

Inhibitory Effect of Protaetiamycine 9 Derived from *Protaetia brevitarsis seulensis* Larvae on LPS-mediated Inflammation in RAW264.7 Cells

Ra-Yeong Choi[†], Minchul Seo[†], Joon Ha Lee, In-Woo Kim, Mi-Ae Kim and Jae-Sam Hwang^{*}

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

Received August 5, 2021 / Revised November 4, 2021 / Accepted November 17, 2021

Our previous studies have reported that antimicrobial peptides (AMPs) derived from the larvae of white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis seulensis*) exert anti-inflammatory and neuroprotective activities. This study explored the anti-inflammatory effects of protaetiamycine 9 (CVLKKAYFLTNLKLRG-NH₂), a novel AMP, derived from *P. b. seulensis* against lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammatory response in RAW264.7 macrophage cells. Protaetiamycine 9 (25, 50, 75, and 100 µg/ml) did not cause cytotoxic effects against RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were pre-treated with various concentrations of protaetiamycine 9 (25-100 µg/ml) for 1 hr and then exposed to LPS (100 ng/ml) for 24 hr. Protaetiamycine 9 treatments decreased the LPS-induced secretion of inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO), in a dose-dependent manner. Protaetiamycine 9 (25-100 µg/ml) effectively downregulated the LPS-induced increase in mRNA and the protein expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), which are involved in the production of inflammatory mediators. Protaetiamycine 9 also suppressed the production and gene expression of pro-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-6 and IL-1β, compared to the presence of LPS alone. Furthermore, protaetiamycine 9 inhibited the degradation of inhibitory kappa B alpha (IκB-α) and the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38. In conclusion, these results suggest that protaetiamycine 9 exhibits LPS-mediated inflammatory responses by blocking IκB-α degradation and MAPK phosphorylation.

Key words : Anti-inflammation, antimicrobial peptide, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), *Protaetia brevitarsis seulensis*, RAW264.7 macrophages

서 론

그람음성세균의 외막 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 내독소(endotoxin)에 의해 자극된 대식세포는 과도한 염증반응을 일으킨다[27]. LPS 처리로 toll-like receptor 4 (TLR4) 신호전달 경로가 활성화 되면 세포질에서 nuclear factor-kappa B (NF-κB)와 결합되어 있던 IκB는 IκB kinase (IKK)에 의해 인산화 되고 NF-κB 복합체로부터 분리됨에 따라 IκB가 분해된다[20]. 이 과정을 통해 NF-κB 이량체는 핵으로 이동하여 염증 매개 인자[reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) 및 prostaglandins E2 (PGE2)]와 염증성 사이토카인 [tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin (IL)-6 및 IL-1β]

의 합성을 조절한다[14]. 이러한 일련의 과정은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt 등 다양한 신호전달 경로와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다[32].

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 꽃무지과(Cetoniidae)로 분류되는 식용곤충으로 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 유럽에 서식하고 있으며 그 유충은 “굶벵이” 또는 “제조”라고 알려져 있다[2]. 흰점박이꽃무지 유충의 영양성분을 분석한 결과, 동결건조분말은 단백질 58%, 지방 17%, 탄수화물 11% 등으로 구성되어 있으며 일반적인 단백질 식품(난류, 육류, 어류)에 비해 단백질 함량이 높아 고단백질 식품 소재로 평가되었다[4]. 흰점박이꽃무지 유충은 동의보감에 ‘간에서 비롯되는 질병, 즉 간암, 간경화, 간염, 누적된 피로의 해소 등을 포함하여 월경불순, 시력 감퇴, 배내장, 금창, 산후풍, 악성종기, 구내염, 파상풍 및 중풍 등의 성인병 치료에 효과가 있다’고 기록되어 있으며 예로부터 약용으로 활용되었다[9, 19]. 흰점박이꽃무지 유충은 항혈전 효능[2], 항산화 활성[19], 항염 및 미백 활성[31], 항비만[1], 사업화탄소로 유도한 간독성에 대한 간보호 효과[3]와 같은 약리학적 효능을 가지고 있다. 최근에는 흰점박이꽃무지 유충 물추

[†]Authors contributed equally.

^{*}Corresponding author

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

E-mail : 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.

출물의 신경변성 개선 효과[23], 흰점박이꽃무지 유충 koji로 제조한 소스와 페이스트의 알코올성 간세포에 대한 보호 효과 [8], *Bacillus subtilis*로 발효된 흰점박이꽃무지 유충 분말의 비알코올성 지방간 개선 효과[30] 등 다양한 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구진은 선행연구에서 흰점박이꽃무지 유충의 전사체 분석으로 도출한 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP) Protactiamycine 2와 Protactiamycine 6의 항염증 활성에 대해 보고한 바 있다[18, 21]. 항균 펩타이드는 선천성 면역반응의 주요 인자이며 병원체에 대한 감염 위험으로부터 1차 방어 역할을 한다[17]. 최근에는 여러 선천성 면역 요소들 중 비특이적이고 빠른 반응성을 가지는 천연물 유래 항균 펩타이드가 항균 작용 이외에도 항암, 항산화 및 항염증 작용 등의 기능이 보고되면서 식의약소재로 이용되고 있다[28, 35]. Krishnan 등 [17]은 흰점박이꽃무지 defensin으로부터 분리된 10-mer 펩타이드, pro10-1D가 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 TLR4 매개 NF- κ B 신호전달을 통해 LPS를 효과적으로 중화하고 염증성 사이토카인 생성을 억제한다고 보고하였으며, 이러한 연구들을 통해 염증성 질환 치료를 위한 곤충 유래 펩타이드의 활용 범주가 더욱 확대될 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 유충 유래 항균 펩타이드 Protactiamycine 9의 항염증 효과를 조사하기 위해 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포를 이용하여 염증인자들의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

펩타이드

흰점박이꽃무지 유래 항균 펩타이드 Protactiamycine 9 (CVLKKAYFLTNLKLRLG-NH₂)는 에니젠(주)(Gwangju, Korea)에서 고상법을 이용하여 95% 이상의 순도로 합성하였다. 펩타이드는 -20°C에서 냉동 보관하며 0.01% 아세트산용액에 녹여 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용한 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 10% fetal bovine serum (HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)와 1× penicillin-streptomycin (HyClone Laboratories Inc.)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, HyClone Laboratories Inc.)을 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 유지하였다. 세포는 80-90% 밀도로 자랐을 때 계대배양하였다.

세포독성 측정

RAW264.7 대식세포에 대한 Protactiamycine 9의 세포독성

을 확인하기 위하여 2×10^4 cells/well로 96-well plate에 분주하여 18시간 동안 세포를 안정시킨 후, Protactiamycine 9를 25, 50, 75 및 100 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 각 well 당 RAW264.7 세포 배양액 100 μ l에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액 10 μ l씩 첨가하고 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 반응시킨 후, microplate reader (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide (NO) 농도 측정

LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포의 NO 생성량은 Griess 방법에 의한 분석 kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 측정하였다. 세포는 8×10^4 cells/well로 96-well plate에 분주하여 18시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. Protactiamycine 9를 25, 50, 75 및 100 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전처리한 후, 100 ng/ml LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액 100 μ l에 sulfanilamide 용액 50 μ l를 가하여 실온에서 5분간 반응시키고, naphthylethylenediamine 용액 50 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 이어서 microplate reader (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RAW264.7 대식세포는 1×10^6 cells/well로 6-well plate에 분주하여 18시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. Protactiamycine 9를 25, 50, 75 및 100 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전처리한 후, 100 ng/ml LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액의 사이토카인 농도(IL-6와 IL- β)는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제시된 방법으로 측정하였다.

Real-time PCR

RAW264.7 대식세포는 1×10^6 cells/well로 6-well plate에 분주하여 18시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. Protactiamycine 9를 25, 50, 75 및 100 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 전처리한 후, 100 ng/ml LPS를 처리하여 5시간 동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. RNA의 정량은 50배 희석한 후 UV/vis 분광광도계(Beckman coulter, Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 정량한 RNA는 high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, AMPIGENE qPCR Green Mix Lo-ROX (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)를 사용하여

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

cDNAs	Primer sequences	Accession number
COX-2	Forward, 5'-CAGACAACATAAACTGCGCCTT-3'	NM_011198
	Reverse, 5'-GATACACCTCTCCACCAATGACC-3'	
iNOS	Forward, 5'-CAGCACAGGAAATGTTTCAGC-3'	NM_010927
	Reverse, 5'-TAGCCAGCGTACCGGATGA-3'	
IL-6	Forward, 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'	NM_031168
	Reverse, 5'-AAGTGCATCATCGTTGTCATACA-3'	
IL-1 β	Forward, 5'-CCTTCCAGGATGAGGACATGA-3'	NM_013693
	Reverse, 5'-TGAGTCACAGAGGATGGGCTC-3'	
GAPDH	Forward, 5'-AAGGTCATCCAGAGCTGAA-3'	NM_008084
	Reverse, 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3'	

Real-time PCR 반응을 수행하였다. 측정하고자 하는 목적 유전자의 발현은 GAPDH의 발현량을 이용하여 정량화 하였다. Real-time PCR에 사용한 각 유전자의 서열은 Table 1에 나타내었다.

Western blot

RAW264.7 대식세포는 1×10^6 cells/well로 6-well plate에 분주하여 18시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. Protoetiamycine 9를 25, 50, 75 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 1시간 동안 전처리한 후, 100 ng/ml LPS를 처리하여 30분 또는 24시간 배양하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 protease와 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)이 함유된 M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific)로 lysis시킨 후 4°C에서 원심분리(12,000 rpm, 15분)하여 상층액을 얻었다. 단백질을 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)로 정량하였고 -20°C에 보관하여 사용하였다. 단백질은 SDS-PAGE gel에 전기영동시킨 후, PVDF membrane으로 transfer하고, inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), p-extracellular signal-regulated kinase (ERK), ERK, p-p38, p38, p-c-Jun N-terminal kinase (JNK), JNK 및 β -actin 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이를 상온에서 2차 항체(Promega Corporation, Madison, WI, USA)로 1시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescent (ECL) Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 단백질 발현 변화를 가시화 하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 평균과 표준오차로 나타내었으며 실험군 간의 유의성은 Statistical Package for Social Science 프로그램(SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student's *t*-test를 통해 검정하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 비교하였다.

결과 및 고찰

Protoetiamycine 9가 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 Protoetiamycine 9를 농도별(25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하고 24시간 동안 배양하여 세포독성을 측정 한 결과, Protoetiamycine 9는 25~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위에서 대조군과 유사한 수준의 세포 생존율을 보였기에 모든 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 간주하였다(Fig. 1A). 따라서 본 연구에서 사용한 Protoetiamycine 9의 최대 처리 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 설정하였다. RAW264.7 세포에 Protoetiamycine 9를 세포 독성이 없는 조건(25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 1시간 동안 전처리한 후, LPS를 24시간 동안 단독 또는 복합 처리하여 NO 생성 정도를 비교하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이, LPS로 자극된 세포는 대조군에 비해 NO 생성이 크게 증가하였으나, Protoetiamycine 9가 전처리 된 세포는 NO 생성이 농도의존적으로 감소되었다. 이전에 본 연구진은 흰점박이꽃무지 유충 유래 항균 펩타이드인 Protoetiamycine 2와 Protoetiamycine 6이 각각 대식세포와 미세아교세포에서 염증반응 억제 효능을 가지고 있음을 입증한 바 있다[18, 21]. 흥미롭게도, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하는 Protoetiamycine 2에 비해 Protoetiamycine 9는 낮은 농도(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 보다 효과적이었다[21]. NO의 과잉 생성은 숙주에 유해하고, 심각한 자가 면역 질환을 일으킬 수 있다[7, 11]. NO와 PGE2는 대식세포가 LPS로 자극될 때, 각각 iNOS와 COX-2 효소의 발현에 의해 생성되는 중요한 염증 매개체이다 [16, 26]. 이들 염증 매개체의 증가는 다양한 염증성 질환을 야기시킬 수 있으며 염증반응 정도를 판단하는 척도로 이용된다[11, 22]. Fig. 2에서 Protoetiamycine 9를 LPS로 자극한 대식세포에 전처리한 결과, iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 수준이 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. Kim 등[13]에 따르면 무당벌레 유충으로부터 분리된 펩타이드 유전자 Harmoniasin의 일부 영역 HaGF는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상부터 LPS 자극(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의해 증가된 NO 생성 및 iNOS와 COX-

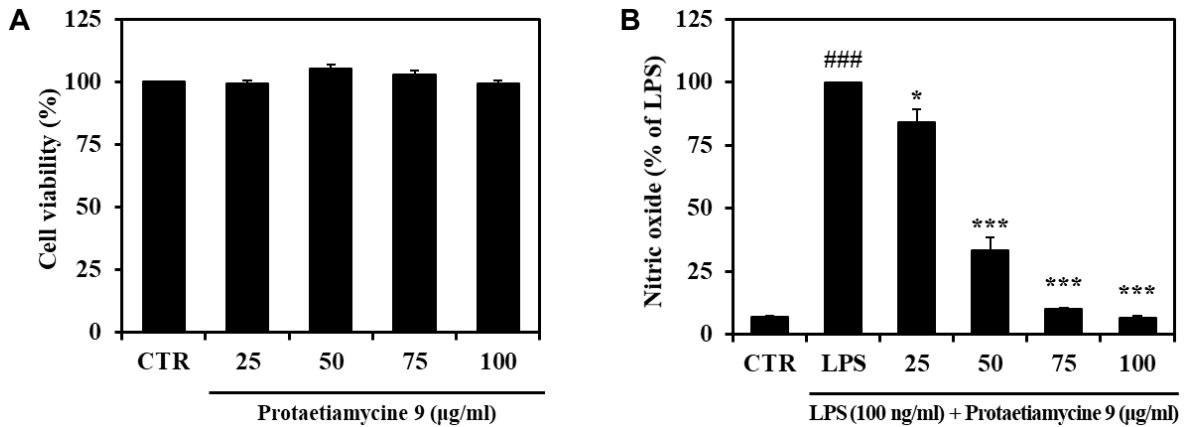


Fig. 1. Effects of Protactiamycine 9 on cell viability (A) and nitric oxide production (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cell viability was determined from the 24 hr culture of RAW264.7 cells in the presence of Protactiamycine 9. To examine nitric oxide levels, RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with Protactiamycine 9 (25, 50, 75, 100 µg/ml) and then stimulated for 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus Protactiamycine 9. Data are expressed as the mean ± standard error (n=3). ###*p*<0.001, compared with the untreated control (CTR) group. **p*<0.05 and ****p*<0.001, compared with the cells treated with LPS alone.

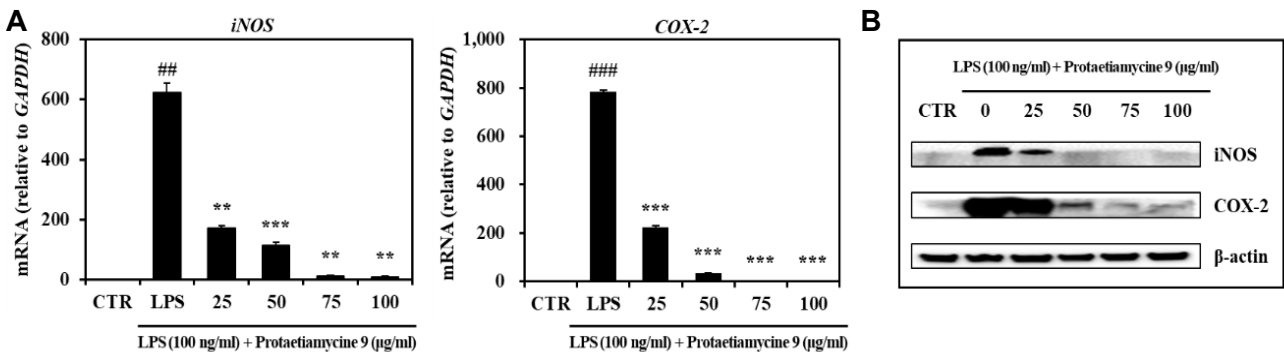


Fig. 2. Effects of Protactiamycine 9 on mRNA expression (A) and protein expression (B) of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with Protactiamycine 9 (25, 50, 75, 100 µg/ml) and then stimulated for 5 hr or 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus Protactiamycine 9. Data are expressed as the mean ± standard error (n=3). ##*p*<0.01 and ###*p*<0.001, compared with the untreated control (CTR) group. ***p*<0.01 and ****p*<0.001, compared with the cells treated with LPS alone.

2의 단백질 발현을 억제한다고 보고하였다. 이와 비교해 보면, 본 연구에 사용된 Protactiamycine 9는 25 µg/ml의 저농도에서 NO 생성 저해 효과를 보였다. 이상의 결과는 Protactiamycine 9가 iNOS의 발현을 저해함으로써 NO 생성을 억제한다는 것을 설명한다.

Protactiamycine 9가 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

LPS에 의한 대식세포의 자극은 TNF-α, IL-6와 IL-1β 같은 염증성 사이토카인 및 IL-8, MCP-1 같은 chemokine의 발현을 유도한다[6, 34]. 이에 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에 Protactiamycine 9 처리가 염증성 사이토카인(IL-6, IL-1β) 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 Fig. 3에서 나타난

바와 같이, LPS에 의해 증가한 IL-6와 IL-1β의 생성 및 mRNA 발현은 Protactiamycine 9 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 확인할 수 있었다. 특히, 유전자 발현의 경우 LPS 단독 처리군과 비교하여 사용된 모든 농도에서 IL-6는 82%, IL-1β는 63% 이상의 억제율을 나타내었다(Fig. 3A). LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 발현을 저해하는 농도는 이전에 보고한 호랑나비 유충 항균 펩타이드 papiliocin 3의 항염증 활성 연구에서도 유사한 농도 범위(25~200 µg/ml)로 확인되었다[29]. IL-6와 IL-1β는 서로 상호작용을 하는 것으로 알려져 있으며 염증 반응을 일으키는 동안 발현이 크게 증가한다[5, 12]. 따라서 Protactiamycine 9가 염증성 사이토카인의 생성을 감소시킴으로써 항염증 활성에 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

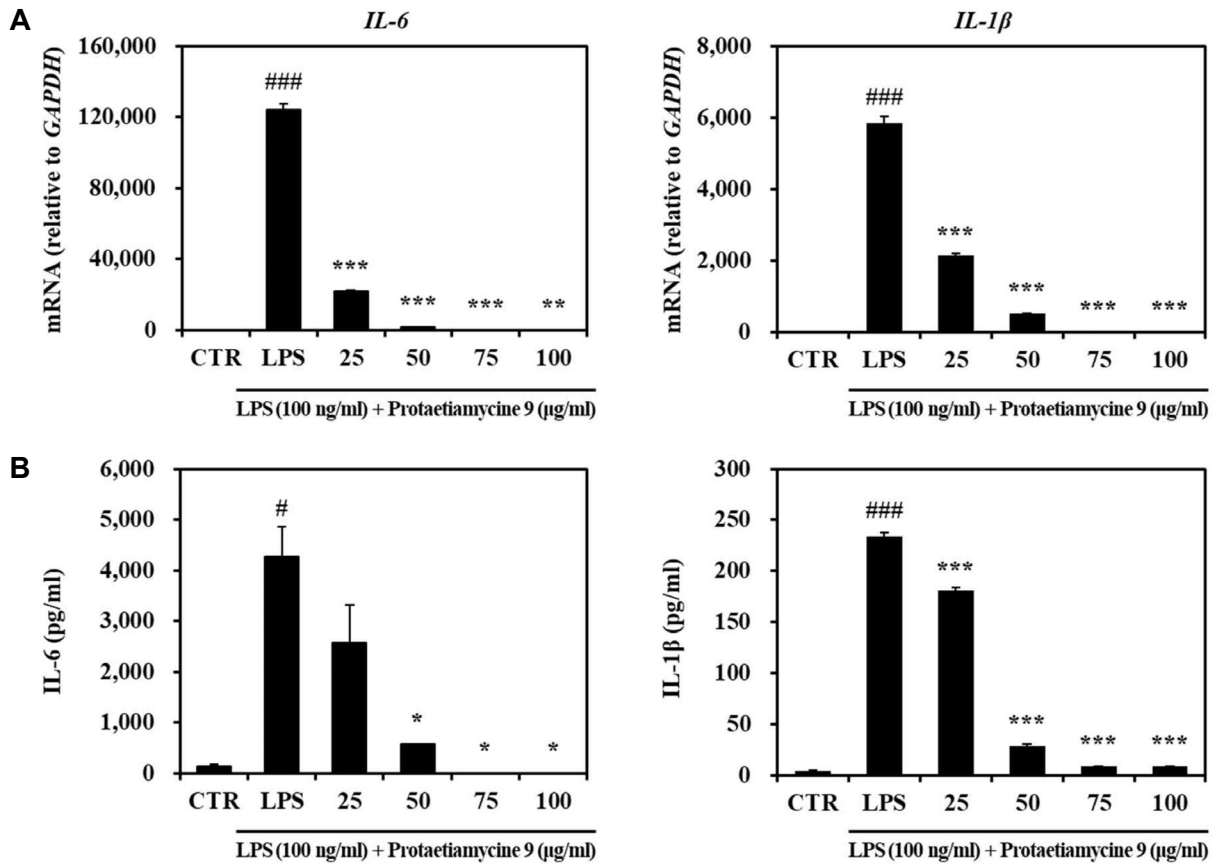


Fig. 3. Effects of Protactiamycine 9 on mRNA expression (A) and production (B) of IL-6 and IL-1β in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with Protactiamycine 9 (25, 50, 75, 100 μg/ml) and then stimulated for 5 hr or 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus Protactiamycine 9. Data are expressed as the mean ± standard error (n=3). #*p*<0.05 and ###*p*<0.001, compared with the untreated control (CTR) group. **p*<0.05 and ****p*<0.001, compared with the cells treated with LPS alone.

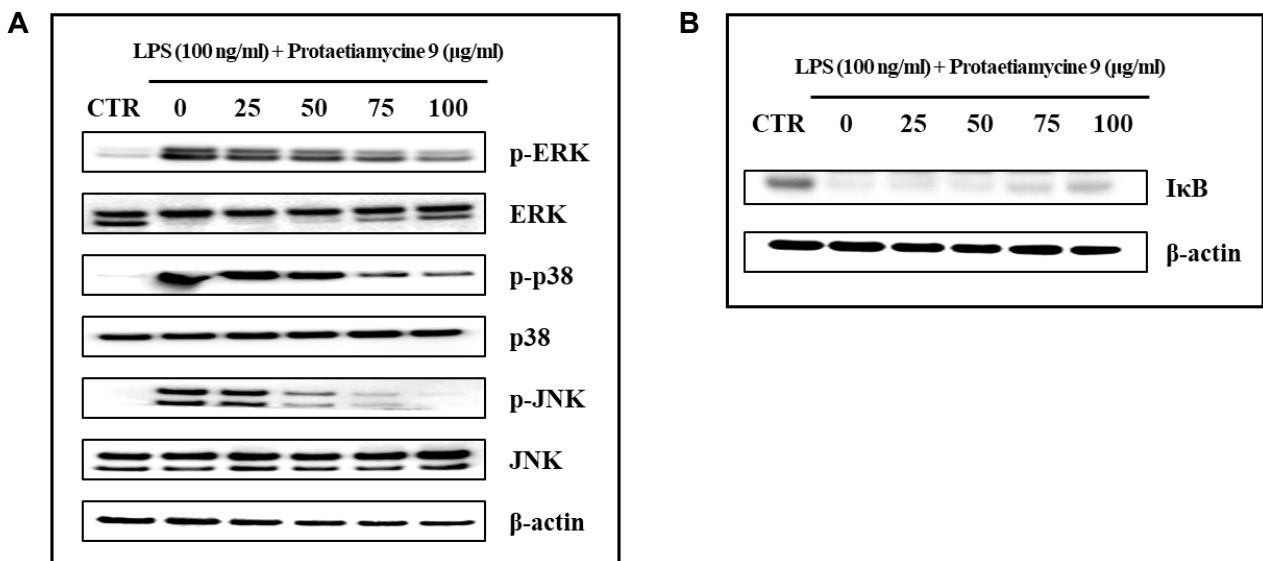


Fig. 4. Effects of Protactiamycine 9 on the protein expression of MAPKs (A) and IκB-α (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with Protactiamycine 9 (25, 50, 75, 100 μg/ml) and then stimulated for 30 min with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus Protactiamycine 9.

Protoetiamycine 9가 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs 발현에 미치는 영향

ERK, JNK, p38을 포함하는 MAPKs의 인산화는 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되어 염증성 발현 인자로 알려진 activator protein 1 (AP-1)과 NF-κB를 활성화시킴으로써 염증성 매개 인자와 사이토카인의 발현을 유도한다[10, 11, 16]. 한편 NF-κB는 세포질에서 IκB와 결합되어 있는 경우 전사인자로서 역할을 못하지만, LPS와 같은 외부 자극이 가해지면 IκB가 인산화되고 분해되어 NF-κB의 핵 내로 이동과 다양한 염증성 매개인자의 합성을 유도하게 된다[15, 25]. 본 연구에서 Protoetiamycine 9가 LPS로 유도된 MAPKs 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과, Protoetiamycine 9의 처리에 따라 농도의존적으로 ERK, JNK, p38의 인산화가 억제되었다(Fig. 4A). 또한 Protoetiamycine 9는 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 IκB의 분해를 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 Protoetiamycine 9가 LPS에 의한 NF-κB p65의 핵 내로의 이동을 억제할 수 있음을 유추할 수 있었다(Fig. 4B). Li 등[24]에 따르면 남중국해 해면(*Dysidea fragilis*)으로부터 분리된 Dysifragilone A (12.5~100 μM)는 LPS (1 μg/ml)로 유도된 대식세포에서 p38/MAPK 신호전달 경로만 선택적으로 활성화를 억제하였다. Yi 등[33]의 연구에서는 대두 단백질 유래 펩타이드(0.25~1 mg/ml)가 LPS (10 ng/ml)로 자극된 대식세포에서 ERK와 p38의 인산화 수준에 변화 없이 JNK 인산화를 유의하게 억제하였다고 보고하였다. 기존의 펩타이드 연구들과 비교하여 본 연구에서 사용된 Protoetiamycine 9는 LPS로 자극된 대식세포에서 MAPKs (ERK, JNK, p38)와 NF-κB의 활성을 억제하여 높은 항염증 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ014958)의 지원에 의해 연구 수행으로 인한 결과물이며, 이에 감사 드립니다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Ahn, E. M., Myung, N. Y., Jung, H. A. and Kim, S. J. 2019. The ameliorative effect of *Protoetia brevitarsis* larvae in HFD-induced obese mice. *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 1177-1186.
- Choi, I. H., Yu, R., Lim, Y. J., Choi, G. S., Choi, S. U., Hwang, J. I., Son, J. S. and Chung, T. H. 2019. Antithrombotic efficacy of *Protoetia brevitarsis* extract. *J. Environ. Sci. Int.* **28**, 639-643.
- Chon, J. W., Kweon, H. Y., Jo, Y. Y., Yeo, J. H. and Lee, H. S. 2012. Protective effects of extracts of *Protoetia brevitarsis* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the mice. *J. Seric. Entomol. Sci.* **50**, 93-100.
- Chung, M. Y., Gwon, E. Y., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protoetia brevitarsis*. *J. Life Sci.* **23**, 664-668.
- Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 397-440.
- Guha, M. and Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85-94.
- Guzik, T. J., Korb, R. and Adamek Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Hwang, D., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2020. *In vitro* protective effect of paste and sauce extract made with *Protoetia brevitarsis* larvae on HepG2 cells damaged by ethanol. *Insects* **11**, 494.
- Kang, I. J., Chung, C. K., Kim, S. J., Nam, S. M. and Oh, S. H. 2001. Effects of *Protoetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in carbon tetrachloride administered rats. *Appl. Microsc.* **31**, 9-18.
- Kawai, T. and Akira, S. 2007. Signaling to NF-κB by toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **13**, 460-469.
- Kim, C. H., Lee, Y. K., Jeong, J. W., Hwang, B. S., Jeong, Y. T., Oh, Y. T., Cho, P. Y. and Kang, C. H. 2021. Anti-inflammatory effects of *Hemistepta lyrata* Bunge in LPS-stimulated RAW264.7 cells through regulation of MAPK signaling pathway. *Kor. J. Plant Res.* **34**, 23-30.
- Kim, D. G., Shin, J. H. and Kang, M. J. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water extracts and ethanol extracts from *Portulaca oleracea* L. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 98-106.
- Kim, D. H., Kim, H. J., Lee, J. Y., Hwang, J. S., Kim, I. W., Lee, S. G., Jeong, H. G. and An, B. J. 2013. Anti-inflammatory effect of HaGF peptide of *Harmonia axyridis*. *J. Life Sci.* **23**, 495-500.
- Kim, J. K., Park, S. Y., Choi, H. Y., Jang, M. H., Jung, D. H., Kim, S. C. and Cho, I. J. 2019. Anti-inflammatory effect of *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells. *Herb. Formula Sci.* **27**, 7-16.
- Kim, M. J., Kim, K. B. W. R., Park, S. H., Park, S. Y., Choi, H. D., Choi, J. S., Jang, M. R., Im, M. H. and Ahn, D. H. 2017. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Polyopes affinis* through suppression of NF-κB and MAPK activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 537-544.
- Kim, M. S., Jeong, J. S., Lee, H. Y., Ju, Y. S., Bae, G. S., Seo, S. W., Cho, I. J., Park, S. J. and Song, H. J. 2011. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. *Kor. J. Herbology* **26**, 51-57.
- Krishnan, M., Choi, J., Jang, A. and Kim, Y. 2020. A novel

- peptide antibiotic, Pro10-1D, designed from insect defensin shows antibacterial and anti-inflammatory activities in sepsis models. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6216.
18. Lee, H. J., Seo, M., Baek, M., Shin, Y. P., Lee, J. H., Kim, I. W., Hwang, J. S. and Kim, M. A. 2020. Inhibitory effect of Protacetamycin 6 on neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 microglia. *J. Life Sci.* **30**, 1078-1084.
 19. Lee, H. S., Ryu, H. J., Song, H. J. and Lee, S. O. 2017. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Protacetia brevitarsis* larvae. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 1164-1170.
 20. Lee, J. Y., Choi, J. W., Lee, M. K., Kim, Y. M., Kim, I. H. and Nam, T. J. 2014. Anti-inflammatory effects of *Pyropia yezoensis* extract in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 757-764.
 21. Lee, J. H., Baek, M., Lee, H. J., Kim, I. W., Kim, S. Y., Seo, M., Kim, M. A., Kim, S. H. and Hwang, J. S. 2019. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide protacetamycin 2 derived from the *Protacetia brevitarsis seulensis*. *J. Life Sci.* **29**, 1218-1226.
 22. Lee, S. H., Lee, E. J., Chung, C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2019. Hesperetin ameliorates inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells via p38 MAPK and ERK1/2. *J. Life Sci.* **29**, 129-134.
 23. Lee, S., Seo, Y. H., Song, J. H., Kim, W. J., Lee, J. H., Moon, B. C., Ang, M. J., Kim, S. H., Moon, C., Lee, J. and Kim, J. S. 2021. Neuroprotective effect of *Protacetia brevitarsis seulensis*' water extract on trimethyltin-induced seizures and hippocampal neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 679.
 24. Li, H., Zhang, Q., Jin, X., Zou, X., Wang, Y., Hao, D., Fu, F., Jiao, W., Zhang, C., Lin, H., Matsuzaki, K. and Zhao, F. 2018. Dysifragilone A inhibits LPS-induced RAW264.7 macrophage activation by blocking the p38 MAPK signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **17**, 674-682.
 25. Nam, N. H. 2006. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **6**, 945-951.
 26. Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
 27. Park, J. H. and Lee, S. R. 2018. Anti-inflammatory activities of *Scolopendra subspinipes mutilans* in RAW264.7 cells. *J. Nutr. Health* **51**, 323-329.
 28. Seo, J. K. 2016. Screening and purification of an antimicrobial peptide from the gill of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **49**, 137-145.
 29. Shin, Y. P., Lee, J. H., Kim, I. W., Seo, M., Kim, M. A., Lee, H. J., Baek, M., Kim, S. H. and Hwang, J. S. 2020. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide Papilioicin 3 derived from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *J. Life Sci.* **30**, 886-895.
 30. Sim, S. Y., Ahn, H. Y. and Cho, Y. S. 2019. Effect of *Protacetia brevitarsis seulensis* larvae fermented by *Bacillus subtilis* on serum lipid contents and liver morphology in orotic acid-induced fatty-liver model Sprague-Dawley rats. *Kor. J. Food Preserv.* **26**, 821-827.
 31. Sung, G. A., Kim, M. H. and Park, S. N. 2016. Anti-inflammatory and whitening effects of *Protacetia brevitarsis Seulensis* extracts by oriental conversion methods. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **42**, 421-432.
 32. Xu, L., Pathak, P. S. and Fukumura, D. 2004. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 701-707.
 33. Yi, G., Li, H., Liu, M., Ying, Z., Zhang, J. and Liu, X. 2020. Soybean protein derived peptides inhibit inflammation in LPS induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4 mediated MAPK JNK and NF kappa B activation. *J. Food Biochem.* **44**, e13289.
 34. Yun, H. J., Lee, Y. J., Kang, M. S. and Baek, J. H. 2009. Inhibitory effect of Coicis semen extract (CSE) on pro-inflammatory mediators. *J. Pediatr. Kor. Med.* **23**, 159-171.
 35. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.

초록 : LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포에서 흰점박이꽃무지 유충 유래 Protactiamycine 9의 항염증 효과

최라영[†] · 서민철[†] · 이준하 · 김인우 · 김미애 · 황재삼*

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충양잠산업과)

이전 연구에서 흰점박이꽃무지 유충 유래 항균 펩타이드 Protactiamycine 2와 6의 항염증 효과를 입증하였다. 본 연구에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 흰점박이꽃무지 유충의 새로운 항균 펩타이드인 Protactiamycine 9의 염증 조절 기전을 검토하였다. 항염증 활성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 독성이 나타나지 않는 범위(25-100 µg/ml)로 Protactiamycine 9를 1시간 동안 전처리한 후, 24시간 동안 LPS (100 ng/ml)로 염증을 유도하였다. Protactiamycine 9 (25-100 µg/ml)는 LPS 자극으로 증가된 nitric oxide (NO) 분비를 농도의존적으로 감소시켰고, 염증 매개 인자의 생성에 관여하는 inducible NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유의적으로 억제하였다. Protactiamycine 9는 LPS로 유도된 inhibitory kappa B alpha (IκB-α)의 분해를 저해하고, extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38을 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 인산화를 억제함으로써 염증성 사이토카인(interleukin (IL)-6와 IL-1β)의 생성과 유전자 발현을 효과적으로 억제하였다. 따라서, Protactiamycine 9는 염증 반응의 신호전달경로인 NF-κB와 MAPKs의 활성화를 억제함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.