산수유의 Prebiotics 특성 및 Lipopolysaccharide로 유도된 장 상피세포 보호 효과

이호림¹ · 이 옥² · 박선경¹ · 강진용¹ · 김종민¹ · 김길한¹ · 김민지¹
문종현¹ · 정혜린¹ · 박효원² · 허호진¹

¹경상국립대학교 응용생명과학부(BK21), 농업생명과학연구원

²국립산림과학원 산림소득자원연구과

Corni fructus Extracts of Prebiotics Property and Cell Protective Effect on LPS-Induced Human Colon Epithelial Cell

Hyo Lim Lee¹, Uk Lee², Seon Kyeong Park¹, Jin Yong Kang¹, Jong Min Kim¹, Gil Han Kim¹,
Min Ji Kim¹, Jong Hyun Moon¹, Hye Rin Jeong¹, Hyo Won Park², and Ho Jin Heo¹

¹Division of Applied Life Science (BK21), Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University

²Division of Special-purpose Trees, National Institute of Forest Science

ABSTRACT To evaluate the prebiotic effect of water extract from *Corni fructus* (WCF), we measured the growth curves, titratable acidity and short-chain fatty acid (SCFAs) contents in *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) and *Lactobacillus brevis* strains. After 24 h incubation, growth curve of the WCF-treated *L. reuteri* strain showed a relatively higher viable count and titratable acidity, as compared to the fructo-oligosaccharide (FOS)-treated strain (positive control). Considering that SCFA contents are useful metabolites for gut health, our results revealed higher contents of acetate in the WCF-treated strain (1,235.98±62.71 mM) than the FOS-treated strain (763.57±5.38 mM) of *L. reuteri*. DCF-DA [intracellular reactive oxygen species (ROS) content] and MTT assays [cell viability on lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity] were applied in human colon epithelial HT-29 cells to determine the cell protective effect of the WCF. The results indicate that WCF effectively decreases the intracellular ROS contents and increases cell viability in LPS-induced HT-29 cells. To confirm the inhibitory effect of WCF on LPS-induced inflammation, we examined the expression levels of toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor-κB (NF-κB). Regulation of the LPS-induced inflammatory reaction by WCF was achieved by decreasing the expressions of TLR4 and NF-κB in HT-29 cells. Exposure to WCF also inhibited the cell permeability injury, as determined by increased expressions of tight junction proteins (occludin and claudin-1) in LPS-induced HT-29 cells, indicating the anti-inflammatory effect of WCF. Finally, morroniside and loganin, the major compound iridoid glycosides in the WCF, were analyzed by high-performance liquid chromatography. Taken together, our results indicate that *Corni fructus* is a potentially good natural source as a prebiotic to prevent intestinal dysfunction.

Key words: *Corni fructus*, HT-29 cell, prebiotics, lipopolysaccharide, iridoid glycosides

서 론

장은 소화계를 이루는 주요한 장기 중 하나로 소장과 대장으로 구분되며, 인체 내에서 장관은 음식물의 소화, 흡수뿐

만 아니라 숙주의 대사 및 면역 체계와 균형을 유지한다. 사람의 몸 중 특히 대장에는 가장 많은 미생물이 모여 살고 있으며 태어날 때부터 유전, 식습관, 생활습관 등에 따라 개인별로 다양한 군집 구조를 형성하게 된다. 장내 미생물 군총은 인간의 건강과 질병에 중요한 역할을 수행하고 있는데, 건강한 미생물 군총을 유지하는 것이 설사와 염증성 장 질환 등으로부터 위를 보호할 수 있다는 연구 결과가 증가하고 있다(DuPont와 DuPont, 2011).

병원균에 의한 장 상피 밀착 접합 장벽의 손상은 장 투과성을 증가시켜 염증성 장 질환 및 괴사성 장염 등의 발병 원인이 된다(He 등, 2019). 그람 음성균의 외막에서 주로 발견되는 lipopolysaccharides(LPS)는 장 및 전신 염증반응을 유

Received 3 Feb 2021; Revised 17 Mar 2021; Accepted 17 Mar 2021
Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongnam 52828, Korea, E-mail: hjher@gnu.ac.kr

Author information: Hyo Lim Lee (Graduate student), Seon Kyeong Park (Researcher), Jin Yong Kang (Researcher), Jong Min Kim (Researcher), Gil Han Kim (Graduate student), Min Ji Kim (Graduate student), Jong Hyun Moon (Graduate student), Hye Rin Jeong (Graduate student), Ho Jin Heo (Professor)

도하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. LPS에 대한 주요 수용체 역할을 하는 toll-like receptors(TLR)는 점막 면역의 중요한 구성 요소로 알려져 있으며, myeloid differentiation primary response 88, interleukin(IL)-1 수용체 관련 kinase 및 tumor necrosis factor(TNF) receptor associated factor 6 등을 통해 신호를 전달하여 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 경로를 활성화함으로써 염증성 사이토카인의 분비를 증가시켜 장 및 전신 염증을 일으킬 수 있다(Lu 등, 2008).

사람의 식습관은 장에서의 미생물 구성과 기능을 형성하는 데 중요한 역할을 하며, 소화된 영양소와 장내 미생물간의 복잡한 상호작용은 숙주 건강에 유익하거나 해로운 영향을 미친다고 알려져 있다(Zmora 등, 2019). 장 상피세포의 완전성을 유지하고 장내 미생물 군집을 변화시켜 위장질환을 예방하기 위한 식이요법으로 prebiotics, probiotics 및 synbiotics가 산업적으로 활용되고 있다. *Lactobacillus* sp.와 같은 장내 유익균은 이러한 다양한 신호 경로를 통해 발생하는 NF- κ B 경로 및 염증성 cytokine 생성을 감소시킴으로써 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Yousefi 등, 2019). 그중 *Lactobacillus reuteri*는 위장관에 존재하는 혐기성 유산균의 일종으로 유기산과 항균 화합물로 알려진 reuterin을 생성하여 장내 병원균의 증식을 억제한다고 알려져 있다(Spinler 등, 2008). 또한, *L. reuteri*는 장 신경계에 관여하여 신경조절 기능을 한다고 알려져 있으며 중추신경계에 작용하는 억제성 신경전달물질인 γ -aminobutyric acid(GABA) 등을 생산할 수 있다(Pallin 등, 2016). 더불어 비만, 신경 발달 장애, 스트레스 및 장 염증과 같은 질병을 약화시키는 것으로 보고되고 있다(Mu 등, 2018). *Lactobacillus brevis*는 GABA를 생산해낸다고 알려진 그람 양성 유산균으로 인간의 장, 질 및 대변에서 발견된다. *L. brevis*는 마우스에서 염증을 조절하여 대장염을 완화하고(Jang 등, 2013), 항비만(Kim 등, 2015b) 및 항당뇨(Abdelazez 등, 2018) 효과가 있다고 알려져 있다. Prebiotics는 소화 불가능한 식품 성분이자 대장에 서식하는 장내 유익균의 성장 또는 활동을 자극하는 물질로서 대표적으로 galacto-oligosaccharide(GOS), fructo-oligosaccharide(FOS), xylo-oligosaccharide(XOS), inulin 등이 있으며 특정 과일, 채소를 포함한 많은 고섬유질 식품에서 자연적으로 발견된다. 그중 FOS는 식품에서 가장 광범위하게 발견되는 prebiotics로 사용된다(Chow, 2002). 이러한 prebiotics는 장내 균총을 개선하여 인체 건강을 증진시킬 수 있는 것으로 알려져 있으나 이에 관한 연구는 섬유질 식품에 국한되어 있다. 따라서 본 연구에서는 섬유질뿐만 아니라 생리활성 물질들을 포함하는 식품의 prebiotics 소재로의 작용 가능성을 확인하고자 한다.

산수유 열매(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽활엽소교목인 산수유나무의 성숙한 과실을

건조한 것으로 약용 소재로 사용하고 있다. 산수유의 주요 성분은 loganin을 비롯하여 morroniside 등과 같은 iridoid glycosides계 화합물들과 sweroside 등의 secoiridoid glycoside계 화합물, cornuside와 같은 bisiridoid glycoside 그리고 triterpenoid, tannin 계열 화합물들이 보고되어 있으며(Xu 등, 2017), 그중에서 특히 morroniside와 loganin은 대한민국 약전에서 산수유의 지표성분으로 설정되어 있다. 산수유의 생리활성으로는 항염증, 혈관 이완, 골다공증 억제, 항산화, 항당뇨, 항비만, 인지기능 개선 등의 효과가 보고되어 있다(Kwon 등, 2009). 하지만 산수유의 장 건강과 관련한 prebiotics로서의 활성 연구는 상대적으로 미비한 실정이므로 산수유 물 추출물에서 *L. reuteri*와 *L. brevis*에 대한 영향과 장관세포인 HT-29 세포의 보호 효과를 확인함으로써 잠재적인 prebiotics 효과를 연구하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Man-Rogosa-Sharp(MRS) broth 및 without glucose MRS는 Difo(Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. 프락토올리고당(fructo-oligosaccharide)은 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하였으며, morroniside, loganin는 AVENTION(Incheon, Korea)에서 HPLC 등급을 구매하였다. 염화나트륨(sodium chloride)은 Biopure(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, agar는 YAKURI(Kyoto, Japan)에서 구입하였다. LPS(*Escherichia coli* O55:B5), Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 medium, 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), bovine serum albumin, hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid(HEPES), 수산화나트륨(sodium hydroxide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), sodium azide를 포함한 모든 제품은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 산수유 열매는 전남 구례군에서 재배되어 50°C에서 열풍 건조된 제품을 두손애약초(Yeongcheon, Korea)에서 2020년 7월 22일에 구입하여 분말화하여 사용하였다. 산수유 20 g과 증류수 1 L를 혼합하여 40°C에서 2시간 동안 환류 냉각장치를 이용하여 추출하였고, 이 추출물을 No. 2 여과지(Whatman Inc., Kent, UK)를 통해 여과하였다. 추출된 산수유 물 추출물(water extract from *Corni fructus*, WCF)은 진공농축 후 동결건조하였다. 산수유 물 추출물의 수율은 49.61%로 나타났으며 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Lactobacillus 균주 배양조건

실험에 사용된 유산균 균주는 성인의 대변 유래의 *L. reuteri* KCTC 3594와 *L. brevis* KCTC 3498을 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 균주는 MRS-agar에 도말하여 생성된 단일 콜로니를 MRS 액체 배지에 접종하였고 37°C에서 48시간 배양하였다.

생균수 측정

균주 배양액은 12,000×g에서 원심분리하고, pellet을 0.85% NaCl에 재현탁시켰다. 현탁된 균주는 microplate reader(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 660 nm에서 0.2의 흡광도 값을 나타내도록 희석하여 실험에 사용하였다. *L. reuteri*와 *L. brevis*의 성장곡선은 각각 glucose가 없는 MRS 액체 배지에서 pH 6.3~6.5로 조정된 뒤 산수유 물 추출물(WCF)과 FOS를 양성대조군으로 사용하였고 배지에 각각 2%(w/v)를 첨가하였다. 그런 다음 대수기 성장기의 균주를 접종(1%, v/v)하여 37°C에서 48시간 동안 배양하여 측정하였다. 이후 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 되는 배양액을 0.85% NaCl 용액으로 연속적으로 희석하여 평판배지에 0.1 mL를 분주하여 도말하였다. 그 후 혐기조건에서 최적온도로 배양하고 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다.

적정산도 측정

*L. reuteri*와 *L. brevis*의 적정산도를 측정하기 위하여 앞서 언급한 방법으로 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 동안 배양한 배양액 1 mL에 1%(v/v) 페놀프탈레인(phenolphthalein) 시약을 지시약으로 하여 10초간 지속되는 연한 홍색을 나타낼 때까지 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 적정에 소비되는 0.1 N 수산화나트륨 용액의 소모량을 젖산 함량(%)으로 환산하여 아래 식으로 계산하였다.

$$\text{산도(젖산\%)} = \frac{a \times f \times 0.009}{\text{시료의 양(mL)}} \times 100$$

a: 0.1 N 수산화나트륨액의 소비량(mL)

f: 0.1 N 수산화나트륨액의 역가

0.009: 유산계수(0.1 N 수산화나트륨 1 mL)

단쇄지방산 측정

*L. reuteri*와 *L. brevis*에서 단쇄지방산을 측정하기 위한 GC/MS 분석의 전처리과정은 다음과 같다. 내부표준물질(2-ethyl butyric acid)을 함유하는 *L. reuteri*와 *L. brevis* 상등액에 propanol/pyridine 혼합 용매(v/v=3:2)와 propyl chloroformate를 첨가하였다. 반응 혼합물에 hexane을 첨가하고 13,000×g에서 15분간 원심분리하여 hexane층을 분석에 사용하였다. 기기분석은 gas chromatograph(GC 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였고, col-

umn은 DB-5ms(thickness: 0.25 µm, length: 30 m, diameter: 0.25 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. Carrier gas로 He를 사용하였고, column oven temperature 40°C, injection temperature 260°C, total flow 54.0 mL/min, total program time 16.50 min으로 설정하여 분석하였다.

세포 배양

인체에서 기원한, 성숙한 장 상피세포의 특성이 있는 HT-29 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용했으며, 25 mM 탄산수소나트륨, 25 mM HEPES, 10% 소태아혈청, 50 units/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였다.

장 상피세포 보호 효과 및 산화 스트레스 함량 측정

LPS로 유도된 HT-29 세포사멸에 대한 WCF의 세포 생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다(van Meerloo 등, 2011). 세포를 96-well plate에 1×10⁴/well로 분주하여 하루 동안 성장시켰다. 5, 10, 20 µg/mL 농도의 WCF와 50 µg/mL 농도의 FOS를 처리한 뒤 30분 후에 LPS를 증류수에 희석하여 1 µg/mL 농도로 만든 다음 24시간 동안 세포를 전처리하였다. 배양 후 MTT stock 용액(5 mg/mL) 10 µL를 처리하여 37°C에서 3시간 동안 배양시키고 배양물을 제거한 뒤 DMSO를 첨가하여 반응을 종결시켜 570 nm(determination wave)와 690 nm(reference wave)에서 microplate reader(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.)로 측정하였다.

세포 내 활성산소 함량은 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 방법에 의하여 측정하였다(Karlsson 등, 2010). Black 96-well plate에 전처리된 세포는 50 µM DCF-DA 용액을 혼합하여 37°C에서 50분 동안 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 PBS 100 µL를 첨가한 다음 fluorescence microplate reader(Infinite 200, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 들뜸 파장(excitation filter, 485 nm) 및 방출 파장(emission filter, 535 nm)에서 형광강도를 측정하였다.

Western blotting

NF-κB 신호 경로와 밀착연접 단백질을 측정하기 위하여 western blotting을 수행하였다. HT-29 세포를 6-well plate에서 2×10⁵/well의 수로 배양하여 LPS와 샘플을 각각 처리하여 배양한 후 단백질을 추출하기 위해 lysis buffer(ProtinEx™ Animal cell/tissue, GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 각 well에 100 µL씩 첨가하여 lysis한 후 얼음에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 13,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액으로 동량의 단백질로 정량한 다음 loading buffer(5×)와 혼합하여 샘플링하였고 -20°C

에 보관하여 실험에 사용하였다. 샘플을 95°C에서 5분간 반응시켜 전처리한 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 전기영동 하여 단백질을 분리하였다. 이후 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane(Millipore, Burlington, MA, USA)에 이동시켰다. 다른 단백질의 혼입을 막기 위해 membrane을 5%(w/v) skim milk(Sigma-Aldrich Co.) 용액에서 1시간 동안 blocking 과정을 거쳤고 β -actin, TLR4, NF- κ B, occludin, claudin-1의 1차 항체를 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)로부터 구입하여 각각 희석한 후 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 0.1%(v/v) Tween 20이 포함된 tris-buffered saline 용액에서 3회 세척한 후 상온에서 2차 항체와 반응시켰다. 밴드는 iBright CL1000 imager(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 감지하였고 발현 밀도는 이미지 감지 소프트웨어(image J software, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계산하였다.

생리활성 물질 분석

WCF의 주요 생리활성 물질은 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC, Ultramate 3000 series, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 시료는 50%(v/v) 메탄올에 5 mg/mL 농도로 용해한 후 0.45 μ m filter를 이용해 여과하여 분석에 사용하였다. 컬럼은 C₁₈ column(100×2.1 mm, 3.5 μ m, Agilent)을 이용하였고, 이동 용매는 0.1% formic acid가 함유된 증류수(A)와 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile(B)의 조성비를 10%(0~8 min), 10~40%(8~25 min), 40~60%(25~35 min), 60~100%(35~45 min)로 총 45분간 분석하였다. 시료의 주입량은 20 μ L, 이동상의 유속은 1 mL/min이며 UV 검출 장치의 파장은 diodearray detector(DAD)로 254 nm에서 분석하였다. 검출파장에 대한 UV spectrum은 분석 파장을 저장하고 표준물질의 파장과 비교하여 유사성을 판단하였다. 검출된 생리활성 물질의 정량분석을 위해 표준물질을 50, 100, 200, 500 μ g/mL의 농도로 희석하여 시료와 같은 방법으로 분석하였고 크로마토그램에서 얻은 peak의 농도별 면적에 대해 검량곡선을 작성하여 검량선 대비 농도를 산출하였다.

통계처리

실험 데이터는 반복 실험을 통해 나타난 값을 SAS software(version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용한 일원배치 분산분석(one way analysis of variance)을 통해 통계처리 하였으며, Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 *P*-value는 5% 수준 내에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

생균수 및 적정산도 측정

WCF가 유익균(*L. reuteri* 및 *L. brevis*) 증식에 도움을 줄 수 있는지 확인하기 위하여 생균수 및 적정산도를 측정하였다. *L. reuteri*와 *L. brevis*를 48시간 동안 배양한 후 생균수와 적정산도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. WCF가 첨가된 배지에서 자란 유산균은 대조군(control)과 양성대조군(FOS)보다 높은 생균수를 나타냈다(Fig. 1A, 1B). WCF가 첨가된 배지에서 *L. reuteri*는 배양 12시간 후에 양성대조군 처리 군주(3.6×10^8 CFU/mL)보다 유의적으로 더 높은 생존수(11.8×10^8 CFU/mL)를 보였으며, *L. brevis*는 배양 24시간 후에 FOS 처리 군주(1.3×10^8 CFU/mL)보다 유의적으로 더 높은 생존수(7.8×10^8 CFU/mL)를 보였다. *L. reuteri*는 *L. brevis*보다 짧은 배양시간 안에 급속히 성장하는 추세를 보였다. Niu 등(2020)에 따르면 산수유에서 추출한 iridoid 배당체, 사포닌, 타닌, 알코올 추출물 4가지의 생리활성을 분석한 결과, 4가지 추출물 모두 제2형 당뇨가 유발된 마우스의 장내 미생물에서의 *Lactobacillus* 속과 *Clostridium* 속을 증가시켰으므로 마우스의 미생물학적 균형을 향상시킨 것으로 보고하였다. 이를 토대로 WCF에 존재하는 생리활성 성분이 유산균 증식에 도움을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

유산균은 주요 발효 산물로 젖산, 아세트산, 구연산 등과 같은 유기산을 생산하며(Nuryana 등, 2019), 발효 중 생성되는 유기산은 장내 산도를 증가시켰으므로 장내 환경을 유지한다. 본 실험에서 적정산도는 두 유산균 사이의 값이 다소 차이가 있지만, 8시간 이후 산도가 증가하였고 12시간 이후로는 증가 양상이 둔화하였다. 양성대조군은 배양 24시간 이후로 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않은 반면, WCF 처리 시 *L. reuteri*는 1.125, *L. brevis*는 0.477로 배양 24시간에 가장 높은 산도를 보여주었다(Fig. 1C, 1D). 이러한 결과는 WCF가 *L. reuteri*와 *L. brevis*의 생육과 생육조건에 긍정적인 영향을 유도하고 유기산을 생성하는 데 도움을 준 것으로 판단되며, 이는 prebiotics로서 산업화 가능성이 있다고 사료된다.

단쇄지방산 측정

단쇄지방산은 탄소수가 6개 미만인 짧은 사슬의 지방산으로 장내 세균이식이섬유를 분해, 발효하여 만들어 내는 대사산물이다. 대표적인 단쇄지방산으로는 아세트산, 프로피온산, 부티르산이 있으며 전체 단쇄지방산의 95% 이상을 구성한다고 알려져 있다(Canfora 등, 2015). 단쇄지방산은 위장관에서 여러 가지 역할을 하는데 미생물 균형과 면역계 사이를 연결하는 매개 역할을 한다고 보고되고 있다. 더불어 장 장벽 무결성을 유지하고 장내 pH의 감소를 통해 위장의 생리적 항상성을 간접적으로 유지하는데, 이는 산에 민감한 병원성 세균의 성장을 억제하는 것에서 기인하는 것으로 알

Fig. 1. Effect of water extracts from *Corni fructus* (WCF) on viable cell count (A), (B) and titratable acidity measurement (C), (D) in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus brevis* strains. The results were shown with mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $P<0.05$, and different small letters at each incubation time represented a statistical difference.

Table 1. Short chain fatty acid contents by *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus brevis* strain after 48 h incubation (Unit: mM)

		Control	2% FOS ¹⁾	2% WCF ²⁾
<i>L. reuteri</i>	Acetic acid	379.62±100.05 ^c	763.57±6.38 ^b	1,235.98±62.71 ^a
	Propionic acid	—	—	1.01±0.09 ^a
<i>L. brevis</i>	Acetic acid	665.00±45.38 ^a	624.28±38.40 ^a	683.16±85.01 ^a

¹⁾FOS: fructo-oligosaccharide.

²⁾WCF: water extracts from *Corni fructus*.

The results were shown with mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $P<0.05$, and different small letters represented a statistical difference.

려져 있다(Gill 등, 2021).

배양 48시간 단쇄지방산 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 단쇄지방산 표준용액과의 retention time 비교 및 library search를 통해 단쇄지방산을 검출하고 정량하였다(Fig. 2). *L. reuteri*에서 아세트산 함량은 대조군 379.62±100.05 mM, 양성대조군 763.57±6.38 mM, WCF 1,235.98±62.71 mM로 WCF가 처리된 배양액에서 가장 높은 함량을 보여주었고, 프로피온산은 WCF가 처리된 배양액에서만 검출(1.01±0.09 mM)되었다. *L. brevis* 배양액에서는 아세트산이 검출되었으며, 대조군 665.00±45.38 mM, 양성대조군 624.28±38.40 mM, WCF 683.16±85.01 mM

로 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. Xie 등(2020)에 따르면 *L. reuteri*를 투여한 마우스의 대변에서 아세트산의 수준은 상당히 증가했지만, 프로피온산과 부티르산은 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 이를 보아 *L. reuteri*가 아세트산을 주요 물질로 생산하는 것으로 추측된다.

아세트산 생성 경로는 많은 박테리아 그룹에 널리 분포하고 있지만, 프로피온산 및 부티르산은 상대적으로 소수의 박테리아가 지배적으로 생산한다(Li 등, 2020). 아세트산은 장에서 가장 풍부한 단쇄지방산으로, 결장에서 대부분의 혐기성 세균은 아세트산을 형성한다. 아세트산과 프로피온산은 모두 순환계에 흡수되어 결장으로부터 다양한 조직에 영

Fig. 2. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) chromatograms for short chain fatty acids analysis. Standard mixtures (acetic acid, propionic acid, and butyric acid) (A), *Lactobacillus reuteri* with water extract from *Corni fructus* (WCF) (B), and *Lactobacillus brevis* (C) with WCF.

향을 미치며, 아세트산은 결장 혈류와 산소 흡수를 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Rivière 등, 2016). 또한, 아세트산은 근육과 뇌 조직의 에너지원으로 사용되며 회장 운동성을 증가시키고 항염증 효과가 있다고 알려져 있다(Li 등, 2020). 또한 아세트산과 프로피온산은 마우스의 결장과 장 세포(Caco-2 및 T84 cells)에서 transepithelial electrical resistance 수치를 용량 의존적으로 증가시키며, 세포 간 수송의 마커인 만니톨의 마우스 맹장 내강에서 장관막 혈액으로의 침투를 감소시켜줌으로써 장 상피 장벽 기능을 증가시킨다고 보고하였다(Suzuki 등, 2008). 이러한 결과를 바탕으로 볼 때 WCF는 *L. reuteri*의 아세트산 및 프로피온산 생성을 증가시킴으로써 장 세포의 성장과 분화를 위한 대사

산물로 사용될 수 있는 가능성이 있으며, 이를 토대로 장 건강에도 도움을 줄 수 있을 것으로 추론된다.

장 상피세포 보호 효과 및 산화적 스트레스 함량 측정

LPS로 유도된 장관세포의 손상은 장 염증을 유발할 수 있으며 FOS와 같은 prebiotics에 의한 장관세포 보호 효과가 보고되고 있다(Kim 등, 2015a). MTT assay는 살아있는 세포에 MTT를 처리하게 되면 MTT가 미토콘드리아에 있는 reductase에 의해 환원되어 formazan이 형성되는 원리를 이용한 방법이다. WCF가 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정 한 결과는 Fig. 3A에 나타내었다. 대조군(100.00%)

Fig. 3. Effect of water extract from *Corni fructus* (WCF) on cell viability (A) and intracellular reactive oxygen species production (B) in LPS-induced HT-29 cells. The results were shown with mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $P<0.05$, and different small letters represented a statistical difference.

과 비교했을 때 LPS 처리군은 82.54%로 세포독성으로 인해 비교적 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 반면 WCF를 각각 5, 10, 20 µg/mL 농도로 처리했을 때, 106.22, 116.17, 130.07%로 양성대조군(93.46%)보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다.

DCF-DA assay는 DCF-DA 시약이 세포 내로 들어가면 oxygen radical에 의해 산화되어 DCF로 탈 아세틸화되면서 형광을 발생하는 물질로 전환되는데, 이를 측정함으로써 활성산소 생성 정도를 파악할 수 있다. WCF가 LPS로 유도된 산화적 스트레스에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 3B에 나타났다. 대조군(100.00%)과 비교했을 때 LPS 처리군은 116.43%로 세포 내 활성산소가 증가한 것을 볼 수 있었으며, 양성대조군은 112.69%로 다소 감소하는 경향을 보였으나 LPS 처리군과 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 WCF가 처리된 세포에서는 각각 110.19, 108.80, 101.88%의 산화스트레스 발생 수준을 보였고 LPS 처리군과 비교하여 WCF가 세포 내 활성산소 함량을 유의적

으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

Yuan 등(2020)의 연구 결과는 산수유의 주요 생리활성 물질인 morroniside와 loganin이 장 세포(HIEC-6 및 HCT-116 cells)에서 LPS로 유도된 세포독성에 대한 세포 보호 효과 및 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , interferon- γ)의 mRNA 수준을 하향 조절시켜 준다고 보고하였다. 또한, WCF가 LPS 처리된 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 산화질소와 prostaglandin E2로 유도되는 세포 손상을 억제하였다(Chu 등, 2009). 산수유 에탄올 추출물은 LPS로 인한 대식세포(RAW 264.7 cells)의 산화적 스트레스를 감소시켜 주었다(Hwang 등, 2016). 이러한 결과를 바탕으로 WCF에서도 HT-29 세포 보호 효과 및 산화스트레스 억제 효과가 나타난 것으로 판단된다.

NF- κ B 신호 경로 확인

TLRs는 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하고 이러한 병원균들에 대항하여 염증반응 및 선천성 면역반응을 유도한다고 알려져 있다(Takeda 등, 2003). 그중 TLR4는 LPS 수용체이며 세포를 자극하여 NF- κ B를 활성화하고, TNF- α , IL-1, monocyte chemotactic protein-1 등의 염증 매개 물질의 생산을 유도한다(Baeuerle과 Henkel, 1994). NF- κ B는 염증 발생 과정에 중요한 신호전달 물질로 LPS에 의해 활성화되어 핵 내의 target gene에 결합하고 염증성 cytokine을 분비하게 된다. LPS로 유도된 HT-29 세포에서의 염증반응 기작을 확인하기 위하여 LPS receptor로 알려진 TLR4와 염증반응을 조절하는 단백질인 NF- κ B의 발현 정도를 측정하였다. LPS 처리 세포는 대조군 대비 TLR4와 NF- κ B 발현량이 증가한 결과를 나타내었다(Fig. 4). 그와 반대로 WCF를 농도별로 처리한 세포에서는 TLR4 및 NF- κ B의 발현이 유의적으로 감소하였으며, 대조군과는 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

LPS는 화학 구조적으로 크게 O-항원(O-antigen), 중심 올리고당(core-oligosaccharide), 그리고 지질 A(lipid A) 부분으로 구성되며, 지질 A 부분은 cluster of differentiation 14, lymphocyte antigen 96 protein 등과 같은 결합 단백질과의 상호작용을 통해 자극을 발생시키고 염증 신호를 보내게 된다. 다양한 원인에 의해 장내 LPS 자극이 발생하면 전신 염증과 패혈증이 유발되는 것으로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면 이러한 염증 과정에 관여하는 많은 유전자를 조절하는 핵심 전사인자인 NF- κ B가 장 상피세포에서 장 상피의 무결성 및 면역 항상성 유지에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(Pasparakis, 2008). 또한, NF- κ B는 감염에 대한 면역반응을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 전사인자로, 대장염을 비롯한 염증성 장 질환의 발병기전 중 장내 세균의 LPS에 대한 TLR4의 과반응으로 인한 면역반응 이상이 보고되었다(Testro와 Visvanathan, 2009). 그러므로 본 연구 결과에서 나타난 WCF의 TLR4 및 NF- κ B 발현 억제 효과는 LPS로 인해 발생하는 염증반응을 억제하는 데

Fig. 4. Effect of water extract from *Corni fructus* (WCF) on NF-κB pathway in LPS-induced HT-29 cells. Band images (A), the expression levels of TLR4 (B) and NF-κB (C). The results were shown with mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $P<0.05$, and different small letters represented a statistical difference.

도움을 줄 것으로 생각된다. 하지만 WCF의 염증성 장 질환에 대한 항염증 기전을 증명하기 위해서는 동물모델을 활용한 IκB kinase alpha, NF-κB inhibitor alpha, TNF-α 및 IL-1β 등의 염증반응과 관련된 인자를 추가 검증할 필요가 있다고 판단된다.

밀착연접 단백질 변화 측정

장내 세균 전위(bacterial translocation)는 장 상피세포의 투과성(permeability)에 의존적인데, 장 상피세포의 투과성에 영향을 주는 것이 세포의 사이에 존재하는 밀착연접

(tight junction)이다. 세포 간 접합은 상피 조직뿐만 아니라 내피세포의 발달과 기능에 중요하다(Matter와 Balda, 2003). 밀착연접은 인접하는 표피 세포 사이를 서로 연결 및 접합하여 전해질과 수분의 이동을 조절할 뿐만 아니라 세포 내 신호를 전달하고 세포분열을 조절하는 등 다양한 기능을 한다(Anderson과 Van Itallie, 2009). 이는 claudin과 occludin 단백질이 사슬 형태로 배열되어 두 세포 사이를 밀봉함으로써 연결된다. 하지만 병원성 세균이 상피세포와 상호작용을 하면서 밀착연접을 손상하게 되면 비정상적인 전해질 및 수분 이동, 조직 염증 등을 일으켜 위장질환을 일으키고(Edelblum과 Turner, 2009), LPS가 세포 내 메커니즘을 통해 장 투과성을 증가시킨다는 연구 결과가 보고되고 있다(Guo 등, 2013).

HT-29 세포에 LPS를 단독처리했을 때와 WCF와 병행 처리했을 때 밀착연접 단백질인 occludin과 claudin-1의 발현 정도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5A, 5B에 나타난 바와 같이 WCF를 처리한 세포는 LPS 처리 세포에 비해 occludin의 발현 정도가 증가하였으며 대조군과 유의적인 결과를 나타내었다. 반면 양성대조군 FOS를 처리한 세포에서는 LPS 단독처리군과 비교하여 occludin의 발현에 영향을 미치지 못하였다. Claudin-1의 발현량을 측정한 결과는 Fig. 5A와 5C에 나타내었다. LPS를 처리한 세포와 양성대조군, WCF 5, 10 μg/mL 농도에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 20 μg/mL 농도에서는 대조군과 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 밀착연접은 장 내장에 있는 세균이 점막층을 투과하여 상피세포로 이동되는 것을 막아주는 역할을 한다. 자극이나 손상으로 인해 장내 세포의 밀착연접이 느슨해지면 병원균, 독소, 항원 등과 같은 유해인자들이 장 상피에 과량 노출되고 면역시스템의 혼란과 염증반응이 유도되어 장 질환이 유발된다(Lee, 2015). 이러한 결과들을 종합해볼 때, LPS로 유도된 밀착연접 단백질의 감소를 WCF가 상향 조절시킴으로써 유해인자들의 장 상피세포의 투과성을 감소시켜 장 관련 질환을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

생리활성 물질 분석

장 건강을 증진시키고 유익균의 성장을 도모함으로써 prebiotics로서의 활성을 가지는 것으로 판단되는 WCF의 생리활성 물질을 분석하기 위해 고성능 액체크로마토그래피를 통한 분석을 진행하였다(Fig. 6). HPLC 분석 결과 254 nm 파장에서 두 가지의 주요 peak를 확인할 수 있었다. 첫 번째로 8.017분에서 생성된 peak는 표준물질인 morroniside의 retention time(Fig. 6A)과 UV-VIS spectrum을 비교했을 때 상동성(similarity)이 0.998로 morroniside임을 확인하였다(Fig. 6A, 6C). 두 번째로 13.887분에 나타난 peak는 표준물질의 retention time과 UV-VIS spectrum을 비교했을 때 상동성이 0.999로 일치해 loganin으로 확인되었다(Fig. 6B, 6C). WCF에 함유된 생리활성 물질인 mor-

Fig. 5. Effect of water extract from *Corni fructus* (WCF) on tight junction proteins in LPS-induced HT-29 cells. Band images (A), the expression levels of occludin (B) and claudin-1 (C). The results were shown with mean±SD (n=3). Data were statistically considered at $P < 0.05$, and different small letters represented a statistical difference.

roniside와 loganin을 정량하기 위해 표준물질로 검량곡선 (morrisonide, $y = 0.3473x + 1.0111$, $R^2 = 0.9997$; loganin, $y = 0.2384x + 0.2951$, $R^2 = 1$)을 그렸고, 표준물질의 검량선 대비 morrisonide와 loganin의 함량은 각각 31.12 ± 1.74 µg/mg of dried weight, 22.81 ± 1.69 µg/mg of dried weight로 정량되었다.

산수유는 oleanolic acid, ursolic acid, morrisonide, loganin, sweroside, cornuside와 같은 유기산, 다당류, 사포닌 및 iridoid로 구성되어 있다. Iridoid는 cyclopenta[c]pyran monoterpenoids 유형으로 일반적으로 식물에서 글

Fig. 6. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of water extract from *Corni fructus* (WCF). The HPLC chromatograms of standard morrisonide (A), loganin (B) and WCF (C) at 254 nm.

리코사이드로 발견되며 대부분 포도당에 결합한다(Villaseñor, 2007). Iridoid의 생리활성에는 염증성 질환 개선, 혈액 순환, 간 기능개선, 항균 활성, 항염증 및 항당뇨 효과를 포함한 여러 생리적 효과가 있다고 알려져 있다(Viljoen 등, 2012). 산수유에서 발견되는 morrisonide와 loganin은 대표적인

iridoid glycoside이다. Morroniside와 loganin은 산화 스트레스를 막아줌으로써 advanced glycation end products에 노출된 마우스의 신장 세포독성에 대한 보호 효과가 보고되었다(Xu 등, 2006). 또한, Yuan 등(2020)의 연구에 따르면 morroniside와 loganin은 dextran sulfate sodium 유도 대장염과 LPS 유도 결장 직장암 세포 염증 모델에서 밀착연접을 증가시키고 전 염증성 cytokine의 발현을 줄여줌으로써 항염증 활성을 가진다는 결과를 보고하였다. 이러한 결과들을 종합했을 때, WCF의 유익균(*L. reuteri*와 *L. brevis*) 생육에 도움을 주는 prebiotics 효과 및 LPS로 손상된 장 상피세포(HT-29)에 대한 보호 효과는 morroniside와 loganin에서 기인한 것으로 판단된다. 하지만 산수유에 미량으로 존재할 수 있는 페놀성 화합물 분석을 위한 적절한 용매를 고려하여 분석을 진행하고 구체적인 물질 동정이 향후 필요하다고 판단된다.

요 약

본 연구에서는 산수유(*Corni fructus*)의 유익균 증식에 대한 prebiotics로서의 활용 가능성과 LPS로 유도되는 세포 독성에 대한 장 상피세포 보호 효과 및 주요 생리활성 물질을 분석하였다. 2% 산수유 물 추출물은 양성대조군인 2% fructo-oligosaccharide보다 *L. reuteri* 및 *L. brevis*의 적정산도 및 생육에 도움을 주었으며 특히 *L. reuteri*의 아세트산 생성을 증가시켰다. 그리고 산수유 물 추출물은 LPS로 유도된 장 상피세포(HT-29 cells) 독성에 대한 보호 효과와 산화적 스트레스를 감소시켜 주었으며, TLR4와 NF- κ B의 발현을 효과적으로 저해하고 밀착연접 단백질의 발현은 증가시켜 주었다. HPLC 분석 결과 산수유 물 추출물의 생리활성 물질은 morroniside와 loganin으로 확인되었다. 결과적으로 산수유는 유익균 증식과 LPS로 유도되는 세포 손상 및 장 질환 예방 소재로서의 활용 가치가 있을 것으로 판단된다. 하지만 산수유에 존재할 수 있는 미량의 페놀성 화합물 동정 및 prebiotics 소재에 대한 평가로서 동물모델 상에서의 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 개인기초연구(2018R1D1A3B07043398)의 지원을 받았으며, 이효림, 박선경, 강진용, 김종민, 김길한, 김민지, 문종현, 정혜린은 Brain Korea(BK) 21 program의 지원을 받아 연구를 수행하였고, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Abdelazez A, Abdelmotaal H, Evivie SE, Melak S, Jia FF, Khoso MH, et al. Screening potential probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* strains in vitro and intervention effect

on type I diabetes in vivo. Biomed Res Int. 2018. Article ID 7356173. <https://doi.org/10.1155/2018/7356173>

Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009. 1: a002584. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu Rev Immunol. 1994. 12:141-179.

Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. Nat Rev Endocrinol. 2015. 11:577-591.

Chow J. Probiotics and prebiotics: A brief overview. J Ren Nutr. 2002. 12:76-86.

Chu Q, Hashimoto K, Satoh K, Wang Q, Sakagami H. Effect of three herbal extracts on NO and PGE₂ production by activated mouse macrophage-like cells. In Vivo. 2009. 23:537-544.

DuPont AW, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011. 8:523-531.

Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. Curr Opin Pharmacol. 2009. 9:715-720.

Gill SK, Rossi M, Bajka B, Whelan K. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021. 18:101-116.

Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability *in vitro* and *in vivo* by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. Am J Pathol. 2013. 182: 375-387.

He C, Deng J, Hu X, Zhou S, Wu J, Xiao D, et al. Vitamin A inhibits the action of LPS on the intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins. Food Funct. 2019. 10: 1235-1242.

Hwang KA, Hwang YJ, Song J. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. BMC Complement Altern Med. 2016. 16:196. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1172-3>

Jang SE, Hyam SR, Han MJ, Kim SY, Lee BG, Kim DH. *Lactobacillus brevis* G-101 ameliorates colitis in mice by inhibiting NF- κ B, MAPK and AKT pathways and by polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages. J Appl Microbiol. 2013. 115:888-896.

Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennsson CI. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?. Biochem J. 2010. 428:183-190.

Kim JK, Shin EC, Park HG. Fructooligosaccharides decreased the ability of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 to adhere to co-cultures of human intestinal cell lines. Appl Biol Chem. 2015a. 58:45-52.

Kim KA, Jeong JJ, Kim DH. *Lactobacillus brevis* OK56 ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice by inhibiting NF- κ B activation and gut microbial LPS production. J Funct Foods. 2015b. 13:183-191.

Kwon SH, Yang HS, Kim JY, Park KW, Shon MY, Kang KS, et al. Biological activities of ethanol extract from *Corni fructus*. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009. 38:287-291.

Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. Intest Res. 2015. 13:11-18.

Li Y, Faden HS, Zhu L. The response of the gut microbiota to dietary changes in the first two years of life. Front Pharmacol. 2020. 11:334. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00334>

- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008. 42:145-151.
- Matter K, Balda MS. Functional analysis of tight junctions. *Methods*. 2003. 30:228-234.
- Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front Microbiol*. 2018. 9:757. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Niu D, An S, Chen X, Bi H, Zhang Q, Wang T, et al. *Corni Fructus* as a natural resource can treat type 2 diabetes by regulating gut microbiota. *Am J Chin Med*. 2020. 48:1385-1407.
- Nuryana I, Andriani A, Lisdiyanti P, Yopi. Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 2019. 251:012054. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/251/1/012054>
- Pallin A, Agback P, Jonsson H, Roos S. Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiol*. 2016. 57:159-171.
- Pasparakis M. IKK/NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells controls immune homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2008. 1:S54-S57.
- Riviere A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front Microbiol*. 2016. 7:979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Spinler JK, Tawechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008. 14:166-171.
- Suzuki T, Yoshida S, Hara H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br J Nutr*. 2008. 100:297-305.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003. 21:335-376.
- Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009. 24:943-954.
- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 2nd ed. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2011. p 237-245.
- Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Curr Med Chem*. 2012. 19:2104-2127.
- Villasenor IM. Bioactivities of iridoids. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2007. 6:307-314.
- Xie R, Jiang P, Lin L, Jiang J, Yu B, Rao J, et al. Oral treatment with *Lactobacillus reuteri* attenuates depressive-like behaviors and serotonin metabolism alterations induced by chronic social defeat stress. *J Psychiatr Res*. 2020. 122:70-78.
- Xu H, Shen J, Liu H, Shi Y, Li L, Wei M. Morroniside and loganin extracted from *Cornus officinalis* have protective effects on rat mesangial cell proliferation exposed to advanced glycation end products by preventing oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006. 84:1267-1273.
- Xu M, Wu HY, Liu H, Gong N, Wang YR, Wang YX. Morroniside, a secoiridoid glycoside from *Cornus officinalis*, attenuates neuropathic pain by activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2017. 174:580-590.
- Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Farrokhi AS, Darabi N. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *J Cell Physiol*. 2019. 234:8008-8018.
- Yuan J, Cheng W, Zhang G, Ma Q, Li X, Zhang B, et al. Protective effects of iridoid glycosides on acute colitis via inhibition of the inflammatory response mediated by the STAT3/NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol*. 2020. 81:106240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106240>
- Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019. 16:35-56.