

Suppression of Monosodium Urate-induced NLRP3 Inflammasome Activation by Garlic-derived Sulfur-containing Phytochemicals is Associated with Blocking ROS Generation in RAW 264.7 Macrophages

Min Yeong Kim¹ and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received February 8, 2023 / Revised April 5, 2023 / Accepted April 13, 2023

Gout, a chronic inflammatory arthritic disease, is characterized by hyperuricemia. Gout can be induced by an inflammatory response to monosodium urate (MSU) crystals mediated by pro-inflammatory cytokine release following activation of the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome. Many sulfur-containing phytochemical compounds in garlic (*Allium sativum* L.) are considered active ingredients because of their potential pharmacological benefits for various diseases, but their efficacy in NLRP3 inflammasome activation-mediated gout has not been demonstrated. In this study, we investigated whether diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS), representative garlic-derived sulfur compounds, have an inhibitory effect on MSU-induced NLRP3 inflammasome activation. Our results showed that under non-cytotoxic conditions, DADS and DATS significantly blocked nitric oxide production and interleukin (IL)-1 β release in response to MSU in lipopolysaccharide (LPS)-primed RAW 264.7 macrophages. DADS and DATS also attenuated enhanced expression of NLRP3 and its adapter protein, apoptosis-associated speck-like protein, which was associated with down-regulation of and caspase-1 p20 and IL-1 β expression, suggesting that MSU-induced LRP3 inflammasome activation was counteracted by DADS and DATS. Furthermore, DADS and DATS blocked oxidative stress, an upstream event for NLRP3 inflammasome activation, as evidenced by the fact that they scavenged reactive oxygen species (ROS) production. Taken together, our findings demonstrate that DADS and DATS suppressed NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the ROS/NLRP3 pathway and that they have potential as treatments for NLRP3-dependent gouty arthritis.

Key words : Garlic-derived sulfur compounds, gout, monosodium urate, NLRP3 inflammasome, ROS

서 론

음식의 맛과 향을 내기 위해 널리 사용되는 마늘(*Allium sativum* L.)은 약리학적 특성을 가진 활성 성분이 풍부하게 존재한다. 또한, 마늘은 다양한 질병의 예방과 치료의 목적으로 오랫동안 사용되어 왔으며, 항염증, 저혈당, 항당뇨, 항고지혈증, 항암, 항균 및 간 보호 효과와 같은 일련의 약리학적 특성은 마늘의 강력한 항산화 활성과 밀접한 연관성을 가진다[28, 29]. 특히 allicin, vinyl-dithiols, ajoenes, diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), selenium과 같은 많은 항산화 활성을 가지는 황

함유 화합물(sulfur-containing phytochemical compounds)이 마늘에 풍부하게 존재하며, 그들은 항바이러스 및 항균과 다양한 대사성 및 신경계 질환 뿐만 아니라 항암 활성 또한 높은 것으로 보고된 바 있다[5, 8, 10, 16-19, 21, 28-30, 33]. 그중, DADS와 DATS는 주요 allyl 황화합물로서 항산화 및 항염증 활성 뿐만 아니라 항암 활성 및 면역증강 효과 등을 가진다[8, 20, 21].

관절에 통증과 부종을 일으키는 관절염의 일종인 통풍(gout)은 혈중에 요산(uric acid)의 수치가 증가하는 고요산혈증(hyperuricemia)을 특징으로 하는 퓨린(purine) 대사 장애(purine metabolism disorder)이다[7, 27]. 요산은 주로 핵산의 이화과정 중 퓨린 염기에서 생긴 inosine 또는 guanosine에서 변환된 xanthine이 xanthine oxidase (XO)에 의해 분해되어 생성되며, 주요 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 하나인 superoxide (O₂⁻)의 생성을 동반한다[2, 14, 31]. 이러한 요산 수치의 증가는 관절 및 기타 조직에 monosodium urate (MSU) 결정의 침착을 유발하며 interleukin (IL)-1 β 와 같은 염증성 cytokine의 생성을 증가시

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.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.

켜 선천 면역 체계를 자극할 수 있는 위험 신호로 인식되기 때문에 급성 염증 상태를 유발할 수 있다[14, 22]. 현재 allopurinol 또는 febuxostat와 같은 약물이 통풍 환자의 임상적 치료에 사용되고 있지만, 이들은 간 괴사, 신장 독성, 과도한 알레르기 반응 등과 같은 심각한 부작용을 가진다[11, 13]. 이러한 한계의 극복을 위한 방안으로 항염증 및 항산화 활성을 가지면서 요산 생성에 관여하는 효소의 활성을 억제할 수 있는 천연물 유래 화합물의 유용성 평가에 대한 관심이 최근 증대되고 있다. 따라서 본 연구에서는 통풍 연구 모델로서 널리 사용되고 있는 RAW 264.7 대식세포[12]를 이용하여 MSU에 의하여 유도된 염증성 반응에 미치는 마늘의 대표적인 황 함유 화합물인 DADS와 DATS의 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 세포 생존율 측정

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포(ATCC® TIB-71™, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 선행 방법에 따라 100 U/ml penicillin/streptomycin과 10%의 fetal bovine serum가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium를 이용하여, 37°C 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다[15]. DADS, DATS, MSU 및 lipopolysaccharide (LPS)가 다양한 조건에서 처리된 세포들의 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석법에 준하여 측정하였다[15]. 세포 배양에 필요한 재료들은 WelGene Inc. (Gyeongsan, Republic of Korea)에서 구입하였으며, MTT, DADS, DATS, MSU 및 LPS는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DADS, DATS와 LPS는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 녹여 적정농도의 stock solution을 제조하였으며, MSU는 1 M NaOH에 5 mg/ml가 되도록 희석(pH 8.5)하고 형성된 결정을 건조시킨 후 phosphate buffer saline (PBS)에 희석하였다.

Nitric oxide (NO) 및 IL-1 β 생성 및 XO 활성 측정

MSU 및 LPS에 의한 NO 및 IL-1 β 에 미치는 DADS 및 DATS의 영향을 조사하기 위하여 DADS (20 μ M) 또는 DATS (20 μ M)를 RAW 264.7 세포에 1시간 동안 전처리한 후 LPS (0.5 μ g/ml)와 MSU (500 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 처리가 끝난 후, 생성된 NO와 IL-1 β 의 양은 Griess 시약(Sigma-Aldrich Chemical Co.) 및 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 준하여 측정하였다. 동일한 조건에서 배양된 RAW 264.7 세포의 XO의 활성은 XO activity assay kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하여 조사하였다.

단백질 발현 측정

다양한 조건에서 배양된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid, 250 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Nonidet-P40 및 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 용해시킨 후, 각 샘플 당 동량의 단백질을 Laemmli sample buffer (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)와 혼합하였다. 이들을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane (Merck Milipore, Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 각 membrane을 검출하고자 하는 단백질에 대항하는 1차 항체에 1시간 이상 반응시킨 후, 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 처리가 끝난 membrane은 암실에서 enhanced chemiluminescence 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)에 반응시킨 후 Fusion FX Image System (Vilber Lourmat, Torcy, France)으로 시각화하였다.

ROS 생성의 측정

세포 내 생성된 ROS의 양적 변화를 조사하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) 염색법을 사용하였다. 선행 연구의 방법[26]에 준하여, 다양한 조건에서 배양된 세포를 DCF-DA와 반응시킨 후 flow cytometry를 사용하여 세포 내 생성된 과산화물 수준을 평가하거나 DCF-DA의 형광 이미지를 형광현미경 하에서 관찰하였다.

통계 조사

실험 결과의 통계 분석은 GraphPad Prism Ver. 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 실시하였다. 실험 결과는 평균±표준 편차(standard deviation, SD)로 표현하였으며, 통계적 유의성의 검정은 $p < 0.05$ 수준으로 하였다.

결과 및 고찰

LPS 및 MSU 처리에 의한 NO의 생성에 미치는 DADS 및 DATS의 영향

RAW 264.7 세포에서 LPS 전처리 후 MSU 처리에 의한 통풍 유도 *in vitro* 모델의 설정은 Cao et al. [12]의 방법에 따랐다. 이를 위한 DADS, DATS, MSU 및 LPS의 처리 농도 설정을 위하여 각 약물의 단독 또는 병행 처리에 따른 세포 독성 유발의 여부를 MTT 분석을 통하여 조사하였다. 이를 위하여 DADS, DATS 및 LPS의 stock solution을 배지에 희석하였을 경우, DMSO의 최종 농도는 세포 독성이 관찰되지 않는 0.05% 이하가 되도록 하였다(data not shown). Fig. 1A 및 Fig. 1B의 결과에 의하면 최고 농도 20

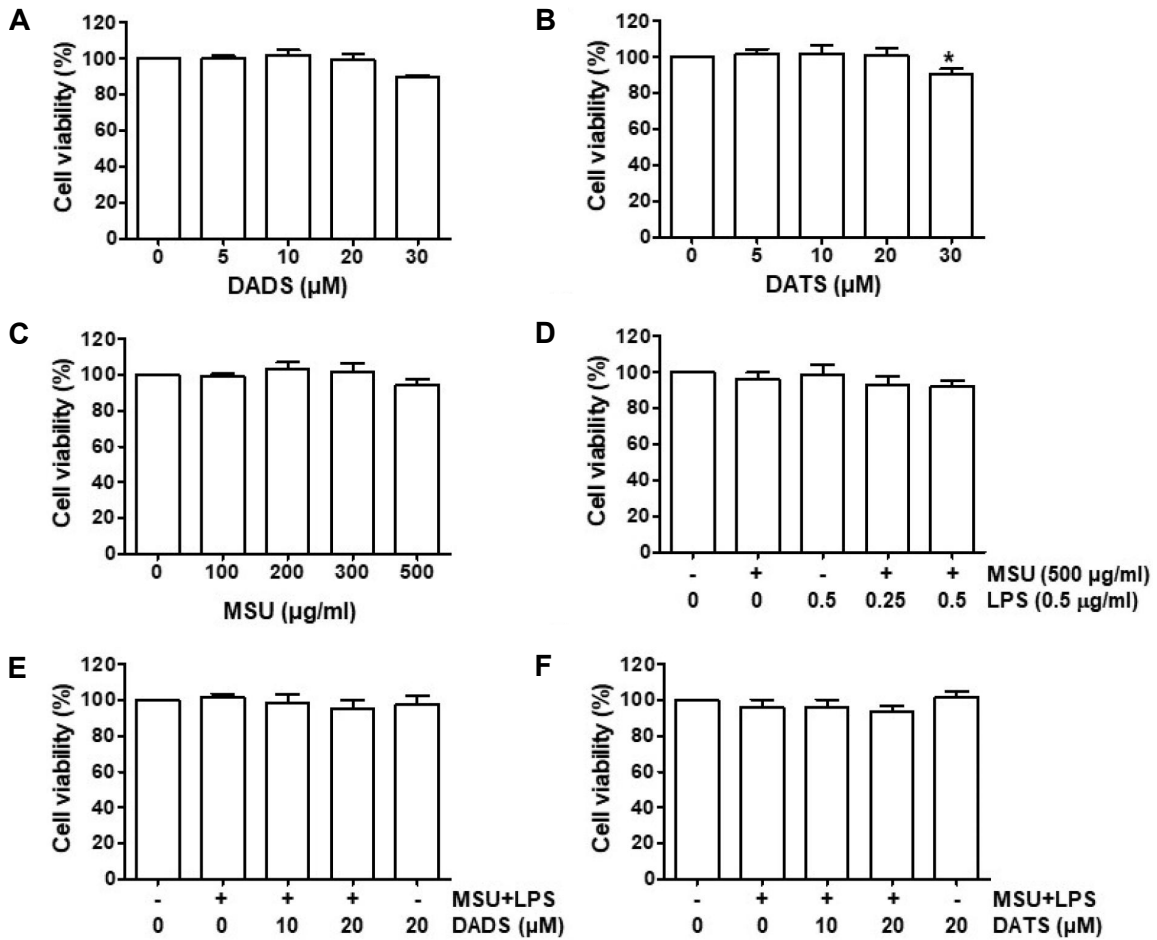


Fig. 1. Effects of DADS, DATS, LPS and MSU treatment alone or their combination on cell viability of RAW 264.7 macrophages. (A-D) RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of DADS, DATS and MSU alone for 24 hr (A-C), or pretreated with or without LPS (0.25 or 0.5 μg/ml) for 2 hr before 500 μg/ml MSU stimulation for 24 hr (D). (E and F) RAW 264.7 cells pretreated or not with DASA and DATS (20 μM) for 1 hr were treated with LPS (0.5 μg/ml) for 2 hr and further treated with MSU (500 μg/ml) for 24 hr. Cell viability was analyzed using the MTT assay. Each value indicates the mean ± SD of three independent experiments (**p*<0.05 compared to control).

μM의 DADS와 DATS가 함유된 배지에서 24시간 배양된 RAW 264.7 세포의 생존율은 대조군 대비 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 최고 농도 500 μg/ml의 MSU에서 유의적인 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 0.5 μg/ml의 LPS를 2시간 처리한 후, 500 μg/ml의 MSU를 24시간 처리한 조건에서도 대조군과 유사한 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1C, Fig. 1D). 아울러, LPS를 처리하기 전, DADS와 DATS를 1시간 처리된 조건에서 MSU가 추가 처리된 RAW 264.7 세포에서도 유의적인 세포 생존율의 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 1E, Fig. 1F). 따라서, DADS와 DATS의 처리 농도는 20 μM 이하로 설정하였으며, LPS와 MSU의 처리 농도는 각각 0.5 μg/ml와 500 μg/ml로 설정하였다.

이상의 조건에서, LPS와 MSU의 처리에 의한 염증 반응에 미치는 DADS와 DATS의 영향을 조사하기 위하여 대표적인 염증성 매개 인자인 NO의 생성[1] 변화를 평가

하였다. Fig. 2A 및 Fig. 2B의 결과에서 알 수 있듯이, LPS와 MSU가 처리된 세포에서 증가된 NO는 DADS 및 DATS가 존재하는 조건에서, 그들의 전처리 농도 의존적으로 억제되었으며, NO 생성 억제 활성은 DADS 보다 DATS에서 다소 높게 나타났다. 이미 잘 알려진 바와 같이, RAW 264.7 세포에서 DADS와 DATS는 LPS에 의한 NO의 생성을 현저하여 억제하였으며, 이는 nuclear factor-κB (NF-κB)의 활성 억제에 따른 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 저하와 연관성이 있었고 이는 DADS와 DATS의 항염증 기전으로 인식되고 있다[16, 18]. 한편, hypoxanthine에서 xanthine으로, xanthine에서 요산염(urate)으로 이어지는 반응에서 핵심적인 역할을 하는 xanthine oxidoreductase (XOR)는 아질산염(nitrite)을 환원시켜 NO의 생성을 증가시킬 수 있다[20, 24]. 비록 DADS와 DATS가 XOR의 활성을 억제할 수 있는지에 대한 조사가 이루어져

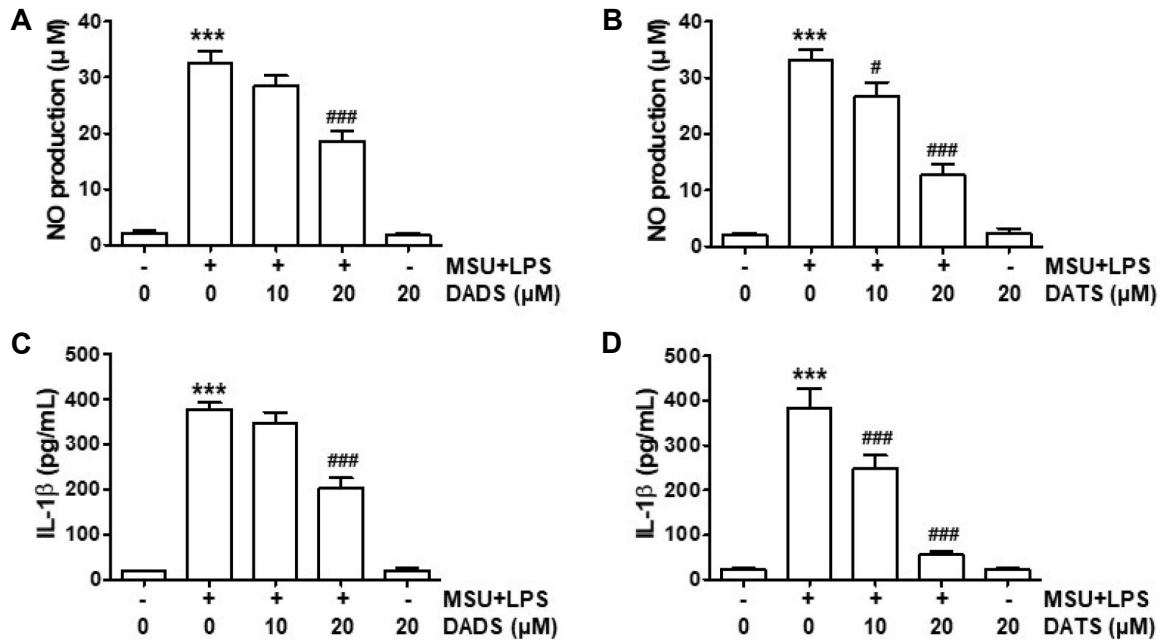


Fig. 2. Inhibitory effects of DADS and DATS on MSU-induced production of NO and IL-1β in LPS-primed RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.5 μg/ml) for 2 hr and further stimulated with MSU (500 μg/ml) for 24 hr. DASA and DATS (20 μM) was used to treat cells for 1 hr before LPS treatment in RAW 264.7 cells. (A and D) The level of NO production was investigated using Griess reagent. (C and D) IL-1β secretion was calculated using an ELISA kit. Data are the mean ± SD from three independent experiments (****p*<0.001 compared to control; #*p*<0.05 and ###*p*<0.001 compared to LPS + MSU).

야겠지만, DADS와 DATS에 의한 NO 생성 억제는 염증성 질환으로 인식되는 통풍의 치료에 기여할 수 있음을 의미한다.

LPS 및 MSU 처리에 의한 IL-1β 및 생성 XO 활성화에 미치는 DADS 및 DATS의 영향

DADS와 DATS의 항염증 활성은 NO 뿐만 아니라 염증성 cytokine의 생성 억제와도 연관성이 매우 높으며, RAW 264.7 세포에서 이미 잘 밝혀진 바 있다[4, 16]. 따라서 LPS와 MSU의 처리에 의해 유도된 대표적인 염증성 cytokine인 IL-1β의 생성에 미치는 DADS와 DATS의 영향을 조사하였다. NO와 유사하게 LPS와 MSU에 의해 현저하게 증가된 세포 배양액 내의 IL-1β 수준은 DADS와 DATS의 전처리에 의하여 유의적으로 감소되었으며, 이는 DADS와 DATS가 LPS와 MSU가 처리된 RAW 264.7 세포에서 IL-1β의 방출을 차단하였음을 의미한다(Fig. 2C, Fig. 2D). 선행 연구의 결과에 의하면, DADS는 활막 세포와 연골 세포에서 IL-1β 및 MSU에 의해 유도된 또 다른 염증성 매개 인자인 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 NF-κB 활성화 억제에 따른 cyclooxygenase 2 (COX2)의 발현 차단을 통하여 억제함으로써 관절 염증을 현저히 완화시켰다[17]. 이러한 결과는 DADS 및 DATS와 같은 마늘 유래 황 함유 화합물이 통풍 치료에 잠재적 효능이 우수함을 의미한다.

한편, 마늘에 함유된 유기 황 화합물은 산화적 및 당화적 손상에 의한 low-density lipoprotein의 형성 차단에 도움을 줄 수 있었으며, 이는 XO 활성의 억제를 통하여 이루어짐이 밝혀진 바 있다[25]. 또한, Chung [5]은 마늘 유래 allicin은 thiol기 교환 기전을 통하여 xanthine/XO 시스템에 의한 superoxide의 형성을 억제하였음을 보고한 바 있다. 비록 이러한 선행 결과들이 항산화 활성화에 초점을 두고 이루어졌지만, 마늘 유래 황 함유 화합물이 XO의 활성을 조절할 수 있음을 암시하여 준다. 따라서 LPS와 MSU에 의한 요산 생성에 핵심적인 역할을 하는 XO의 활성화를 DADS와 DATS가 억제할 수 있는지를 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, LPS와 MSU가 처리된 RAW 264.7 세포에서 현저하게 증가된 XO의 활성이 DADS와 DATS가 존재하는 조건에서는 유의적으로 감소되었으며, XO 활성 저해 효과는 NO 및 IL-1β 생성 억제에서와 유사하게 DATS가 DADS 보다 다소 높게 나타났다. 이 결과는 DADS와 DATS의 항산화 활성이 XO 활성의 억제를 통한 통풍 유발에 최소한 관여할 수 있음을 시사한다.

LPS 및 MSU 처리에 의한 NLRP3 inflammasome의 활성화 및 ROS의 생성에 미치는 DADS 및 DATS의 영향

NLRP3 inflammasome은 세포 손상 및 감염에 대한 숙주 면역 반응을 매개하기 위해 세포질 구획에서 생성되는

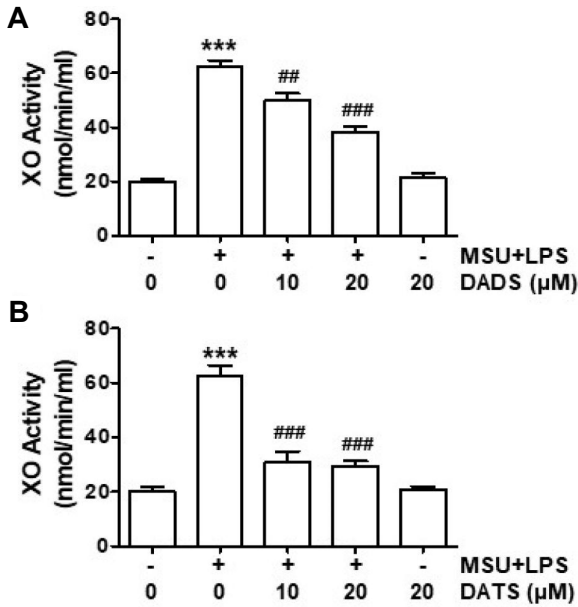


Fig. 3. Inhibitory effects of DADS and DATS on MSU-induced activation of XO in LPS-primed RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.5 μg/ml) for 2 hr and further stimulated with MSU (500 μg/ml) for 24 hr. DASA and DATS (20 μM) was used to treat cells for 1 hr before LPS treatment in RAW 264.7 cells. (A and B) XO activity was measured using an XO activity assay kit. Data are the mean ± SD from three independent experiments (****p*<0.001 compared to control; ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared to LPS + MSU).

염증성 다중 단백질 복합체로서 뼈와 관절을 포함한 다양한 기관의 염증성 질환에 핵심적인 역할을 함이 밝혀졌다 [23, 32]. Caspase-1은 NLRP3 inflammasome에 의해 활성화되어 IL-1β를 포함한 염증성 cytokine의 유리를 촉진하며, MSU는 NLRP3 inflammasome의 활성화를 통하여 통풍 유발 염증 반응을 개시할 수 있음이 보고된 바 있다[6, 34]. 비록 DADS와 DATS를 포함한 마늘 유래 황 함유 화합물이 NLRP3 inflammasome의 활성을 억제할 수 있을 가능성이 최근 제시되었지만[19, 33], 통풍과 연관된 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 DADS와 DATS가 MSU 유도 NLRP3 inflammasome의 활성을 억제할 수 있는지를 조사하였으며, Fig. 4에 제시한 결과에 의하면, LPS 자극 후 MSU가 처리된 RAW 264.7 세포에서 NLRP3와 inflammasomes 및 proapoptotic 분자의 주요 어댑터 단백질인 ASC 뿐만 아니라 IL-1β와 활성화형 caspase-1 (cleaved caspase-1, p20)의 발현이 증가되어 NLRP3 inflammasome이 활성화되었음을 알 수 있다[3]. 그러나 DADS와 DATS는 이들의 발현을 현저하게 감소시켜 NLRP3 inflammasome의 활성 억제제로 작용하였음을 알 수 있으며(Fig. 4), 이는 DADS와 DATS의 MSU 유도 IL-1β의 유리와 XO 활성의 억제가 NLRP3

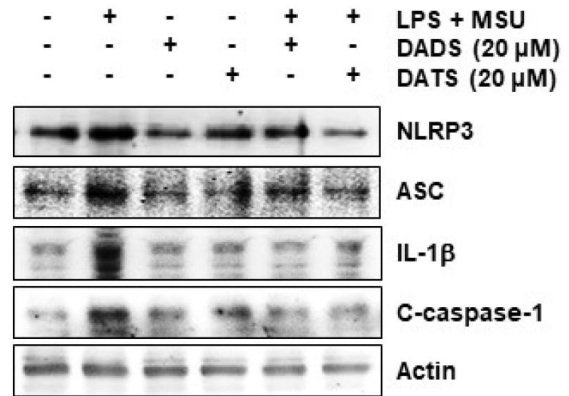


Fig. 4. Inhibitory effects of DADS and DATS on MSU-induced NLRP3 inflammasome activation in LPS-primed RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.5 μg/ml) for 2 hr and further stimulated with MSU (500 μg/ml) for 24 hr. DASA and DATS (20 μM) was used to treat cells for 1 hr before LPS treatment in RAW 264.7 cells. (A) After treatment, representative images of NLRP3 (green) and ASC immunofluorescence (red) observed under a fluorescence microscope are shown. The location of the nucleus was indicated by counterstaining with DAPI (blue). (B) After extracting cell lysate of each treatment group, expression levels of IL-1β and cleaved caspase-1 (p20) proteins were investigated through immunoblotting. Actin was used as a loading control.

inflammasome의 불활성화에 기인하였음을 의미한다.

한편, ROS는 NLRP3 inflammasome을 활성화하는 손상 관련 분자 패턴 분자(damage-associated molecular pattern molecules)로 작용할 수 있으며[34], NLRP3 inflammasome에 의한 염증은 대식세포와 호중구를 포함한 염증세포를 모집하여 ROS 생성을 유발한다[9]. 이러한 결과들은 ROS와 NLRP3 inflammasome 사이의 feedback loop의 차단이 통풍 치료의 표적이 될 수 있음을 의미한다. Fig. 5에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, DADS와 DATS는 LPS 자극 후 MSU가 처리된 RAW 264.7 세포에서 ROS의 생성을 현저하게 차단하였다. 이러한 DADS와 DATS의 ROS 제거능은 XO 활성 저해와도 연관성이 있을 것이며[14, 31], 이들의 ROS 생성 억제력은 NLRP3 inflammasome의 활성 억제에도 기여하였을 것이다. 아울러 두 화합물의 항산화 활성은 DADS 보다 DATS 전처리군에서 높게 관찰되었으며, 이는 선행 연구들에서 밝혀진 황(S)의 함유량 차이에 의한 것일 것으로 추측된다[28, 29].

본 연구에서는 마늘의 주요 황 함유 화합물인 DADS와 DATS가 염증성 질환의 일종인 통풍의 예방과 치료 적용성에 관한 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 잘 확립된 LPS 자극 후 MSU를 처리하는 *in vitro* RAW 264.7 세포 모델을 이용하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 세포 독성

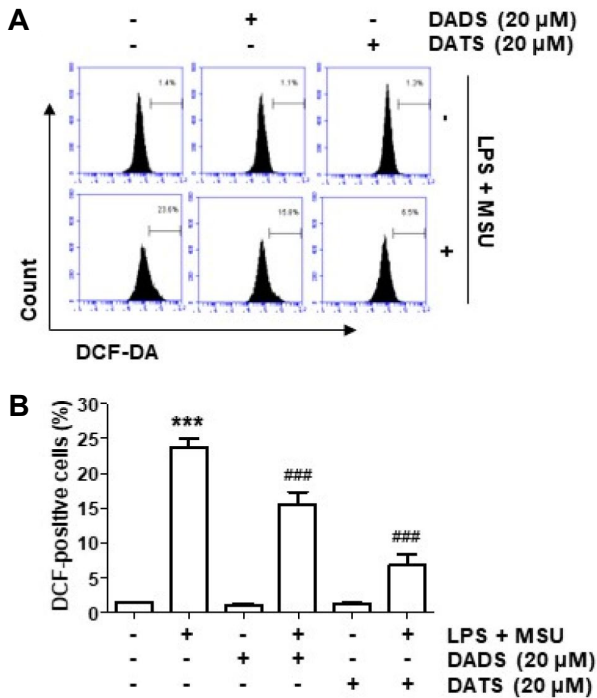


Fig. 5. Inhibitory effects of DADS and DATS on MSU-induced ROS generation in LPS-primed RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.5 μg/ml) for 2 hr and further stimulated with MSU (500 μg/ml) for 2 hr. DASA and DATS (20 μM) was used to treat cells for 1 hr before LPS treatment in RAW 264.7 cells. ROS generation was detected using a DCF-DA probe and quantified by flow cytometry. (A) Numbers indicate the percentage of DCF-positive cells in the gate. (B) Densitometric analysis was used to quantify the levels of ROS. The results represent the mean ± SD for three experiments (***p*<0.001 compared to control; ###*p*<0.001 compared to LPS + MSU).

이 없는 범위에서 DADS와 DATS는 MSU에 의한 NO의 생성과 특히 NLRP3 inflammasome의 활성화와 깊은 연관성이 있는 IL-1β의 유리를 유의적으로 억제하였다. 또한, DADS와 DATS는 XO의 활성화와 ROS의 생성을 차단시켰으며, 이는 NLRP3 inflammasome 활성화의 저해와 연관성이 있었다. 비록 *in vivo* 모델에서의 통풍 억제 효능의 확인과 ROS 생성의 중재 과정에 관여하는 세포 내 신호 전달계 역할에 관한 추가 연구가 요구되지만, 본 연구에서는 마늘에 함유된 황화합물이 통풍 처치를 위한 잠재력이 매우 우수함을 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단에서 시행한 기초연구사업 지원(No. 2021R1A2C2009549)에 의해 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Anavi, S. and Tiroshmi, O. 2020. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **146**, 16-35.
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M. and Bolognesi, A. 2016. Xanthine oxidoreductase in drug metabolism: Beyond a role as a de-toxifying enzyme. *Curr. Med. Chem.* **23**, 4027-4036.
- Cao, Y., Hu, Y., Jin, X. F., Liu, Y. and Zou, J. M. 2023. Dimethyl fumarate attenuates MSU-induced gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **27**, 628-641.
- Chang, H. P., Huang, S. Y. and Chen, Y. H. 2005. Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2530-2534.
- Chung, L. Y. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: Allyl cysteine, alliin, alliin, and allyl disulfide. *J. Med. Food* **9**, 205-213.
- Clavijo-Cornejo, D., Hernández-González, O. and Gutierrez, M. 2021. The current role of NLRP3 inflammasome polymorphism in gout susceptibility. *Int. J. Rheum. Dis.* **24**, 1257-1265.
- Dalbeth, N., Merriman, T. R. and Stamp, L. K. 2016. Gout. *Lancet* **388**, 2039-2052.
- De Greef, D., Barton, E. M., Sandberg, E. N., Croley, C. R., Pumarol, J., Wong, T. L., Das, N. and Bishayee, A. 2021. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. *Semin. Cancer Biol.* **73**, 219-264.
- Dominic, A., Le, N. T. and Takahashi, M. 2022. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **36**, 784-796.
- El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., Wasef, L. G., Elewa, Y. H. A., Al-Sagan, A. A., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Abd-Elhakim, Y. M. and Prasad Devkota, H. 2020. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. *Nutrients* **12**, 872.
- Guan, X., Zhang, S., Liu, J., Wu, F., Zhou, L., Liu, Y. and Su, N. 2022. Cardiovascular safety of febuxostat and allopurinol in patients with gout: A meta-analysis. *Front. Pharmacol.* **13**, 998441.
- Guo, Y., Li, L., Xu, T., Guo, X., Wang, C., Li, Y., Yang, Y., Yang, D., Sun, B., Zhao, X., Shao, G. and Qi, X. 2020. HUWE1 mediates inflammasome activation and promotes host defense against bacterial infection. *J. Clin. Invest.* **130**, 6301-6316.
- Kaul, S., Gupta, M., Bandyopadhyay, D., Hajra, A., Deed-

- wania, P., Roddy, E., Mamas, M., Klein, A., Lavie, C. J., Fonarow, G. C. and Ghosh, R. K. 2021. Gout pharmacotherapy in cardiovascular diseases: A review of utility and outcomes. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **21**, 499-512.
14. Kimura, Y., Tsukui, D. and Kono, H. 2021. Uric acid in inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12394.
 15. Kwon, D. H., Kim, G. Y., Cha, H. J., Kim, S., Kim, H. S., Hwang, H. J. and Choi, Y. H. 2021. Nargenicin A1 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory and oxidative response by blocking the NF- κ B signaling pathway. *EXCLI J.* **20**, 968-982.
 16. Lee, H. H., Han, M. H., Hwang, H. J., Kim, G. Y., Moon, S. K., Hyun, J. W., Kim, W. J. and Choi, Y. H. 2015. Diallyl trisulfide exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 487-495.
 17. Lee, H. S., Lee, C. H., Tsai, H. C. and Salter, D. M. 2009. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β . *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 91-99.
 18. Liu, K. L., Chen, H. W., Wang, R. Y., Lei, Y. P., Sheen, L. Y. and Lii, C. K. 2006. DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3472-3478.
 19. Liu, S. X., Liu, H., Wang, S., Zhang, C. L., Guo, F. F. and Zeng, T. 2022. Diallyl disulfide ameliorates ethanol-induced liver steatosis and inflammation by maintaining the fatty acid catabolism and regulating the gut-liver axis. *Food Chem. Toxicol.* **164**, 113108.
 20. Maia, L. B. and Moura, J. J. 2011. Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: A new class of nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 443-460.
 21. Malla, R., Marni, R., Chakraborty, A. and Kamal, M. A. 2022. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide in garlic as novel therapeutic agents to overcome drug resistance in breast cancer. *J. Pharm. Anal.* **12**, 221-231.
 22. Mulla, M. J., Myrtolli, K., Potter, J., Boeras, C., Kavathas, P. B., Sfakianaki, A. K., Tadesse, S., Norwitz, E. R., Guller, S. and Abrahams, V. M. 2011. Uric acid induces trophoblast IL-1 β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* **65**, 542-548.
 23. Murakami, T., Nakaminami, Y., Takahata, Y., Hata, K. and Nishimura, R. 2022. Activation and function of NLRP3 inflammasome in bone and joint-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5365.
 24. Okamoto, K., Kusano, T. and Nishino, T. 2013. Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum co-factor of xanthine oxidoreductase. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2606-2614.
 25. Ou, C. C., Tsao, S. M., Lin, M. C. and Yin, M. C. 2003. Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids* **38**, 219-224.
 26. Park, C., Cha, H. J., Kim, M. Y., Bang, E., Moon, S. K., Yun, S. J., Kim, W. J., Noh, J. S., Kim, G. Y., Cho, S., Lee, H. and Choi, Y. H. 2022. Phloroglucinol attenuates DNA damage and apoptosis induced by oxidative stress in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells by blocking the production of mitochondrial ROS. *Antioxidants (Basel)* **11**, 2353.
 27. Ragab, G., Elshahaly, M. and Bardin, T. 2017. Gout: An old disease in new perspective - A review. *J. Adv. Res.* **8**, 495-511.
 28. Shang, A., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Tang, G. Y., Corke, H., Mavumengwana, V. and Li, H. B. 2019. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). *Foods* **8**, 246.
 29. Tudu, C. K., Dutta, T., Ghorai, M., Biswas, P., Samanta, D., Oleksak, P., Jha, N. K., Kumar, M., Radha, Proćków, J., Pérez de la Lastra, J. M. and Dey, A. 2022. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of garlic (*Allium sativum*), a storehouse of diverse phytochemicals: A review of research from the last decade focusing on health and nutritional implications. *Front. Nutr.* **9**, 949554.
 30. Yamaguchi, Y. and Kumagai, H. 2020. Characteristics, biosynthesis, decomposition, metabolism and functions of the garlic odour precursor, S-allyl-L-cysteine sulfoxide. *Exp. Ther. Med.* **19**, 1528-1535.
 31. Yan, J., Jiang, J., He, L. and Chen, L. 2020. Mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide: An emerging therapeutic target for metabolic diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **152**, 33-42.
 32. Yang, G., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S. and Lee, J. Y. 2022. Inflammasomes and their roles in arthritic disease pathogenesis. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 1027917.
 33. Zhang, X. N., Zhao, N., Guo, F. F., Wang, Y. R., Liu, S. X. and Zeng, T. 2022. Diallyl disulfide suppresses the lipopolysaccharide-driven inflammatory response of macrophages by activating the Nrf2 pathway. *Food Chem. Toxicol.* **159**, 112760.
 34. Zhao, J., Li, J., Li, G. and Chen, M. 2022. The role of mitochondria-associated membranes mediated ROS on NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 1059576.

초록 : RAW 264.7 대식세포에서 마늘 유래 황 함유 화합물에 의한 요산 유도 inflammasome 활성화의 억제에는 ROS 생성 차단과 연관성이 있음

김민영¹ · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실)

만성 염증성 관절염 질환인 통풍은 고요산혈증을 특징으로 하며 NLRP3 inflammasome의 활성화에 따른 IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine 방출과 연관된 MSU에 대한 염증 반응에 의해 유발될 수 있다. 마늘에 함유된 황 함유 화합물은 다양한 질병에 대한 잠재적인 유익한 약리학적 효능을 가지지만, NLRP3 inflammasome 활성화와 연관된 통풍 억제에 대한 효능은 현재까지 입증되지 않았다. 본 연구에서는 대표적인 마늘 유래 황화합물인 DADS와 DATS가 MSU에 의한 NLRP3 inflammasome 활성을 억제할 수 있는지를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 비세포 독성 조건에서 DADS와 DATS는 LPS가 전처리된 RAW 264.7 대식세포에서 MSU에 대한 반응으로 증가된 NO의 생성과 IL-1 β 유리를 유의적으로 차단하였다. DADS와 DATS는 또한 증가된 NLRP3, ASC, caspase-1 p20 및 IL-1 β 의 발현을 감소시켰으며, 이는 MSU로 유도된 LRP3 inflammasome 활성화가 DADS와 DATS에 의해 억제되었음을 의미한다. 아울러, DADS와 DATS는 NLRP3 inflammasome 활성화에 상위 신호로 작용하는 산화적 스트레스를 차단했으며 ROS 생성을 제거한다는 사실에서 입증되었다. 결론적으로, 본 연구의 결과는 DADS와 DATS가 ROS/NLRP3 경로를 억제하여 inflammasome 활성화를 차단함으로써 NLRP3 의존성 통풍성 관절염 치료를 위한 잠재력이 우수함을 의미한다.