

## Anti-neuroinflammatory Effects of a *Locusta migratoria* Ethanol Extract in LPS-stimulated BV-2 Microglia

Hwa Jeong Lee<sup>†</sup>, Minchul Seo<sup>†</sup>, Joon Ha Lee, In-Woo Kim, Sun Young Kim, 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 10, 2018 / Revised October 2, 2018 / Accepted October 4, 2018

Activated microglia, induced by various pathogens, protect neurons and maintain homeostasis of the central nervous system (CNS). However, severe activation causes neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease because of the secretion of various neurotoxic molecules, such as nitric oxide (NO), prostaglandin (PG), and pro-inflammatory cytokines. Because chronic microglial activation endangers neuronal survival, negative regulators of microglial activation have been identified as potential therapeutic candidates for treatment of many neurological diseases. One potential source of these regulators is *Locusta migratoria*, a grasshopper of the Acrididae, usually 4-6 cm in size, belonging to the family of large insects in Acrididae. This grasshopper is an edible insect resource that can be consumed by humans as protein source or used for animal feed. The aim of the present study was to examine the inhibitory effects of a *L. migratoria* ethanol extract (LME) on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV-2 microglia cells. The extract significantly inhibited the NO, iNOS, COX-2, and pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) levels in BV-2 microglia cell. Because the inhibition of microglial activation may be an effective solution for treating brain disorders like Alzheimer's and Parkinson's diseases, these results suggest that LME may be a potential therapeutic agent for the treatment of brain disorders induced by neuroinflammation.

**Key words** : BV-2 microglia, *Locusta migratoria*, neuroinflammation, nitric oxide, proinflammatory cytokine

### 서 론

세계가 점차 노령화 사회로 변화하면서 파킨슨씨 병, 알츠하이머병, 간질, 기억상실증 등 각종 뇌 질환에 관련된 병에 걸리는 사람들이 급증하고 있다. 뇌는 생명유지에 필수적인 정보를 주관하고 신경신호에 이상이 생기면 각종 신경성 장애를 일으키게 되는데 많은 연구에도 불구하고 현재 정확한 기전을 이해하고 치료하는 뇌질환은 극소수에 불과하다[25]. 따라서, 신경세포가 손상 되면서 유도된 신경염증반응의 제어가 신경퇴행성 질환의 치료 및 예방의 원인으로 인식되면서 미세아교세포의 과도한 활성화 억제를 위한 소재 개발 연구가 다양하게 진행되고 있다[18, 23].

미세아교세포(microglia)는 전체 뇌 세포의 12%를 차지하

는 중추신경계(central nervous system; CNS)의 일차적인 면역 기능을 수행하는 세포로서, 외부에서 유입되거나 내부에서 발생하는 독소들이 존재하게 되면 이들 독소로부터 신경세포를 보호하기 위해 활성화 된다. 미세아교세포의 활성화는 손상된 세포를 제거하고 외부에서 침입하는 박테리아나 바이러스로부터 신경세포를 보호하는 역할을 가지고 있으나, 과도한 활성화는 iNOS의 발현 증가를 통한 Nitric Oxide 합성과 COX-2에 의한 Prostaglandin, TNF- $\alpha$  등의 합성 증가로 인해 신경세포에 독성을 나타내기 때문에 결과적으로 미세아교세포의 활성화는 신경세포의 손상을 악화시키게 된다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 미세아교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다[8].

Lipopolysaccharide (LPS) 등의 자극에 의해 과하게 활성화된 미세아교세포는 nitric oxide (NO), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등과 같은 염증성 매개 인자 및 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 분비를 촉진하여 신경독성을 유발한다[2, 3]. 활성 산소종의 일종인 Nitric oxide (NO)는 무기 저분자 라디칼로써 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할을 하며 대식세포 및 간세포에서 NO합

<sup>†</sup> 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.

성 경로인 nitric oxide synthase (NOS)를 통해 L-arginine으로부터 합성된다[13]. 그러나 면역반응에서 숙주의 방어기전으로 만들어지는 과량의 NO는 오히려 자가 면역질환이나 만성 염증의 원인이 되며[20], cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜[21] prostaglandin (PG) 등의 생합성을 유도하여 염증 반응을 심화시키는 것으로 보고되어있다[14]. 따라서 미세아교세포의 염증반응 관련 유전자의 발굴이나 이들의 조절을 통한 퇴행성 뇌질환 치료에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며[6, 8] 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO의 분비를 효과적으로 억제할 수 있는 억제제 개발은 각종 뇌질환을 치료하는 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다[9, 11].

최근 다양한 천연물 추출물을 이용하여 대식세포 활성화를 조절함으로써 염증반응을 억제시키는 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데 천연물로서 주로 식물을 이용한 연구가 진행되고 있는 실정이다. 그러나 신약 개발과 관련하여 천연자원을 이용한 염증관련 신약 개발 연구가 활발하게 진행되면서 지구상에서 다수 종을 차지하고 있는 곤충의 기능에 대한 관심도 증대되고 있다[16, 17]. 풀무치(*Locusta migratoria*)는 메뚜기과에 속하는 곤충으로 아시아, 아프리카, 오스트레일리아, 유럽 등 전세계적으로 분포하고 있으며[7], 한국에 서식하는 메뚜기과 곤충 중에서 4~6 cm정도로 크기가 큰 곤충에 속하는 것으로써 체중의 70% 이상이 단백질로 되어 있어 단백질원 공급원으로 인간이 섭취할 수 있거나 동물사료용으로 이용될 수 있는 식용곤충자원으로 알려져 있다[30]. 그러나 풀무치는 농작물 피해를 일으키는 메뚜기과 곤충에 해당되어 해충으로 언급되고 있기 때문에 [7, 27], 대부분의 집단형 풀무치에 대한 방제[12]연구가 대부분이며 식·약용소재로서 이용하기 위한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 풀무치의 신경염증 억제 효능을 알아보기 위하여 중추신경계의 면역반응을 담당하는 미세아교세포인 BV-2 세포를 이용하여 풀무치 에탄올 추출물이 신경염증에 미치는 효능 및 조절기전을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 대상곤충

풀무치(*Locusta migratoria*)는 국립농업과학원 곤충산업과에서 실내 계대 사육한 해남 6세대를 사용하였다. 실험 곤충은 밀을 먹이로 사용하였으며, 30°C, 65% R. H., 9L/15 D, 1,800 Lux의 조건에서 사육하였다.

### 추출물의 제조

풀무치는 동결건조 하여 분쇄기로 분쇄한 후 분말로 사용하였으며 제조한 분말은 -70°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 풀무치 분말 1 g에 10 ml의 70% Etha-

nol을 혼합하여 초음파 분쇄기(250 J, 10 s, twice)로 추출하고 추출된 물질을 필터로 거른 뒤 감압농축기(rotary vacuum evaporator, CVC-3100, Tokyo, Japan)로 농축한 후 20% DMSO에 녹여 사용하였다.

### 세포 배양

BV-2 미세아교세포는 5% fetal bovine serum (FBS)와 50 µg/ml gentamicin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### MTS assay

BV-2 세포에 대한 풀무치 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 96-well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 약 24시간 동안 배양하였다. 그 후 풀무치 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 추가 배양한 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

### Nitric oxide (NO) assay

BV-2 세포에 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. BV-2 세포는 4×10<sup>4</sup> cells/well로 96-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 풀무치 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상등액 100 µl를 취하여 Griess 시약과 반응 시킨 후 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 측정하였다. 생성된 NO의 농도는 표준물질인 sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>)용액의 표준곡선을 기준으로 하여 계산하였다.

### Real time RT-PCR assay

BV-2 세포는 4×10<sup>5</sup> cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 풀무치 에탄올 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 5시간 배양하였다. 배양한 BV-2 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 total RNA를 추출한 후 동량의 RNA (2 µg)로부터 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 염증관련 유전자의 발현은 Table 1에 제시한 각각의 primer와 함께 AMPIGENE® qPCR Green Mix Lo-ROX (Enzo Life Sciences, USA)를 이용하여 Real-time PCR로 확인 하였다.

Table 1. Sequences of primes used for RT-PCR

cDNAs	Primer sequences	Accession number
<i>iNOS</i>	Forward, 5' -CAGCACAGGAAATGTTTCAGC-3' Reverse, 5' - TAGCCAGCGTACCGGATGA-3'	NM_010927
<i>Cox-2</i>	Forward, 5'-CAGACAACATAAACTGCGCCTT-3' Reverse, 5'-GATACACCTCTCCACCAATGACC-3'	NM_011198
<i>IL-6</i>	Forward, 5' -GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' Reverse, 5' -AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	NM_031168
<i>IL-1</i>	Forward, 5' -CCTTCCAGGATGAGGACATGA-3' Reverse, 5' -TGAGTCACAGAGGATGGGCTC-3'	NM_008361
<i>TNF-α</i>	Forward, 5' -ATGAGAAGTTCCTCAAATGGC-3' Reverse, 5' -CTCCACTTGGTGGTGGTTTGCTA-3'	NM_013693
<i>Gapdh</i>	Forward, 5' -AAGGTCATCCAGAGCTGAA-3' Reverse, 5' -CTGCTTACCACCTTCTTGA-3'	NM_008084

**Western blot analysis**

BV-2 세포를 harvest 한 후 원심 분리하여 그 상등액을 버리고 cell pellet을 수거 하였다. M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo)를 이용하여 세포를 lysis 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 수거하였다. 단백질 양은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 정량 하였으며 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, PVDF membrane 으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS와 anti-COX-2 (Cell signaling, MA) 항체를 각각 반응시킨 후 horseradish pero-oxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체로 1시간 반응 시켰다. 각 반응 사이에 0.05% TBST로 10분씩 3회 수세 하였다. 그 후 항체에 대한 대응 단백질 band를 ECL kit (Amersham pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 확인하였다. 단백질 band의 intensity는 Image J (version, 1.52) 프로그램을 이용하여 측정하였다.

**ELISA 방법에 이용한 IL-6, TNF-α 측정**

BV-2 세포는 4×10<sup>5</sup> cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 풀무치 에탄올 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 회수하여 배양액에 유리된 IL-6와 TNF-α를 ELISA kit (Thermo Fisher, Waltham, MA)를 이용하여 측정하였다.

**통계처리**

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

**결과 및 고찰**

**풀무치 에탄올 추출물의 세포독성 확인**

BV-2 미세아교세포에서 풀무치 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다(Fig. 1). 96-well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well의 세포를 약 24시간 배양한 후 풀무치 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인 하였다. 그 결과 풀무치 추출물은 2,000 µg/ml의 농도까지 독성을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다. 따라서 이후 실험들에서 사용한 풀무치 에탄올 추출물의 최고 농도는 세포독성을 나타내지 않는 2,000 µg/ml 이하의 농도로 사용하였다.

**풀무치 에탄올 추출물에 의한 Nitric Oxide 생성 억제 확인**

정상적인 NO는 신경 보호나 뇌 발달에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나[15], LPS나 interferon-

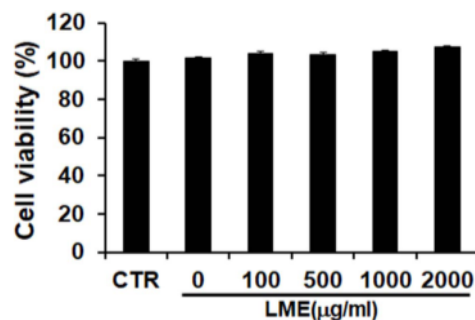


Fig. 1. LME on the cell viability in BV-2 microglia. BV-2 microglia (2×10<sup>4</sup> cells/well in a 96-well plate) were incubated with LME for 24 hr, and cell viability was assessed using MTS assay. CTR: control (non-treated sample). LME: *Locusta migratoria* 70% Ethanol Extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. \*p<0.05, compared with the LPS only.

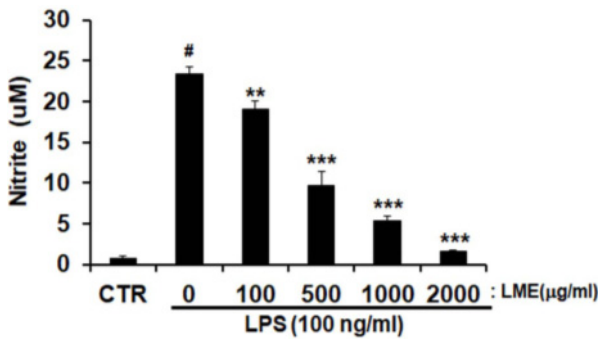


Fig. 2. Inhibitory effect of LME extract on the production of nitric oxide in BV-2 microglia. BV-2 microglia ( $4 \times 10^4$  cells/well in a 96-well plate) were cultured with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of LME for 24 hr to determine the level of NO. CTR: control (non-treated sample). LME: *Locusta migratoria* 70% Ethanol Extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. \* $p < 0.05$ , compared with the LPS only.

gamma (IFN- $\gamma$ ),  $\beta$ -amyloid 등으로 인해 활성화된 미세아교세포로부터 과도하게 생성될 경우 중추신경계에서 심각한 세포독성과 신경염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 본 연구에서는 풀무치 에탄올 추출물의 신경염증 억제효능을 알아보기 위해 BV-2 세포에 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 과도한 신경염증을 유도 시킨 후 염증반응의 대표적인 지표물질 NO의 생성량을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 BV-2 세포에 LPS를 단독 처리한 실험군의 경우 대조군에 비해 약 12배정도 NO생성량이 증가되었으나, 풀무치 에탄올 추출물 농도별 (100~2,000  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 실험군에서는 풀무치 추출물 농도에 의존적으로 NO분비량이 유의적으로 감소됨을 확인 할 수 있었다. 특히 풀무치 추출물의 최고농도인 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 LPS만 단독으로 처리한 실험군에 비해 약 90%

이상의 감소 효과를 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과는 풀무치 에탄올 추출물이 LPS에 의해 유도되는 BV-2 세포의 염증반응을 감소시킬 수 있는 신경염증반응 억제제로서의 활용 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

### 풀무치 에탄올 추출물의 iNos 및 Cox-2 유전자 발현 억제 효능 확인

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 외부자극에 의해 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하고, 이렇게 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 유발한다[22]. 염증상태에서는 iNOS 뿐만 아니라 COX-2의 발현을 증가시켜서 prostaglandin과 같은 염증매개물질의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[26]. LPS에 의해 활성화된 BV-2 세포에서 풀무치 에탄올 추출물이 iNos와 Cox-2의 발현에 미치는 영향을 real-time RT-PCR을 통하여 확인 하였다(Fig. 3). BV-2 세포에 LPS를 단독으로 처리하여 염증반응을 유도 시켰을 때 대조군에 비해 각각 약4.5배 이상 증가하였으며, 풀무치 에탄올 추출물을 농도별(100~2,000  $\mu\text{g/ml}$ )로 함께 처리한 경우 추출물의 처리 농도에 의존적으로 iNos와 Cox-2 유전자의 발현이 현저히 억제됨을 확인 할 수 있었다.

### 풀무치 에탄올 추출물이 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

풀무치 에탄올 추출물이 LPS에 의해 활성화된 BV-2 세포로부터 생성되는 NO의 합성효소인 iNos의 유전자 발현과 PGE<sub>2</sub>의 합성효소인 Cox-2 유전자 발현을 억제시키는 이상의 결과에서 우리는 풀무치 에탄올 추출물이 활성화된 BV-2 세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현 또한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 단백질 발현 양상을 Western blot으로 분석 하였다

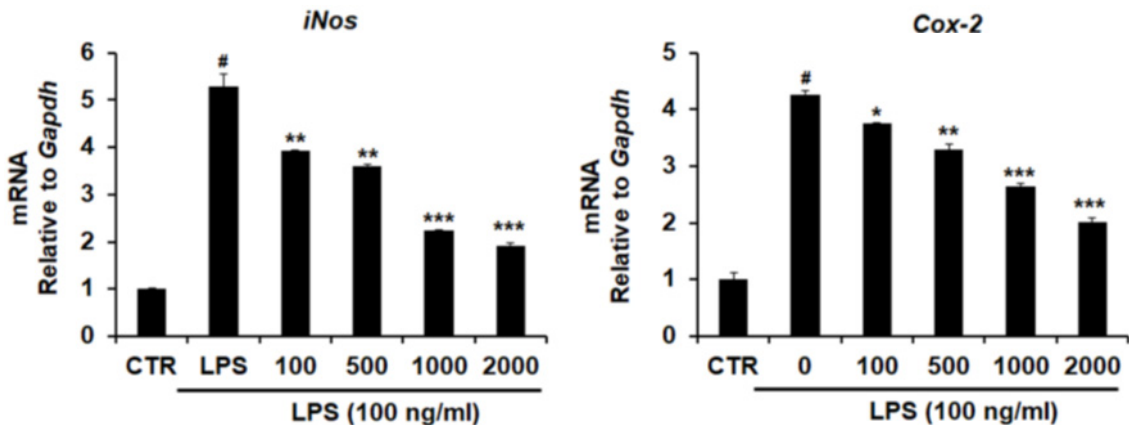


Fig. 3. Inhibitory effect of LME on iNos and Cox-2 expression in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated with LME (100, 500, 1,000, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 5 hr after the LPS treatment. The level of iNOS and Cox-2 mRNA were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to *Gapdh*. CTR: control (non-treated sample). LME: *Locusta migratoria* 70% Ethanol Extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. \* $p < 0.05$ , compared with the LPS only.

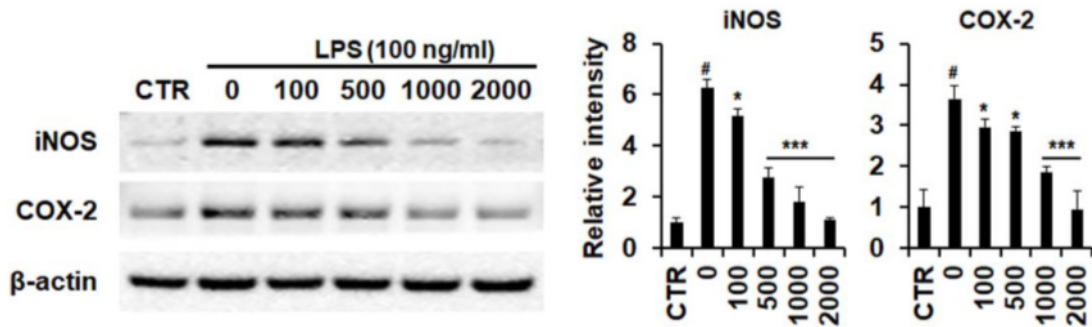


Fig. 4. Inhibitory effect of LME on the protein levels of iNOS and COX-2 in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of LME extract sample (100, 500, 1,000, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hr. The expression level of iNOS and COX-2 were determined by Western blot. The data were normalized to  $\beta$ -actin. Results of densitometric analysis of Western blot are also shown (right). CTR: control (non-treated sample). LME: *Locusta migratoria* 70% Ethanol Extract. Level of significance was identified statistically using Student's test.  $*p < 0.05$ , compared with the LPS only.

(Fig. 4). 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 LPS처리에 의해 증가된 iNOS와 COX-2단백질의 발현은 풀무치 에탄올 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 양상을 나타내었다. 결론

적으로 풀무치 에탄올 추출물은 iNOS, COX-2 유전자와 단백질 발현의 억제를 통해 NO의 생성 및 신경염증 억제 활성을 가지는 것으로 사료된다.

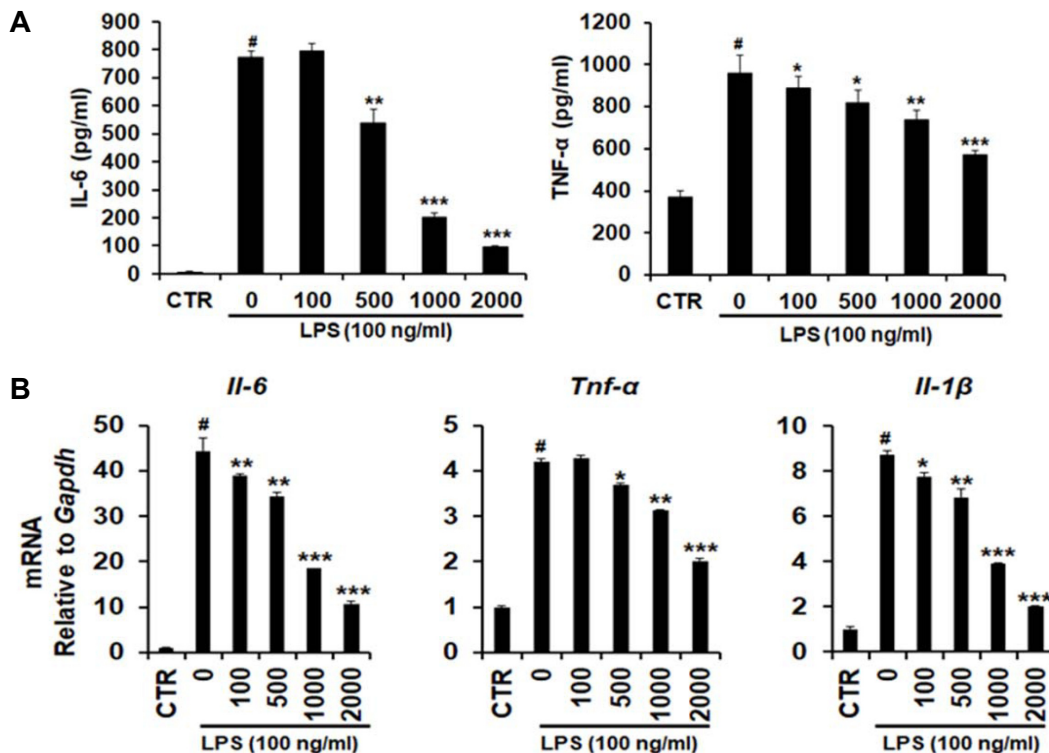


Fig. 5. Inhibitory effect of LME on the production of proinflammatory cytokine in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of LME extract sample (100, 500, 1,000, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hr. (A) IL-6 and TNF- $\alpha$  in the culture media were measured by ELISA. (B) BV-2 microglia ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated with LME extract sample (100, 500, 1,000, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hr prior to incubation of LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 5 hr after the LPS treatment. The levels of *Il-6*, *Tnf- $\alpha$*  and *Il-1 $\beta$*  mRNA were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to *Gapdh*. CTR: control (non-treated sample). LME: *Locusta migratoria* 70% Ethanol Extract. Level of significance was identified statistically using Student's test.  $*p < 0.05$ , compared with the LPS only.

### 플루치 에탄올 추출물이 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향

BV-2 세포는 중추신경계에 존재하는 면역세포로서 외부 이 물질을 포식하여 탐식하여 죽이는 기능 외 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 등의 염증 cytokine이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide 등의 염증 물질을 분비하는 것으로 보고되어 있다[8, 28]. TNF- $\alpha$ 는 LPS에 의해 활성화된 면역세포로부터 다량 분비되어 폐혈증이나 류마티스 관절염과 같은 염증질환 발달에 매우 중요한 역할을 하며, 압, 악액질(cachexia), 당뇨, 비만 등 대사성 질환에서 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다[4, 24]. 따라서 본 실험에서는 플루치 에탄올 추출물이 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 플루치 추출물을 전처리한 BV-2 세포에 LPS로 염증 반응을 유도 한 후 염증성 cytokine의 발현을 단백질 및 유전자 발현 수준에서 관찰 하였다(Fig. 5). 먼저 염증성 cytokine인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 단백질 수준에서의 발현 변화를 확인 하기 위하여 IL-6와 TNF- $\alpha$  ELISA kit를 이용하여 확인 한 결과 LPS단독 처리군에서 무처리 군에 비해 각각 800배와 2.5배 발현양이 증가되었으나 플루치 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 최대 2~8배 감소됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5A). 또한 염증성 cytokine 의 유전자 발현 수준에서 플루치 에탄올 추출물의 효과를 확인하기 위해 real-time PCR를 수행 하였으며(Fig. 5B), 사용한 primer는 Table 1에 나타났다. BV-2 세포에 IL-6, TNF- $\alpha$  그리고 IL-1 $\beta$ 가 LPS만 단독으로 처리한 경우 대조군에 비해 현저하게 증가하는 것을 확인하였으며, 플루치 에탄올 추출물에 의해 농도 의존적으로 유전자의 발현이 억제 되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 플루치 에탄올 추출물이 염증매개인자인 염증성 사이토카인 생성을 현저히 억제 시킴으로써 신경염증 억제 효능을 갖고 있을 뿐만 아니라 새로운 천연물 유래 신경염증 억제 물질로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ013110)의 지원에 의해 연구 수행으로 인한 결과물이며, 이에 감사 드립니다.

### References

- Angus, J. A. and Cocks, T. M. 1989. Endothelium-derived reaxing factor. *Pharmacol. Ther.* **41**, 303-352.
- Benveniste, E. N. 1997. Immunology of the nervous system. pp.419-459. Oxford University press, New York.
- Benveniste, E. N. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 259-275.
- Beutler, B. and Cerami, A. 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* **27**, 7575-7582.
- Boje, K. M. and Arora, P. K. 1992. Microglia-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxide mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587**, 250-256.
- Cross, A. K. and Woodrooffd, M. N. 2001. Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc. Res. Tech.* **54**, 10-17.
- Farrow, R. A. and Colless, D. H. 1980. Analysis of the interrelationships of geographical races of *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Orthoptera: Acrididae), by numerical taxonomy, with special reference to sub-speciation, in the tropics and affinities of the Australian race. *Acrida* **9**, 77-99.
- Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 219-240.
- Hanada, T. and Yoshimura, A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine growth Factor. Rev.* **3**, 413-421.
- Hobbs, A., Higgs, A. and Moncada, S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 191-220.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 9265-9269.
- Lee, M. R., Kim, J. C., Lee, S. J., Kim, S. H., Lee, S. J., Park, S. E., Lee, W. H. and Kim, J. S. 2017. Assessment of Physiological Activity of Entomopathogenic Fungi with Insecticidal Activity Against Locusts. *Kor. J. Appl. Entomol.* **56**, 301-308.
- Knott, C., Shern, G. and Wilkin, G. P. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyflooxygenase-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 724-739.
- Mason, R. P. and Cockcroft, J. R. 2006. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J. Clin. Hypertens (Greenwich)* **8**, 40-52.
- McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749-754.
- Okamoto, S. and Lipton, S. A. 2015. S-nitrosylation in neurogenesis and neuro-nal development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 1588-1593.
- Park, D. S., Yoon, M. Z., Xu, H., Yu, J. R. and Kom, T. S. 2004. Screening of anti-atherogenic substances from insect resources. *Kor. J. Phar-macogn.* **35**, 233-238.
- Park, J. H., Kim, S. H. and Lee, S. R. 2017. Inhibitory effect of *Petalonia binghamiae* on neuroinflammation in LPS-stimulated microglial cells. *J. Nutr. Health.* **50**, 25-31.
- Park, J. Y., Heo, S. M., An, E. Y., Han, J. S., Hwang, S. W. and Kang, C. Y. 2005. High throughput-compatible screening of anti-oxida-tive substances by insect extract library. *Kor. J. Food Preserv.* **12**, 482-488.
- Perry, V. H. and Gordon, S. 1997. Immunology of the nervous system. pp.155-172. Oxford University press, New York.
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, H., Nitsch, D., Pluss, C. and Walker, G. 1996. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potential for a novel class of anti-inflammatory agents.



- Cell Biol. Int.* **20**, 51-58.
22. Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7240-7244.
23. Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Giuffrida Stella, A. M., Green, C. J. and Motterlini, R. 2002. Caffeic acid phenethyl ester and *curcumin*: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol. Pharmacol.* **3**, 554-561.
24. Seo, M. C., Lee, J. H., Baek, M. H., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. A novel role for earthworm peptide Lumbricusin as a regulator of neuroinflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 1004-1010.
25. Son, E. H., Lee, J. W. and Yoo, J. Y. 2004. Brain disease treatment. *KISTI.* **11**, 1-39.
26. Takeuchi, T. 2007. Clinical development and future perspective of biological agents. *Nippon Rinsho Review* **65**, 1185-1188.
27. Uvarov, B. P. 1977. Grasshoppers and Locusts. pp.475. Centre for Overseas Pest Research, London.
28. Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R. S. and Sinclair, A. J. 2008. The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **17**, 220-228.
29. Yoon, H. J., Lee Y, B., Lee, K. Y., Kim, S. Y. and Jeong, J. K. 2016. Artificial breeding method of *Locust migratoria*. *Korea patent.* 10-2016-0071011.

---

### 초록 : LPS로 자극된 미세아교세포에서 풀무치 에탄올 추출물의 신경염증 억제 효능

이화정<sup>†</sup> · 서민철<sup>†</sup> · 이준하 · 김인우 · 김선영 · 황재삼 · 김미애\*  
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

뇌신경 질환의 주요 원인이 되는 것으로 알려진 미세아교세포의 과도한 활성화에 의한 신경염증반응에서 풀무치 에탄올 추출물이 미세아교세포의 염증 반응에 미치는 영향을 검토하였다. 미세아교세포의 활성화를 유도하기 위해 LPS를 사용하였으며, LPS 처리에 의해 신경염증반응의 지표인 NO의 생성량과 이들을 조절하는 iNOS, COX-2의 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 풀무치 에탄올 추출물을 1시간 전처리 한 후 LPS를 처리한 경우 추출물의 농도에 의존적으로 이들의 발현량이 현저히 감소되는 것을 확인 하였다. 또한 LPS 처리로 인해 분비되는 염증성 cytokine들의 생성량도 풀무치 에탄올 추출물에 의해 현저히 억제 됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 미세아교세포의 과도한 활성화로 인해 발생하는 뇌 신경질환의 치료 소재로서 풀무치 에탄올 추출물의 활성 가능성을 제시하였다.