

## Antioxidative Effects of *Tenebrio molitor* Larvae Extract Against Oxidative Stress in ARPE-19 Cells

Bong Sun Kim<sup>†</sup>, Ra-Yeong Choi<sup>†</sup>, Eu-Jin Ban, Joon Ha Lee, In-Woo Kim and Minchul Seo\*

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

Received September 7, 2022 /Revised October 25, 2022 /Accepted October 31, 2022

*Tenebrio molitor* larvae is well known as edible insect. Then, although it has been widely studied that *Tenebrio molitor* larvae has various bioactive functions such as antioxidant, anti-wrinkle, and anticancer. Nevertheless, antioxidant effects of *Tenebrio molitor* larvae water extract (TMH) has not been well described in Adult Retina Pigment Epithelial cell line (ARPE-19). In this study, we demonstrated that antioxidant effects of TMH against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in ARPE-19. Thus, we selected for our studies and performed a series of dose-response assay to determine the working concentration that lead to a consistent and high degree of cytotoxicity, which we defined as the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that killed 40% of the ARPE-19 cells. ARPE-19 cells were pre-treated with various concentrations of TMH (0.1 up to 2 mg/ml) before exposure to 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As we expected, TMH effectively prevented ARPE-19 cells from 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in a dose-dependent manner. Furthermore, TMH inhibited the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38. Overall, the inhibitory effects of TMH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and oxidative stress were associated with the protection cleaved caspase-3, Bax, Bcl-2, and HO-1. The TMH suppressed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell membrane leakage and oxidative stress in ARPE-19 cells. Thus, these results suggest that the TMH plays an important role in antioxidant effect in ARPE-19.

**Key words :** AMD, antioxidant, apoptosis, ARPE-19 cells, *Tenebrio molitor*

### 서 론

황반은 눈 안쪽에 있는 빛을 감지하고 물체의 상이 맺히는 부위로 시력에 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 다양한 원인에 의해 황반부에 변형이 생길 경우 시력장애가 발생하며 가장 흔한 원인인 노화로 인해 발생하는 노인성 황반 변성(age-related macular degeneration, AMD)은 망막 색소상피세포의 이상과 함께 광 수용체 손상, 사물이 구부러져 보이는 변형시, 시력 저하 혹은 실명을 야기한다 [9]. 일반적으로 노화에 의한 황반부 변성은 산화적 스트레스로 인한 과도한 reactive oxygen species (ROS)의 생성과 축적이 주요 원인으로 미토콘드리아 손상, 망막상피세포의 심각한 기능 저하를 일으킬 수 있다[4, 9]. 또한 산화

적 스트레스에 의한 망막상피세포의 손상은 활성산소의 과다 축적으로 세포 내 단백질 및 DNA 변성을 유도함으로써 세포의 기능과 세포막의 통합성을 손상시켜 세포 사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다[4]. 따라서 망막색소상피세포의 산화적 스트레스를 조절하는 것이 AMD와 같은 다양한 망막질환 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있다 [12, 13, 21].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 superoxide anion과 같은 활성산소종은 *in vitro* 상에서 세포 내 산화적 스트레스를 유발하는 대표적인 화학물질이다[4, 13, 18]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발생한 산화적 스트레스의 증가와 세포 사멸은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), heme의 분해와 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 heme oxygenase (HO-1) 그리고 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 Bax, BCL-2 그리고 cleaved caspase-3와 같은 경로로 이루어진다[2, 6, 14, 16, 19, 20, 23]. 산화적 스트레스는 현대 사회의 생활 습관에 의해 급속도로 증가했고, 이에 따라 눈의 노화 속도가 빠르게 증가하고 있다. 하지만 노인성 황반 변성 유병률이 급격히 증가하는데 반해 눈 건강 기능성 소재 연구는 현재 오메가3 그리고 루테인과 같은 소재로 한정되어 있어 다양한 눈 건강 소재 연구가 시급한 것이 실정이다[11, 14].

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2991, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : nansmc@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.

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목 거저리과에 속하는 곤충으로 세계적으로 널리 서식하며 대량 사육을 통해 산업화가 용이한 곤충으로 갈색거저리 유충은 식용으로서의 가치를 뛰어넘어 식용곤충을 이용한 곤충 단백질 기반 제품에 관한 연구도 진행되고 있다[5, 17]. 우리나라에서 식용곤충 관련 시장의 크기가 증가하고 있는 추세이며, 이에 따라 식용곤충의 종류 및 기능성 소재로서의 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 7]. 현재 갈색거저리 유충의 기능성 소재 연구는 항산화 활성, 항염증 효능 그리고 탈모 개선 기능성 연구와 같은 다양한 연구가 진행되어져 왔다[1, 24]. 그러나 갈색거저리 유충 추출물의 산화적 스트레스에 따른 눈 건강 효능 연구 결과는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 갈색거저리 유충 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발생하는 망막색소상피세포의 산화적 스트레스 억제 및 세포 사멸 보호 효과와 그 기전을 구명하고 눈 건강 소재 개발을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 갈색거저리 유충 열수 추출물(TMH) 제조

본 연구에 사용된 갈색거저리 유충 원료는 우주 곤충(고흥, 전라남도)에서 종령 유충을 구입하였다. 갈색거저리 유충은 세척 후 멸균 및 동결 건조한 뒤 분쇄해 3차 증류수와 1:10 (W/V) 비율로 60°C, 80 rpm에 20시간 회전 교반한 다음 980×g에서 4°C로 원심 분리 해 상등액을 취해 새로운 micro tube에 옮겨 centrifugal evaporator (CVE-3100, Tokyo, Japan)를 이용해 완벽히 건조 시켜 -80°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

### 세포배양

인간 망막색소상피세포주 ARPE-19 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)과 Ham's F12 1:1 혼합 배지인 DMEM/F12 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco, Burlington, ON, Canada) 그리고 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK)를 첨가해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 습윤 배양해 70% 이상의 밀도로 성장했을 때 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### 산화스트레스 유도

ARPE-19 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24시간 배양한 다음 상등액을 모두 제거하고 phenol red free DMEM/F12에 10% fetal bovine serum 그리고 1% penicillin-streptomycin를 첨가한 배지로 교체하였다. 그 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 300 μM 부터 700 μM 농도로 24시간 동안 처리해 최종 100 μl의 배양액에 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethox-

ylphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) solution을 10 μl/well을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 4시간 반응시킨 후 microplate reader (ThermoFisher scientific, USA)로 490 nm에서 흡광도 측정을 통해 대조군 대비 세포 생존율 60% 수준의 농도의 산화스트레스 최적 조건을 확립하였다.

### 세포 사멸 보호 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 ARPE-19 세포에 대한 TMH의 세포 사멸 보호 효능을 확인하기 위해 MTS assay를 실시해 세포 생존율을 분석하였다. ARPE-19 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24시간 배양하고 TMH 0.1, 0.5, 1 그리고 2 mg/ml로 1시간 전 처리한 뒤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 300 μM로 24시간 단독 혹은 병용 처리 후 최종 100 μl의 배양액에 MTS solution을 10 μl/well을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 4시간 반응시킨 후 microplate reader (ThermoFisher scientific, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포막 손상 억제 효능 측정

Lactate dehydrogenase (LDH)는 세포질 내에 안정적으로 존재하는 효소로 일반적으로 세포막을 통과하지 못해 세포 밖으로 방출되지 않지만 세포막이 손상되면 세포 밖으로 방출된다. 따라서 TMH에 의한 세포막 손상 억제 효능을 평가하기 위해 LDH assay kit (Biomax Co.)를 이용해 LDH 방출량을 분석하였다. 먼저, ARPE-19 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24시간 배양하고 TMH 0.1, 0.5, 1 그리고 2 mg/ml로 1시간 전 처리하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 300 μM로 24시간 단독 혹은 병용 처리한 후, 상등액을 새로운 plate로 옮긴 후 LDH solution과 1:1로 첨가한 해 암실 조건에서 30분 간 실온 반응하였다. 이후 Stop solution을 10 μl/well로 첨가한 다음 microplate reader (ThermoFisher scientific, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 활성산소종의 생성 변화 측정

산화적 스트레스로 인한 세포 내 활성산소종의 생성에 미치는 TMH의 효능을 확인하기 위해 Intracellular ROS assay kit (Cell Biolabs, USA)를 사용하여 제시된 방법을 따라 세포 내 ROS를 측정하였다. 먼저 ARPE-19 세포에 TMH 2 mg/ml로 1시간 동안 전 처리한 뒤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 300 μM로 24시간 단독 혹은 병용 처리한다. 이후 DCF-DA를 (100 μM) 첨가하여 37°C 조건에서 1시간 반응시킨 후 배양액을 완벽히 제거하고 1×PBS로 2회 세척해 serum free phenol red를 제거한 새로운 DMEM/F12 배지 100 μl와 2× cell lysis buffer 100 μl를 넣어 5분간 상온 반응시켰다. 마지막으로 cell lysates 150 μl를 black plate에 옮겨 fluorescence plate reader (ThermoFisher scientific, USA)로 485 nm excitation 그리고 530 nm emission 파장에서 측정하였다.

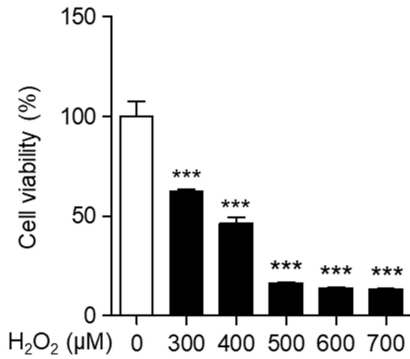


Fig. 1. Definition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working concentration to oxidative stress in ARPE-19 cells. ARPE-19 (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were plated in the complete DMEM/F12 medium. The cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> various concentration for 24 hr. After treatment, the cell viability was measured using by MTS assay. Asterisks (\*), (\*\*), and (\*\*\*) indicate *p*<0.05, *p*<0.01 and *p*<0.005, respectively.

**Western blot 분석**

TMH의 항산화 및 세포 사멸 억제 효능 기작을 구명하기 위해 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), heme oxygenase (HO-1), Bax, BCL-2 그리고 cleaved caspase-3와 같은 세포 내 신호 전달 기작을 확인 하였다. 먼저 ARPE-19 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24시간 배양하고 TMH 2 mg/ml로 1시간 전 처리한 뒤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 300 μM로 30분 혹은 24시간 단독/병용 처리 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 protease와 phosphatase inhibitor를 첨가한 M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific)로 세포를 4°C에서 lysis 시킨 다음 원심분리 해 상등액을 얻었다. 그렇게 얻은 단백질을 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)로 10 μg으로 정량 한 뒤 -80°C

냉동고에 보관해 사용하였다. 단백질 전기영동 후 PVDF membrane에 transfer한 뒤 p-P38, P38, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK와 같은 MAPKs, HO-1과 HO-2, Bax, BCL-2 및 cleaved caspase-3 그리고 β-actin 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 4°C에서 20시간 반응 시킨 뒤 이를 상온에서 2차 항체(Promega Corporation, Madison, WI, USA)로 1.5시간 반응시킨 뒤 ECL western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific)를 이용해 단백질 발현을 확인하였다.

**통계처리**

모든 실험결과는 3회 반복 실험을 실시한 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험 군의 유의성 검사는 GraphPad prism 5 (GraphPad SoftWare Inc., USA)의 unpaired two-tailed *t* test를 이용해 *p*<0.05값을 통계적으로 유의한 것으로 통계 처리하였다.

**결과 및 고찰**

**TMH의 ARPE-19 세포 사멸 억제 효능 평가**

산화적 스트레스 유발을 확인하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다양한 농도에서 24시간 처리해 약 60%의 ARPE-19세포의 생존율을 보이는 300 μM로 산화적 스트레스 유발 농도를 설정 하였다(Fig. 1). 그리고 TMH의 추출물의 농도는 세포 독성이 나타나지 않는 농도인 2 mg/ml로 설정하였다(Fig. 2A). Fig. 2B 결과는 다양한 농도의 TMH를 1시간 전처리 후, 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 24시간 노출된 ARPE-19 세포를 대상으로 MTS assay를 통해 세포 사멸 억제를 확인 하였다. 먼저 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험 군에서 약 40%의 세포 사멸 정도를 확인 할 수 있었고 TMH를 농도별로 처리

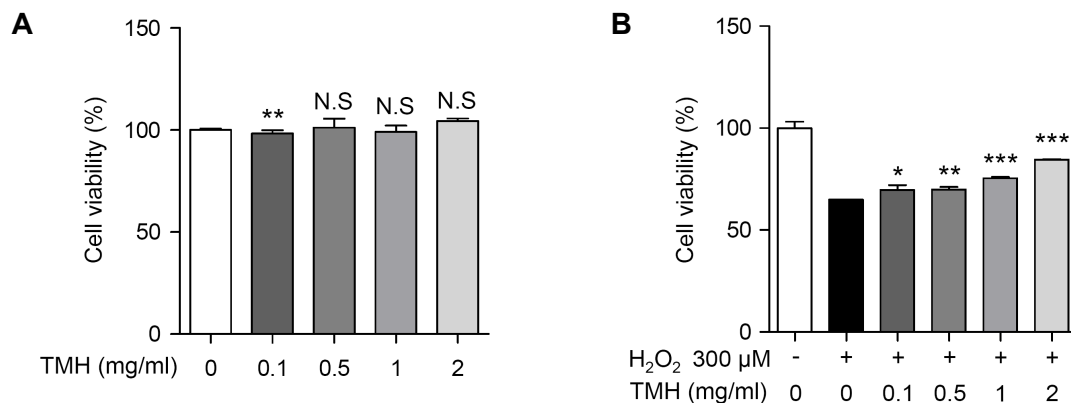


Fig. 2. TMH protects human adult retina pigment epithelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. ARPE-19 (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were plated in the complete DMEM/F12 medium. The cells were treated with TMH 0.1, 0.5, 1 or 2 mg/ml for 24 hr (A). The cells were pre-treated with TMH for 1 hr. Then, the cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) with for 24 hr (B). Subsequently, the cell viability was measured using a MTS assay. Asterisks (\*), (\*\*), and (\*\*\*) indicate *p*<0.05, *p*<0.01 and *p*<0.005, respectively.

했을 때 농도 의존적으로 세포 사멸 억제 효능을 확인할 수 있었다. 그러므로 TMH는 산화 스트레스에 의한 세포 사멸 억제를 통해 AMD를 예방 할 수 있을 것으로 사료된다.

**TMH의 세포막 보호 효능 평가**

ARPE-19 세포에 TMH를 농도 별(0.1, 0.5, 1 그리고 2 mg/ml)로 1시간 전처리 후, 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 24시간 노출시켜 LDH release assay를 통해 TMH의 세포막 손상 보호 효능을 확인하였다. Fig. 3A 결과에서 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24시간 처리한 실험군에서 세포막 손상으로 인해 세포 밖으로 유리된 LDH가 증가되었으나, TMH 처리에 의해 농도 의존적으로 세포막 보호를 통해 세포 밖으로 유리된 LDH가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 2 mg/ml 농도의 TMH 처리군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 처리에 의해 증가하는 LDH를 약 50%까지 억제해 뛰어난 세포막 보호 효능을 확인할 수 있었다. 이에 따라 TMH는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ARPE-19세포의 손상되는 세포막 보호를 통해 망막 질환을 예방 할 수 있을 것으로 사료된다.

**ARPE-19세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ROS 생성에 미치는 TMH의 효능**

항산화 효능은 세포 내부의 protein 그리고 DNA의 변형, 미토콘드리아 기능 저하 및 세포 사멸을 억제한다고 알려져 있다[10, 21, 22]. 대표적으로 항산화는 세포 내 활성산소의 축적을 방지하는 경로를 통해 이루어진다고 알려져 있다[13, 23]. 따라서 ARPE-19세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 생성된 ROS를 TMH 처리 시 조절할 수 있는지 확인 함으로서 항산화 효능을 평가 하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 세포 내에서 급격히 증가한 ROS level을 확인할 수 있다.

그러나 세포 사멸 및 세포막 보호 효능 최적 농도인 2 mg/ml의 TMH를 ARPE-19 세포에 1시간 전 처리한 실험군에서는 ROS의 생성을 현저히 감소시키는 결과를 확인 하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 TMH가 산화적 스트레스의 대표적 유발 인자인 ROS의 세포 내 과다 축적을 조절 함으로서 산화적 스트레스를 억제 하는 것으로 판단된다.

**TMH가 ARPE-19세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 MAPKs, HO-1, Bax, BCL-2 그리고 cleaved caspase-3 발현에 미치는 영향**

MAPKs의 아형 단백질들인 p38, ERK 그리고 JNK는 세포의 증식, 분화 및 염증과 apoptosis에 관여하는 세포 내 신호 단백질로 잘 알려져 있다[6, 20, 22]. MAPKs는 세포 내부 혹은 외부의 인자에 영향을 받아 단백질의 인산화 과정을 통해 세포 신호 전달 경로가 활성화되어 핵 내로 전사 인자의 전사가 시작된다고 알려져 있다. Fig. 4A의 결과를 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30분 노출 실험군에서 MAPKs의 인산화가 가장 활발히 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 2 mg/ml의 TMH를 1시간 전처리 실험군에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 증가된 MAPKs의 인산화를 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 TMH가 MAPKs의 인산화 조절을 통해 세포 생존 및 세포 사멸을 조절하는 것으로 사료된다.

HO-1은 heme의 분해와 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하고 항염증, 항산화 및 apoptosis 억제에 중요한 역할을 한다[23]. 주로 Nrf-2/HO-1 신호 전달 경로를 통해 HO-1의 발현이 증가하고 산화적 스트레스 환경에서 세포를 보호하는 역할을 한다[2, 8, 13, 23]. HO-1은 대표적인 항산화 효소로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 TMH 병용 처리 실험군에서 HO-1이 강하게 발현되었다(Fig. 5). 이를 통해 TMH

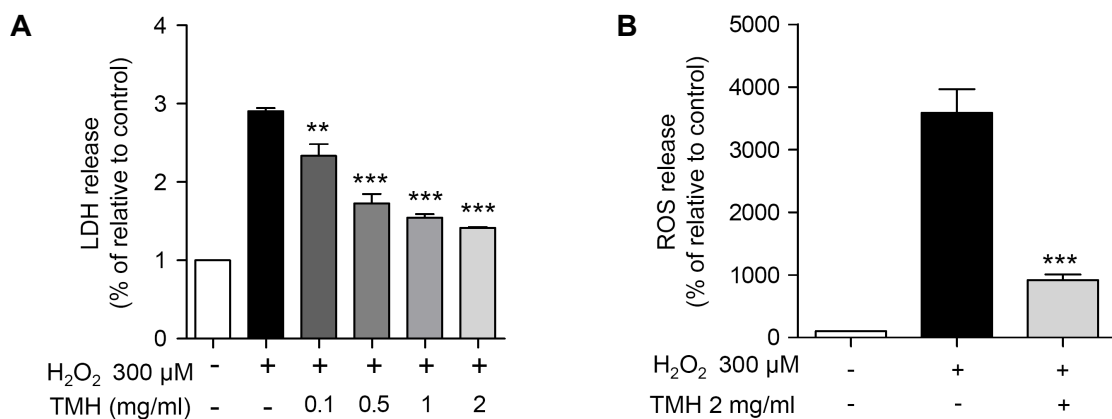


Fig. 3. Inhibitory effect of TMH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and ROS release. ARPE-19 (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were plated in the complete DMEM/F12 medium. The cells were pre-treated with TMH for 1 hr. Then, the cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) with for 24 hr, followed by the cell viability was determined using a LDH assay (A). The cells were pre-treated with TMH for 1 hr. Then, the cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) with for 24 hr. After treatment, the ROS production was determined by using a ROS kit (B). Asterisks (\*), (\*\*), and (\*\*\*) indicate *p*< 0.05, *p*<0.01 and *p*<0.005, respectively.

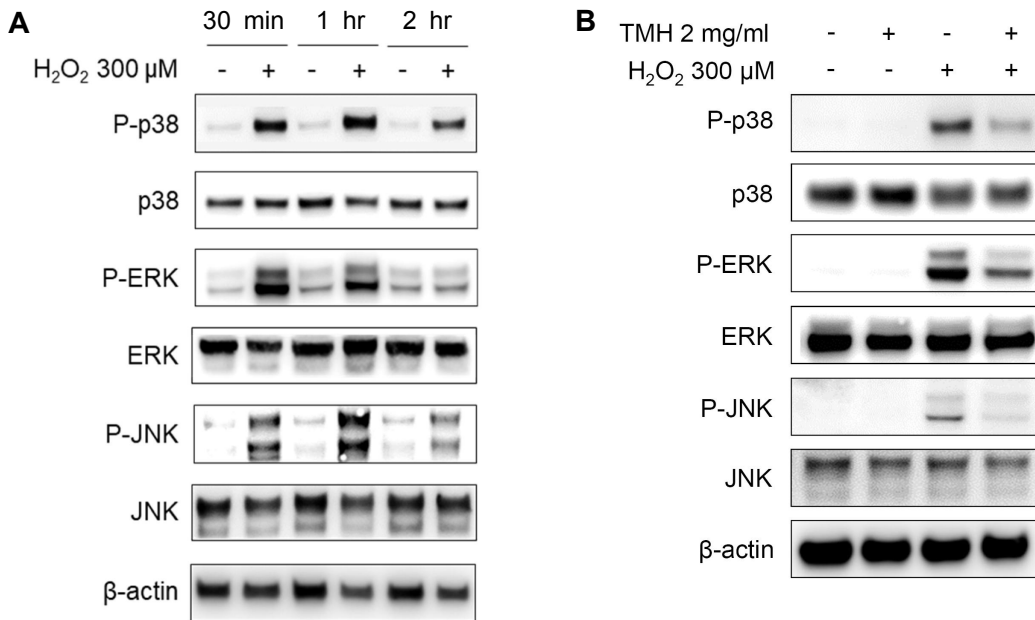


Fig. 4. TMH attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activation of MAPKs in ARPE-19 cells. ARPE-19 (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were plated in the complete DMEM/F12 medium. The cells were pre-treated with TMH for 1 hr. Then, the cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) with for 30 min. Subsequently, the cell lysates were subjected to Western blotting using primary antibodies (p38, p-p38, ERK, p-ERK, JNK and p-JNK).

의 항산화 효과를 확인 할 수 있었다.

또한, 세포 사멸에 관여 단백질인 Bax와 Bcl-2는 정상 세포에서 이형 중합체로 존재하지만 산화적 스트레스에

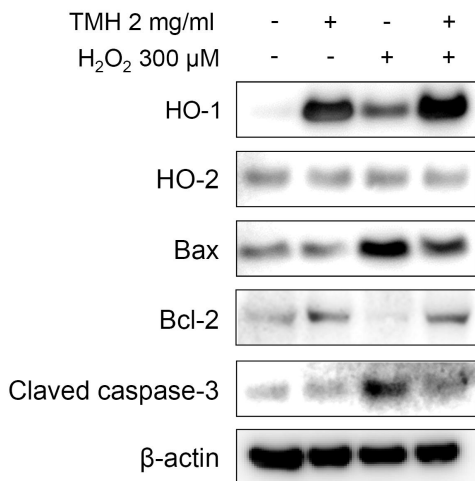


Fig. 5. Suppression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and cell death by HO-1, Bax/Bcl-2 and cleaved caspase-3 in ARPE-19 cells. ARPE-19 (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were plated in the complete DMEM/F12 medium. The cells were pre-treated with TMH for 1 hr. Then, the cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM) with for 24 hr. Subsequently, the cell lysates were subjected to western blotting using primary antibodies (HO-1, Bax/Bcl-2, and cleaved caspase-3).

의해 DNA가 손상 받으면 Bax의 발현이 증가하게 되고 Bcl-2와 이형중합체를 형성하고 남은 Bax가 동형중합체를 형성하게 되면 세포가 사멸하게 된다고 알려져 있다 [20, 22]. 또 다른 세포 사멸 단백질인 caspase는 다양한 세포 사멸 신호에 의해서 활성화 되는데, cleaved caspase-3의 경우 손상된 DNA의 복원을 차단해 세포 사멸이 일어난다고 알려져 있다. Cleaved caspase-3는 세포 사멸의 가장 마지막 단계로 apoptosis에 중요한 역할을 한다[15]. Fig. 5의 단백질 발현을 확인 한 결과 Bax의 단백질 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리 실험군에서 강하게 발현 되었다가 TMH 병용 처리 군에서 정상세포 수준으로 떨어진 것을 확인 할 수 있었다. Bcl-2의 세포질 내 단백질 발현은 산화적 스트레스가 증가함에 따라 감소했고 TMH 병용 처리 시 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 산화적 스트레스에 의해 세포 사멸 단백질인 Bax가 증가하고 이에 따라 Bcl-2의 이형중합체를 형성으로 Bcl-2가 감소하는 것을 확인 할 수 있었지만 TMH와 병용 처리한 실험군에서는 Bax가 감소하고 Bcl-2가 증가됨을 확인 할 수 있었다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리에 의해 증가된 cleaved caspase-3의 발현양이 TMH 병용 처리에 의해 현저히 감소함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 TMH가 산화적 스트레스에 의해 유도 되는 망막색소상피세포의 손상을 억제 할 수 있으며, 이에 따라 망막 질환 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료 된다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01563201)의 지원에 의해 연구 수행으로 인한 결과물이며, 이에 감사드립니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## Reference

- Baek, M., Seo, M., Kim, M., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. The antioxidant activities and hair-growth promotion effects of *Tenebrio molitor* larvae extracts (TMEs). *J. Life Sci.* **27**, 1269-1275.
- Chiang, Y. W., Su, C. H., Sun, H. Y., Chen, S. P., Chen, C. J., Chen, W. Y., Chang, C. C., Chen, C. M. and Kuan, Y. H. 2022. Bisphenol A induced apoptosis via oxidative stress generation involved Nrf2/HO-1 pathway and mitochondrial dependent pathways in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells. *Environ. Toxicol.* **37**, 131-141.
- Costa, S., Pedro, S., Lourenço, H., Batista, I., Teixeira, B., Bandarra, N. M., Murta, D., Nunes, R. and Pires, C. 2020. Evaluation of *Tenebrio molitor* larvae as an alternative food source. *NFS Journal* **21**, 57-64.
- Du, L., Chen, J. and Xing, Y. Q. 2017. Eupatilin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Biomed. Pharmacother.* **85**, 136-140.
- Hong, J., Han, T. and Kim, Y. Y. 2020. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: a review. *Animals* **10**, 2068.
- Hytti, M., Piippo, N., Salminen, A., Honkakoski, P., Kaarniranta, K. and Kauppinen, A. 2015. Quercetin alleviates 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity and inflammation in ARPE-19 cells. *Exp. Eye Res.* **132**, 208-215.
- Jajić, I., Popović, A., Urošević, M., Krstović, S., Petrović, M. and Guljaš, D. 2019. Chemical composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) reared in Serbia. *Con. Agr.* **68**, 23-27.
- Johnson, J., Maher, P. and Hanneken, A. 2009. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 2398-2406.
- Kauppinen, A., Niskanen, H., Suuronen, T., Kinnunen, K., Salminen, A. and Kaarniranta, K. 2012. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells – implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol. Lett.* **147**, 29-33.
- Kim, M. H., Chung, J., Yang, J. W., Chung, S. M., Kwag, N. H. and Yoo, J. S. 2003. Hydrogen peroxide- induced cell death in a human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19. *Kor. J. Ophthalmol.* **17**, 19-28.
- Koskela, A., Reinisalo, M., Petrovski, G., Sinha, D., Olmiere, C., Karjalainen, R. and Kaarniranta, K. 2016. Nutraceutical with resveratrol and omega-3 fatty acids induces autophagy in ARPE-19 cells. *Nutrients* **8**, 284.
- Li, Z., Dong, X., Liu, H., Chen, X., Shi, H., Fan, Y., Hou, D. and Zhang, X. 2013. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol. Vis.* **19**, 1656.
- Liang, R., Zhao, Q., Zhu, Q., He, X., Gao, M. and Wang, Y. 2021. Lycium barbarum polysaccharide protects ARPE-19 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress via the Nrf2/HO-1 pathway. *Mol. Med. Rep.* **24**, 1-8.
- Liu, H., Liu, W., Zhou, X., Long, C., Kuang, X., Hu, J., Tang, Y., Liu, L., He, J. and Huang, Z. 2017. Protective effect of lutein on ARPE-19 cells upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced G2/M arrest. *Mol. Med. Rep.* **16**, 2069-2074.
- Liu, L. and Wu, X. W. 2018. Nobiletin protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage. *Adv. Mol. Toxicol.* **32**, e22052.
- Quan, J. H., Gao, F. F., Ismail, H. A. H. A., Yuk, J. M., Cha, G. H., Chu, J. Q. and Lee, Y. H. 2020. Silver nanoparticle-induced apoptosis in ARPE-19 cells is inhibited by *Toxoplasma gondii* pre-infection through suppression of NOX4-dependent ROS generation. *Int. J. Nanomed.* **15**, 3695.
- Ravzanaadii, N., Kim, S.H., Choi, W. H., Hong, S. J. and Kim, N. J. 2012. Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *Int. J. Indust. Entomol.* **25**, 93-98.
- Wankun, X., Wenzhen, Y., Min, Z., Weiyang, Z., Huan, C., Wei, D., Lvzhen, H., Xu, Y. and Xiaoxin, L. 2011. Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium *in vitro*. *Mol. Vis.* **17**, 3512.
- Weng, S., Mao, L., Gong, Y., Sun, T. and Gu, Q. 2017. Role of quercetin in protecting ARPE-19 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway activation and endoplasmic reticulum stress inhibition. *Mol. Med. Rep.* **16**, 3461-3468.
- Yating, Q., Yuan, Y., Wei, Z., Qing, G., Xingwei, W., Qiu, Q. and Lili, Y. 2015. Oxidized LDL induces apoptosis of human retinal pigment epithelium through activation of ERK-Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Cur. Eye Res.* **40**, 415-422.
- Yiğit, M., Güneş, A., Uğuz, C., Yalçın, T. Ö., Tök, L., Öz, A. and Nazıroğlu, M. 2019. Effects of astaxanthin on antioxidant parameters in ARPE-19 cells on oxidative stress model. *Int. J. Ophthalmol.* **12**, 930.
- Zhang, Y., Ren, S., Liu, Y., Gao, K., Liu, Z. and Zhang, Z. 2017. Inhibition of starvation-triggered endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in ARPE-19 cells by taurine through modulating the expression of calpain-1 and calpain-2. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2146.
- Zhu, C., Dong, Y., Liu, H., Ren, H. and Cui, Z. 2017. Hesperetin protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered oxidative

damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed. Pharmacother.* **88**, 124-133.

24. Yu, J. M., Jang, J. Y., Kim, H. J., Cho, Y. H., Kim, D.

I., Kwon, O. J., Cho, Y. J. and An, B. J. 2016. Antioxidant capacity and Raw 264.7 macrophage anti-inflammatory effect of the *Tenebrio Molitor*. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 890-898.

## 초록 : ARPE-19 세포에서 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 추출물의 항산화 효과

김봉선<sup>†</sup> · 최라영<sup>†</sup> · 반유진 · 이준하 · 김인우 · 서민철\*

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충양잠산업과)

황반 변성은 현대 사회에서 발병율이 급격히 증가한 질환 중 하나이다. 황반 변성의 대표적인 원인은 노화로 인한 산화 스트레스로 널리 알려져 있고 최근 노령화로 인해 발병 연령은 40대부터 급격하게 증가하고 있다. 따라서 본 연구에서는 TMH를 이용해 산화적 스트레스에 대한 항산화 효능 및 세포 사멸 억제 연구를 통해 눈 건강 개선 소재를 개발하였다. 먼저 TMH의 인간 망막색소상피세포 사멸 억제 효능 평가를 위해 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. 망막색소상피세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 스트레스로 인해 약 60%의 세포 생존율을 확인 할 수 있었고 TMH에 의해 농도 의존적으로 세포 사멸을 억제됨을 확인 할 수 있었다. 또한 LDH release assay를 통해 세포막 보호 효능을 확인 하였으며 세포 내 ROS 측정을 통해 세포 내 활성산소종 조절을 통한 항산화 효능을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 세포 생존과 사멸에 관여하는 세포 내 신호 단백질인 MAPKs의 인산화 조절, 항산화 효소인 HO-1 발현 조절, 세포 사멸 관여 단백질인 Bax/Bcl-2의 발현 그리고 cleaved caspase-3 단백질 분석을 통해 TMH의 산화 스트레스에 대한 항산화 그리고 세포 사멸 억제 경로를 확인 하였다. 위와 같은 결과 도출을 통해 TMH의 눈 건강 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다.