

## 스테비올 및 그 유도체의 세포연접 관련 클라우딘 8 발현 조절을 통한 세포이동 저해효과

최선경·조남준·조욱민\*·심중현\*·김기광·황형서\*†

충남대학교 생화학과, \*세명대학교 한방화장품과학과  
(2016년 11월 16일 접수, 2016년 12월 8일 수정, 2016년 12월 20일 채택)

### Inhibitory Effect of Steviol and Its Derivatives on Cell Migration via Regulation of Tight Junction-related Protein Claudin 8

Sun Kyung Choi, Nam Joon Cho, Uk Min Cho\*, Joong Hyun Shim\*,  
Kee K. Kim, and Hyung Seo Hwang\*†

Department of Biochemistry, Chungnam National University, 99 Deahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

\* Department of Oriental Cosmetic Science, Semyung University, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

(Received November 16, 2016; Revised December 8, 2016; Accepted December 20, 2016)

**요약:** 밀착연접(tight junction, TJ)은 인접하는 표피 세포 사이를 서로 연결 및 접합하여 전해질과 수분의 이동을 조절할 뿐만 아니라 세포 내 신호를 전달하고 세포분열을 조절하는 등 다양한 기능을 갖고 있는 것으로 알려졌다. 또한 최근 연구에 따르면 TJ 관련 단백질들의 비정상적 발현은 암 발생 및 진행과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었으며, TJ 구성 단백질의 발현 조절은 피부 장벽 강화 및 보습 조절과 연관된 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 세포 장벽 조절을 통해 피부 보습 조절에 관여하는 새로운 화장품 소재를 발굴하기 위해 여러 가지 소재들에 대한 스크리닝을 수행하였다. 이 중 인공 감미료 소재로 널리 사용되는 스테비올 및 당 유도체(스테비오사이드)의 미백 및 주름 개선 등의 효능에 대한 기존 보고에 따라, 이들에 의한 TJ 조절 메커니즘을 확인하기 위해 다양한 세포 활성 기능 시험을 수행하였다. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)를 이용한 실험을 통하여 스테비올은 human keratinocyte cell line인 HaCaT 세포에 250  $\mu$ M 까지 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. Quantitative real-time PCR을 이용한 TJ 관련 단백질들의 mRNA 발현 변화를 통하여 스테비올에 의한 TJ 조절 기능을 확인하였다. 그 결과, 스테비올은 TJ 관련 단백질 중 특이적으로 claudin 8을 대조군 대비 30% 수준까지 감소시키는 것을 관찰하였다. 또한, 세포이동에 의한 영향을 관찰한 결과 스테비올 처리에 의해 세포이동이 현저히 저해되는 것을 확인하였다. 마지막으로 세포 장벽의 투과성 변화를 관찰하기 위해 표피세포 피부저항(trans epithelial electric resistance, TEER) 분석 결과 스테비올에 의한 세포투과성(cell permeability) 또한 증가되는 것을 관찰하였다. 이에 반해, 스테비올 유도체(스테비오사이드, 리바우디오사이드)에서는 1000  $\mu$ M까지 세포 독성이 거의 나타나지 않을 뿐만 아니라 claudin 8 발현 억제 및 세포이동 저해현상도 관찰되지 않았다. 스테비올은 HaCaT 세포의 세포 독성, claudin 8 발현 억제, 그리고 세포 이동의 저해효과를 보이는 반면 스테비올 당 유도체인 스테비오사이드, 리바우디오사이드는 세포 독성 및 세포이동에 영향이 없는 것으로 나타난 본 연구 결과들은 스테비올 당 유도체가 향후 화장품 원료로써 스테비올보다 적합한 소재임을 시사한다.

**Abstract:** The tight junction, one of Intercellular junctions, performs a variety of biological functions by bonding adjacent cells, including the barrier function to control the movement of the electrolyte and water. Recent studies have revealed that unusual expression of tight junction-related genes have been shown to be related in cancer development

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

and progression. Recently, there are many reports that control of tight junction proteins expression is closely related to the skin moisture. In this study, we are focusing on the regulating mechanism of tight junction-associated genes by the steviol and its derivatives. Steviol, used as a sweetener, is known to chemical compound isolated from stevia plant. The MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay was carried out in HaCaT cells (human keratinocyte cell line) in order to determine the cytotoxicity. As a result, while steviol showing cytotoxicity from 250  $\mu$ M, steviol derivatives are not cytotoxic more than 250  $\mu$ M concentration. We have observed a change in the tight junction protein via quantitative real-time PCR. Claudin 8 among tight junction proteins is only significantly reduced up to 30% in the presence of steviol. In addition, cell migration was inhibited by steviol, not by stevioside and rebaudioside. Finally, we could observe that steviol, not stevioside and rebaudioside, is able to increase the skin barrier permeability through the transepithelial electric resistance (TEER) measurements. These results suggest that the steviol and its derivatives are specifically acts on the tight junction related gene expression, but steviol derivatives are more suitable as a cosmetic material.

**Keywords:** steviol, steviol glycoside, tight junction, claudin 8, cell migration

## 1. 서 론

스테비오사이드(stevioside)는 브라질과 파라과이 등 남아메리카 고산지대에서 주로 자생하는 스테비아 (*Stevia rebaudiana* Bertoni, *S. rebaudiana*)의 다년생 초본식물로부터 유래된 감미성분이다. 보통 스테비오사이드는 aglycone 부분인 스테비올(steviol)과 3개의 당이 결합된 배당체를 의미한다. 스테비올은 1931년, *S. rebaudiana* 로부터 분리된 첫 번째 diterpene이다. 스테비아에 존재하는 스테비올 배당체는 감미를 나타내는 성분으로 설탕 대체품으로 널리 사용되고 있다. 스테비아 추출물에는 스테비오사이드 및 리바우디오사이드(rebaudioside)가 많이 함유되어 있다. 스테비오사이드는 설탕의 당도 대비 약 200 ~ 300배 이상을 지니고 있으나 상대적 칼로리가 낮고 열에 강해 기존 합성감미료 대비 안정성이 높아 당 대체 감미료로 널리 이용되고 있다[1,2]. 또한, 스테비올과 그 유도체인 스테비오사이드, 리바우디오사이드는 인체 유해성에 대해 보고되지 않았고 피부 섬유아세포 콜라겐 합성을 통해 피부 탄력 향상 및 주름 개선 효과가 보고되어 있다[3]. 특히 스테비올에 여러 개의 당이 결합된 스테비오사이드는 고농도 조건에서도 별다른 독성이 나타나지 않는 것으로 알려져 안전성이 입증되었고 인간 암세포에 대해 세포사멸(apoptosis)을 유발한다고 알려져 있다[4,5].

피부보습은 피부의 수분과 탄력을 유지할 뿐 아니라, 해로운 외부 환경 요인을 방어하는 관점에서 필수적인 요소이다. 이러한 피부 보습 효과는 각질층(stratum corneum)의 NMF (natural moisturizing factor)와 히알루론산의 수분 결합 능력으로 인해 조절되는데,

이러한 보습 능력은 피부장벽 기능과도 밀접한 관련이 있다[6]. 피부장벽 기능은 노화 및 외부 여러 요소들에 의해 파괴될 수 있으며, 이러한 피부장벽 손상은 결국 피부 수분량 감소와 주름 발생의 원인이 될 수 있다[7,8]. 이러한 피부 보습 및 피부 장벽과 직접적 관련이 있는 것이 바로 밀착연접(tight junction, TJ)이다. TJ은 두 개 이상의 세포 간 부착을 연계하고, 세포외기질을 통해 물질수송을 조절하는 다중 단백질 복합체(multiprotein complexes)로 occludin, claudin 등이 알려진다[9,10]. TJ 관련 단백질들은 세포막 사이에 transmembrane domain을 가지고 있어 세포막 내에 강하게 박혀 있으나 zona occludens-1 (ZO-1), ZO-2, cingulin 등과 actin cytoskeleton과 결합하고 다양한 신호 전달 단백질과의 상호작용 등을 하며, 이를 통해 세포 간의 부착(adhesion), 수분 및 이온 등의 물질 이동을 조절하는 물리적 장벽기능(barrier function)을 가진다[11-14]. 이러한 피부세포의 장벽기능은 피부 표면의 약산성(pH 5.5) 유지와 각질층 내 항균 펩타이드 등에 직접 관여하며 바이러스나 박테리아와 같은 외부 침입을 막고 각질세포 분열과 분화를 조절하는 등 정상적 피부 보호 및 유지에 중요한 역할을 수행한다고 할 수 있다[15,16].

그러나 최근 많은 연구들에 따르면 TJ은 수분 유지, 이온 수송 조절 등에 의한 피부 보습 기능뿐 아니라 암세포의 유전자 전사와 종양 전이의 억제, 세포증식 조절 등에도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 TJ의 기능은 조직의 구획을 정하고 항상성을 유지하기 위해 상당히 중요하다[17,18]. 특히 TJ 관련 단백질 중 claudin family 단백질에 의한 구조적 변화

발생은 암세포의 초기 침윤과 전이에 관련되어 있어 TJ 구조의 변화 및 소실이 관찰된다. 따라서 TJ 관련 단백질(claudins, occludin, ZO-1, ZO-2 등) 및 TJ 관련 단백질(E-cadherin 등) mRNA 발현에 관여하는 조절 메커니즘 연구의 중요성이 커지고 있다[19-22]. 그 예로 claudin 1과 claudin 7은 전이성 유방암 세포에서 그 발현이 억제되지만 다른 암 조직에서 claudin 3과 claudin 4 발현량은 현저히 증가된다고 알려진다. 또한 자궁경부암의 경우에는 비종양 조직에 비해 claudin 5와 claudin 9의 발현량이 저해되지만 claudin 8 발현은 오히려 크게 증가된다. Claudin 8은 인간 골육종 세포인 U2OS의 악성 증식에 관여하고 신장암 진단을 위한 바이오마커로도 사용된다. Na<sup>+</sup> 흡수 메커니즘에서는 claudin 8 과발현 조절이 중요하다[23,24]. 이러한 연구들로 볼 때 TJ 관련 단백질의 발현조절은 암 발생 초기 단계의 결과라기보다 구조적 변화 등에 의해 암이 발생되고 진행 및 전이에 원인이 되는 것으로 이해되어진다[25-28]. 이 뿐 아니라 TJ 관련 단백질 중 claudin 단백질들은 세포이동(cell migration)에도 직접적으로 관여한다는 연구결과가 있어 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다[29,30].

이에 본 연구에서는 여러 가지 화장품 소재 중에 피부 주름개선 및 미백 기능성 소재로 기 활용되고 있는 스테비올 및 그 유도체들의 TJ 관련 유전자 발현 조절, 세포이동 및 피부 세포투과도 기능 변화에 대해 조사하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 스테비올 및 스테비오사이드 유도체 시료

본 연구에서 사용한 스테비올 및 스테비올 당 유도체(스테비오사이드, 리바우디오사이드)들은 Table 1에 제시된 바와 같이 모두 (주)마크로케어에서 제조 및 생산하고 동결 건조한 순도 95% 이상 분말원료를 사용하였다. 또한, 이에 대한 검증을 위해 Sigma (USA)를 통해 개별 구매하여 실험결과를 검증하였다.

### 2.2. 세포 배양

실험에 사용된 세포주는 인간 유래 각질형성 세포(human keratinocyte cell line)인 HaCaT으로, 고려대학교 생명공학부에서 분양받아 사용하였다. HaCaT 세포를

10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea)과 1% 항생제(100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, Welgene, Korea)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Korea)을 이용하여 표준 세포 배양법인 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 2.3. 세포 독성 평가

스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드가 세포 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay를 수행하였다. 96-well plate에 HaCaT 세포를 5,000 cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 각각의 well에 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드를 농도별로 처리하여 다시 24 h 동안 배양한 후 MTS 시약(Promega, USA)을 첨가하였다. 그 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정한 흡광도를 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 생존율을 백분율로 표시하여 상대적인 세포 독성을 측정하였다.

세포생존율(%) =

$$(\text{시료첨가군의흡광도} / \text{대조군의흡광도}) \times 100$$

### 2.4. RNA 추출 및 Quantitative Real-time PCR

6-well culture dish에 HaCaT 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드를 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 250 µM로 처리하여 다시 48 h 동안 배양하였다. 각 시료가 첨가된 배지를 제거한 후 RiboEx (Geneall, Korea) 1 mL로 세포를 lysis 한 다음, hybrid-R RNA purification kit (Geneall, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하고 Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, USA)로 정량하였다. 이렇게 추출하여 정량한 total RNA로 cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 2 µg, dNTP mix (10 mM) 2 µL, random hexamer (100 pmol/µL) 2 µL를 넣은 후 DEPC-treated water로 총 부피 20 µL가 되도록 조정하였다. 65 °C에서 5 min간 반응시킨 후 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, 각각 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA) 8 µL, M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) 2 µL,

**Table 1.** Primers Used for Quantitative Analysis of Gene Expression

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
Claudin1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GIG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		
$\beta$ -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

RNase inhibitor (Enzynomics, Korea) 2  $\mu$ L, DEPC-treated water 8  $\mu$ L를 추가적으로 첨가해 주었다. 그 뒤 실온에서 10 min간 둔 후에 50 °C에서 1 h 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 추후 실험에는 이렇게 합성한 cDNA를 1/5로 희석시켜 사용하였다. 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드 처리에 의해 TJ 관련 유전자인 claudin family의 mRNA 발현량을 비교해 보기 위하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 2X Prime Q-master mix (Genet Bio, Korea) 10  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L forward primer와 10 pmol/ $\mu$ L reverse primer를 각각 1.5  $\mu$ L, nuclease free water 2  $\mu$ L, 합성한 후 1/5로 희석시킨 cDNA 5  $\mu$ L를 넣은 뒤 95 °C에서 3 min 후 95 °C에서 denaturation 20 s, 58 °C에서 annealing 20 s, 72 °C에서 elongation 20 s를 40 cycle 실시하는 조건 하에서 AriaMx (Agilent, USA)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 실험군과 대조군의 internal standard로  $\beta$ -actin을 사용하였고, 실험에 사용한 primer의 염기 서열은 Table 1과 같다.

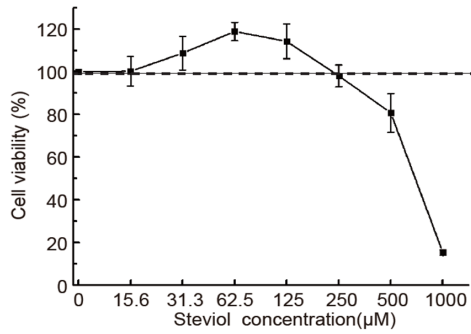
## 2.5. Cell Migration Assay

스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드 처리에 의한 세포의 이동성을 확인하기 위하여 cell migration assay를 실시하였다. 6-well plate에 HaCaT 세포를  $6 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 세포가 plate에 confluent 될 때까지 배양해 주었다. 배양 중인 HaCaT 세포의 표면에 200p tip을 이용하여 wound를 만든 다음,

각 well에 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드를 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 250  $\mu$ M로 처리하여 다시 24 h 동안 배양하였다. 그 후 healing 정도를 현미경을 통해서 관찰하였으며, 현미경을 통하여 남아 있는 wound의 거리를 측정하여 다음 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료첨가군의 상처 치료 정도를 백분율로 표시하여 상대적인 closure rate를 측정하였다.

## 2.6. 표피세포 피부저항 측정

스테비올과 스테비올 유도체가 상피세포 간 장벽 (epithelial barrier)에 미치는 영향을 확인하기 위하여 transepithelial electric resistance (TEER)를 측정하였다. 12-well plate 0.4  $\mu$ m pore transparent PET membrane (Corning, USA)에, HaCaT  $5.0 \times 10^4$  cells/insert 밀도로 seed하여 TEER 측정값이 100 ~ 120 ohm  $\cdot$  cm<sup>2</sup>까지 도달하도록 배양한 뒤, 250  $\mu$ M의 steviol과 steviol 유도체를 처리한 후 0, 12, 24 h 간격으로 TEER 값을 측정하였다. 이때 TEER 값은 ohm ( $\Omega$ )  $\times$  cm<sup>2</sup>으로 표시하였다. 본 연구에서 세포 장벽 강화를 확인하기 위해 EVOM2 (epithelial volt ohm meter 2, World Precision Instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 양성 대조군으로 resveratrol (50  $\mu$ M), 음성대조군은 deoxy-nivalenol (DON, 5  $\mu$ M)을 사용하여 세포 장벽 강화를 비교 측정하였다[31].



**Figure 1.** Examination of the cytotoxicity of steviol in human keratinocyte. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of the percentage of control optical density (O.D.) in triplicate.

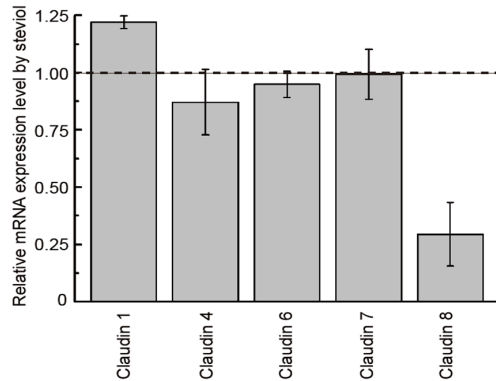
2.7. 통계처리

모든 통계처리는 Student's *t*-test를 이용하여 유의 수준 0.05 ( $p < 0.05$ )로 검정하여 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 스테비올의 세포 독성 평가

스테비올이 세포의 증식 및 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 인간 유래 각질 형성세포인 HaCaT 세포를 배양하고 각각의 농도별로 처리하여 MTS assay를 수행하였다. 농도 범위는 기존 논문을 참고하여 0 ~ 1000  $\mu$ M로 설정하였다. HaCaT 세포에 스테비올을 농도별로 처리한 후 24 h 뒤 MTS assay를 실시한 결과 스테비올 0 ~ 62.5  $\mu$ M까지는 세포 증식률이 점차 증가하여 62.5  $\mu$ M에서  $118.86 \pm 4.31\%$ 로 가장 높은 세포 증식률을 보였다(Figure 1). 스테비올 125  $\mu$ M에서도  $114.25 \pm 8.20\%$ 로 높은 세포 증식률이 관찰되어 125  $\mu$ M까지는 스테비올이 HaCaT 세포의 증식률을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다. 250  $\mu$ M에서는 세포 생존율  $98.08 \pm 5.11\%$ 로, HaCaT 세포에 스테비올을 250  $\mu$ M까지 처리하였을 때까지는 세포 독성이 관찰되지 않았다. 그러나 250  $\mu$ M 이후에는 처리 농도가 증가할수록 세포 생존율이 떨어져 스테비올 1000  $\mu$ M에서는  $15.29 \pm 1.30\%$ 로 세포 생존율이 급격히 감소하는 등 높은 세포 독성을 보였다. 스테비올의 세포 독성 실험 결과 스테비올 125  $\mu$ M까지는 대조군 대비 HaCaT 세포의 증식률이 증가하였으나, 250  $\mu$ M에서 세포 생존율이 대조군과 거의 유사하였고, 250  $\mu$ M보다 더 높은 농도에서는 세포 독성이 관찰되었다. 따라서 그 이후 실험

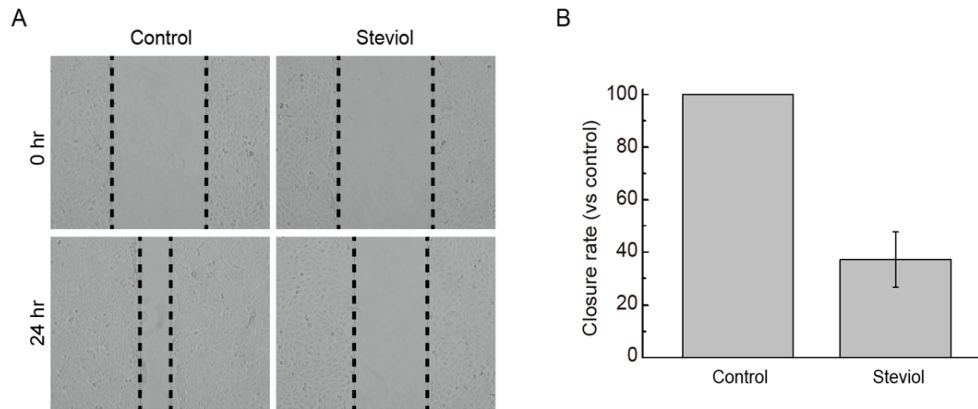


**Figure 2.** Steviol decreases mRNA expression level of claudin 8. Claudin 8 is specifically decreased up to 0.29 times among the claudin genes by steviol treatment (250  $\mu$ M). The results were expressed as the average of triplicate samples.

험에서는 HaCaT 세포의 생존율에 영향을 주지 않으면서 스테비올의 효과를 극대화하기 위해 HaCaT 세포 처리 최고 농도인 250  $\mu$ M로 진행하였다.

3.2. 스테비올에 의한 TJ 관련 유전자의 mRNA 발현량 확인

최근 연구에 따르면 세포간 연접(intercellular junction) 중 하나인 TJ은 피부 과립층에 위치해 있으면서 인접한 세포들을 접합시킴으로써 상피의 전해질과 수분의 이동을 조절하는 장벽 기능뿐 아니라 세포 내 신호전달 등 다양한 생물학적 기능을 수행한다고 알려진다[32,33]. 또한, 암세포 전이에 있어서 세포 adhesion과 junction 관련 단백질의 변화 중 claudin 유전자의 변화가 특히 중요하게 작용할 것으로 추정된다[34]. 따라서 본 연구에서는 스테비올이 피부를 구성하는 각질 형성 세포의 생물학적 메커니즘에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 TJ 관련 유전자인 claudin mRNA 발현량을 측정하였다. MTS 실험 결과 세포 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 확인된 250  $\mu$ M 농도 조건하에서 스테비올을 48 h 동안 처리한 후 internal standard로  $\beta$ -actin을 이용하여 대조군 대비 스테비올 처리군의 claudin 1, 4, 6, 7, 8의 mRNA 발현량을 비교해 보았다. 그 결과 claudin 1과 claudin 4는 각  $1.22 \pm 0.03$ ,  $0.87 \pm 0.14$ 배로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. Claudin 6와 claudin 7 또한,  $0.95 \pm 0.06$ ,  $0.99 \pm 0.11$  배로, claudin 1, 4와 마찬가지로 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면, claudin 8은  $0.29 \pm 0.14$ 배까지 현저히 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 스테비올이 TJ 관



**Figure 3.** Investigation on the cell migration by steviol. (A) Representative images for indicated condition show inhibitory effect of steviol on cell migration (B) The results are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

런 유전자 중에서도 특이적으로 claudin 8 유전자 발현을 억제한다는 것을 보여준다.

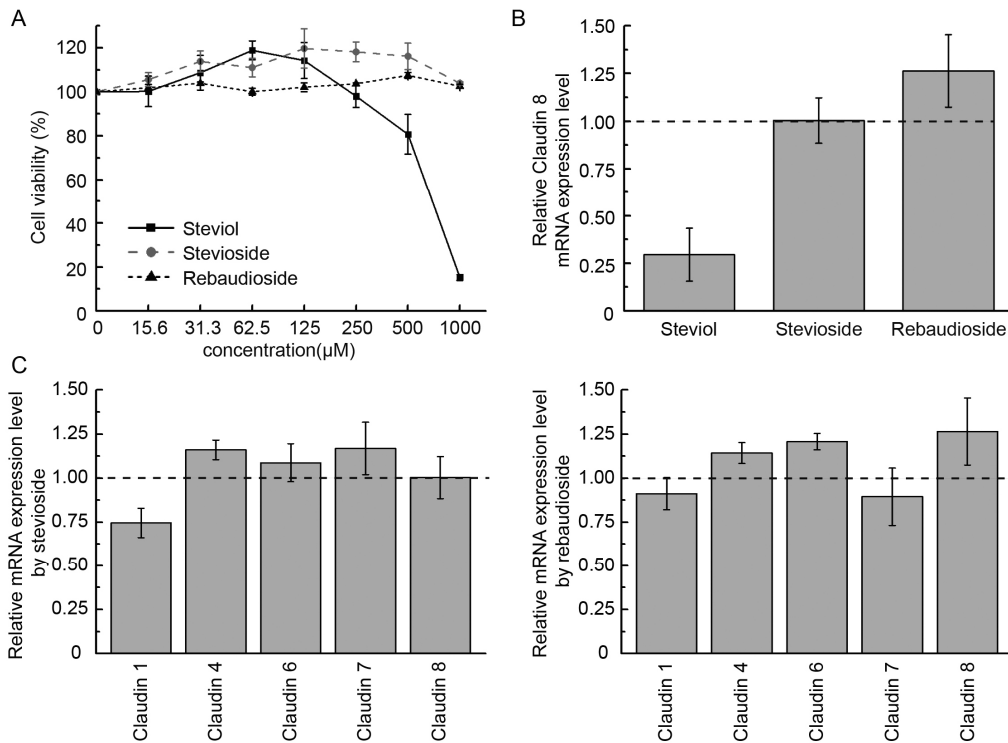
### 3.3. 스테비올의 세포 이동 저해효과

TJ 관련 claudin 단백질은 세포-세포 접촉 단백질로 세포 이동을 용이하게 하여 정상세포의 이동 뿐 아니라 암의 전이과정에서도 중요한 의미를 가지고 있다 [21-24]. 또한, 세포 이동은 상처 치유 시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 기능성 화장품 개발에 있어서 고려해야 할 사항 중의 하나이다. 본 연구에서는 스테비올과 그 유도체가 세포 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해 cell migration assay를 이용하여 세포 이동 실험을 수행하였다. 세포 배양 과정에서 세포 배양 용기에 wound를 남기고 빈 공간에 세포들이 성장 및 이동을 통해 복구되는지를 관찰하기 위해 흔적이 복구되는 거리를 측정함으로써 세포의 이동 속도를 비교하는 실험기법이다. HaCaT 세포를 배양한 plate에 흡집을 낸 후 250  $\mu$ M 스테비올을 24 h 동안 처리한 뒤 현미경으로 확인한 결과 육안으로도 대조군에 비해 스테비올 처리군이 세포이동 및 상처 치료 거리가 확연하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3A). Cell migration assay 실시 0 h과 24 h째에 세포를 이미지화하여 상처 치료 거리인 closure rate를 측정된 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 스테비올을 처리한 경우 37.33  $\pm$  10.49%의 상처 치료 복구율을 보였다(Figure 3B). 이를 통해 스테비올이 세포의 이동을 저해하여 상처 치료 거리를 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 스테비올은 상처 치유를 목적으로 하는 화장품 개발에는 좋은

소재가 아닐 것으로 예상된다.

### 3.4. 스테비올 및 스테비올 당 유도체들과의 비교 실험

앞선 실험에서 스테비올이 1000  $\mu$ M과 같은 고농도에서는 세포 생존율을 급격히 떨어뜨리고 claudin family 중에서도 특히 claudin 8의 mRNA 발현량을 현저히 감소시킴이 확인되었다. 그리고 스테비올에 의해 세포 이동 또한 저해된다는 사실이 관찰되었다. 스테비올과 그 유도체인 스테비오사이드와 리바우디오사이드의 비교 실험을 통하여 스테비올과 유도체가 생물학적으로 얼마나 차이가 있는지 알아보았다. 먼저 스테비올과 그 유도체인 스테비오사이드와 리바우디오사이드가 HaCaT 세포에 미치는 세포 독성을 비교하기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 그 결과 스테비올은 62.5  $\mu$ M에서 118.86  $\pm$  4.31%로 가장 높은 세포 생존율을 보이고, 125  $\mu$ M에서도 114.25  $\pm$  8.20%로 세포 생존율을 증가시킨 반면에 스테비오사이드는 500  $\mu$ M에서 116.16  $\pm$  5.96%의 세포 생존율을 보여 스테비올보다 더 높은 농도에서도 세포의 생존율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다(Figure 4A). 리바우디오사이드는 500  $\mu$ M에서 107.50  $\pm$  1.32%로 세포 생존율이 다소 증가하는 경향을 보였으나 전반적인 농도에서 스테비올이나 스테비오사이드에 비하여 세포 생존율에 큰 영향을 미치지지는 못하였다. 또한 1000  $\mu$ M에서 스테비오사이드는 103.88  $\pm$  0.76%, 리바우디오사이드는 102.57  $\pm$  0.87%의 세포 생존율이 관찰되었다. 스테비올은 1000  $\mu$ M에서 15.29  $\pm$  1.30%의 세포 생존율을 보여 높은 세포 독성을 나타낸 반면에, 스테비오사이드와 리바우디

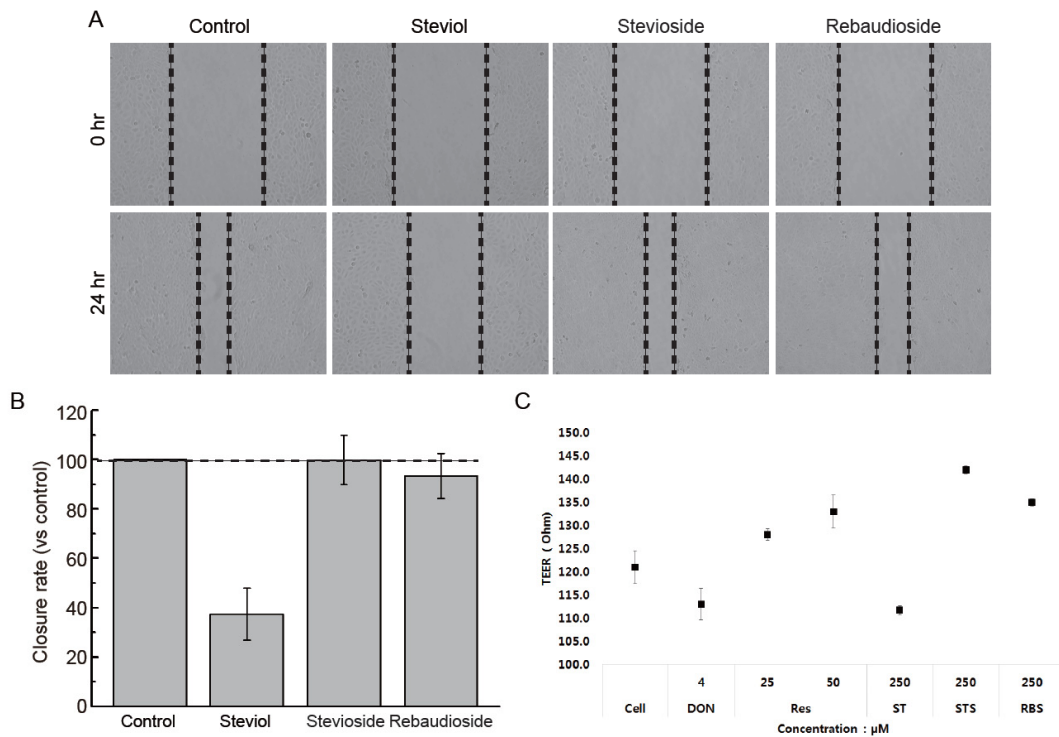


**Figure 4.** Effect of steviol and its derivatives on cytotoxicity and claudin gene expression. (A) Stevioside and rebaudioside could not suppress cell proliferation unlike steviol in 250 μM. (B) Investigating the activity of steviol and its derivative on mRNA expression of tight junction claudin 8. (C) This panel show that steviol derivatives such as stevioside and rebaudioside are not able to up-regulate tight junction related claudin genes such as claudin 1, 4, 6, 7, 8 expression. The results are expressed as mean ± S.D. of data obtained three independent experiments.

오사이드는 스테비올과 같은 농도에서도 세포 독성이 관찰되지 않았다. 그다음으로 스테비올 유도체인 스테비오사이드와 리바우디오사이드의 claudin family의 mRNA 발현량을 살펴보았다. 스테비오사이드와 리바우디오사이드는 스테비올과 마찬가지로 250 μM 농도에서 실험하였다. 앞선 실험의 결과로 스테비올의 claudin 8 mRNA 발현량이 0.29 ± 0.14배로 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었으나, 스테비오사이드는 1.00 ± 0.12, 리바우디오사이드는 1.26 ± 0.19배로 관찰되었다 (Figure 4B). 스테비오사이드에서 claudin 1과 claudin 4는 대조군 대비 각 0.75 ± 0.08, 1.16 ± 0.06배였으며, claudin 6와 claudin 7은 1.09 ± 0.11, 1.17 ± 0.15배였다. 리바우디오사이드는 claudin 1, 4, 6, 7이 각각 0.91 ± 0.09, 1.14 ± 0.06, 1.21 ± 0.05, 0.89 ± 0.16배로 관찰되었다(Figure 4C). 이로써 스테비오사이드와 리바우디오사이드는 claudin 1, 4, 6, 7에서 모두 스테비올과 유사하게 대조군과 큰 유의성이 보이지 않음을 알 수 있었다. 이

러한 결과는 스테비올과 그 유도체인 스테비오사이드, 리바우디오사이드 중에서도 스테비올이 TJ 관련 유전자인 claudin 8의 mRNA 발현량에 특이적으로 작용한다는 것을 말해준다.

마지막으로 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드의 세포 이동 속도를 비교해 보았다(Figure 5A). 스테비올과 같은 농도인 250 μM의 스테비오사이드와 리바우디오사이드를 24 h 배양한 후 상처 치료 복구율을 확인해 본 결과 스테비오사이드는 99.91 ± 9.99%, 리바우디오사이드는 93.46 ± 9.12%로 관찰되었다. Claudin 8의 mRNA 발현량을 감소시킨 스테비올만 대조군 대비 37.33 ± 10.49%로 상처 치료 복구율이 억제된 것으로 보아 claudin 8이 각질 세포인 HaCaT 세포의 이동에 중요한 역할을 한 것으로 추측되어진다 (Figure 5B). 또한 우리는 스테비올과 스테비오사이드, 리바우디오사이드에 의한 세포장벽 기능 강화 및 cell permeability 감소효과를 관찰하기 위해 TEER 값(ohm)



**Figure 5.** The effects of steviol and its derivatives on cell migration and permeability. (A) Stevioside and rebaudioside could recover its migration defects caused by steviol in HaCaT cells. (B) Steviol inhibit normal cell division and cell proliferation through the suppression of claudin 8, not by stevioside and rebaudioside. (C) Comparison of cell permeability effect through TEER assay in treatment of steviol (ST) and its derivatives (STS and RBS) using negative control (Deoxynivalenol, DON) and positive control (Resveratrol, Res). The results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of data obtained three independent experiments.

을 측정하였다. 정상적인 세포배양 조건인 대조군 (control)  $121.0 \pm 4.6$  대비 음성대조군인  $4 \mu\text{M}$  deoxynivalenol (DON)는  $113.0 \pm 4.4$ 로 TEER 값이 감소한 반면 양성대조군인 resveratrol (Res)은  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  농도 조건에서 각각  $128.0 \pm 1.7$ ,  $133.0 \pm 4.6$ 로 TEER 값이 측정되어 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. 그러나 스테비올의 경우  $111.7 \pm 1.5$ 로 감소하였다. 이는 스테비올에 의해 세포투과성의 증가를 보여준다. 반면 스테비올 유도체인 스테비오사이드는  $142.0 \pm 4.6$ , 리바우디오사이드는  $135.0 \pm 0.0$ 로 측정되어 대조군 대비 세포투과성이 감소되고 이를 통해 세포장벽이 강화되는 것을 확인하였다(Figure 5C).

#### 4. 결 론

피부의 장벽기능은 외부 미생물의 침입이나 유해성 물질들로부터 피부를 보호하고, 체내 물질 유출 방지

및 피부 수분 증발을 막는 등 다양한 기능을 수행하고 있다. 여러 요인들에 의한 피부장벽 기능 약화는 피부 건조, 주름 발생의 일차적 원인이 된다고 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 피부장벽 강화를 통한 보습과 피부 노화 방지에 효과적인 소재 발굴을 위해 피부장벽을 강화 기능을 수행하는 TJ 관련 단백질의 조절 메커니즘을 연구하였다. 본 연구에서는 피부 주름 개선 효과 및 미백 기능성 화장품 소재로 활용되고 있는 스테비올 및 그 유도체들이 TJ와 피부장벽 기능 조절 메커니즘을 확인하고자 하였다. MTS assay를 통해 스테비올과 스테비오사이드 및 리바우디오사이드를 인간 유래 각질 형성 세포인 HaCaT 세포에 처리하여 세포 독성이 있는 농도를 확인하였고, 스테비올의 경우  $250 \mu\text{M}$ 의 농도에서 세포 생존율에 영향을 미쳤으나 스테비오사이드 및 리바우디오사이드는  $1000 \mu\text{M}$ 의 농도까지 세포의 생존율에 큰 영향이 없음을 확인하였다. 이는 스테비올 보다 스테비오사이드 및 리바우디오사



이드가 보다 안전한 소재임을 보여준다. TJ 관련 유전자의 mRNA 발현 측정실험 결과 스테비올 250  $\mu\text{M}$  처리군은 대조군 대비 claudin 8의 발현만을 특이적으로 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다. 반면 스테비올 사이드와 리바우디오사이드는 claudin 8의 발현에 별다른 영향을 보이지 않았다. 이러한 claudin 8 발현 감소가 세포의 이동성에 어떠한 영향을 끼치는지 확인하기 위해 cell migration assay를 실시한 결과, claudin 8을 감소시킨 스테비올 처리군에서만 세포의 이동이 억제되는 반면, 스테비올 사이드와 리바우디오사이드 처리군에서는 세포 이동 저해효과가 관찰되지 않았다. 결과적으로 스테비올 250  $\mu\text{M}$  처리 시 관찰된 피부각질형성세포의 세포 독성 발생과 TJ 관련 단백질 중 claudin 8의 특이적 발현 억제, 세포이동 억제현상은 스테비올 당 유도체인 스테비올 사이드, 리바우디오사이드 처리군에서는 전혀 관찰되지 않았다. 정확한 피부장벽 기능 조절 메커니즘까지 규명하지는 못하였으나, 스테비올 처리에 따른 특이적 claudin 8 발현 억제 효과는 피부각질형성세포의 세포이동과 밀접한 관련이 있어 나타난 결과라 사료된다. 위의 결과들을 종합해 볼 때 스테비올 보다 스테비올에 당이 붙어 있는 스테비올 유도체가 화장품 소재로 보다 적합하므로 이러한 결과에 대한 정확한 규명을 위해 스테비올 유도체의 물성 변화와 세포독성과의 상관관계 규명이 필요하고 스테비올 유도체들의 항노화 효과를 포함한 다양한 효능평가 연구도 필요할 것이다. 이와 더불어 향후 스테비올의 claudin 8 발현 조절 메커니즘에 대한 추가 연구 및 스테비올 유도체들의 TJ 관련 메커니즘 연구도 필요할 것으로 여겨진다.

### Acknowledgement

이 논문은 2015학년도 중소기업청 기술혁신개발사업 (효소전환기술에 의한 스테비올 배당체의 개발 및 응용, S2313489)과 충남대학교 자체연구과제 지원에 의해 수행되었습니다. steviol, stevioside, rebaudioside 원료를 공급해 주신 (주)마크로케어 김무성 박사님께 감사드리며 충남대학교 김기광 교수님께는 공동 연구 및 교신저자 역할을 성실히 수행해 주심에 다시 한번 감사 드립니다.

### Reference

1. J. R. Hanson and B. H. De Oliverira, Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides, *Nat. Prod. Prp.*, **10**(3), 301 (1993).
2. H. Oh, E. Han, D. Choi, J. Kim, M. Eom, I. Kang, H. Kang, and K. Ha, *In vitro* and *in vivo* evaluation of genotoxicity of stevioside and steviol, natural sweetener, *J. Pharm. Soc. of Korea*, **43**, 614 (1999).
3. Korea, PCT/KR2013/008636 (2012).
4. M. Ukiya, S. Sawada, T. Kikuchi, Y. Kushi, M. Fukatsu, and T. Akihisa, Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines, *Chem. Biodivers.*, **10**(2), 177 (2013).
5. D. Brusick, A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides, *Food Chem. Toxicol.*, **46**(7), 177 (2008).
6. F. Bonte, Skin moisturization mechanisms: new data, *Ann. Pharm. Fr.*, **69**(3), 135 (2011).
7. R. Ghadially, B. Brown, S. Sequeira-Martin, K. Feingold, and P. Elias, The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model, *J. Clin. Invest.*, **95**(5), 2281 (1995).
8. S. H. Lee, D. J. Min, Y. J. Na, J. W. Shim, L. K. Kwon, J. C. Cho, and H. K. Lee, The protective effect of mineral water against UVB irradiation, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(1), 39 (2013).
9. M. Cereijido and J. M. Anderson, Tight junctions, Crc Press, New York Washington, D.C. (2001).
10. K. Morita and Y. Miyachi, Tight junctions in the skin, *J. Dermatol. Sci.*, **31**(2), 81 (2003).
11. E. Schneeberger and R. Lynch, The tight junction: a multifunctional complex, *Am. J. physiol. Cell Physiol.*, **286**(6), 1213 (2004).
12. L. Gonzalez, A. Betanzos, P. Nava, and B. Jaramillo, Tight junction proteins, *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, **81**(1), 1 (2003).
13. L. Lapierre, The molecular structure of the tight junction, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**(3), 255 (2000).

14. S. Tsukita, M. Furuse, and M. Itoh, Multifunctional strands in tight junctions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**(4), 285 (2001).
15. H. Y. Yu, I. J. Yang, V. R. Lincha, I. S. Park, D. U. Lee, and H. M. Shin, The effect of the fruits of *Foeniculum vulgare* on skin barrier function and hyaluronic acid production in HaCaT keratinocytes, *J. Life Sci.*, **25**(8), 880 (2015).
16. M. S. Kwon and T. B. Choi, The effect on the skin barrier function of ceramide, *Korean Journal of Aesthetic Society*, **3**(1), 131 (2005).
17. E. Dejana, Endothelial cell-cell junctions: happy together, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**(4), 261 (2004).
18. H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada, Transmembrane proteins of tight junctions, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1778**(3), 588 (2008).
19. M. Katoh, Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (review), *Int. J. Oncol.*, **27**(60), 1677 (2005).
20. J. A. Tunggal, I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Gunzel, M. Fromm, and C. M. Niessen, E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions, *EMBO J.*, **24**(6), 1146 (2005).
21. A. S. Wong and B. M. Gumbiner, Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin, *J. Cell Biol.*, **161**(6), 1191 (2003).
22. K. Yokoyama, N. Kamata, E. Hayashi, T. Hoteiya, N. Ueda, R. Fujimoto, and M. Nagayama, Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*, *Oral Oncol.*, **37**(1), 65 (2001).
23. J. Xu, Y. Yang, P. Hao, and X. Ding, Claudin 8 contributes to malignant proliferation in human osteosarcoma U2OS cells, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **30**(9), 400 (2015).
24. W. Akihiro, H. Maki, Y. Kiyohito, and K. Masuo, Checkpoint kinase 1 activation enhances intestinal epithelial barrier function via regulation of claudin-5 expression, *PLoS one*, **11**(1), e0145631 (2016).
25. S. L. Kominsky, P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, and S. Sukumar, Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast, *Oncogene*, **22**(13), 2021 (2003).
26. P. J. Morin, Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy, *Cancer Res.*, **65**(21), 9603 (2005).
27. A. M. Tókes, J. Kulka, S. Paku, A. Szik, C. Paska, P. K. Novak, and Z. Schaff, Claudin-1,-3 and-4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study, *Breast Cancer Res.*, **7**(2), 1 (2005).
28. J. Zhu, R. Wang, H. Cao, H. Zhang, S. Xu, A. Wang, and R. Wang, Expression of claudin-5,-7,-8 and-9 in cervical carcinoma tissues and adjacent non-neoplastic tissues, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**(8), 9479 (2015).
29. P. G. Webb, M. A. Spillman, and H. K. Baumgartner, Claudins play a role in normal and tumor cell motility, *BMC Cell Biol.*, **14**(1), 1 (2013).
30. A. Shiozaki, H. Shimizu, D. Ichikawa, H. Konishi, S. Komatsu, T. Kubota, H. Fujiwara, K. Okamoto, D. Iitaka, S. Nakashima, Y. Nako, M. Liu, and E. Otsuji, Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells, *World J. Gastroenterol.*, **20**(47), 17863 (2014).
31. K. H. Ling, L. Y. W. Murphy, E. N. Hani, and W. Mingfu, Protective capacity of resveratrol, a natural polyphenolic compound, against deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation, *Chem. Res. Toxicol.*, **29**(5), 823 (2016).
32. C. Zihni, C. Mills, K. Matter, and M. S. Balda, Tight junction: from simple barriers to multifunctional molecular gates, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 564 (2016).
33. A. Hartsock and W. J. Nelson, Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1778**(3), 660 (2008).
34. M. J. Kwon, Emerging roles of claudins in human cancer, *International journal of molecular sciences*, **14**(9), 18148 (2013).