



## Anti-inflammation effect of rebaudioside A by inhibition of the MAPK and NF- $\kappa$ B signal pathway in RAW264.7 macrophage

Da Hee Choi<sup>1</sup> · Uk Min Cho<sup>1</sup> · Hyung Seo Hwang<sup>1</sup>

### RAW264.7 대식세포에서 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 신호전달 억제를 통한 rebaudioside A의 항염 효과

최다희<sup>1</sup> · 조옥민<sup>1</sup> · 황형서<sup>1</sup>

Received: 11 May 2018 / Accepted: 11 June 2018 / Published Online: 30 June 2018  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

**Abstract** Rebaudioside A is a natural sweetener isolated from *Stevia rebaudiana Bertoni*, one of the glycosides based on steviol. Recent studies have shown that rebaudioside A inhibits the inflammatory response by inhibiting cytokines secretion such as interleukin-1 $\alpha$ /1 $\beta$  in activated RAW264.7 mouse macrophage cells by LPS. However, the inhibitory mechanism of inflammation by rebaudioside A in the presence of LPS has not been fully elucidated. Therefore, in this study, we tried to investigate the anti-inflammatory activity of rebaudioside A at the protein level when RAW264.7 cells were stimulated by LPS. The inducible nitric oxide synthase protein expression level was reduced in the group treated with 250  $\mu$ M rebaudioside A compared to the LPS-treated group. In addition, the mRNA expression level of NF- $\kappa$ B, which is a representative nuclear transcription factor by inflammatory signal, was also decreased as compared with that of LPS-treated group. In addition, NF- $\kappa$ B and inhibitor- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) complexes that are known to be dissociated by I- $\kappa$ B phosphorylation and ubiquitination were less phosphorylated than LPS treated group in the presence rebaudioside A. Finally, we could find that rebaudioside A was involved in the NF- $\kappa$ B pathway through

reducing extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation in a concentration-dependent manner. These results suggest that rebaudioside A might suppress inflammatory reaction through MAPK and NF- $\kappa$ B regulation in LPS-stimulated RAW264.7.

**Keywords** Anti-inflammation · Mitogen-activated protein kinase · NF- $\kappa$ B · RAW264.7 cell · Rebaudioside A

### 서론

염증이란 보통 외부 병원체 침입 및 위험인자에 감염된 세포로 인해 촉발되는 생체반응을 말한다. 이는 다양한 면역세포, 혈관, 신호전달 단백질 등이 복합적으로 작용하는 일종의 인체 보호 반응이다. 이러한 염증반응은 손상된 세포의 추가적인 분열을 억제하고, 괴사된 세포 및 상처 조직을 제거함과 동시에 조직 재생을 하는데 궁극적 목적이 있다. 이러한 염증에 관여하는 화합물질은 히스타민과 프로스타글란딘이 대표적이다. 히스타민은 혈액과 림프액을 손상된 부위로 유인하는 작용을 통해 혈관확장을 촉진시킨다. 이 때 백혈구가 혈관 내피세포로 유입되고 통증과 발열이 발생하게 된다. 염증반응은 크게 급성염증과 만성염증으로 구분되는데, 만성염증은 류마티스 관절염, 천식, 아토피 등 자가면역질환에서 주로 나타난다. 만성염증은 증상이 심해지면 조직 파괴 및 괴사까지 진행되기 때문에 염증억제가 무엇보다 중요하다[1]. 따라서 항염증제 개발이 활발히 진행 중이나 지금까지 개발된 항염증제는 인체 안전성에 대한 문제를 지니고 있어, 최근에는 천연물로부터 항염증 물질을 찾는 연구들이 활발히 진행되고 있다[2].

Hyung Seo Hwang (✉)  
E-mail: hshwang@semyung.ac.kr

<sup>1</sup>School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 65, Semyungro, Jechon, Chungbuk 27136, Republic of Korea

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.

식물 유래 천연 생리활성 물질 중 플라보노이드는 *in vitro* 에서 활성산소의 라디칼 제거능과 항염증, 항알레르기, 항바이러스 및 항암 효능이 알려진다[3,4]. 플라보노이드 계열 중에 대표적인 항산화 소재이며 폴리페놀 화합물인 퀘르세틴(Quercetin)의 산화질소(NO) 라디칼 제거 및 COX 활성 억제능이 규명되었다[5]. 또한 플라보노이드 계열들은 혈관 내피에 고정화되는 백혈구의 수를 감소시켜 염증반응을 완화시켰다[6]. 대표적 피부 염증 질환인 아토피 피부염에서는 염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-4, IL-13 등의 분비 증가로 백신 부작용인 중두 습진(eczema vaccinatum) 증상이 나타나고, IL-1 계열인 IL-33이 과도하게 분비되어 각종 사이토카인, 케모카인의 분비와 호산구 부착이 유도된다[7,8,9].

최근 연구들에 따르면 LPS에 의한 세포 내 염증반응은 세포막의 TLR4 수용체, Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4 (IRAK1/4)에 의한 NF-κB 활성화와 더불어 p38, c-Jun amino-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) 등의 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통한 NF-κB 활성화와 연계된다[10,11]. MAPK는 정상적인 세포의 분열 및 증식, 분화조절 등에 관여하며 단백질 인산화에 의해 부분적으로 제어되는 특징을 가지고 있다. 또한 MAPK는 주로 ERK1/2, JNK, p38 kinase이며 LPS 또는 성장인자들에 의해 활성화되고 궁극적으로는 NF-κB까지 연결된다[12]. 또한 NF-κB가 여러 염증성 사이토카인과 COX-2, iNOS 유전자 발현을 조절하는 전사인자(transcription factor)이며, NF-κB는 p50과 p65 두 개의 subunit으로 구성되는데 정상 조건에서는 억제제인 inhibitor-κB (I-κB)와 결합되어 비활성 상태로 존재한다[13]. 그러나 LPS와 같이 외부로부터 염증 자극이 발생하면 I-κB는 IKKα/β에 의해 인산화 및 ubiquitination 되어 빠르게 분해되고, NF-κB (p50/p65) 이합체는 자유로이 활성화되어 세포질에서 핵으로 이동하게 된다[14]. 또한 핵으로 이동된 NF-κB (p50/p65)가 p65의 인산화로 더욱 활성화됨이 증명되었다[15]. 따라서 NF-κB는 LPS로 활성화 된 염증 조절 연구에 있어서 가장 중요한 인자이다. 이에 본 연구에서는 항염 효과를 나타내는 천연 소재 발굴을 목표로 NF-κB 및 MAPK 신호 체계 조절을 통한 염증성 사이토카인 분비 억제에 효과를 보이는 신규 소재를 발굴하고자 하였다. 선행 연구를 통해 우리는 LPS 자극에 의해 활성화 된 RAW264.7 세포를 이용해 rebaudioside A를 처리하였을 때, IL-1α, -1β, -6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 mRNA 발현이 유의성 있게 감소됨을 확인하였다[16,17,18]. 그러나 세포 내 정확한 신호 전달 및 단백질 수준에서의 조절기작 규명은 이뤄지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 활성화 된 RAW264.7 마우스 대식세포에서 rebaudioside A가 NF-κB 조절 및 MAPK signal pathway를 통해 항염 효능을 나타내는지 분자 수준에서 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 연구에서 사용한 스테비올 배당체인 rebaudioside A((4α)-13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl)-3-O-β-D-glucopyranosyl]-β-D-

glucopyranosyl)-oxy]kaur-6-en-8-oic acid β-D-glucopyranosyl ester, CAS Number 58543-16-1) 및 LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli*)는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 직접 구매하여 사용하였다.

### 세포 배양

본 실험에서 사용된 RAW264.7 마우스 대식세포는 한국세포주 은행에서 분양 받았고 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Kyungsan, Kyungbuk, Korea)에 60 °C에서 불활성화 된 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Kyungsan, Kyungbuk, Korea)와 penicillin 100 U/mL (Gibco, Dublin, Ireland), streptomycin sulfate (100 µg/mL)을 혼합하여 사용하였으며, 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% 조건에서 배양하였다. Cell culture plate에 RAW264.7 세포를 48시간 배양한 후 세포 증식에 따른 과밀도 현상을 해결하기 위해 48시간 마다 계대배양을 실시하였다. 또한 배양 중 발생하는 비특이적인 대식세포 활성을 방지하기 위해 계대배양 시 트립신을 처리 하는 대신 물리적 방법으로만 세포를 분리하였고, 매 24시간 마다 현미경으로 RAW264.7 세포 morphology를 관찰하였다.

### 세포독성 실험

세포독성 실험은 CCK-8 (Cell counting kit-8 DogenBio, Seoul, Korea) assay 방법으로 수행하였다. RAW264.7 세포를 24 well-plate에 well 당 약 5.0×10<sup>4</sup> 개가 되도록 500 µL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 기존 배양 배지를 rebaudioside A처리한 새로운 배양배지로 교체한 후 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배양 배지를 제거한 후 1/10로 희석된 CCK-8 용액을 각 well에 500 µL씩 분주하여 30분간 반응시켰다. 살아있는 세포에서는 water soluble tetrazolium salt와 Dehydrogenase가 반응하여 오렌지 색의 수용성 formazan이 생성되므로 이 때 상등액만 채취하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 수식에 따라 세포 생존율(cell viability)를 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}}^{\text{a}} - \text{OD}_{\text{blank}}^{\text{b}}}{\text{OD}_{\text{control}}^{\text{c}} - \text{OD}_{\text{blank}}^{\text{b}}} \times 100$$

a: rebaudioside A 처리군의 흡광도

b: CCK-8 solution의 흡광도

c: 대조군의 흡광도

### RT-PCR 및 mRNA 발현량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well의 세포수가 되도록 2 mL씩 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 대식세포가 비활성화 된 조건에서 염증 자극 유발을 위해 LPS (1 µg/mL)를 처리하고 동시에 rebaudioside A를 최대 250 µM 농도까지 함께 처리하였다. 염증 관련 유전자의 mRNA 발현량을 분석하기 위하여 배양배지를 제거 한 후, 1 mL TRIzol reagent (Ambion, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1.5 µg이 되도록 정량한 후 Revertra ACE kit (Toyobo, OSAKA, Japan)를 사용하여 42 °C 20분, 99 °C 5분, 4 °C 5분 조건에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 100X Tris/EDTA buffer (Sigma Aldrich)를 1X로 DEPC water (Sigma aldrich)로 희석하여 사용하였다. RT-PCR

**Table 1** Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Mm00476361_mL
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1

**Table 2** Protein and antibody catalog number in western blot analysis

Symbol	Protein name	Catalog No.
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	MA5-15738
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	PA3-030A
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	PA5-16545
p-NF-κB	Phospho - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	MA5-15160
I-κBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	39-7700
p-I-κBα	Phospho - nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	MA5-15087
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2	13-6200
p-ERK1/2	Phospho - extracellular signal-regulated kinase 1/2	700012
Secondary Antibody	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secodary Antibody, HRP	31460
	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secodary Antibody, HRP	31430

실험은 Step one realtime PCR (Applied biosystems, Foster city, CA, USA) 장비와 Taqman probe (Applied biosystems)를 사용했으며 50 °C 2분, 95 °C 10분의 holding stage 후 95 °C 15초, 60 °C 1분의 cycling stage를 약 45회 실시하여 실시간으로 mRNA 발현량을 분석하였다. 실험에 사용된 Taqman probe는 Table 1에 별도로 표기 하였다.

**Western blot Assay에 의한 단백질 발현 측정**

6 well plate에 1.0×10<sup>6</sup> cells/well의 세포수가 되도록 2 mL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 염증 관련 단백질의 발현량을 분석하기 위해 LPS (1 µg/mL)와 rebaudioside A를 농도별 (62.5, 125, 250 µM)로 각각 처리하여 최소 15분에서 24시간까지 조건 별로 배양 하였다. 배양 이후 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척 한 후 RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, phosphatase inhibitor cocktail, 50 mM EDTA) 100 µL를 분주하여 15분 동안 교반 한 후, 4 °C 12000 rpm 조건에서 15분간 원심 분리 하여 단백질을 추출하였고 정량은 Bradford (Bio-rad, Hercules, CA, USA) assay를 통해 진행하였다. 단백질은 laemmli sample buffer (31.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% Bromophenol Blue), β-mercaptoethanol 혼합액에서 약 95 °C, 5분간 가열한 후, 10% SDS-PAGE gel을 Tris/Glycine/SDS running buffer 조건에서 전기영동 후 iBlot dry blotting system (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 한 후 primary antibody를 상온에서 1시간 처리한 후 TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) buffer로 5분간 6회 washing, 다시 secondary antibody를 1시간 동안 처리한 후 동일한 방법으로 washing 하였다. 이후 Western ECL substrates (Bio-rad)를 PVDF membrane 위에 처리하고 암실에서 약 5분간 반응한 후 이미지 처리장치 (Microchemi-DNR, Neve Yamin, Israel)로 단백질 발현량을 측

정 하였다. 실험에 사용된 Antibody는 모두 Thermo fisher (Waltham, MA, USA) 제품을 사용하였으며, 사용된 Antibody는 Table 2에 표기하였다. 또한 본 연구에서 사용한 단백질 발현량에 대한 정량 분석은 Image J 프로그램(N.I.H, Bethesda, MD, USA) 활용을 통해 분석하였다.

**통계처리**

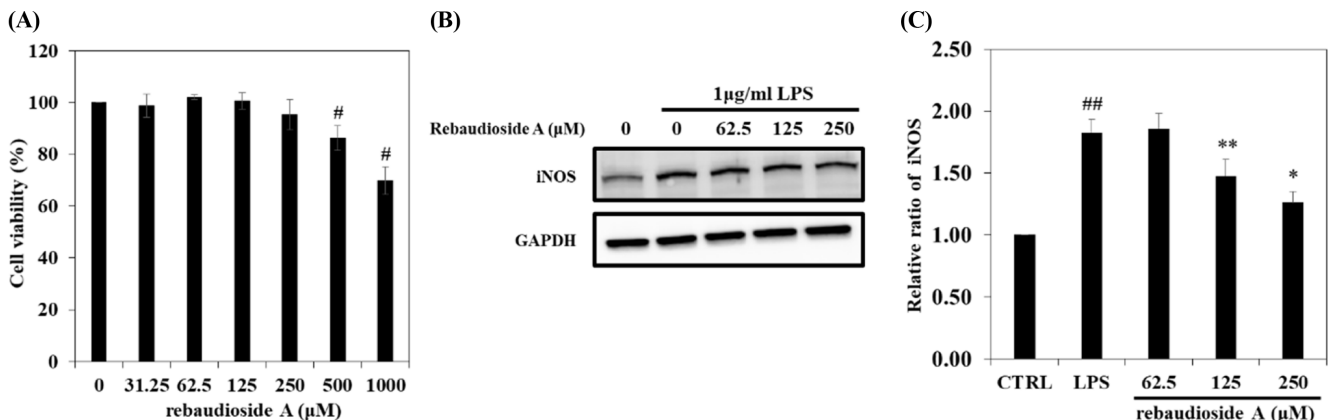
본 연구의 모든 실험은 세 번 이상 반복 하였으며, 통계처리는 얻어진 결과들을 평균값과 표준편차를 이용하여 Student's t-test를 실시하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

**결 과**

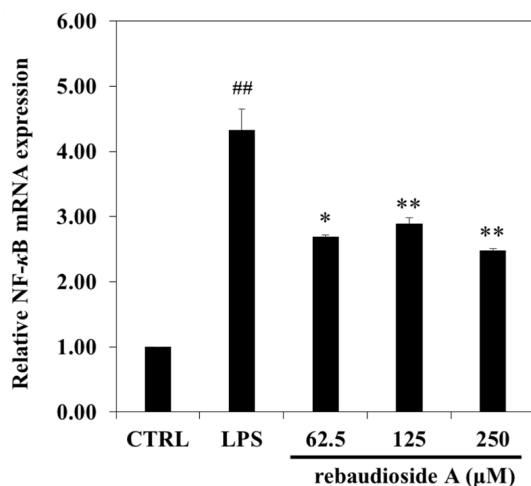
**RAW264.7 대식세포에서 rebaudioside A에 의한 iNOS 단백질의 조절**

염증 유발 물질인 NO (Nitric Oxide)생성에 직접적으로 관여하는 iNOS 단백질의 발현량 변화를 Western Blot 실험기법을 통해 확인하였다. 이를 위해 CCK-8 assay를 수행하여 rebaudioside A가 RAW264.7 세포 증식과 독성에 미치는 영향을 관찰 한 결과 0–1,000 µM 중 250 µM 이후부터 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 이에 이후 모든 실험에서 rebaudioside A는 250 µM을 최대 농도로 설정하였다(Fig. 1A).

RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 활성화를 유발한 후 rebaudioside A를 동시에 처리하여 iNOS 단백질의 발현량을 비교하였다. 무처리군, LPS 처리군, LPS와 rebaudioside A 처리군에 대한 iNOS 단백질 발현을 측정하였다(Fig. 1B). LPS 처리군에서는 무처리군 대비 182.4±10.8%로 유의 수준만큼 증가해 염증이 유발되는 것을 확인하였고, 이 때 rebaudioside A를 농도별로 처리해 본 결과 62.5 µM에서는 큰 변화가 나타나지 않았지만, 125, 250 µM 농도 조건에서는 147.6±13.4, 126.1±8.6%로 각각 19, 31% 수준 만큼 감소됨을 확인하였다.



**Fig. 1** Rebaudioside A suppressed iNOS protein expression as concentration dependent manner in the presence of LPS. (A) CCK-8 assay was performed to validate cytotoxicity of rebaudioside A. (B) Cells were treated by 62.5, 125, and 250 μM rebaudioside A for 24 h. The expression of iNOS protein was detected by western blot using iNOS, GAPDH antibodies. (C) iNOS protein level was validated by Image J.  $^{#}p < 0.05$ , compared to control,  $^{##}p < 0.01$ , compared to control,  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$  compared to LPS group



**Fig. 2** mRNA expression of NF-κB was suppressed by rebaudioside A in RAW264.7 cells. RT-PCR was carried out to validate mRNA expression of NF-κB by rebaudioside A in RAW264.7 cells. Cells were treated with 1 μg/mL LPS in absence or presence of rebaudioside A (62.5, 125 and 250 μM) for 1 h.  $^{##}p < 0.01$ , compared to control,  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ , compared to LPS group

이를 통해 rebaudioside A는 LPS 처리 조건에서 RAW264.7 대식세포 내 iNOS 단백질 발현을 억제하였고, 이로 인해 NO 생성이 감소됨을 예상할 수 있다(Fig. 1C).

#### RAW264.7 세포에서 rebaudioside A에 의한 NF-κB mRNA 발현량 감소

스테리아 추출물 중 rebaudioside A는 NO 생성 억제 및 염증성 사이토카인 발현을 농도 의존적 경향으로 조절하였고, 염증성 사이토카인 발현은 주로 NF-κB와 연관되어 있기 때문에 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에 rebaudioside A를 농도별로 처리하고 전사인자 NF-κB의 mRNA 발현을 확인하였다. Rebaudioside A 처리에 의한 NF-κB mRNA 발현량은 LPS 처

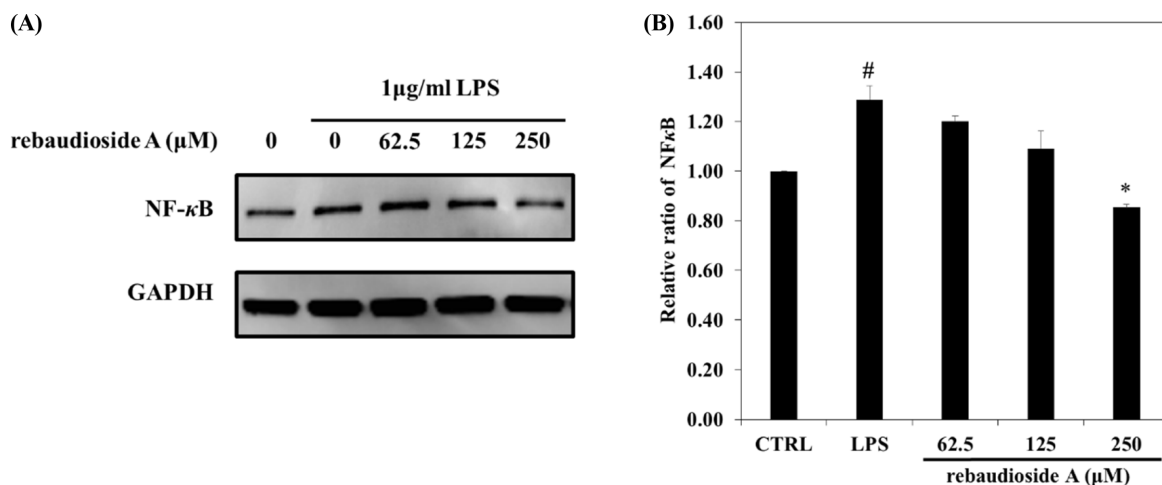
리군에서 무처리 대조군 대비  $432.9 \pm 31.8\%$  수준까지 증가하여 염증 유발이 정상적으로 이뤄진 것을 확인하였고, rebaudioside A 62.5 μM 처리군에서는 NF-κB가 대조군 대비  $268 \pm 2.7\%$ 로 38% 감소, 250 μM 조건에서는  $289.4 \pm 9.1\%$  수준으로 43% 감소하였다(Fig. 2).

#### Rebaudioside A에 의한 NF-κB 단백질 발현 억제

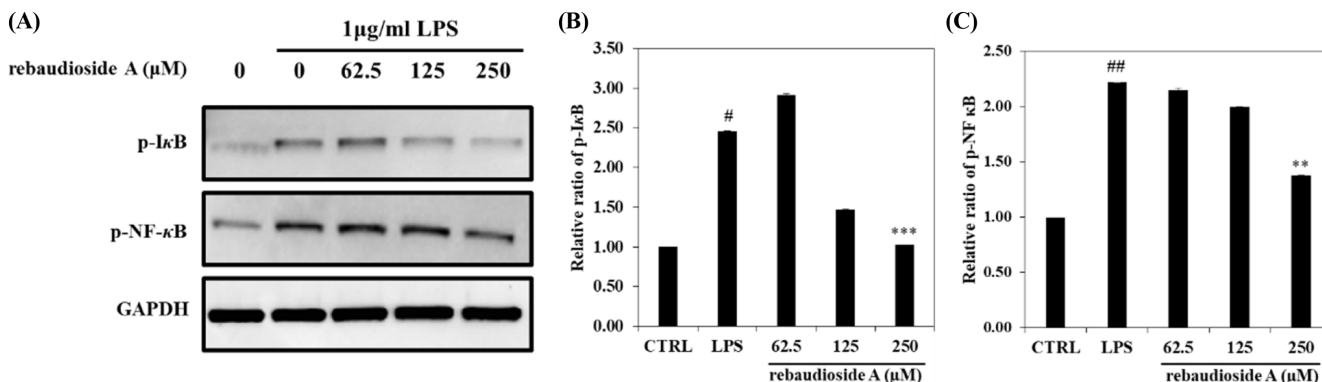
Rebaudioside A에 의한 NF-κB 단백질 발현량을 비교하기 위해 LPS로 RAW264.7 세포를 활성화 시킨 후 rebaudioside A를 농도별로 처리하여 NF-κB 단백질 발현을 관찰하였다(Fig. 3A). LPS 처리군에서 NF-κB 단백질은  $128.8 \pm 5.6\%$ 로 증가하였고, Fig. 2에서 NF-κB mRNA 발현을 감소시켰던 농도인 62.5 μM 처리군에서는 대조군 대비 NF-κB 단백질 발현량이 감소되었으나 유의성은 없었고, 보다 고농도 조건인 250 μM 에서  $85.5 \pm 1.3\%$ 로 LPS 처리군 대비 34% 감소하여 유의성 있게 NF-κB 단백질 발현이 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 LPS 처리로 활성화된 대식세포에서 rebaudioside A에 의해 NF-κB 유전자 및 단백질 합성 모두 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

#### Rebaudioside A에 의한 I-κB 및 NF-κB 인산화 저해

Rebaudioside A에 의한 I-κB 및 NF-κB 인산화 조절 기능을 확인하기 위해 western blot을 이용해 단백질 발현량을 비교 분석하였다(Fig. 4A). LPS 처리군에서 인산화된 I-κB 단백질이  $245.9 \pm 0.8\%$  증가하였고, LPS와 rebaudioside A를 62.5 μM 조건으로 동시에 처리한 경우 인산화된 I-κB 발현은  $291.6 \pm 8.4\%$ 로 오히려 다소 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 125 μM 농도 처리군에서는 LPS 처리군 대비  $147.2 \pm 2.9\%$ 로 41% 감소하였고, 250 μM 조건에서는 LPS 처리군 대비  $102.6 \pm 1.9\%$ 로 59% 감소하였다(Fig. 4B). 또한 인산화된 NF-κB 단백질 발현은 LPS 처리군에서  $221.9 \pm 19.1\%$  증가하였다가 250 μM 조건에서는  $137.7 \pm 5.7\%$ 로 유의성 있게 감소됨을 확인하였고 37% 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 우리는 rebaudioside A가 I-κB 및 NF-κB의 phosphorylation 모두 저해함으로 NF-κB에 의한 염증성 사이토카인 발현 등이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4C).



**Fig. 3** Reduction of NF-κB protein by rebaudioside A. (A) Rebaudioside A downregulated the NF-κB protein level in LPS stimulated RAW264.7 cells in the condition of 250 μM. (B) NF-κB expression ratio was presented using Image J. #*p* < 0.05, compared to control \**p* < 0.05, compared to LPS group



**Fig. 4** Rebaudioside A was involved in inhibition of I-κB and NF-κB phosphorylation. (A) Protein expression level of phosphorylated NF-κB and I-κB by rebaudioside A. Cells were co-treated with LPS (1 μg/mL) and rebaudioside A (0, 62.5, 125, and 250 μM) for 6 h. GAPDH was used as a loading control. (B) Phosphorylated I-κB and (C) Phosphorylated NF-κB protein was decreased by rebaudioside A. ##*p* < 0.01, compared to control, \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001 compared to LPS group

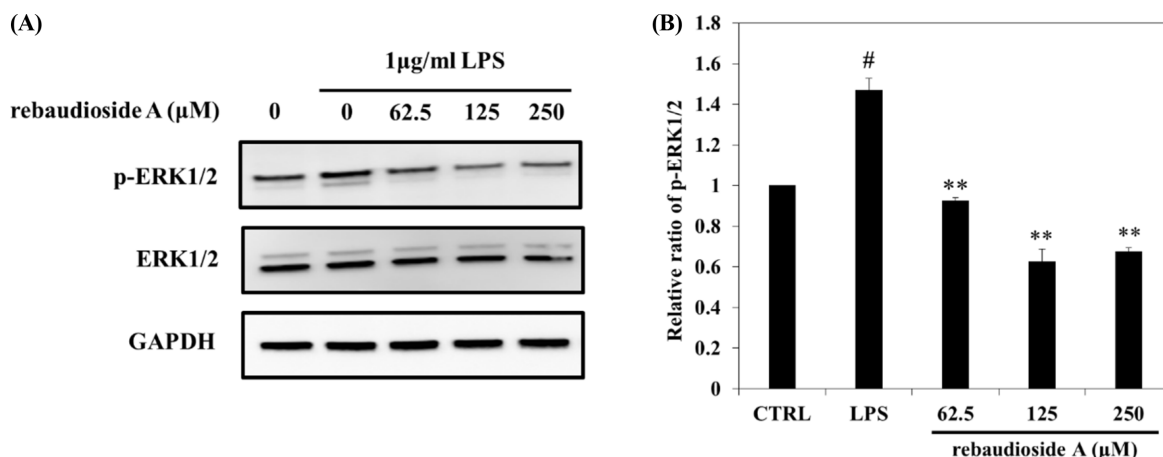
**Rebaudioside A에 의한 MAPK (ERK1/2) 인산화 억제**

LPS에 의한 염증신호는 LPS가 TLR4 (Toll-like Receptor 4) 수용체에 결합되고 세포 내 신호전달 체계를 통해 NF-κB를 활성화 시켜 염증성 사이토카인 및 iNOS, COX-2 등의 발현을 촉진하는 과정이다. 특히 전사인자 NF-κB는 ERK1/2, p38 및 JNK등의 MAPK 신호 전달 체계와 밀접한 관련이 있어 염증 조절에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진다[19,20]. 따라서 우리는 LPS 자극에 의해 활성화 된 RAW264.7 세포에서 rebaudioside A를 처리한 후 MAPK인 ERK1/2의 인산화 조절을 확인하였다(Fig. 5). RAW264.7 세포에 rebaudioside A를 각각 62.5, 125 및 250 μM 농도로 30 분간 전처리 한 후, LPS (1 μg/mL)를 15 분간 자극 하여 세포 내 단백질 시료에서 ERK1/2 및 p-ERK1/2 단백질 발현량을 관찰하였다. ERK1/2 단백질은 무처리군, LPS 처리군, rebaudioside A의 62.5, 125, 250 μM 농도 처리군 모두에서 발현량 변화가 거의 나타나지 않았다. 그러나 인산화된 ERK1/2 단백질은 무처리 대조군 대비 LPS 처리군에서 146.8±5.7%로 인산화된 ERK1/2 단백질 발현

이 유의성 있게 증가하였고, rebaudioside A를 62.5, 125, 250 μM 농도로 처리한 경우 LPS 처리군 대비 각각 92.6±1.2, 62.6±5.9, 67.7±1.6%로 약 36, 57, 53% 수준으로 감소하여 ERK1/2 단백질의 인산화가 특이적으로 조절되는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 rebaudioside A는 NF-κB와 I-κB upstream에서 MAPK인 ERK1/2의 인산화를 특이적으로 억제 하였다.

**고 찰**

스테비아 식물 잎 추출물에 존재하는 스테비올 배당체인 rebaudioside A는 염증성 사이토카인 및 NO 생성 억제를 통한 피부염 개선 화장품 소재로서의 가능성이 제시되었다. 이러한 rebaudioside A의 선행연구를 기반으로 RAW264.7 대식세포에서 NF-κB 및 MAPKs 신호전달 기전에 대한 메커니즘 규명 연구를 수행하였다. RAW264.7의 생존율과 증식을 저해하지 않는



**Fig. 5** Phosphorylation of ERK1/2 protein was inhibited by rebaudioside A as concentration dependent manner. (A) Cells were pretreated with rebaudioside A (62.5, 125, and 250  $\mu$ M) for 30min and then stimulated with 1  $\mu$ g/mL LPS for 15min. Protein samples were analyzed with specific ERK1/2 and p-ERK1/2 antibodies by western blot. (B) This represents a relative ratio of p-ERK1/2 compared to GAPDH. # $p$  <0.05, compared to control, \*\* $p$  <0.01 to LPS group

농도 설정을 토대로 NO 생성에 관여하는 iNOS의 단백질 발현을 관찰한 결과 rebaudioside A는 iNOS 단백질 발현을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 1). Rebaudioside A는 천연 항염증 소재 연구와 유사하게 LPS 자극에 의해 증가된 NF- $\kappa$ B의 transcriptional regulation 뿐 아니라 NF- $\kappa$ B translational 단계에 모두 관여하였다[21,22]. 그러나 NF- $\kappa$ B mRNA 발현 및 단백질 발현은 62.5  $\mu$ M 농도에서부터 억제되는 것이 관찰되었지만 유의성은 없었고, 이보다 고농도 조건인 125, 250  $\mu$ M 처리군에서는 단백질 발현이 통계적으로 유의성 있게 억제되었다. 또한 rebaudioside A는 NF- $\kappa$ B 및 I- $\kappa$ B의 인산화를 농도 의존적 방식으로 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하는 것이 확인되었다(Fig 4). MAPK는 세포 성장과 분화 조절, 사이토카인에 대한 세포 신호 전달 조절에 중요한 역할을 하며, 전사인자인 NF- $\kappa$ B가 ERK1/2 신호 전달 경로에 연계된 ERK1/2 MAPK 인산화 조절이 규명되었다[23]. 따라서 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 ERK1/2와 인산화된 ERK1/2를 조사한 결과, rebaudioside A의 62.5, 125, 250  $\mu$ M 농도로 처리한 경우에서는 ERK1/2의 인산화 단백질 발현량이 LPS 처리군 대비 36, 57, 53%로 유의성 있게 저해됨을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과들을 종합해보면, rebaudioside A가 iNOS, COX-2 발현을 억제하는 것은 ERK1/2 및 I- $\kappa$ B 인산화 저해를 통한 NF- $\kappa$ B 조절의 결과로 보여진다. 향후 rebaudioside A가 MAPK의 upstream으로 알려진 IRAK1/4, TNF receptor associated factor 6 등의 신호 전달 기전에 대한 추가 연구 및 피부임상 효능평가 연구가 수행된다면, 피부 염증성 질환에 대한 새로운 치료제 및 기능성화장품 소재 활용이 기대된다.

## 초 록

리바우디오사이드 A는 *Stevia rebaudiana Bertoni*에서 분리된 천연감미료로 널리 알려진 스테비올배당체 중 하나이다. 최근 연구에서 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 마우스 대식

세포에서 리바우디오사이드 A가 인터루킨-1 $\alpha$ /1 $\beta$  같은 염증성 사이토카인 분비를 억제하는 기능이 확인되었다. 그러나 LPS처리 시 리바우디오사이드 A의 항염 활성에 대한 염증 억제기작은 정확히 제시하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 리바우디오사이드 A의 LPS 신호전달 메커니즘에서의 항염증 효능을 단백질 수준에서 규명하고자 하였다. NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질 발현량을 분석한 결과 리바우디오사이드 A의 250  $\mu$ M 처리군에서 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 염증 신호에 의한 대표적 핵 전사 인자인 NF- $\kappa$ B의 mRNA 발현량 분석 결과에서도 LPS 처리군에 비해 그 발현량이 감소하였다. 또한 세포질에 존재하는 NF- $\kappa$ B와 I- $\kappa$ B 복합체는 LPS신호에 의한 I- $\kappa$ B의 인산화 및 ubiquitination으로 인해 NF- $\kappa$ B가 이탈되기 때문에, 리바우디오사이드 A에 의한 pNF- $\kappa$ B, pI- $\kappa$ B의 단백질 발현을 비교 분석한 결과 NF- $\kappa$ B 단백질의 인산화가 농도 의존적으로 감소하였고, I- $\kappa$ B의 인산화 또한 저해되는 것을 확인 하였다. 최종적으로 리바우디오사이드 A는 LPS처리 조건에서 MAPK중 특이적으로 extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)의 인산화를 농도 의존적으로 감소시킴으로써 NF- $\kappa$ B 조절 기작에 관여함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구 결과들을 통해 우리는 리바우디오사이드 A가 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 활성화 되는 MAPK 및 NF- $\kappa$ B의 발현 억제를 통해 염증이 억제될 수 있음을 확인하였다.

**Keywords** 리바우디오사이드 A · 항염증 · Mitogen-activated protein kinase · NF- $\kappa$ B · RAW264.7 대식세포

**감사의 글** 본 연구는 2017년도 세명대학교 교내연구지원으로 진행되었습니다.

## References

- Kundu JK, Surh YJ (2008) Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res* 659: 15–30
- Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY, Kim HJ (2012) Anti-inflammatory

- effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1645–1648
3. Middleton E (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In: *Flavonoids in the living system*. Springer, Boston
  4. Nijveldt RJ, Van Nood ELS, Van Hoor DE, Boelens, PG Van Norren K, Van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J Clin Nutr* 74: 418–425
  5. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R (1999) Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57: 199–208
  6. Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M (1994) Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: *in vivo* observations in the hamster skin fold. *J Vasc Res* 14: 50–55
  7. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY (1994) Differential *in situ* cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Investig* 94: 870–876
  8. Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE, Leung DY (2006) Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 24: 341–348
  9. Wong CK, Leung KML, Qiu HN, Chow JYS, Choi AOK, Lam CWK (2012) Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. *PLoS one* 7: e29815
  10. Ruimi N, Rwashdeh H, Wasser S, Konkimalla B, Efferth T, Borgatti M, Roberto G, Mahajna J (2010) *Daedalea gibbosa* substances inhibit LPS-induced expression of iNOS by suppression of NF- $\kappa$ B and MAPK activities in RAW264.7 macrophage cells. *Int J Mol Med* 25: 421–432
  11. Bode JG, Ehrling C, Häussinger D (2012) The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK-STAT3 axis. *Cellular signalling* 24: 1185–1194
  12. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621–663
  13. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res* 480: 243–268
  14. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291–3310
  15. Reber L, Vermeulen L, Haegeman G, Frossard N (2009) Ser276 phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS one* 4: e4393
  16. Stoyanova S, Geuns J, Hideg É, Van Den Ende W (2011) The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *Int J Food Sci Nutr* 62: 207–214
  17. Fengyang L, Yunhe F, Bo L, Zhicheng L, Depeng L, Dejie L, Wen Z, Yongguo C, Naisheng Z, Xichen Z, Zhengtao Y (2012) Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation* 35: 1669–1675
  18. Cho UM, Hwang HS (2017) Anti-inflammatory Effects of rebaudioside A in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophage Cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 43: 157–164
  19. Chi G, Wei M, Xie X, Soromou LW, Liu F, Zhao S (2013) Suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation* 36: 501–511
  20. Shi Y, Tu Z, Tang D, Zhang H, Liu M, Wang K, Calderwood SK, Xiao X (2006) The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway but not the MAPK pathways. *Shock* 26: 277–284
  21. Rachmilewitz D, Stamler J S, Karmeli F, Mullins M E, Singel D J, Loscalzo J, Podolsky D K (1993) Peroxynitrite-induced rat colitis—a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* 105: 1681–1688
  22. Pande V, Ramos M J (2005) NF- $\kappa$ B in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Current medicinal chemistry* 12: 357–374
  23. Johnson G L, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912