

ORIGINAL ARTICLE

Lipopolysccharides에 의해 활성화된 미세아교세포에서 수질(水蛭) 추출물의 NF- κ B 억제를 통한 뇌신경염증 억제 효과

박건혁^{1),2)} · 양선규¹⁾ · 문병철¹⁾ · 노수민¹⁾ · 임혜선^{1)*}

¹⁾한국한의약연구원 한약자원연구센터, ²⁾과학기술연합대학원대학교(UST) 한의융합의학전공

Inhibitory Effect of Hirudo on Neuroinflammation in LPS-stimulated Microglial Cells

Gunhyuk Park^{1),2)}, Sungyu Yang¹⁾, Byeong Cheol Moon¹⁾, Sumin Noh¹⁾, Hye-Sun Lim^{1)*}

¹⁾Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Korea

²⁾University of Science & Technology(UST), Korean Convergence Medicine Major, Campus of Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34113, Korea

Abstract

Today, environmental pollution has been found to be one of the causes of various diseases, including brain and nervous system diseases. In particular, neurodegenerative diseases have been found to be caused by hyperactivation of immune system cells such as microglia. Preventive and therapeutic measures are needed to suppress them. Hirudo is known as a traditional herbal medicine, based on its multiple biological activities such as anti-eczema and anti-coagulation. In the present study, the anti-neuroinflammatory potential of hirudo extract was investigated in lipopolysccharide (LPS)-stimulated BV2 microglial cells and in mice. Hirudo extract significantly inhibited LPS-stimulated nitric oxide (NO) production and cytokine (IL-1 α , KC, MCP-5, and RANTES) expression in a dose-dependent manner without causing cytotoxicity. Pretreatment with hirudo extract suppressed LPS-induced NF- κ B p65 nuclear translocation. Moreover, hirudo extract reduced LPS-stimulated microglial activation and improved memory impairments. The results demonstrated that hirudo extract exerts anti-neuroinflammation activities, partly through inhibition of the NF- κ B signaling pathway. These findings suggest that hirudo extract might have therapeutic potential with respect to neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

Key words : Neuroinflammation; Hirudo; Hippocampus; NF- κ B

1. 서론

과학 기술의 발전으로 산업이 고도화되면서 삶이 양적으로 팽창하고 편리해졌으나 산업화에 동반된 환경오염 때문에 인류는 재앙 수준의 건강 위협에 처하면서 역설적으로 삶의 질은 점차 악화되어가고 있다(Han,

2019). 2018년 발표된 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 자료에 의하면, 2016년 기준으로 세계 인구 91% 이상이 WHO 공기질 권장 기준(WHO air quality guidelines level)에 미치지 못하는 지역에 살고 있으며 대기 오염에 의한 조기 사망이 연간 420만 명에 이른다고 한다(Han, 2019; Goshua et

Received 15 February, 2023; Revised 8 March, 2023;

Accepted 15 March, 2023

*Corresponding author : Hye-Sun Lim, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Korea

Phone : +82-61-338-7124

E-mail : qp1015@kiom.re.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© 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.

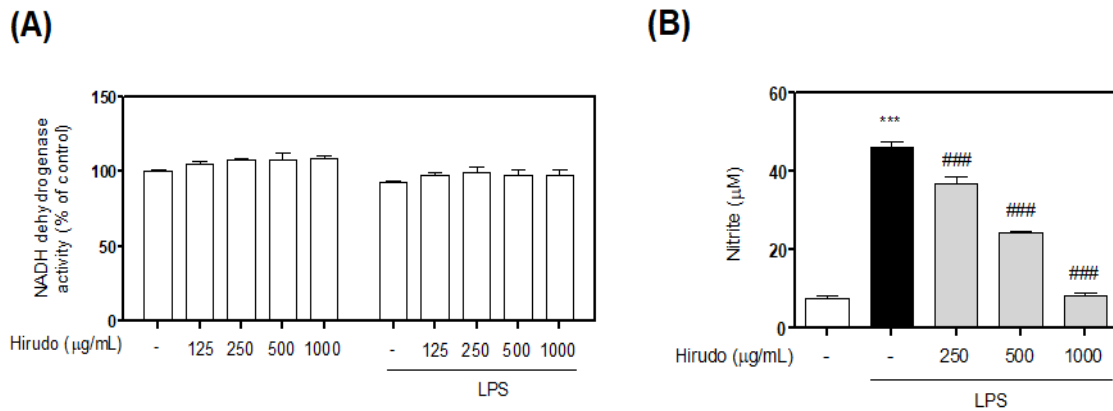


Fig. 1. Effect of hirudo on LPS-induced NADH dehydrogenase activity and nitric oxide levels in BV2 cells. NADH dehydrogenase activity was measured using MTT (A). Nitric oxide levels were measured using an Gress reagents (B). Values are presented as mean \pm SEM. *** p <0.001 and ### p <0.001; one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was performed using the GraphPad Prism software.

al., 2022). 이는 전쟁, 말리리아, 결핵, 약물 등에 의한 조기사망에 보다는 높은 사망자 수이며, 흡연에 의한 사망자 수와 비슷한 정도로 위험 단계에 접어들고 있다 (Han, 2019; Goshua et al., 2022). 그 중 대기오염은 2000년 290만명에서 2019년 450만 명으로 꾸준히 증가세를 보이고 있어 많은 과학자들은 이에 대한 질병의 유병율과 원인 및 예방, 치료에 대한 연구를 집중적으로 시도하고 있다(Han, 2019; Goshua et al., 2022). 그 결과 현재까지 발표에 의하면 호흡기질환, 심혈관대사질환, 인지장애 및 유아발달장애와 같은 질환에 밀접한 관련이 있다고 보고되었으며, 놀랍게도 오염된 공기의 독성인자는 혈류를 통해 폐에서 뇌로 운반되어 뇌신경학적 손상을 일으킬수 있다는 것이 밝혀졌다(Adivi et al., 2020; Tran et al., 2020; Goshua et al., 2022). 이 뿐만 아니라 다른 대사기관보다 뇌에 더 오랜 시간동안 머무른다는 것이 발표되어 타 장기에 비해 뇌에 더욱 치명적이라는 연구 결과가 보고 되었다(Adivi et al., 2020; Tran et al., 2020).

뇌는 신경세포를 보호하기 위한 다양한 수단 중에 면역이 가장 중요한 인자로 여겨지고 있으며, 이에 면역을 담당하는 미세아교세포는 중추신경계에서 매우 중요한 세포로 알려져 있다(Jang et al., 2020; Park et al., 2020). 또한, 미세아교세포의 활성화는 약물 또는 독소에 의해 이물질을 제거하고 신경성장인자 등을 분비하여 신경계의 항상성을 유지하는데 반드시 필요한 역할을 담당한다(Jang et al., 2020; Park et al., 2020). 그

러나 손상된 신경세포로부터 발생하는 신호 또는 외부 자극에 의해 변형된 비정상적 단백질, 병원체침투, 환경성 데미지 등과 같은 스트레스에 노출되면 미세아교세포의 활성이 과도하게 신경염증반응을 보이게 되고 이는 신경세포의 손상을 유발하여 파킨슨병, 치매, 뇌경색 등을 포함하는 신경퇴행성질환을 일으킬 수 있다고 보고되고 있다(Jang et al., 2020; Park et al., 2020). 따라서, 많은 연구자들은 신경세포 손상을 유도하는 신경염증반응의 제어가 퇴행성신경 질환을 예방 및 치료 수단으로 인식하여 미세아교세포의 과도한 활성 억제를 위한 소재 개발 연구가 진행되고 있다.

고대 그리스에서도 의료용으로 사용했다는 기록이 있는 수질(水蛭: hirudo)은 거머리과에 속한 환절동물인 참거머리 또는 말거머리의 몸체이며, 여름과 겨울에 잡아 끓는 물에 탕사(燙死)시킨다음 건조한 것을 뜻한다(Karataş et al., 2020; Aminov et al., 2021). 서양에서는 혈액 응고를 방지하거나, 지속적인 방혈을 위해 흡혈하는 용도로 사용했다고 기록되어 있으며, 동양에서는 거머리의 몸체를 건조하여, 어혈을 풀어주는 약으로 사용해왔다(Karataş et al., 2020; Aminov et al., 2021). 특히 수질의 생리활성물질인 hirudin은 현존하는 가장 강력한 혈액응고효소억제제로 많은 제약사에서 이를 개발하고자 노력하고 있다(Karataş et al., 2020; Aminov et al., 2021). 그러나 현재까지도 뇌신경계 질환에 대한 연구는 미비한 실정이며, 이번 연구에서는 뇌염증을 주관하는 미세아교세포의 활성 억제

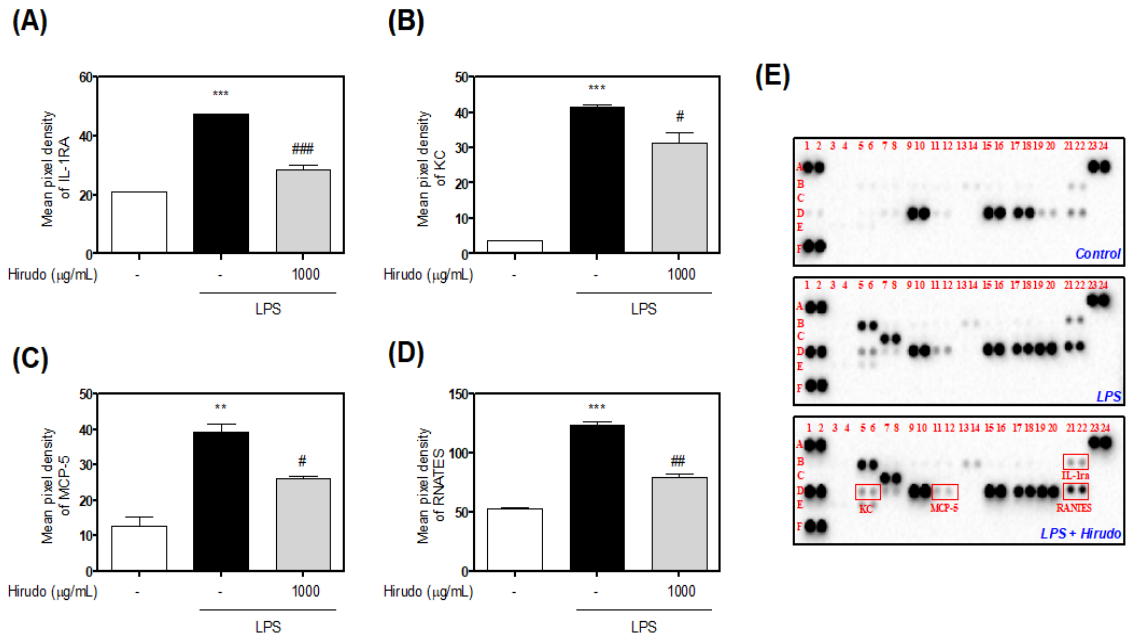


Fig. 2. Inhibitory effect of hirudo on LPS-induced neuroinflammatory signaling factors. Densitometric ratios of the arrays showed differences in the cytokine markers (IL-1Ra, KC, MCP-5, and RANTES). Bar graphs represent the relative 4 expression of IL-1Ra, KC, MCP-5, and RANTES. Values are presented as mean ± SEM. ***p<0.001, #p<0.05, and ###p<0.001; one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was performed using the GraphPad Prism software.

및 인지장애 개선에 보이는 유의미한 과학적 근거를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin / streptomycin (P/S)은 Gibco Industries Inc.에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), vectashield mounting medium, lipopolysaccharide (LPS), Phosphate Buffer Saline (PBS) 등은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB), lamin B은 Cell signaling사에서 구입하였으며, iba-1은 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다. 본 연구

에 사용된 hirudo extract의 표본은 한국한의학연구원 한약표준표본관에 보관하였다(KIOM-3-18-0040).

2.2. 세포 배양 및 신경독성 연구

세포 실험 방법은 이전 논문에 상세하게 기술되어 있으며, 37℃의 5% CO₂, 95% 조건에서 10% FBS, 1% P/S를 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다(Jang et al., 2020; Park et al., 2020). 96-well plate에 BV2 cell은 1.5 × 10⁴/well로 seeding하고 12시간 배양한 후, 독성을 보이지 않는 농도도 한정하여 hirudo extract를 1-1000 μg/mL 농도별로 1 시간 동안 전처리 후 23 시간 LPS를 함께 처리하였다. 반응이 끝난 후 상층액을 회수하여 Nitric Oxide (NO)를 측정하였으며, 제거된 세포는 MTT를 2시간 처리 후 DMSO를 이용해 decrystalize시켜 Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)H dehydrogenase activity를 측정하였다.

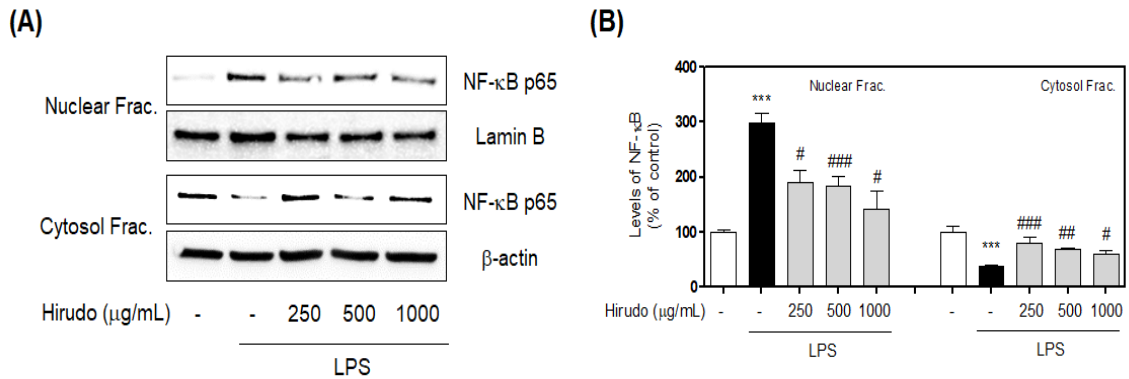


Fig. 3. Inhibitory effect of hirudo on LPS-induced NF- κ B levels. Nuclear and cytoplasmic NF- κ B p65 was measured using Western blotting. Bar graphs represent the relative expression of NF- κ B levels. Values are presented as mean \pm SEM. *** p <0.001, # p <0.05, ### p <0.01, and #### p <0.001; one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was performed using the GraphPad Prism software.

2.3. Nitric oxide 측정

BV2 cell에 hirudo extract를 1시간 전처리 후, 염증 반응을 유도하기 위하여 LPS를 처리하고 24시간 배양한 다음 상등액을 회수하였다. 상등액과 Griess 시약(sulfanilamide:N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride=1:1)를 동량 혼합하여 5-10분 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하고 다음 표준 곡선에 따라 nitrate 양을 계산하였다.

2.4. Cytokine array 분석

BV2 cell에 hirudo extract를 1시간 전처리 한 후, LPS를 처리하고 24시간 동안 배양한 다음 상등액을 회수하였다. 사이토카인 생성에 대한 hirudo extract의 효과를 알아보기 위해 cytokine array kit (R&D system, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 배양액 내에 존재하는 사이토카인 분비량을 측정하였다.

2.5. 사육과 투여

C57BL/6 생쥐 8 주령을 두얼바이오텍(Seoul, Korea)을 통해 구입하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도($53 \pm 3\%$) 및 명암 주기(12시간)는 자동적으로 조절되도록 하였다. 본 실험은 한국한의학연구원 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인 번호: 20-003,

21-039). 제1군(대조군, $n=7$) 및 제2군(LPS군, $n=7$)은 식염수를 10 일간 1일 1회 경구 투여하였고, 제3, 4군(hirudo 투여군, $n=7$)은 식염수에 용해시킨 hirudo를 파일릿 예비실험(data not shown)을 통해 독성을 보이지 않았던 농도인 10 또는 50 mg/kg으로 10일간 1일 1회 경구 투여하였다. 또한 제5군(Dex 투여군, $n=7$)은 식염수에 용해시킨 텍사메타손을 10 mg/kg으로 10일간 1일 1회 경구 투여하였다. 본 연구에서는 chronic LPS모델을 사용하였으며, 경구투여 2시간 전 생리식염수 또는 LPS를 생쥐 체중 kg당 5 mg 씩 복강투여 하였다.

2.6. 행동평가

인지장애 행동 패턴을 확인하기 위해 Y-maze를 실시하였으며, LPS투여 마지막날인 10일 후, 실험의 방법은 이전에 발표된 논문에 의거하여 평가하였다(Park et al., 2017). 각 실험은 3회 연습 후 2회 본 실험의 평균값을 사용하였다.

2.7. 면역염색법

고정 후 $30 \mu\text{m}$ 로 절단된 뇌조직의 흑질 부분을 골라 PBS워싱 후, H_2O_2 로 30분간 처리하였으며, 그 후 rabbit-anti-iba-1을 12시간 반응시켰다. 그 후 2차 rabbit-antibody와 avidin-biotin complex (ABC) 시약을 차례로 1시간씩 처리하였다. 이후 3,3'-

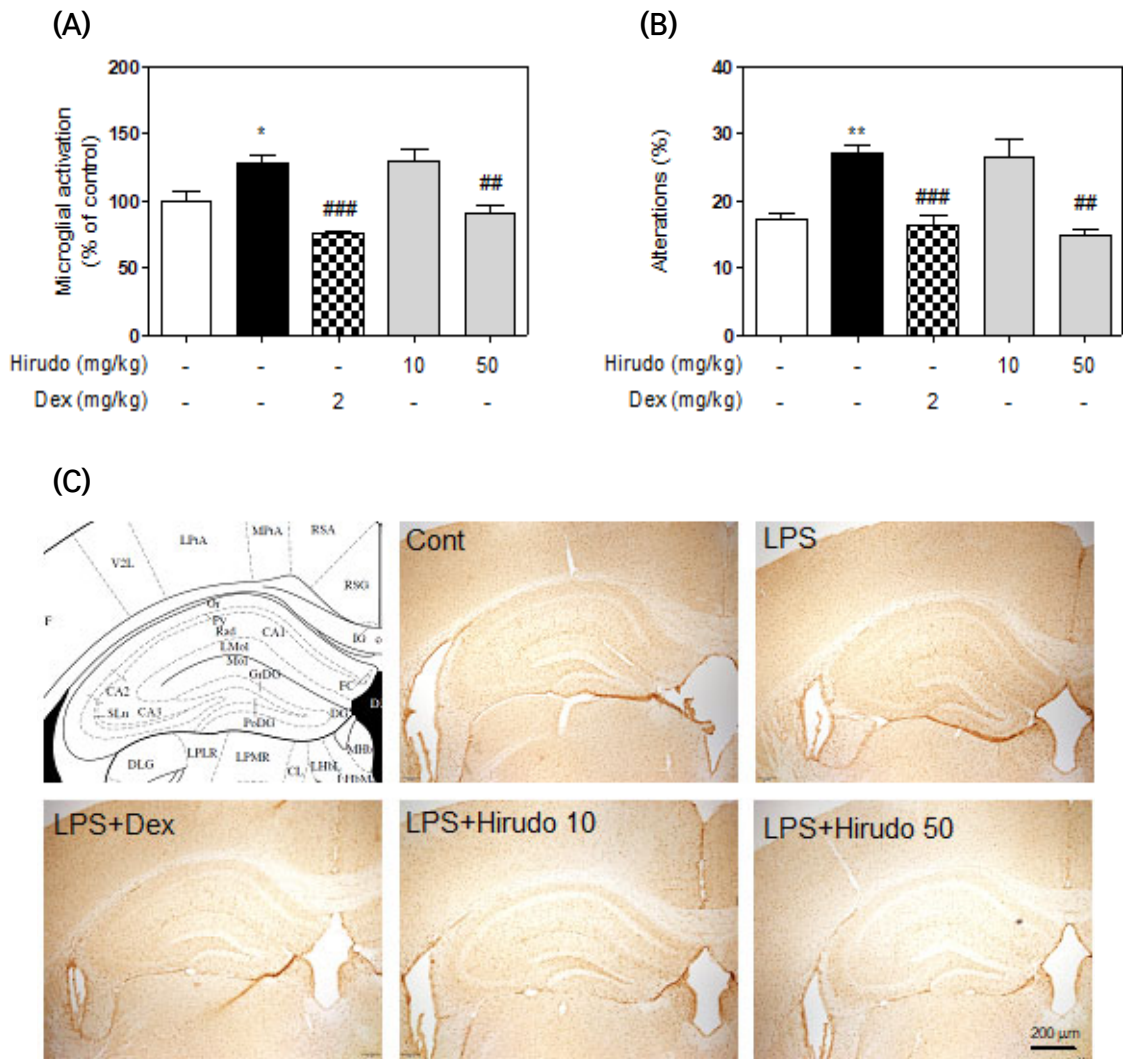


Fig. 4. Inhibitory effect of hirudo on LPS-induced microglial activations in the hippocampus. The number of ionized calcium-binding adapter molecule 1-immunopositive cells in the hippocampus was counted (A) and visualized (B). Moreover, evaluation of memory impairment using a Y-maze (C). *** p <0.001, * p <0.05, and ### p <0.001; one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was performed using the GraphPad Prism software.

diaminobenzidine로 2~5분간 발색하였으며, mounting medium으로 커버슬라이드 부착시켰다. 일정시간 건조후 microscope(Olympus Microscope System BX53; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 사진을 각각 촬영하였으며, ImageJ software (Bethesda, MD, USA)를 활용하여 microglia 양성세포의 개수를 측정하였다.

2.8. Western blot 실험법

약물 처리가 완료된 세포를 lysis buffer를 활용하여 단백질을 확보하였으며, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 polyvinylidene difluoride membrane에 옮긴 다음 transfer하였다. Transfer 후 5% skim milk로

background를 제거하였으며, 1차 antibody(1:500)를 12시간동안 처리 후 2차 antibody(1:1000)를 2 h 반응시켰다. Band density는 Image Quant LAS-4000(GE life sciences, Taiwan)으로 확인 하였다.

2.9. 통계처리

모든 측정값은 mean \pm S.E.M으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 Graphpad Prism 5.0(San Diego, CA) 프로그램을 사용하였으며, one-way ANOVA를 활용하여 처리하였다. 또한 사후검정은 Tukey's test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LPS로 유도된 뇌염증 세포모델에서의 hirudo의 nitric oxide 억제능

우리는 hirudo의 뇌염증 억제 효능을 검증하기 위해 LPS로 유도한 세포모델을 제작하여 확인하였다. 미세아교세포와 같이 면역을 담당하는 세포는 활성화 후 다양한 물질(cytotoxic molecules: tumor necrosis factor- α , nitric oxide 등)을 분비하는데 이는 주변의 신경세포에 치명적 영향을 주어 세포 사멸을 일으킨다고 알려져 있다(Jang et al., 2020). 따라서, 우리는 hirudo을 전처리하여 뇌염증에 의해 분비되는 물질인 nitric oxide가 억제되는지를 확인하였다. 먼저 hirudo에 의해 세포를 사멸시키지 않는 안전한 농도를 확인하기 위해 MTT assay를 실험 하였으며, tetrazolium염인 MTT는 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 formazan으로 환원되어 이는 생존하는 세포 수와 비례하므로 신경세포의 미토콘드리아의 기능을 검토 및 이를 통한 신경세포독성을 확인하는 실험법을 사용하였다. 그 결과, hirudo는 0-1000 μ g/mL까지 신경독성이 없는 것으로 확인되었으며, 이후 LPS로 뇌염증 모델을 제작하여 hirudo를 동일한 농도로 처리한 결과 nitric oxide가 통계적으로 유의하게 억제된 것을 확인하였다.

3.2. LPS로 유도된 뇌염증 세포모델에서의 hirudo의 염증사이토카인 억제능

Cytokine은 신경면역 시스템에서 사용되는 일종의 의사소통 매커니즘으로 미세아교세포 표면의 수용체와

상호작용하여 수용체를 활성화시키고 특정기능을 수행한다. Cytokine은 세포 기반(cell-based)과 체액(humoral)사이의 균형적인 반응을 조절하기 때문에 면역 체계에서 특히 중요하다고 알려져 있으며, 신경세포 집단의 성숙, 성장 및 활동을 조절한다(Park et al., 2017). 우리는 18개의 사이토카인을 동시에 분석할 수 있는 cytokine array를 활용하여 스크리닝 하였으며, hirudo는 LPS에 의해 증가된 각 사이토인 중 Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1Ra), keratinocyte-derived cytokine (KC), monocyte chemoattractant protein (MCP-5), regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES)를 유의미하게 억제하는 것을 알수 있었다.

3.3. LPS로 유도된 뇌염증 세포모델에서의 hirudo의 NF- κ B 억제능

LPS에 의한 신경염증은 toll-like receptor 4(TLR 4)의 활성화에 의해 초기에 조절되며 독성유도물질로 알려진 nitric oxide, prostaglandin E2을 포함한 다양한 사이토카인들에 의해 조절 되기도 하는데 이러한 일련의 과정은 nuclear NF- κ B와 activator protein-1의 신호전달 조절 기전과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Hang et al., 2004). NF- κ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절(immune modulation), 세포고사(apoptosis), 세포증식, 상피세포의 분화(epithelial differentiation) 등에 관여하는 단백질군(protein family)으로 다양한 유전자들의 발현을 조절하며 세포 내의 신호전달 체계의 중심축을 이루고 있다(Hang et al., 2004). 따라서, 뇌신경계에서는 NF- κ B의 조절을 통한 면역조절 및 이를 비롯한 신경세포 사멸 억제, 시냅스저하 억제 등 다양한 기능을 설명하는데 중요한 역할을 해왔다. 이번 연구에서도 hirudo의 항염증억제 기전을 설명하는데 있어 NF- κ B의 활성화는 매우 중요한 연구로 생각되어지며, 그 결과 hirudo는 LPS에 의해 증가된 nucleus NF- κ B의 양을 통계적으로 유의하게 억제되었다.

3.4. LPS로 유도된 뇌염증 동물모델에서의 hirudo의 미세아교세포 억제능 및 행동학적 평가

미세아교세포를 활용한 뇌염증 세포모델에서의

hirudo 효과를 동물실험을 통해 재확인하기 위해 장기 LPS를 주입형 뇌염증 동물 모델을 제작하였다. 이전 연구에 의하면 10일 이상 LPS를 주입할 경우 뇌의 전체적으로 미세아교세포의 활성화가 나타난다고 알려졌다. 이러한 미세아교세포의 활성화는 뇌염증작용이 일어나고 있다는 것을 확인할 수 있는 바이오마커로 여겨져 왔다(Park et al., 2017; Jang et al., 2020). 따라서, 우리는 미세아교세포 활성화 정도를 확인하기 위해 iba-1(미세아교세포 마커)를 활용하여 측정하였다. 그 결과 해마의 신생신경세포가 많이 모여있는 dentate gyrus 부위에 특징적으로 증가된 활성화는 hirudo에 의해 통계적으로 유의하게 감소된 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 해마 부위와 특징적으로 관련이 깊은 행동학적 장애는 대표적으로 인지장애가 있는데, 우리의 연구에서 hirudo가 이를 억제 또는 개선하는 지를 확인하였다. 인지장애 행동실험은 Y-maze를 활용하였고, 세 개의 가지로 구성되어 있는 통로를 마우스가 기억하고 각각을 차례로(겹치지 않고) 들어가는 것을 확인하여 자발적 변경 행동력을 계산한다(Park et al., 2017). 따라서 이러한 실험방법을 활용하여 기억력 테스트를 실행한 결과 hirudo에 의해 통계적으로 유의하게 인지장애가 개선된 것을 알 수 있었다.

4. 결론

우리는 이번 연구를 통해 뇌신경계에 부정적인 영향을 주는 미세아교세포의 활성을 억제하는 약물을 찾고자 노력하였으며, 이를 한국의 전통의학서인 동의보감에서 찾고자 하였다. 동의보감은 한의학의 대표 의학서적으로 2009년 유네스코 지정 세계기록유산으로 등재된 문화유산으로 전세계에서 인정받는 의서이다(Park et al., 2019). 우리 연구진은 오래기간동안 임상학적 근거 구축 및 과학적 이해 등의 이유로 한약재에 대한 연구를 지속해 왔다. 그 중 상대적으로 과학적 근거가 미비한 탕액편 내 충부약재에 속해있는 수질의 효능에 집중하게 되었다. 한의학적으로 hirudo는 성은 평(平), 유소독(有小毒)하고, 미(未)는 신함고(辛鹹苦)하여 간경(肝經)으로 입(入)하여 경폐(經閉), 징가(癥瘕); 질타손상(跌打損傷)으로 어혈(瘀血)이 내조(內阻)해서 생긴 흉복동통(胸腹疼痛), 이변불통(二便不通)에 사용한다고 알려져 있다(Jang and Heo, 2010; Lee et al., 2019). 최근에는 항알러지, 천식 등과 같은 호흡기질

환, 심혈관계 질환 등에 효과가 있다는 것을 보고한 바가 있어 이러한 효능이 염증과 관련된 질환의 병태생리에 중요 역할을 하는 미세아교세포에 응용이 가능할 것으로 생각되어 적용해 보았다(Jang and Heo, 2010; Lee et al., 2019). 그 결과, hirudo는 NF- κ B를 조절하여 염증성 사이토카인을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 뇌염증에 의해 나타난 인지장애를 개선하는 것으로 보아 추후 환경오염을 비롯한 다양한 신경 자극에 의해 생긴 다양한 뇌염증 관련질환의 치료 및 예방 약물로 생각될 수 있다. 나아가 이러한 연구결과는 임상근거 기반 구축 및 한약의 과학화 기초자료로서 활용될 수 있다고 생각되어 진다. 또한 이렇게 새롭게 밝혀진 유효성은 약리학적 소재로서의 가치를 확보하는데 의미가 있다고 생각되어 추후 자세한 기전연구와 약물의 활성성분 분석을 추가적으로 연구될 필요가 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '지속가능한 한약표준 자원 활용기술 개발'(KSN1822320) 사업 및 한국연구재단 '미활용 생물자원의 연구기반 구축 및 활성화 연구: 동물성 자원 중심'(NRF-2020R111A2073003)의 지원으로 수행되었다.

REFERENCES

- Adivi, A., Lucero, J., Simpson, N., McDonald, J. D., Lund, A. K., 2020, Exposure to traffic-generated air pollution promotes alterations in the integrity of the brain microvasculature and inflammation in female ApoE^{-/-} mice, *Toxicol. Lett.*, 339, 39-50.
- Aminov, R., Frolov, A., Aminova, A., 2021, The influence of the planting time and conditions on the reproductive properties of *Hirudo verbana* and *Hirudo medicinalis*, *Ann. Parasitol.*, 67, 169-174.
- Goshua, A., Akdis, C. A., Nadeau, K. C., 2022, World Health Organization global air quality guideline recommendations: Executive summary, *Allergy.*, 77, 1955-1960.
- Han, S. H., 2019, Fine dust and dementia: Is ambient air pollution associated with cognitive health?, *J. Korean. Neurol. Assoc.*, 37, 135-143.
- Hang, C. H., Shi, J. X., Tian, J., Li, J. S., Wu, W., Yin, H. X., 2004, Effect of systemic LPS injection on cortical NF- κ B activity and inflammatory response following traumatic brain injury in rats, *Brain. Res.*,

- 1026, 23-32.
- Jang, H. K., Heo, D. S., 2010, The literature review of Leech therapy, *J. Pharmacopuncture.*, 13, 103-120.
- Jang, J. H., Lee, S. H., Jung, K., Yoo, H., Park, G., 2020, Inhibitory effects of myricetin on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, *Brain. Sci.*, 10, 32.
- Karataş, E., Ceylan, M., Dernekbaş 1, S., 2022, Effects of mammalian blood with different glucose levels on reproduction, growth and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana Carena*, 1820, *Anim. Reprod. Sci.*, 243, 107030.
- Lee, A. Y., Lee, J., Kim, Y. S., Choi, G., 2019, Inorganic components of insect origin medicines, *Korean. Herb. Med. Inf.*, 7, 189-194.
- Lim, H. S., Moon, B. C., Lee, J., Choi, G., Park, G., 2020, The insect molting hormone 20-hydroxyecdysone protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity in a mouse model of Parkinson's disease, *Free. Radic. Biol. Med.*, 159, 23-36.
- Park, G., Kim, Y. U., Kusuma, I. W., 2019, Discovery of novel animal-based medicinal products with therapeutic potential in evidence-based traditional medicine, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2019, 1626543.
- Park, G., Lee, S. H., Oh, D. S., Kim, Y. U., 2017, Melatonin inhibits neuronal dysfunction-associated with neuroinflammation by atopic psychological stress in NC/Nga atopic-like mouse models, *J. Pineal. Res.*, 63, e12420.
- Tran, V. V., Park, D., Lee, Y. C., 2020, Indoor air pollution, related human diseases, and recent trends in the control and improvement of indoor air quality, *Int. J. Environ. Res. Public. Health.*, 17, 2927.

-
- Researcher. Gun-Hyuk Park
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine / University of Science &
Technology(UST), Korean Convergence Medicine Major,
Campus of Korea Institute of Oriental Medicine
gpark@kiom.re.kr
 - Researcher. Sun-Gyu Yang
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine
sgyang81@kiom.re.kr
 - Researcher. Byeong-Cheol Moon
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine
bcmoon@kiom.re.kr

-
- Researcher. Su-Min Noh
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine
pureum322@kiom.re.kr
 - Researcher. Hye-Sun Lim
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea
Institute of Oriental Medicine
qp1015@kiom.re.kr