



Original Article / 원저

흑효모 유래 Polycan의 인간 대장 상피세포(HT-29)에서 MAPK 및 NF- κ B 경로 조절을 통한 항염증 및 항산화 효과

이선민¹, 김서영^{2,3}, 김영숙⁴, 조민정⁴, 오테우^{2,3*}

¹국가독성과학연구소 경남바이오환경연구본부 바이오헬스연구센터,

²한국한의학연구원 한의기술응용센터,

³과학기술연합대학원대학교 한의융합과학 전공, ⁴(주)글루칸

Protective Effects of *Aureobasidium pullulans* SM-2001 Derived Polycan Against Inflammatory and Oxidative Stress in HT-29 Cells Through MAPK/NF- κ B Regulation

Seon Min Lee¹, Seo Young Kim^{2,3}, Young-Suk Kim⁴, Min Jeong Cho⁴, Tae Woo Oh^{2,3*}

¹Center for Bio-Health Research, Division of Gyeongnam Bio-Environmental Research, Korea Institute of Toxicology,

²Korean Medicine-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine,

³Department of Korean Convergence Medical Science, University of Science & Technology, ⁴Glucan Co. Ltd.

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the anti-inflammatory and antioxidant effects of Polycan, a β -glucan derived from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, and elucidated its molecular mechanisms in IFN- γ and LPS-stimulated human intestinal epithelial HT-29 cells.

Methods : HT-29 cells were treated with Polycan (125, 250, and 500 μ g/mL) and stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) and LPS (10 ng/mL) to induce inflammation. Cell viability was evaluated using the MTT assay. The expression of inflammatory mediators (iNOS and COX-2) and signaling molecules (MAPK and NF- κ B) was analyzed by Western blotting. Pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) were quantified using ELISA. To assess antioxidant activity, oxidative stress was induced with hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 mM), and intracellular ROS levels were measured using CellROX® Red staining.

© 2025 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Results : Polycan exhibited no cytotoxicity and significantly inhibited IFN- γ /LPS-induced iNOS and COX-2 expression in a dose-dependent manner. It suppressed the phosphorylation of ERK, JNK, and p38 and prevented NF- κ B activation by blocking p65 nuclear translocation and stabilizing I κ B α . Polycan also reduced the secretion of IL-6, TNF- α , and IL-1 β . Under oxidative stress, Polycan markedly decreased H₂O₂-induced MAPK phosphorylation and intracellular ROS accumulation.

Conclusion : These findings indicate that Polycan exerts potent anti-inflammatory and antioxidant effects by modulating MAPK and NF- κ B signaling pathways in intestinal epithelial cells. Polycan may be a promising therapeutic or functional candidate for preventing and managing intestinal inflammatory diseases.

Keywords : Polycan; β -glucan; HT-29 cells; NF- κ B; MAPK; intestinal inflammation

I. 서론

염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)은 원인 불명의 만성 염증이 장관에 발생하는 질환으로, 주로 궤양성 대장염 (ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)을 포함한다¹⁾. 이들 질환은 면역학적 이상, 유전적 소인, 장내 미생물 환경, 환경적 요인 등 다양한 기전이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다²⁾. 우리나라에서는 비교적 흔한 베체트 장염(Behcet's colitis)도 임상적으로 IBD의 범주에 포함될 수 있다. IBD의 진단은 질병 특이적인 단일 소견이 존재하지 않기 때문에, 임상 증상 및 경과, 내시경, 영상학적 검사 결과, 조직병리학적 소견을 종합적으로 고려하여 이루어진다. 이 과정에서 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염뿐 아니라, 허혈성 장질환이나 방사선성 장염 등도 중요한 감별 대상이 된다. 진단 후에는 병변의 분포와 범위를 명확히 규명하고, 임상적 중증도 평가 및 동반 합병증의 확인이 치료 전략 수립에 필수적이다. IBD는 만성적인 경과를 보이지만, 대부분의 환자에서 증상의 악화기(relapse)와 관해기(remission)가 반복되는 양상을 나타낸다. 증상은 일반적으로 서서히 발현되나, 급성으로 나타나는 경우 감염성 장염과의 감별이 어려울 수 있다. 주요 임상 증상으로는 설사, 혈변, 점액변, 후증감, 잔변감, 배변 급박감, 복통 등이 있으며, 이는 염증의 정도와 병변의 범위에 따라 다양하게 나타난다³⁾. 이러한 염증성 장질환에 대하여 전통의학인 한의학에서는 위, 소대장과 같은 소화기관을 비위(脾胃)라고 칭하는데, 기(氣)를 생산하는 원천이라고 알려져 있다. 염증성 장질환 환자는 소화관의 기능실조와는 달리, 만성적인 염증으로 인한 예후가 불량한

질환으로 알려져 있으며, 장풍(腸風) 장독(臟毒), 이질(痢疾) 등으로 접근하는데, 나타나는 증후에 따라, 특히 하리, 복통, 하혈, 누공형성, 전신권태감 등을 목표로 하여 치료 방침을 결정한다⁴⁾. 즉, 한의학에서는 변증유형을 구분하고, 체질을 판단해 염증성 장질환의 치료계획을 수립하는데, 크게 경도(가벼운 단계), 중등도(염증기), 중증(심한 염증상태)로 나누어 치료를 한다. 주로 경도와 중등도 단계가 치료의 대상이며 한약재, 침, 뜸치료를 병행하여 적용한다.

염증 매개물질(inflammatory mediators)과 사이토카인(cytokine)은 장의 급성 염증을 이해하고, 치료적 중재(therapeutic intervention)를 위한 병태생리학적 기전을 규명하는 데 특히 유망한 표적으로 여겨지고 있다. 최근 몇 년간, 사이토카인 생성을 조절함으로써 이러한 질환을 치료하기 위한 식이 기반 중재 (dietary-based intervention) 전략이 활발히 연구되어 왔다⁵⁻⁷⁾. 포유류의 면역체계는 다양한 세포와 분자로 구성된 복잡한 네트워크를 이루며, 이들은 병원성 미생물의 침입으로부터 숙주를 보호하기 위해 Th1 및 Th2 T세포를 포함한 다양한 T세포를 매개로 상호작용한다⁸⁾. 또한, Th17 세포와 조절 T세포 (regulatory T cells; Treg)와 같은 다른 T세포 아형 (subpopulation)들도 면역학적 항상성(immunological tolerance)을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다⁹⁾. Th1 세포는 IFN- γ (interferon- γ), TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 (interleukin-1), IL-2, IL-8, Cox-2 (cyclooxygenase-2) 등과 같은 염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)을 분비하는 반면, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등과 같은 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory

*Corresponding author: Tae Woo Oh, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3833, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

•Received : October 17, 2025 / Revised : November 3, 2025 / Accepted : November 4, 2025

cytokine)을 분비한다. 이처럼 염증은 해로운 자극에 대한 보호 반응이지만, 만성 염증은 염증성 장질환(IBD), 대장암 및 기타 만성 질환을 포함한 다양한 병리적 상태의 발병에 기여하며, 이러한 질환에서 염증 반응은 iNOS와 COX-2와 같은 친염증 매개체의 생성이 특징이며, 이들은 염증 관련 질환의 발병 기전에 중요한 역할을 한다. NF- κ B와 MAPK 신호 전달 경로는 염증 반응의 주요 조절인자로서, IFN- γ 와 LPS와 같은 세균 내독소와 같은 친염증성 사이토카인에 의해 자극을 받으면, 이 경로들이 활성화되어 염증 유전자의 전사를 유도 한다¹⁰⁻¹².

기능성 다당체 (β -1,3/1,6-glucan)를 세포외로 분비하는 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양물인 Polycan¹³은 잠재적인 치료 효능을 지니고 있는 소재로서, 현재까지 보고된 Polycan의 기능으로는, 엑소폴리머의 면역조절효과¹⁴, 난소절제술로 유발된 골다공증에 완화¹⁵, DSS로 유발된 궤양성 대장염에서 염증 및 장장벽 보호효과¹⁶, 텍사메타손으로 유도된 근감소 동물모델¹⁷ 및 디스트로핀 결핍 MDX 마우스에서의 근위축 개선 효과¹⁸, 비만마우스에서의 장벽손상 완화¹⁹에 대한 효과 등 여러 기능성이 이미 보고되었지만, 장 상피 세포에서의 항염증 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 HT-29 장 상피세포에서 Polycan의 항염증 효과를 조사하고 그 분자기전을 규명하는 것을 목적으로 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

Polycan은 증류수에 용해되어 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 희석하였다. Recombinant human IFN- γ , LPS, 그리고 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 한편, 본 실험에 사용한 polycan은 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양한 분말로, (주)글루칸에서 제공받아 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

HT-29 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS와 1% penicillin (100 units/ml)(Gibco, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5%

CO₂가 포함된 습윤한 환경에서 배양하였다. 세포는 80~90% confluent이 되었을 때마다 2~3일 간격으로 계대 배양하였다.

3. 세포독성 측정

세포 생존율 및 세포독성은 각각 MTT 분석법과 LDH 분석법을 사용하여 평가하였다. HT-29 세포는 96 well plate에 well당 2×10^4 세포의 밀도로 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포는 125, 250, 500 μ g/ml 농도의 Polycan으로 24시간 처리하였다. MTT 분석의 경우, 배양 후 각 well에 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하고 37°C에서 추가로 4시간 동안 배양하였다. 생성된 formazan crystals은 DMSO에 용해시켰으며, microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. LDH 분석의 경우, 배양 상등액을 수거하여 LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였으며, microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH 방출량은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

4. 염증 유도

HT-29 세포는 6 well plate에 well당 5×10^5 세포의 밀도로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 염증을 유도하기 위해 세포는 IFN- γ (10 ng/ml)와 LPS (10 ng/ml)를 24시간 동안 동시에 자극하였다. Polycan은 IFN- γ 및 LPS 자극과 동시에 125, 250, 500 μ g/ml 농도로 처리하였다.

5. 사이토카인 측정

HT-29 세포를 24시간 처리한 후 배양 상등액을 수집하고, 세포 잔해를 제거하기 위해 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. IL-6, TNF- α , IL-1 β 를 포함한 전염증성 사이토카인 수치는 제조사의 지침(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)에 따라 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 100 μ l의 배양 상등액을 항체가 코팅된 microplate에 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후 검출 항체와 기질 용액을 순차적으로 첨가하였다. Microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사이토카인 농도는 kit에 제공된 재조합

사이토카인을 이용해 생성한 표준 곡선을 바탕으로 계산하였다. 모든 샘플은 3회 반복 분석하였다.

6. Western Blot Analysis

HT-29세포에 Polycan 처리 후, 세포는 차가운 PBS로 세척한 후, protease 및 phosphatase inhibitor cocktails이 포함된 RIPA buffers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 용해하였다. 핵 단백질을 추출을 위해, 제조사의 지침에 따라 Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 핵과 세포질 분획을 분리하였다. 단백질을 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 동일한 양의 단백질(30 μ g)을 10 또는 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후, PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. Membrane은 0.1% Tween-20이 포함된 Tris-buffered saline (TBST) 내 5% non-fat dry milk로 실온에서 1시간 동안 blocking한 후, iNOS, COX-2, phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38, 핵 내 p65, I κ B α , β -actin, Lamin B에 대한 1:1000 희석된 1차 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)와 함께 4°C에서 overnight 시켰다. TBST로 세척한 후, 1:5000으로 희석된 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질을 ECL 시스템(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 시각화하였으며, ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량하였다.

7. 산화스트레스 유도 및 처리

Polycan의 산화 효과 평가하기 위해 HT-29 세포를 6 well plate에 well당 4×10^5 세포의 밀도로 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 세포는 Polycan을 125, 250, 500 μ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후, 산화 스트레스를 유도하기 위해 과산화수소(H_2O_2 , 0.5 mM)에 1시간 노출시켰다. 대조군 세포는 용매 처리만 수행하였다. 처리 후 세포는 웨스턴 블롯 분석을 위해 수확하거나 ROS 검출 분석에 사용되었다.

8. ROS 측정

세포 내 ROS 수준은 제조사의 지침에 따라 CellROX[®]

Red 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. HT-29 세포를 24 well plate에 7×10^4 세포/well의 밀도로 접종하고 위에서 설명한 대로 처리하였다. 처리 후, 세포를 37°C 암실에서 30분 동안 5 μ M CellROX[®] Red 시약과 함께 배양하였다. 이후 세포를 PBS로 세 번 세척한 후, 형광 리더기 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 485/520 nm에서 형광 강도를 측정하였다. 한편, 형광 현미경 관찰을 위해 세포를 커버슬립에 접종하고, 위와 같이 처리한 후 CellROX[®] Red 시약으로 염색하고 핵 시각화를 위해 Hoechst 33342(Thermo Fisher Scientific)로 대조 염색하였다. 이미지는 형광 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 200배 배율로 촬영하였다. ROS 수준은 정량화하여 대조군 대비 상대 형광 강도로 표현하였다.

9. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복 수행되었으며, 최소 3회 독립적으로 반복 실험하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 제시하였으며, 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(ANOVA) 후 Tukey 사후 검정을 통해 평가하였다. $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였으며, 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 버전 8.0(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

III. 결과

1. HT-29 세포에서 Polycan의 세포독성 평가

항염증 연구에 사용된 농도에서 Polycan이 세포독성 효과를 나타내는지 확인하기 위해 HT-29 세포를 대상으로 MTT 분석과 LDH 분석을 수행하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 125, 250, 500 μ g/ml 농도의 Polycan 처리 시 대조군과 비교하여 세포 생존율이 약 100%로 유지되었으며, LDH 방출량 역시 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Polycan이 시험된 농도 범위 내에서 HT-29 세포에 세포막 손상이나 세포 사멸을 유발하지 않음을 나타내며, 해당 농도 범위 내에서 후속 항염증 실험에 안전하게 사용할 수 있음을 시사한다.

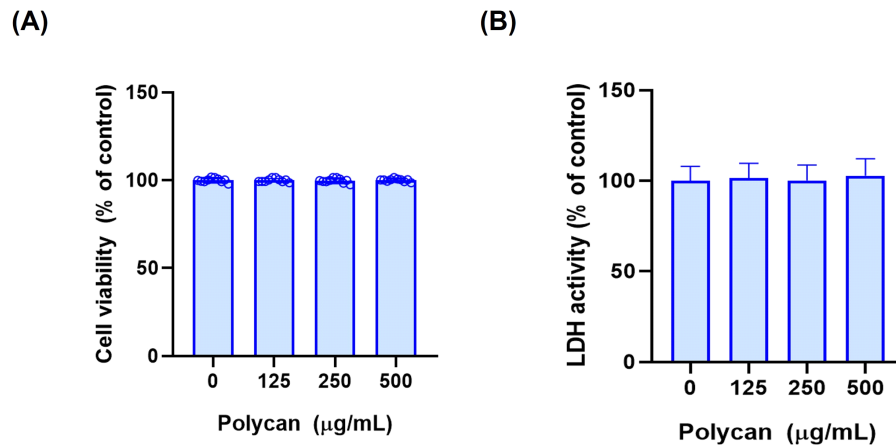


Fig. 1. Cell viability of HT-29 cells treated Polycan.

Cell viability and cytotoxicity of HT-29 cells treated with Polycan. Cells (2×10^4 cells/ml) were treated with different concentrations (0, 125, 250, and 500 µg/ml) of Polycan for 24h. (A) Cell viability was determined by MTT assay. (B) Cytotoxicity was assessed by measuring LDH release into the culture medium. DMSO (0.1%) was used as vehicle, did not affect on the cell viability or LDH release. Results of independent experiments were averaged as percentage cell viability, compared with control. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=3).

2. Polycan이 IFN- γ /LPS로 유도된 HT-29 세포의 염증 매개물 발현에 미치는 영향

Polycan의 항염증 효과를 평가하기 위해 IFN- γ (10 ng/ml)와 LPS (10 ng/ml)로 공동 자극된 HT-29 세포에서 주요 염증 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현을 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과, IFN- γ 와 LPS의 공동 자극은 자극하지 않은 대조군 세포에 비해 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 유의하게 증가시켰다(Fig. 2A). 그러나 Polycan 처리 시 염증이 유발된 HT-29 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 용량 의존적으로 감소하였다. 구체적으로, 125, 250, 500 µg/ml 농도의 Polycan은 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 감소시켰으며, 500 µg/ml에서 가장 뚜렷한 억제 효과가 관찰되었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 Polycan이 농도 의존적으로 염증 매개체의 발현을 효과적으로 억제함을 보여준다. 한편, MAPK 신호 전달 경로는 염증 반응 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이에 대하여 Polycan이 MAPK 활성화를 조절하는지 확인하기 위해 IFN- γ 와 LPS로 자극된 HT-29 세포에서 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화 상태를

분석하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이, IFN- γ 와 LPS의 공동 자극은 자극하지 않은 대조군에 비해 ERK, JNK, p38의 인산화를 유의하게 증가시켰다. Polycan 처리 결과, 세 가지 MAPK 단백질의 인산화가 용량 의존적으로 효과적으로 감소되었다. Polycan에 의한 MAPK 인산화 억제는 이 화합물이 적어도 부분적으로 MAPK 신호 전달 경로를 억제함으로써 항염증 효과를 발휘함을 시사한다. NF- κ B 신호 전달 경로는 염증성 유전자 발현의 주요 조절자이다. Polycan이 NF- κ B 활성화에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 우리는 NF- κ B의 중요한 소단위체인 p65의 핵 이동과 NF- κ B 억제제인 I κ B α 의 발현을 분석하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과, IFN- γ 와 LPS의 공동 자극은 핵 내 p65 수준을 유의하게 증가시키고 세포질 내 I κ B α 발현을 감소시켰다(Fig. 2C). 그러나 Polycan 처리는 용량 의존적으로 핵 내 p65 이동을 감소시키고 세포질 내 I κ B α 단백질 수준을 회복시켰다. 이러한 결과는 Polycan이 p65의 핵 이동을 방지하고 I κ B α 를 안정화시켜 NF- κ B 활성화를 억제함으로써 염증 반응을 억제함을 시사한다.

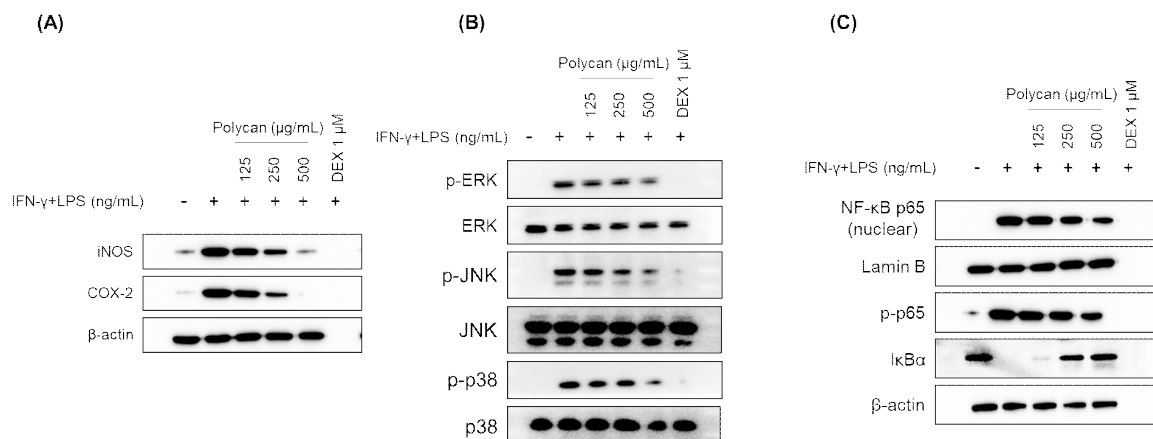


Fig. 2. The effect of Polycan on the IFN- γ and LPS-induced expression of inflammatory protein levels in HT-29 cells. HT-29 cells were seeded in 6-well plate at a density of 5×10^5 cells/well. After 24h, The cells were treated with Polycan and IFN- γ and LPS-induced inflammatory signaling pathway. (A) iNOS and COX-2 level (B) MAPK cellular signaling (C) NF- κ B pathway. The level of expression of proteins level determined by Western blot analysis.

3. Polycan이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

Polycan의 항염증 효과를 추가로 평가하기 위해, 배양 상등액 내 염증성 사이토카인 분비를 ELISA를 사용하여 측정하였다. IFN- γ 와 LPS의 공동 자극은 자극하지 않은 대조군 세포에 비해 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 생성을 유의하게 증가시켰다(Fig. 3). 그러나 Polycan 처리는 세

가지 사이토카인의 분비를 농도 의존적으로 억제하였다. 구체적으로, 125, 250, 500 μ g/ml 농도의 Polycan은 배양 배지 내 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 수준을 감소시켰다. 이러한 결과는 Polycan이 주요 염증성 사이토카인의 분비를 억제함으로써 염증 반응을 효과적으로 완화함을 보여준다.

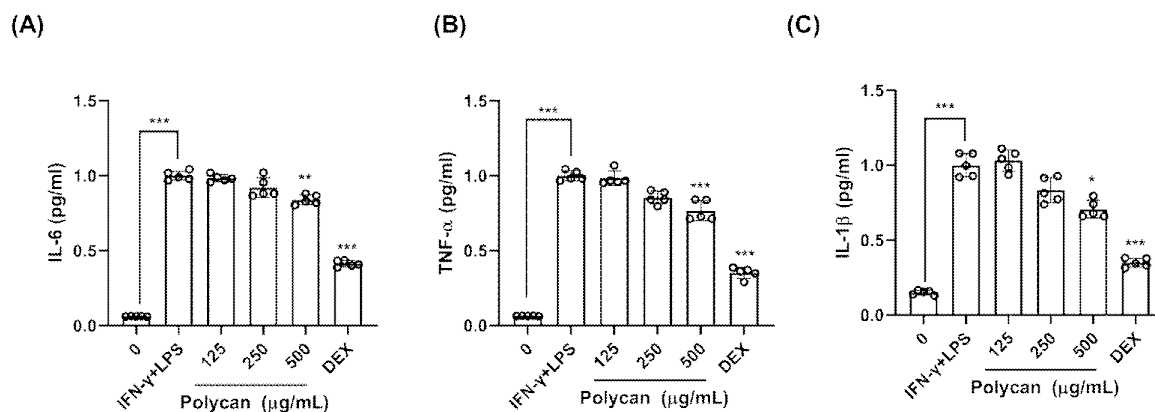


Fig. 3. The effect of Polycan on the IFN- γ and LPS-induced expression of cytokine levels in HT-29 cells. HT-29 cells were seeded in 6-well plate at a density of 5×10^5 cells/well. After 24h, The cells were treated with Polycan

and IFN- γ and LPS-induced inflammatory signaling pathway. (A) IL-6 level (B) TNF- α (C) IL-1 β . The level of expression determined by ELISA. Values are shown as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Experimental data are considered statistically significant at values $***p < 0.001$, significant difference compared to control; $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ in comparison with the 0 or IFN- γ + LPS group.

4. Polycan이 H₂O₂ 유도 MAPK 활성화와 ROS 생성에 미치는 영향

Polycan이 항산화 효과를 발휘하는지 조사하기 위해 HT-29 세포에서 H₂O₂ 유도 산화 스트레스에 대한 영향을 검토하였다. western blot 분석 결과, H₂O₂ (0.5 mM) 처리 시 처리하지 않은 대조군 세포에 비해 MAPK 단백질(ERK, JNK, p38)의 인산화가 유의하게 증가하였다(Fig. 4A). 그러나 Polycan 전처리는 용량 의존적으로 H₂O₂ 유도 MAPK 인산화를 완화시켰다. 구체적으로, 125, 250, 500 μ g/ml 농도의 Polycan은 ERK, JNK, p38의 인산화 수준을 점진적으로 감소시켰으며, 500 μ g/ml에서 가장 뚜렷한 억제 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 Polycan이 산화 스트레스에 의한 MAPK

활성화로부터 세포를 보호함을 시사한다. Polycan의 항산화 특성을 추가로 확인하기 위해 CellROX[®] Red 시약을 사용하여 세포 내 ROS 수준을 측정하였다. Fig. 4B에 나타난 바와 같이, H₂O₂ 처리는 붉은색 형광 강도의 증가로 나타난 세포 내 ROS 생성을 현저히 증가시켰다. 반면, Polycan 전처리는 H₂O₂에 노출된 세포에서 ROS 수준을 용량 의존적으로 감소시켰다. 형광 현미경 이미지와 정량 분석 결과, Polycan은 ROS 축적을 유의하게 감소시켰으며, 최고 농도인 500 μ g/ml에서는 ROS 수준이 거의 기저선에 근접하였다. 이 결과들은 Polycan이 ROS를 제거하고 산화 스트레스 유발 세포 손상을 방지함으로써 강력한 항산화 활성을 지님을 나타낸다.

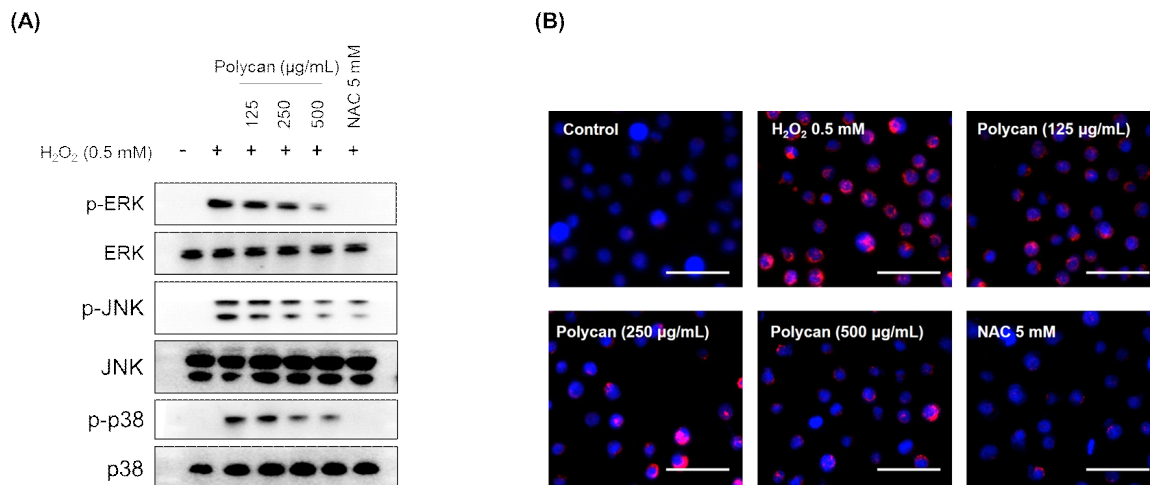


Fig. 4. The effect of Polycan on the H₂O₂-induced expression of MAPK cellular signaling pathways and ROS production in HT-29 cells.

HT-29 cells were seeded in 6-well plate at a density of 5×10^5 cells/well. After 24h, The cells were treated with Polycan and H₂O₂-induced MAPK cellular signaling. (A) MAPK(ERK, JNK, p38) protein level (B) Representative images of intracellular ROS detection with CellROX[®] Red for untreated cells (Control), cells treated with H₂O₂-conditioned medium (H₂O₂) alone or in combination with Polycan (250, 500 μ g/ml), N-acetyl-L-cysteine(NAC, ROS inhibitor). Red = CellROX[®] probe; Blue = DAPI staining of nuclei.

IV. 고찰

대장 상피세포는 단순히 외부 환경으로부터 인체 내부를 보호하는 물리적 장벽에 그치지 않고, 점막 면역계의 핵심적인 조절자 역할을 수행한다. 즉, 장 상피세포는 외부 항원을 인지하고 이를 T 세포에 제시할 수 있으며, 세균 감염과 같은 자극에 반응하여 HLA class II 분자나 intercellular adhesion molecule(ICAM)의 발현을 유도한다. 또한 염증 반응 과정에서 interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-8 등의 다양한 사이토카인을 분비하는 능력을 가지고 있다²⁰. 특히, 사람의 호중구 활성화 펩타이드(neutrophil-activating peptide, NAP-1)로 알려진 IL-8은 강력한 호중구 화학주성 인자이자 활성 인자로 작용한다²¹. IL-8은 단핵구, 섬유아세포, 혈관내피세포, 그리고 장 상피세포 등에서 LPS 또는 IL-1 β , IL-18 등의 염증성 사이토카인 자극에 의해 생성된다. 장 상피세포(Intestinal epithelial cells, IEC)는 이러한 염증 자극에 반응하여 활성화되며, IL-8을 포함한 케모카인을 분비함으로써 호중구를 염증 부위로 유인하는 데 중요한 역할을 한다²¹⁻²³. 최근 연구들은 IL-8이 염증성 장질환(IBD)의 병태생리에서 중심적인 역할을 한다는 증거를 제시하고 있다²⁴. 실제로 IBD 환자의 장 점막에서는 IL-8 합성이 현저히 증가하며, 상피세포가 염증성 사이토카인에 반응하여 COX-2를 발현하는 것으로 보고되었다²⁵. COX-2의 전사 조절에는 MAPK 경로를 비롯한 다양한 상위 신호전달 인자가 관여하며²⁶, 특히 MAPK 및 NF- κ B는 IBD 환자에서 유의하게 활성화되어 있음이 알려져 있다. IL-8과 COX-2의 발현은 모두 MAPK와 NF- κ B의 활성화에 의해 상향 조절되며, 이는 염증 반응의 증폭에 핵심적으로 작용한다²⁵. 한편, 궤양성 대장염(UC)의 정확한 병인은 아직 명확히 규명되지 않았으나, 현재의 치료 전략은 주로 면역계 및 염증매개 인자의 비특이적 억제에 기반하고 있다. 과도하게 활성화된 면역 반응은 점막 조직 손상의 직접적인 원인이 될 수 있으며, 이에 따라 최근에는 MAPK 또는 NF- κ B 억제제를 활용한 UC 치료 접근법이 시도되고 있다²⁷. 한편, 한의학적으로 궤양성 대장염은 복통(腹痛), 장옹(腸癰), 화설(火泄), 설사(泄瀉), 구사(久瀉)의 범주에 속한다고 할 수 있으며, 습열내온(濕熱內蘊), 기체혈어(氣滯血瘀), 비신량허(脾腎兩虛), 음혈휴허(陰血虧虛) 등으로 변증 할 수 있다⁴. 주된 병인은 대장습열(大腸濕熱)과 비신량허(脾腎兩虛)로, 청열이습(熱利濕)을

위주로 건비익신(健脾益腎), 이기화혈(理氣和血), 활혈화어(活血化瘀)를 기본 치법(治法)으로 치료한다²⁸. 이러한 결과들은 장 상피세포의 염증 반응 조절 기전과 주요 신호전달 경로를 표적으로 하는 치료 전략이 염증성 장질환의 병태생리 이해 및 치료제 개발에 중요한 단서를 제공할 수 있음을 시사한다.

HT-29 세포주는 인간 장 상피세포의 형태적 및 생리학적 특성을 잘 모방하기 때문에 장 염증 연구에서 가장 널리 사용되는 in vitro 모델 중 하나이다²⁹. 이 세포주는 실험실 환경에서 염증 반응을 재현할 수 있어, 장 염증의 병태생리적 기전 규명과 항염증 후보물질의 효능 평가를 위한 신뢰성 높은 연구 플랫폼을 제공한다. HT-29 세포는 명확한 상피세포 특성을 지니며, 밀착연접(tight junction) 형성과 장벽 기능을 유지하는 능력을 가지고 있는 특성으로 실제 장 상피의 기능을 모사하는 데 적합하다. 염증 반응은 LPS, TNF- α , 또는 Entamoeba histolytica 감염 등의 다양한 자극을 통해 유도할 수 있으며, 염증 과정에서 장 상피 장벽 기능의 변화를 평가하거나, 장벽 안정성을 강화하는 생리활성물질의 효능을 검증하는 데 유용하다^{8,9}. 높은 재현성과 다양한 자극에 대한 반응성을 바탕으로, HT-29 세포주는 프로바이오틱스, 식물 추출물, 천연물 성분 등의 항염증 활성을 in vitro에서 신속하고 효율적으로 스크리닝하고 그 작용 기전을 규명하는 연구에 폭넓게 활용되고 있다²⁹. 이에 저자는 이미 염증성 장질환에 효능을 보인 Polycan에 대하여 IFN- γ 및 LPS로 자극된 HT-29 세포에서 다중 신호전달 경로의 조절을 통한 항염증 효과를 알아보고자 하였다.

먼저 장 상피세포의 항염증효과를 알아보기 전에 HT-29 세포에서 Polycan에 대한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, MTT 분석 결과, Polycan은 최대 500 μ g/ml 농도에서 HT-29 세포에 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 세포 생존율은 약 100%로 유지되었다(Fig. 1). 이 결과는 이후 항염증 데이터 해석에 있어 중요하며, 관찰된 효과가 비특이적 세포 손상이 아닌 Polycan의 약리학적 활성에 기인함을 확인해 준다.

대식세포(macrophage)는 선천면역계의 주요 구성 요소로서, 병원체 인지 후 염증 반응을 개시하고 조절하는 핵심적인 역할을 담당한다. 특히, IFN- γ 와 LPS는 대식세포를 강력하게 활성화시키는 대표적인 자극 인자로 알려져 있으며, 이들 자극은 다양한 염증매개 분자의 발현을 유도한다³⁰. IFN- γ 는 주로 T 세포와 NK 세포에

의해 분비되며, 대식세포의 활성화를 통해 항원제시능과 미생물 제거 능력을 증진시킨다. 한편, LPS는 그람 음성균의 세포벽 성분으로, 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4(TLR4)를 인식하여 세포 내 신호전달 경로를 활성화한다. IFN- γ 와 LPS의 병합 자극은 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 현저히 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 IFN- γ /LPS로 유도된 활성화 모델이 항염증 소재의 분자적 작용기전을 탐구하고, 염증성 질환 치료제의 전임상 효능을 평가하는 데 매우 유용한 실험적 시스템임을 시사한다³¹⁾.

iNOS는 염증 반응 중 질소 산화물(NO)을 생성하여 병원체 제거에 기여하지만, iNOS의 높은 발현은 NO 생성으로 이어지고, 이는 산화적 손상과 조직 염증을 유발할 수 있다. COX-2는 아라키돈산 대사경로를 통해 prostaglandin을 생성함으로써 염증 반응, 혈관 확장, 통증 및 부종을 매개한다. 본 연구의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 확인해 본 결과, Polycan은 IFN- γ 및 LPS로 자극된 HT-29 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2A). 이러한 억제는 Polycan이 염증 매개체의 생성을 효과적으로 감소시켜 염증 반응을 완화할 수 있음을 시사한다. 한편, iNOS와 COX-2의 발현은 MAPK 및 NF- κ B 경로의 활성화에 의해 조절된다. NF- κ B와 MAPK는 LPS에 의해 촉진되는 염증 반응에서 중요한 세포 신호 전달 경로로, STAT3와 NF- κ B는 LPS 자극에 대한 면역 반응에서 중심 전사 인자이다. NF- κ B와 MAPK는 염증 신호 전달 과정에서 조절자 역할을 하며 다양한 염증성 매개체와 사이토카인의 전사에 관여한다²²⁾. LPS 자극은 ERK, JNK, p38 MAPK를 포함한 MAPK 신호 경로를 활성화시켜 염증 관련 유전자의 전사를 유도한다. 동시에, NF- κ B는 세포질 내 억제 단백질 I κ B의 인산화 및 분해 후 핵으로 이동하여, iNOS와 COX-2를 비롯한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6 등)의 전사 활성화를 촉진한다. 이러한 MAPK-NF- κ B 축은 대식세포 염증 반응의 핵심 조절 메커니즘으로 작용하며, 다양한 염증성 질환의 병태생리와 밀접하게 연관되어 있다⁸⁻¹⁰⁾.

본 연구에서도 Polycan은 ERK, JNK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 유의하게 억제하여 MAPK 매개 염증 신호 전달을 방해함을 나타냈다(Fig. 2B). 또한 Polycan이 핵 내 p65 이동을 억제하고 I κ B α 단백질 수준을 증가시켜, I κ B α 를 안정화하고 p65의 핵 진입을 차단함으로써 NF- κ B 활성화를 방지함을 보여주었다

(Fig. 2C). Polycan은 TLR2/4를 통해 어댑터 단백질(MyD88/TRIF)을 활성화하고, 이는 TAK1을 매개로 IKK복합체(NF- κ B 경로)와 p38 MAPK 및 JNK 경로를 동시에 활성화 하여 두 신호전달 경로의 상호적인 활성화를 유도함을 시사한다.

염증성 사이토카인 중 TNF- α 는 염증성 사이토카인을 상향 조절하고, 혈관신생을 촉진하며, NF- κ B를 활성화하고, NO 생성을 자극하며, IL-1 β 는 TNF- α 와 함께 발열을 유발하고, 염증 반응과 관련된 응고를 유발하며, 자가분비 기전을 통해 심각한 염증 연쇄 반응을 유도한다. IL-6는 만성 염증과 관련이 있으며 급성기 반응물인 B 세포 및 T 림프구의 유도제 역할을 하는데²⁹⁾, 사이토카인의 억제는 심각하고 잠재적으로 치명적인 염증 연쇄 반응을 약화시킬 수 있다. 본 연구에서도 IFN- γ 및 LPS로 자극된 HT-29 세포에서 Polycan은 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현을 하향 조절하여 염증성 사이토카인을 유의미하게 감소시켰다(Fig. 3).

한편, 과산화수소(H₂O₂)는 염증 반응 과정에서 생성되는 대표적인 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 중 하나로, 하이드록실 라디칼($\cdot$ OH)이나 차아염소산(HOCl)과 같은 고반응성 산화제의 전구체로 작용한다³²⁾. 이러한 ROS는 세포 내 단백질, 지질, 핵산과 반응하여 산화적 손상을 유발하고, 결과적으로 장 상피세포의 구조적 및 기능적 손상을 초래한다. 특히 궤양성 대장염(UC) 환자의 장 조직에서는 활성화된 식세포(phagocyte)가 관찰되며, 이들은 장 상피세포 인근에서 H₂O₂를 분비함으로써 산화 스트레스를 유발한다^{32,33)}. 이러한 ROS의 축적은 염증 반응을 증폭시키고, 세포 손상과 세포사멸(apoptosis)을 매개 하는 연쇄 반응을 일으켜 장 상피 장벽의 파괴를 가속화 한다. 만성적인 염증 반응은 장 조직의 항상성을 저해하며, 장기간 지속될 경우 대장암(colorectal cancer) 또는 췌장암(pancreatic cancer)과 같은 염증 관련 암 발생의 중요한 위험 요인으로 작용하는 것으로 보고되고 있다³⁴⁾.

염증 반응과 산화 스트레스 사이의 이러한 상호작용은 여러 신호전달 경로를 통해 매개되며, 그중에서도 MAPK/AP-1/NF- κ B 경로가 대표적으로 알려져 있다. H₂O₂는 MAPK 경로의 ERK, JNK, p38의 인산화를 유도하여 세포 내 염증 신호를 활성화시키고, 전사인자 AP-1과 NF- κ B를 조절함으로써 염증성 유전자 발현을 촉진한다. 특히 NF- κ B는 염증, 세포생존, 세포사멸 등 다양한 생물학적 반응에 관여하는 핵심 전사인자로서,

활성산소에 의해 직접적으로 조절된다. 낮은 농도의 ROS는 NF- κ B 활성을 증가시켜 염증 유전자의 발현을 촉진하는 반면, 높은 농도의 ROS는 세포 독성을 유발하여 오히려 NF- κ B 활성을 억제하는 양면적 효과를 보인다. 본 연구에서도 Polycan이 H₂O₂로 자극된 HT-29 세포에서 MAPK 신호전달 경로(ERK, JNK, p38)의 인산화를 유의하게 억제하였으며, ROS 생성량 또한 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 Polycan이 산화 스트레스에 의해 유도되는 염증 신호전달 경로를 차단함으로써, 장 상피세포의 손상과 염증 반응을 완화하는 잠재적 보호 효과를 가짐을 시사한다.

본 연구에서는 기능성 다당체 (β -1,3/1,6-glucan)를 세포 외로 분비하는 효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양물인 Polycan이 인간 장 상피세포 HT-29에서 강력한 항염증 및 항산화 효과를 나타냄을 확인하였다. Polycan은 IFN- γ 및 LPS로 자극된 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고, ERK, JNK, p38을 포함한 MAPK 경로의 인산화를 감소시켰으며, NF- κ B의 핵 이동을 차단하고 I κ B α 를 안정화함으로써 염증성 유전자 발현을 효과적으로 억제하였다. 또한 Polycan은 IL-6, TNF- α , IL-1 β 등 주요 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켰고, H₂O₂로 유도된 산화 스트레스 환경에서 MAPK 인산화 및 ROS 생성을 유의하게 완화시켰다. 이러한 결과는 Polycan이 염증 및 산화적 손상으로부터 장 상피세포를 보호하는 생리활성 물질로 작용할 수 있음을 시사한다. 특히 Polycan의 작용은 MAPK 및 NF- κ B 신호전달 경로의 하향조절을 통해 이루어지며, 이는 장내 염증성 질환의 병태생리 조절 및 예방을 위한 유망한 기전적 기반을 제공한다. 따라서 본 연구는 Polycan이 장 염증 관련 질환의 치료제 또는 기능성 소재로 개발될 수 있는 과학적 근거를 제시한 점에서 의미가 크다.

그러나 본 연구에는 몇 가지 한계점이 존재한다. 본 연구는 *in vitro* 세포 모델(HT-29)에서 수행되었기 때문에, 실제 장내 환경에서의 면역세포, 미생물, 점막 장벽 간의 복잡한 상호작용을 완전히 반영하지 못하므로, 향후에는 동물모델 또는 임상연구를 통한 *in vivo* 검증이 필요하다. 또한, 본 연구는 MAPK 및 NF- κ B 경로에 초점을 맞추었으나, Polycan의 항산화 효과에는 Nrf2/HO-1, JAK/STAT 등 다른 신호전달 경로가 관여할 가능성이 있으며, 이러한 경로에 대한 추가적 분자 수준 연구가 요구된다. 아울러, Polycan이 세포 내에서 직접

작용하는 분자 결합 표적과 상호작용 기전은 아직 명확히 규명되지 않았으며 이에 향후에는 전사체(transcriptomic) 또는 단백질체(proteomic) 기반 분석을 통해 보다 정밀한 작용기전을 규명할 필요가 있다. 따라서 본 연구는 Polycan의 장 상피세포 수준에서의 항염증 및 항산화 작용을 최초로 체계적으로 규명하였다는 점에서 학문적 의미가 있으나, 향후 연구에서는 이를 전임상 및 임상 단계로 확장하여 생리학적 유효성과 안전성을 입증함으로써 기능성 소재 및 치료제로서의 가능성을 구체화할 필요가 있다.

V. 결론

본 연구에서는 IFN- γ 및 LPS로 자극된 장 상피 세포주인 HT-29 세포에서 Polycan의 항염증 효과에 대한 기전을 살펴본 결과로서, Polycan은 세포 독성을 유발하지 않으면서 염증 매개체(iNOS 및 COX-2)를 효과적으로 억제하고 주요 염증 신호 전달 경로(MAPK 및 NF- κ B)를 차단하였다. 이러한 결과는 장 상피에 영향을 미치는 염증성 질환의 치료제 또는 보조식품 으로서 잠재적으로 활용될 수 있음을 뒷받침한다.

감사의 글

본 연구는 재단법인 경남항노화연구원의“천연물 활용 건강기능성 소재개발 지원사업”으로 수행된 연구결과입니다.

References

1. Matsuoka, K.; Kobayashi, T.; Ueno, F.; Matsui, T.; Hirai, F.; Inoue, N.; Kato, J.; Kobayashi, K.; Kobayashi, K.; Koganei, K.; et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 2018;53:305–353.
2. Xavier RJ. Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007;448:427–434.
3. Jess, T.; Rungoe, C.; Peyrin-Biroulet, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of populationbased cohort studies.



- Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2012;10:639–645.
4. Jiang YQ. Integrative Medicine Subcommittee to study. Beijing: Beijing Publishing House; 1997, p 277–87.
5. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. Dietary CLA and n-3 PUFA in inflammatory bowel disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care.(2010; 13: 569–573.
6. Adesokan A, Neild P. Attitudes and expectations of gastroenterology outpatients about the importance of diet and possible relationship to their symptoms. Frontline Gastroenterol. 2012;3:278–282.
7. Fung QM, Szilagyi A. Carbohydrate elimination or adaptation diet for symptoms of intestinal discomfort in IBD: rationales for“Gibsons’ Conundrum”. Int J Inflamm .2012;2012:493717.
8. Ghadimi D, Folster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, Schrezenmeir J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. Immunobiology. 2008;213:677–692.
9. Petersen ER, Claesson MH, Schmidt EG, Jensen SS, Ravn P, Olsen J, Ouwehand AC, Kristensen NN. Consumption of probiotics increases the effect of regulatory T cells in transfer colitis. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(1):131–142.
10. Zhang H, Shi Y, Lin C, He C, Wang S, Li Q, Sun Y, Li M. Overcoming cancer risk in inflammatory bowel disease: new insights into preventive strategies and pathogenesis mechanisms including interactions of immune cells, cancer signaling pathways, and gut microbiota. Front Immunol. 2024;14:1338918.
11. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. Signal Transduct Target Ther. 2024;9(1):53.
12. Shahgoli et al. Shahgoli VK, Noorolyai S, Ahmadpour Youshanlui M, Saeidi H, Nasiri H, Mansoori B, Holmskov U, Baradaran B. Inflammatory bowel disease, colitis, and cancer: unmasking the chronic inflammation link. Int J Colorectal Dis. 2024;39:173.
13. Seo HP, Kim JM, Shin HD, Kim TK, Chang HJ, Park BR, Lee JW. Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullulans* SM-2001. Kor J BiotechnolBioeng. 2002; 17:376–380.
14. Yoon HS, Kim JW, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Lee HS, Kwon YS, Ku SK. Immunomodulatory effects of *Aureobasidium pullulans* SM-2001 exopolymers on the cyclophosphamide-treated mice. J Microbiol Biotechnol. 2010;20(2):438445.
15. Jung MY, Kim JW, Kim JY, Choi SH, Ku SK. Polycan, a β -glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. Exp Ther Med. 2016;12(3):1251–1262.
16. Do HJ, Kim YS, Oh TW. Effect of Polycan, a β -Glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, on Inflammatory Response and Intestinal Barrier Function in DSS-Induced Ulcerative Colitis. Int. J. Mol. Sci. 2023;24(19):14773.
17. Lim JM, Lee YJ, Cho HR, Park DC, Jung GW, Ku SK, Choi JS. Extracellular polysaccharides purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan) inhibit dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. Int J Mol Med. 2018;41(3):1245–1264.
18. Kim YS, Lim JM, Shin JS, Kim HJ, Park KI, Oh TW. Extracellular polysaccharides purified (Polycan) from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 improves pathophysiology of dystrophin-deficient mdx mice. Mol Cell Toxicol. 2022;18:285–297.
19. Ko GP, Kim YS, Kim JM. Dietary Polycan, a β -glucan originating from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, attenuates high-fat-diet-induced intestinal barrier damage in obese mice by modulating gut microbiota dysbiosis. Food Sci. Nutr. 2024;12(8):5824–5835.
20. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn’s disease. J Pathol. 2003;199:28–35.
21. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H,

- Hess M, Laissue JA, et al. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol.* 1994;144:997-1007.
22. Gewirtz AT, Simon Jr. PO, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD, et al. Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest.* 2001;107:99-109.
23. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology.* 1997;113:1214-1223.
24. Katsuta T, Lim C, Shimoda K, Shibuta K, Mitra P, Banner BF, Mori M, Barnard GF. Interleukin-8 and SDF1- α mRNA expression in colonic biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:3157-3164.
25. Shiby Paul, Agnes M. Rimando, Hong jin Lee, Yan Ji, Bandaru S. Reddy, and Nanjoo Suh. Antiinflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 MAPK pathway in colon cancer cells. *Cancer Prev Res.* 2009;2(7):650-657.
26. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26:3279-3290.
27. Van Den Blink B, Ten Hove T, Van Den Brink GR, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJ. From extracellular to intracellular targets, inhibiting MAP kinases in treatment of Crohn's disease. *Ann NY Acad Sci.* 2002;973:349-358.
28. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in 'non specific' inflammatory bowel disease. *N Engl Med.* 1982;306:775-780.
29. Lee YJ, Pan YN, Park SH, Sin SI, Park KY. Anticancer Effects in HT-29 Cells and Anti-Inflammatory Effects on Mouse Splenocytes of Broccoli Cultivated with Deep Sea Water Minerals in Organic Farming. *Appl Sci.* 2023;13(17):9684.
30. Kang SS, Jeon JH, Woo SJ, Yang JS, Kim JW, Yun CH, Han SH. IFN- γ renders human intestinal epithelial cells responsive to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* by down-regulation of DMBT1. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35(4):345-354.
31. Rohith HS, Prakash MH. The Combined Effect of Potential Probiotic *Bacillus licheniformis* MCC 2514 and *Bifidobacterium breve* NCIM 5671 Towards Anti-inflammatory Activity on HT-29 Cell Line. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2023;15:351-362.
32. Barrett: Barrett KE, McCole DF. Hydrogen peroxide scavenger, catalase, alleviates ion transport dysfunction in murine colitis. *Clin Exp Pharmacol.* 2016;43:1097-1106.
33. Muro: Muro P, Zhang L, Li S, Zhao Z, Jin T, Mao F, Mao Z. The emerging role of oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Front Endocrinol.* 2024;15: 1390351.
34. Bystrom LM, Guzman ML, Rivella S. Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells? *Antioxid Redox Signal. Antioxid Redox Siganl.* 2014;20(12):1917-1924.