

Inhibitory Effect of Protactiamycine 6 on Neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 Microglia

Hwa Jeong Lee[†], Minchul Seo[†], Minhee Baek, Yong Pyo Shin, Joon Ha Lee, In-Woo 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 11, 2020 / Revised November 2, 2020 / Accepted November 5, 2020

Protactia brevitarsis seulensis is an insect belonging to the order Coleoptera. This insect is reported to contain large amounts of physiologically active substances useful for liver protective effect and improvements in blood circulation as well as a broad source of edible protein. Antimicrobial peptides (AMPs) are found in a variety of species, from microorganisms to mammals, and play an important role in the innate immune systems of living things. Microglia are the main source of proinflammatory cytokines and nitric oxide (NO) in the central nervous system. Activated microglia secrete large amounts of neuroinflammatory mediators (e.g., TNF- α , NO, and ROS), which are the main cause of neuronal cell death. In the present study, we investigated the inhibitory effect of Protactiamycine 6 (PKARKLQKLSAYKTTLRN-NH²), an AMP derived from *Protactia brevitarsis seulensis*, on LPS-induced neuroinflammation in BV-2 microglia. Protactiamycine 6 significantly inhibited NO production without cytotoxicity and decreased the expression levels of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2. In addition, Protactiamycine 6 also reduced the production of neuroinflammatory cytokines on activated BV-2 microglia. These results suggest that Protactiamycine 6 could be a good source of functional substance to prevent neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

Key words : Antimicrobial peptide, inflammatory cytokine, microglia, neuroinflammation, *Protactia brevitarsis seulensis*

서 론

현대의학기술과 과학의 발달로 인해 생활이 고차원화되고 인간의 평균수명이 증가하면서 노령화 현상이 나타나고 있으며 이러한 현대 사회에서 인지능력과 기억력은 청소년에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이 되고 있다. 특히 기억력의 저하는 치매와 같은 퇴행성 질환으로 발달되어 현대 사회 활동에 문제를 일으킬 수 있기 때문에 이에 대한 연구의 중요성은 날로 증대 되고 있다.

미세아교세포(microglia)는 뇌의 중추신경계에 존재하는 대식세포로 다양한 자극에 반응하는 항원지시세포로 알려져 있으며 다양한 자극에 의해 뇌에서 염증반응을 유발시키는 주요 세포로서 뇌 손상 시 과도하게 활성화 되어 tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO) 및 reactive oxygen

species (ROS) 등의 염증매개물질들을 다량 분비하게 되는데 이러한 염증매개물질들은 신경세포사멸의 주원인으로 작용하게 된다[13, 9]. 미세아교세포의 과도한 활성화는 TNF- α , NO, 및 interleukin-6 (IL-6)의 발현을 증가시켜 뇌신경세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있어 미세아교세포의 활성억제를 위한 소재개발 연구가 다양하게 진행되고 있다[22, 27].

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 내독소(endotoxin)로 미세아교세포를 활성화시켜 염증관련 연구에 사용되는 것으로 알려져 있다[6]. LPS의 자극에 의해 활성화된 미세아교세포는 염증매개물질 및 활성산소종 ROS의 분비를 촉진하여 신경독성을 유발하는데[3, 4], 그중 NO는 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할을 한다[19]. 생체 내 과량의 NO 생성은 오히려 세포를 파괴하고 신체에 유해한 영향을 미치게 될 뿐만 아니라 염증반응을 비롯한 퇴행성 뇌질환에 있어 중요한 원인이 되며[18], cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜[22] prostaglandin (PG) 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 악화시키는 것으로 보고되어 있다[21].

항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 주로 미생물이나 사람, 토끼, 쥐 등의 식세포인 백혈구에서 발견되었으며 생명체의 선천성 면역체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[26]. AMPs는 미생물 종류에 상관없이 몇 시간

[†]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.

내에 작용하고 광범위하게 항균활성을 나타내며 면역, 거부 반응, 내성 등의 문제없이 자연적으로 생성된 천연항생제로 알려져 있다. 따라서 최근 항생제 남용으로 인해 발생하는 항생제 저항성 문제를 해결하기 위해 중요한 항생물질로 각광받고 있으며 피부질환 치료제, 항암제, 항바이러스제, 방부제 등 다양한 분야에서 개발될 수 있는 가능성을 가지고 있다.

곤충은 지구상에 약 130만 종이 서식하는 것으로 알려져 있고 동의보감,本草綱目을 통해 다양한 효능이 보고되어 있지만 아직 곤충을 이용한 소재 개발은 미비한 실정이다. 또한 곤충은 미래식량으로 각광받고 있으며 현재 국내에서 7종의 식용곤충이 일반식품으로 식품공전에 등록되어 있다[2]. 그 중 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 딱정벌레목(Coleoptera)에 속하는 크기 17~24 mm의 곤충으로 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 및 시베리아 동부 지역에 서식하고 있으며[19, 30], 최근에는 영양성분 분석뿐만 아니라 다양한 연구를 통하여 간 보호효과 및 인돌알칼로이드와 같은 혈행개선 물질이 함유되어 있음을 보고한 바 있다[7, 8, 20]. 과도하게 활성화된 미세아교세포의 염증반응에 의해 증가되는 과량의 NO를 효과적으로 억제할 수 있는 억제제의 개발은 다양한 염증성 질환치료에 유용한 치료방법으로 여겨지고 있으므로 [14, 16], 본 연구에서는 흰점박이꽃무지로부터 선발된 항균 펩타이드 Protaetiamycine 6이 LPS로 유도된 미세아교세포의 신경염증반응에 미치는 영향 및 조절기전을 조사하였다.

재료 및 방법

실험곤충

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 국립농업과학원의 곤충사육동에서 사육된 것을 사용 하였고 먹이원은 발효톱밥을 사용 하였으며 28℃, 70%의 상대습도 조건으로 16L : 8D의 광주기로 사육 하였다.

펩타이드

Protaetiamycine 6는 애니젠(주)에서 고상법을 이용하여 합성하였고, 순도 95% 이상의 펩타이드를 사용하였다. 합성한 펩타이드는 -20℃에서 보관하다가 산성화시킨 증류수(0.01% 아세트산용액)에 녹여서 사용하였다.

세포 배양

Mouse 유래 microglia cell 미세아교세포(BV-2)는 AcceGen (NJ, USA)에서 구입하였으며 5% fetal bovine serum (FBS)와 50 µg/ml gentamicin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양 하였다.

MTS assay

BV-2 세포에 대한 Protaetiamycine 6의 세포독성을 확인하기 위하여 96-well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 약 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 Protaetiamycine 6을 5, 10, 20, 40, 80 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 측정 하였다.

Nitric oxide (NO) assay

BV-2 세포에 LPS를 처리하여 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 Protaetiamycine 6을 5, 10, 20, 50, 80 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 뒤 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 Protaetiamycine 6을 10, 20, 40, 80 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)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 ABI 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 확인하였다.

Western blot analysis

BV-2 세포는 4×10⁵ cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 Protaetiamycine 6을 10, 20, 40, 80 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 M-PERTM 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

Table 1. Sequences of primers 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' - AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	NM_031168
Tnf-α	Forward, 5' - ATGAGAAGTTCCCAAATGGC-3' Reverse, 5' - CTCCACTTGGTGGTGGTTTGCTA-3'	NM_013693
Il-1β	Forward, 5' - CCTTCCAGGATGAGGACATGA-3' Reverse, 5' - TGAGTCACAGAGGATGGGCTC -3'	NM_008361
Gapdh	Forward, 5' - AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3' Reverse, 5' - CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'	NM_008084

Pierce™ BCA protein assay kit (Rockford, IL, USA)로 정량하였으며, 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-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 수세하였다. 그 후 항체에 대한 대응 단백질 band를 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 FluorChem (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 이미징 분석장비로 확인하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (IL-6, TNF-α)

BV-2 세포는 4×10⁵ cells/well로 6-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 Protactiamycine 6을 10, 20, 40, 80 µg/ml의 농도로 1시간 전처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 회수하여 배양액에 유리된 IL-6와 TNF-α 를 ELISA kit (ThermoFisher, 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

BV-2세포에 대한 Protactiamycine 6의 세포독성 확인

Protactiamycine 6의 신경염증 억제 효능을 알아보기 위해

우선 BV-2 미세아교세포에서 세포독성을 MTS assay 방법으로 수행하였다(Fig. 1). 96-well plate에 2×10⁴ cells/well의 세포를 약 24시간 배양한 후 Protactiamycine 6을 5, 10, 20, 50, 80 µg/ml의 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 처리한 Protactiamycine 6의 최고 농도인 80 µg/ml까지 독성을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다. 따라서 이후 신경염증 억제 효능 실험에서는 세포독성을 나타내지 않는 80 µg/ml 이하의 농도로 사용하였다.

Protactiamycine 6이 NO 생성에 미치는 영향 확인

활성산소종의 일종인 NO는 LPS나 interferon-gamma (IFN-γ), β-amyloid 등으로 인해 생성되며 불안정하고 산화력이 높아 생체 물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 생성되면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으킨다[12]. 이러

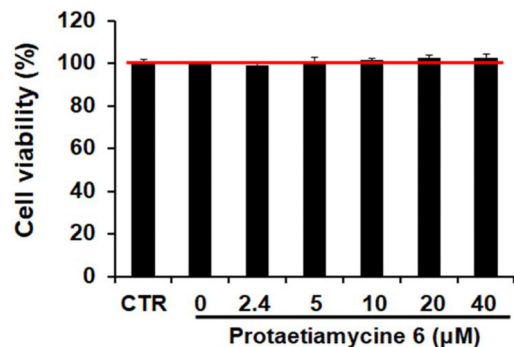


Fig. 1. Protactiamycine 6 on the cell viability in BV-2 microglia. BV-2 microglia (2×10⁴ cells/well in a 96-well plate) were incubated with Protactiamycine 6 for 24 hr, and cell viability was assessed using MTS assay. CTR: control (nontreated sample). Protactiamycine 6: antimicrobial peptide derived from the *Protactia brevitarsis seulensis*. Level of significance was identified statistically using Student's test.

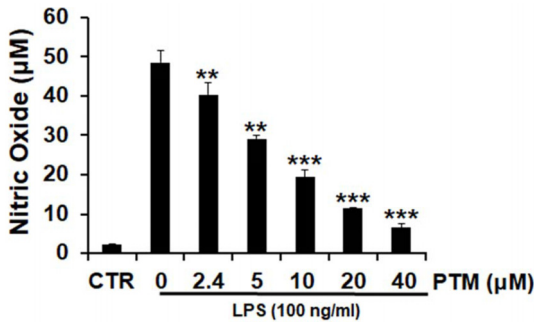


Fig. 2. Inhibitory effect of Protactiamycine 6 extract on the production of nitric oxide in BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^4 cells/well in a 96-well plate) were cultured with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of Protactiamycine 6 for 24 hr to determine the level of NO. CTR: control (non-treated sample). Protactiamycine 6 (PTM): antimicrobial peptide derived from the *Protactia brevitarsis seulensis*. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ in comparison with the LPS group.

한 산화적 스트레스는 세포막 및 DNA 등을 산화시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 산화적 손상을 일으켜 뇌혈관 장애를 촉진하고 암, 알츠하이머성 치매 및 파킨슨 병과 같은 다양한 퇴행성 질환을 유발하게 된다[17, 28]. 따라서 본 연구에서는 Protactiamycine 6의 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 25배 정도 NO 생성량이 증가되었으나, Protactiamycine 6을

농도별(5~80 µg/ml)로 처리한 실험군에서는 Protactiamycine 6의 농도 의존적으로 NO분비량이 유의적으로 감소되었음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 Protactiamycine 6이 LPS에 의해 유도된 BV-2 세포의 염증반응을 감소시킬 수 있는 신경염증반응 억제제로서의 활용 가능성을 보여주는 것으로 생각 된다.

Protactiamycine 6이 iNos 및 Cox-2 유전자 발현에 미치는 영향

iNOS는 NO, COX는 PG의 합성에 관여하는 생합성 경로이며 iNOS와 COX-2 모두 미생물에 의한 감염이나 외부 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다[15, 25]. 또한 외부 자극에 의해 유도된 iNOS는 다량의 NO를 생성하며 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 유발한다[22]. 따라서 미세아교세포의 염증반응상태에서 iNOS 및 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 Protactiamycine 6이 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 유도하였을 때 대조군에 비해 iNos의 경우는 약 4배, Cox-2의 경우는 2배 정도 발현량이 증가하였으며, Protactiamycine 6을 농도별(10~80 µg/ml)로 함께 처리한 경우 항균펩타이드의 처리 농도에 의해 iNos, Cox-2 유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소되었고, 최고 농도에서는 대조군 만큼 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 Protactiamycine 6이 Cox-2, iNos 유전자 발현을 조절함으로써 NO의 생성 및 신경

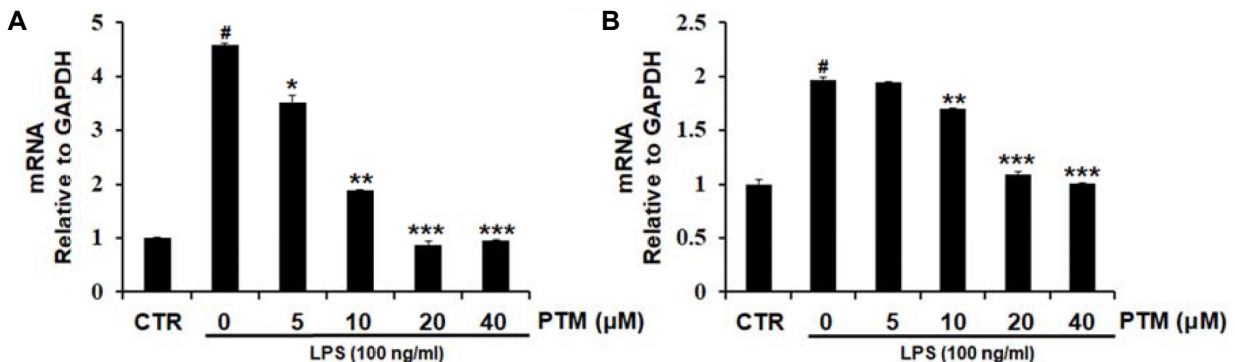


Fig. 3. Inhibitory effect of Protactiamycine 6 on iNos and Cox-2 expression in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated with Protactiamycine 6 for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 5 hr after the LPS treatment. 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). Protactiamycine 6 (PTM): antimicrobial peptide derived from the *Protactia brevitarsis seulensis*. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ in comparison with the LPS group.

염증 억제 활성 가능성을 가지는 것으로 판단된다.

Protaetiamycine 6이 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

이상의 결과에서 우리는 LPS에 의해 과하게 활성화된 BV-2 세포로부터 생성되는 PGE2의 합성효소인 Cox-2 유전자 발현

과 NO의 합성효소인 iNOS의 유전자 발현이 Protaetiamycine 6에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 우리는 과하게 활성화된 BV-2 세포에서 Protaetiamycine 6가 iNOS와 COX-2 단백질 발현 또한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Western blot으로 분석하였다(Fig. 4). 그 결과 iNOS와 COX-2 단백질의 발현은 BV-2 세포에 LPS를 단독으로 처리하여 염증반응을 유

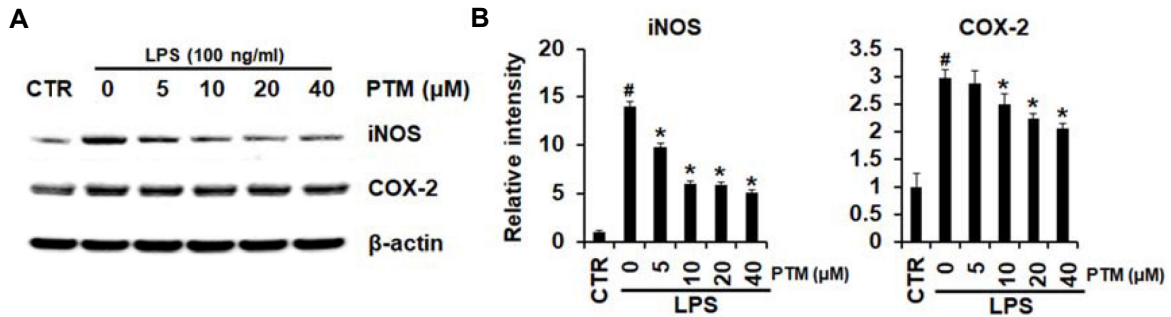


Fig. 4. Inhibitory effect of Protaetiamycine 6 on the protein levels of iNOS and COX-2 in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of Protaetiamycine 6 for 24 hr. (A) 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). Protaetiamycine 6 (PTM): antimicrobial peptide derived from the *Protaetia brevitarsis seulensis*. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ in comparison with the LPS group.

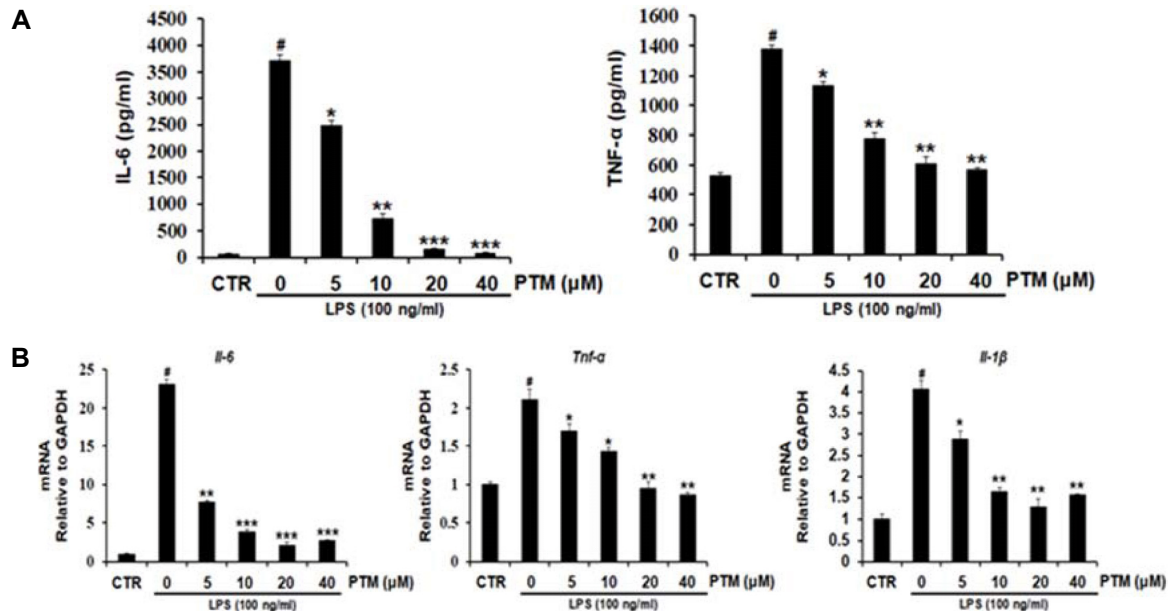


Fig. 5. Inhibitory effect of Protaetiamycine 6 on the production of proinflammatory cytokine in LPS stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglia (4×10^5 cells/well in a 6-well plate) were pretreated for 24 hr, and the cell were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of Protaetiamycine 6 for 24 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 Protaetiamycine 6 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). Protaetiamycine 6 (PTM): antimicrobial peptide derived from the *Protaetia brevitarsis seulensis*. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$, in comparison with control group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ in comparison with the LPS group.

도 하였을 때 대조군에 비해 iNOS의 경우는 약 14배, COX-2의 경우는 3배 정도 발현량이 증가하였으며, Protaetiamycine 6을 농도별(10~80 µg/ml)로 함께 처리한 경우 펩타이드의 처리 농도에 의해 iNOS, COX-2 단백질의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 Protaetiamycine 6은 초기 염증반응 조절인자인 iNos, Cox-2 유전자 및 iNOS, COX-2 단백질 발현을 억제함으로써 신경염증반응이 조절됨을 확인하였고, 나아가 염증 반응을 기반으로 하는 다양한 퇴행성 뇌 질환 치료를 위한 기능성 소재로 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

Protaetiamycine 6이 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향

TNF- α 는 단핵구, 대식세포, 비만세포, 림프구 등을 비롯한 많은 세포에서 생산되어 감염 또는 염증반응에 관여하는 매개 물질 중 하나이며 정상적인 세포 기능을 방해할 수 있다[23]. LPS에 의해 과하게 활성화되면 면역세포로부터 염증성 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 등이 다량 분비 되는데 그 중 TNF- α 가 다량 분비될 경우 염증질환 발달에 매우 중요한 역할을 하며, 암, 비만 등 대사성 질환에서 인슐린 저항성을 유도하고 혈전생성을 촉진하며 lipogenetic 대사를 억제하는 것으로 알려져 있다[1, 5, 24]. 또한 염증성 cytokine 중 IL-6는 B림프구와 T림프구의 분화에 관여하고, 조직손상과 감염을 알리는 신호로 작용하면서 항암효과를 나타낸다[11]. 또한 B림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 IL-6는 염증반응이 일어나면 항상 증가되는 것으로 보고되고 있다[10]. 즉, 면역세포에서 LPS의 자극은 염증성 cytokine 생성을 유발하여 염증반응을 일으킬 수 있기 때문에 본 실험에서는 Protaetiamycine 6이 염증성 cytokine 발현 억제에 미치는 영향을 확인하기 위해 BV-2 세포에 LPS로 1 hr 전처리한 후 염증반응을 유도하여 염증성 cytokine의 발현 변화를 관찰하였다 (Fig. 5).

우선 염증성 cytokine 중 IL-6와 TNF- α 의 단백질 수준에서의 발현 변화를 확인 하기 위해 IL-6와 TNF- α ELISA kit를 이용하였다. 그 결과 LPS에 의해 증가한 IL-6와 TNF- α 의 발현량이 Protaetiamycine 6에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A). 다음으로 염증성 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 유전자 발현 수준에서 Protaetiamycine 6의 효과를 확인하기 위해 real-time PCR를 수행 하였으며(Fig. 5B), 사용한 primer는 Table 1에 나타났다. BV-2 세포에 LPS만 단독으로 처리한 경우 IL-6, TNF- α 그리고 IL-1 β 의 발현량이 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, Protaetiamycine 6에 의해 농도 의존적으로 유전자의 발현이 억제 되는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 항균 펩타이드 Protaetiamycine 6이 염증성 cytokine의 생성을 현저히 억제함으로써 신경염증 억제 효능

을 가지며 결과적으로 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있는 의료용 소재개발에 이용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 포스트게놈다부처유전체연구사업 (세부과제번호: PJ01338401)의 지원에 의해 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Aggarwal, B. B. 2003. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745-756.
2. Baek, M., Seo, M., Kim, M. A., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. The antioxidant activities and hair-growth promotion effects of *Tenebrio molitor* larvae extracts (TMEs). *J. Life Sci.* **27**, 1269-1275.
3. Benveniste, E. N. 1997. Immunology of the nervous system. pp.419-459. Oxford University press, New York.
4. Benveniste, E. N. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 259-275.
5. Beutler, B. and Cerami, A. 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* **27**, 7575-7582.
6. Carme, S., Carme, 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. 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.
8. 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.
9. Cross, A. K. and Woodroffe, M. N. 2001. Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc. Res. Tech.* **54**, 10-17.
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 subpopulations after exposure to substance. *Neuropeptide* **37**, 355-361.
11. Dinarello, D. A., Endres, S., Medani, S. N., Meydani, M. and Marc, K. H. 1991. Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acid. *Ann. NY Acad. Sci.* **1**, 332.
12. Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
13. Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 307-321.

14. Hanada, T. and Yoshimura, A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **3**, 413-421.
15. Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R. P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**, 144-150.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
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 brevitaris 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. 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.
23. Reiko, H., Masshide, A., Katsuko, S., Hirotaka, K., Masatoshi, S., Masugi, N., Michio, N. and Yoichiro, I. 1998. Production of mice deficient in genes for interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α / β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J. Exp. Med.* **187**, 1463-1475.
24. Seo, M., 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 Lumbricisin as a regulator of neuroinflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 1004-1010.
25. 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. Herbol.* **23**, 73-83.
26. Steintraesser, L., Kraneburg, U. M. and Hirsch, T., Kesting, M., Steinau, H. U., Jacobsen, F. and Al-Benna, S. 2009. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 3951-3970.
27. 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.
28. 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.
29. Yun, H. J., Heo, S. K., Lee, Y. T., Park, W. H. and Park, S. D. 2008. Anti-inflammatory effect of Evodia Officinalis DODE in mouse macrophage and human vascular endothelial cells. *Kor. J. Herbol.* **23**, 29-38.
30. Zhang, Z. L. 1984. Economic insect fauna of China. Fasc. **28**, Cloeoptera: Larva of Scarabaeidae, pp.27-28, Science Press, Beijing (in Chinese).

초록 : LPS에 의해 활성화된 미세아교세포에서 흰점박이꽃무지 유래 항균 펩타이드 Protaetiamycine 6의 신경염증 억제 효과

이화정[†] · 서민철[†] · 백민희 · 신용표 · 이준하 · 김인우 · 황재삼 · 김미애*
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

흰점박이꽃무지는 딱정벌레목 풍뎅이과에 속하는 곤충이며, 현재 국내에서는 식용곤충 자원으로써 단백질 공급 원일 뿐만 아니라 간보호 효과와 혈액개선 등에 유용한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다. 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 미생물에서부터 포유동물에 이르기까지 다양한 종에서 발견되며 생명체의 선천성 면역체계에서 중요한 역할을 한다. 또한 AMPs는 광범위하게 항균활성을 나타내며 면역, 거부 반응, 내성 등의 문제없이 자연적으로 생성된 자연항생제로 알려져 있다. 활성화된 미세아교세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO) 및 reactive oxygen species (ROS) 등의 염증매개물질들을 다량 분비하는데 이러한 염증매개물질들은 신경세포사멸의 주원인으로 작용하게 된다. 그러므로 본 연구에서는 미세아교세포를 이용하여 흰점박이꽃무지 유래 항균 펩타이드 Protaetiamycine 6의 신경염증 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, Protaetiamycine 6는 LPS에 의해서 증가한 NO 생성을 현저히 억제하였고, iNOS와 COX-2 발현량을 감소시켰으며 LPS에 의해 분비되는 염증성 cytokine의 생성량도 농도의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과로 보아 Protaetiamycine 6는 신경염증 및 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료 가능성 소재 개발에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.