

Original Article / 원저

NF- κ B와 MAPK 억제를 통한 스테비아 잎의 항염증효과

김선영¹ · 조미정^{1,2} · 황보민¹ · 백영두³ · 정태영¹ · 조일제^{1,2*} · 지선영^{1*}

¹대구한의대학교 한의과대학, ²대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터,

³대구보건대학교 임상병리과

Anti-inflammatory Effect of *Stevia Rebaudiana* as a Results of NF- κ B and MAPK Inhibition

Seon-Young Kim¹ · Mi-Jeong Jo^{1,2} · Min Hwangbo¹ · Young-Doo Back³ ·

Tae-Young Jeong¹ · Il-Je Cho^{1,2*} · Seon-Young Jee^{1*}

¹College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-060

²MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongsangbukdo

³Dept. of Clinical Pathology, Daegu Health College

Abstract

Objectives : *Stevia rebaudiana* is a well-known herbal sweetener in the Korea, Japan and China, and its medical uses were originated from countries in South America. Although it has been shown the various medical effects of *S. rebaudiana* including contraception and treatment of human diseases such as hyperglycemia, it has almost not been studied about the efficacy of *S. rebaudiana* methanolic extract (SRE) on the acute inflammation and its action mechanism.

Methods : To investigate the anti-inflammatory effects of SRE, we treated SRE and examined the level of inflammatory mediators in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Results : Treatment of macrophage with LPS markedly induced the production of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines. Pretreatment of SRE blocked the induction of inflammatory mediators and the expression of iNOS protein. More importantly, LPS-induced phosphorylation of I κ B- α was suppressed by the treatment of SRE, suggesting SRE inhibition of NF- κ B activation. Furthermore, SRE blocked LPS-induced phosphorylation of MAPKs.

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

Conclusions : SRE inhibited the induction of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines in Raw264.7 cells. SRE's effect may be mediated with its inhibition of NF- κ B activation and MAPK phosphorylation, which suggests its uses as an anti-inflammatory agents.

Key words : *Stevia rebaudiana*; acute inflammation; LPS; i NOS

서 론

염증은 인체에 침입한 외인적 병원체 또는 내인적으로 발생하는 염증인자를 인지하여 제거하기 위하여 활성화되는 인체의 적극적인 방어 기전이다. 적절한 염증반응은 외인적/내인적 인자로부터 인체를 보호하는 필수 불가결한 반응이나, 과도하고 부적절한 염증반응은 정상 조직의 파괴와 더불어 암과 대사성질환을 포함한 다양한 질환의 원인으로 작용할 수 있다.

대식세포 및 순환기계에서 존재하는 전구세포인 단핵구는 lipopolysaccharide (LPS)를 포함한 병원체 유래 다양한 인자의 인식에 의해 활성화되어, 이들 외래 인자의 탐식을 위한 nitric oxide (NO), prostanoid, cytokine, chemokine 등을 포함한 급성 염증인자를 유리하여 외래 인자를 제거하기 위한 내재면역계의 효능세포로서 중요한 역할을 담당한다¹⁾. 내재면역계는 외래 인자의 pathogen-associated molecular pattern을 인식할 수 있는 pattern recognition receptor의 활성화를 통하여 nuclear factor- κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), activating protein-1 (AP-1)을 포함한 다양한 염증매개 신호 네트워크의 활성화를 통하여 외래인자의 탐식작용을 활성화시키고, 염증반응을 증폭시키는 면역세포의 화학주성을 촉진한다²⁾. 따라서 대식세포를 매개한 급성 염증 반응의 조절을 위하여 NO 생성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS),

prostaglandin 생합성의 속도조절 단계 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 염증성 cytokine들의 발현 조절과 이들 유전자의 발현에 있어 주요 신호전달 분자인 MAPK와 NF- κ B의 활성 조절은 염증 반응을 조절하기 위한 핵심요소로서 인식되고 있으며, 이들 인자들의 활성을 조절하여 염증 반응을 조절하기 위한 신규 후보 소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

*Stevia rebaudian*은 남아메리카 대륙에서 자생하는 국화과(Asteraceae)에 속하는 다년생 여러해살이풀로 설탕에 비해 약 200 - 300 배의 강한 단맛을 가져 설탕 성분을 대체할 수 있는 저칼로리의 다양한 식품의 감미소재로 활용되어 왔다³⁾. *S. rebaudian*에는 단맛 성분인 stevioside를 중심으로 약 100 여종 이상의 phytochemical 류가 포함되어 있으며⁴⁾, 항당뇨, 항고혈압, 항산화 및 항암 등의 다양한 약리활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다⁵⁻⁸⁾. 지금까지 진행된 *S. rebaudian*의 약리활성 연구가 전신적 또는 국소적 염증이 질환의 원인으로 주목받고 있는 주요 질환에 초점이 맞추어져 있는 것을 고려할 때 *S. rebaudian* 추출물이 급만성 염증의 제어를 통해 약리활성을 나타낼 것으로 예측 가능하나 이에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 *S. rebaudian* 잎 메탄올 추출물 (SRE)의 신규 약리 효능으로서 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위하여, *S. rebaudian* 잎 메탄올 추출물을 대식세포주인 Raw264.7 세포에 전처리한 후, LPS로 유도한 NO 생성, iNOS 발현 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 cytokine 생성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 또한 SRE가 염증반응의 주요 신호전달

교신저자 : 지선영, 대구광역시 수성구 신천동로 136 대구한의대학교
(Tel : 054-281-0055, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr) 또는
조일제, 경상북도 경산시 한의대로 1 대구한의대학교
한의학대학 방제과학급로별 연구센터
(Tel : 053-819-1862, E-mail : skek023@dhu.ac.kr)

• 접수 2013/7/26 • 수정 2013/8/8 • 채택 2013/8/15

분자인 NF- κ B와 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 연구하여 염증세포에서 신규 약리 효능의 분자기전을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

LPS (*E. coli*), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, iNOS 항체는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였고, I κ B- α 와 NF- κ B 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-I κ B- α (p-I κ B- α), phospho-p38 MAPK (p-p38), phospho-Erk 1/2 (p-Erk 1/2)와 phospho-JNK 1/2 (p-JNK 1/2) 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 그 외 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. *Stevia rebaudiana* 잎 메탄올 추출물 (SRE)의 제조

*S. rebaudiana*에 100% 메탄올을 가하고 상온에서 72시간 동안 추출하여 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과한 후 여액을 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 12시간 동안 동결하여 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 동결건조하고 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

3. 세포 배양 및 처치

Raw264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포에 SRE 3 - 100 μ g/ml을 1시간 동안 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)를 추가로 처리하여 배양한 후, 배지 및 세포를 회수하였다.

4. 세포 독성 평가

약물 처리된 세포를 24시간 배양한 후, 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 넣고 4시간 추가 배양하였다. 생성된 formazan에 DMSO를 가하여 용해시킨 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리군 세포의 생존율과 비교하여 다음과 같은 수식에 의해 평가하였다. Cell viability (% control) = 100 \times (absorbance of treated cells)/(absorbance of control cells)

5. NO 생성능 측정

Raw264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 24 well plate에서 배양된 Raw264.7 세포에 SRE 3 - 100 μ g/ml을 각각 처리하고, 1 시간 후 LPS (1 μ g/ml)를 12시간 동안 처리하여 세포 배양액을 회수하였다. 세포 배양 상등액 50 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 혼합하여 넣고 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

SRE와 LPS가 처리된 세포 배양액 중의 PGE₂, TNF- α 및 IL-6의 양을 mouse anti-PGE₂ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-TNF- α 및 anti-IL-6 (Endogen, Woburn, MA, USA)와 biotinylated 2차 항체를 이용한 ELISA법에 의해 제조사의 방법에 따라 측정하여 정량하였다.

7. Immunoblot analysis

전세포 추출액 (whole cell lysates) 및 핵 분획 (nuclear fractions)은 본 연구실에서 기확립된 방법에 따라 분리하였다²⁾. 정량한 단백질을 50 μ g을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 단백질을 전이시켰다. iNOS, I κ B- α , p-I κ B- α , NF- κ B, p-p38, p-Erk 1/2 및 p-JNK 1/2 1차 antibody와 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 동일 단백질의 loading의 확인은 β -actin 및 lamin에 대한 면역화학 분석을 통하여 확인하였다. Densitometric analysis는 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

8. 통계분석

One way analysis of variance (ANOVA)로 그룹 간 유의성을 평가하였다. 2개 이상의 그룹의 유의성 평가를 위하여 Newman-Keuls test를 활용하였다. 데이터는 산술평균 \pm S.D.로 표기하였으며 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 을 기준으로 평가하였다.

결 과

1. SRE가 Raw264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

SRE의 항염증 효능 및 이에 관련된 분자기전을 탐색하기에 앞서 SRE가 대식세포주인 Raw264.7 세포에 세포독성을 나타내는지 관찰하기 위하여, $1 \times 10^5/ml$ 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 배양한 후, 약 80%의 confluency에서 12시간 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에서 배양하였다. 이후 세포에 SRE 3 - 100 μ g/ml을 농도별로 24시간 동안 처리한 후, MTT 용액 (5 mg/ml, 4시간) 가하여 생성된 formazan을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 SRE의 세포독성을 확인하였다. 무처리군 세포에서 관찰된 세포의 생존율을 기준으로 SRE 3 - 100 μ g/ml을 농도별로 처리한 모든 그룹에서 통계적으로 유의한 세포 생존율의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 이 결과는 3 - 100 μ g/ml SRE가 Raw264.7 세포에 세포독성을 유발하지 않음을 의미하며, 이후 100 μ g/ml 이하의 SRE 농도를 선택하여 후속 실험을 진행하였다.

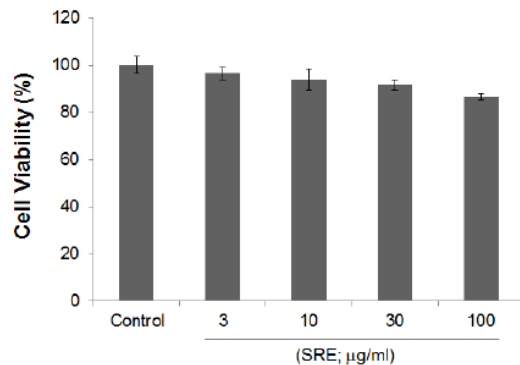
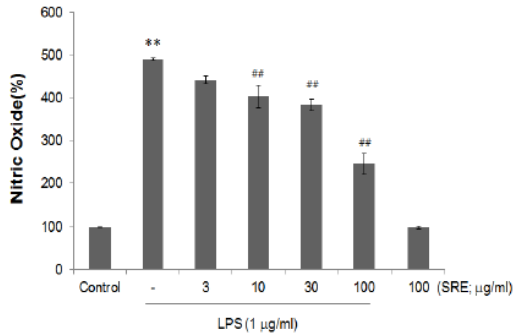


Fig. 1. Effect of SRE on cell viability.

Raw264.7 cells were treated with 3 - 100 μ g/ml of SRE dissolved in DMSO for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay and expressed as a relative percentage of the control cells without the addition of indicated SRE. All values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. SRE, *S. rebaudiana* methanolic extracts.

2. SRE가 LPS에 의해 유리되는 NO 생성 및 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향

A)



B)

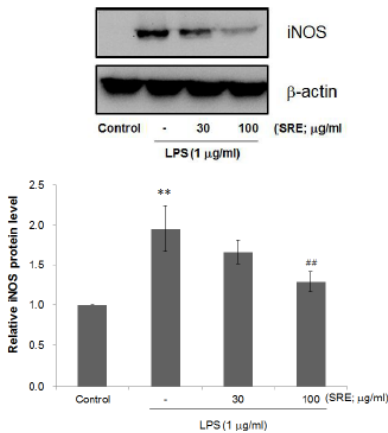


Fig. 2. Effect of SRE on LPS-mediated NO and iNOS protein expression.

- (A) Raw264.7 cells were treated with 3 - 100 $\mu\text{g/ml}$ of SRE for 1 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. The concentrations of nitrite in culture medium were measured by Griess reagent.
- (B) Expressions of iNOS protein were determined by immunoblot using specific anti-iNOS antibodies. β -actin was used as a loading control (Upper panel). The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry (Lower panel). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, ** $p < 0.01$; significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$).

Raw264.7 세포에 염증반응을 활성화시키기 위하여 본 연구에서는 Toll-like receptor (TLR)-4에 결합

하는 ligand인 LPS를 이용하였다. Raw264.7 세포에 3 - 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE를 1시간 동안 전처리한 후 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 24시간 동안 처리하여 배양액에 유리된 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS는 Raw264.7 세포의 NO 유리를 약 5 배 정도 증가시켰다. LPS에 의해 증가된 NO의 양은 3 $\mu\text{g/ml}$ SRE에 의해 감소하는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. 그러나 10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE 전처리는 농도 의존적으로 LPS에 의해 증가된 NO의 유리를 감소시켰다(Fig. 2A). 다음으로, NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot 분석을 수행하였다. 무처리 세포의 경우 iNOS 단백질의 발현을 관찰할 수 없었으나, 24시간 동안 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 처리는 iNOS 발현을 유도하였다. 30 $\mu\text{g/ml}$ SRE 전처리는 iNOS 발현을 감소하는 경향을 나타내었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE 전처리는 LPS 단독 처리 세포와 비교하여 iNOS 발현을 통계적으로 유의한 수준으로 억제하였다(Fig. 2B).

3. SRE가 LPS에 의해 증가되는 PGE₂ 및 염증성 cytokine에 미치는 영향

대식세포에서 PGE₂는 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다⁹⁾. LPS로 활성화된 Raw264.7 세포에서 SRE가 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 측정하였다. LPS는 PGE₂의 생성을 증가시켰고, SRE는 농도 의존적으로 LPS로 유도된 PGE₂를 통계적으로 유의하게 감소시켰다(Fig. 3A). TNF- α , IL-6 등은 염증성 cytokine으로 서로 간에 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 염증반응이 유발된 대식세포가 주요 생성세포이다¹⁾. 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 자극은 Raw264.7 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 유리를 통계적으로 유의하게 약 72.2배, 4.2배 각각 증가시켰다. 그러나 LPS에 의해 증가한 TNF- α 와 IL-6는 SRE 전처리에 의해 통계적으로 유의하게 LPS 대비 64.9%,

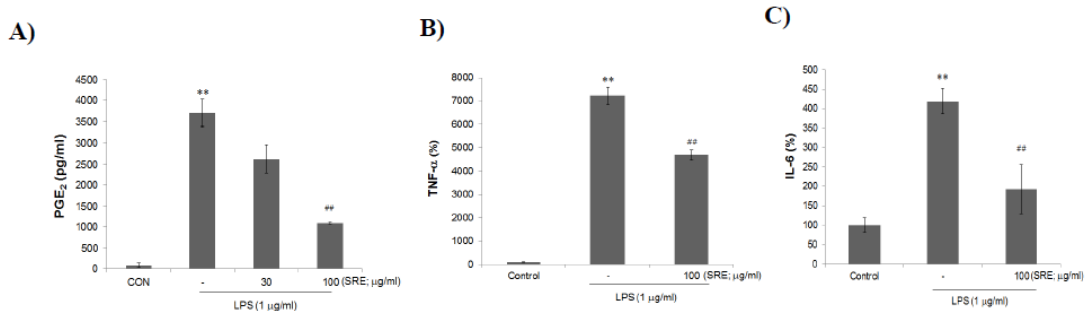


Fig. 3. Effect of SRE on LPS-mediated PGE₂, TNF- α and IL-6 productions.

Raw264.7 cells were treated with 30 or 100 μ g/ml of SRE for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml) for 18 h. The concentrations of PGE₂ (A), TNF- α (B) and IL-6 (C) in culture medium were measured by ELISA. All values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control cells, ** p < 0.01; significant as compared to LPS treated cells, ## p < 0.01).

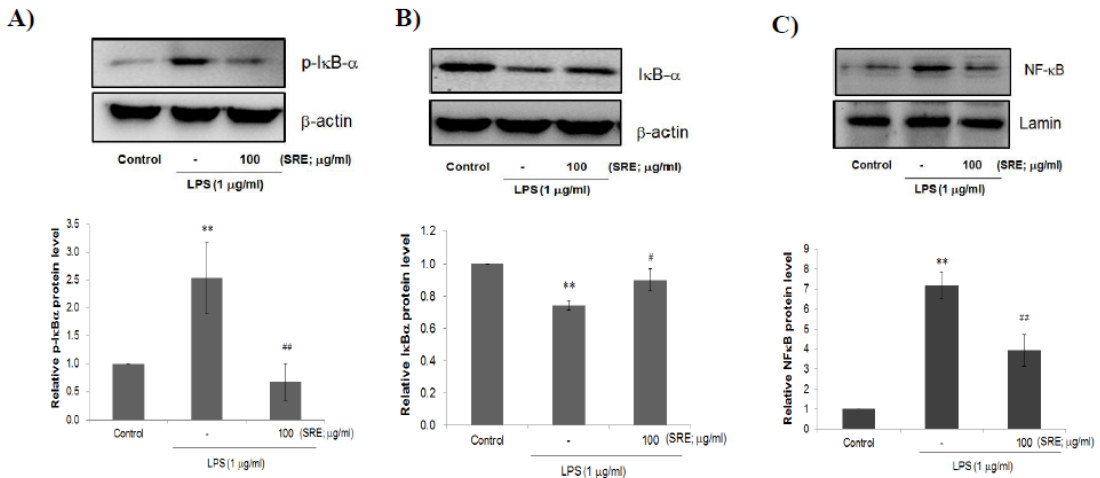


Fig. 4. Effect of SRE on the LPS-mediated NF- κ B activation in Raw264.7 cells.

Whole cell lysates or nuclear extracts were prepared from vehicle, LPS (1 μ g/ml) with or without SRE (100 μ g/ml) treated cells. Phosphorylation level of I κ B- α protein (A), I κ B- α expression in whole cell lysates (B), and NF- κ B expression in nuclear fractions (C) were determined by immunoblot analysis. β -actin or lamin was used as a loading control for whole cell lysates or nuclear fractions, respectively (Upper panel). The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry (Lower panel). Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, ** p < 0.01; significant as compared to LPS alone, ## p < 0.01, # p < 0.05).

45.8% 수준으로 각각 감소시켰다(Fig. 3, B-C).

4. 대식세포에서 SRE가 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B 신호 네트워크에 미치는 영향

대식세포는 LPS 자극에 의해 inhibitory- κ B (I κ B) kinase가 활성화되며 I- κ B α 의 인산화에 의한 분

해가 촉진되고, I- κ B α 로부터 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 염증 매개 유전자의 프로모터에 결합하여 이들 유전자의 발현을 유도하게 된다¹⁰⁻¹². 따라서 SRE가 이들 염증매개인자의 발현에 관여하는 NF- κ B 신호네트워크에 미치는 영향을 immunoblot 분석을 통해 관찰하였다. Raw264.7 세포에 0.5시간 동안 1 μ g/ml LPS를 처치한 결과, I κ B- α 의 인산화가

증가하였고, 세포질 내의 I κ B- α 단백질 양이 감소하였다. 이와 더불어 핵으로의 NF- κ B 단백질 (p65 subunit)의 유입이 증가하였다(Fig. 4, A-C). 100 μ g/ml SRE 전처치는 LPS에 의한 NF- κ B 신호 네트워크의 활성화를 모두 억제하였다(Fig. 4, A-C). 이 결과는 SRE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B 신호 네트워크를 억제하여 LPS 유도성 염증매개 인자의 유리를 억제할 수 있음을 시사한다.

5. 대식세포에서 SRE가 LPS에 의해 활성화되는 MAPK 신호에 미치는 영향

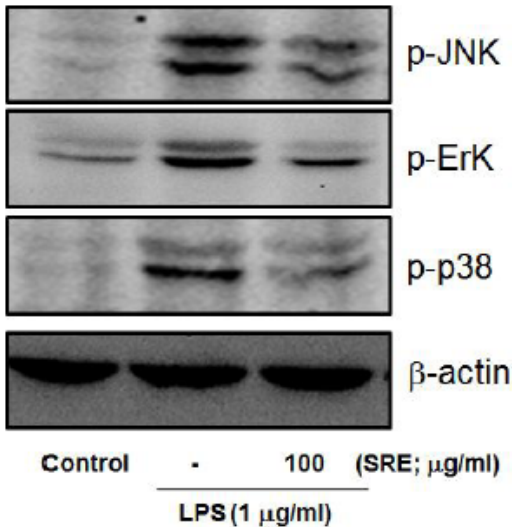


Fig. 5. Effect of SRE on the LPS-mediated MAPKs phosphorylations in Raw264.7 cells.

Lysates were prepared as described in figure 4. Phosphorylation levels of JNK, Erk and p38 were monitored by immunoblot analysis. The results were confirmed by repeated experiments.

대식세포에서 LPS 자극에 의해 활성화되는 또 다른 대표적 신호는 mitogen activated protein kinase (MAPK)로서 포유류에서는 extracellular signal regulated kinase (Erk), p38 protein kinase (p38), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) 3종의 단백질이 알려져 있다¹³⁾. SRE에 의한 LPS 유도성 염증매개인

자의 유리 억제에 있어 세포 내 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 대식세포에서 SRE가 LPS에 의해 증가하는 MAPK의 인산화에 미치는 영향을 관찰하였다. Raw264.7 세포에 0.5시간 동안 1 μ g/ml LPS를 처리한 결과, 3종의 MAPK (JNK 1/2, Erk 1/2, p38 protein kinase)의 인산화가 모두 증가하였다. 100 μ g/ml SRE 전처치는 LPS에 의해 증가하는 JNK1/2 및 p38 protein kinase의 인산화를 Erk 1/2의 인산화에 비교하여 강하게 억제하였다(Fig. 5). 이 결과는 SRE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPK의 인산화를 억제하여 항염증 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

고 찰

*Stevia rebaudian*은 브라질을 포함한 남아메리카 대륙에서 자생하는 국화과(Asteraceae)에 속하는 다년생 여러해살이풀로 남아메리카 대륙을 포함한 동남아시아에서 다양한 식품의 감미소재로서 활용되어 왔다³⁾. *S. rebaudian* 잎에 포함된 감미 성분은 steviol 배당체인 stevioside와 rebaudioside A로서 설탕에 비해 약 200 - 300 배의 단맛이 더 강한 것으로 알려져 있다. 최근 서구화된 식습관과 더불어 대사성 질환 환자의 수가 급격히 증가하고 있으며, 설탕 성분을 대체할 수 있는 저칼로리의 다양한 식품 감미소재로서 *S. rebaudian*에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

1899년 *S. rebaudian*이 처음 동정된 이래로 terpenoid류와 flavonoid류를 포함한 100 여종 이상의 phytochemical류가 동정되었다⁴⁾. *S. rebaudian* 잎에는 steviobioside, rebaudioside A-E, stevioside 등을 diterpenoid glycoside와 jhanol, sterebin A-N, 6-O-ethyl-austroinulin 등의 diterpenoid 성분이 보고되었고¹⁴⁻¹⁶⁾, 이들 성분들의 약리활성에 연구가 활발히 진행 중이다. 지금까지 보고된 *S. rebaudian*의 약리활성 연구에 따르면 *S. rebaudian* 또는 *S.*

*rebaudian*에 포함된 *stevioside*가 항당뇨, 항고혈압, 항산화 및 항암 등의 약리활성을 가지는 것으로 보고되었다⁵⁻⁸⁾. 이와 더불어 박 등¹⁷⁾은 *S. rebaudian* 잎 추출물의 첨가가 *stevioside* 첨가에 비해 고지방식이에 의해 유도된 비만을 더욱 효과적으로 억제할 수 있음을 보고하였다. 지금까지 진행된 *S. rebaudian*의 약리활성 연구가 전신적 또는 국소적 염증이 질환의 원인으로 주목받고 있는 질환에 초점이 맞추어져 있는 것을 고려할 때 *S. rebaudian* 추출물이 급만성 염증의 제어를 통해 약리활성을 나타낼 것으로 예측 가능하나 이에 대한 연구는 미진한 실정이다. 최근 *S. rebaudian*에서 diterpenoid 화합물인 Austroinulin이 대식세포에서 iNOS의 발현억제를 통하여 NO를 생성을 억제할 수 있음이 보고되었으나¹⁸⁾, *S. rebaudian* 추출물의 항염 소재로서의 연구와 그 염증억제의 분자기전에 대한 연구는 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 *S. rebaudian* 잎 메탄올 추출물이 LPS로 활성화된 대식세포에서 나타나는 급성 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하여 SRE의 항염증 효능 및 이에 대한 분자기전을 연구하고자 하였다.

본 연구에서 대식세포를 활성화시키기 위해 사용한 LPS는 대식세포의 대표적 염증 수용체인 TLR-4와 결합하는 ligand로서 TLR-4, CD14과 MD2로 이루어진 표면수용체 복합체의 활성화를 통하여 MyD88, TIRAP/Mal, TRIF 및 TRAM과 같은 TIR 영역을 포함하는 adaptor 단백질과 결합하여 하위 신호망의 활성화를 매개한다^{19,20)}. 대식세포에서 LPS에 의해 분비되는 염증매개인자 중 NO 및 prostaglandin의 유리는 염증과정의 중요 인자로 대표된다^{10,21)}. 본 연구에서는 대식세포주인 Raw264.7 세포를 이용하여 *S. rebaudian* 추출물이 LPS에 의한 NO 유리를 억제할 수 있는지 관찰하였다. Raw264.7 세포에서 세포 독성이 관찰되지 않은 3 - 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE 전처치는 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO의 유리를 억제하였고, NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현을 관찰한 결과, 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE는 효과적으로 LPS에 의해 증가

한 iNOS의 발현을 억제하였다. 이와 더불어 30 - 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE 전처치는 LPS에 의한 PGE₂의 유리 또한 억제하였다. 이상의 결과는 SRE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 세포 내 공통 신호 분자 및 전사인자의 억제를 통해 iNOS와 COX-2 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

염증매개인자에 의해 활성화된 대식세포는 NO와 prostaglandin의 유리와 더불어 TNF- α , IL-6를 포함한 다양한 cytokine을 생성하여 감염 초기의 염증 반응을 증폭시킨다^{1,22)}. TNF- α 는 septic shock 및 toxic shock을 포함한 전신적 염증반응시 혈액 내에 증가하는 대표적인 cytokine으로서 대식세포의 활성화와 더불어 autocrine 효과에 의해 다른 cytokine의 유리를 증가시키며, IL-6는 숙주방어, 면역반응, 및 신경세포의 기능 등에 있어 중요한 역할을 담당한다^{1,2)}. 기존의 문헌보고와 일치하게 대식세포에 대한 LPS 자극은 TNF- α 와 IL-6의 생성 및 유리를 증가시켰으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ SRE는 LPS에 의해 증가한 TNF- α 와 IL-6의 생성을 통계적으로 유의한 수준으로 억제하였다.

본 연구에서 관찰한 iNOS, TNF- α , IL-6은 NF- κ B와 MAPK에 의해 발현이 조절되는 대표적인 유전자군이다^{10-12,23)}. NF- κ B는 저해 단백질인 I κ B- α 와 복합체의 형태로 불활성화되어 세포질에 존재한다. LPS를 포함한 염증자극은 I κ B kinase를 활성화시키고 이에 의해 I κ B- α 의 N-terminal 영역의 serine 잔기를 인산화시킨다. I- κ B α 의 인산화는 I κ B- α 의 lysine 잔기에 multi-ubiquitination을 유도하고 이에 의해 proteasome 복합체에 의해 분해를 촉진한다. I κ B- α 의 분해는 NF- κ B/I κ B- α 복합체에서 감추어져 있던 NF- κ B 복합체의 핵 이동 서열이 노출되어 핵으로 이동하여, 표적 유전자 프로모터에 결합하여 염증 매개 유전자를 포함한 다양한 유전자의 발현을 증가시킨다²⁴⁾. 대식세포에서 NF- κ B의 활성화는 세포 내 다양한 신호분자의 활성화와 서로 상승적으로 영향을 주고 받으며, NF- κ B의 활성화에 영향을 주는

가장 대표적인 신호분자는 MAPK이다. MAPK는 포유류에서 Erk, p38 MAPK, JNK의 3종의 member가 보고되었으며, JNK의 경우 I κ B kinase의 직접적인 인산화를 통하여 NF- κ B 신호 네트워크를 활성화시키는 것으로 보고되었다^{23,25}. 이와 더불어 MAPK는 AP-1, activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화에 관여하는 핵심 신호전달 분자이다²³. 기존의 문헌 보고와 같이 본 연구에서도 LPS 자극에 의해 I κ B- α 의 인산화와 이를 통한 I κ B- α 의 분해, NF- κ B의 핵 내 축적 및 3종의 MAPK의 인산화가 관찰되었다. 그리고 LPS에 의한 NF- κ B 및 MAPK 신호의 활성화는 100 μ g/ml SRE에 의해 모두 억제되었다. 이는 SRE가 염증신호에 의해 활성화되는 NF- κ B와 MAPK 신호 네트워크의 활성 조절을 통해 염증 매개 유전자의 발현을 조절할 수 있음을 시사한다.

이상의 결과를 종합하여 본 연구에서는, 설탕 대체 감미 보조제 및 만성 질환 치료의 기능성 식품소재로서 활용가능성이 증가하고 있는 *S. rebaudian* 추출물에 대한 신규 약리 효능 연구로서, 급성염증에 대한 치료효능을 대식세포주를 활용하여 규명하였고, 부분적으로 이에 관련된 분자기전을 연구하였다. 이후 *S. rebaudian* 추출물의 동물 수준에서의 약효시험 및 안전성에 대한 후속 연구가 진행된다면, *S. rebaudian* 추출물의 활용 증대와 더불어 신규 항염증 소재로서 다양한 염증성 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 마우스 대식세포주인 Raw264.7 세포를 이용하여 LPS에 의해 활성화된 염증 매개 유전자 발현과 관련 신호 네트워크의 변화에 *Stevia rebaudiana* 잎 메탄올 추출물이 미치는 영향을 평가

하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Stevia rebaudiana* 잎 메탄올 추출물 (SRE)은 Raw264.7 세포에서 3 - 100 μ g/ml의 농도 범위에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. SRE는 LPS에 의해 증가한 NO 및 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. SRE는 LPS에 의해 유도된 PGE₂ 및 염증성 cytokine (TNF- α , IL-6)의 발현을 억제하였다.
4. SRE는 LPS에 의해 활성화된 I κ B- α 의 인산화 및 분해, NF- κ B의 핵내 이동 억제를 통하여 NF- κ B 신호 네트워크를 억제하였고 이와 더불어 MAPK의 인산화를 억제하였다.

이러한 SRE의 항염증 효능 및 분자기전에 대한 연구는 *Stevia rebaudiana*를 활용한 급성 염증성 질환의 예방 및 면역치료 약물의 신규 한의학 소재로서의 개발 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Kuby Immunology. 6th Edit. New York:W.H. Freeman and Company. 2007:52-75.
2. Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC. Inhibitory Effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated Raw264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2012;27:31-8.
3. Park DC, Lee YH. Production, transglycosylation and application of stevioside. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1997;2:31-41.
4. Komissaranko NF, Derkuch AI, Kovalyov IP, Bublik NP. Diterpene glycoside and phenylpropanoid of *Stevia rebaudiana* bertonii (astercae). *Rast Res*. 1994;1:53-64.

5. Dyrskog SE, Jeppensen PB, Colombo M, Abudula R, Hermansen K. Preventive effects of soy based diet supplemented with stevioside on development of type 2 diabetes. *Metabolism*. 2005;54:1181-8.
6. Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP, et al. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertension rats. *Life Sci*. 1998;19:1679-84.
7. Srijani G, Anindita B, Avijit P, Sharmila C. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (bertoni) bertoni, a natural sweetener. *J Agric Food Chem*. 2007;55:10962-7.
8. Yasukawa K, Kitanaka S, Shujiro S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:1488-90.
9. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:525-34.
10. Qiao-Wen X, Richard W, Carl N. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993;177:1779-84.
11. Rhodes KL, Golub SH, Economou JS. The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem*. 1992;267:22102-7.
12. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1990;10:2327-34.
13. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298:1911-2.
14. Oshima Y, Saito JI, Hikino H. Sterebins A, B, C and D, bisnorditerpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. *Tetrahedron*. 1986;42:6443-6.
15. Oshima Y, Saito JI, Hikino H. Sterebins E, F, G and H, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. *Phytochemistry*. 1988;27:624-6.
16. Dacome AS, da Silva CC, da Costa CEM, Fontana JD, Adelman J, da Costa SC. Sweet diterpenic glycoside balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: isolation and quantitative distribution by chromatography, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem*. 2005;40:3587-94.
17. Park JE, Kee HJ, Cha YS. Effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf Extract on Antiobesity in C57BL/6J Mice. *Korean J Food Sci Technol*. 2010;42:586-92.
18. Byun MW. Anti-Inflammatory Activity of Austroinulin from *Stevia rebaudiana* in LPS-induced Raw264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012;41:456-61.
19. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:446-58.
20. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:3-9.
21. Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S,

- Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated Raw264.7 macrophages. *J Biol Chem*. 2000;275:6259-66.
22. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Nitric Oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2005;20:7-16.
23. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immuno*. 2002;20:55-72.
24. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*. 1996;78:773-85.
25. Ki SH, Choi MJ, Lee CH, Kim SG. Galphal2 specifically regulates COX-2 induction by sphingosine 1-phosphate. Role for JNK-dependent ubiquitination and degradation of I kappa B alpha. *J Biol Chem*. 2007;282:1938-47.