



Involvement of TLR4-JNK/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cell activation of *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae extracts

Ju-Hwi Park¹ · Jongbeom Chae¹ · Joon Ha Lee² · Dongyup Hahn³ · Ju-Ock Nam^{1,4}

흰점박이꽃무지 유충 추출물의 RAW264.7 세포 활성화에서 TLR4-JNK/NF- κ B 신호전달 경로의 관여

박주휘¹ · 채종범¹ · 이준하² · 한동엽³ · 남주옥^{1,4}

Received: 3 August 2023 / Accepted: 23 October 2023 / Published Online: 6 November 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract In the environment in which humans live, there are various antigens that invade the human body and interfere with humans leading a healthy life, so the immune system recognizes the antigen then removes them through a complex mechanism. Macrophages are widely distributed immune cells involved in the innate immune system, and produce various immune modulators such as inducible nitric oxide synthase-induced nitric oxide, cyclooxygenase-2 induced prostaglandin E2 and proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha. On the other hand, *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae are a type of edible insect

that have emerged as an alternative to the future food supply problem. The immuno-modulatory effect through the activation of murine macrophage RAW264.7 cell via mitogen-activated protein kinases (MAPKs)/nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathways has been reported. Based on this report, in this study, we confirmed how the expression of immune modulators induced by *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae extracts in RAW264.7 cells was changed by treatment with pharmacological inhibitors of toll-like receptor 4 (TLR4), MAPKs and NF- κ B signaling pathways. As a result, reduction of immune modulators was confirmed in the c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor treatment group and NF- κ B inhibitor treatment group among the *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae-treated RAW264.7 cell. Furthermore, in the TLR4 inhibitor-treated group, decreases in phosphorylation of JNK and NF- κ B factors were confirmed in *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae-treated RAW264.7 cell, as well as decreases in immune modulators. This results suggest that *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae activates RAW264.7 cells by the engagement of TLR4-JNK/NF- κ B signaling pathway.

Dongyup Hahn (✉)
E-mail: Dohahn@knu.ac.kr

Ju Ock Nam (✉)
E-mail: namjo@knu.ac.kr

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Bukgu, Daegu 702-701, Republic of Korea

²Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-gun, Jeonbuk 55362, Republic of Korea

³Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41404, Republic of Korea

⁴Research institute of Tailored Food Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

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.

Keywords c-Jun N-terminal kinase · Edible insect food · Immune modulators · Macrophage · Nuclear factor-kappa B

서 론

인간이 살아가는 환경에는 인간의 체내에 침입하고자 하는 다양한 병원성 미생물과 독성 물질이 포함되어 있으며, 체내에 존재

하는 면역계는 복잡한 메커니즘을 통해 이러한 물질을 제거한다 [1]. 체내 면역계는 선천 면역계와 후천 면역계로 구분할 수 있으며, 이 중 선천 면역계는 후천 면역계와 달리 항원에 비특이적이고 신속하게 반응한다는 특징을 가지고 있다[2]. 선천 면역 반응은 주로 호중구 (neutrophils), 대식세포 (macrophages) 등의 골수계 세포 (myeloid cells) 들이 관여한다[3]. 이 중, 대식세포는 체내 전반에 걸쳐 널리 분포하는 면역 세포로 혈중에 존재하는 단핵구 (monocyte)가 분화하여 형성되며 간에서의 쿠퍼 세포 (kupffer cell), 중추신경계의 성상 소교 세포 (stellate microglial cell) 등 조직 특이적으로 존재하기도 한다[3].

대식세포는 외부 항원의 침입에 반응하여 탐식 작용을 통해 항원을 제거하며, 선천 면역 반응과 함께 세포 간 상호작용을 통해 T 세포, B 세포와 함께 사이토카인 발현, 반응성 라디칼 및 효소 활성 등을 기반으로 하는 체액성 면역에 기여한다[4]. 대식세포는 활성화 시 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의한 산화질소(nitric oxide) 생성, cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의한 프로스타글란딘 E2 (prostaglandin E2) 생성, 전염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 발현 등의 표현형을 보인다[5-7]. 이러한 면역조절물질을 생산하는 대식세포의 활성화를 매개하는 세포 내 신호 전달 경로로는 p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)로 구성되는 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 경로와 nuclear factor kappa-B (NF-κB) 경로가 잘 알려져 있다[8]. 대식세포 활성화를 매개하는 MAPKs 경로와 NF-κB 경로의 수용체로는 대표적으로 톨 유사 수용체 (Toll-like receptor, TLR)가 알려져 있다[9].

식용 곤충은 최근 인류에 도래한 미래 식량 공급 문제에 대안으로서 활용 가능한 양질의 단백질 공급원인 동시에, 최근 다양한 약리 효과에 대한 연구가 보고되고 있다[10]. 딱정벌레목 꽃무지과에 속하는 흰점박이꽃무지의 유충인 흰점박이꽃무지 유충(*Protaetia brevitarsis seulensis* larvae, PB)은 굼벵이 또는 꽃벵이의 이름으로 불리며 한국뿐만 아니라, 일본, 중국, 유럽에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 식용 곤충으로 알려져 있다[11]. 식용 곤충이 생물 자원으로써 그 가치가 높게 평가되고 있으며, 식용 곤충의 기능성 물질에 대한 관심이 고조됨에 따라 흰점박이꽃무지 유충이 가지고 있는 기능성에 대한 연구도 여러 방면으로 연구되고 있으며, 대표적으로 유산균 발효 물질의 항산화 활성, 흰점박이꽃무지 유충 구성 성분인 protaetiamycine 9의 항염증 활성 등이 보고되어 있다[10-12]. 뿐만 아니라, Yoo 등[13]은 대식세포 내 MAPKs 및 NF-κB 신호 전달 경로를 통한 면역 활성 효과를 보고하였다. 이를 바탕으로, 본 연구에서는 MAPKs 경로와 NF-κB 경로의 각 인자에 해당하는 약리학적 억제제를 활용하여 각 인자가 흰점박이꽃무지 유충으로 유도된 대식세포 내 면역 활성 효과에 미치는 영향에 대해 탐구하였으며, 더 나아가 수용체 수준의 세포 내 작용 기전을 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 흰점박이꽃무지 유충은 익산굼벵이농장(익산, 전라북도)에서 3일간 절식 후에 세척하여 끓는 물에 30초간 데

친 증령 유충들을 열풍 건조한 것으로 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약은 lipopolysaccharide (LPS), SB203580, PD98059, SP600125, BAY 11-7082, TAK-242는 Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)사에서, Western blot에 사용한 Antibody는 iNOS, COX-2, p38, p-p38, p-ERK, JNK, p-JNK, IκB, p-IκB, NF-κB, p-NF-κB는 Cell signaling technology (Beverly, MA, USA)사에서, β-actin, ERK, Mouse, Rabbit 2차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, MA, USA)사에서 구입하였다.

Protaetia brevitarsis seulensis larvae 추출물 제조

열풍 건조한 흰점박이꽃무지 유충은 추출물 제조를 위해 액체질소를 이용하여 급속 냉동시킨 후 막자 사발을 이용하여 분말로 준비하여 흰점박이꽃무지유충 분쇄물(CPBE, Crushed *protaetia brevitarsis seulensis* extract)를 획득하였다. 흰점박이꽃무지 유충 열수 추출물(PBWE, *protaetia brevitarsis seulensis* water extract)을 위해서 흰점박이꽃무지 유충 분말 1g에 10 mL의 증류수를 혼합하여 shaking water bath를 이용하여 60 °C에서 20시간 동안 교반하였다. 교반된 흰점박이꽃무지 유충의 열수추출물은 15000 ×g로 10분간 원심분리 후 얻어진 상등액을 취해 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과하고 centrifugal evaporator (CVE-3100, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축하여 수분이 제거된 추출물은 -70 °C에서 보관하고 실험 시 증류수에 녹여 사용하였다(추출 수율: 54%). 흰점박이꽃무지유충 주정 추출물(PBEE, *protaetia brevitarsis seulensis* ethanol extract)을 위해서 흰점박이꽃무지 유충 분말 1g에 10 mL의 70% 에탄올을 첨가한 후 sonicator 수조에서 6시간 추출하였다. 추출물은 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 진행하여 얻어진 상등액을 취해 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과 후 농축하였다. 농축하여 수분이 제거된 추출물은 -70 °C에서 보관하고 실험 시 증류수에 녹여 사용하였다(추출 수율: 49%).

세포 배양

마우스 유래 대식세포주 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1%의 penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. DMEM, FBS는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

세포 생존율 측정

RAW264.7 세포를 96-well plates에 각 웰 당 5×10³개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰 마다 CPBE, PBWE, PBEE를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, CCK-8 kit (Dojindo, Japan)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였으며, 제조업체의 프로토콜에 따라 10 μL의 CCK-8 용액을 처리 후 2시간 배양 후 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소 생성능 측정

대식세포의 산화질소 생성능은 Griess reagent system (Promega, Madison, WI, USA)에 의해 측정되었다. RAW264.7 세포를 96-well plates에 각 웰 당 1×10⁵개의 세포를 분주하고 24시간 동안

배양하였다. 이후, 각 웰 마다 CPBE, PBWE, PBEE를 농도 별로 처리 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 이후, 50 μ L의 세포 상층액을 새로운 96-well plates에 옮긴 후 웰 당 50 μ L의 sulfanilamide 용액을 첨가하고 10분간 반응하였다. 이후, 웰 당 50 μ L의 N-(1-naphthyl) ethylenediamine 용액을 첨가하고 10분간 반응한 뒤 infinite reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석

RAW264.7 세포를 6-well plates에 각 웰 당 1×10^6 개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰 마다 CPBE, PBWE, PBEE를 농도 별로 처리한 후 iNOS, COX-2의 경우 24시간, MAPK인자의 경우 30분, NF- κ B 인자의 경우 15분 간 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 1% protease inhibitor와 1% phosphatase inhibitor가 함유된 radioimmunoprecipitation assay 완충액(Biosesang, Korea)으로 용해하여 13000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 후 상층액의 단백질을 얻었다. 희석한 단백질은 SDS-loading 완충액과 4:1의 비율로 혼합 후 100°C에서 10분간 가열하였으며, 동량의 단백질은 sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 겔 상의 단백질을 분리하고, nitrocellulose (NC) membrane으로 옮겼다. Membrane에 전달된 단백질은 0.1%의 Tween 20을 함유한 Tris-buffered saline (TBST)에 희석한 5%의 skim milk로 blocking 한 후, iNOS, COX-2, p38, p-p38, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, I κ B, p-I κ B, NF- κ B, p-NF- κ B, β -actin에 대한 1차 항체를 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이후 membrane은 TBST로 10분간 3회 세척한 후 horseradish peroxidase가 접합된 2차 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, TBST로 10분간 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (Cytiva, Marlborough, MA, USA)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. 단백질의 상대적 발현 수준은 Image-J를 사용하여 정량화하였다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) 분석

RAW264.7 세포를 6-well plates에 각 웰 당 1×10^6 개의 세포를 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 이후, RAW264.7 세포에 CPBE, PBWE, PBEE를 농도 별로 처리한 후 3시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 RNAiso Plus reagent (Takara Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 Trizol method를 통해 RNA를 분리하였다. Complimentary DNA (cDNA)는 ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix (FSQ-201, TOYOBO, Osaka, Japan)을 사용하여 합성되었으며, RT-qPCR은 Cyclo iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 수행되었다. 각 인자의 mRNA 수준의 상대적인 발현은 β -actin을 이용하여 표준화하여 $\Delta\Delta C_t$ 기법을 활용하여 정량화하였다. 사용된 primer는 Supplementary Table 1에 정리하였다.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

RAW264.7 세포를 6-well plates에 웰 당 1×10^6 개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, RAW264.7 세포에 CPBE, PBWE, PBEE를 농도 별로 처리한 후 24시간 동안 배양

하였다. 배양 후, 세포 상층액을 수거하여 사용 전까지 -80°C 에 보관하였다. TNF- α 와 IL-6의 발현은 ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였으며 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

통계 분석

모든 데이터는 3반복 결과값에 대한 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, 통계 분석은 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 수행되었다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

용매 별 PB 추출물이 RAW264.7 대식세포의 활성화에 미치는 영향

대식세포 활성화 시 생성되는 iNOS는 L-아르기닌(L-arginine)을 대사하여 L-시트룰린(L-citrulline)과 산화질소를 생성하며, 산화질소는 항종양 활성, 항균 활성, 사이토카인 및 케모카인 생성에 관여하는 등 체내 면역 반응에 관여한다[16,17]. COX-2는 인지질에 존재하는 아라키돈산(arachidonic acid)를 대사하여 프로스타글란딘 E2를 생성하며, 프로스타글란딘 E2는 혈관 확장과 호중구 등 면역세포의 국소적 유인 작용을 통한 체내 면역 반응에 관여한다[18,19]. 종양괴사인자 알파(Tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)으로 Regulatory T cell의 활성화 등 면역 세포 활성화를 통한 면역 반응에 관여한다[20]. 본 연구에서는 RAW264.7 대식세포에 PB의 분쇄물(CPBE), 열수(PBWE) 및 70% 주정(PBEE)을 용매로 사용한 추출물을 가하여 PB에 대한 대식세포 활성화에 미치는 영향을 확인하였으며, 양성 대조군으로는 LPS (1 μ g/mL)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 CPBE, PBWE, PBEE는 설정한 농도(100, 200, 400 μ g/mL)에서 세포 독성을 보이지 않았다(Sup Fig. 1A). 산화질소 생성능은 PBEE 처리군에서는 무처리 대조군과 비교하여 400 μ g/mL의 처리군에서 무처리 대조군 대비 1.4배 가량 증가하였으며, CPBE 처리군에서는 100 μ g/mL 처리군부터 유의적으로 증가하였으며, 농도 의존적으로 증가하여 400 μ g/mL의 처리군에서는 무처리 대조군 대비 5배 가량 증가하였으며, PBWE 처리군에서는 모든 농도에서 무처리 대조군 대비 6배 가량 증가하였다(Fig. S1B). 이와 유사하게, iNOS와 COX-2는 PBEE 처리군에서는 발현이 확인되지 않았으나, CPBE 처리군과 PBWE 처리군에서는 농도 의존적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. S1C). TNF- α 의 mRNA 발현은 CPBE, PBWE, PBEE 처리군에서 무처리 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보였으며, PBWE 처리군에서 효과가 가장 우수하였다(Fig. S1D). 종합하면, 흰점박이꽃무지유충의 분쇄물, 열수 및 70% 주정 용매를 사용한 추출물 중 흰점박이꽃무지유충의 분쇄물과 열수 추출물에서 대식세포의 활성화 효과를 확인하였으며, 열수 추출물에서 그 효과가 가장 뛰어난 것을 확인하였다.

PBWE가 RAW264.7 대식세포의 MAPK 신호전달 경로의 활성화에 미치는 영향

MAPK 신호 전달 경로는 p38, ERK, JNK로 구성되며, 각 인자

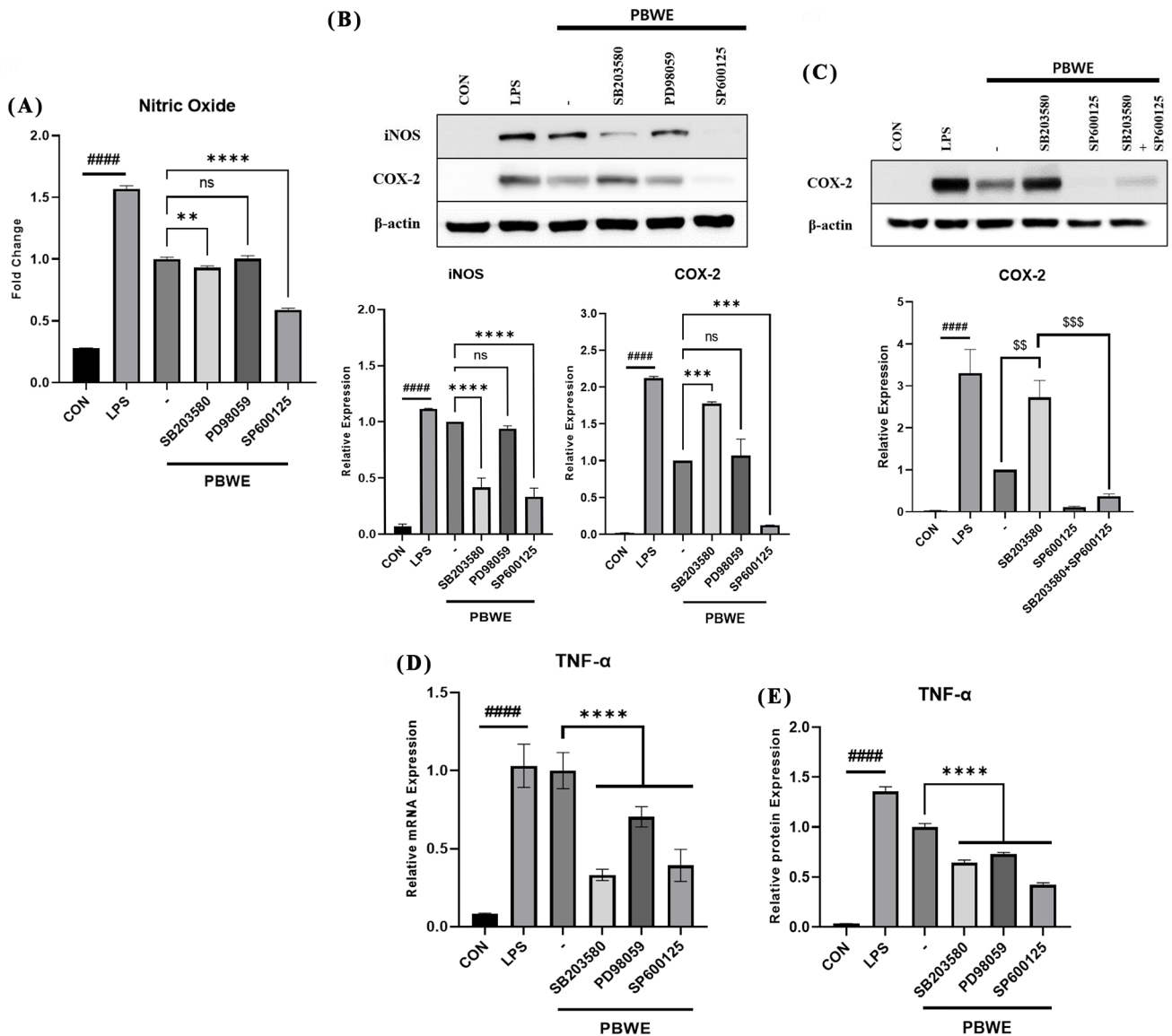


Fig. 1 Inhibition of JNK pathway decreased immune response in PBWE-treated RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were pre-treated with SB203580 (p38 inhibitor, 20 μ M), PD98059 (ERK inhibitor, 20 μ M), SP600125 (JNK inhibitor, 20 μ M) for 2 h then co-treated with PBWE (400 μ g/mL) 3 h for mRNA analysis, 24 h for the others. (A, B) JNK inhibitor treatment group showed decreased production of Nitric oxide, iNOS and COX-2 expression in PBWE-treated RAW264.7 cells. Nitric oxide production was measured using Griess reagent. The expression of iNOS and COX-2 were detected by Western blot and normalized by β -actin. (C, D) MAPKs inhibitor treatment group showed decreased mRNA and protein expression of TNF- α in PBWE-treated RAW264.7 cells. The expression of mRNA level of TNF- α was performed by RT-qPCR and normalized by β -actin. The expression of protein level of TNF- α was performed by ELISA. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 represent a significant difference compared with the PBWE-treated group. ss p < 0.01, sss p < 0.001 represents a significant difference compared with SB203580 co-treated PBWE-treated group. $^{####}$ p < 0.0001 represents a significant difference compared with control group and positive control (LPS) group

는 인산화에 의해 신호 전달 경로가 활성화되며, ERK와 JNK에 의해 인산화 되는 c-Fos와 c-Jun은 Activated protein-1을 형성하여 대식세포의 활성화를 위한 전사인자로서 기여한다[8,14]. PBWE의 농도(100, 200, 400 μ g/mL)별 처리에 의해 p38, ERK, JNK의 인산화가 증가하였으며, 본 결과를 통해 PBWE가 MAPK 신호전달 경로를 매개하여 RAW264.7세포의 활성화를 유도하였음을 확인하였다(Fig. S2A). 이에, MAPK 신호전달 경로의 3가

지 인자 중 어떤 인자가 RAW264.7 세포의 활성화에 기여하는지 알아보기 위해 MAPK 신호전달 경로의 약리학적 억제제를 활용하여 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포 내에서 대식세포 활성화 바이오마커의 발현을 확인하였다. 약리학적 억제제는 p38의 경우 SB203580, ERK의 경우 PD98059, JNK의 경우 SP600125를 활용하였다. 그 결과, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 p38 억제제 처리군에서 산

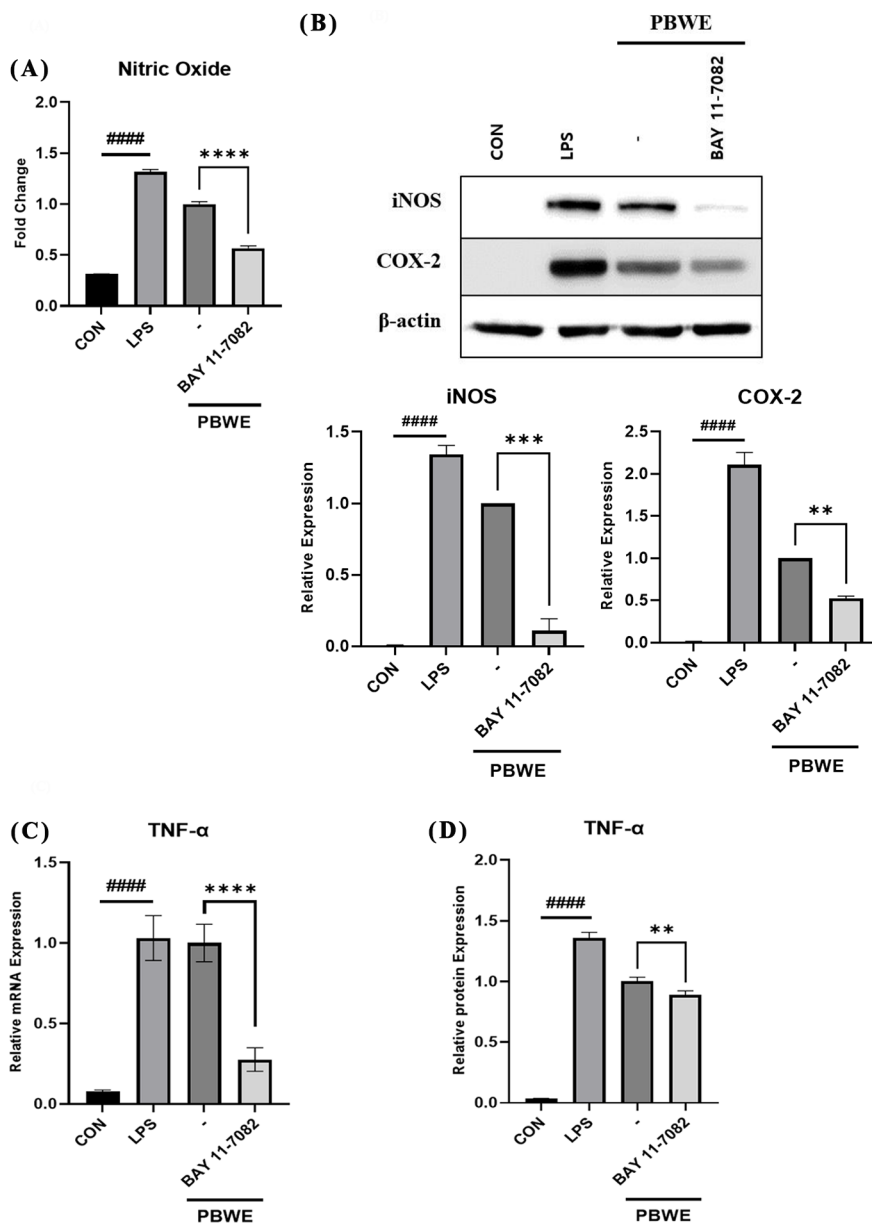


Fig. 2 Inhibition of NF-κB pathway decreased immune response in PBWE-treated RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were pre-treated with BAY 11-7082 (NF-κB inhibitor, 10 μM) for 2 h then co-treated with PBWE (400 μg/mL) 3 h for mRNA analysis, 24 h for the others. (A, B) NF-κB inhibitor treatment group showed decreased production of Nitric oxide, iNOS and COX-2 expression in PBWE-treated RAW264.7 cells. Nitric oxide production was measured using Griess reagent. The expression of iNOS and COX-2 were detected by Western blot and normalized by β-actin. (C, D) NF-κB inhibitor treatment group showed decreased mRNA and protein expression of TNF-α in PBWE-treated RAW264.7 cells. The expression of mRNA level of TNF-α was performed by RT-qPCR and normalized by β-actin. The expression of protein level of TNF-α was performed by ELISA. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001 represent a significant difference compared with the PBWE-treated group. #####*p* < 0.0001 represents a significant difference compared with control group and positive control (LPS) group

화질소 생성이 10%가량 감소하였고, JNK 억제제 처리군에서는 40%가량 감소하였으나, ERK 억제제 처리군에서는 감소하지 않았다(Fig. 1A). iNOS의 발현은 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군에 비해 p38 및 JNK 억제제 처리군에서 감소하였으나, 흥미롭게도 COX-2의 발현은 JNK 억제제 처리군에서만 감소하였으며, p38 억제제 처리군에서는 증가하는 경향

을 보였다(Fig. 1B). Muniyappa와 Das의 연구[15]에 의하면 p38 억제제 SB203580은 mixed lineage kinase-3(MLK3)-MKK7 신호전달 경로에 의한 JNK 신호전달 경로의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있으며, p38 억제제 처리로 인해 JNK 신호전달 경로의 활성화가 유도되어 COX-2의 발현이 증가한 것으로 사료된다. 이에, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포에 p38 억제제와

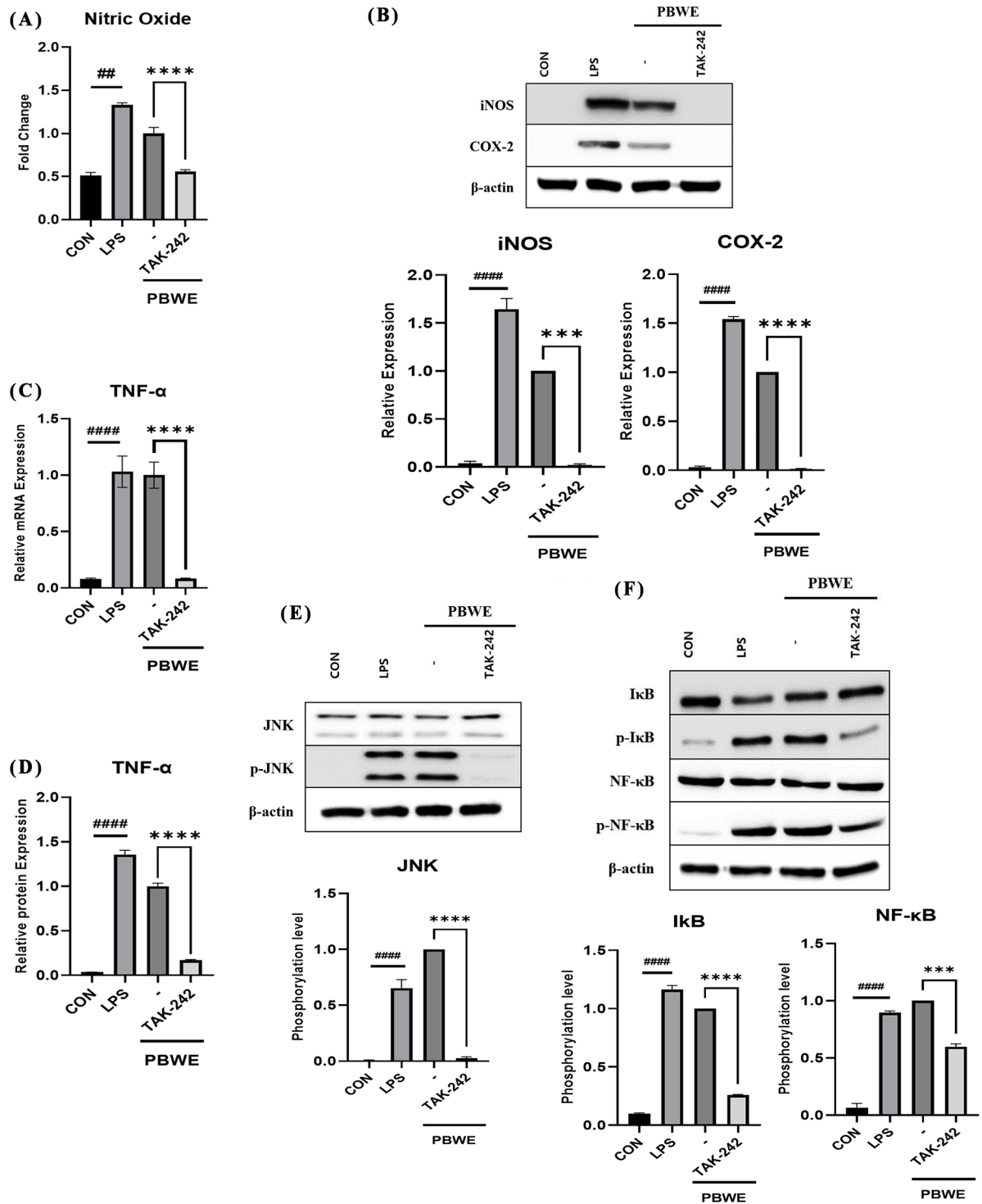


Fig. 3 TLR4 is the important receptor for activating immune response in PBWE-treated RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were pre-treated with TAK-242 (TLR4 inhibitor, 1 μ M) for 2h then co-treated with PBWE (400 μ g/mL) 30 min for JNK pathway analysis, 15 min for NF- κ B signaling pathway, 3 h for mRNA analysis, 24 h for the others. (A-D) Inhibition of TLR4 showed decreased immune modulator factors in PBWE-treated RAW264.7 cells. Nitric oxide production was measured using Griess reagent. The expression of iNOS and COX-2 were detected by Western blot and normalized by β -actin. The expression of mRNA level of TNF- α was performed by RT-qPCR and normalized by β -actin. The expression of protein level of TNF- α was performed by ELISA. (E-F) Inhibition of TLR4 showed decreased phosphorylation of JNK and NF- κ B signaling pathways in PBWE-treated RAW264.7 cells. The expression and phosphorylation of JNK, I κ B and NF- κ B were detected by Western blot. ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 represent a significant difference compared with the PBWE-treated group. ##### p < 0.00001 represents a significant difference compared with control group and positive control (LPS) group

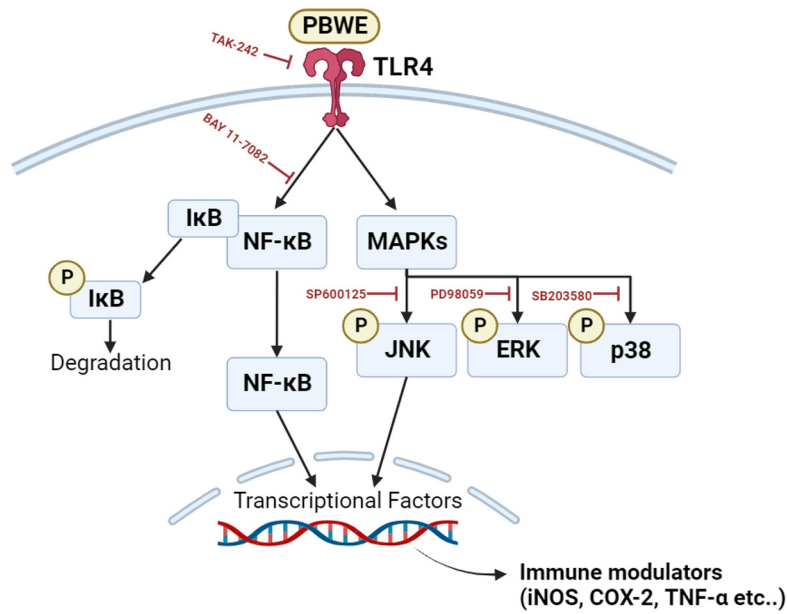


Fig. 4 Graphical summary of PBWE-induced RAW264.7 cell activation

JNK 억제제를 병용처리하여 COX-2의 발현을 확인한 결과, PBWE와 p38 억제제로 유도된 COX-2의 발현은 PBWE와 p38-JNK 억제제 병용 처리군에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이에, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포 내 COX-2의 발현은 JNK 신호전달경로에 의해 유도되는 것으로 사료된다. 한편, TNF- α 의 mRNA 수준 발현은 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 p38, ERK, JNK 억제제 처리군에서 감소하였으며, TNF- α 의 단백질 수준 발현은 이전 결과와 일관되게 p38, ERK, JNK 억제제 처리로 인해 감소하였다(Fig. 1C, D). 흥미로운 점은, ERK 억제제 처리군에 비해 p38 억제제 처리군과 JNK 억제제 처리군에서 TNF- α 의 mRNA 수준 발현과 단백질 수준 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, p38 억제제 처리군에 비해 JNK 억제제 처리군에서 TNF- α 의 단백질 수준 발현이 더욱 감소하는 것을 확인하였다. 정리하면, PBWE는 MAPK 신호전달 경로의 인자 중 JNK 신호전달 경로를 매개하여 RAW264.7 세포의 활성화를 유도하는 것으로 사료된다.

PBWE가 RAW264.7 대식세포의 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화에 미치는 영향

NF- κ B 신호 전달 경로는 대식세포 활성화를 통한 면역 반응의 핵심 인자로, 비활성화된 대식세포 내에서는 inhibitory κ B- α (I κ B- α)와 NF- κ B가 결합하여 불활성화 형태로 존재하지만, 외부 자극에 의한 대식세포 활성화 시, I κ B kinase의 작용에 의해 I κ B- α 의 인산화가 유도되어 프로테아좀 분해(proteosomal degradation)가 발생하고 NF- κ B는 핵 내부로 전위(translocation)되어 전사인자로서 작용하여 대식세포의 활성화에 기여한다[8,21]. 농도(100, 200, 400 μ g/mL) 별 PBWE 처리에 의해 I κ B, NF- κ B의 인산화가 증가하였으며, 이는 PBWE가 NF- κ B 신호전달 경로를 매개하여 RAW264.7세포의 활성화를 유도하였음을 확인하였다(Fig. S2B). NF- κ B 신호전달 경로가 RAW264.7 세포의 활성화에 기여함을 추가로 확인하기 위해, NF- κ B의 약리학적 억제제 BAY

11-7082를 활용하여 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포 내에서 대식세포 활성화 바이오마커의 발현을 확인하였다. 그 결과, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 NF- κ B 억제제 처리군에서 산화질소 생성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 이와 유사하게, iNOS와 COX-2의 발현 또한 감소하는 것을 확인하였으며(Fig. 2B), TNF- α 의 mRNA 및 단백질 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2C, D). 이는 RAW264.7세포의 활성화에 NF- κ B 신호전달 경로가 관여하는 것으로 사료된다.

PBWE로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 TLR4 수용체가 미치는 영향

다양한 천연 물질이 TLRs 중 TLR4를 매개로 하여 대식세포의 활성화를 유도하는 것으로 보고되어 있다[9]. 이에, PBWE가 TLR4 수용체를 통해 면역 반응이 수행되는 것을 확인하기 위해, TLR4의 약리학적 억제제를 활용하여 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포 내에서 대식세포 활성화 바이오마커의 발현을 확인하였다. TLR4의 약리학적 억제제는 TAK-242를 활용하였다. 그 결과, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 TLR4 억제제 처리군에서 산화질소 생성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 이와 마찬가지로, iNOS와 COX-2의 발현이 PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 TLR4 억제제 처리군에서 감소하였고(Fig. 3B), TNF- α 의 mRNA 및 단백질 수준의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3C). 추가적으로, PBWE로 유도된 RAW264.7 세포 내 JNK 및 NF- κ B 신호전달 경로에 TLR4가 미치는 영향에 대해 알아보았다. 그 결과, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포의 억제제 무처리군과 비교하여 TLR4 억제제 처리군에서 JNK와 NF- κ B 경로의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다. 즉, PBWE가 처리된 RAW264.7 세포에서 인산화가 TLR4 하위 경로의 신호 전달이 감소하는 것을 확인하였으며, RAW264.7 세포의 활성화가

감소하는 것을 확인하였으며, 이는 PBWE가 TLR4에 의해 RAW264.7 세포의 활성화를 유도하는 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 흰점박이꽃무지 유충의 RAW264.7세포의 활성화에는 TLR4 수용체와 그 하위 신호전달 경로로 JNK 및 NF- κ B 경로가 관여하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 추후, 흰점박이꽃무지 유충 내 RAW264.7 세포의 활성화를 유도하는 효과를 지닌 기능 성분에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것이며, *in vivo*에서의 흰점박이꽃무지 유충의 면역세포 활성화 효과에 대한 평가가 필요할 것으로 사료된다.

초 록

인간이 살아가는 환경에는 인체에 침입하여 건강한 삶을 영위하는 것을 방해하는 다양한 항원들이 존재하며, 면역 체계는 복잡한 기전을 통하여 이를 인식하고 제거한다. 대식세포는 선천 면역 체계에 관여하는 면역세포로 체내 널리 분포하고 있으며, inducible nitric oxide synthase로 유도된 산화질소, cyclooxygenase-2로 유도된 prostaglandin E2 그리고 tumor necrosis factor-alpha 등의 전염증성 사이토카인 같은 다양한 면역 조절 물질을 생산한다. 흰점박이꽃무지유충은 미래 식량 수급 문제에 대한 대안으로 등장한 식용 곤충의 일종으로, 기존 mitogen activated protein kinases 및 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 신호전달 경로를 경유하는 RAW264.7 대식세포의 활성화를 통한 면역 조절 효과가 보고되었다. 본 연구에서는 RAW264.7 세포에서 흰점박이꽃무지유충 추출물에 의해 유도된 면역 조절 물질의 발현이 toll-like receptor 4, mitogen activated protein kinases 및 nuclear factor-kappa B 신호전달 경로의 약리학적 억제에 의해 어떻게 변화되었는지 확인하였다. 그 결과, 흰점박이꽃무지유충 처리에 의해 증가된 면역 조절 물질의 발현이 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 억제제 및 NF- κ B 억제제 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 또한, toll-like receptor 4 (TLR4) 억제제 처리에 의해서는 흰점박이꽃무지유충 추출물 처리에 의해 증가된 면역 조절 물질의 발현과 JNK 및 NF- κ B의 인산화 감소를 확인하였다. 우리의 이러한 연구는 흰점박이꽃무지유충이 TLR4-JNK/NF- κ B 신호전달의 관여에 의해 RAW264.7 세포를 활성화하는 것을 시사한다.

Keywords 대식세포 · 면역조절인자 · 식용곤충 · c-Jun N-terminal kinase · Nuclear factor-kappa B

감사의 글 본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부 과제 번호: PJ01594003)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125: S3–S23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Koenderman L, Buurman W, Daha MR (2014) The innate immune response. *Immunol Lett* 162: 95–102. doi: 10.1016/j.imlet.2014.10.010
- Beutler B (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845–859. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci (Landmark Ed)* 13: 453–461. doi: 10.2741/2692
- Kashfi K, Kannikal J, Nath N (2021) Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of iNOS-derived NO. *Cells* 10: 3194. doi: 10.3390/cells10113194
- Giroux M, Descoteaux A (2000) Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α . *J Immunol* 165: 3985–3991. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3985
- Ma X (2001) TNF- α and IL-12: balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect* 3: 121–129. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01359-9
- Juhas U, Ryba-Stanislawowska M, Szargiej P, Myśliwska J (2015) Different pathways of macrophage activation and polarization. *Adv Hyg Exp Med* 69: 496–502. doi: 10.5604/17322693.1150133
- Geum NG, Eo HJ, Kim HJ, Park GH, Son HJ, Jeong JB (2020) Immune-enhancing activity of *Hydrangea macrophylla* subsp. *serrata* leaves through TLR4/ROS-dependent activation of JNK and NF- κ B in RAW264.7 cells and immunosuppressed mice. *J Funct Foods* 73: 104139. doi: 10.1016/j.jff.2020.104139
- Park MJ, Cho SJ (2022) Antioxidant Activities of *Protaetia brevitarsis* Larvae Fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Life Sci* 32: 890–898. doi: 10.5352/JLS.2022.32.11.890
- Kwon EY, Yoo J, Yoon YI, Hwang JS, Goo TW, Kim MA, Choi YC, Yun EY (2013) Pre-treatment of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) as an ingredient for novel foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(3): 397–402. doi: 10.3746/jkfn.2013.42.3.397
- Choi RY, Seo MC, Lee JH, Kim IW, Kim MA, Hwang JS (2021) Inhibitory Effect of *Protaetia brevitarsis* 9 Derived from *Protaetia brevitarsis* *seulensis* Larvae on LPS-mediated Inflammation in RAW264.7 Cells. *J Life Sci* 31: 987–994. doi: 10.5352/JLS.2021.31.11.987
- Yoo BG, Hong JP, Song HY, Byeon EH (2022) Immuno-Modulatory Activity of Hot Water Extracts Isolated from *Protaetia brevitarsis* *seulensis* Larvae through MAPKs and NF- κ B Pathways in Macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51(2): 100–106. doi: 10.3746/jkfn.2022.51.2.100
- Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180–186. doi: 10.1016/S0955-0674(97)80061-0
- Muniyappa H, Das KC (2008) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 20: 675–683. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.12.003
- Nathan CF, Hibbs Jr JB (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65–70. doi: 10.1016/0952-7915(91)90079-G
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunol* 2: 907–916. doi: 10.1038/ni1001-907
- Giuliano F, Warner TD (2002) Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1001–1006. doi: 10.1124/jpet.102.041244
- Kalinski P (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188: 21–28. doi: 10.4049/jimmunol.1101029
- Jang D-i, Lee A-H, Shin H-Y, Song H-R, Park J-H, Kang T-B, Lee S-R, Yang S-H (2021) The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci* 22: 2719. doi: 10.3390/ijms22052719
- Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* 42: 443–468. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130338