

## Anti-neuroinflammatory Effect of *Teleogryllus emma* Derived Teleogryllusine in LPS-stimulated BV-2 Microglia

Minchul Seo<sup>†</sup>, Yong Pyo Shin<sup>†</sup>, Hwa Jeong Lee, Minhee Baek, 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 10, 2020 / Revised October 20, 2020 / Accepted October 23, 2020

The suppression of neuroinflammatory responses in microglial cells, well known as the main immune cells in the central nervous system (CNS), are considered a key target for improving the progression of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease. *Teleogryllus emma* is widely consumed around the world for its broad-spectrum therapeutic effect. In a previous work, we performed transcriptome analysis on *T. emma* in order to obtain the diversity and activity of its antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are found in a variety of species, from microorganisms to mammals. They have received much attention as candidates of therapeutic drugs for the treatment of inflammation-associated diseases. In this study, we investigated the anti-neuroinflammatory effect of Teleogryllusine (VKWKRLNNNKVLQKIYFVKI-NH<sub>2</sub>) derived from *T. emma* on lipopolysaccharide (LPS) induced BV-2 microglia cells. Teleogryllusine significantly inhibited nitric oxide (NO) production without cytotoxicity, and reducing pro-inflammatory enzymes expression such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). In addition, Teleogryllusine also inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) through down-regulation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. These results suggest that *T. emma*-derived Teleogryllusine could be a good source of functional substances that prevent neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

**Key words** : Antimicrobial peptide, inflammatory cytokine, microglia, neuroinflammation, nitric oxide, *Teleogryllus emma*

### 서 론

염증반응은 외부 자극에 대한 생체의 정상적 방어기작으로서, 특히 중추신경계(central nerve system, CNS) 내의 염증은 뇌에 상주하는 미세아교세포(microglia) 또는 말초로부터 면역세포가 침투하여 일어나는데 중추신경계에서의 염증반응은 대표적으로 미세아교세포에 의해 이루어진다[27, 28]. 미세아교세포는 일반적으로 중추신경계에서 대식세포의 역할을 대신하며 외부의 다양한 스트레스로부터 신경세포 보호 및 중추신경계의 항상성을 유지하는 역할을 한다[9, 29].

그러나 뉴런의 손상, 외부 요인에 의해 변형된 비정상적인 단백질의 축적, 병원체의 침투 등에 의해 미세아교세포가 과

도하게 활성화 되거나 오랜 기간 지속될 경우 진행성 염증 반응을 일으켜 nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 및 reactive oxygen species (ROS)와 같은 염증성 매개인자를 분비함으로써 신경 독성을 유발하고 신경세포의 손상 및 뇌 조직을 파괴하여 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, ischemic injury, multiple sclerosis 등과 같은 신경퇴행성 질환들을 일으킬 수 있다[1, 4, 10, 12, 18]. 따라서 미세아교세포의 활성 억제는 신경염증 조절뿐만 아니라 신경퇴행성 질환의 치료에 중요한 표적으로서 인식되고 있다[22, 31, 35].

항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 미생물, 식물, 곤충, 동물 등 모든 생명체에서 발견되며, 체액과 체표면에 존재하며 선천성 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하는 생체 방어 물질이다[11, 36]. 항균 펩타이드는 2차 구조의 형태에 따라 여러 유형으로 나누어지는데,  $\beta$ -sheet 구조를 갖는 펩타이드는 이황화 결합을 통해 구조를 안정화 시키고 세포막 통과에 유리하며,  $\alpha$ -helix 구조를 갖는 펩타이드는 시스테인 잔기를 가지고 있어 분자 내 이황화 브릿지를 형성한다[8, 15, 39].

특히 곤충들이 만들어내는 항균 펩타이드와 단백질에 대한

<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.

연구는 박테리아에 의해 면역화된 나방의 번데기에서 처음 관찰되었으며[2, 33], 세크로핀으로 알려진 곤충 유래 항균 펩타이드가 정제된 이후 다양한 곤충으로부터 150 종류 이상의 항균 펩타이드가 발견되었다[7]. 최근 본 연구팀에서는 곤충의 전사체 분석을 통하여 다양한 곤충으로부터 항균활성뿐만 아니라 항염증 효능을 나타내는 다양한 종류의 항균 펩타이드를 선별 하였으며 그 작용기전을 보고한 바 있다[19, 21, 23, 24]. 이러한 연구 결과는 곤충 유래의 항균 펩타이드가 항균뿐만 아니라 항염증 치료제로서의 개발 가능성이 있음을 보여주고 있다. 따라서 본 연구에서는 왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*)의 전사체 분석을 기반으로 선별된 Teleogryllusine 펩타이드가 LPS로 유도된 미세아교세포의 신경염증반응에서 염증매개 인자들의 발현 변화와 신호전달에 미치는 영향에 대해서 조사 하였다.

### 재료 및 방법

#### 펩타이드

왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*) 유래 항균 펩타이드 Teleogryllusine은 에니젠(주)에서 고상법을 이용하여 95% 이상의 순도로 합성하였다. 펩타이드는 산성화시킨 증류수(0.01% 아세트산용액)를 이용하여 녹였으며 -20℃에 보관하며 사용하였다.

#### 세포 배양 및 MTS

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% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

#### 세포 생존율 측정

Teleogryllusine이 BV-2 세포의 세포 생존율에 미치는 영향은 Chao 등[3]의 방법에 따라 확인하였다. BV-2 세포에 대한 Teleogryllusine의 세포독성 및 세포증식을 확인하기 위하여

BV-2 세포를 96-well plate (SPL life sciences, Korea)에 2.0×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 5% FBS (Hyclone)가 들어있는 배지에서 배양하였다. 그 후 Teleogryllusine을 10, 20, 40, 80 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 추가 배양 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent (Sigma, MO, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

#### Nitric oxide (NO) 측정

Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 신경염증 반응이 유도된 BV-2 세포에서 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 NO detection kit (Intron, Seongnam, Korea)를 이용하여 측정하였다. 계대 배양된 BV-2 세포는 4×10<sup>4</sup> cells/well로 96-well plate에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 Teleogryllusine을 10, 20, 40, 80 µg/ml 농도로 1시간 전처리 한 뒤 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 24시간 신경염증반응을 유도하였다. 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 농도(µM)는 표준물질인 sodium nitrate (NaNO<sub>2</sub>) 용액의 표준곡선을 기준으로 하여 계산하였다.

#### Real-time RT-PCR

BV-2 세포는 4×10<sup>5</sup> cells/well로 6-well plate (SPL life sciences, Korea)에 분주하여 약 24시간 동안 배양한 후 Teleogryllusine을 10, 20, 40, 80 µg/ml 농도로 1시간 전처리 한 뒤 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 5시간 동안 배양하였다. 배양한 BV-2 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 total RNA를 추출한 후 동량의 RNA (1 µg)로부터 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR에 사용한 각 유전자의 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Sequences of primes used for RT-PCR

cDNAs	Primer sequences	Accession number
<i>Cox-2</i>	Forward, 5'-CAGACAACATAAACTGCGCCTT-3' Reverse, 5'-GATACACCTCTCCACCAATGACC-3'	NM_011198
<i>iNos</i>	Forward, 5'-CAGCACAGGAAATGTTTCAGC-3' Reverse, 5'-TAGCCAGCGTACCGGATGA-3'	NM_010927
<i>Il-6</i>	Forward, 5'-GAGGATAACCACTCCCAACAGACC-3' Reverse, 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	NM_031168
<i>TNF-a</i>	Forward, 5'-ATGAGAAGTTCCCAAATGGC-3' Reverse, 5'-CTCCACTTGGTGGTTTGCTA-3'	NM_013693
<i>Gapdh</i>	Forward, 5'-AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3' Reverse, 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3'	NM_008084

### Western blot analysis

BV-2 세포를  $4 \times 10^5$  cells/well의 농도로 6-well plate (SPL life sciences)에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 Teleogryllusine을 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g/ml}$  농도로 1시간 전처리 한 뒤 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 40분(MAPKs 및 I $\kappa$ B) 또는 24시간 (iNOS 및 COX-2) 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 PBS (Caisson laboratories)로 세척한 뒤 protease와 phosphatase inhibitor cocktail가 함유된 M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent (ThermoFisher, MA, USA)를 사용하여 세포를 lysis 하고 원심분리하여 상등액을 회수하였다. BCA를 이용하여 단백질을 정량한 후, SDS-PAGE gel에서 전기영동을 통해 분자량에 따라 단백질을 분리하고 PVDF membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 각각의 1차 항체를 4°C에서 overnight으로 반응시켰으며, 그 후 각 항체에 대한 2차 항체를 반응시킨 후 ECL kit (Thermo Fisher)를 이용하여 각 단백질 band를 관찰하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며, 그 결과는 평균값과 표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타났다. 실험결과의 통계적 분석은 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 Student's *t*-test를 통해 검정하였고,  $p < 0.05$ 일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### Teleogryllusine의 NO 생성 억제 효과 및 세포 생존율 확인

미세아교세포는 중추신경계에서 대식세포의 역할을 대신 하며 외부의 스트레스로부터 다양한 면역반응 물질들을 생성함으로써 신경계 내의 면역반응을 조절하는 역할을 한다. 이

들 중 nitric oxide (NO)는 신경보호와 뇌 발달에 있어서 매우 중요한 역할을 하며 NOS의 선택적 inhibitor인 L-NAME를 처리하여 NO의 생성을 억제할 경우 NO에 의한 신경보호 효과가 저해되었으며, NO가 증대한 단백질의 s-nitrosylation 과정은 신경세포의 분화 및 성숙을 유도하는 것으로 보고되어 있다[13, 30]. 그러나 과도한 NO의 생성은 산화적 손상이나 뇌혈관장벽(blood-brain-barrier) 붕괴와 같은 다양한 과정을 통해 뇌신경 질환에 연관되어있기 때문에 NO의 생성을 효과적으로 조절하는 것이 신경염증의 치료와 예방을 위한 일반적인 접근방법으로 인식되고 있다[17, 38]. 따라서 본 연구에서는 immortalized 된 mouse microglia 세포인 BV-2를 이용하여 왕귀뚜라미 유래 Teleogryllusine이 LPS에 의해 활성화된 BV-2 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 20배 가량 증가된 NO의 양이 Teleogryllusine을 농도별(10~80  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 실험군에서는 처리농도에 의존적으로 NO 분비량이 효과적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 다음으로 이러한 NO의 감소가 Teleogryllusine 처리에 의한 세포독성에 의한 것인지 확인 하기 위하여 Teleogryllusine을 BV-2 세포에 농도별(10~80  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 후 세포 생존율을 MTS assay 방법을 이용하여 확인 하였다(Fig. 1B). 그 결과 NO 생성억제를 확인한 최고농도인 80  $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 이후 신경염증 억제 효능 실험들에서 Teleogryllusine은 세포독성을 나타내지 않는 최고농도인 80  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도로 사용하였다.

### Teleogryllusine이 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 면역반응에서 NADPH를 이용하여 L-아르기닌으로부터 NO를 생성하는 효소이며, COX-2는 prostaglandins (PG), prostacyclin 및 thromboxanes 등의 합성을 매개하는 효소로 미생물 감염이나 외

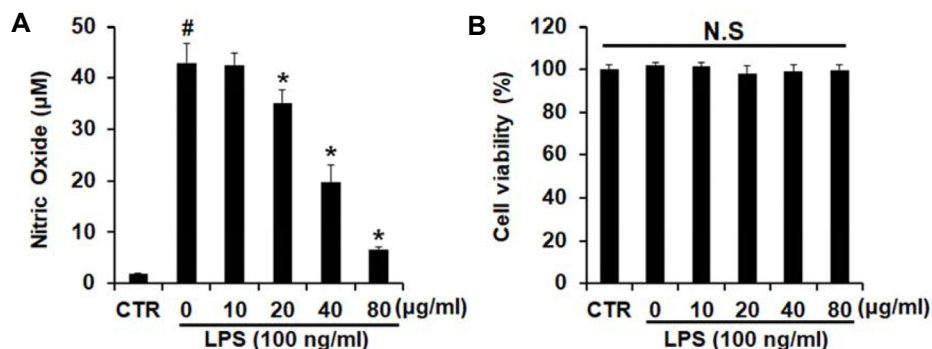


Fig. 1. Inhibitory effects of Teleogryllusine on NO production in LPS-stimulated BV-2 microglia. (A) BV-2 microglial cells were pretreated with Teleogryllusine ( $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hr prior to incubation with lipopolysaccharides (LPS; 100 ng/ml) for 24 hr. The nitrite in the culture media was measured with the Griess reagent. (B) BV-2 microglial cells ( $4 \times 10^4$  cells/well in a 96-well plate) were incubated with Teleogryllusine for 24 hr, and cell viability was assessed using MTS assay. Results are shown as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). <sup>#</sup> $p < 0.05$  in comparison with control group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  in comparison with LPS group. CTR, control; LPS, lipopolysaccharides.

부 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다[14]. 특히 이들 유전자는 중추신경계의 외상과 질병 연관조직에서 과다하게 발현되어 있으며 특히 신경교종 및 파킨슨 병의 흑질 내 glia 세포에서 발현이 동시에 증가된다[16, 20, 37]. 또한 이들은 LPS를 처리한 마우스 뇌의 microglia에서 동시에 과발현된다는 보고가 있어서 LPS를 자극원으로 microglia를 활성화시켜 염증반응 및 신경독성 연구에 다양하게 이용될 수 있음을 의미한다[27, 34]. 따라서 본 연구에서는 LPS로 유도된 BV-2 세포에 Teleogryllusine 처리에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 변화를 유전자 및 단백질 수준에서 확인 하였다(Fig. 2). Quantitative RT-PCR 을 이용하여 iNos와 Cox-2 유전자 발현 변화를 확인한 결과 LPS를 단독처리 하여 염증반응을 유도한 경우 대조군에 비해 iNos와 Cox-2 유전자 발현은 각각 15배와 4배 정도 증가하였으나 Teleogryllusine을 함께 처리한 경우 이들의 발현이 현저히 감소됨을 확인 할 수 있었다. 또한 western blot를 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 확인한 결과도 유전자 발현 변화와 유사한 경향으로 Teleogryllusine 처리농도에 의존적으로 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Teleogryllusine이 LPS에 의해 유도되는 BV-2 세포의 iNOS와 COX-2의 발현을 억제 시킴으로써 NO의 생성

및 신경염증 억제 활성 가능성을 가지는 것으로 판단된다.

**Teleogryllusine이 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향**

BV-2 세포는 LPS로부터 유도되는 염증반응에서 다양한 염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 등)을 분비하는 일련의 과정이 이루어진다[5, 6]. 따라서 이러한 염증 매개 인자들의 분비를 조절하는 것은 외부자극에 대한 조직의 손상을 최소화 할 수 있는 방법이다. 따라서 본 연구에서는 Teleogryllusine이 LPS 자극에 의해 증가된 염증성 cytokine의 발현을 억제할 수 있는지 real-time PCR을 이용하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 유전자 발현을 확인하였다(Fig. 3). BV-2 세포에 LPS를 단독으로 처리하여 염증반응을 유도하였을 때 대조군에 비해 매우 높은 발현량을 보였으나, Teleogryllusine을 농도 별로 함께 처리한 경우 처리농도에 의존적으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 유전자 발현이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다.

**Teleogryllusine이 MAPKs 신호전달에 미치는 영향**

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs; p38, JNK, ERK)는 세포질에서 인산화되지 않은 상태로 존재하다가 LPS 등에 의해 자극이 가해지면 인산화되어 염증반응을 조절하는

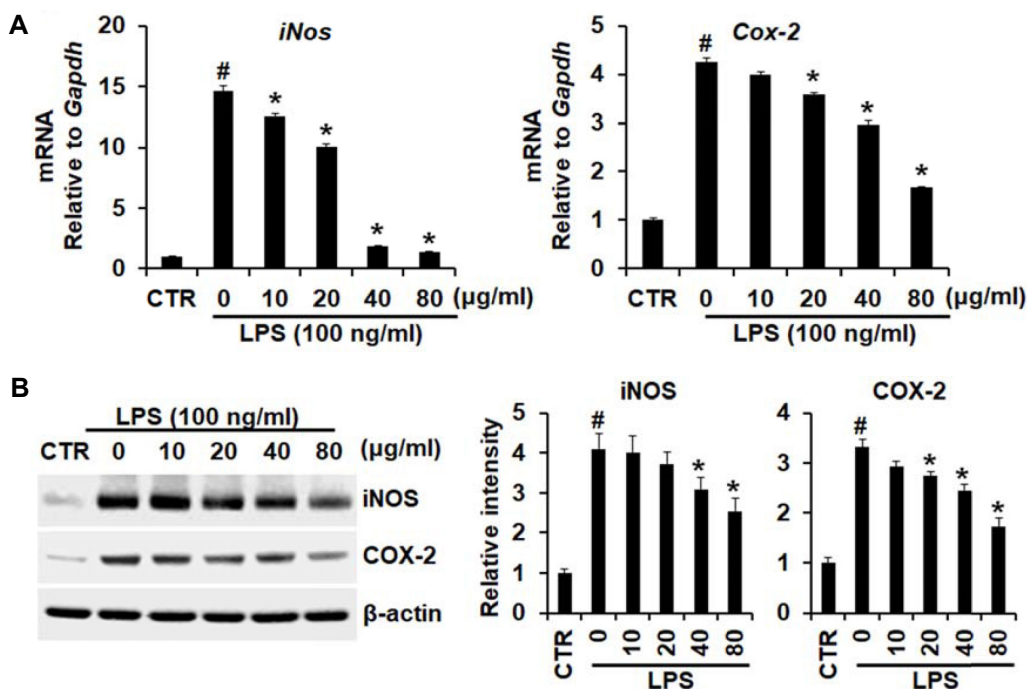


Fig. 2. Inhibitory effects of Teleogryllusine on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated BV-2 microglia. (A) BV-2 microglial cells ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated with Teleogryllusine ( $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 6 hr after the LPS treatment. The levels of *iNos* and *Cox-2* mRNA were determined by quantitative RT-PCR. The data were normalized to *Gapdh*. (B) BV-2 microglial cells ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated with Teleogryllusine for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml). Protein was isolated at 24 hr after LPS treatment. The expression level of iNOS and COX-2 were determined by Western blot. The data were normalized to tubulin. Results of densitometric analysis of Western blot are also shown (right). Results are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0.05$  in comparison with control group. \* $p < 0.05$  in comparison with LPS group. CTR, control; LPS, lipopolysaccharides.

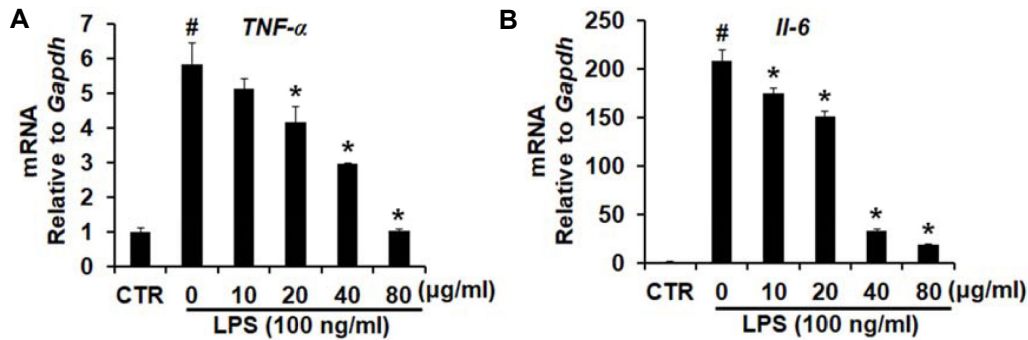


Fig. 3. Inhibitory effects of Teleogryllusine on the production of proinflammatory factors in LPS-stimulated BV-2 microglia. BV-2 microglial cells ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were pretreated with Teleogryllusine ( $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hr prior to incubation of LPS (100 ng/ml). RNA was isolated at 6 hr after the LPS treatment. The levels of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* mRNA were determined by quantitative RT-PCR. The data were normalized to *Gapdh*. Results are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0.05$  in comparison with control group. \* $p < 0.05$  in comparison with LPS group. CTR, control; LPS, lipopolysaccharides.

중요한 인자로서 iNOS와 COX-2 발현 및 염증성 cytokine의 발현조절 과정에서도 매우 중요한 역할을 수행한다[26, 35]. NF- $\kappa$ B는 일반적인 상태에서 I $\kappa$ B와 결합되어 세포질에 존재하지만 외부자극으로 인해 AKT/IKK가 활성화 되어 I $\kappa$ B의 인산화가 진행되면 I $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B로부터 분리되고 proteosome에 의해서 분해된다. 이때 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 핵 내로의 이동이 촉진되어 전사조절인자로 작용하면서 다양한 염증반응 매개

유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다[25, 32]. 따라서 Teleogryllusine이 LPS에 의해 유도되는 염증반응에서 MAPKs와 I $\kappa$ B의 인산화 및 proteosome에 의한 I $\kappa$ B 분해에 미치는 영향을 western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 4). MAPKs 및 I $\kappa$ B 인산화 변화를 확인하기 위해서 BV-2 세포에 Teleogryllusine을 1시간 전처리 한 후 LPS를 40분간 처리하여 염증반응을 유도하였다. 그 결과 MAP kinase인 p38, JNK 및

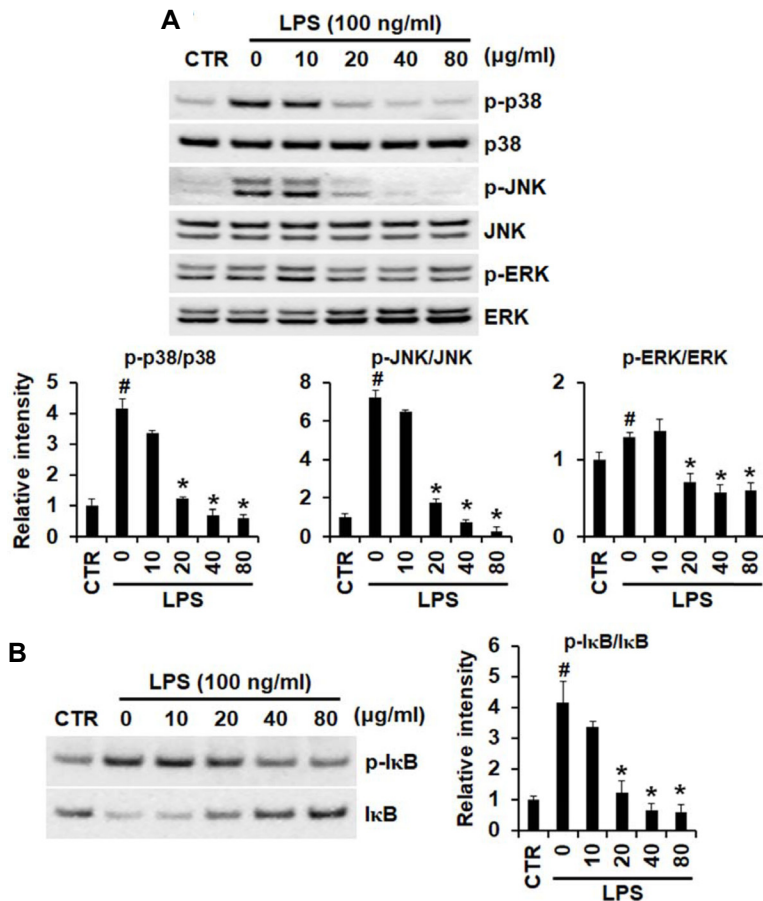


Fig. 4. Inhibitory effect of Teleogryllusine on MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathways. BV-2 microglial cells ( $4 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were incubated with the indicated concentration of Teleogryllusine ( $\mu\text{g/ml}$ ). (A) Protein was then isolated at 40 min after LPS treatment, and phosphorylation of ERK, p38, and JNK was detected using Western blot. The data were normalized to total protein, respectively. Results of densitometric analysis of the Western blot are also shown (lower). (B) Phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B was detected using Western blot. The data were normalized to total protein. Results of densitometric analysis of the Western blot are also shown (right). Results are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0.05$  in comparison with control group. \* $p < 0.05$  in comparison with LPS group. CTR, control; LPS, lipopolysaccharides.



ERK의 인산화가 LPS 처리에 의해 증가한 것을 확인하였으며 Teleogryllusine을 함께 처리한 경우 이들의 인산화가 Teleogryllusine 처리 농도에 따라 효과적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 LPS에 의해 유도된 IκB 단백질의 인산화 또한 LPS에 의해서 증가되었지만 Teleogryllusine의 처리에 의해 감소되었으며, proteasome에 의한 IκB 단백질의 degradation을 확인한 결과도 Teleogryllusine의 처리 농도에 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Teleogryllusine이 BV-2 세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPKs의 인산화 및 NF-κB 활성 억제를 통해 항신경염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 위 연구 결과들을 종합해보면 항균 펩타이드 Teleogryllusine은 염증반응을 매개로 하는 다양한 중추신경계 질환에 도움을 줄 수 있는 의료용 소재개발에 이용 가능할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

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

### The Conflict of Interest Statement

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

### References

1. Andreasson, K. I., Bachstetter, A. D., Colonna, M., Ginhoux, F., Holmes, C., Lamb, B., Landreth, G., Lee, D. C., Low, D., Lynch, M. A., Monsonogo, A., O'Banion, M. K., Pekny, M., Puschmann, T., Russek-Blum, N., Sandusky, L. A., Selenica, M. L., Takata, K., Teeling, J., Town, T. and Van Eldik, L. J. 2016. Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. *J. Neurochem.* **138**, 653-693.
2. Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K. and Rasmuson, Jr. T. 1974. Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.* **10**, 136-145.
3. Chao, D., Bahl, P., Houlbrook, S., Hoy, L., Harris, A. and Austyn, J. M. 1999. Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotherapy agents as assessed by the MTS assay. *Br. J. Cancer* **81**, 1280-1284.
4. Chung, Y. C., Ko, H. W., Bok, E., Park, E. S., Huh, S. H., Nam, J. H. and Jin, B. K. 2010. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep.* **43**, 225-232.
5. 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.
6. Deque, G., A. and Descoteaux, A. 2014. Macrophage Cytokine: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* **5**, 491.
7. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. and Boman, H. G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**, 7-16.
8. Freudenthal, O., Quilès, F. and Francius, G. 2017. Discrepancies between cyclic and linear antimicrobial peptide actions on the spectrochemical and nanomechanical fingerprints of a young biofilm. *ACS Omega* **2**, 5861-5872.
9. Gonzalez, H., Elgueta, D., Montoya, A. and Pacheco, R. 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* **274**, 1-13.
10. Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 219-240.
11. Gordon, Y. J., Romanowski, E. G. and McDermott, A. M. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* **30**, 505-515.
12. Griffin, W. S. 2006. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 470S-474S.
13. Gulati, P. and Singh, N. 2014. Pharmacological evidence for connection of nitric oxide-mediated pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6**, 233-240.
14. Hink, U. and Munzel, T. 2006. COX-2, another important player in the nitric oxide-endothelin cross-talk: good news for COX-2 inhibitors? *Circ. Res.* **98**, 1344-1346.
15. Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C. and Maffia, P. C. 2018. Antimicrobial Peptides: Interaction model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. *Front. Chem.* **6**, 204.
16. Hunot, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y. and Hirsch, E. C. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* **72**, 355-363.
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. Jin, R., Yang, G. and Li, G. 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 779-789.
19. Kim, I. W., Lee, J. H., Seo, M., Lee, H. J., Baek, M., Kim, M. A., Shin, Y. P., Kim, S. H., Kim, I. and Hwang, J. S. 2020. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide periplanetasin-5 derived from the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1282-1289.
20. Knott, C., Stern, G. and Wilkin, G. P. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and

- cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 724-739.
21. Kwon, Y. N., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, S. H., Yun, E. Y., Nam, S. H., Ahn, M. Y., Jeong, M., Kang, D. C., Lee, I. H. and Hwang, J. S. 2013. Antimicrobial activity of the synthetic peptide scolopendrasin ii from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1381-1385.
  22. Lee, A. H., Kim, J. E., Choi, J. Y., Sung, J. E., Youn, W. B., Son, H. J., Lee, H. S., Kang, H. G. and Hwang, D. Y. 2020. Inhibitory effects of *Asparagus cochinchinensis* in LPS-stimulated BV-2 microglial cells through regulation of neuroinflammatory mediators, the MAP kinase pathway, and the cell cycle. *J. Life Sci.* **30**, 331-342.
  23. Lee, J. H., Seo, M., Lee, H. J., Baek, M., Kim, I. W., Kim, S. Y., Kim, M. A., Kim, S. H. and Hwang, J. S. 2019. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide allomyrinasin derived from the dynastid beetle, *Allomyrina dichotoma*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 687-695.
  24. Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. Antimicrobial activity of the scolopendrasin V peptide identified from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 43-48.
  25. Liden, J., Rafter, L., Truss, M., Gustafsson, J. A. and Okret, S. 2000. Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 1008-1014.
  26. Marina, L., Kamal, R. M., Andrew, F., Gary, B., Jeremy, S. and Andrew, R. C. 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4265-4278.
  27. Melchior, B., Puntambekar, S. S. and Carson, M. J. 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem. Int.* **49**, 145-153.
  28. Nakagawa, Y. and Chiba, K. 2014. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* **7**, 1028-1048.
  29. Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S. and Kurihara, T. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* **65**, 322-331.
  30. Okamoto, S. and Lipton, S. A. 2015. S-Nitrosylation in neurogenesis and neuronal development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 1588-1593.
  31. 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.
  32. Pruetz, S. B., Fan, R. and Zheng, Q. 2003. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic I $\kappa$ B, nuclear NF $\kappa$ B, and activation of NF $\kappa$ B in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone *in vivo*. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1-16.
  33. Robertson, M. and Postlethwait, J. H. 1986. The humoral antibacterial response of *Drosophila* adults. *Dev. Comp. Immunol.* **10**, 167-179.
  34. Schmid, C. D., Sautkulis, L. N., Danielson, P. E., Cooper, J., Hasel, K. W., Hilbush, B. S., Sutcliffe, J. G. and Carson, M. J. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* **83**, 1309-1320.
  35. 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 Lumbricusin as a regulator of neuroinflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 1004-1010.
  36. Steinstraesser, L., Kraneburg, U. M., 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.
  37. Teismann, P., Vila, M., Choi, D. K., Tieu, K., Wu, D. C., Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. 2003. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann. NY. Acad. Sci.* **991**, 272-277.
  38. 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.
  39. Yaakobi, K., Liebes-Peer, Y., Kushmaro, A. and Rapaport, H. 2013. Designed amphiphilic  $\beta$ -sheet peptides as templates for paraoxon adsorption and detection. *Langmuir* **29**, 6840-6848.

## 초록 : BV-2 미세아교세포에서 왕귀뚜라미 유래 Teleogryllusine의 신경염증 억제 효과

서민철<sup>†</sup> · 신용표<sup>‡</sup> · 이화정 · 백민희 · 이준하 · 김인우 · 황재삼 · 김미애\*

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

최근 중추신경계에서 면역기능을 담당하는 미세아교세포(microglia)의 염증반응을 효율적으로 조절하는 것은 알츠하이머 병, 파킨슨 병 및 헌팅턴 병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료를 위한 중요한 타겟으로 인식되고 있다. 왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*)는 다양한 치료효능으로 인해 세계적으로 널리 이용되고 있으며, 본 연구팀에서는 최근 왕귀뚜라미의 전사체 분석을 통하여 항균활성을 가지는 다양한 종류의 새로운 항균 펩타이드(antimicrobial peptide; AMP) 후보들을 선별한 바 있다. 항균 펩타이드는 미생물에서부터 포유류까지 매우 다양한 종으로부터 발견되었으며, 현재는 항균활성뿐만 아니라 염증반응과 같은 다양한 질병의 치료제 개발을 위한 후보 물질로 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 선행연구를 통하여 선별된 왕귀뚜라미 유래 항균 펩타이드들 중에서 Teleogryllusine (VKWKR-LNNNKVLQKIYFVKI-NH<sub>2</sub>)으로 명명된 항균 펩타이드의 신경염증 억제 효능을 관찰하였다. Teleogryllusine의 신경염증 억제 효능을 관찰 하기 위하여 immortalized mouse microglia 세포주인 BV-2 세포에 Teleogryllusine을 1시간 전처리 한 후 LPS를 이용하여 BV-2 세포의 염증 반응을 유도하였다. 그 결과 Teleogryllusin은 최대 처리 농도인 80 µg/ml까지 세포독성 없이 nitric oxide (NO) 생성을 현저히 감소시킴을 확인할 수 있었다. 또한 염증반응 매개인자인 iNOS와 COX-2 및 cytokine (IL-6, TNF-α)의 발현을 유전자 수준과 단백질 수준에서 확인한 결과 Teleogryllusine 처리농도에 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 Teleogryllusine의 신경염증 억제작용 기작을 확인한 결과 mitogen activated protein kinases (MAPKs)와 IκB의 인산화 및 proteosome에 의한 IκB의 분해를 억제함으로써 BV-2 세포의 신경염증반응이 조절됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 왕귀뚜라미 유래 Teleogryllusine 펩타이드는 신경염증반응에 의해 유도되는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방을 위한 의약품 소재로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.