

The Anti-inflammatory and Antiallergic Effects of *Allomyrina dichotoma* Larva Hot-water Extract

Hwa Jeong Lee[†], Minchul Seo[†], In-Woo Kim, Joon Ha Lee, Jae-Sam Hwang and Mi-Ae Kim*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea

Received September 13, 2017 / Revised October 13, 2017 / Accepted October 13, 2017

Traditionally, the larvae of *Allomyrina dichotoma* (AD), a species of the rhinoceros beetle, have been widely used for their antidiabetic, antihepatofibrotic, antineoplastic, and antiobesity effects. The United Nations' Food and Agriculture Organization has reported on the possibility of using edible insects in human dietary supplements in the future. However, despite the growing interest in insect-based bio-active products, the biological activities of these products have rarely been studied. Previously, we reported that AD larvae inhibit the *in vitro* differentiation of adipocytes via transcription factor downregulation. In this study, our objective was to evaluate the effects of a hot-water extract of AD larvae on allergy and inflammation. To investigate the inhibitory effect of the extract on allergic reactions, we measured the levels of β -hexosaminidase, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), and cyclooxygenase-2 (COX-2) after activation of RBL-2H3 cells using Compound 48/80. In addition, the inhibitory effect of the extract on inflammation was determined using Raw 264.7 cells after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The extract significantly inhibited the β -hexosaminidase, TNF- α , IL-4, and COX-2 levels in RBL-2H3 cells. Furthermore, it effectively inhibited the inflammatory cytokine IL-6, nitric oxide, and inducible nitric oxide synthase expression in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. These results suggest that AD larval extract can be potentially developed as an antiallergic and anti-inflammatory therapeutic agent.

Key words : *Allomyrina dichotoma* (AD), anti-allergy, anti-inflammation, cytokine, nitric oxide

서 론

경제가 성장함에 따라 생활수준이 향상되고, 서구적인 식생활의 변화 등 환경적인 원인으로 인하여 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 발병률이 증가되고 있는 천식은 알레르기 반응으로부터 유발 되는 것으로 보고되고 있으며, 개인의 차가 매우 크게 나타나는 질병이다[16]. 천식의 주요 원인인 알레르기 (allergy)란 일반적으로 꽃가루, 곰팡이, 집 먼지 진드기, 난 알부민, 동물비듬 등 여러 가지 알레르겐(allergen)에 의해 신체 내의 면역학적 기전을 통해 야기되는 반응으로서 피부, 호흡기, 위장관의 점막, 임파관 주위, 혈관 주위, 뇌 등 전신의 장기에 널리 분포 하고 있는 비만세포에 의해 야기된다[19]. 비만세포는 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이며, 천식과 알레르기성 비염에 관여하고[21], 알레르겐과 결합을 통해 활성화

화 되면 히스타민, β -hexosaminidase, prostaglandin (PG), 류코트리엔과 같은 화학매체를 탈과립 과정을 통하여 세포외로 분비한다[27]. 알레르기 반응을 확인하기 위해서는 주로 비만세포에서 분비되는 β -hexosaminidase를 측정 하는데, 이는 비만세포에서 탈과립을 통하여 분비되는 히스타민의 농도가 매우 낮기 때문에 호염구나 비만세포에 다량 존재하는 β -hexosaminidase를 천식 및 비염과 같은 알레르기 질환에서 탈과립의 지표로 이용되며, 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다[2, 19].

이와 같이 알레르기 반응은 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화에 의해 야기되므로, 비만세포의 활성화를 억제하는 물질은 알레르기성 질환의 치료제로 활용될 수 있다[3]. 현재 알레르기 질환과 염증의 치료 방법은 염증 억제제인 스테로이드 등의 외용제나 연고, 항히스타민제의 도포나 복용, 그리고 면역반응 억제제가 사용되고 있다[18]. 그러나 이러한 치료제는 증상을 완화하는데 매우 효과적이거나 장기간 사용 시 부작용 및 합병증이 있으며 약 복용을 중단하면 병변의 재발 가능성이 높아지므로 안전하고 효과적인 대체 치료법이 요구된다[24, 25]. 현재까지 천연물을 기반으로 하는 천식치료제 개발은 주로 식물을 대상으로 많은 연구가 수행되어 왔으나, 아직 합성의약을 대체할 수 있는 새로운 천연물 치료제 개발 실적은 미흡한 실정이다.

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2977, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : kimma@korea.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.

곤충들은 살아가는 환경에 적응하고 생존하기 위해서 그들의 특별한 생리조절 기전 및 물질들을 확보하는 방향으로 진화해 왔는데, 최근 곤충의 생리활성 물질들을 이용한 새로운 약물후보물질 개발 연구가 활발히 진행되고 있다[23]. 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)는 딱정벌레목 장수풍뎅이과의 곤충으로 한국, 일본, 중국, 인도에 분포하고 있으며, 상수리나무 또는 졸참나무와 같은 여러 종류의 나무에 서식하는 것으로 보고되어 있다. 특히 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva ; AD)은 전통적으로 간질환을 치료하기 위한 민간요법으로 사용되어 왔을 뿐만 아니라[22, 30], 필수불포화지방산 및 단백질의 함량이 높은 것으로 알려져 건강식품으로써의 가능성이 보고 된 바가 있다[14]. 또한 최근 생화학적인 생리활성 연구에 따르면 장수풍뎅이 유충은 활성산소를 억제하는 항산화 효능[28] 또는 항비만[4], 신경세포보호[17] 효과에도 탁월한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 2016년 식품공전에 식품원료로 등록된 장수풍뎅이 유충을 이용하여 보다 효과적인 천연물 유래 항알레르기 및 항염증 효능을 검토하고자 하였다. 이를 위하여 장수풍뎅이의 추출 용매(ethanol, methanol, distilled water)에 따른 항알레르기 효능을 검토한 결과 distilled water를 이용한 열수추출물에서 비만세포의 탈과립 억제효과가 가장 높게 나타났으며, 본 연구에서는 건강기능성제품 제조시 활용도가 높은 열수추출법을 이용하여 항알레르기 및 항염증 효능을 검토하였다.

알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포주(RBL-2H3)를 사용하여 β -hexosaminidase의 탈과립과 염증 cytokine (IL-4, TNF- α), COX-2의 유리량을 측정하였으며, 대식세포주(Raw 264.7)를 이용하여 염증반응과 관련된 nitric oxide (NO) 생성 및 조절기전에 미치는 영향을 확인함으로써 장수풍뎅이 유충 추출물의 항알레르기 및 항염증 반응에 대한 효능을 검토하였다[13].

재료 및 방법

대상곤충

장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larva)은 경상북도 예천군의 사육농가 '예천곤충나라'에서 구입하여 실험에 사용하였다.

추출물의 제조

장수풍뎅이 유충은 액체질소를 사용하여 급속 냉동 시킨 후 분쇄하여 분말로 제조하였으며 제조한 분말은 -70℃에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 장수풍뎅이 유충 분말 1 g에 10 ml의 distilled water (DW)를 혼합하여 60℃에서 24시간 교반하는 방식으로 유효 성분을 추출하였다. 이를 여과한 다음 감압농축기(rotary vacuum evaporator,

CVC-3100, Tokyo, Japan)로 농축하였고 100% DMSO에 녹여 사용하였다.

세포주 및 배양

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 rat basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포와 마우스 대식세포 세포주 Raw 264.7은 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 5% CO₂ 조건하에서 37℃로 유지되는 배양기에서 배양하여 사용하였다.

β -hexosaminidase 측정

비만세포의 탈과립은 β -hexosaminidase의 유리량 측정을 통해 확인하였다. RBL-2H3 세포를 phosphate buffered saline (PBS)에 세척 및 현탁하고 1×10^6 cells/ml의 농도에서 200 μ l씩 분주한 후 장수풍뎅이 유충 추출물을 처리하여 5% CO₂ 조건하에서 37℃로 유지되는 배양기에서 30분 배양하였다. 이후 알레르기 유발 물질인 Compound 48/80을 25 μ g/ml 처리하여 5% CO₂ 조건하에서 37℃로 유지되는 배양기에서 30분 배양하여 알레르기를 유발하였다. 이 중 100 μ l의 상등액을 취한 후 β -hexosaminidase ELISA kit (Cloud-Clone Corp., USA)을 이용하여 β -hexosaminidase의 유리량을 측정하였으며 최종 확인은 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 확인하였다.

Cytokine 측정

RBL-2H3 세포에서 cytokine (IL-4, TNF- α)의 측정은 RBL-2H3 세포를 PBS에 현탁 하고 1×10^6 cells/ml의 농도에서 200 μ l씩 1.5 ml tube에 분주한 후 장수풍뎅이 유충 추출물을 125, 250, 500 μ g/ml의 농도별로 처리하여 5% CO₂ 조건하에서 37℃로 유지되는 배양기에서 30분 배양하였다. 이후 Compound 48/80을 25 μ g/ml 처리하여 5% CO₂ 조건하에서 37℃로 유지되는 배양기에서 30분 배양하였다. 배양 후 상등액을 이용하여 IL-4 (Rat IL-4 ELISA Kit, novex, MA, USA), TNF- α (Rat TNF- α ELISA Kit, Invitrogen, MA, USA), COX-2 (Rat Cyclooxygenase-2 (COX-2) ELISA Kit, CUSABIO, MA, USA) 분비량을 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Raw 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여 8×10^5 cells/ml로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 장수풍뎅이 유충 추출물을 300, 500, 700, 1,000 μ g/ml의 농도로 1시간 처리 후에 염증반응 유도를 위하여 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액으로부터 ELISA Kit (Invitrogen, MA, USA)를 사용하여 IL-6 (Thermo scientific, MA, USA)의 분비량을 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)를

이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 측정

Raw 264.7 세포주로부터 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로써 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여 8×10⁵ cells/ml로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 장수풍뎅이 유충 추출물을 300, 500, 700, 1,000 µg/ml의 농도로 1시간 처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상등액 100 ul을 취하여 Griess 시약과 반응 시킨 후 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 측정하였다.

Western blot analysis

Raw 264.7 cell을 harvest 한 후 원심 분리하여 그 상등액을 버리고 cell pellet을 수거 하였다. RIPA buffer를 이용하여 세포를 lysis 시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 20 min)하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질을 정량한 후 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC, Schleicher & Schuell BioScience, Germany)에 transfer하였다. NC를 5% Skim milk로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체를 반응시킨 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체로 1시간 반응 시켰다. 각 반응 사이에 0.05% TBST로 10분씩 3회 수세 하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균값 ± 표준편차로 나타냈으며 통계적 분석은 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 각 처리구간의 유의성 검증을 실시하였고 유의성은 p<0.05 로 하였다.

결과 및 고찰

장수풍뎅이 유충 추출물이 Compound 48/80에 의해 자극된 RBL-2H3의 β-hexosaminidase 분비에 미치는 영향

중류수를 이용하여 추출된 장수풍뎅이 유충 추출물의 비만세포(RBL-2H3)에 대한 세포독성을 확인하기 위해 MTS 분석을 통한 세포생존율을 조사한 결과 500 µg/ml의 농도까지 세포 독성이 없는 것으로 확인 되었으며, 항알레르기 효능 검증을 위한 추출물의 사용 농도는 500 µg/ml을 최고 농도로 사용

하였다.

세포가 외부의 자극을 받게 되면 다양한 염증성 물질을 분비하게 되는데 그 중 비만세포는 세포 내 과립에 존재하는 다양한 단백질들과 함께 β-hexosaminidase를 분비하는 것으로 알려져 있으며 이는 현재 알레르기 측정 지표로 사용되고 있다[14].

비만세포의 탈과립을 유도하는 인자들 중 Compound 48/80은 formaldehyde에 의한 cross-linked phenethylamine의 혼합 다당체로서, 비만세포의 막수용체에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시킴으로써 세포 내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포를 탈과립 시키고 히스타민과 세로토닌, 가수분해 효소 등의 매개물질들이 비만세포 밖으로 분비된다[15].

따라서 본 실험에서는 장수풍뎅이 유충 추출물의 항알레르기 효능을 알아보기 위해 RBL-2H3 세포주에 Compound 48/80로 자극 후 이들 세포로부터 유리되는 β-hexosaminidase의 유리량을 측정함으로써 장수풍뎅이 유충 추출물이 알레르기 반응에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 1). 장수풍뎅이 유충 추출물을 125, 250, 500 µg/ml의 농도로 처리한 결과 125 µg/ml에서는 대조군 과의 유의적 차이를 보이지 않았으나 250 µg/ml과 500 µg/ml 농도를 처리하였을 때 β-hexosaminidase 유리율이 각각 10%, 24% 감소되었다. 이 실험 결과로 장수풍뎅이 유충 추출물은 RBL-2H3 세포에 농도의존적으로 β-hexosaminidase의 분비를 억제함으로써 항알레르기 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

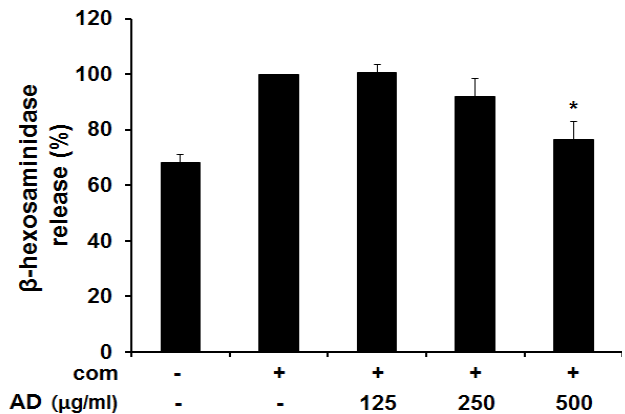


Fig. 1. Inhibition effect of AD on the β-hexosaminidase released from RBL-2H3 cells by Compound 48/80. RBL-2H3 (1×10⁶ cells/ml) cells were treated with AD for 30 min prior to the Compound 48/80(25 µg/ml) stimulation. The amount of β-hexosaminidase were measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. *p<0.05, compared with the Compound 48/80 only.

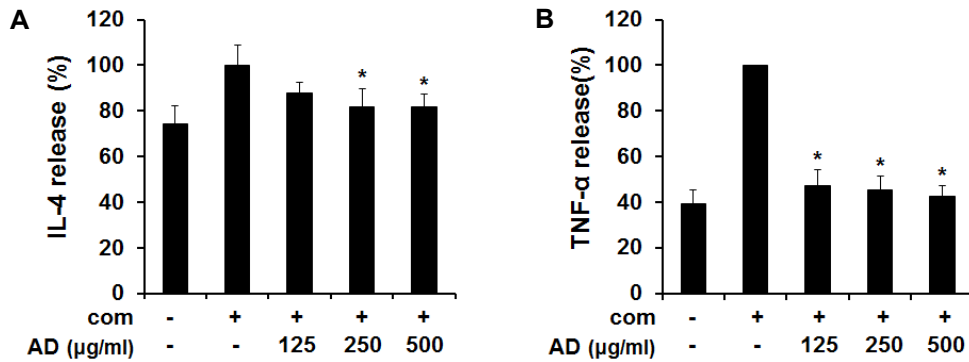


Fig. 2. Effect of AD on the production of cytokines stimulated by Compound 48/80. RBL-2H3 (1×10^6 cells/ml) cells were treated with AD for 30 min prior to the Compound 48/80 (25 μ g/ml) stimulation. Production of IL-4 (A) and TNF- α (B) were measured in the medium of RBL-2H3 cells. The amount of β -hexosaminidase were measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. * $p < 0.05$, compared with the Compound 48/80 only.

Compound 48/80으로 자극된 RBL-2H3에서 cytokine 분비에 장수풍뎅이 유충 추출물이 미치는 영향

비만세포가 활성화 되면 비만세포는 탈과립을 통하여 아라키돈산 대사물질과 염증반응을 유발하는 다양한 cytokine이 분비되는데, 그 중 IL-4는 B-cell을 활성화하여 Immunoglobulin E (IgE) 항체를 생성하며, Th2 세포의 분화를 촉진시키므로 천식과 같은 알레르기 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[5]. 호흡기질환 천식을 유발하기 위해 비만 세포주 RBL-2H3에 Compound 48/80 (25 μ g/ml)으로 활성화시킨 후 장수풍뎅이 유충 추출물을 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 처리하여 비만세포로부터 분비되는 cytokine인 IL-4의 유리량을 ELISA 방법으로 실험하였다(Fig. 2A). 그 결과 Compound 48/80만 처리한 샘플에 비교하여 장수풍뎅이 유충 추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 IL-4 분비량이 감소되는 경향을 보였다. 따라서 cytokine의 분비가 장수풍뎅이 유충 추출물에 의해 유의적으로 감소된 것을 통해 세포가 Th2 세포의 기능을 획득하는 것을 억제함으로써 항천식 작용이 있을 것이라 판단된다.

TNF- α 는 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로, 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 cytokine이다[7]. 따라서 장수풍뎅이 유충 추출물을 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 처리하여 Compound 48/80 (25 μ g/ml)으로 활성화시킨 비만세포로부터 분비되는 염증 cytokine인 TNF- α 의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 확인하기 위하여 ELISA 방법으로 실험하였다(Fig. 2B). 그 결과 125 μ g/ml의 낮은 농도에서도 호흡기 질환 유발 물질을 처리하지 않은 샘플과 유사한 분비량을 나타내었다. 따라서 장수풍뎅이 유충 추출물은 호흡기 질환 완화에 효과가 있을 것이라 판단된다.

Compound 48/80으로 자극된 비만세포주 RBL-2H3에서 염증을 일으키는 체내효소 COX-2 분비에 장수풍뎅이 유충 추출물이 미치는 영향

면역세포의 대표적인 알레르기 염증인자로 알려진 COX (cyclooxygenase)는 COX-1과 COX-2가 두 가지로 존재하는데 COX-1은 대부분의 조직에 존재하며, 신장의 혈액흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반면 COX-2는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응하여 발현되어 prostaglandins (PG)의 합성에 관여하고, LPS 및 cytokine에 의해 염증 관련 질병을 유발하는 것으로 밝혀져 있다[9, 26]. 본 연구에서는 염증 관련 비만 세포주(RBL-2H3)에 알레르기 유도 물질 Compound 48/80을 25 μ g/ml의 농도로 처리하고 장수풍뎅이 유충 추출물을 농도별로 처리하였을 때 COX-2의 분비량을 측정하여 Fig. 3에 나타냈다. 그 결과 장수풍뎅이 유충 추출물을 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 Compound 48/80만 처리한 샘플에 비해 COX-2 분비가 장수풍뎅이 유충 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 하였으며, 이러한 결과는 장수풍뎅이 유충 추출물이 알레르기 질환의 치료에 효과가 있을 것으로 판단된다.

장수풍뎅이 유충 추출물이 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포에서 IL-6분비에 미치는 영향

내독소로 알려진 LPS는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하며 대식세포에 처리하면 염증성 cytokine의 유전자 발현을 유도한다[8]. IL-6는 염증반응 과정에서 강력한 중재자로서 정상적으로는 상당히 낮은 수준으로 조절되고 있으나, 감염, 천식 및 다른 스트레스에 의해 발현이 유도된다[11, 12]. IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키고, 염증성 질환에서는 IL-6의 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다[6]. 따라서 본 연구에서는 장수풍뎅이 유충 추출물의 항염증 효능을 확인하

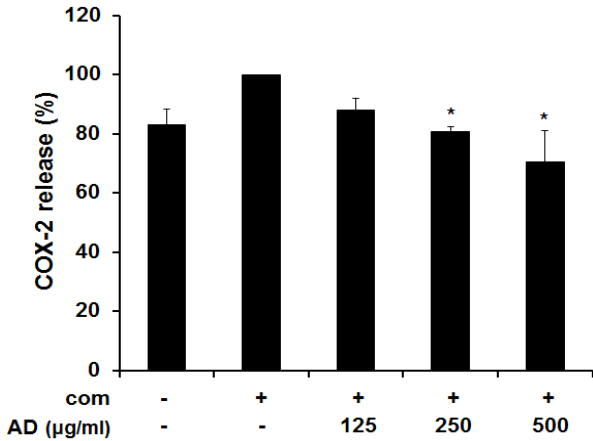


Fig. 3. ELISA analysis for COX-2 release in RBL-2H3 cells by Compound 48/80. RBL-2H3 (1×10^6 cells/ml) cells were treated with AD for 30 min prior to their Compound 48/80 (25 μ g/ml) stimulation. Production of COX-2 were measured in the medium of RBL-2H3 cells. The amount of COX-2 were measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. * $p < 0.05$, compared with the Compound 48/80 only.

기 위하여 LPS에 의해 유도되는 대식세포주의 IL-6 분비량의 변화를 측정하였다(Fig. 4). 대식세포주에 장수풍뎅이 유충 추출물을 300, 500, 700, 1,000 μ g/ml의 농도로 1시간 전처리 후 LPS를 사용하여 염증을 유도하였을 때 장수풍뎅이 유충 추출물의 700, 1,000 μ g/ml 농도에서 IL-6의 분비량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 장수풍뎅이 유충 추출물이 대식세포(Raw 264.7)에 작용하여 LPS에 의해 유도되는 IL-6 분비를 유의성 있게 억제하여 염증성 질환의 치료에 도움

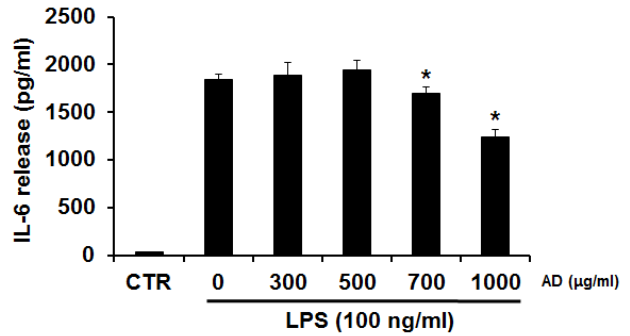


Fig. 4. Effects of AD on the production of IL-6 in Raw 264.7 cells by LPS. Production of IL-6 was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of AD for 24 hr. The amount of cytokine were measured by immunoassay as described in materials and methods. CTR: control. Data represent the mean \pm S.D. with three separate experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. * $p < 0.05$, compared with the LPS only.

을 줄 것으로 생각된다.

장수풍뎅이 유충 추출물이 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포에서 nitric oxide 생성 및 cytokine 발현에 미치는 영향

염증반응이 일어나면 대식세포(Raw 264.7)와 염증세포들은 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 등 염증매개물질을 분비한다[20]. 그 중 산화질소(nitric oxide; NO)는 대식세포에서 혈액응고, 혈압 및 신경전달 기능의 조절 등 생리적 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, NO가 과도하게 생성되는 경우 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고되어 있다[1, 10]. 따라서 본

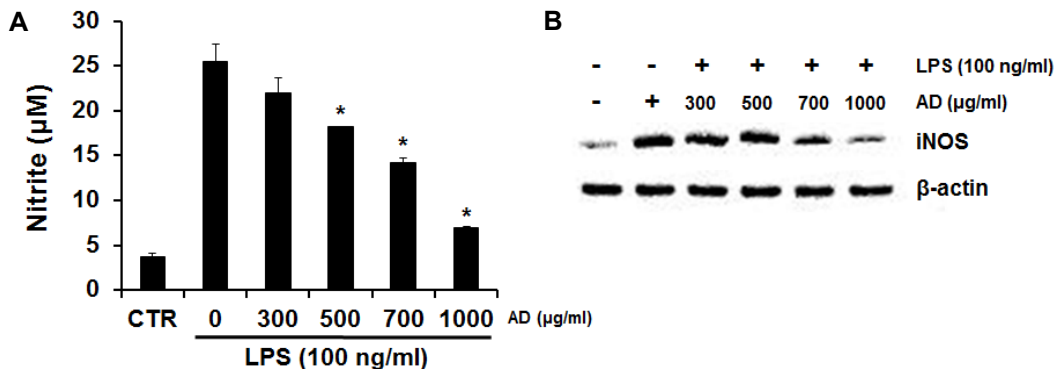


Fig. 5. Inhibitory effects of AD extract on the production of nitric oxide and protein levels of iNOS in Raw 264.7 cells by LPS. (A) Raw 264.7 cells were cultured with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of AD for 24 hr to determine the level of NO. (B) Raw 264.7 cells (1×10^6 cells/well) were pre-incubated for 24 hr, and the cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of AD extract sample (125, 250, 500 μ g/ml) for 24 hr. CTR: control. Level of significance was identified statistically using Student's t test. * $p < 0.05$, compared with the LPS only.

연구에서는 장수풍뎅이 유충의 항염증 효능을 확인 하기 위하여 LPS로 마우스 대식세포주 Raw 264.7를 자극하여 NO 생성을 유도한 후 장수풍뎅이 유충 추출물이 NO 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 5A). 그 결과, LPS로 자극된 Raw 264.7 세포에서 NO 생성은 장수풍뎅이 유충 추출물의 500 µg/ml 처리 농도에서 부터 유의하게 억제되는 것을 확인하였으며, 또한 NO의 생성과 염증유도 단백질로 알려져 있는 iNOS 단백질 발현 또한 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 장수풍뎅이 유충 추출물이 염증성 질환의 치료에 효과적인 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01099303)의 지원에 의해 연구 수행으로 인한 결과물이며, 이에 감사드립니다.

References

- Bosca, L., Zeini, M., Traves, P. G. and Hortelano, S. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* **208**, 249-258.
- Choi, O. B. 2002. Anti-allergic Effects of *Petasites japonicum*. *Kor. J. Food Nutr.* **15**, 382-385.
- Choi, S. P., Kim, M. Y. and Nam, S. H. 2005. Inhibitory activity of pigmented rice bran extract to the allergic inflammation in basophilic cell line and peritoneal mast cells. *Appl. Biol. Chem.* **48**, 315-321.
- 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.
- Church, M. K. and Levi-Schaffer, F. 1997. The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 155-160.
- Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**, 355-361.
- Gordon, J. R., Burd, P. R. and Galli, S. J. 1990. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today* **11**, 458-464.
- Guzik, T. J., Korbust, R. and Adamek, G. T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R. P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**, 144-150.
- Ide, N. and Lau, B. H. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J. Nutr.* **131**, 1020S-1026S.
- Jeong, H. J., Koo, H. N., Na, H. J., Kim, M. S., Hong, S. H., Eom, J. W., Kim, K. S., Shin, T. Y. and Kim, H. M. 2002. Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. *Cytokine* **18**, 252-259.
- Jeong, H. J., Hong, S. H., Lee, D. J., Park, J. H., Kim, K. S. and Kim, H. M. 2002. Role of Ca(2+) on TNF-alpha and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells. *Cell. Signal.* **14**, 633-639.
- Jo, J. H., Lyu, J. H., Kim, C. H., Kang, K. H., Yoon, H. J., Lee, S. Y., Ko, W. S. and Kim, W. I. 2007. The anti-allergic effects of *Taraxaci herba* on the RBL-2H3 Cells. *J. Kor. Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **20**, 209-217.
- Jung, J. K. and Park, Y. K. 2011. Effect of modified-Okbyungpoongsan on mast-mediated allergic responses in RBL-2H3 mast cells. *Kor. J. Herbology* **26**, 1-7.
- Kang, K. J., L, M., Ryu, Y. G., Chai, O. H. and Lee, J. Y. 1999. Inhibitory effect of polysaccharide fraction from *Cortex mori* on Compound 48/80-Induced mast cell activation. *Kor. J. Immunol.* **21**, 35-45.
- Kim, J., McKinley, L., Natarajan, S., Bolgos, G. L, Siddiqui, J., Copeland, S. and Remick, D. G. 2006. Anti-tumor necrosis factor-a antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by house dust. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 122-132.
- KIM, M. J., Youn, K., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Ahn, M. R., Jeong, W. S. and Jun, M. R. 2014. Effects of solvent fractions of *Allomyrina dichotoma* larvae through the inhibition of *in vitro* BACE1 and β -amyloid (25 - 35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Entomol. Res.* **44**, 23-30.
- Kim, B. J., Son, W. R., Choi, M. O., Jo, S. K., Jung, H. K., Lee, J. T., Kim, H. Y. and Kwoen, D. J. 2013. Anti-atopic effects of *castanea crenata* inner shell extracts fermented by *lactobacillus bifementans*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 1378-1386.
- Lee, E., Choi, E. J., Cheong, H., Kim, Y. R., Ryu, S. Y. and Kim, K. M. 1999. Anti-allergic actions of the leaves of *castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 320-323.
- Mann, J. R., B, M. and DuBois, R. N. 2005. Mechanism of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2**, 202-210.
- Metcalfe, D. D., Kaliner, M. and Donlon, M. A. 1981. The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* **3**, 23-74.
- Pemberton, R. W. 1999. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **65**, 207-216.
- 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.
- Schreiber, S. L. and Crabtree, G. R. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142.

25. Sidbury, R. and Hanifin, J. M. 2000. Old, new, and emerging therapies for atopic dermatitis. *Dermatol. Clin.* **18**, 1-11.
26. Smith, W. L., Meade, E. A. and DeWitt, D. L. 1994. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **714**, 136-42.
27. Stevens, R. L. and Austen, K. F. 1989. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today* **10**, 381-386.
28. 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.
29. Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D. D. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**, 2258-2261.
30. 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.
31. Youn, K., Kim, J. Y., Yeo, H., Yun, E. Y., Hwang, J. S. and Jun, M. R. 2012. Fatty acid and volatile oil compositions of *Allomyrina dichotoma* larvae. *Prev. Nutr. Food. Sci.* **17**, 310-314.

초록 : 장수풍뎅이 유충 열수 추출물에 의한 항알레르기 및 항염증 효과

이화정[†] · 서민철[†] · 김인우 · 이준하 · 황재삼 · 김미애*

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

본 연구에서는 장수풍뎅이 유충 추출물을 이용하여 알레르기 및 염증 반응에 미치는 효과를 확인하였다. 장수풍뎅이 유충 추출물의 항알레르기 및 항염증 효능은 Compound 48/80에 의해 활성화된 비만세포(RBL-2H3)와 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 대식세포(Raw 264.7)로부터 분비 또는 발현되는 β -hexosaminidase, TNF- α , IL-4, IL-6, COX-2, nitric oxide, 및 iNOS를 측정하여 관찰하였다. 비만세포에 장수풍뎅이 유충 추출물과 Compound 48/80을 함께 처리한 경우 비만세포의 탈과립에 의해서 분비되는 β -hexosaminidase의 양이 현저히 감소하였으며 TNF- α , IL-4, COX-2의 발현 또한 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다. 또한 LPS에 의해 활성화된 대식세포(Raw 264.7)는 장수풍뎅이 유충 추출물 처리에 의해 염증반응인자인 IL-6와 nitric oxide의 분비량이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 장수풍뎅이 유충 추출물이 알레르기와 염증반응의 원인 물질인 β -hexosaminidase 억제 효과뿐만 아니라, 염증 cytokine의 발현을 저해하는 것으로 보아 알레르기와 염증 질환의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.