 상황이다.

꿀벌 군집 가운데 수벌은 일벌과 달리 여왕벌과 교미하는 일 외에는 생산적 가치가 낮지만 수벌 번데기를 식품원료로 이용한다면 경제적 소득 및 식품 소재의 다양화 측면에서 중요한 자원이 될 수 있을 것으로 기대하고 있다. 최근 식품원료로 사용하기 위하여 수벌 번데기의 영양학적 측면과 유해미생물에 대한 안전성 등에 많은 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

따라서 본 연구에서는 수벌 번데기에 대한 다양한 효능 구명을 통해 고부가가치 식품 소재로 활용하고자 수벌 번데기 메탄올 추출물을 이용하여 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 NO 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

본 실험에 사용한 수벌 번데기는 2018년도 충청남도 청양에서 서양종꿀벌을 사육하는 양봉농가에서 생산한 17~23일령의 수벌 번데기를 이용하였고 채취 즉시 냉동보관(-20°C)하여 실험에 사용하였다. 분석시료 제조 방법은 Kim *et al.* (2019)에 따라 제조하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)과 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 항생제 (penicillin/streptomycin)는 Gibco (grand Island, NY, USA)에서 구매하였다. Fetal

bovine serum (FBS)는 GenDEPOT (GenDEPOT, TX, USA)로부터 구입하였고, lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2. 추출물 제조 및 용매분획

건조된 수벌 번데기를 분말로 만든 후에 메탄올을 첨가하여 3시간 동안 초음파세척기 (Branson Ultrasonics, 8510, CT, USA)로 추출한 다음 여과지로 불순물을 제거하였다. 여과한 추출물을 rotary vacuum evaporator (Eyela, N-1200A, Tokyo, Japan)로 40°C에서 감압농축하여 추출물을 얻었다. 용매 분획은 극성의 차이를 이용하여 hexane, ethyl acetate 및 butanol 순서로 분획물을 얻었다. 분리된 각각의 용매 분획물은 상기와 동일한 방법으로 감압농축하여 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 10% FBS와 penicillin (100 units/mL) 및 streptomycin (100 µg/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

4. 세포생존율

세포생존율은 EZ-Cytox cell viability assay kit (Dogen, Suwon, Korea)를 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 시험법에 따라 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 최종농도가 2×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 수벌 번데기 추출물 및 용매분획물을 50 µg/mL 농도로 처리하고 24시간 배양 후 EZ-Cytox 시약 10 µL를 처리한 다음 4시간 동안 배양 후 microplate reader (BioSurplus, Spectramax M2, CA, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

5. NO 측정

RAW264.7 세포를 96 well plate에 최종농도가 2×10^5

cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 수벌 번데기 추출물 및 용매분획물을 50 µg/mL 농도로 처리하고 2시간 후에 LPS (1 µg/mL)를 넣고 18시간 배양하였다. NO 측정에는 NO plus detection kit (iNtRON, MA, USA)를 이용하였으며, 제조사에서 권장하는 시험법에 따라 진행하였고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선(Nitrite)을 작성하여 NO 생성량을 산출하였다.

6. 통계처리

모든 데이터는 3회 반복 측정된 후 평균치±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Statistical analysis system (SAS enterprise guide, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 one way ANOVA 법으로 분산분석을 실시하였으며, 조사항목들 간의 유의성 검증은 Tukey's의 다중 검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

수벌 번데기 건조분말 시료 100 g을 methanol로 추출한 후 감압농축하여 추출물 8.3 g (8.3%)을 얻었다. 그리고 여기서 얻어진 추출물 8.3 g을 증류수로 용해시킨 후에 hexane, ethyl acetate 및 butanol 순으로 분획하였다. 그 결과 hexane 분획물 2.3 g (27.71%), ethyl acetate 분획물 296 mg (3.56%), butanol 분획물 824 mg (9.92%) 및 물 분획물 3.29 g (39.63%)을 얻었다. 수벌 번데기 추출물에 대한 분획물 중 ethyl acetate 분획물 수율이 3.56%로 가장 낮았고 물 분획물이 39.63%로 가장 높은 수율을 보였다. 대식세포는 여러 조직에 존재하는 면역세포로서 이물질 침입이나 상처 발생 시 가장 먼저 인식하여 급성 염증반응을 개시하는 역할을 한다(Willeaume *et al.*, 1996). 본 연구에서는 RAW264.7 세포에서 수벌 번데기 추출물 및 용매분획물의 세포독성을 확인하기 위해 EZ-Cytox cell viability assay kit를 이용하였다(Fig. 1). 실험 결과 대조군 대비 hexane 분획물에서 90%의 세포생존율을 보여 유의적인 차이를 나타내었고 나머지 시료는 세포독성이 나타나지 않았다. NO는 정상적인 농도로 존재하면 대식세포의 항

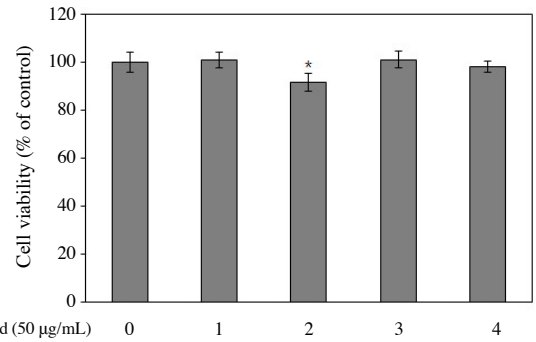


Fig. 1. Effects of compounds on cell viability in RAW264.7 cells. Cell viability was measured using an EZ-Cytox cell viability assay kit. Data are presented as the mean±SD (n=3). * $p < 0.05$ vs. control cells. 1: Methanol extract, 2: Hexane fraction, 3: Ethyl acetate fraction 4: Butanol fraction.

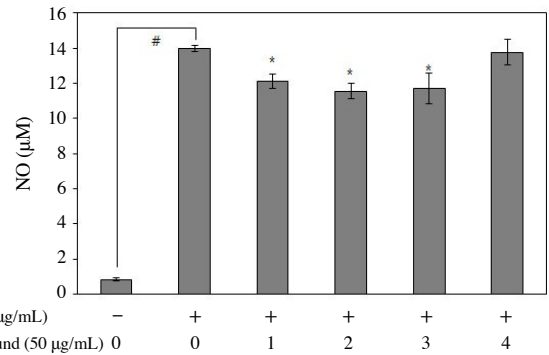


Fig. 2. Effects of compounds on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-treated with compounds (50 µg/mL) for 2 h and then co-treated with LPS (1 µg/mL) for 18 h. Data are presented as the mean±SD (n=3). # $p < 0.05$ vs. control cells, * $p < 0.05$ vs. LPS-treated cells. 1: Methanol extract, 2: Hexane fraction, 3: Ethyl acetate fraction 4: Butanol fraction.

균 활성, 세포의 신호전달 및 감염성 병원체에 대한 억제 등 다양한 기능을 가지고 있다(Hyun *et al.*, 2015). 반면 생체 내 과발현된 NO는 독성 radical로 작용하여 조직 손상 뿐만 아니라 뇌막염, 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다고 알려져 있다(Kawamata *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001). 우리는 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 수벌 번데기 추출물 및 용매분획물의 NO 생성 저해 활성을 알아보고자 하였다(Fig. 2). 그 결과 LPS 무처리군에 비해 LPS 처리군에서 NO 생성량이 크게 증가하였지만 50 µg/mL 농도의 시료 처리군에서는 butanol 처리군을 제외하고 LPS 처리군과 비교하여 NO 생성량을 유의적으로 억제하였다(methanol 처리군: 13.20%, hexane 처리군: 17.30%, ethyl acetate 처리군:

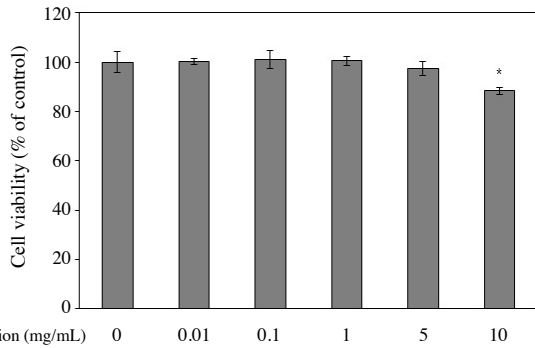


Fig. 3. Effects of ethyl acetate fractions on cell viability in RAW264.7 cells. Cell viability was measured using an EZ-Cytox cell viability assay kit. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05 vs. control cells.

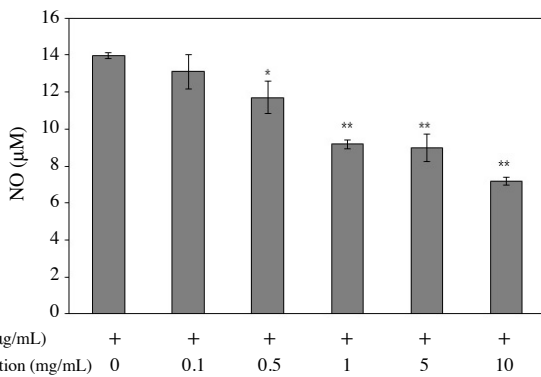


Fig. 4. Effects of ethyl acetate (EA) fractions on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-treated with various concentration of EA fractions for 2 h and then co-treated with LPS (1 µg/mL) for 18 h. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). # p < 0.05 vs. control cells, * p < 0.05 vs. only LPS-treated cells.

16.19%, butanol 처리군: 1.61% 억제). 가장 효능이 좋았던 ethyl acetate 추출물에 대한 세포독성 및 NO 생성량 측정을 다양한 농도별로 수행하였다. 그 결과 5 mg/mL까지는 세포 생존에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으나 10 mg/mL에서는 세포 독성(생존율 88.2%)을 유발하였다 (Fig. 3). 또한 NO 생성량 억제 효율은 ethyl acetate 추출물 처리량이 높을수록 효과적이었으나 1 mg/mL 이상의 농도에서는 농도 의존성이 높지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 4).

Lee and Kim (2019) 연구에 따르면 LPS 유도된 RAW264.7 세포에서 식용곤충인 쌍별귀뚜라미를 3 mg/mL을 처리하였을 때 높은 NO 저해 활성을 보였지만, 본 실험 결과는 더 낮은 농도인 1 mg/mL에서 유사한 활성을

나타내었다. 또한, Yoon *et al.* (2014)에 의하면 벼메뚜기 에탄올 추출물에서 항염증 효능을 갖는다고 보고되었다. 종합하면 수벌 번데기의 ethyl acetate 분획물에서 세포독성이 적고 NO 생성 억제 활성이 높았고 나아가 세부적인 분리 연구를 통해 주요성분을 밝히고 분자적 수준에서 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

적 요

본 연구에서는 LPS에 의해 염증을 유도한 RAW264.7 세포에서 수벌 번데기의 추출물 및 용매분획물의 NO 생성 억제 활성을 확인하고자 하였다. 세포생존을 측정 결과 hexane 처리군에서 세포독성을 유발하였으나, 나머지 시료에서는 세포독성을 나타내지 않았다. NO 생성 억제 능 결과 butanol 처리군을 제외한 시료에서 유의한 수준으로 NO 생성을 감소시켰다. 이상과 같은 연구 결과를 통해 수벌 번데기의 ethyl acetate 분획물이 항염증 활성 소재로서의 가능성을 가지는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다연구사업 (과제번호: PJ01314201)에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

인용문헌

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783-801.

Bukkens, S. G. F. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecol Food Nutr* 36: 287-319.

Chung, H. T., H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar and Y. M. Kim. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 1075-1079.

Guo, S., P. Qiu, G. Xu, X. Wu, P. Dong, G. Yang, J. Zheng, D. J. McClements and H. Xiao. 2012. Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J. Agr. Food Chem.* 60: 2157-2164.

Hofseth, L. J. and L. Ying. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1765: 74-84.

Hyun, J. M., K. J. Park, S. S. Kim, S. M. Park, Y. J. Lee and H.

- J. An. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of solvent fractions from the peel of the native Jeju citrus 'Hongkyool' and 'Pyunkyool'. *J. Life Sci.* 25(10): 1132-1138.
- Kawamata, H., H. Ochiai, N. Mantani and K. Terasawa. 2000. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* 28: 217-226.
- Kim, H. Y., S. O. Woo, S. G. Kim, K. W. Bang, H. M. Choi, H. J. Moon and S. M. Han. 2019. Analysis of oxidative stability in drone pupae (*Apis mellifera* L.). *J. Apiculture.* 34(1): 63-66.
- Kim, S. G., S. O. Woo, K. W. Bang, H. R. Jang and S. M. Han. 2018. Chemical composition of drone pupa of *Apis mellifera* and its nutritional evaluation. *J. Apiculture.* 33(1): 17-23.
- Lee, J. A. and A. J. Kim. 2019. Safety and nutritional evaluation of *Gryllus bimaculatus* according to pre-treatments. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 48(6): 640-648.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454: 428-435.
- Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush and B. A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls, the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 4244-4250.
- van Huis, A., J. Van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir and P. Vantomme. 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Willeaume, V., V. Kruys, T. Mijatovic and G. Huez. 1996. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophage: Similarities and differences. *J. Inflamm.* 46:1-12.
- Yoon, Y. I., M. Y. Chung, J. S. Hwang, T. W. Goo, M. Y. Ahn, Y. B. Lee, M. S. Han and E. Y. Yun. 2014. Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J. Life Sci.* 24(4): 370-376.