

Steviol β -Glucopyranosyl Ester가 RAW 264.7 세포의 산화질소 및 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

정 희 훈 · 조 욱 민* · 황 형 서* · 조 건** · 이 상 린 · 김 무 성[†]

(주)마크로케어 부설연구소

*세명대학교 한방화장품학과

**한국기초과학지원연구원 생의학오믹스연구부

(2018년 5월 29일 접수, 2018년 8월 8일 수정, 2018년 9월 4일 채택)

Effect of Steviol β -Glucopyranosyl Ester on The Production of Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Cells

Heehoon Jung, Uk Min Cho*, Hyung Seo Hwang*, Kun Cho**, Sang Rin Lee and Moo Sung Kim[†]

R&D center, Macrocare Tech Co., Ltd., 32 Gangni 1-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28126, Korea

*School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Jecheon, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

**Biomedical Omics Team, Korea Basic Science Institute (KBSI), Ochang, Chungcheongbuk-do 28119, Korea

(Received May 29, 2018; Revised August 8, 2018; Accepted September 4, 2018)

요 약: 만성적인 염증은 낭포성 섬유증, 암, 치매, 아토피성 질환, 비만 등과 같은 염증성 질환의 원인이 된다. 또한 염증의 발생단계에 관여하는 일부 신호물질은 피부조직의 손상과 노화에도 영향을 주는 것으로 알려져 있기 때문에 염증발생 매커니즘을 조절하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 최근에는 염증반응을 억제하거나 예방하기 위해, 몇몇 식물로부터 항염증 소재를 개발하려는 연구들이 이루어지고 있다. 특히 *Stevia rebaudiana*는 특유의 풍미를 가지는 천연감미료 스테비올배당체 (steviol glycoside, SG)를 생성하는데, 일부 SG에 대한 연구를 통해 염증억제 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 기존연구를 통해 항염증 효능이 있는 것으로 확인된 스테비오사이드, 리버디오사이드 A, 스테비올 이외에도 항염증 소재로 활용될 가능성이 있는 SG가 더 존재할 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 우리는 *S. rebaudiana*에서 얻은 SG의 nitric oxide (NO) 생성억제활성을 RAW 264.7 세포주를 대상으로 스크리닝 하였다. 그 결과 steviol β -glucopyranosyl ester (SGE)가 동일한 농도 조건의 SG 중에서 가장 높은 억제활성을 보여주었다. 또한, interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 염증관련 인자의 mRNA 발현량 또한 농도의존적으로 감소시키는 것으로 확인되었다. 이러한 연구결과를 통해 SGE는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성 및 NO 생성 억제 효과가 있음을 확인하였다. 이를 통하여 SGE가 항염증 소재로 활용될 잠재성이 있음을 확인하였다.

Abstract: Chronic inflammation is known to have effects on various diseases such as gout, cancer, dementia, atopic disease, and obesity. In addition, since some signal cascades involved in the development of inflammation are known to affect the damage and aging of the skin tissue, studies are being conducted actively to control the inflammation

[†] 주 저자 (e-mail: rnd@macrocare.net)
call: 043)214-3656

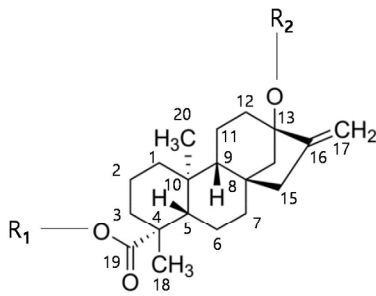
mechanism. In order to mitigate or prevent inflammatory response, a number of researches have been made to develop anti-inflammatory materials from some plants. In particular, *Stevia rebaudiana* produces steviol glycosides (SG), a natural sweetener with a distinctive flavor. Studies on some of SG have been shown to have anti-inflammatory activity. Researchers of this study expected that more SG also possess anti-inflammatory activity, besides stevioside, rebaudioside A, and steviol. In order to confirm this possibility, the researchers screened inhibition activity of various steviol glycosides for NO production in RAW 264.7 cell lines. As a result, steviol β -glucopyranosyl ester (SGE) showed the highest inhibitory activity among steviol derivatives treated at the same molar concentration. In addition, we found that mRNA expression level of interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was also decreased in a dose-dependent manner. These results show that SGE inhibits anti-inflammatory activity and NO production in mouse macrophage RAW 264.7 cells. It was confirmed that SGE has potential to be applied as an anti-inflammatory material.

Keywords: steviol β -glucopyranosyl ester, anti-inflammation, NO, inflammatory cytokine, bioconversion

1. 서 론

현대에서는 다양한 항원과의 접촉이 증가함에 따라 염증을 억제할 수 있는 물질에 대한 수요가 크게 증가하고 있다. 특히, 염증 발생의 신호전달과정은 낭포성 섬유증, 암, 치매, 아토피성 질환, 비만 등의 발생과도 관련되어 있다고 알려져 염증을 조절기전을 다루는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[1-2]. 염증의 발생은 다양한 단계를 통해 유도되는데, 주로 lipopolysaccharide (LPS)나 알레르겐과 같은 항원, 온도변화, 신경자극, 자외선 등에 의해 시작된다. 이때, 자극의 종류에 따라 다양한 리셉터가 활성화되며, 그에 대응하는 신호물질이 분비된다. 대식세포는 LPS로 인한 자극이 발생할 경우 IL-1 α , IL-1 β , IL-6 등의 인터루킨(interleukin, IL)들을 생성하여 염증반응을 유도하거나, E-selectin의 생성을 통해 면역세포들을 염증부위로 유인하는 역할을 수행하는데, 이 과정에서 발현되는 단백질들을 염증유발 정도를 확인하는 지표로 사용될 수 있다[3]. 뿐만 아니라 자외선으로 인한 자극도 피부의 손상 및 염증에 기여하는데, P38 및 c-Jun N-terminal kinases (JNK)를 거쳐 미토콘드리아(mitochondria)의 기능부전을 일으킬 수 있으며, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 발생량을 증가시켜 세포 내 스트레스를 유발하는 과정을 통해 염증을 유발하거나, DNA에 직접적인 손상을 주고 피부세포에서 쉽게 matrix metalloproteinase (MMP)를 발현시키는 과정을 통해 노화를 촉진시킨다[4]. 이러한 자극으로 인해 발생하는 피부손상을 방지하기 위해서는 신호전달 과정을 억제하는 전략이 사용

되기도 한다. 이 과정에는 nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)와 cyclooxygenase 2 (COX2)의 발현이 염증의 발현단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. COX2는 arachidonic acid를 염증유발 신호물질인 prostaglandin E2 (PGE2)로 전이시키는 과정에 직접적으로 관여하는 효소로, 비스테로이드계(non-steroidal) 염증억제물질을 개발하는 타겟으로 활발한 연구가 이루어지고 있으며, NF- κ B는 MMP-1, MMP-3, IL-6 발현 및 nitric oxide (NO), PGE2 합성 촉진 등의 조절에 관여하는 것으로 알려진 전사인자(transcription factor)이다[5]. 또한, NF- κ B로 인해 발현이 증가된 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 작용으로 NO의 생성도 증가하는 것으로 알려져 이러한 단백질들 역시 염증 발생의 지표로 사용될 수 있다[6]. 현재, 염증의 치료에는 스테로이드계 항염증제가 보편적으로 알려져 있는데, 주로 염증매개 단백질에 대한 messenger RNA (mRNA)의 전사를 억제하거나 샤페론(chaperones)과 같은 염증억제 단백질의 분비를 촉진하는 억제기전을 이용한다[7]. 스테로이드계 항염증제는 종류에 따라 권장 복용량에 차이는 있으나 수 mg / kg / day의 양으로도 류마티스관절염, 혈관염, 근육통 등에 강한 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 그러나, 골다공증, 골괴사, 근육병증, 소화성 궤양, 감염증, 부신피질호르몬유사작용, 동맥경화, 혈당 조절이상, 체중증가, 상처치유 지연, 백내장 등의 부작용이 발견되어 대체물질의 탐색이 활발하게 진행되고 있다[8]. 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 스테비올배당체(steviol glycosides, SG) 역시 염증억제활성이 있어



Compound	R ₁	R ₂	Average molecular weight(Da)
Steviol	—H	—H	318.45
Steviol glucopyranosyl ester	— β -Glc	—H	480.59
Steviolmonoside	—H	— β -Glc	480.59
Steviolbioside	—H	— β -Glc — β -Glc(2 \rightarrow 1)	642.73
Rubusoside	— β -Glc	— β -Glc	642.73
Stevioside	— β -Glc	— β -Glc — β -Glc(2 \rightarrow 1)	804.87
Rebaudioside B	—H	— β -Glc — β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)	804.87
Rebaudioside A	— β -Glc	— β -Glc — β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)	967.01
Rebaudioside C	— β -Glc	— β -Glc — α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)	951.01
Rebaudioside D	— β -Glc — β -Glc(2-1)	— β -Glc — β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)	1129.15

Figure 1. Structure and average molecular weight of STL and SGs. Glc: glucose, Rha: rhamnose.

개발가치가 높은 물질이다. SG는 스테비아 리버디아나 (*Stevia rebaudiana*)의 잎에서 주로 발견되는 다이테르펜계(diterpenoid) 어글리콘(aglycone)인 스테비올(steviol, STL)에 당이 결합된 형태를 가지는 성분이다. STL 및 SG의 종류별 상세한 구조는 Figure 1에 언급된 바와 같다. 자연계의 SG를 구성하는 포도당의 대부분은 β -포도당으로, 체내에서 분해가 어렵기 때문에 열량이 거의 없는 감미성분으로 알려져 있다. 특히, 스테비아추출물의 대부분을 구성하는 stevioside (STV)와 rebaudioside A (REA)는 설탕의 250배와 350배의 단맛을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그 밖의 SG로 rebaudioside B (REB), steviolbioside (STB), rubusoside (RUB), steviolmonoside (STM), steviol β -glucopyranosyl ester (SGE) 등이 알려져 있으나, 자연계에서 발견되는 농도가 2% 이하로 미미하고 감미배수가 상대적으로 낮아 별다른 주목을 받지 못하고 있다. SG는 구조적으로 안정하여 쉽게 변성되지 않으며, 생체독성이 낮고 치명적인 부작용이 보고되지 않아 안전한 물질로 알려져 있어 식품첨가물 이외의 용도를 찾기 위한 연구들이 진행되고 있다[9-10]. 이러한 움직임에 힘입어 스테비아추출물에 항산화, 항고혈당, 항고혈압, 항종양, 항염

증 및 항바이러스 활성이 있다는 것이 보고되었다 [11-16]. 뿐만 아니라 스테비아 유래 성분을 피부노화억제에 활용하려는 움직임도 확인되었다[17]. 일부 연구에서는 스테비아추출물의 페놀계 성분과 SG가 함께 염증억제 효과를 일으킨다고 보고하고는 있으나, STV 나 REA와 같이 SG 단독으로도 염증을 지표인 NF- κ B, IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제한다는 연구를 통해 염증억제 효과가 있는 것으로 확인되었다[18-21]. 이와 같이 SG에는 항염증 소재로 활용하기 유리한 점이 많음에도 불구하고, STL, STV 및 REA를 제외한 스테비올유도체의 면역학적 효능은 현재 연구되지 않고 있다. 본 논문에서는 스테비올배당체의 구조와 면역학적 신호체계가 상호작용하는 과정을 연구하여 보다 강력한 항염증 효능을 가지는 SG를 찾아내고자 하였다. 이를 위하여 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 대상으로 다양한 SG를 처리하여 염증인자의 생성억제효과를 조사하였고, 항염증 소재로 활용가능성이 있음을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

본 연구에서 사용된 STV, REA, REB, STB, RUB, STL은 Sigma (USA)에서 구매하여 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA) 용매에 녹여 사용하였다.

2.2. 스테비올배당체 시료 준비

STM 및 SGE의 합성 및 정제는 기존의 연구내용을 참조하였다[22,23]. RUB로부터 STM를 제조하기 위해, RUB 2 g을 80% (v/v) 에탄올에 용해시킨 뒤 2 g NaOH를 첨가하고 45 °C에서 200 rpm으로 12 h 동안 가수분해하였다. 가수 분해 후 반응액을 농축하고 pH를 3.0으로 조정한 뒤, 4000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하고 증류수로 세척하는 과정을 3회 반복하고 건조하여 STM를 얻었다. STV로부터 SGE를 제조하기 위해 *Aspergillus oryzae*를 yeast-mold broth (YM broth, Difco, USA)에 28 °C로 48 h 동안 배양한 뒤, 이를 GF / C 필터로 여과하고 4배수 에탄올로 침전하여 조가수분해 효소를 얻었다. 침전된 효소는 0.01% CaCl₂에 희석하여 효소액의 상태로 사용하였다. 가수분해반응을 수행하기 위해 효소액에 STV 2 g을 첨가하고 pH를 4.8로

Table 1. Gene Name and Assay ID Number in RT-PCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
IL-1 α	Interleukin 1 alpha	Mm004396-20_mL
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_mL
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Mm00476361_mL
COX-2	Cyclooxygenase-2	Mm00478374_mL
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Mm00440502_mL

조절한 뒤, 40 °C에서 96 h 동안 200 RPM으로 교반하였다. 가수분해 후 반응액을 4,000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하고 증류수로 세척하는 과정을 3회 반복하고 건조하여 SGE를 얻었다.

2.3. NMR

제조된 스테비올배당체 시료들의 nuclear magnetic resonance (NMR)분석을 위하여 400 MHz NMR (Advance III, Bruker, USA)를 사용하였다. 시료는 CD₃OD (Sigma, USA)에 희석하여 분석하였으며, chemical shifts는 δ (ppm)로, coupling constant는 Hz로 기록하였다.

2.4. MS

Mass spectrometry (MS) 데이터는 양이온 모드로 설정된 전기분사 이온화장치(Electrospray ionizer, Waters, USA)를 질량분석기(Premier Quadrupole Time of flight, Waters, USA)에 연결하여 수집하였다. 시료는 0.1% formic acid를 함유하는 methanol : acetonitrile (1 : 1)로 희석하고 온보드 시린지 펌프를 사용하여 주입하였다.

2.5. 세포배양

RAW 264.7 세포주는 American type culture collection (Rockville, USA)로부터 분양받았다. 배양에 사용된 배지는 fetal bovine serum 10% (v/v) 및 항생제(100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신)가 함유된 Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM, Welgene, ROK)을 56 °C에서 30 min 동안 heat inactivation 시켜 준비하였다. 실험 전, 세포는 신선한 배지와 함께 2×10^5 cells/well의 농도가 되도록 96-well plate에 분주한 후 5% CO₂를 공급하여 37 °C에서 배양을 수행하였다.

2.6. NO 생성량 분석

NO 생산량을 측정하기 위해 Griess의 방법에 따라

수행되었다[25]. 실험 전 RAW 264.7 세포는 0.2×10^6 cells/well의 비율이 되도록 24-well plate에 분주 하여 24 h 동안 배양되었으며, 이후 기존 연구논문들에 사용된 농도를 참고하여 STL 및 SG를 각 well에 대하여 60 μ g/mL가 되도록 첨가하고 LPS(Sigma, USA)는 1 μ g/mL 농도가 되도록 첨가하였다[21]. 이후 상등액을 Griess 시약(Sigma, USA)과 1 : 1로 혼합하여 실온에서 30 min 동안 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 질산나트륨(Sigma, USA)을 사용하여 준비하였다.

2.7. 세포 독성평가

기존의 연구내용을 참고하여 세포독성평가를 수행하였다[24]. RAW 264.7 세포에 스테비올 및 스테비올 배당체를 처리하기 위한 최대농도를 결정하기 위해 EZcytox cell viability assay kit (EZ-1000, Dogenbio, Korea)를 사용하여 cell viability assay를 진행하였다[24]. RAW 264.7 cell을 0.6×10^4 cells/well로 96-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 이후 각 물질을 농도별로 희석하여 처리한 후 24 h 동안 추가로 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고, DMEM : EZ-cytox를 10 : 1로 희석하여 각 well에 100 μ L씩 처리한 뒤 30 min 동안 반응하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포의 수로 환산하였다.

2.8. RT-PCR

세포의 염증사이토카인 및 염증대사단백질의 발현량을 확인하기 위해 6-well plate에 RAW 264.7 세포를 6.0×10^5 cells/well씩 분주하여 24 h 동안 배양한 후, LPS 1 μ g/mL를 6 h 동안 처리하여 염증반응을 유도하였다. 이때, 염증관련 유전자의 mRNA 전사량을 분석하기 위해 TRIzol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 -80 °C에

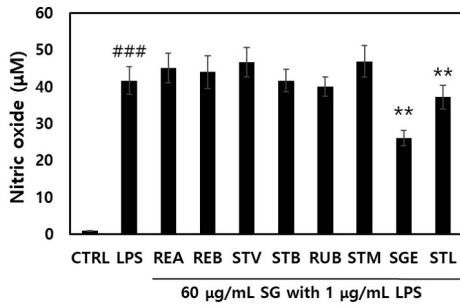


Figure 2. Inhibitive effect of SG on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7. CTRL : LPS free control, REA : rebaudioside A, REB: rebaudioside B, STV: stevioside, STB: steviolbioside, RUB : Rubusoside, STM: steviolmonoside. SGE: steviol glucopyranosyl ester, STL: steviol, ###*p* < 0.001 compared to CTRL, ***p* < 0.01 compared to LPS.

보관하였으며, Revertra ACE kit (Toyobo, Japan)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. cDNA는 Tris / EDTA buffer에 1 / 5로 희석하여 사용하였다. 유전자별 mRNA 발현량은 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)에 Taqman probe (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 분석하였다. 실험에 사용된 probe들은 기존의 연구를 참조하여 선정하였으며, Table 1에 기재된 바와 같다[21].

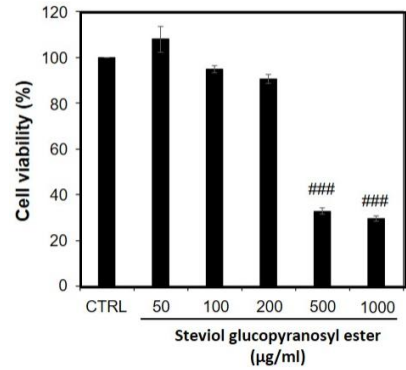
2.9. 통계처리

분석수치는 Student's *t*-test를 수행하여 *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

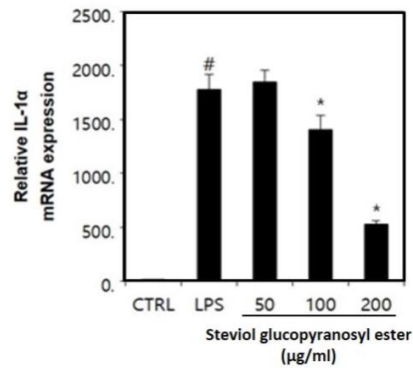
3. 실험 결과

3.1. 스테비올배당체의 물질 동정

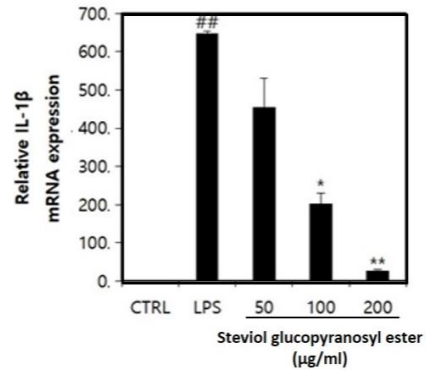
본 논문에서 유도한 STM과 SGE가 설계한 분자구조에 맞게 합성되었는지 확인하기 위하여 400MHz ¹H-NMR 및 MS 분석을 수행하였다. STM의 경우, ¹H-NMR에서는 어글리콘의 메틸그룹을 구성하는 C20과 C18의 수소로부터 유래한 δ 1.04 (3H, s), δ 1.12 (3H, s)를 확인할 수 있었으며, 이중결합구조를 구성하는 수소로부터 유래한 δ 5.2 (J = 3.24)를 확인하였다. 한편, δ 3.1 ~ 4.5에서는 C13에 결합된 포도당에서 유래한 피크를 확인하였다. MS를 통해 측정된 분자량은 [M + H]⁺ = 481.27 m/z로 분석되었다. SGE의 경우,



(A)



(B)



(C)

Figure 3. Cell cytotoxicity, gene expression of IL-1 α and IL-1 β in RAW 264.7 treated with SGE in addition to LPS. #*p* < 0.05 compared to CTRL, ##*p* < 0.01 compared to CTRL, ###*p* < 0.001 compared to CTRL, CTRL: LPS free control, **p* < 0.05 compared to LPS, ***p* < 0.01 compared to LPS.

¹H-NMR에서는 어글리콘의 메틸그룹을 구성하는 C20과 C18에 결합된 수소로부터 유래한 δ 1.04 (3H, s), δ 1.18 (3H, s)를 확인할 수 있었으며, 이중결합구조를 구성하는 수소로부터 유래한 δ 4.9 (J = 3.24)를 확인

하였다. 한편, δ 3.1 ~ 3.9 및 5.4에서는 C19에 결합된 포도당에서 유래한 피크를 확인하였다. MS를 통해 측정된 분자량은 $[M + H]^+ = 481.29$ m/z로 분석되었다.

3.2. NO 생성량 조절 스크리닝

STL 및 SG가 LPS로 촉진된 RAW 264.7의 NO 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Griess assay를 수행하였다(Figure 2). 아무것도 처리하지 않은 시험군을 음성대조군으로 정하여 NO 생성량을 기준으로 비교한 결과, LPS를 처리한 경우 LPS 미처리 대조군 대비 41.7배로 증가하여 염증반응이 유도됨을 확인하였다. 이때, LPS와 함께 REA, REB, STV, STB, RUB, STM, SGE, STL를 각각 60 μ M 첨가하였을 때의 NO 생성량은 각각 LPS 미처리 대조군 대비 45.1, 44.0, 46.7, 41.7, 40.0, 46.9, 26.2, 37.2배로 분석되었다. 이를 통하여 실험에 사용된 SG 중 SGE의 NO 생성억제활성이 가장 높은 것으로 확인되었다.

3.3. 스테비올 배당체들의 세포 독성 평가

스테비올 및 스테비올배당체들이 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다(Figure 3A). 시험에 사용한 물질의 범위는 기존 논문을 참조하여 0-500 μ g/mL로 설정하였다[21]. 세포를 24 h 동안 배양하여 세포독성을 확인한 결과, 200 μ g/mL까지는 세포증식의 감소가 관찰되지 않아 SGE의 처리농도를 200 μ g/mL로 하여 모든 실험을 진행하였다.

3.4. SGE가 염증 유발 사이토카인의 mRNA 발현량에 미치는 영향

SGE가 LPS에 의하여 증가되는 염증 유발 사이토카인의 발현량을 농도의존적으로 감소시키는지 확인하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 6 h 처리하여 IL-1 α , IL-1 β 의 mRNA생성을 촉진하였고, SGE를 최대농도 200 μ g/mL 조건에서 함께 처리한 시험군과 비교하였다(Figure 3B, 3C). IL-1 α 의 경우 LPS 처리군에서의 mRNA 발현량이 LPS 미처리 대조군 대비 1771배 증가되었다. 반면, LPS와 함께 SGE를 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리한 시험군의 경우 IL-1 α mRNA 발현량이 각각 LPS 미처리 대조군의 1,847, 1,398, 526배만큼 증가하는 것으로 확인되었다(Figure 3B). IL-1 β 의

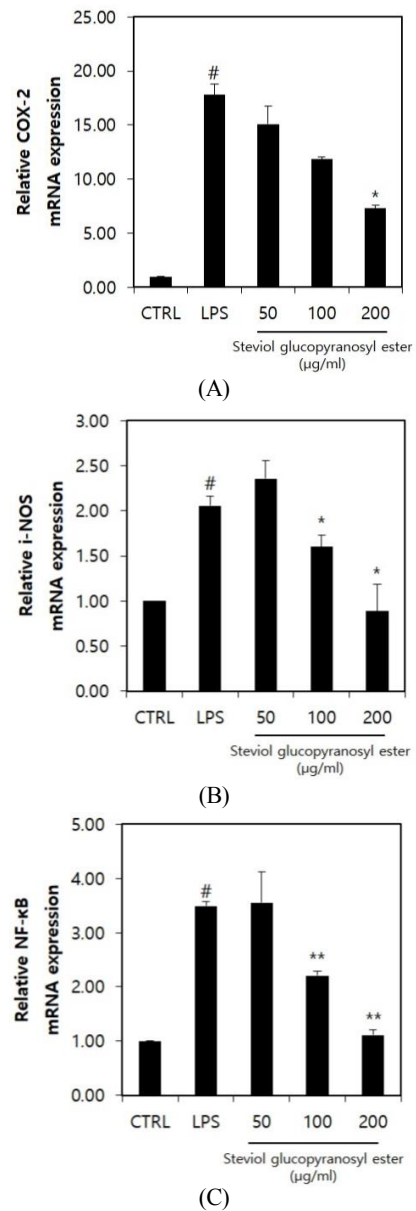


Figure 4. Gene expression of COX-2, i-NOS and NF- κ B in RAW 264.7 treated with SGE in addition to LPS. CTRL: LPS free control, # $p < 0.05$ compared to CTRL, * $p < 0.05$ compared to LPS, ** $p < 0.01$ compared to LPS.

경우 LPS 처리군의 mRNA 발현량이 LPS 미처리군 대비 647배 증가되었다. 반면, LPS와 함께 SGE를 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 처리한 시험군의 경우 IL-1 β mRNA 발현량이 각각 LPS 미처리 대조군의 454.3, 202.3, 27.7배 수준으로 감소하는 것으로 확인되었다(Figure 3C).

3.5. SGE가 NF- κ B, COX2, iNOS의 mRNA 발현량에 미치는 영향

SGE가 LPS에 의하여 증가되는 NF- κ B, COX2, iNOS의 mRNA 생성량을 농도의존적으로 감소시키는 지 확인하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 6 h 처리하여 NF- κ B, COX2, iNOS의 mRNA 생성을 촉진하였고, SGE를 함께 처리한 시험군과 비교하였다 (Figure 4). COX2의 경우 LPS 처리군에서의 mRNA 발현량이 LPS 미처리 대조군 대비 17.8배로 증가되었다. 반면, LPS와 함께 SGE를 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리한 시험군의 경우 COX2 mRNA 발현량이 각각 LPS 미처리 대조군 대비 15.1, 11.8, 7.3배 수준으로 감소하는 것으로 확인되었다(Figure 4A). iNOS의 경우 LPS 처리군에서의 mRNA 발현량이 LPS 미처리 대조군 대비 2.1배로 증가되었다. 반면, LPS와 함께 SGE를 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리한 시험군의 경우 iNOS mRNA 발현량이 각각 LPS 미처리 대조군 대비 2.4, 1.6, 0.9배로 변화하는 것으로 확인되었다(Figure 4B). NF- κ B의 경우 LPS 처리군에서의 mRNA 발현량이 음성대조군인 LPS 미처리 대조군 대비 3.5배로 증가되었다. 반면, LPS와 함께 SGE를 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리한 시험군의 경우 NF- κ B mRNA 발현량이 각각 LPS 미처리 대조군 대비 3.6, 2.2, 1.1배로 변화하는 것으로 확인되었다(Figure 4C).

4. 결 론

본 논문에서는 STV나 REA와 같은 SG에 관하여 염증 억제 효능에 관련된 보고들이 이루어지고 있는 것에 주목하여, 동일한 어글리콘을 공유하지만 당의 결합형태가 다른 성분에도 항염증 활성이 있을 것이라 예상하고 가장 염증억제 활성이 높은 구조를 확인하고자 하였다.

이를 위하여 가장 먼저 Griess reaction을 이용하여 동일 농도에서의 항염증 활성을 스크리닝 하였다. 그 결과, Figure 2에서 나타난 바와 같이 R2위치에 당이 결합되지 않은 STL 및 SGE의 NO생성 억제활성이 높게 나타났으며, 그중에서도 SGE의 활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 이를 통하여 스테비올 배당체 중 R1 위치에 에스테르 결합되어있는 당이 염증활성의 억제에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 예상할 수 되었으며, R2 위치에 위치한 당은 STL 고유의 NO생성

억제활성을 저해하는 것으로 예상되었다. 또한, STL 및 SG가 상위 단계의 조절인자인 iNOS 및 전사인자의 억제여부를 확인하기 위하여 mRNA의 발현량을 조사한 결과, NF- κ B 및 iNOS의 mRNA 생성량이 모두 감소되었다. 이러한 경향성은 STV를 대상으로 한 기존의 연구에서도 확인된 바 있다[19]. 이러한 경향성은 COX2의 mRNA에서도 마찬가지로 확인되었다. 따라서, STL 및 SG 역시 염증의 진행이나 만성염증으로 인해 가속화되는 암의 발생을 억제할 가능성이 있음을 확인하였다.

SGE의 작용 기전이 보다 상위단계에서 유래되는지 확인하기 위하여, 스테비올 및 SGE를 처리한 RAW 264.7의 IL-1 α , IL-1 β 발현량을 조사하였다. 그 결과, Figure 3에 나타난 바와 같이 각 IL들의 mRNA 발현량 또한 감소된 것으로 확인되었다. 타 연구들에서 얻은 신호전달과정을 본 실험의 결과에 적용할 때, SGE는 염증 사이토카인인 IL-1 β 의 발현을 억제하고, 염증성 사이토카인 유전자 발현의 조절자인 NF- κ B의 발현량을 감소시켰을 뿐 아니라 COX-2 역시 활성이 줄어든 것으로 확인되었다[19,26].

결론적으로, SGE는 면역 사이토카인의 발현을 결정하는 상위단계에 영향을 줄 수 있는 가능성이 높다고 확인되었다. 그러나 스테비올 및 스테비올 배당체가 정확히 어떠한 리셉터와 상호작용하여 IL의 조절에 관여하는지에 대해서는 아직 알려진 바가 많지 않으며, 단백질로 발현된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 이후 단계의 유전자와 상호작용하는 정도가 정량적으로 변화하는지에 관한 자료가 충분치 않다는 점에서 추가적인 연구가 필요하다. 그러나 다양한 STL 및 SG가 IL의 발현에 관여하는 상위단계의 리셉터와 상호작용하는 분자구조적 연구와 더불어, 세포 내에서 발현된 신호 단백질들의 수송을 추적하는 연구를 수행한다면, 보다 명확하게 STL 및 SG의 작용 매커니즘을 밝힘과 동시에 항염소재로 적합한 새로운 물질을 찾아낼 수 있을 것으로 예상된다.

Acknowledgement

이 논문은 2015년 중소기업청 기술혁신개발사업 「효소 전환기술에 의한 스테비올 배당체의 개발 및 응용과제」의 지원을 받아 연구되었습니다(S2313489).

Reference

1. J. Brown and R. Dubois, COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention, *J. Clin. Oncol.*, **23**, 2840 (2005).
2. L. Marnett and R. DuBois, COX-2: a target for colon cancer prevention, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **42**(1), 55 (2002).
3. P. Wojdasiewicz, A. Poniatowski, and D. Szukiewicz, The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis, *Mediat. Inflamm.*, Article ID 561459, 1 (2014).
4. S. Shin, E. Jung, S. Kim, J. Kim, E. Kim, J. Lee, and D. Park, Antagonizing effects and mechanisms of afzelin against UVB-induced cell damage, *PLoS ONE*, **8**(4), e61971 (2013).
5. J. Lim, H. Kim, and K. Kim, Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells, *Lab Invest.*, **81**(3), 349 (2001).
6. D. Arias-Salvatierra, E. Silbergeld, L. Acosta-Saavedra, and E. Calderon-Aranda, Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide, *Cell Signal*, **23**(2), 425 (2011).
7. T. Rhen and J. Cidlowski, Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs, *New Engl. J. Med.*, **353**, 1711 (2005).
8. F. Buttgerit, G. Burmester, and B. Lipworth, Glucocorticoids and risk of cardiovascular disease, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, **5**, 18 (2009).
9. H. Awney, M. Massoud, and S. El-Maghrabi, Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats, *J. Appl. Toxicol.*, **31**, 431 (2011).
10. J. Geuns, P. Augustijns, R. Mols, J. Buyse, and B. Driessen, Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1599 (2003).
11. P. Chan, B. Tomlinson, Y. Chen, J. Liu, M. Hsieh, and J. Cheng, A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension, *British J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 215 (2000).
12. C. Boonkaewwan and A. Burodom, Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells, *J. Sci. Food. Agric.*, **93**, 3820 (2013).
13. C. Lee, K. Wong, J. Liu, Y. Chen, J. Cheng, and P. Chan, Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension, *Planta Med.*, **67**, 796 (2001).
14. Y. Xi, T. Yamaguchi, M. Sato, and M. Takeuch, Antioxidant mechanism of *Stevia rebaudiana* extract and antioxidant activity of inorganic salts, *Nippon Kagaku Kaishi*, **45**, 317 (1998).
15. P. Jeppesen, S. Gregersen, K. Alstrup, and K. Hermansen, Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats, *Phytomedicine*, **9**, 9 (2002).
16. T. Konoshima and M. Takasaki, Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds, *Pure Appl. Chem.*, **74**, 1309 (2002).
17. U. S. Patent 14, 368, 212 (1978).
18. E. Yildiz-Ozturk, A. Nalbantsoy, O. Tag, and O. Yesil-Celiktas, A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities, *Ind. Crops Prod.*, **77**, 961 (2015).
19. 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- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Inflamm.*, **35**(5), 1669 (2012).
20. T. Wang, M. Guo, X. Song, Z. Zhang, H. Jiang, W. Wang, Y. Fu, Y. Cao, L. Zhu, and N. Zhang, Stevioside plays an anti-inflammatory role by regulating the NF- κ B and MAPK pathways in *S. aureus*-in-

- ected mouse mammary glands, *Inflamm.*, **37**(5), 1837 (2014).
21. U. Cho and H. Hwang, Anti-inflammatory effects of rebaudioside A in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells, *J. soc. cosmet. scientists Korea*, **43**(2), 157 (2017).
 22. V. Chaturvedula and I. Prakash, Acid and alkaline hydrolysis studies of stevioside and rebaudioside A, *J. App. Pharm. Sci.*, **1**(8), 104 (2011).
 23. G. Kaur, V. Pandhair, and G. Cheema, Extraction and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *J. Med. Plants Studies*, **2**(5), 41 (2014).
 24. 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).
 25. L. Green, D. Wagner, J. Glogowski, P. Skipper, J. Wishnok, and S. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
 26. N. Ishimura, S. Bronk, and G. Gores, Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**(1), G88 (2004).