

## LPS에 의해 자극된 RAW264.7 대식세포에서 Rebaudioside A의 항염 효과

조 옥 민 · 황 형 서<sup>†</sup>

세명대학교 화장품뷰티생명공학부

(2017년 5월 25일 접수, 2017년 6월 19일 수정, 2017년 6월 23일 채택)

### Anti-inflammatory Effects of Rebaudioside A in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophage Cells

Uk Min Cho and Hyung Seo Hwang<sup>†</sup>

School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon,  
Chungbuk-do 27136, Korea

(Received May 23, 2017; Revised June 19, 2017; Accepted June 23, 2017)

**요약:** 스테비아(*Stevia rebaudiana*)는 남아메리카 지역이 원산지인 국화과 스테비아 속의 다년생 식물로 스테비올(steviol)을 기본 구조로 하는 다양한 배당체가 존재하며 스테비오사이드(stevioside)와 리바우디오사이드(rebaudioside) A 등이 주성분이다. 스테비올 배당체들은 설탕보다 단맛이 월등히 뛰어나 감미료로 널리 사용되어지고 있다. 최근 여러 논문들에서 스테비올 배당체들이 미백 및 항염 효과 뿐 아니라 피부장벽 타이트정선 단백질 조절에 연관되어 있다는 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서는 스테비올 배당체인 리바우디오사이드 A의 항염 효과 연구를 통해 향후 아토피 피부염 개선 화장품 원료 개발 가능성을 확인하고자 하였다. 항염 연구를 위해 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 이용하여 cell viability 및 염증 유발 사이토카인 mRNA 발현량을 분석하였다. 우선 cell viability 측정을 위해 cell counting kit-8 (CCK-8) assay를 수행하였고 세포독성이 없는 최대 농도를 250  $\mu$ M로 설정하여 이후 모든 실험을 진행하였다. 리바우디오사이드 A의 염증 조절 기능 연구는 주로 정량적 real-time RT-PCR 방법을 이용하였다. LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 리바우디오사이드 A 처리 결과 LPS 처리군 대비 iNOS 발현량은 약 47% 감소하였고, COX-2 또한 41% 감소하였다. 생성된 NO의 양 또한 농도 의존적으로 감소하였다. 대식세포를 LPS로 활성화시킨 조건에서 염증 관련 사이토카인 유전자인 interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현량 조절을 확인한 결과 사이토카인(IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6) 발현이 LPS 처리군 대비 40%, 45%, 59%로 농도 의존적 유의성 있게 감소하였다. 결론적으로 스테비올 배당체인 리바우디오사이드 A는 NO 생성 및 사이토카인 분비 억제를 통해 염증 반응을 저해하였다. 이러한 리바우디오사이드 A의 신규 항염증 조절 기능을 통해 아토피성피부염 개선 소재로의 개발이 기대된다.

**Abstract:** Stevia (*Stevia rebaudiana*) is a perennial plant of the genus Stevia, originated in South America. It stores many forms of glycosides, mainly stevioside and rebaudioside A, in which steviol is the basic structure. Steviol glycosides, widely used as sweeteners, are superior to sugar in sweetness. Recently, it has been reported that steviol glycosides are involved not only in the skin whitening and anti-inflammatory effect but also in enhancing skin barrier function through tight junction regulation. Thus, we examined anti-inflammatory effect of rebaudioside A and tried to identify its potential for improving atopic dermatitis as cosmetic ingredients. To investigate the anti-inflammatory effect, cell viability and mRNA expression level of inflammation-related cytokines were measured using mouse macrophage RAW264.7 cells. Cell counting kit 8 (CCK-8) assay was carried out to measure cell viability and the maximum concentration without cytotoxicity was set to 250  $\mu$ M. A quantitative real-time RT-PCR method was used for the study

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: hshwang@semyung.ac.kr)  
call: 043)649-1618

of the inflammatory suppression of rebaudioside A. Rebaudioside A inhibited expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) up to 47% and COX-2 up to 41% compared to LPS treated condition. NO synthesis was decreased by rebaudioside A. Also, mRNA expression of interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 cells was decreased to 40%, 45% and 59%, respectively, as a concentration-dependent manner. In conclusion, rebaudioside A inhibited the inflammatory response by regulation of cytokine gene expression. From these results, we expect that steviol glycoside, such as rebaudioside A, can be used as a material for improving atopic dermatitis in the future.

**Keywords:** Steviol, Stevioside, Rebaudioside A, anti-inflammatory effects, RAW264.7

## 1. 서 론

스테비아(*Stevia rebaudiana*)는 파라과이 등 남미가 주 원산지이며 오랫동안 천연감미료 및 약재로 사용되어 온 식물이다. 스테비아 식물의 잎에는 약 110개 화합물이 존재하고 이 중 18종의 화합물이 단맛을 나타내며 전체 잎의 약 3-8%를 차지한다. 스테비올(steviol)을 기본 구조로 하는 다양한 배당체 중 스테비오사이드와 리바우디오사이드 A는 설탕에 비해 단맛이 약 300배 이상 뛰어나 당뇨병환자 및 체중 조절에도 널리 사용되고 있다. 또한 최근에는 안전성에 대한 연구결과에서 독성 우려에 대한 부작용은 거의 없고, 혈압을 낮추고 고혈압 개선 뿐 아니라 스테비오사이드의 항염 효과에 대한 연구도 활발히 진행 중이다[1-6]. 또한 스테비올과 그 배당체인 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A의 밀착연접(tight junction, TJ)조절에 대한 연구에서는 스테비올이 TJ 구성 단백질 중 하나인 클라우딘(claudin)-8의 발현 억제 및 세포 이동을 저해하고, 스테비올에 의해 transepithelial electrical resistance (TEER) 감소 및 세포투과도가 증가되었다. 반면 그 배당체인 스테비오사이드와 리바우디오사이드 A에서는 TEER이 증가되어 세포투과도가 낮아지고 피부장벽이 강화되었다[7]. 일반적으로 피부장벽(skin barrier)이란 외부로부터 인체를 보호하는 피부의 필수적인 기능을 담당하고 피부 각질층과 밀착연접으로 구성된 물리적 장벽과 항균 펩타이드, 지질 등으로 구성되는 화학적/생화학적 장벽 그리고 감염성 질환에 대한 면역 장벽 등이 알려진다. 이 중 물리적 장벽 역할을 수행하는 밀착연접은 표피층에 존재하는 단백질로 위치에 따라 공기-액체 장벽, 인체 내부의 수분 손실을 막는 액체-액체 장벽의 역할을 수행한다. 밀착연접 단백질들은 표피의 과립층에서 주로 발현되고 zonula occludens proteins(ZO)-1, -2, occludin, 막투과 단백질인 claudin 등

이 있다[8]. 또한 상피세포에서 이러한 밀착연접 단백질의 연접이 끊어져 자유로운 형태가 되는 것을 epithelial-mesenchymal transition (EMT)라 하고 이는 암세포의 전이과정에 필수적이다[9]. 이러한 다양한 밀착연접의 피부장벽 기능은 최근 사회적 이슈가 되고 있는 아토피 피부염과도 밀접한 관련이 있다. 아토피 피부염 원인에 대한 2가지 가설이 있는데 피부장벽의 약화로 인해 피부 투과도가 증가하여 면역반응이 유발된다는 가설(outside-inside 가설)과 염증반응이 정상적인 상태보다 민감하게 일어나서 염증반응의 결과로 피부장벽의 이상이 나타난다는 가설(inside-outside 가설)이다[10]. 여러 원인에 의한 피부장벽 기능의 약화는 피부조직의 구조적 결함을 가져와 외부 박테리아 또는 바이러스 등의 피부조직 내 침입을 허락하게 되고 이로 인해 비 특이적인 피부 염증반응(아토피 피부염)이 유발된다. 아토피 피부염환자의 피부는 세라마이드(ceramide) 감소, serine proteases 증가, 필라그린(fillagrin) 유전자 돌연변이 및 밀착연접 단백질의 현저한 감소 현상과 면역조절 체계 이상의 증상이 함께 관찰된다[11-13]. 아토피피부염은 심한 가려움증과 skin flexure 등을 유발하는 유전적 성질이 강한 만성 염증성 질환이며, 아토피피부염에 주로 침윤되는 대식세포, 호산구 등의 세포들은 인터루킨(interleukin, IL)-1과 종양괴사인자(tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 등에 의해 E-selectin이 유도되어 면역세포들을 염증 부위로 침투시키는 데 주요 역할을 한다고 알려져 있다[14-16]. Nitric oxide (NO)의 증가 역시 염증반응에 관여하는데, 주로 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되어 병리적인 혈관 확장을 통해 염증반응을 촉진시키고 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 활성화시켜 프로스타글란딘(prostaglandin, PG) 등의 염증매개체의 합성을 촉진하여 염증을 유발한다. 따라서 기존의 많은 항염증제는 lipopolysaccharide (LPS) 및 interferon gamma (IFN $\gamma$ )로 활성화 된 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을

**Table 1.** Gene Name and Assay ID Number in Real-Time PCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 alpha	Mm004396-20_mL
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta	Mm00434228_mL
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_mL
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_mL
COX-2	Cyclooxygenase-2	Mm00478374_mL
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Mm00440502_mL
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm9999915_gL

억제하여 NO의 생성 및 PG의 합성을 저해한다[17,18]. 따라서 본 연구에서는 리바우디오사이드 A의 새로운 항염 조절 기능 및 항후 아토피피부염 개선 화장품 소재 활용 가능성을 확인하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

본 연구에서 사용한 스테비올 배당체인 스테비오사이드 (50956), 리바우디오사이드 A (01432)는 Sigma (USA)에서 직접 구매하여 사용하였다.

### 2.2. 세포 배양

본 실험에 주로 사용된 RAW264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양받아 배양하였다. 배양조건은 37 °C, CO<sub>2</sub> 5%로 유지된 환경에서 배양하였으며, 주 2-3회 계대배양을 실시하였다. 배양에 사용된 배양액은 Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Welgene, Korea)에 56 °C로 30 min 동안 heat inactivation 한 fetal bovine serum (FBS, Welgene) 10%, penicilin (100 U/mL) /streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Pen/Strep, Gibco, USA)을 첨가하여 사용하였다.

### 2.3. 세포 독성 평가

스테비오사이드, 리바우디오사이드 A를 RAW264.7 세포에 처리하기 위한 최고 농도를 결정하기 위하여 cell viability assay를 진행하였다[19]. 실험에는 EZ-cytox cell viability assay kit (EZ-1000, Dogenbio, Korea)를 사용하였다. RAW264.7 cell을 0.6  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well로 96-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양하여 부착시켰다. 이후 각 물질을 농도별로 희석하여 처리한 후 24

h 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고, DMEM: EZ-cytox를 10:1로 희석한 용액을 well마다 100  $\mu$ L씩 처리한 후 30 min 동안 반응시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 산출하였다.

### 2.4. NO 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위해 Griess 방법에 따라 실험을 진행하였다[20]. 24-well plate에 RAW264.7 세포를 well 당 0.2  $\times$  10<sup>6</sup> cell이 되도록 분주하여 24 h 동안 배양한 후 lipopolysaccharide (LPS, Sigma) 1  $\mu$ g/mL와 각 물질을 농도별로 처리하여 20 h 동안 반응시켰다. 반응을 마친 상등액과 Griess reagent (G4410, Sigma)를 1:1로 섞어 30 min 간 실온에서 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrate (237213, Sigma)를 이용하여 작성하였으며, 표준곡선에 흡광도를 대입하여 NO 생성량을 산출하였다.

### 2.5. RNA 추출 및 정량적 Real Time RT-PCR

RAW264.7 세포를 6-well plate에 0.6  $\times$  10<sup>6</sup> cells/plate씩 분주하여 24 h 동안 배양한 후 염증 유발을 위해 LPS 1  $\mu$ g/mL을 6 h 동안 처리하여 자극을 유발하였다. 염증 관련 유전자의 mRNA 발현량을 비교 분석하기 위해 total RNA를 TRIzol reagent (Ambion, USA)을 사용하여 추출하였다. 추출한 total RNA는 -80 °C에 보관하여 사용하였으며, Revertra ACE kit (Toyobo, Japan)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Tris/EDTA buffer를 첨가하여 1/5로 희석해서 사용하였다. RT-PCR 실험은 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)에 Taqman probe (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 실시간으로 유전자별 mRNA 발현량을 분석하였다. 실험에 사용된 probe들은 Table 1에 표

기하였다.

## 2.6. 통계처리

통계처리는 Student's *t*-test를 실시하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

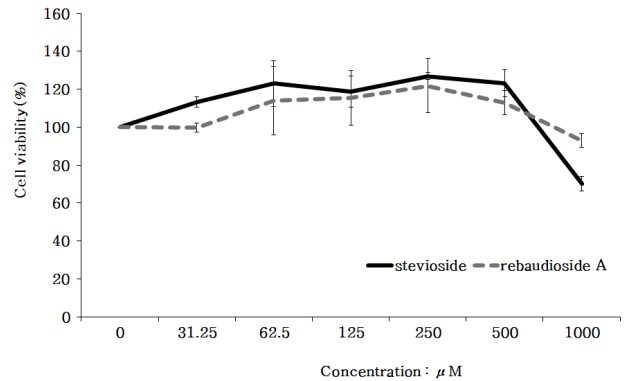
## 3. 실험 결과

### 3.1. 스테비올 배당체들의 세포 독성 평가

스테비올 배당체들이 RAW264.7 세포의 증식과 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 CCK-8 assay를 진행하였다. 시험에 사용할 각각의 농도의 범위는 기존 논문을 활용하여 0-1,000  $\mu$ M로 설정하였다. RAW264.7 대식세포에 최대 1,000  $\mu$ M로 설정하고 농도별로 희석하여 세포 처리 후 24 h 뒤에 생존율을 산출한 결과 스테비오사이드의 경우 250  $\mu$ M까지 세포 생존율이  $127 \pm 2\%$ 로 유지되었고, 이후 500  $\mu$ M에서는  $123 \pm 7\%$ , 1,000  $\mu$ M에서는  $70 \pm 4\%$ 로 감소하는 경향이 나타났다. 리바우디오사이드 A의 경우 250  $\mu$ M까지  $122 \pm 14\%$ 로 세포 생존율이 증가되다가 500  $\mu$ M에서는  $113 \pm 6$ , 1,000  $\mu$ M에서는  $93 \pm 4\%$ 로 감소하는 경향이 나타났다. 이러한 세포 생존율 실험 결과 RAW264.7 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 조건에서 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A의 효과를 극대화하기 위한 최대 농도값을 250  $\mu$ M로 설정하여 추후 모든 실험에 적용하였다(Figure 1).

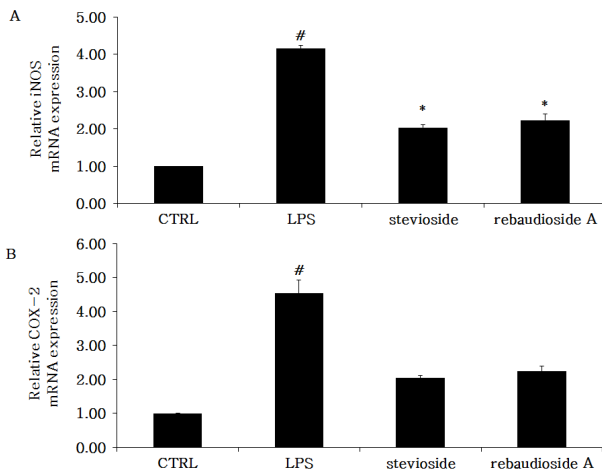
### 3.2. 스테비올 배당체에 의한 iNOS 및 COX-2 발현 조절

염증반응은 병원균, 손상된 세포 등과 같은 생체 조직의 유해한 자극원에 대한 생체반응 중 하나이다. 염증반응은 주로 비만세포에서 분비되는 히스타민과 대식세포가 분비한 사이토카인 등에 의해 시작되는데 염증반응에서 iNOS는 평소엔 발현이 되지 않지만 사이토카인 분비에 의해 자극을 받으면 전사조절에 의해 발현되며 다양한 생리적 병리적 기능을 수행하는 NO를 생성한다[21]. 염증을 매개하는 물질로 잘 알려진 PG는 염증이나 혈소판 응집 등과 같은 생리적, 병리적 기능에 관여하는 물질로 그중 PGE2 (prostaglandin E2)가 가장 잘 알려져 있다. PGE2의 합성은 COX에 의해 촉진되는데, COX는 지속적으로 발현되는 COX-1과 염증 등의 자극에 의해 발현되는 COX-2가 있다[22].



**Figure 1.** Examination of the cytotoxicity of stevioside and rebaudioside A in RAW264.7 cells by CCK-8 assay. As a result, it was decided to use steviol glycosides at a maximum concentration of 250  $\mu$ M. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of the percentage of control density (OD) in triplicate.

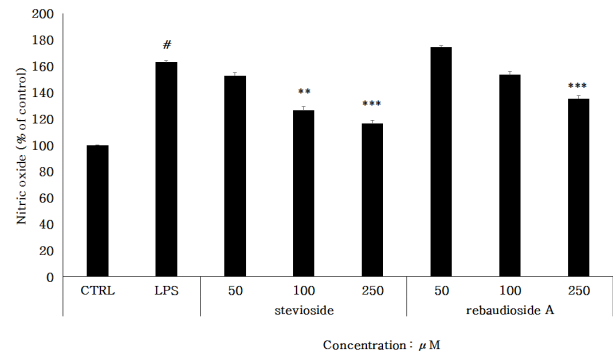
따라서 우리는 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 대식세포에서 스테비올 배당체들에 의한 iNOS와 COX-2 유전자 발현을 확인하였다. 우선 염증반응을 유발하기 위하여 LPS 1  $\mu$ g/mL을 처리하였으며 iNOS 발현이 유의적으로 증가되는 것을 확인하였다. 이는 본 실험에서 염증자극이 정상적으로 유도되었음을 의미하며, 이 조건에서 각각의 소재 250  $\mu$ M 처리 시 iNOS mRNA 발현량 변화를 관찰하였다. LPS 처리군에서는 iNOS mRNA 발현이 음성 대조군 대비  $4.16 \pm 0.07$ 배 증가한 반면 양성 대조군인 스테비오사이드(250  $\mu$ M)는  $2.04 \pm 0.08$ 로 LPS 처리군 대비 51% 감소하였다. 또한 리바우디오사이드 A를 처리한 결과  $2.24 \pm 0.16$ 로 LPS 처리군 대비 47% 유의성 있게 감소하였다(Figure 2A). 또한 LPS 처리 조건에서 COX-2의 mRNA 발현을 확인한 결과 발현량이 음성 대조군 대비  $4.61 \pm 0.37$ 배 증가하였고, 스테비오사이드 처리군에서는  $2.86 \pm 0.40$ 로 LPS 처리군 대비 38% 감소하였다. 리바우디오사이드 A를 250  $\mu$ M 조건으로 처리한 경우  $2.76 \pm 0.2$ 배로 측정값의 유의성은 없으나 COX-2의 mRNA 발현은 LPS 처리군 대비 41% 감소하였다(Figure 2B). 이러한 LPS 자극에 의해 유도된 RAW264.7 대식세포에서 iNOS 및 COX-2 유전자의 mRNA 발현량 억제로 스테비오사이드 뿐 아니라 리바우디오사이드 A가 항염 조절 기능이 있음을 확인하였다.



**Figure 2.** To verify effect on inflammatory regulation by steviol glycosides, iNOS and COX-2 gene expression was examined by RT-PCR. (A) The expression of iNOS was decreased by stevioside or rebaudioside A in the presence of LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) COX-2 was negatively regulated by stevioside or rebaudioside A in the presence of LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). #:  $p < 0.05$ , compared to control, \*:  $p < 0.05$ , compared to LPS treated group.

### 3.3. NO 생성량 측정

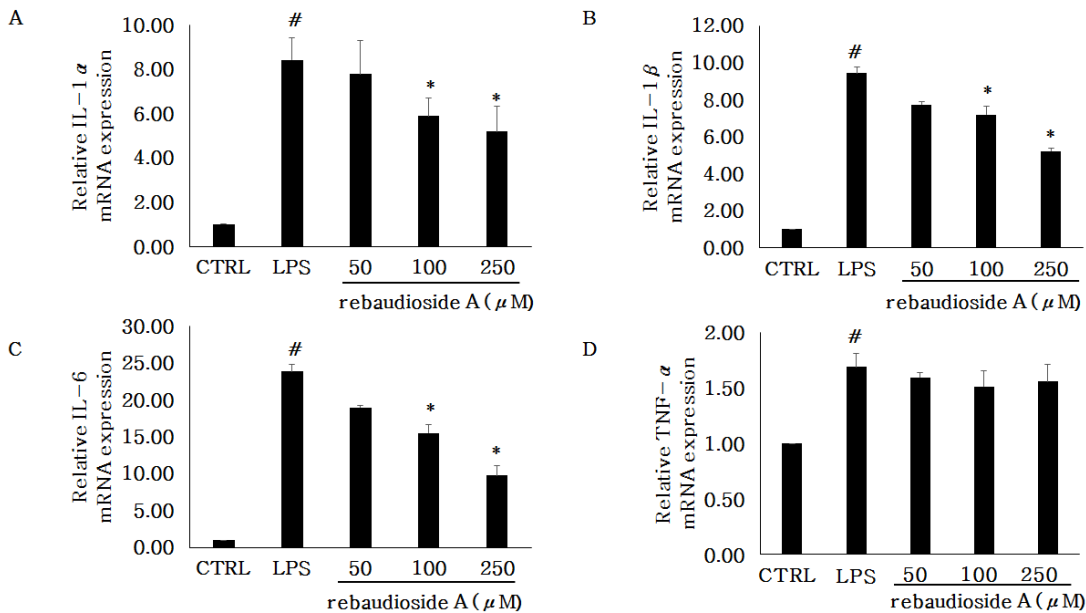
LPS로 활성화된 RAW264.7 세포의 NO 생성에 스테비올 배당체가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Griess reagent를 이용하여 Griess assay를 진행하였다. sodium nitrate 0-62.5  $\mu\text{M}$  범위를 기준으로 하여 standard curve를 작성한 후 NO의 양을 산출하였다(Figure 3A). 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 NO 생성량을 100%로 환산하였을 때, LPS를 처리한 경우  $162.16 \pm 2.71\%$ 로 유의 수준 만큼 증가하여 염증이 정상적으로 유발됨을 확인하였다. 우선 양성대조군인 스테비오사이드를 50, 100, 250  $\mu\text{M}$ 로 각각 처리하였을 때 NO 생성량은  $151.02 \pm 4.86$ ,  $125.68 \pm 3.34$ ,  $115.42 \pm 3.52\%$ 로 최대 250  $\mu\text{M}$  조건에서 LPS 처리군 대비 29% 감소하는 것을 확인하였다. 이와 동일한 농도 조건에서 리바우디오사이드 A를 각각 처리하였을 때  $174.22 \pm 1.48$ ,  $152.22 \pm 3.90$ ,  $134.42 \pm 3.21\%$ 로 NO의 생성량이 관찰되었고, LPS 처리군 대비 18% 감소하여 리바우디오사이드 A 또한 NO 생성 억제에 관여함을 알 수 있었다(Figure 3).



**Figure 3.** Inhibitory effects of steviol glycosides (stevioside, rebaudioside A) on the production of NO in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. #:  $p < 0.05$ , compared to control, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , compared to LPS treated group.

### 3.4. 리바우디오사이드 A에 의한 염증 유발 사이토카인 발현량의 변화

스테비올 배당체인 리바우디오사이드 A의 염증 유발 사이토카인 조절 기작을 관찰하였다. 먼저 RAW264.7 대식세포에 LPS를 6 h 처리하여 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 발현을 촉진하고 리바우디오사이드 처리에 따른 발현량 변화를 관찰하였다. LPS 처리 군에서 IL-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현은 음성대조군 대비  $8.43 \pm 0.99$ 배 증가하여 염증 유발이 정상적으로 이뤄졌음을 확인하였다. 동일한 조건하에 리바우디오사이드 A 50, 100, 250  $\mu\text{M}$  처리한 경우 IL-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현은  $7.78 \pm 1.50$ ,  $5.89 \pm 0.79$ ,  $5.19 \pm 1.14$ 배로 LPS 처리군 대비 18%, 28%, 40% 감소하였다(Figure 4A). IL-1 $\beta$ 의 경우 LPS를 처리하여 음성대조군 대비  $9.44 \pm 0.33$ 로 발현량 증가를 확인하였고, 리바우디오사이드 A 50, 100, 250  $\mu\text{M}$  처리 조건에서는  $7.74 \pm 0.17$ ,  $7.21 \pm 0.44$ ,  $5.23 \pm 0.16$ 배로 LPS 처리군 대비 18%, 24%, 45%로 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Figure 4B). IL-6의 유전자 발현량이 LPS를 처리한 경우 대조군 대비  $23.84 \pm 0.89$ 배 증가하였을 때 리바우디오사이드 A를 50, 100, 250  $\mu\text{M}$  처리한 경우  $18.98 \pm 0.28$ ,  $15.46 \pm 1.22$ ,  $9.76 \pm 1.35$ 배로 LPS 처리군 대비 20%, 35%, 59% 감소하였다(Figure 4C). 그러나 동일한 실험조건에서 관찰한 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량에서는 LPS 처리군 대비 감소하는 현상이 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다(Figure 4D). 위의 결과들에서 확인되었듯이 리바우디오사이드 A는 염증 유발 조절 사이토카인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의



**Figure 4.** The expression level of inflammation-related genes was examined by real-time RT PCR. When treated with rebaudioside A, IL-1 $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B), IL-6(C) and TNF- $\alpha$ (D) gene expression were decreased as a dose-dependent manner. #:  $p < 0.05$ , compared to control \*:  $p < 0.05$ , compared to LPS treated group.

mRNA 발현을 억제하고 항염 효과를 나타낸다.

#### 4. 결 론

본 연구팀은 스테비아 식물 잎 추출물의 피부 효능 연구를 통해 스테비아 추출물 내 기본 아글리콘 구조인 스테비올과 그 배당체들에 대한 연구를 통해 피부 장벽과 밀접한 관련이 있는 밀착연접 관련 단백질인 클라우딘(claudin) 8의 유전자 발현을 특이적으로 억제하고 그 배당체인 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A의 경우 클라우딘 8 발현의 억제효과가 관찰되지 않고 오히려 피부투과도가 감소하며 피부장벽 강화 효과가 있음을 보고하였다[7]. 또한 스테비오사이드의 항염 효과에 대한 선행연구가 이미 보고되어 또 다른 스테비올 배당체인 리바우디오사이드 A의 항염 검증 연구를 수행하였다[5]. 세포독성이 없고 효과를 극대화할 수 있는 농도값을 정하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였고 리바우디오사이드 A 최대 농도를 250  $\mu$ M로 설정 하여 모든 실험을 진행하였다. 또한 농도 의존성을 확인하기 위해 각각 50, 100, 250  $\mu$ M로 농도 조건을 맞춰 실험을 진행하였다. 항염증 조절 연구를 위해 LPS

로 활성화된 마우스 RAW264.7 대식세포를 이용하여 iNOS, COX-2, 사이토카인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  등의 mRNA 발현을 RT-PCR 실험을 통해 분석하였다. LPS 1  $\mu$ g/mL을 6 h 동안 처리하여 RAW264.7 대식세포를 활성화 시킨 후 양성대조군인 스테비오사이드를 최대농도 250  $\mu$ M로 처리한 결과, 기 보고된 바와 같이 iNOS 및 COX-2 유전자 발현은 모두 유의적으로 감소하였고(Figure 2) NO 생성 또한 감소됨이 확인되었다(Figure 3). 리바우디오사이드 A를 250  $\mu$ M 조건으로 처리하였을 때 iNOS 발현은 LPS 처리군 대비 47% 감소하였고, COX-2의 발현 또한 LPS 처리군 대비 41% 감소하였다(Figure 2). NO 생성 시험에서는 LPS 처리군 대비 18% 억제되었으며(Figure 3) 염증 조절 사이토카인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현은 LPS 처리군 대비 40%, 45%, 59% 농도 의존적 감소 현상이 관찰되었다(Figure 4). 이러한 연구 결과들을 통해 우리는 리바우디오사이드 A의 신규 항염증 조절 소재 가능성을 최초로 규명하였다.

결론적으로 스테비올의 배당체인 스테비오사이드 뿐 아니라 리바우디오사이드 A는 NO의 생성량을 감소시키면서 사이토카인의 유전자 발현을 억제하여 피

부 내 염증반응을 조절하는 신규 항염증 기능성 소재이다. 따라서 향후 피부 세포장벽 기능 강화 및 항염증 조절을 통한 아토피 피부염 개선 소재로서의 개발 가능성이 있으며, 추후에 염증반응의 신호 전달 기전에 대한 추가 연구 및 임상평가가 충분히 진행된다면 아토피 피부염 개선 화장품 원료로서 산업화 가능성이 있다고 사료된다.

### Acknowledgement

본 연구는 2015년도 중소기업청 기술혁신개발사업 (효소전환기술에 의한 스테비올 배당체의 개발 및 응용, S2313489) 지원을 받아 수행되었습니다.

### Reference

1. S. K. Goyal, Samsher, and R. K. Goyal, Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review, *Int. J. Food Sci. & Nutr.*, **61**(1), 1 (2010).
2. A. S. Dacome, C. C. Da Silva, C. E. Da Costa, J. D. Fontana, J. Adelman, and S. C. Da Costa, Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods, *Proc. Biochem.*, **40**(11), 3587 (2005).
3. H. Misra, M. Soni, N. Silawat, D. Mehta, B. K. Mehta, and D. C. Jain, Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J. Pharm. & Bio. Sci.*, **3**(2), 242 (2011).
4. K. Philippaert, A. Pironet, M. Mesuere, W. Sones, L. Vermeiren, S. Kerselaers, S. Pinto, A. Segal, N. Antoine, C. Gysemans, J. Laureys, K. Lemaire, P. Gilon, E. Cuypers, J. Tytgat, C. Mathieu, F. Schuit, P. Rorsman, K. Talavera, T. Voets, and R. Vennekens, Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nat. Commun.*, **8** (2017).
5. L. Fengyang, F. Yunhe, L. Bo, L. Zhicheng, L. Depeng, L. Edjie, Z. Wen, C. Yongguo, Z. Naisheng, Z. Xichen, and Y. Zhengtao, Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells, *Inflammation*, **35**(5), 1669 (2012).
6. S. Y. Kim, M. J. Jo, M. H. Hwangbo, Y. D. Back, T. Y. Jeong, I. J. Cho, and S. Y. Jee, Anti-inflammatory effect of *Stevia rebaudiana* as a results of NF- $\kappa$ B and MAPK inhibition, *J. Kor. Med. Ophthalmol. & Otolaryngol. & Dermatol.*, **26**(3), 54 (2013).
7. S. K. Choi, N. J. Cho, U. M. Cho, J. H. Shim, K. K. Kim, and H. S. Hwang, Inhibitory effect of steviol and its derivatives on cell migration via regulation of tight junction-related protein claudin 8, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**, 403 (2016).
8. H. J. Kim, J. U. Shin, and K. H. Lee, Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction, *Allergy Asthma & Respir. Dis.*, **1**(1), 20 (2013).
9. C. L. Chaffer and R. A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis, *Science*, **331**(6024), 1559 (2011).
10. T. Bieber, Atopic dermatitis, *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1483 (2008).
11. M. Boguniewicz and D. Y. M. Leung, Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation, *Immunol. Rev.*, **242**(1), 233 (2011).
12. E. H. Choi, Skin barrier related pathogenesis and its clinical application in atopic dermatitis, *Kor. Acad. Asthma Allergy Clin. Immunol.*, 573 (2012).
13. A. De Benedetto, N. M. Rafaels, L. Y. McGirt, A. I. Ivanov, S. N. Georas, C. Cheadle, and M. Boguniewicz, Tight junction defects in patients with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**(3), 773 (2011).
14. Nilesh Morar, Saffron A.G. Willis-Owen, Miriam F. Moffatt, and William O. C. M. Cookson, The genetics of atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**, 24 (2006).
15. H. Rossiter, F. Van Reijssen, G. C. Mudde, F. Kalthoff, A. F. M. Carla, L. J. Picker, and T. S. Kupper, Skin disease-related T cells bind to endothe-

- lial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding, *Eur. J. Immunol.*, **24**(1), 205 (1994).
16. J. W. Kim, Review: Atopic dermatitis from an allergic and immunological point of view, *Kor. J. Dermatol.*, **46**(6), 687 (2003).
  17. E. E. Aeberhard, S. A. Henderson, N. S. Arabolos, J. M. Griscavage, F. E. Castro, C. T. Barrett, and L. J. Ignarro, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**(3), 1053 (1995).
  18. D Salvemini, T. P. Misko, J. L. Masferrer, K. Seibert, M. G. Currie, and P. Needleman, Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**(15), 7240 (1993).
  19. M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura, and K. Ueno, A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta*, **44**(7), 1299 (1997).
  20. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
  21. J. MacMicking, Q. W. Xie, and C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 323 (1997).
  22. M. E. Turini and R. N. DuBois, Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.*, **53**, 35 (2002).