

Inhibitory Effect of *Protaetia brevitarsis seulensis* Ethanol Extract on Neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 Microglia

Hwa Jeong Lee[†], Minchul Seo[†], 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, 2019 / Revised October 10, 2019 / Accepted October 11, 2019

Neuroinflammation is mediated by the activation of microglia and has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Therefore, the inhibition of neuroinflammation may be an effective solution to treat these brain disorders. *Protaetia brevitarsis seulensis* is an insect belonging to the order Coleoptera and inhabits Korea, China, Japan and Siberia. *P. brevitarsis seulensis* is an edible insect that can be consumed as a protein source for humans. It has been reported that *P. brevitarsis seulensis* contains useful bioactive substances for hepatoprotection and improving blood circulation, such as indole alkaloids. Microglia cells are the main source of proinflammatory cytokines and nitric oxide (NO) in the central nervous system, which perform neuroimmune, inflammatory, and other neurobiological functions. In this study, we investigated the anti-neuroinflammatory effects of *P. brevitarsis seulensis* ethanol extract (PBE) in activated microglia cells treated with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml). As a result, PBE significantly inhibited NO production without cytotoxicity and decreased the expression levels of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2. In addition, the production of inflammatory cytokine secreted by LPS was also reduced by PBE. These results suggest that PBE could be a good source of functional substances to prevent neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

Key words : Inflammatory cytokine, microglia, neuroinflammation, nitric oxide, *Protaetia brevitarsis seulensis*

서 론

현대의학기술과 문명의 발달로 인해 가속화되는 노령화 사회는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 뇌졸중(stroke) 등과 같은 뇌 질환 발병율을 증가 시킴으로써 전 세계적으로 뇌 질환의 사전 예방 및 치료를 위한 의약품 개발에 관심이 커지고 있다.

미세아교세포(microglia)는 중추신경계(central nervous system; CNS)의 12%를 차지하고 있으며, 중추신경계의 일차적인 면역을 담당하는 세포로서 손상된 신경세포를 제거하고 신경독소, 바이러스 및 박테리아등과 같은 내·외부의 자극으로부터 신경세포를 보호하는 역할을 가지고 있다[23-25]. 그러나 미세아교세포의 과도한 활성화는 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α 및 interleukin-6의 발현을 증가시켜 뇌신경

세포사멸을 유도하는 것으로 보고 되고 있어 미세아교세포의 활성화억제를 위한 소재개발 연구가 다양하게 진행 되고 있다 [27, 31].

Lipopolysaccharide (LPS)는 신경염증관련 연구에 사용되는 미세아교세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며[6], 미세아교세포가 LPS의 자극에 의해 활성화되면 염증매개물질 및 활성 산소 중(reactive oxygen species, ROS)의 분비를 촉진하여 신경독성을 유발한다[2, 3]. 활성 산소 중의 일종인 NO는 무기 저분자 라디칼로써 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할을 하며 nitric oxide synthase (NOS)를 통해 L-arginine으로부터 합성된다 [19]. 과량의 NO는 신체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상을 초래할 뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 퇴행성 뇌질환에 있어 중요한 원인이 되며[17], cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜[27] prostaglandin (PG) 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키는 것으로 보고되어있다[21]. 따라서 염증반응에 의해 증가되는 NO의 분비를 효과적으로 억제할 수 있는 억제제 개발은 각 중 염증성 질환을 치료하는 유용한 치료방법으로 여겨지고 있다[12, 14].

그러나 화학적으로 합성된 항염증 제제의 장기간 복용 시 장기 및 혈관에 대한 기능성 저해 등 부작용들이 밝혀지면서 천연자원을 이용한 염증반응을 억제시키는 물질에 대한 연구

[†] 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.

가 많이 진행 되고 있다[7]. 전통적으로 천연물 유래의 약제 개발은 주로 식물을 활용하여 진행되고 있으나[26, 29], 최근에는 지구상에 약 180만종이 서식하고 있는 것으로 알려진 곤충을 소재로 한 천연물 유래 신약개발 연구도 빠르게 확대되고 있다[28].

우리나라에서는 주로 한약재로 이용되어 왔으며 누에, 매미 허물, 동충하초, 지네 등 약 30 여종이 유용한 곤충자원으로 이용되고 있다[16]. 그 중 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 풍뎅이과(Scarabaeidae) 꽃무지아과(Cetoniinae)에 속하는 17~24 mm의 크기의 곤충으로 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 및 시베리아 동부 지역에 서식하고 있으며[19, 35], 동의보감에서는 간암, 누적된 피로해소, 각종 성인병 치료에 효과가 있다고 전해지고 있다. 최근에는 흰점박이꽃무지 영양성분 분석뿐만 아니라 다양한 연구를 통하여 간 보호효과 및 인돌알칼로이드와 같은 혈행개선 물질이 함유되어 있음을 보고한 바 있다[8, 9, 20]. 따라서 본 연구에서는 신경염증반응을 매개하는 미세아교세포를 활용하여 신경염증 질환의 진행을 조절하는데 효과를 가지는 천연물 소재를 발굴하고자 예로부터 한약재로 사용 되고 있는 흰점박이꽃무지를 이용하여 신경염증 반응에 미치는 영향 및 조절기전을 조사하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 세종자치시 금남면의 사육농가 ‘세종 꿈꾸는 굴벵이’에서 발효톱밥을 먹여 사육한 3령 유충을 구입하여 실험에 사용하였다. 흰점박이꽃무지는 동결건조 하여 분쇄기로 분쇄한 후 분말로 사용하였으며 제조한 분말은 -70℃에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 흰점박이꽃무지 분말 1 g에 10 ml의 70% ethanol을 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℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

MTS assay

BV-2 세포에 대한 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 96-well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 약 24시간 동안 배양하였다. 그 후 흰점박이꽃무지 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 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess reagent (iNtRON, Korea)를 이용하여 측정하였다. BV-2 세포는 4×10⁴ cells/well로 96-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 흰점박이꽃무지 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 (NaNO₂)용액의 표준곡선을 기준으로 하여 계산하였다.

Real time RT-PCR

BV-2 세포는 4×10⁵ cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 5시간 배양하였다. 배양한 BV-2

Table 1. Sequences of primes used for RT-PCR

| cDNAs | Primer sequences | Accession number |
|-------|---|------------------|
| iNos | Forward, 5' - CAGCACAGGAAATGTTTCAGC-3' Reverse, 5' - TAGCCAGCGTACCGGATGA-3' | NM_010927 |
| Cox-2 | Forward, 5' - CAGACAACATAAACTGCGCCTT-3' Reverse, 5' - GATACACCTCTCCACCAATGACC-3' | NM_011198 |
| Il-6 | Forward, 5' - GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' Reverse, 5' - AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-3' | NM_031168 |
| Tnf-α | Forward, 5' - ATGAGAAGTTCCCAAATGGC-3' Reverse, 5' - CTCCACTTGGTGGTGGTTTGCTA-3' | NM_013693 |
| Gapdh | Forward, 5' - AAGGTCATCCAGAGCTGAA-3' Reverse, 5' - CTGCTTACCACCTTCTTGA-3' | NM_008084 |

세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 total RNA를 추출한 후 동량의 RNA (2 µg)로 부터 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, Farmingdale, NY)를 이용하여 Real-time PCR로 확인 하였다.

Western blot analysis

BV-2 세포를 harvest 한 후 원심 분리하여 그 상등액을 버리고 cell pellet을 수거 하였다. M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo scientific, MA, USA)를 이용하여 세포를 lysis 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 수거하였다. 단백질 양은 Pierce™ BCA protein assay kit (Rockford, IL, USA)로 정량 하였으며, 동일량의 단백질을 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, PVDF membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS와 anti-COX-2 (Cell signaling Technology, Denver, MA, USA) 항체를 각각 반응시킨 후 horseradish peroxidase (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.

ELISA 방법에 이용한 IL-6, TNF-α 측정

BV-2 세포는 4×10⁵ cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 흰점박이꽃무지 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 (ThermoFisher, Waltham, MA)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

BV-2세포에 대한 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 세포독성 확인

흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 신경염증 억제 효능을 알

아보기 위해 우선 BV-2 미세아교세포에서 세포독성을 MTS assay 방법으로 수행하였다(Fig. 1). 96-well plate에 2×10⁴ cells/well의 세포를 약 24시간 배양한 후 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인 하였다. 그 결과 처리한 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 최고 농도인 2,000 µg/ml까지 독성을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다. 따라서 이후 신경염증 억제 효능 실험들에서는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물은 세포독성을 나타내지 않는 2,000 µg/ml 이하의 농도로 사용하였다.

흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향

신경 보호나 뇌 발달에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 NO는 LPS나 interferon-gamma (IFN-γ), β-amyloid 등으로 인해 생성되는데 미세아교세포의 활성화로 인해 생성된 과도한 NO는 중추신경계에서 심각한 세포독성과 신경염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다[5, 22]. 특히, 미세아교세포의 과도한 활성화에 의해 분비되는 NO의 경우 비정상적으로 작용하여 뇌혈관장벽 파괴를 촉진하고 산화적 손상을 야기하기도 하여 뇌경색을 악화시키기도 한다[15, 33]. 따라서 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 신경염증 억제효능을 알아보기 위해 BV-2 세포에 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 신경염증반응을 유도 시킨 후 염증반응의 대표적인 지표물질 NO의 생성량을 Griess reagent 방법으로 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 BV-2 세포에 LPS를 단독 처리한 실험군의 경우 대조군에 비해 약 17배정도 NO생성량이 증가되었으나, 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물을 농도별(100~2,000 µg/ml)로 처리한 실험군에서는 흰점박이꽃무지 추출물농도에 의존적으로 NO분비량이 유의적으로 감소됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 LPS에 의해 유도되는 BV-2 세포

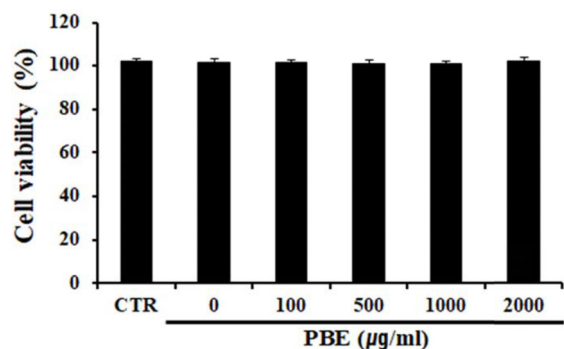


Fig. 1. PBE on the cell viability in BV-2 microglia. BV-2 microglia (2×10⁴ cells/well in a 96-well plate) were incubated with PBE for 24 hr, and cell viability was assessed using MTS assay. CTR: control (non-treated sample). PBE: *Protactia brevitaris seulensis* 70% ethanol extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. *p<0.05, compared with the LPS only.

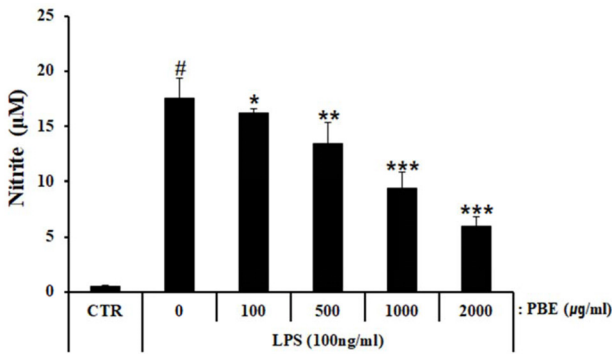


Fig. 2. Inhibitory effect of PBE extract on the production of nitric oxide in BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^4 cells/well in a 96-well plate) were cultured with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of PBE for 24 hr to determine the level of NO. CTR: control (non-treated sample). PBE: *Protactia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

의 염증반응을 감소시킬 수 있는 신경염증반응 억제제로서의 활용 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 iNos 및 Cox-2 유전자 발현에 미치는 영향

COX는 PG의 합성에 관여하며 COX-1과 COX-2로 분류되는데 COX-1의 경우 대부분의 조직에 존재하며 위장의 세포를 보호 하거나 혈액흐름을 조절하는 등의 생리적 기능을 담당하고 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 외부 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다[13, 30]. iNOS 또한 외부자극에 의해 유도되며 많은 양의 NO를 생성하며 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한

작용을 유발한다[27]. 따라서 염증반응상태에서는 iNOS 뿐만 아니라 COX-2가 염증매개물질의 생합성을 촉진하여 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있으므로[32], 미세아교세포에서 iNOS및 COX-2의 발현을 효과적으로 억제하는 것이 염증성 cytokine의 생성 억제와 함께 신경염증과 신경퇴행성 질환의 치료와 예방을 위한 일반적인 접근방법으로 인식되고 있다.

따라서 본 연구에서는 LPS에 의해 과하게 활성화된 BV-2 세포에서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 iNos와 Cox-2의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 real-time RT-PCR을 이용해 이들의 발현변화를 확인 하였다(Fig. 3). BV-2 세포에 LPS를 단독으로 처리하여 염증반응을 유도 시켰을 때 대조군에 비해 각각 약 2-4배 정도 증가하였으며, 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물을 농도별(100~2,000 µg/ml)로 함께 처리한 경우 추출물의 처리 농도에 의해 iNos, Cox-2 유전자의 발현이 1,000 µg/ml 및 2,000 µg/ml의 농도에서 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 Cox-2, iNos 유전자 발현을 조절함으로써 NO의 생성 및 신경염증 억제 활성 가능성을 가지는 것으로 판단된다.

흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

이상의 결과에서 우리는 LPS에 의해 과하게 활성화된 BV-2 세포로부터 생성되는 PGE2의 합성효소인 Cox-2 유전자 발현과 NO의 합성효소인 iNos의 유전자 발현을 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물에 의해 억제시킴을 확인 하였다. 따라서 우리는 과하게 활성화된 BV-2 세포에서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물에 의해 iNOS와 COX-2 단백질 발현 또한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 Western blot으로 분석 하였다(Fig. 4). 그 결과 LPS처리에 의해 증가된

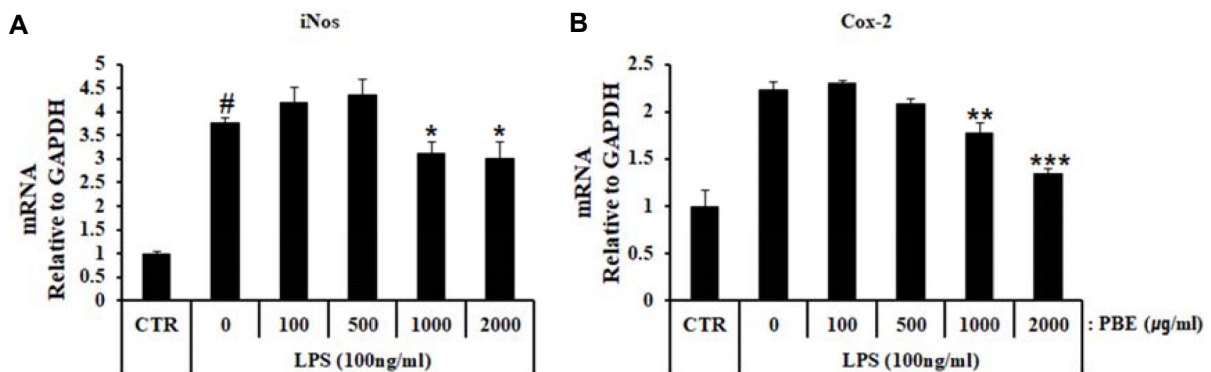


Fig. 3. Inhibitory effect of PBE on iNos and Cox-2 expression in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated with PBE (100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml) for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 5 hr after the LPS treatment. The level of iNOS (A) and Cox-2 (B) mRNA were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to the housekeeping gene glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). CTR: control (non-treated sample). PBE: *Protactia brevitarsis seulensis* 70% ethanol extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. * $p < 0.05$, compared with the LPS only.

iNOS와 COX-2 단백질의 발현은 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물에 의해 500 µg/ml의 농도까지는 감소되지 않다가 1,000 µg/ml 및 2,000 µg/ml의 농도에서는 대조군 만큼 감소하는

양상을 확인할 수 있었다. 결론적으로 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물은 초기염증반응 조절인자인 iNOS, COX-2 유전자 및 단백질 발현을 억제함으로써 신경염증반응이 조절됨을 확인

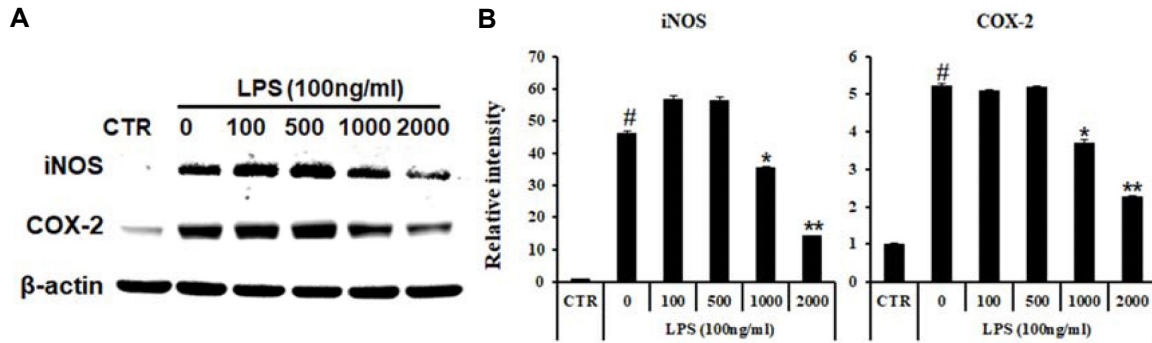


Fig. 4. Inhibitory effect of PBE on the protein levels of iNOS and COX-2 in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of PBE extract sample (100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml) for 24 hr. (A) The expression level of iNOS and COX-2 were determined by Western blot. (B) The data were normalized to β -actin. Results of densitometric analysis of Western blot are also shown. CTR: control (non-treated sample). PBE: *Protactia brevitarsis seulensis* 70% ethanol extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. * $p < 0.05$, compared with the LPS only.

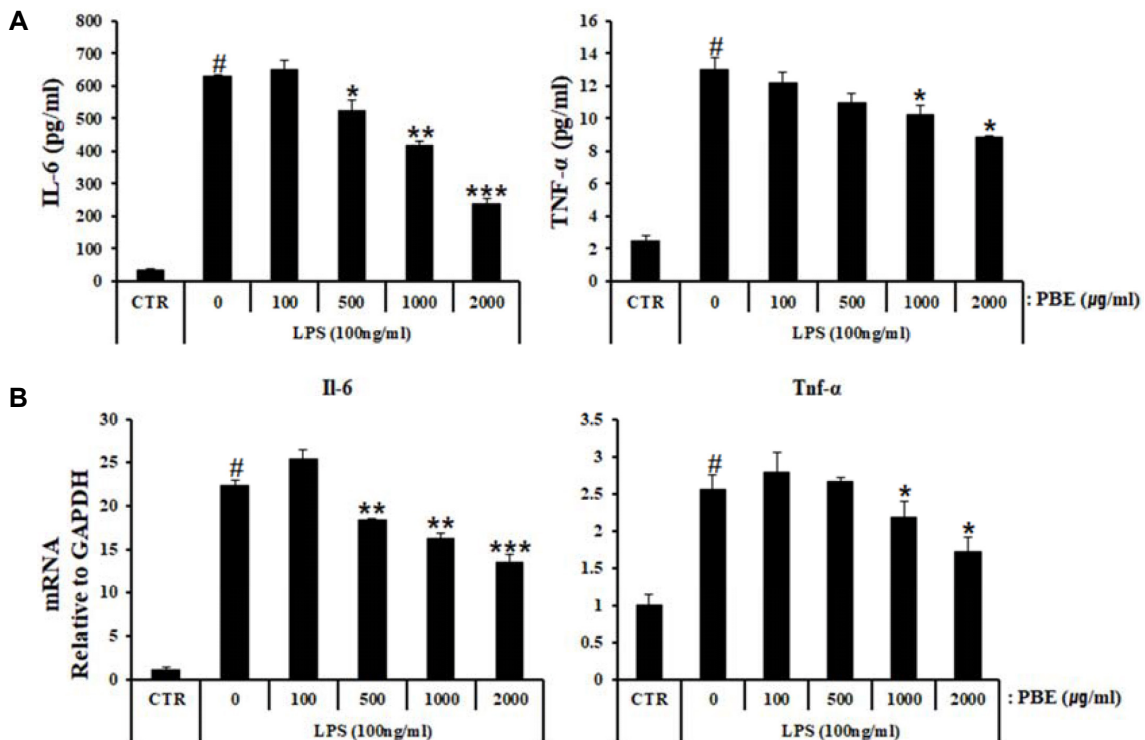


Fig. 5. Inhibitory effect of PBE on the production of proinflammatory cytokine in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of PBE extract sample (100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml) for 24 hr. (A) IL-6 and TNF- α in the culture media were measured by ELISA. (B) BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated with PBE sample (100, 500, 1,000, 2,000 µg/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- α* and *Il-1 β* mRNA were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to *Gapdh*. CTR: control (non-treated sample). PBE: *Protactia brevitarsis seulensis* 70% ethanol extract. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. * $p < 0.05$, compared with the LPS only.

할 수 있었으며, 향후 염증 반응을 기반으로 하는 다양한 신경계 질환 치료를 위한 기능성 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향

중추신경계에 존재하는 면역세포인 BV-2 세포는 염증성 cytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) 이나 eicosanoids, ROS, NO, superoxide 등의 염증 매개 물질을 분비하는 것으로 보고되어 있다[10, 34]. TNF- α 는 염증 반응의 중요한 매개 물질이며 다양한 세포의 성장과 분화를 조절하는 것으로 알려져 있으며 LPS에 의해 과하게 활성화된 면역세포로부터 TNF- α 가 다량 분비되는데 이것은 류마티스나 관절염과 같은 염증질환 발달에 매우 중요한 역할을 하며, 압, 골 흡수, 비만 등 대사성 질환에서 인슐린 저항성을 유도하고 혈전생성을 촉진하며 lipogenetic 대사를 억제하는 것으로 알려져 있다[1, 4, 28]. 또한 염증 cytokine 중의 하나인 IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 IL-6는 염증반응이 일어나면 항상 증가되는 것으로 보고 되고 있다[10]. 따라서 본 실험에서는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 염증성 cytokine 발현 및 반응 산물의 억제효과를 확인 하기 위해 흰점박이꽃무지 추출물을 BV-2 세포에 1 hr 전처리한 후 LPS로 염증 반응을 유도하여 염증성 cytokine의 발현 변화를 관찰 하였다(Fig. 5).

먼저 염증성 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 단백질 수준에서의 발현 변화를 확인 하기 위하여 IL-6와 TNF- α ELISA kit를 이용하여 확인 한 결과 LPS 단독 처리군에서 무처리 군에 비해 각각 600배와 6배 발현량이 증가되었으나 흰점박이꽃무지 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 최대 2~3배 감소됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5A). 또한 염증성 cytokine의 유전자 발현 수준에서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 효과를 확인 하기 위해 real-time PCR를 수행 하였으며(Fig. 5B), 사용한 primer는 Table 1에 나타났다. BV-2 세포에 LPS만 단독으로 처리한 경우 염증성 cytokine IL-6, TNF- α 가 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물에 의해 농도 의존적으로 유전자의 발현이 억제 되는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 염증매개 인자인 염증성 cytokine 생성을 현저히 억제 시킴으로써 신경염증 억제 효능을 갖고 있을 뿐만 아니라 천연물 유래 신경염증 억제를 함유하고 있을 것으로 판단된다. 그러나 향후 보다 더 정확한 검증을 위해 알츠하이머질환이나 파킨슨질환, 신경퇴행성 동물모델을 이용한 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 효능 검증에 대한 추가 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

References

1. Aggarwal, B. B. 2003. Signaling pathways of the TNF super-family: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745-756.
2. Benveniste, E. N. 1997. Immunology of the nervous system. pp.419-459. Oxford University press, New York.
3. Benveniste, E. N. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 259-275.
4. Beutler, B. and Cerami, A. 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* **27**, 7575-7582.
5. 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.
6. Carne, S., Carne, C., Josep M, T. and Joan, S. 2002. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1275-1283.
7. Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M. and Diederich, M. 2010. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1801-1815.
8. Chon, J. W., Kweon, H. Y., Jo, Y. Y., Yeo, J. H. and Lee, H. S. 2012. Protective effects of extracts of *Protaetia brevitarsis* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the mice. *J. Seric. Entomol. Sci.* **50**, 93-100.
9. Chung, M. Y., Kwon, E. Y., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia brevitarsis*. *J. Life Sci.* **23**, 664-668.
10. 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 sub-populations after exposure to substance. *Neuropeptide* **37**, 355-361.
11. Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 219-240.
12. Hanada, T. and Yoshimura, A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **3**, 413-421.
13. Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R. P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**, 144-150.
14. 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.
15. Jiang, Z., Li, C. Arrick, D. M., Yang, S., Baluna, A. E. and Sun, H. 2014. Role of nitric oxide synthases in early blood-

- brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. *PLoS One* **9**, e93134.
16. Kang, I. J., Kim, H. K., Chung, C. K. and Oh, D. H. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **29**, 479-484.
 17. Kasckow, J. W., Aguilera, G., Mulchahey, J. J., Sheriff, S. and Herman, J. P. 2003. *In vitro* regulation of corticotropin-releasing hormone. *Life Sci.* **73**, 769-781.
 18. Kim, H. G. and Kang, K. H. 2005. Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Kor. J. Appl. Entomol.* **44**, 139-144.
 19. 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.
 20. Lee, J. I., Lee, W. H., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M. K. and Bae, J. S. 2017. Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 1217-1227.
 21. Mason, R. P. and Cockcroft, J. R. 2006. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J. Clin. Hypertens (Greenwich)* **8**, 40-52.
 22. 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.
 23. Miquel, V., Lewis, J. L., Christelle, G., Du, C. W., Peter, T., Kug, C. D., Kim, T. and Serge, P. 2001. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* **14**, 483-489.
 24. Norton, W., T., Aquino, D. A., Hozymi, I., Chiu, F. C. and Brosnan, C. F. 1992. Quantative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* **17**, 877-885.
 25. Orr, C. F., Row, D. B. and Haliday, G. M. 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **68**, 325-340.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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 regelator of neurinfammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 1004-1010.
 29. 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**, 136-142.
 30. Seo, U., K. Jung, H., W. and Park, Y., K. 2008. Chloroform fraction of zingiberis rhizoma recens modulates the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 73-83.
 31. Toyoko, A. and Guoying, B. 2003. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **12**, 35-45.
 32. Uvarov, B. P. 1977. Grasshoppers and Locusts. pp.475. Centre for Overseas Pest Research, London.
 33. Wang, J. Y., Lee, C. T. and Wang, J. Y. 2014. Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia. *Neuro. Sci.* **281**, 164-177.
 34. Witkamp, R. and Monshouwer, M. 2000. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet. Q.* **22**, 11-16.
 35. Zhang, Z. L. 1984. Economic insect founa of China. Fasc. **28**, Cloeoptera: Larva of Scarabaeidae, pp.27-28, Science Press, Beijing (in Chinese).

초록 : LPS에 의해 활성화된 미세아교세포에서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 신경염증 억제 효과이화정[†] · 서민철[†] · 이준하 · 김인우 · 김선영 · 황재삼 · 김미애^{*}

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

신경염증은 알츠하이머병 및 파킨슨병 과 같은 신경퇴행성 장애의 발병원인에 관련이 있는 미세아교세포의 활성화에 의해 매개되므로 신경염증억제는 다양한 뇌질환을 치료할 수 있는 효과적인 해결책이 될 수 있다. 흰점박이꽃무지는 딱정벌레목 풍뎅이과에 속하는 곤충으로 한국, 중국, 일본 및 시베리아에 서식한다. 현재 국내에서는 흰점박이꽃무지가 식용곤충 자원으로서 단백질 공급원일 뿐만 아니라 간보호 효과와 혈행개선 등에 유용한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다. 미세아교세포는 중추신경계에서 염증성 cytokine 및 산화질소의 중요공급원이며 신경면역 및 염증기능 및 기타 다양한 신경생물학적 효과를 발휘한다. 본 연구에서는 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 과하게 활성화된 미세아교세포에서 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물의 신경염증 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물은 세포독성 없이 NO 생성을 현저히 억제하였고, iNOS와 COX-2 발현량을 감소시켰으며 LPS에 의해 분비되는 염증성 cytokine의 생성량도 흰점박이꽃무지 추출물에 의해 감소되었다. 이러한 결과는 흰점박이꽃무지 에탄올 추출물이 신경염증 및 퇴행성 신경질환을 예방하기 위한 기능성 물질의 좋은 공급원이 될 수 있음을 시사한다.