

한약재 추출물에 의한 *Helicobacter pylori*의 생장 및 Urease 활성 억제

윤양식 · 이성훈 · ¹백남인 · ²김현영 · †박창호
경희대학교 화학공학과, ¹경희대학교 생명과학부, ²(주) 싸이크로젠
(접수 : 2004. 1. 28., 게재승인 : 2004. 6. 14.)

Inhibition of Cell Growth and Urease Activity of *Helicobacter pylori* by Medicinal Plant Extracts

Yang-Shik Yoon, Sung-Hoon Lee, Nam-In Baek¹, Hyun Young Kim², and Chang-Ho Park†
College of Environment and Applied Chemistry, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
¹Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University,
Yongin 449-701, Korea
²Cyclogen Co., Ltd., Seoul 121-839, Korea
(Received : 2004. 1. 28., Accepted : 2004. 6. 14.)

Among 14 medicinal plants selected for the study ethanol (70%) extract of *Coptis japonica* Makino showed the highest anti-microbial activity against *Helicobacter pylori* followed by *Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO, *Caesalpinia sappan* L. and *Schizonepeta tenuifolia* Briq. However, anti-urease activity of methanol (80%) extracts was best for *Forsythiae Fructus* followed by *Caesalpinia sappan* L. and *Schizonepeta tenuifolia* Briq. In the second fractionation using water, ethyl acetate and butanol more than 90% of the anti-urease activity was detected in the ethyl acetate fraction.

Key Words : Urease activity, *Helicobacter pylori*, *Forsythiae Fructus*, ethyl acetate fraction

서 론

최근 우리나라 사람에게 발생하는 암중에서 위암이 차지하는 비율이 20.3%이다(1). 우리나라 사람에게 위암 발생률이 높은 것은 식생활환경 등 여러 요인에 기인하겠으나 위암 원인균인 *Helicobacter pylori*에 의한 감염도 그 중요한 요인 중 하나이다.

*H. pylori*는 위염, 위궤양, 십이지장 궤양 및 위암의 원인균으로 알려져 있다(2, 3). *H. pylori*는 위 점막을 덮고 있는 점액층에서 최초 발견되었고(4), 그람 음성간균으로서 미호기적 조건에서 잘 자라며 최적 성장 온도와 pH는 각각 30-37°C와 7.0-7.4이다(5, 6). *H. pylori*가 다른 세균과 달리 강한 산성 조건인 위장에서 서식할 수 있는 것은 이 균주가 urease라는 효소를 생성하기 때문이다. 이 효소는 위점막의 혈장 삼출액이나 조직액 내에 있는 요소를 분해하여 암모니아와 CO₂를 발생시켜 균체 주위를 알칼리성으로 만들어 위 내부의 강산

을 중화하는 작용이 있다(7, 8).

*H. pylori*에 의한 감염을 치료하는 방법으로는 bismuth 제재, metronidazole, amoxicillin, tetracycline 등을 포함하는 3가지 항균제를 동시에 투여하는 방법이 유효한 것으로 보고되었다(9, 10). 그러나 이러한 치료법은 환자의 순응도를 필요로 하고, 항생제에 대한 내성, 재발 가능성의 내재, 고비용 등의 문제가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에 백리향(11), 중국차(12), Cashew apple(13), 소목과 황련(14) 등 여러 천연물의 *H. pylori*에 대한 항균활성이 연구되었다.

본 연구에서는 한약재의 *H. pylori*에 관한 항균효과를 좀더 포괄적으로 연구하기 위하여 전통 동양약물 데이터베이스(15), 한국의 자원식물에 관한 문헌자료(16) 및 한의사와의 상의를 거쳐 위를 보호하거나 항균효과가 있는 한약재 14종을 선별하여 물 및 유기용매를 사용한 추출물로 항균활성 및 urease 활성 억제 능력을 비교하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

*Helicobacter pylori*는 경상대학교 의과대학에서 분양받은

† Corresponding Author : College of Environment and Applied Chemistry, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
Tel : +82-31-201-2531, Fax : +82-31-202-1946
E-mail : chpark@khu.ac.kr

ATCC 43504를 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 10% horse serum (JRH Bioscience, USA)을 첨가한 brucella broth (Difco, USA)(17)를 이용하였으며, 배지의 조성은 bacto tryptone 10 g, bacto peptamin 10 g, bacto dextrose 1 g, bacto yeast extract 2 g, sodium chloride 5 g, sodium bisulfite 0.1 g으로 구성되어 있다. 배양조건은 37°C, 혼합가스 (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)를 사용하였으며, 회전속도와 온도를 제어하기 위한 방법으로는 anaerobic jar를 shaking incubator (Vision Science, Korea)에 고정하여 회전속도 (180 rpm)를 제어하였다.

균주의 단기보존 및 CFU (colony forming unit) 측정, disc method를 위한 고체배지 또한 brucella agar 배지를 이용하였으며 이때도 역시 10%의 horse serum를 첨가하여 배지를 제조하였고, CO₂ incubator (Sanyo, Japan)에서 CO₂만을 조정하여 10% CO₂ 조건으로 배양하였다.

균주확인

Urea broth test

Urea broth (yeast extract 0.1 mg/ml, monopotassium phosphate 9.1 mg/ml, dipotassium phosphate 9.5 mg/ml, urea 20 mg/ml, phenol red 0.01 mg/ml)를 1 ml씩 Eppendorf-tube에 분주하여 냉장 보관하였고, 이 tube에 *H. pylori*를 접종시켜 색이 붉게 변화하는 것으로 균주를 확인하였다.

Gram stain 염색법

Gram stain 염색법은 4가지 순서로 진행되는데 우선 crystal violet (Becton Dickinson, USA)으로 1분간 염색한 후 gram iodine (Becton Dickinson, USA)으로 1분간 염색한다. ethanol (Becton Dickinson, USA)에 1분간 세척한 후 carbol fuchsin (Becton Dickinson, USA)으로 10분간 염색한다. 모든 과정이 끝난 후 건조하여 광학 현미경 (×1500)으로 morphology를 관찰하여 오염여부를 확인하였다.

Table 1. List of medicinal plants used for the experiments

Botanical name
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
<i>Caesalpinia sappan</i> L.
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> KUDO
<i>Forsythiae</i> Fructus
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.
<i>Coptis japonica</i> Makino
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis
<i>Atractylodis</i> Rhizoma Alba
<i>Atractylodis</i> Rhizoma
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi
<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.
<i>Alpiniae Officinari</i> Rhizoma
<i>Evodiae</i> Fructus

대상 한약재의 선정 및 용매추출

대상 한약재는 주로 전통동양약물 데이터베이스(15)와 한국의 자원식물에 관한 문헌자료(16), 한의사와의 상의 및 예비실험을 거쳐 위를 보호하거나 항균효과가 있는 한약재 14

종을 선별하였다(Table 1). 각 한약재 50 g을 70%의 에탄올 500 ml에 넣고 1시간 동안 교반하여 추출한 후 여과지(Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하였다. 각 추출액은 제균을 위하여 0.2 µm의 syringe filter로 여과하였고, NaOH와 HCl을 사용하여 pH를 7로 보정하였고, 농축액의 최종농도는 10 mg/ml로 하였다.

추출물의 항균활성 검색 (Disc method)

지름 8 mm 크기의 disc를 각각의 lawned plate에 올려놓고 disc 위에 각 한약재의 추출물을 20 µl씩 분주하였다. 모든 plate는 10% CO₂ 조건과 37°C에서 72시간 동안 배양되었으며, 각 disc 주위에 나타난 inhibition zone의 직경을 측정함으로써 항균활성을 검색하였다.

추출물의 Urease 활성억제 효과검색

14종의 한약재에 대하여 urease 활성억제능을 측정하였다. urease 활성억제능은 *H. pylori* bacterial suspension (50 µl)을 urea broth (yeast extract 0.1 mg/ml, monopotassium phosphate 9.1 mg/ml, dipotassium phosphate 9.5 mg/ml, urea 20 mg/ml, phenol red 0.01 mg/ml) 7 ml이 들어있는 cuvette에 넣고 urea의 분해에 따른 phenol red의 color intensity의 변화를 spectrophotometer (Spectronic 20D+, Milton Roy, USA)를 이용하여 560 nm에서 측정하였다. Urease의 작용에 대한 한약재의 억제 효과가 커질수록 요소가 적게 분해되어 pH 증가가 적을 것이며 phenol red는 오렌지색이 유지되어 O.D.가 상대적으로 높은 성질을 이용하였다.

연교 (*Forsythiae Fructus*) 추출물의 분획 실험

*H. pylori*의 urease 활성억제 실험에서 가장 효능이 있는 것으로 판명된 연교(*Forsythiae Fructus*)를 대상으로 메탄올로 1차 추출하고, 물, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 부탄올을 이용한 분획 실험을 수행하였다. 건조된 연교(중국산, 경동시장) 3 kg을 분말로 하여 80% 메탄올 (Ducksan Pharm, Korea) 12 L로 42시간 추출하여 여과(Whatman No.1, Whatman International Ltd., Maidstone, England)한 후 다시 80% 메탄올 9 L로 26시간 2차 추출하였다. 이것을 두 번 여과하여 얻어진 15 L의 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)로 감압농축하여 암갈색의 농축물 1.2 L를 얻었다. 이 농축물 1.2 L에 에틸아세테이트(Ducksan Pharm, Korea) 1.2 L와 증류수 600 ml를 가하여 혼합시킨 후 물 층(fraction)과 에틸아세테이트 층으로 나누었다. 물 층은 다시 부탄올(Ducksan Pharm, Korea) 600 ml를 넣어 혼합하여 물 층과 부탄올 층으로 나누었다. 최종적으로 얻어진 물 층, 에틸아세테이트 증 및 부탄올 층의 양은 각각 1330 ml, 2480 ml 및 1625 ml이었다.

분획물에 대한 *H. pylori*의 urease 활성억제 측정

물, 에틸아세테이트 및 부탄올 층 각각에서 200 ml씩 취하여 감압 농축하고, 동결건조기 (Eyela NE, Japan)를 이용하여 건조하여 물 층에서 11.5 g, 에틸아세테이트 층에서 2.5 g, 부탄올 층에서 4.8 g의 추출물을 얻었다. 이것을 각각 0.1 g

씩 취하여 0.2 ml의 각 해당용매에 용해시키고 그 중에서 건조중량 대비 일정량 (물: 52 μ l, ethyl acetate: 10.5 μ l, butanol: 13.5 μ l)을 취하여 *H. pylori*에 대한 urease 활성억제능을 측정하였다.

결과 및 고찰

추출물의 항균활성 (Disc Method)

한약재 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성을 Disc 방법으로 측정하였다. 14종의 약재추출물 중 백출 (*Atractylodes japonica* Koid)과 양강 (*Alpiniae Officinari* Rhizoma)을 제외한 모든 약재에서 항균활성이 확인되었다. 항균활성을 갖는 약재 중에서 황련 (*Coptis japonica* Makino), 소엽 (*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO), 소목 (*Caesalpinia sappan* L.) 및 형개 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.) 추출물에서 강한 항균활성이 확인되었고, 특히 황련의 항균 활성이 가장 높았다 (Fig. 1). 황련에 함유된 여러 성분 중에서 bacteria, viruses, fungi 등에 대한 항균활성이 증명된 바 있는 berberine이라는 식물성 alkaloid 물질(18)이 황련의 항균활성에 중요한 역할을 한 것으로 보인다. 그러나 황련의 경우 chloroform과 부탄올 용매의 분획에서 각각 강한 항균활성을 나타냄으로서 항균물질이 단일물질이 아님을 시사하는 연구보고도 있다(19). 본 실험에서 한약재 유효성분이 고체배지 상에서 확산에 의해 작용한 것을 고려하면 황련의 *H. pylori*에 대한 항균활성은 매우 강한 것으로 보인다.

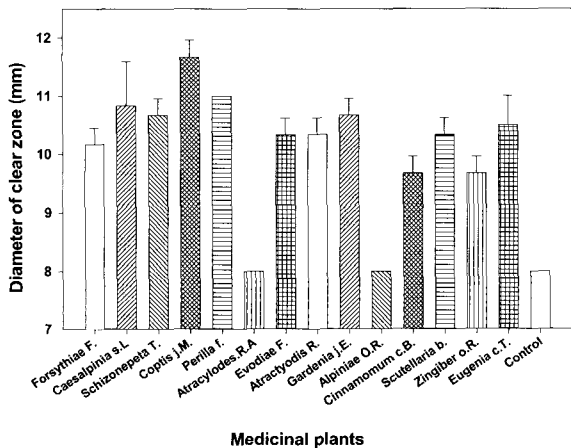


Figure 1. Antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *H. pylori* by disc method. The diameter of the disc was 8 mm.

추출물의 urease 활성억제 효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 주목할 만한 것으로서 다량의 urease (urea aminohydrolase) 생성 능력이 보고되었고 (20, 21) 이 urease는 1분자의 urea에서 2분자의 ammonia와 하나의 수소이온을 생성함으로써(22) pH 상승시켜 위액의 강한 산성조건에서도 *H. pylori*가 살아갈 수 있도록 도와주는 것으로 추정된다(21). 따라서 urease의 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있기 때문

에 본 연구에서 한약재 추출물의 urease활성 억제 효과를 연구하였다.

14가지 한약재 추출액의 최종농도를 10 mg/ml로 맞추고 pH를 7로 보정한 후 urease 활성억제 효과를 spectrophotometer를 사용하여 O.D.로 측정하였다. 연교 (*Forsythiae Fructus*), 소목 (*Caesalpinia sappan* L.), 형개 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.), 황련 (*Coptis japonica* Makino)의 4가지 한약재 추출물에 대하여 O.D.값이 0.4 미만으로서 강한 urease 활성억제 효과가 있었다(Fig. 2, 3). 특히, 연교의 경우 O.D. 값이 0.2 이하로서 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 80% 이상의 urease 활성억제 효과를 나타내었다.

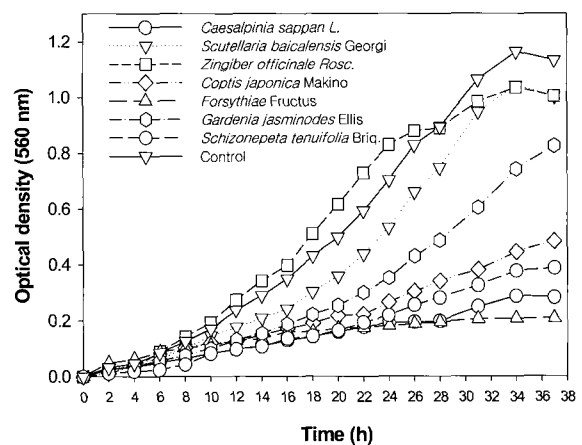


Figure 2. Inhibition of *H. pylori* urease activity by various medicinal plant extracts.

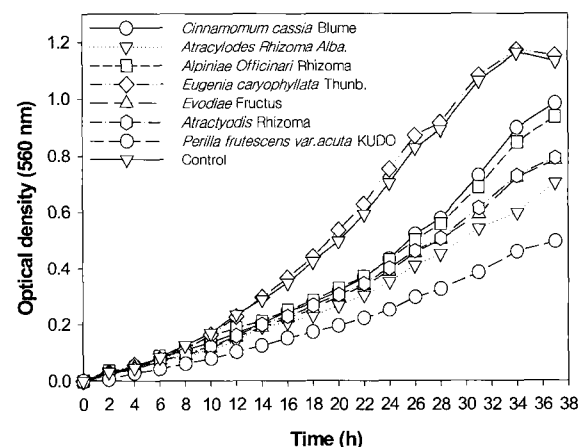


Figure 3. Inhibition of *H. pylori* urease activity by various medicinal plant extracts. Data for *Evodiae Fructus* are very close to those of *Atractylodis Rhizoma*.

Forsythiae Fructus의 분획물에 대한 H. pylori의 urease 활성억제 효과

*H. pylori*의 urease 활성에 대해 가장 강한 억제 능력을 보

인 연교를 대상으로 활성물질을 잘 용해시키는 용매를 알아 낼 목적으로 메탄올로 1차 추출한 물질을 이용하여 극성이 다른 물, 에틸아세테이트, 부탄올의 순서로 분획하여 각 분획물에 대한 urease 억제 활성을 검색하였다. 부탄올과 물 분획에서는 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군(control)과 비교하여 O.D. 값의 차이가 10% 이내로서 urease 활성억제가 관찰되지 않았다. 그러나 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 대조군과 비교하여 O.D. 값이 92% 감소하는 것으로 보아 에틸아세테이트 분획물 중에 urease 활성억제 물질이 포함되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

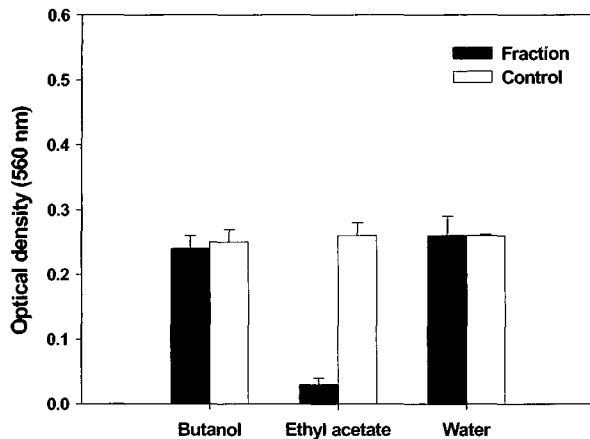


Figure 4. Inhibition of *H. pylori* urease activity by fraction of *Forsythiae Fructus*.

연교에는 일반적으로 triterpenoid, lignan, 배당체 및 flavonoid가 함유되어 있다. Triterpenoid 성분으로는 betulinic acid, 3 β -acetylbetulinic acid, oleanolic acid 등이, lignan 성분으로 arctigenin, matairesinol 등이, phenylpropanoid 배당체로는 suspensaside, β -hydroxyacetoside, acetoside 등이, flavonoid 성분으로는 rutin 등이 보고되었다(15). 이중 squalene을 전구체로 합성되는 triterpenoid 성분과 C₆-C₃ 화합물인 phenylpropanoid 배당체의 성분이 활성을 가지는 유효성분으로 추측되지만 정확한 성분을 알기 위해서는 ethyl acetate 분획으로부터 단일성분을 분리하여 동정하고 활성검색을 진행하여야 할 것이다.

요 약

14종 한약재의 70% 에탄올 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성은 황련 (*Coptis japonica* Makino)이 가장 뛰어났으며, 소엽 (*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO), 소목 (*Caesalpinia sappan* L.) 및 형개 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)의 경우에도 높은 항균활성을 나타내었다. 그러나 *Helicobacter pylori*의 위내 서식을 도와주는 것으로 알려진 urease 활성억제능은 연교 (*Forsythiae Fructus*)의 메탄올(80%) 추출물에서 가장 높았으며, 소목 및 형개의 추출물도 높았다. 특히 연교의 경우 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 80% 이상의 활성이 억제되었다. 연교의 메탄올 추출물을 물, 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 부탄올 순으

로 분획하여 각 분획물에 대한 urease 활성억제능을 검색한 결과 에틸아세테이트 분획에서 92%의 urease 활성이 억제되었다.

감 사

이 연구는 (주)싸이크로젠 및 2004년도 경희대학교 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Korean Central Center Registry, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (2003), Annual Report of the Korean Central Center Registry.
2. McGowan, C. C., T. L. Cover, and M. J. Blaser (1996), *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications, *Gastroenterol.* **110**, 926-938.
3. Buck, G. E. (1990), *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease, *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 1-12.
4. Warren, J. R. and B. J. Marshall (1983), Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet.* **1**, 1273-1275.
5. Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. MacConnell, and W. E. S. Harper (1989), Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 397-405.
6. Goodwin, C. S. and J. A. Armstrong (1990), Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 1-13.
7. Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowaka (1991), Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets, *Infect. Immun.* **59**, 2470-2475.
8. Ferrero, R. L., S. L. Hazell, and A. Lee (1988), The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium, *J. Med. Microbiol.* **27**, 33-40.
9. Rauws, E. A., W. Langenberg, H. J. Houthoff, H. C. Zanen, and G. N. Tytgat (1988), *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral gastritis: a prospective study of its prevalence and the effect of antibacterial and antiulcera treatment, *Gastroenterol.* **94**, 33-40.
10. Hentschel E., G. Brandstatter, B. Dragosics, A. M. Hirschl, H. Nemeck, K. Schutze, M. Taufer, and H. Wurzer (1993), Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer, *N. Engl. J. Med.* **328**, 308-312.
11. Tabak, M., R. Artmom, I. Potasman, and I. Neeman (1996), *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme, *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 667-672.
12. Yee, Y. K., M. W. Koo, and M. L. Szeto (2002), Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 552-555.
13. Kubo, J., J. R. Lee, and I. Kubo (1999), Anti-*Helicobacter pylori* agents from the Cashew Apple, *Agric. Food Chem.* **47**, 533-537.
14. Lee, J. J., S. H. Kim, B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim, and Y. J. Baek (1999), The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 764-770.
15. Seoul National University Natural Products Research Institute

- (1996), TradiMed - *Traditional oriental medicines database* (in Korean), Seoul Systems Co., Ltd.
16. Kim, T. J. (1996), *Korean resource plants*, Seoul National University Press, Seoul, Korea.
 17. Mac Faddin, J. D. (1985), *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. 1, p110-114. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
 18. Hong, S. W., S. H. Kim, J. A. Jeun, S. J. Lee, S. U. Kim, and J. H. Kim (2000), Antimicrobial activity of 9-O-acyl and 9-O-benzoyl-substituted berberrubines, *Planta Medica*. **66**, 361-363.
 19. Lee, J. J., S. H. Kim, B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim, and Y. J. Baek (1999), The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 764-770.
 20. Rhee, K. H., M. J. Cho, J. B. Kim, S. K. Choi, and Y. C. Kim (1988), Bacteriological characteristics of *Campylobacter pylori* (in Korean), *J. Kor. Soc. Microbiol.* **23**, 17-26.
 21. Kim, J. I., S. C. Baik, M. J. Cho, and K. H. Rhee (1991), Purification of the urease of *Helicobacter pylori* and production of monoclonal antibody to the urease of *Helicobacter pylori* (in Korean), *J. Kor. Soc. Microbiol.* **26**, 531-540.
 22. Mobley, H. L. T. and R. P. Hausinger (1989), Microbial urease : Significance, regulation and molecular characterization, *Microbiol. Rev.* **53**, 85-108.