

## Anti-inflammatory Activity of Antimicrobial Peptide Protaetiamycine 2 Derived from the *Protaetia brevitarsis seulensis*

Joon Ha Lee, Minhee Baek, Hwa Jeong Lee, In-Woo Kim, Sun Young Kim, Minchul Seo, Mi-Ae Kim, Seong Hyun Kim and Jae Sam Hwang\*

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

Received October 4, 2019 / Revised November 14, 2019 / Accepted November 18, 2019

The white-spotted flower chafer *Protaetia brevitarsis seulensis* is a medicinally beneficial and important edible insect species. We previously performed an *in silico* analysis of the *Protaetia brevitarsis seulensis* transcriptome to identify putative antimicrobial peptides and then tested their antimicrobial and hemolytic activities. These peptides had potent antimicrobial activities against bacteria and yeast without inducing hemolysis. In the present study, the cationic antimicrobial peptide, protaetiamycine 2, was selected for further assessment of its anti-inflammatory properties in mouse macrophage Raw264.7 cells. Protaetiamycine 2 treatment of Raw264.7 cells suppressed LPS-induced nitric oxide production and reduced the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, as determined by real-time PCR and western blotting. The expression of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) was also attenuated through the MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling. We also confirmed that protaetiamycine 2 bound to bacterial cell membranes by a specific interaction with LPS. Collectively, these data obtained from LPS-induced Raw264.7 cells indicated that protaetiamycine 2 could have both antimicrobial and anti-inflammatory properties.

**Key words** : Antimicrobial peptide, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, *Protaetia brevitarsis seulensis*, RNA sequencing

### 서 론

우리나라를 포함한 아시아의 여러 나라에서는 예로부터 약용곤충을 민간요법으로 사용하였는데 그 중 흰점박이꽃무지는 '동의보감'에서 간 질환(간암, 간경화, 간염 등) 및 성인병 치료 효과가 있음이 기록되어 있다. 최근에는 흰점박이꽃무지의 전처리 조건 확립[9] 및 영양학적 가치와 안전성[3]이 입증되어 식품의약품안전처로부터 2014년 한시적 식품원료로 승인 받아 2016년도에 식품공전에 등록이 완료된 상태이다. 현재 흰점박이꽃무지 유충을 가공하여 즙과 환의 형태로 또는 분말을 이용하여 다양한 제품들이 출시되고 있다. 하지만 약리학적 연구들은 아직 미비한 상태이며 대부분이 추출물을 이용한 연구들로 어떠한 성분들이 약리학적 효능을 나타내는지에 대한 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 추출물로부터 정제된 물질은 앞서 에탄올 추출물을 이용하여 분획침전 및 HPLC를 통해 인돌알칼로이드(indole alkaloid)를 정제하고

인돌알칼로이드가 항혈전 효능이 있음을 보고한바 있다[14]. 그러나 추출물로부터 단일 화합물의 분리를 통한 약리학적 효능 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 앞서 흰점박이꽃무지 유충을 이용하여 대장균으로 면역화시킨 개체와 면역화시키지 않은 개체로부터 RNA 시퀀싱을 통해 확인된 전사체 분석결과를 바탕으로 도출한 항균 펩타이드의 항균활성 및 항염증활성에 관한 실험내용을 보고하였다. 전사체분석을 통해 선발된 항균 펩타이드들은 항균활성 및 항염증활성과 함께 다양한 기능성연구를 수행하여오고 있다. 앞서 보고된 흰점박이꽃무지 유래 항균 펩타이드는 2003년에 면역화된 혈림프(hemolymph)로부터 처음으로 분리 정제된 protaetin 1, 2, 3 [25]로 protaetin 1은 참검정풍뎀이(*Holotrichia diomphalia*) 유래 항균 펩타이드 holotricin 2 [15]와 매우 유사한 서열을 나타내었다. 우리 그룹에서는 RNA 시퀀싱 도입 전 2006년에 흰점박이꽃무지 유충으로부터 cDNA 라이브러리 스크리닝을 통해 곤충 디펜신(defensin)을 처음으로 클로닝하고 프로테티아마이신(protatiamycine)으로 명명하였다[5]. 프로테티아마이신의 mature form은 43개의 아미노산으로 구성되어있는데 그 중 아미노산 22번(Ala)부터 30번(Gly)까지의 9-mer 펩타이드를 template로 일부 아미노산의 치환을 통해 다양한 analog 들을 디자인하여 항염증 활성, 항진균활성, 항균활성 작용기작을 보고한바 있다[10, 12, 24]. 이후에는 2016년에 흰점박이꽃무지로부터 디펜신 유사 항균 펩타이드 Psdefensin이 보고

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2974, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : [hwangjs@korea.kr](mailto:hwangjs@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.

된바 있다[11]. Psdefensin은 본 연구실에서 발표한 애기뿔소똥구리 유래 디펜신인 코프리신[6]과 앞서 발표한 프로테티아마이신[5]을 포함하여 다른 곤충종들의 디펜신과 서열유사성을 나타내었다.

항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 선천성면역체제(innate immune system)에서 매우 중요한 생체방어물질로서 침입하는 병원성미생물들에 대하여 감염의 위협으로부터 개체를 보호하고 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있도록 해준다[26]. 항균 펩타이드에 관한 많은 연구들로 항균 펩타이드의 물리화학적 특성들뿐만 아니라 미생물에 대한 항균활성 작용기작에 대해 잘 알려져 있다[8]. 항균 펩타이드의 작용기작은 듀얼 메커니즘으로 설명할 수 있는데 한가지는 미생물의 세포막에 작용하는 membrane-active 메커니즘이고 다른 하나는 세포막을 통과하여 세포 자연사(apoptosis)를 유도하는 방식이다. 세포막에 작용하는 membrane-active 메커니즘은 항균 펩타이드가 막에 구멍(hole)을 뚫는 작용방식에 따라 Carpet, Barrel-Stave, Troidal 메커니즘으로 나눌 수 있다[13]. 이때 항균 펩타이드가 미생물의 세포막에 작용하기 전에 음전하를 띠는 세포막 구성성분들과 상호작용을 한다는 것이 알려져 있는데, 예를 들면 그람음성균의 지질다당체(lipopolysaccharide, LPS)와 리피드 A (lipid A) 그리고 그람양성균의 펩티도글리칸(peptidoglycan, PGN)과 리포테이코산(lipoteichoic acid, LTA)이 박테리아의 대표적인 세포막 구성성분이다. 이러한 세포막 구성성분들은 면역반응을 일으키는 유도인자(elicitor)로서 이러한 물질들을 통칭하여 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)라고 명명하는데, 이러한 PAMPs는 호스트에 존재하는 인식단백질(recognition protein)들에 의해 결합되어 면역반응이 개시되며 이러한 인식단백질들을 pattern recognition receptors (PRRs)라고 한다. 염증반응과 관련해서 LPS는 내독소(endotoxin)로도 잘 알려져 있는데 그람음성균에 존재하는 PAMP의 일종으로 그람음성균의 감염으로 인해 다량의 내독소가 유리되면 패혈성 쇼크(septic shock)를 일으키기도 한다[22]. 이러한 LPS는 면역세포에 존재하는 PRR인 Toll-like receptor 4 (TLR 4)에 의해서 인식되며 면역세포의 활성화로 염증반응이 일어나게 된다. 활성화된 면역세포들은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines), 케모카인(chemokines)을 포함하여 다양한 염증성 매개인자들의 발현이 유도되어 분비하는데, 이러한 염증성 매개인자들의 과도한 발현은 세포들과 조직에 손상을 일으키기 때문에 적절하게 발현이 조절되어야 한다[7, 20]. 이러한 측면에서 본 연구에서는 흰점박이꽃무지로부터 선발된 항균 펩타이드 프로테티아마이신 2가 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에서 염증반응을 제어함으로써 항염증활성을 나타내는지 일련의 실험을 통해 염증매개인자들의 발현양상과 신호전달과정에서의 인산화 및 LPS와의 상호작용 유무를 조사하여 보고하였다.

## 재료 및 방법

### 모델곤충

흰점박이꽃무지(*Portaetia brevitarsis seulensis*)는 국립농업과학원의 곤충사육동에서 계대사육을 통해 유지되어오고 있다. 흰점박이꽃무지 유충의 먹이원은 발효톱밥을 사용하였으며 28°C, 70%의 상대습도 조건으로 16L : 8D의 광주기로 사육되었다.

### 펩타이드

프로테티아마이신 2는 애니젠(주)에서 고상법을 이용하여 합성하였다. 합성한 펩타이드는 산성화시킨 증류수(0.01% 아세트산용액)에 녹여서 사용하였으며 사용 전에는 -20°C에 보관하였다.

### 항균활성

프로테티아마이신 2의 항균활성은 radial diffusion assay [16]을 통해 테스트하였다. 펩타이드 용액은 0.01% 아세트산 용액으로 준비하였으며 펩타이드 농도는 일정량으로 serial dilution 하였다. Radial diffusion assay에 사용한 *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*는 3%(w/v) tryptic soy broth (TSB)에서 37°C, 200 rpm의 조건으로 18시간 배양한 후, *E. coli* 와 *S. aureus*는 다시 동일한 조건에서 대수증식기(log phase)에 들어가도록 2시간 30분간 2차 배양하였다. Citrate phosphate buffer (9 mM sodium phosphate, 1 mM sodium citrate, pH7.4) 와 1%(w/v) type I (low EEO) agarose, 0.03% TSB로 구성된 멸균된 underlay gel에 배양된 미생물( $4 \times 10^6$  colony forming units, CFUs)을 각각 넣고 혼합해준 뒤 사각플레이트에 붓고, underlay gel이 굳으면 지름 3 mm의 hole을 내어 준비하였다. Serial dilution을 통해 준비한 농도별 펩타이드들은 5  $\mu$ l씩 hole에다 loading 하였다. 샘플들이 확산되도록 37°C에서 3시간 동안 배양한 후, overlay agar (6% TSB, 1% agarose) 10 ml을 붓고 37°C에서 하룻밤 동안 추가 배양했다. 다음날 생성된 clear zone을 확인하고 지름을 측정하였다.

### 용혈활성

다양한 농도(12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml)의 펩타이드 용액 20  $\mu$ l에 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 있는 2.5%(v/v) 랫트(rat) 적혈구 용액 180  $\mu$ l를 넣어 주었다. 멜리틴(melittin)은 벌독으로부터 분리된  $\alpha$ -나선 구조의 항균 펩타이드로 적혈구를 파괴하는 양성 대조군으로 사용하였다. 펩타이드와 적혈구의 혼합물은 37°C에서 30분간 반응시킨 후 600  $\mu$ l의 PBS를 각각의 튜브에 추가로 넣어주었다. 원심분리기기를 이용하여 10,000 $\times$  g에서 3분간 원심분리 후 상등액을 취하여 분광 광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**세포배양**

마우스의 대식세포인 Raw264.7 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS) 과 항생제 penicillin G (100 U/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen, USA)이 함유된 complete medium을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 계대배양하고 유지하였다.

**세포생존율 측정**

Raw264.7 세포에 대한 프로테티아마이신 2의 세포독성을 확인하기 위하여 96-well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 18시간 동안 배양하였다. 그 후 프로테티아마이신 2를 25, 50, 75, 100, 200 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. 흡광도는 multi detector (Beckman, DTX8800, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

**Nitric oxide (NO) assay**

Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw264.7 세포는 4×10<sup>4</sup> cells/well로 96-well plate에 분주하여 약 18시간 동안 배양한 후 프로테티아마이신 2를 25, 50, 75, 100 µg/ml의 농도로 1시간 전처리 한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상등액 100 µl를 취하여 Griess 시약과 반응 시킨 후 multi detector (Beckman, DTX8800, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 측정하였다. 생성된 NO의 퍼센트는 LPS를 처리한 샘플을 최대 NO 생성량 기준으로 하여 계산하였다.

**Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Raw264.7 세포는 1×10<sup>6</sup> cells/well로 6-well plate에 분주하

여 18시간 동안 배양한 후 프로테티아마이신 2를 25, 50, 75, 100 µg/ml의 농도로 1시간 전처리 한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 17시간 배양하였다. 배양한 Raw264.7 세포는 PBS로 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. 염증 관련 유전자의 발현은 Table 1에 제시한 각각의 primer와 함께 AMPIGENE® qPCR Green Mix Lo-ROX (Enzo Life Sciences, USA)를 이용하여 ABI 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 확인하였다.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Raw264.7 세포는 1×10<sup>6</sup> cells/well로 6-well plate에 분주하여 18시간 동안 배양한 후 프로테티아마이신 2를 25, 50, 75, 100 µg/ml의 농도로 1시간 전처리 한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 회수하여 배양액에 유리된 TNF-α, IL-6와 IL-1β를 ELISA kit (Thermo Fisher, Waltham, MA)를 이용하여 측정하였다.

**Western blot analysis**

Raw264.7 세포는 1×10<sup>6</sup> cells/well로 6-well plate에 분주하여 18시간 동안 배양한 후 프로테티아마이신 2를 25, 50, 75, 100 µg/ml의 농도로 1시간 전처리 한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 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, nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백

Table 1. Sequences of primers used for qRT-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'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	NM_031168
Il-1β	Forward, 5'-CCTTCCAGGATGAGGACATGA-3' Reverse, 5'-TGAGTCACAGAGGATGGGCTC-3'	NM_008361
Tnf-α	Forward, 5'-ATGAGAAGTTCCTCCAAATGGC-3' Reverse, 5'-CTCCACTTGGTGGTGGTTTGCTA-3'	NM_013693
Gapdh	Forward, 5'-AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3' Reverse, 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3'	NM_008084

질에 대한 반응성을 차단하고  $\beta$ -actin, iNOS, COX-2, anti-phospho와 total-p44/p42 MAPK, anti-phospho와 total-p38 MAPK, anti-phospho와 total JNK, 그리고 I $\kappa$ B (Cell signaling, MA, USA) 항체를 각각 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체로 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에 0.05% TBST로 10분씩 3회 수세 하였다. 그 후 항체에 대한 대응 단백질 band를 Western Lightning Plus (PerkinElmer, Boston, MA, USA)를 사용하여 FluorChem (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 이미지 분석장비로 확인하였다.

**통계처리**

모든 실험 결과는 3회 반복하여 평균과 표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타냈다. 실험군 간의 유의성은 Duncan post-hoc ANOVA analysis를 통해 검정하였고,  $p < 0.05$ 일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**프로테티아마이신 2의 항균활성 및 용혈활성 확인**

전사체분석을 통해 선별한 항균 펩타이드들은 앞서 명명하였던 프로테티아마이신에 숫자를 붙여 명명하였으며 그 중 프로테티아마이신 2를 이용하여 미생물에 대한 항균활성을 확인하였다(Fig. 1A). 그 결과 그람음성균인 대장균(*E. coli*)과 그람양성균인 황색포도상구균(*S. aureus*) 및 진균인 칸디다 알비칸스(*C. albicans*)에 대해 프로테티아마이신 2가 농도의존적으로 광범위한 활성을 나타내었다. 또한 랫트(rat)의 적혈구를

이용하여 항균활성뿐만 아니라 용혈활성을 통해 세포독성이 있는지 확인한 결과 멜리틴(melittin)은 최저농도인 12.5  $\mu$ g/ml에서 75%의 용혈활성을 나타낸 반면 프로테티아마이신 2는 최고농도인 200  $\mu$ g/ml에서도 용혈활성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1B). 이러한 항균 펩타이드의 항균활성은 음전하를 띠는 미생물의 세포막 구성성분들과 상호작용을 통해 세포막에 구멍을 뚫거나 막을 통과하여 항균활성을 나타낸다는 것이 알려져 있다[19]. 프로테티아마이신 2는 양전하를 띠는 항균 펩타이드로 C-말단의 아미드화(amidation)를 포함해서 총전하(net charge)는 중성 pH에서 +6 이며 등전점(isoelectric point, pI)은 10.6으로 염기성 펩타이드이다.

**프로테티아마이신 2의 세포독성 확인**

프로테티아마이신 2가 마우스의 대식세포인 Raw264.7 세포에 대해 세포독성을 나타내는지 확인하기 위해 MTS assay를 통해 관찰하였다. 세포독성은 Raw264.7 세포에 25, 50, 75, 100, 그리고 200  $\mu$ g/ml의 프로테티아마이신 2를 처리하고 24시간 뒤에 MTS 시약을 처리하여 세포생존율을 확인하였다. 그 결과 프로테티아마이신 2는 100  $\mu$ g/ml까지는 세포생존율에 영향을 미치지 않았지만 200  $\mu$ g/ml의 농도에서는 생존율이 82%로 일부 세포독성을 나타내었다(Fig. 2A). 따라서 항염증관련 실험들은 세포독성을 나타내지 않는 100  $\mu$ g/ml을 최대농도로 하여 실험을 수행하였다.

**프로테티아마이신 2에 의한 Nitric Oxide 생성 억제 확인**

NO는 전령분자(messenger molecule)로서 많은 생리학적 병리학적 과정들에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다[17]. 특히

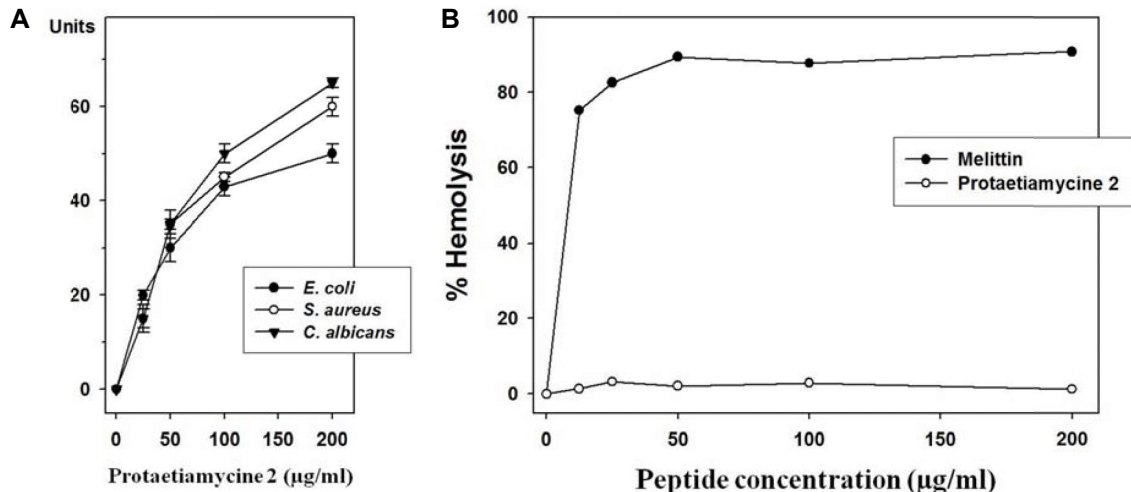


Fig. 1. Antimicrobial and hemolytic activities of protaetiamycine 2 against microorganisms and rat erythrocytes determined through radial diffusion assay and hemolysis assay. (A) Protaetiamycine 2 concentration (x-axis) was plotted against the diameter of the microbial growth inhibition zone (y-axis) after incubation for 12 hr, and is expressed in units (1 mm = 10 units). Data shown are means  $\pm$  standard deviations (SD) of triplicate experiments. (B) Melittin was used as a control. Percentage hemolysis was calculated follows: % Hemolysis =  $(A_{540}$  of sample -  $A_{540}$  of peptide-free control) / ( $A_{540}$  of 100% control -  $A_{540}$  of peptide-free control)  $\times$  100.

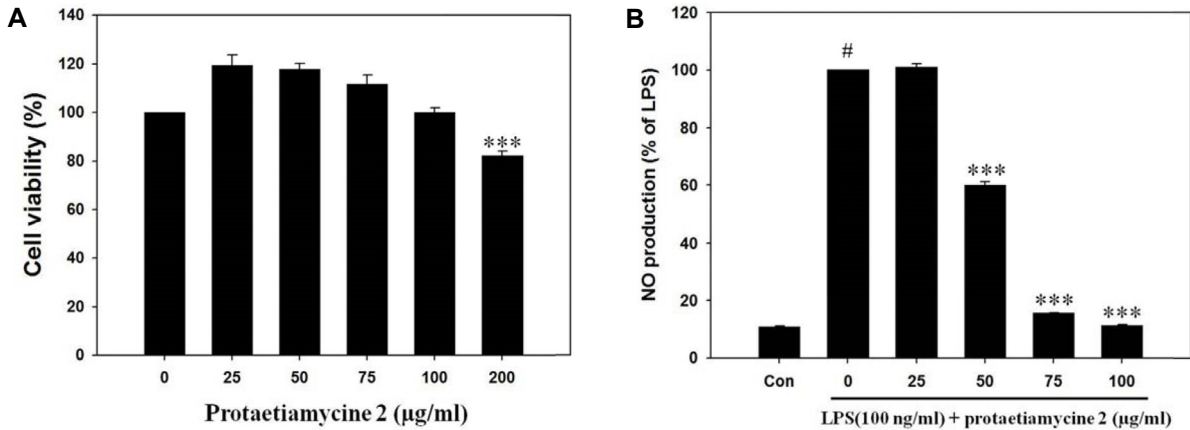


Fig. 2. Cell viability and inhibition of NO production in Raw264.7 cells after protaetiamycine 2 treatment. (A) Cell viability was measured through the MTS assay after 24 hr incubation with the indicated concentrations of the peptides. (B) Cells were pretreated with protaetiamycine 2 for 1 hr prior to incubation with LPS for 24 hr. The NO in the culture media was measured with the Griess reagent. Data shown are means  $\pm$  SD of triplicate experiments. Statistical analyses were performed as described. # $p$ <0.05 in comparison with control group. \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05, compared to the LPS-treated group. Con, control; LPS, lipopolysaccharide.

염증반응에서 패혈증(sepsis)과 패혈성 쇼크(septic shock)와 관련해서 중요한 역할을 한다. 따라서 실험을 통해 LPS에 의해 유도된 Raw264.7 세포의 염증반응에서 분비하는 NO의 생성 정도에 대한 프로테티아마이신 2의 효과를 확인하였다. 그 결과 최저농도인 25 µg/ml에서는 NO의 생성을 억제하지 못하였지만 50 µg/ml 부터는 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 NO의 생성이 억제되었다(Fig. 2B). 앞서 다양한 펩타이드들을 기반으로 염증반응 억제를 위한 펩타이드의 작용기작에 관한 *in vitro* 및 *in vivo* 연구들이 보고되어왔는데 패혈증 치료제로서 사용 가능한 펩타이드기반 약제는 없는 실정이므로 [2] 부작용이 없으면서 효과적인 항패혈증 의약품 개발이

절실히 요구되고 있는 상황이다.

**프로테티아마이신 2가 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향**

앞서 살펴본 프로테티아마이신 2의 NO 생성억제효과뿐만 아니라 염증반응에서 신호전달과정 중 중요한 매개인자인 iNOS와 COX-2의 발현에 프로테티아마이신 2가 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2 모두 LPS에 의해 유도발현되지만 프로테티아마이신 2 처리에 따라 농도의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

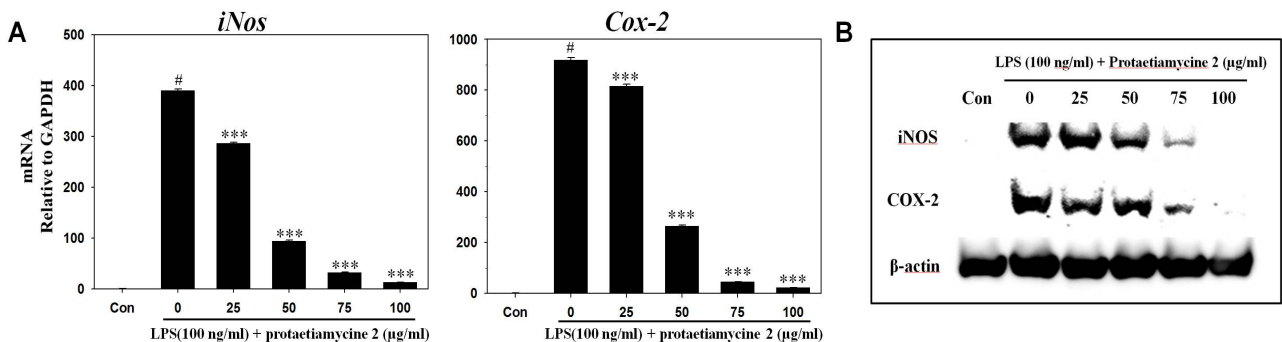


Fig. 3. Inhibitory effects of protaetiamycine 2 on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced Raw264.7 cells. (A) Raw264.7 cells were pretreated with protaetiamycine 2 for 1 hr prior to incubation with LPS. RNA was isolated 12 hr after LPS treatment. The levels of iNOS and COX-2 mRNA were determined by qRT-PCR. The data were normalized to *Gapdh* mRNA levels. (B) Raw264.7 cells were pretreated with protaetiamycine 2 for 1 hr prior to incubation with LPS. Protein was isolated 24 hr after LPS treatment. The protein expression levels of iNOS and COX-2 were determined through Western blot analysis. The data were normalized to β-actin protein levels. Data shown are means  $\pm$  SD of triplicate experiments and are representative of three independent experiments. # $p$ <0.05 in comparison with control group. \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 in comparison with LPS group. Con, control; LPS, lipopolysaccharide.

**프로테티아마이신 2가 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향**

LPS에 의해 유도되는 염증반응은 일련의 신호전달과정을 통해 NO 뿐만 아니라 다양한 염증성 사이토카인들이 유도발현되어 분비되는데, 이러한 인자들이 과도하게 분비되는 경우 조직손상(tissue injury)을 일으키는 등 부작용을 초래하기 때문에 적절하게 조절되어야 한다[7]. 이러한 관점에서 프로테티아마이신 2가 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 저해 할 수 있는지 qRT-PCR과 ELISA 실험을 통해 확인하였다. 먼저 LPS에 의해 유도된 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 에 대한 유전자발현에 프로테티아마이신 2가 미치는 영향을 조사하였다. 조사결과 TNF- $\alpha$ 의 경우는 최고농도인 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 발현이 저해되었고 IL-6와 IL-1 $\beta$ 는 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 농도의존적으로 저해효과를 나타내었다(Fig. 4A). 또한 프로테티아마이신 2의 전염증성 사이토카인의 저해효과가 단백질 수준에서도 나타나는지 ELISA를 통해 확인하였다. 그 결과 IL-6는 유전자발현 결과와 유사하게 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 농도의존적으로 저해효과를 나타

낸 반면(Fig. 4B) TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 현저한 저해효과를 나타내지는 않았다.

**프로테티아마이신 2와 LPS의 상호작용 확인**

LPS에 의해 유도되는 염증반응은 Raw264.7 세포의 세포막에 존재하는 Toll-like receptor 4 (TLR4)에 의해서 인식되어 개시되는데[21], 예를 들면 대장균의 경우 LPS가 주요한 세포막성분으로 외막(outer membrane)을 둘러싸 구성하고 있으며 이는 또한 내독소(endotoxin)로도 잘 알려져 있다. 내독소인 LPS는 염증반응을 유도할 뿐만 아니라 패혈증(sepsis)을 일으키기도 한다. 이러한 관점에서 프로테티아마이신 2가 LPS와 상호작용을 통해 내독소를 중화(neutralization)시킴으로써 염증반응을 제어할 수 있는지 실험을 수행하여 확인하였다. 프로테티아마이신 2와 LPS의 결합유무는 radial diffusion assay를 통해 조사하였다. 먼저 LPS의 농도를 증가시킴에 따라 프로테티아마이신 2의 항균활성이 저해되는지 확인한 결과 LPS가 없는 경우는 강한 항균활성으로 clear zone이 잘 형성된 반면 LPS의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 프로

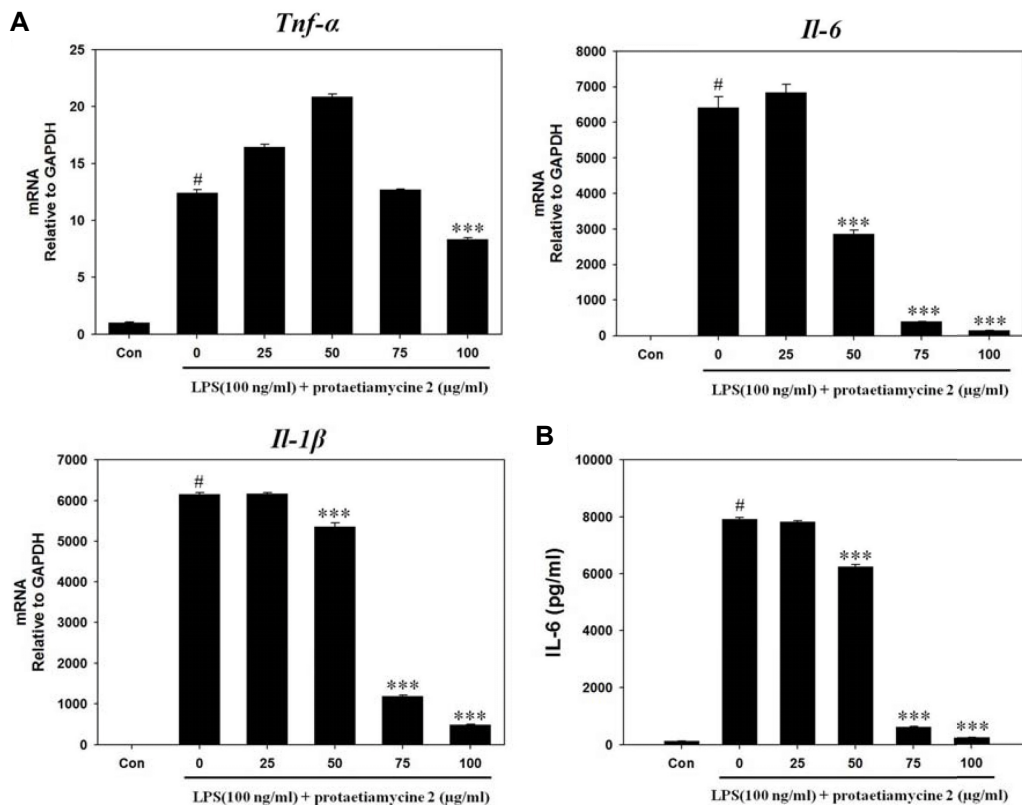


Fig. 4. Inhibitory effects of protaetiamycin 2 on the production of proinflammatory cytokines in LPS-induced Raw264.7 cells. (A) Raw264.7 cells were pretreated with protaetiamycin 2 for 1 hr prior to incubation with LPS. RNA was isolated at 12 hr after LPS treatment. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  mRNA were determined through quantitative real-time PCR. The data were normalized to *Gapdh* mRNA level. (B) Raw264.7 cells were pretreated with protaetiamycin 2 for 1 hr prior to incubation with LPS for 24 hr. IL-6 levels in the culture media were measured through ELISA. Data shown are means  $\pm$  SD of triplicate experiments. <sup>#</sup> $p < 0.05$  in comparison with control group. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*</sup> $p < 0.05$  in comparison with LPS group. Con, control; LPS, lipopolysaccharide.

테티아마이신 2의 항균활성이 감소되어 사라지는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 이는 LPS와 프로테티아마이신 2의 상호작용으로 인해 대장균의 외막에 존재하는 LPS와 결합하지 못해 항균 활성이 저해되는 것을 나타낸다. 이 결과는 프로테티아마이신 2가 LPS와 결합한다는 것을 보여주는 것으로 LPS로 인한 패혈증이나 패혈성 쇼크에 항균 펩타이드가 치료제로서의 가능성을 제시하고 있다. 최근 패혈성 쇼크를 예방하기 위한 접근 방법으로 LPS를 중화시키는 것이 대두되고 있는데 항균 펩타이드가 LPS와 상호작용을 통해 결합한다는 것이 매우 잘 알려져 있다[23]. 예를 들면 항균 펩타이드들 중 폴리믹신B (polymyxin B)와 LPS와의 상호작용 및 작용기작에 대한 많은 연구가 보고되어오고 있다[1]. 하지만 폴리믹신B의 내독소 중화를

통한 패혈성 쇼크의 예방 및 치료는 심각한 부작용으로 인해 사용이 제한적이어서 부작용이 적거나 없는 항균 펩타이드로 내독소를 중화시킬 수 있는 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

**프로테티아마이신 2가 Raw264.7 세포에서 MAPKs 인산화에 미치는 영향**

LPS에 의해서 개시되는 TLR4 신호전달경로(signaling pathway)는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 포함해서 여러 신호전달경로들을 활성화시킨다[18]. 특히 NF- $\kappa$ B는 급성 및 만성 염증성 반응에서 매우 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다[4]. MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 활성화는 일련의 인산화 과

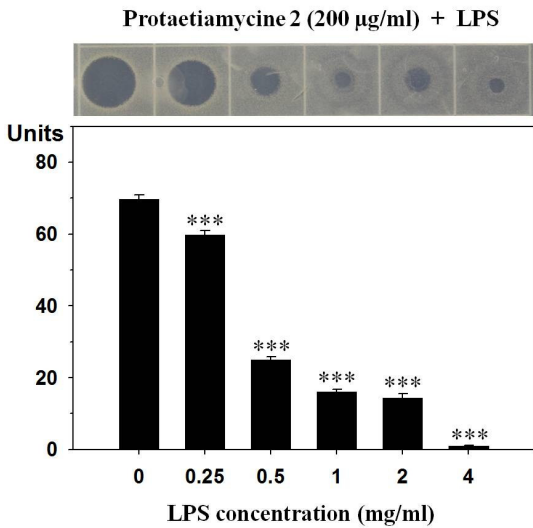


Fig. 5. Specific binding of protaetiamycine 2 to lipopolysaccharide. The radial diffusion assay was conducted by mixing varying amounts of LPS with 200 µg/ml of protaetiamycine 2. The mixtures of peptide with LPS were loaded into wells of the assay plate seeded with *E. coli*, which has been confirmed to be highly susceptible to protaetiamycine 2. The upper panel shows a photo of the gel from the radial diffusion assay. Numbers (x-axis) represent the LPS concentration (mg/ml) of the mixture loaded in the wells. Five µl of 200 µg/ml protaetiamycine 2 was used for LPS-free control. The lower panel shows the antibacterial activity of protaetiamycine 2 in the mixture plotted against the concentration of LPS. The diameters of the clearing zone are expressed in units (1 mm = 10 units). Data shown are means ± SD of triplicate experiments and are representative of three independent experiments. Statistical analyses were performed as described. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , compared to the LPS non-treated control. LPS, lipopolysaccharide.

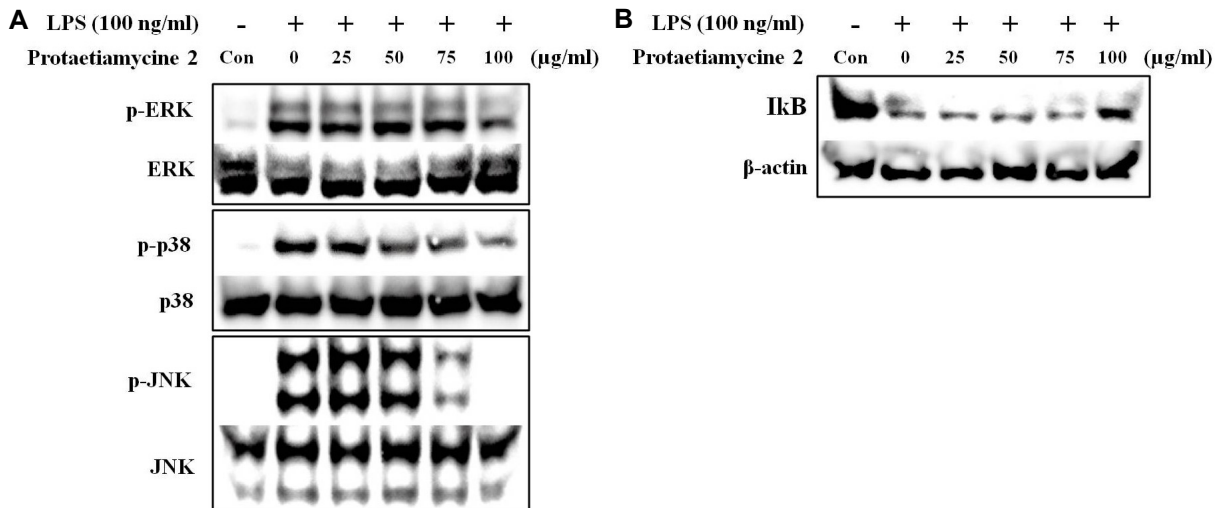


Fig. 6. Inhibitory effect of protaetiamycine 2 on MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathways in Raw264.7 cells. (A) Raw264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well in a 6-well plate) were incubated with the indicated concentration of protaetiamycine 2 (µg/ml). Protein was then isolated at 30 min after LPS treatment, and phosphorylation of ERK, p38, and JNK was detected using Western blot analysis. The data were normalized to total protein, respectively. (B) Degradation of I $\kappa$ B was detected using Western blot analysis. The data were normalized to  $\beta$ -actin. Con, control; LPS, lipopolysaccharide.

정을 거쳐 최종적으로 전사인자(transcription factor)들이 핵 안으로 들어가 전염증성 사이토카인, 케모카인(chemokine) 및 iNOS와 같은 매개인자들을 포함해서 많은 유전자들의 전사를 조절한다. 그러므로 프로테티아마이신 2가 이들 신호전달과정에 어떠한 영향을 미치는지 Western blotting을 통해 확인하였다. 그 결과 MAPKs의 ERK, p38, JNK의 인산화는 LPS에 의해 유도 발견되지만 프로테티아마이신 2의 농도가 증가함에 따라 인산화 정도가 농도의존적으로 감소하는 결과를 보였다(Fig. 6A). NF- $\kappa$ B의 경우는 NF- $\kappa$ B의 활성을 조절하는 I $\kappa$ B의 분해 정도를 관찰함으로써 NF- $\kappa$ B의 상대적 활성을 확인한 결과 LPS에 의한 I $\kappa$ B의 분해가 최대인 것에 비해 프로테티아마이신 2의 최고농도인 100  $\mu$ g/ml에서는 I $\kappa$ B의 분해가 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B). 이들 결과는 항균 펩타이드인 프로테티아마이신 2가 감쇠조절인자(attenuator)로서 신호전달경로의 활성화 정도를 조절하여 과도한 면역반응을 억제 할 수 있음을 나타내었다.

## 감사의 글

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01338401)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Bhor, V. M., Thomas, C. J., Surolia, N. and Surolia, A. 2005. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol. Biosyst.* **1**, 213-222.
- Brandenburg, K., Andra, J., Garidel, P. and Gutschmann, T. 2011. Peptide-based treatment of sepsis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 799-808.
- Chung, M. 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.
- Gasparini, C. and Feldmann, M. 2012. NF- $\kappa$ B as a target for modulating inflammatory responses. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 5735-5745.
- Hwang, J. S., Kang, B. R., Kim, S. R., Yun, E. Y., Park, K. H., Jeon, J. P., Suh, H. J., Nam, S. H. and Kim, I. 2008. Molecular characterization of a defensin-like peptide from larvae of a beetle, *Protaetia brevitarsis*. *Int. J. Indust. Entomol.* **17**, 131-135.
- Hwang, J. S., Lee, J., Kim, Y. J., Bang, H. S., Yun, E. Y., Kim, S. R., Suh, H. J., Kang, B. R., Nam, S. H., Jeon, J. P., Kim, I. and Lee, D. G. 2009. Isolation and characterization of a defensin-like Peptide (coprisin) from the dung beetle, *Copris tripartitus*. *Int. J. Pept.* **2009**, 2009.
- Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H. and Matsushima, K. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today* **5**, 123-132.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N. and Straus, S. K. 2018. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules* **8**, 4.
- Kwon, E. Y., Yoo, J., Yoon, Y. I., Hwang, J. S., Goo, T. W., Kim, M. A., Choi, Y. C. and Yun, E. Y. 2013. Pre-treatment of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) as an ingredient for novel foods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 397-402.
- Lee, E., Kim, J. K., Shin, S., Jeong, K. W., Lee, J., Lee, D. G., Hwang, J. S. and Kim, Y. 2011. Enantiomeric 9-mer peptide analogs of protaetiamycine with bacterial cell selectivities and anti-inflammatory activities. *J. Pept. Sci.* **17**, 675-682.
- Lee, J., Bang, K., Hwang, S. and Cho, S. 2016. cDNA cloning and molecular characterization of a defensin-like antimicrobial peptide from larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *Mol. Biol. Rep.* **43**, 371-379.
- Lee, J., Hong, H. J., Kim, J. K., Hwang, J. S., Kim, Y. and Lee, D. G. 2009. A novel antifungal analog peptide derived from protaetiamycine. *Mol. Cells* **28**, 473-477.
- Lee, J. and Lee, D. G. 2015. Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: membrane disruption and Apoptosis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 759-764.
- Lee, J., Lee, W., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M. 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.
- Lee, S. Y., Moon, H. J., Kurata, S., Kurama, T., Natori, S. and Lee, B. L. 1994. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J. Biochem.* **115**, 82-86.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. 1991. Designer assays for antimicrobial peptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. and Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* **120**, 227-237.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145-151.
- Malmsten, M. 2016. Interactions of antimicrobial peptides with bacterial membranes and membrane components. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 16-24.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. and Moss, M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546-1554.
- Qin, H., Wilson, C. A., Lee, S. J., Zhao, X. and Benveniste, E. N. 2005. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- $\kappa$ B and STAT-1 $\alpha$  in macrophage and microglia. *Blood* **106**, 3114-3122.
- Ronco, C. 2014. Lipopolysaccharide (LPS) from the cellular wall of Gram-negative bacteria, also known as endotoxin, is a key molecule in the pathogenesis of sepsis and septic shock. Preface. *Blood Purif.* **37 Suppl 1**, 1.
- Rosenfeld, Y. and Shai, Y. 2006. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 1513-1522.



24. Shin, S., Kim, J. K., Lee, J. Y., Jung, K. W., Hwang, J. S., Lee, J., Lee, D. G., Kim, I., Shin, S. Y. and Kim, Y. 2009. Design of potent 9-mer antimicrobial peptide analogs of protaetiamycine and investigation of mechanism of antimicrobial action. *J. Pept. Sci.* **15**, 559-568.
25. Yoon, H. S., Lee, C. S., Lee, S. Y., Choi, C. S., Lee, I. H., Yeo, S. M. and Kim, H. R. 2003. Purification and cDNA cloning of inducible antibacterial peptides from *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **52**, 92-103.
26. Zhang, L. J. and Gallo, R. L. 2016. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **26**, R14-R19.

---

### 초록 : 흰점박이꽃무지 유래 항균 펩타이드 프로테티아마이신 2의 항염증활성

이준하 · 백민희 · 이화정 · 김인우 · 김선영 · 서민철 · 김미애 · 김성현 · 황재삼\*  
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과 곤충소재연구실)

흰점박이꽃무지는 약용으로서 매우 유용하고 중요한 곤충종이다. 선행연구를 통해 전사체 분석결과를 바탕으로 인실리코(*in silico*) 분석을 실시하여 전사체유래 항균 펩타이드를 스크리닝하고 선발하여 항균활성 및 용혈활성을 확인하였다. 그 결과 선발된 항균 펩타이드들은 박테리아와 칸디다 진균에 강한 항균활성을 나타낸 반면 적혈구에 대한 용혈활성은 전혀 없었다. 선발한 펩타이드들 중 프로테티아마이신 2로 명명한 양이온 항균 펩타이드를 이용하여 항균활성뿐만 아니라 마우스의 대식세포 Raw264.7 세포주를 이용하여 프로테티아마이신 2의 항염증활성을 확인하였다. 그 결과 프로테티아마이신 2는 LPS로 유도된 Raw264.7 세포들의 산화질소 생성을 감소시키는 결과를 보여주었다. 또한 프로테티아마이신 2가 산화질소 합성효소(iNOS), 고리형 산소화 효소-2(COX-2)의 발현을 감소시킨다는 것을 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR) 방법과 웨스턴 블랏(western blot)을 통해 확인하였다. 더욱이 Raw264.7 세포에서 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )의 발현이 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호전달과정을 통해 약화되어짐을 알 수 있었다. 게다가 프로테티아마이신 2가 LPS와 상호작용을 통해 결합한다는 것을 확인하였다. 종합하여 보면 프로테티아마이신 2는 항균활성과 함께 LPS로 유도된 Raw264.7 세포에서 항염증활성도 가지고 있음을 나타내었다.