

## Anti-inflammatory Activities of Antimicrobial Peptide Locustacin Derived from *Locusta migratoria* in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Ra-Yeong Choi<sup>†</sup>, Joon Ha Lee<sup>†</sup>, Minchul Seo, 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 August 2, 2021 / Revised September 30, 2021 / Accepted October 1, 2021

*Locusta migratoria* is a widespread locust species in many parts of the world and is considered an alternative source for the production of protein for value-added ingredients. We previously identified putative antimicrobial peptides derived from *L. migratoria* through an *in silico* analysis of its transcriptome. However, its anti-inflammatory effect has not been studied. In this study, we investigated the anti-inflammatory activities of the antimicrobial peptide locustacin (KTHILSFFPSFLPLFLKK-NH<sub>2</sub>) derived from *L. migratoria* on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage cells. Locustacin (50, 100, and 200 µg/ml) significantly reduced the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated macrophages without any cytotoxicity. Locustacin also inhibited the mRNA and protein expression of pro-inflammatory mediators, such as inducible NO synthase and cyclooxygenase-2, in contrast to the presence of LPS alone. Locustacin decreased the release of LPS-induced pro-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-6 and IL-1β, and their gene expression in a dose-dependent manner. Furthermore, locustacin (100 and/or 200 µg/ml) inhibited phosphorylation levels of extracellular signal regulated kinase, p38, and c-Jun N-terminal kinase. Locustacin also suppressed the degradation of inhibitory kappa B alpha, which was considered to be an inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-κB). Collectively, these results demonstrate that locustacin can exert anti-inflammatory effects through the inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation, activation of NF-κB, and downstream inflammatory mediators in LPS-stimulated macrophage cells.

**Key words** : Antimicrobial peptide, *Locusta migratoria*, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), nuclear factor kappa B (NF-κB), RAW264.7 cells

### 서 론

염증은 외부 자극에 의해 유도되는 신체를 방어하기 위한 면역반응으로 조직 손상에 대한 구조나 기능을 회복하고 우리 몸의 항상성을 유지하는 매우 중요한 시스템이지만, 과도하고 지속적인 염증반응은 만성 염증을 유발하게 되어 관절염, 심혈관질환, 신경퇴행성질환과 암 등 다양한 질환의 발병 요인이 되기도 한다[5, 22]. 대식세포는 인체 내 면역반응에서 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), lysosomal enzyme, free radical 및 염증성 사이토카인과 같은 염증매개물질 생성에 관여하고 이를 조절한다[25]. NO는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 산화되어 생성되며, NOS에는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS

(eNOS)가 있다[29]. Constitutive NOS (cNOS)로 불리는 nNOS와 eNOS는 정상적인 체내 생리기능을 담당하는 반면, iNOS는 특정 자극에 의해 발현되며 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많다[29]. 또 다른 염증인자인 PGE2는 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 생성된다. COX의 isoenzyme 중 COX-1은 혈소판 응집, 위점막 보호 등 정상적인 세포 활성을 조절하지만, COX-2는 염증 등의 자극에 의해서 발현되고 COX-2로 인해 생성된 PGE2는 염증반응에 관여한다[10, 26].

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 당지질 화합물이다. LPS는 대식세포 표면의 toll like receptor 4 (TLR4)와 결합하게 되고 세포 내 신호 전달 체계인 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 활성화를 유도한다[11, 12]. MAPKs 신호 전달 경로는 extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 및 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 단백질을 포함하며 nuclear factor kappa B (NF-κB)의 활성화에 관여한다[8]. NF-κB가 활성화되면 결합해 있던 inhibitory kappa B alpha (IκB-α)가 분해되어 NF-κB가 세포 외 환경에서 핵으로 전위되고, 이후 iNOS, COX-2, 염증성 사이토카인 발현의 전사인자로서 중요한 역할을 한다[18, 27]. 따라서, MAPKs와 NF-κB의 조절은 항염증 효과에 대한 중요한 표적으로 인식

<sup>†</sup> Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2974, 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.

되고있다.

풀무치(*Locusta migratoria*)는 메뚜기목(Orthoptera) 메뚜기과(Acrididae)에 속하는 식용곤충으로 아시아, 아프리카, 오스트레일리아, 유럽 등을 포함하여 전세계적으로 서식한다[15]. Cao 등[3]에 따르면 풀무치는 단백질, 아미노산, 미네랄, 비타민과 같은 영양성분이 풍부하고, 특히 필수아미노산 함량(45.6%)이 FAO/WHO의 기준(35%) 보다 높다고 보고하며 영양요구를 충족시킬 수 있는 좋은 단백질 공급원이라고 제안하였다. 최근 풀무치의 아급성독성 연구에서 동결건조 분말을 90일 동안 연속적으로 750, 1500, 3000 mg/kg/day로 경구투여한 결과, no-observed-adverse-effect-level (NOAEL)이 암컷과 수컷 랫드 모델에서 3,000 mg/kg/day 이상임을 밝혔다[14]. 풀무치에 관한 연구로는 *L. manilensis*로부터 분리한 펩타이드의 항노화 효과[3], 에탄올 추출물을 이용한 BV-2 미세아교세포에서 신경염증 억제 효과[15], RAW264.7 파골세포에서 분화 억제 효과[2], MG-63 조골세포의 분화 촉진 효과[1]가 보고되고 있으나 풀무치의 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 부족한 실정이다. 최근 본 연구진은 풀무치 전사체 분석을 통하여 항균 활성을 가지는 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)를 선별한 바 있다[16]. 따라서 본 연구에서는 선행연구를 통하여 선별된 풀무치 유래 항균 펩타이드인 locustacin의 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성량과 염증성 사이토카인 함량 등 염증매개인자들의 발현 양상을 분석하였고, 그 조절 기전으로 MAPKs와 NFκB 신호 전달을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 펩타이드

풀무치 유래 항균 펩타이드 locustacin은 에니젠(주)(Gwangju, Korea)에서 고상법을 이용하여 95% 이상의 순도로 합성하였다. 펩타이드는 -20°C에서 냉동 보관하며 0.01% 아세트산용액에 녹여 사용하였다.

### 세포배양

RAW264.7 세포는 American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며 10% fetal bovine serum (HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)와 1× penicillin-streptomycin (HyClone Laboratories Inc.)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, HyClone Laboratories Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포는 2-3일 간격으로 계대배양하며 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

RAW264.7 세포는 96-well plate (SPL Life Sciences Co.,

Ltd., Pocheon, Korea)에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 18시간 동안 배양하였다. Locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

### Nitric oxide (NO) 저해 활성 측정

RAW264.7 세포에 대한 locustacin의 NO 저해 활성을 확인하기 위하여 NO plus detection kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, Korea)를 사용하여 제시된 방법으로 측정하였다. RAW264.7 세포는 96-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd.)에 8×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 18시간 동안 배양하였다. Locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml LPS 용액을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 상등액 100 µl와 sulfanilamide 용액 50 µl를 혼합한 다음 상온에서 5분간 반응시켰다. 반응 용액에 naphthylethylenediamine 용액 50 µl를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 내의 NO 농도는 nitrite 표준 용액의 농도별 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RAW264.7 세포는 6-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd.)에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 18시간 동안 배양하였다. Locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml LPS 용액을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 상등액의 interleukin (IL)-6와 IL-β 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였다.

### qRT-PCR

RAW264.7 세포는 6-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd.)에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 18시간 동안 배양하였다. Locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml LPS 용액을 첨가하여 5시간 동안 배양하였다. Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하였고, 50배 희석한 후 UV/VIS 분광광도계(Beckman coulter, Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. 이후 high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, AMPIGENE qPCR Green Mix Lo-ROX (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)를 사용하여 qRT-PCR 반응을 수행하였다. qRT-PCR에 사용한 각 유전자의 primer는 Table 1에 제시하였으며 유전자의 상대적 발현양

은 동일한 시료의 GAPDH의 발현양을 이용하여 비교하였다.

**Western blot**

RAW264.7 세포는 6-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd.)에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 18시간 동안 배양하였다. Locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml LPS 용액을 첨가하여 30분 또는 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 protease와 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)이 함유된 M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 lysis시킨 후 4℃에서 원심분리(12,000 rpm, 15분)하여 상층액을 얻었다. Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 단백질을 정량한 후, SDS-PAGE gel에서 전기영동을 통해 분자량에 따라 단백질을 분리하고, PVDF membrane으로 transfer 하였다. Membrane은 5% skim milk 용액으로 blocking 한 후 iNOS, COX-2, p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK, JNK 및 β-actin 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 4℃에서 overnight으로 반응시키고, 이어서 2차 항체(Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 반응시킨 후 enhanced chemiluminescent (ECL) Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

**통계처리**

실험 결과는 3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타냈다. 실험군 간의 유의성은 Student's *t*-test를 통해 검정하였고, *p*<0.05일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**LPS로 자극한 마우스 대식세포에서 locustacin의 NO 저해 활성**

Locustacin이 RAW264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로

24시간 처리한 후 MTS assay를 통해 세포의 증식 및 독성을 확인하였다(Fig. 1A). Locustacin의 모든 처리 농도는 세포 독성이나 성장 저해 효과가 관찰되지 않아 이 결과를 바탕으로 동일한 농도 범위에서 이후 실험을 진행하였다. NO는 LPS로 유도된 염증반응으로 생성되며, NOS에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화될 때 생산되는 반응성이 높은 radical이다 [13]. 일반적으로 NO는 박테리아를 제거하는 역할을 하지만 과잉으로 생성될 경우 염증을 일으켜 조직 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발한다[28]. 또한, 외부 자극으로 인해 손상을 입은 세포는 세포막 인지질로부터 arachidonic acid가 유리되어 COXs에 의해 다양한 염증반응 매개인자인 prostaglandins (PGs)를 생성하는데, PG류 중에서도 특히 PGE2가 염증반응에 관련이 있으며 종양의 세포사멸을 억제하여 종양 생성에 기여한다[21]. 본 연구에서는 locustacin의 항염증 효과를 확인하기 위하여 locustacin을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, LPS로 자극한 RAW264.7 세포배양 상층액에서 염증지표인 NO 생성 억제 효과를 확인하였다(Fig. 1B). LPS 단독처리군은 무처리 대조군에 비해 NO 생성이 현저히 증가하였으나, locustacin을 함께 처리한 실험군에서는 LPS 단독처리군에 비해 농도의존적으로 최대 80%까지 억제되었다. 한편, RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 locustacin의 억제 효과가 iNOS와 COX-2의 발현 조절과 관련이 있는지 조사하기 위하여 qRT-PCR과 western blot을 수행하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, LPS 단독처리군은 대조군에 비해 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰으나 locustacin 처리에 의해 농도의존적으로 감소하였다. LPS로 자극되어 활성화된 대식세포는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 증가시킨 반면, locustacin 50 µg/ml 농도 이상에서 발현이 억제되었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 갯지렁이 (*Marphysa sanguinea*) 유래 펩타이드(NCWPFGQVPLGFQAPP; Mw 1757.86 kDa)가 LPS (2 µg/ml)로 자극된 NO 생성과 iNOS의 단백질 발현을 25와 50 µM에서 감소시킨 Park 등[23]의 연구와 유사한 농도에서 효과적임을 확인할 수 있었다. 따라서 locustacin은 iNOS와 COX-2 유전자 및 단백질 발현을

Table 1. Sequences of primes used for qRT-PCR

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

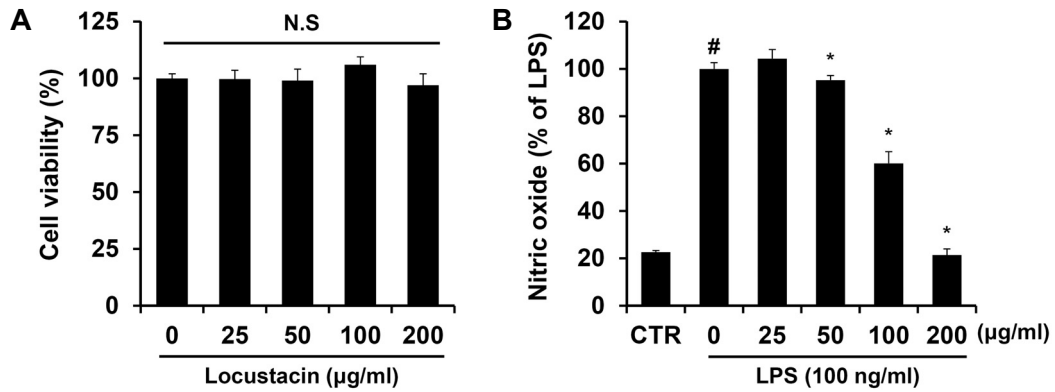


Fig. 1. Effects of locustacin on cell viability (A) and nitric oxide production (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cell viability was determined from the 24 hr culture of RAW264.7 cells in the presence of locustacin. To examine nitric oxide levels, RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with locustacin (25, 50, 100, 200 µg/ml) and then stimulated for 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus locustacin. Values are presented as the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. control (CTR) group, \**p*<0.05 vs. LPS-treated group. N.S; not significant.

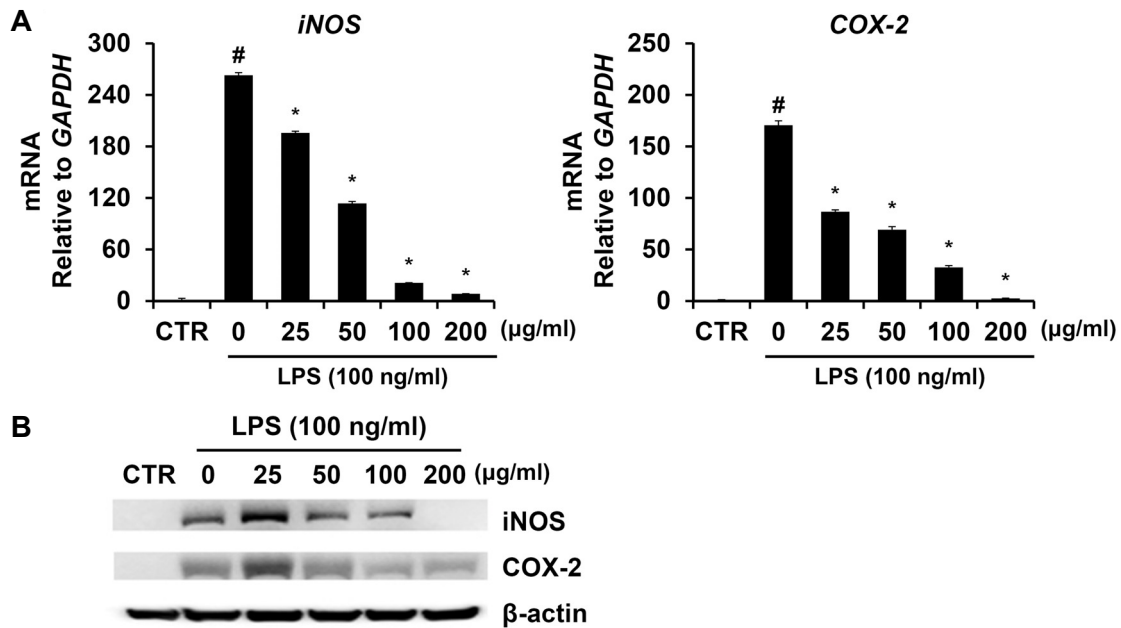


Fig. 2. Effects of locustacin on mRNA expression (A) and protein expression (B) of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with locustacin (25, 50, 100, 200 µg/ml) and then stimulated for 5 hr or 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus locustacin. Values are presented as the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. #*p*<0.05 vs. control (CTR) group, \**p*<0.05 vs. LPS-treated group.

억제함으로써 NO 생성을 조절 한 것으로 판단된다.

### LPS로 자극한 마우스 대식세포에서 locustacin의 염증성 사이토카인 조절 효과

염증성 사이토카인은 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자로 TNF-α, IL-6 및 IL-1β는 염증반응을 조절하는 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려져 있다[20, 28]. 이러한 이유로 LPS에 의해 활성화된 대식세포는 다양한 염증 관련 사이토카인을 생성함으로써 염증반응을

매개하는 것으로 보고되어 있다[19]. 따라서 locustacin이 대식세포의 염증반응에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 농도별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 1시간 전 처리한 후, LPS로 염증반응을 유도하여 염증성 사이토카인(IL-6와 IL-1β)의 함량과 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과, LPS에 의한 대식세포의 IL-6와 IL-1β 유전자 발현 증가는 locustacin 처리에 의해 농도의존적으로 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 3A). 또한, LPS 단독처리군은 무처리 대조군에 비해 IL-6와 IL-1β 함량이 현저히 증가되었으

나, locustacin 처리로 인해 IL-6와 IL-1 $\beta$  분비량이 농도의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 염증성 사이토카인 함량 측정 결과는 앞서 확인한 유전자 발현 결과와 일치하였으며, 특히 locustacin의 농도가 50  $\mu\text{g/ml}$  이상일 때 약 50% 이상의 억제율을 나타내었다. 본 연구 결과는 염증성 사이토카인 생성 억제 효능을 보인 딱정벌레(*Allomyrina dichotoma*) 유래 항균 펩타이드 allomyrinasin의 농도(100과 200  $\mu\text{g/ml}$ )와 비교하여 저용량(25  $\mu\text{g/ml}$  이상)에서 보다 효과적임을 확인할 수 있었다[17]. 이와 같이 locustacin은 염증성 사이토카인의 분비 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

**LPS로 자극한 마우스 대식세포에서 locustacin의 MAPKs 발현 조절 효과**

MAPKs는 ERK, p38과 JNK의 세가지 주요 하위 유형으로 구성되며 염증 조절에 중요한 역할을 한다. 또한, 염증반응에서 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로는 대식세포가 휴지기일 때 NF- $\kappa$ B 이량체와 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 결합된 상태로 세포질에서 불활성 형태로 존재하지만, 세포가 자극되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 인산화되어 NF- $\kappa$ B 이량체로부터 분리된다. 분리된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 proteosome에 의해 분해되고 이때 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 핵으로 전위되어 표적 유전자의 전사를 활성화시킨다[4, 7]. 한 연구에서는 NF- $\kappa$ B 전사

인자가 TLR4를 통해 LPS에 의해 활성화된 염증 유발 유전자 전사의 주요 조절자 중 하나라고 보고하였다[9]. 본 연구에서 LPS 단독처리군은 ERK, p-38와 JNK의 인산화가 현저하게 증가되었지만, locustacin의 처리에 의해 인산화가 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한, locustacin은 LPS 단독처리군에 비해 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 유의하게 억제하였다(Fig. 4B). Gao 등[6]은 철갑상어 근육 유래 펩타이드(12.5, 25, 50  $\mu\text{M}$ )가 LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ )자극으로 증가한 염증성 사이토카인 (IL-6, IL-1 $\beta$ ) 함량을 억제하고, MAPKs 중 JNK와 p38의 인산화 수준을 농도 의존적으로 감소하였다고 보고하였으며, locustacin과 유사한 경향을 나타내었다. Shim 등[24]의 연구에서 항균 펩타이드(WALK11; tryptophan-containing, amphipathic-helical leucine/lysine undecapeptides)는 상대적으로 낮은 농도(2  $\mu\text{M}$ )에서 LPS (100 ng/ml)로 유도된 MAPKs의 인산화 및 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해를 억제하는 것으로 보고된 바 있다. 펩타이드를 활용한 이전의 연구들에서 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로의 조절이 염증 억제에 중요한 역할을 한다고 보고한 바와 같이 본 연구에 이용한 풀무치 유래 항균 펩타이드 locustacin은 LPS 처리된 대식세포에서 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로의 활성의 억제를 통해 하위 염증 매개체를 억제하므로 항염증 소재 개발에 이용 가능할 것으로 사료된다.

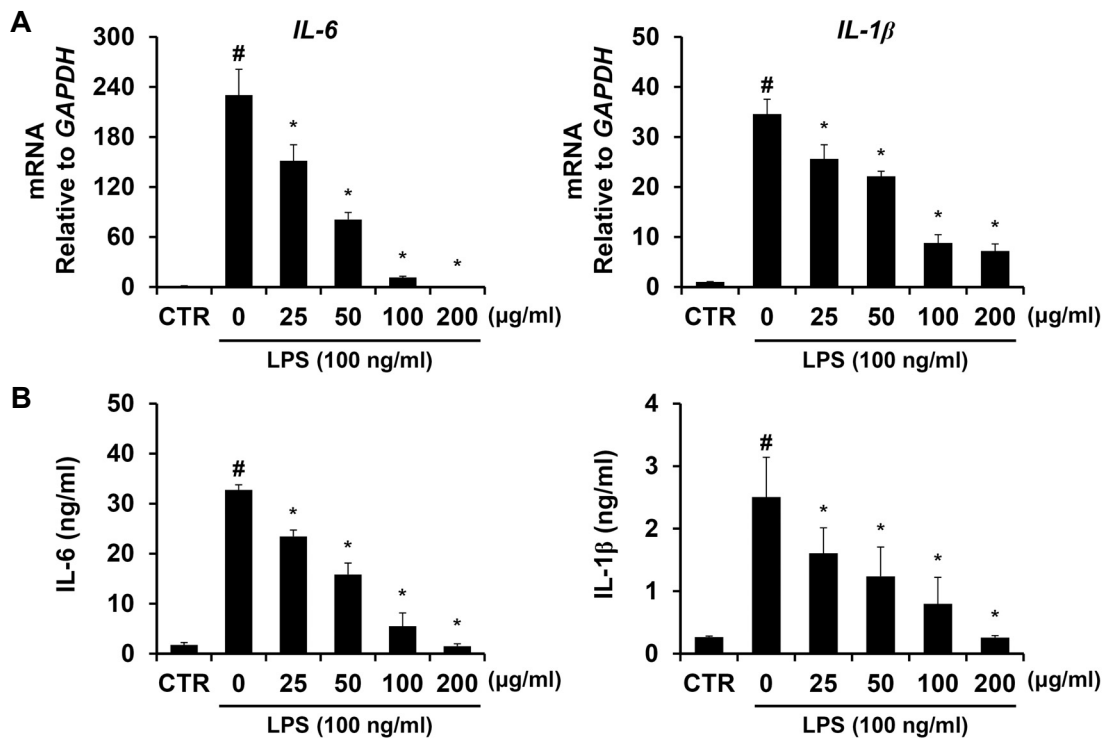


Fig. 3. Effects of locustacin on mRNA expression (A) and production (B) of IL-6 and IL-1 $\beta$  in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with locustacin (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) and then stimulated for 5 hr or 24 hr with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus locustacin. Values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments. # $p$ <0.05 vs. control (CTR) group, \* $p$ <0.05 vs. LPS-treated group.

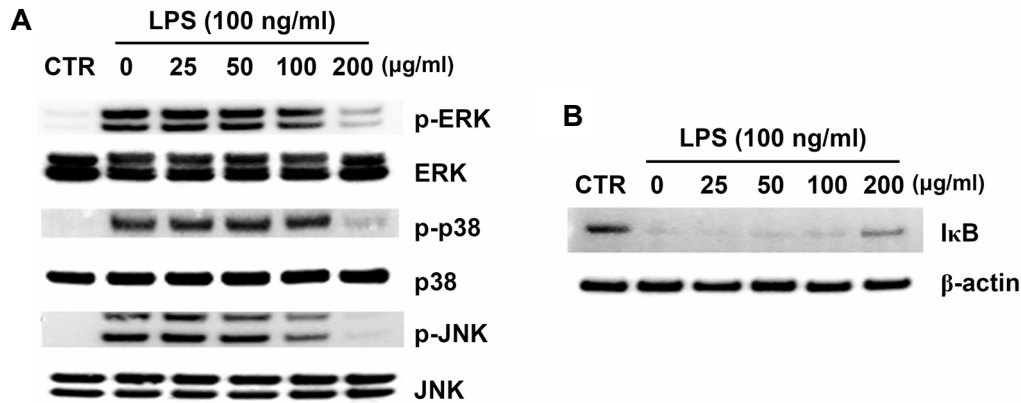


Fig. 4. Effects of locustacin on the protein expression of MAPKs (A) and IκB-α (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pre-incubated for 1 hr with locustacin (25, 50, 100, 200 μg/ml) and then stimulated for 30 min with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) alone or LPS plus locustacin.

### 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(320012-2).

### The Conflict of Interest Statement

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

### References

- Baek, M., Seo, M., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A. and Hwang, J. S. 2018. Osteoblastogenic activity of *Locusta migratoria* ethanol extracts on pre-osteoblastic MG-63 cells. *J. Life Sci.* **28**, 1448-1454.
- Baek, M., Seo, M., Lee, J. H., Lee, H. J., Kim, I. W., Kim, S. Y., Kim, M. A., Kim, S. Y. and Hwang, J. S. 2019. Inhibitory effects of *Locusta migratoria* ethanol extracts on RANKL-induced osteoclast differentiation. *J. Life Sci.* **29**, 1104-1110.
- Cao, H., Luo, Q., Wang, H., Liu, Z., Li, G. and Liu, J. 2019. Structural characterization of peptides from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen, 1835) and anti-aging effect in *Caenorhabditis elegans*. *RSC Advances* **9**, 9289-9300.
- Capece, D., Verzella, D., Di Francesco, B., Alesse, E., Franzoso, G. and Zazzeroni, F. 2020. NF-κB and mitochondria cross paths in cancer: mitochondrial metabolism and beyond. *Semin. Cell Dev. Biol.* **98**, 118-128.
- Ferrero Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. and Girardin, S. E. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin 1β generation. *Clin. Exp. Immunol.* **147**, 227-235.
- Gao, R., Shu, W., Shen, Y., Sun, Q., Bai, F., Wang, J., Li, D., Li, Y., Jin, W. and Yuan, L. 2020. Sturgeon protein-derived peptides exert anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via the MAPK pathway. *J. Funct. Foods* **72**, 104044.
- Gao, R., Shu, W., Shen, Y., Sun, Q., Jin, W., Li, D., Li, Y. and Yuan, L. 2021. Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF-κB pathways. *Food Sci. Hum. Wellness* **10**, 103-111.
- Guha, M. and Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**, 85-94.
- Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S. and Sukkar, M. B. 2013. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Mol. Immunol.* **56**, 739-744.
- Ji, J. D., Lee, Y. H. and Song, G. G. 2004. Prostaglandin E2 (PGE2): Roles in immune responses and inflammation. *J. Kor. Rheum. Assoc.* **11**, 307-316.
- Kim, B. H., Lee, Y. T. and Kang, K. H. 2010. *Codonopsis lanceolata* inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **24**, 80-84.
- Kim, M. K. and Kim, D. Y. 2015. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 735-743.
- Kim, S. J., Kim, T. J., Kim, E. H. and Kim, Y. M. 2020. Anti-inflammatory and anti-oxidant studies of Osung-tang extracts in LPS-induced RAW264.7 cells. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **33**, 1-11.
- Kwak, K. W., Kim, S. Y., An, K. S., Kim, Y. S., Park, K., Kim, E., Hwang, J. S., Kim, M. A., Ryu, H. Y. and Yoon, H. J. 2020. Subacute oral toxicity evaluation of freeze-dried powder of *Locusta migratoria*. *Food Sci. Anim. Resour.* **40**, 795.
- Lee, H. J., Seo, M., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, S. Y., Hwang, J. S. and Kim, M. A. 2018. Anti-neuroinflammatory effects of a *Locusta migratoria* ethanol extract in LPS-stimulated BV-2 microglia. *J. Life Sci.* **28**, 1332-1338.
- Lee, J. H., Chung, H., Shin, Y. P., Kim, I. W., Natarajan, S., Veerappan, K., Seo, M., Park, J. and Hwang, J. S. 2021. In silico strategic curation, retrieval and prediction of novel antimicrobial peptide from *Locusta migratoria* transcriptome.

- J. Asia Pac. Entomol.* **24**, 237-242.
17. 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.
  18. Majdalawieh, A. and Ro, H. S. 2010. Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  function and NF- $\kappa$ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm.* **2010**, 823821.
  19. Martinez, F. O., Helming, L. and Gordon, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 451-483.
  20. Namkoong, S., Jang, S. A., Sohn, E. H., Bak, J. P., Sohn, E., Koo, H. J., Yoon, W. J., Kwon, J. E., Jeong, Y. J., Meng, X., Han, H. S. and Kang, S. C. 2015. Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. *Kor. J. Plant Res.* **28**, 145-152.
  21. Oh, S., Park, H. S., Kim, E. H. and Kim, Y. M. 2019. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Danpitang in RAW 264.7 cell. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **32**, 37-47.
  22. 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.
  23. Park, Y. R., Park, C. I. and Soh, Y. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory effects of NCW peptide from clam worm (*Marphysa sanguinea*). *J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1387-1394.
  24. Shim, D. W., Heo, K. H., Kim, Y. K., Sim, E. J., Kang, T. B., Choi, J. W., Sim, D. W., Cheong, S. H., Lee, S. H., Bang, J. K., Won, H. S. and Lee, K. H. 2015. Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of toll-like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *PLoS One* **10**, e0126871.
  25. Shin, J. S., Kim, J. M. and An, W. G. 2012. Anti-inflammatory effect of red ginseng through regulation of MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **26**, 293-300.
  26. Turini, M. E. and DuBois, R. N. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **53**, 35-57.
  27. Woo, H. S., Lee, S. M., Heo, J. D., Lee, M. S., Kim, Y. S. and Kim, D. W. 2018. Anti-inflammatory activity of extracts of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Plant Res.* **31**, 466-477.
  28. Yang, E. J., Hyun, K. H., Choi, H. R., Kim, S. Y. and Hyun, C. G. 2018. Anti-inflammatory activity of *Rumex acetosella* extracts from Jeju Island. *KSBB. J.* **33**, 155-160.
  29. Yim, C. Y. 2010. Nitric oxide and cancer. *Kor. J. Med.* **78**, 430-436.

## 초록 : 풀무치 유래 항균 펩타이드 locustacin의 항염증 활성

최라영<sup>†</sup> · 이준하<sup>†</sup> · 서민철 · 김인우 · 황재삼 · 김미애\*

(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충양잠산업과)

본 연구는 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW264.7 세포에 대한 풀무치 유래 항균 펩타이드 locustacin의 항염증 메커니즘을 조사하였다. Locustacin (50, 100, 200  $\mu$ g/ml)은 세포 독성 없이 LPS로 자극된 대식세포의 nitric oxide (NO) 생성을 유의하게 감소시켰고, 단백질과 mRNA 수준에서 inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 전염증 매개체의 발현을 억제하였다. Locustacin은 LPS 처리로 증가된 염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-6 및 IL-1 $\beta$  함량과 이들의 유전자 발현을 모든 처리 농도에서 농도의존적으로 감소시켰다. 한편, LPS에 의해 인산화된 extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 및 c-Jun N-terminal kinase (JNK)는 locustacin (100, 200  $\mu$ g/ml) 처리로 억제되었다. 또한, LPS에 의해 유도된 inhibitory kappa B alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ )의 분해를 locustacin이 단백질 수준에서 억제한다는 것을 발견했다. 결론적으로, locustacin은 LPS 처리된 대식세포에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 인산화, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 활성화 및 하위 염증 매개체를 억제함으로써 항염증 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 풀무치 전사체 분석을 통해 확인된 locustacin이 항염증제 후보물질로서 개발 가능성이 있음을 제시한다.