



ORIGINAL ARTICLE

Effect of *Evodiae fructus* Methanol Extract on Virulence-Related Genes' Expression of *Helicobacter pylori*Ji Yeong Yang¹, Pyeongjae Lee², Jong-Bae Kim¹¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, Korea²School of Industrial Bio-pharmaceutical Science, Semyung University, Jecheon, Korea오수유 메탄올 추출물이 *Helicobacter pylori* 병원성 관련 유전자 발현에 미치는 영향양지영¹, 이평재², 김종배¹¹연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²세명대학교 바이오제약산업학부

ARTICLE INFO

Received June 23, 2019
Revised 1st August 1, 2019
Revised 2nd August 8, 2019
Accepted August 10, 2019

Key words

CagA
Evodiae fructus
Helicobacter pylori
Urease
VacA

ABSTRACT

Helicobacter pylori, a gram-negative bacterium, is one of the risk factors that induces gastritis and gastric cancer. Therefore, much attention has been paid to the compounds that inhibit bacterial growth or eradicate bacteria. *Evodiae fructus* (EF), the fruit of *Evodia rutaecarpa*, has been used for treating diarrhea and abdominal pain. EF extract was already found to inhibit the growth of *H. pylori*. However, to the best of our knowledge, the effect of EF on the virulence factors of *H. pylori* has not been reported. In this study, when comparing the minimum inhibitory concentration (MIC) of the different methanol concentration extracts, the 95% methanol extract (EF95) showed the lowest MIC value. EF95 extract suppressed the expressions of *cagA*, *vacA* and *ureB*, but interestingly, it up-regulated the expression of *ureA*. A decrease in production of ammonia in the culture medium and the cell lysates indicated that EF95 inhibited the urease activity in *H. pylori*, which was the result of EF95 inhibiting the *ureB* expression. Although the mechanism by which EF95 extract regulates the virulence factors in *H. pylori* needs further study, EF95 could be used for treatment of gastric troubles induced by *H. pylori*.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

*Helicobacter pylori*는 위에 군집을 형성하는 그람 음성 박테리아로서 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 *H. pylori*를 위암을 발생시키는 1급 발암인자로 보고하고 있으며 위궤양, 위염 등의 위험성을 높이는 것으로 알려져 있다

[1]. *H. pylori*의 병원성 요소로는 cytotoxin-associated gene A (CagA), vacuolating cytotoxin A (VacA), urease, 부착 및 운동 관련 단백질 등이 알려져 있다. CagA는 약 40 kb에 이르는 *cag* pathogenicity island (PAI)에 암호화되어있는 단백질로 동아시아에서 분리되는 거의 대부분의 *H. pylori* strain은 PAI 양성인 것으로 알려져 있다.

*H. pylori*는 CagA를 type IV secretion system (T4SS)를 통해 위 상피세포 안으로 주입하며[2], 상피세포의 Src family kinases는 CagA를 인산화 한다. CagA는 인산화 의존적 혹은 비 의존적으로 상피세포에게 영향을 준다. CagA에 의해 세포내

* Corresponding author: Jong-Bae Kim

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, 1 Yonseidae-gil, Wonju 26493, Korea
E-mail: kimjb70@yonsei.ac.kr* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6502-2281>

NF- κ B가 활성화되면 IL-8과 같은 pro-inflammatory 유전자의 발현이 증가하여 염증이 발생한다. 또한 상피세포들 상호간의 치밀이음(tight junction)과 결합이음(adherens junction)에도 영향을 준다[3, 4]. *H. pylori*는 type V secretion system (T5SS)에 의해 VacA를 세포 밖으로 분비한다. VacA는 상피세포 안으로 들어가서 상피세포 안에 공포(vacuole)를 형성하게 하며 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다[5, 6]. *H. pylori*는 위 안에서 군락을 형성하는데 있어 경쟁 박테리아가 없는 반면에 산성 조건이라는 환경적 스트레스를 극복해야한다. *H. pylori*는 urease의 발현을 강화하여 urea를 암모니아와 이산화탄소로 분해하며 이렇게 생성된 암모니아는 세포안과 주변의 pH를 높여 산성조건을 극복한다[7]. *H. pylori*의 urease는 *H. pylori*가 위에서 생존하여 군집을 형성하게 하고 CagA와 VacA는 위 상피세포에게 독성을 나타내는 주요인자라고 할 수 있다.

오수유(*Evodia fructus*)는 운향과에 속하는 오수유(*Evodia rutaecarpa*)의 열매를 일컫는 생약으로 한방에서는 복통, 설사 및 소화불량에 사용되어 왔다. 오수유는 evodiamine과 rutaecarpine과 같은 indoloquinazoline alkaloids와 evocarpine과 같은 quinolone alkaloids를 주요한 성분으로 함유하고 있으며 항암과 항염증 등 다양한 생리활성이 있다[8-10]. 오수유 추출물이 *H. pylori*에 대한 성장억제 효과가 있으며 bioactivity-guided fraction 방법을 통해 오수유 내의 quinolone alkaloid류가 주요한 성분임이 밝혀졌다(Table 1) [11-13]. 하지만 이는 *H. pylori* 억제 효과가 있는 오수유의 활성 성분을 밝힌 것으로 오수유 추출물이 *H. pylori*의 주요 병원성 인자들의 발현 및 활성에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

본 실험에서 각기 다른 메탄올 농도에서 추출한 오수유 추출물(40, 60, 80, 95%)의 *H. pylori* 성장 억제 효과를 확인한 결과 95% 추출물이 가장 낮은 최소저해농도를 보였다. 이 95% 추출물에 의한 *H. pylori*의 병원성 인자인 CagA, VacA, UreA 및

UreB의 mRNA와 단백질의 발현 변화를 확인하고 *H. pylori*가 분비하는 urease에 의해 생성되는 암모니아의 양을 측정하는 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 오수유는 (주)내몸에당에서 구입하였다. 오수유 100 g을 농도별로 제조된 메탄올 수용액(40, 60, 80, 95% (V/V)) 1.5 L에 넣고 60°C에서 90분 동안 sonication 후에 여과하였다. 이 과정을 3회 반복한 이후에 감압농축과 동결건조로 용매를 제거하였고 이후 -80°C에 보관하였다. 시료는 100 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO, Duchefa, Haarlem, Netherlands)에 녹인 다음 4°C 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

2. *Helicobacter pylori*의 배양

H. pylori 표준균주 ATCC 49503 (CagA+/VacA+)은 미국생물자원센터(American Type Culture Collection, VA, USA)에서 구입하였다. 10%의 bovine serum (BRL Life Technologies, NY, USA)과 항미생물 보충액(Oxoid Limited, Hampshire, UK)이 첨가된 Brucella agar에 세균을 접종한 후 5~10% CO₂와 100% 습도를 유지하고 37°C에서 3일간 배양하였다.

3. 한천희석법(Agar dilution test)

10%의 bovine serum이 첨가된 brucella agar에서 배양한 *H. pylori*를 모아 saline에 부유시킨 후 박테리아 개수를 측정하였다. 10%의 bovine serum과 해당 농도(12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/mL)의 시료가 첨가된 Mueller-Hinton agar에 McFarland 탁도 2 (6×10^8 /mL)의 *H. pylori* 부유액 10 μ L를 분주하고 72시간 동안 배양한 후 성장 정도를 확인하였다[14]. 대조군과 각 실험군에 동일한 최종 용매의 양(%)이 되도록 DMSO를 첨가하였다.

4. 액체배지희석법(Broth dilution test)

*H. pylori*를 10% bovine serum이 첨가된 Mueller-Hinton 액체배지에 부유시킨 후 박테리아 개수를 측정하였다. McFarland 탁도 0.5 (1.5×10^8 /mL)의 *H. pylori* 부유액에 95%메탄올 오수유 추출물을 해당 농도(1.6~100 μ g/mL)를 처리하여 72시간 동안 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. 대조군과 각 실험군에 동일한 최종 용매의 양(%)이 되도록 DMSO를 첨

Table 1. Quinolone alkaloids showing the anti-*Helicobacter pylori* activity

Chemical	Ref.
Evocarpine	[11-13]
Dihydroevocarpine	[11]
1-methyl-2-undecyl-4(1 <i>H</i>)-quinolone	[11]
1-methyl-2-pentadecyl-4(1 <i>H</i>)-quinolone	[11]
1-methyl-2-[(6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i>)-6,9-decadienyl]-4(1 <i>H</i>)-quinolone	[11]
1-methyl-2-[(4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i>)-4,7-tridecadienyl]-4(1 <i>H</i>)-quinolone	[11]
1-methyl-2-[(7 <i>Z</i>)-7-tridecenyl]-4(1 <i>H</i>)-quinolone	[12, 13]

가하였다. 자료는 시료를 처리하지 않은 군에서의 600 nm 흡광도 값에 대비하여 %로 표시하였다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction)

10%의 bovine serum이 첨가된 Muller-Hinton 액체배지에서 배양한 *H. pylori*에 95% 메탄올 오수유 추출물(5, 10, 20 µg/mL)을 처리하고 72시간 동안 배양하였다. *H. pylori*를 원심 분리(3,000 rpm, 10분)로 모은 다음 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. Trizol Reagent™ (Invitrogen, MA, USA)로 total RNA를 추출하였다. RNA의 순도와 농도를 측정 후 cDNA는 2 µg의 total RNA를 대상으로 0.25 µg의 random hexamer와 200 U의 moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (MMLV-RT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 premix (Bio-solution, Seoul, Korea)에 cDNA 2 µL를 넣고 수행하였다. 최종 PCR product는 2% agarose gel에서 전기영동 한 후 UV-transiluminator에서 확인하였다. 본 연구에서 사용한 primer의 염기서열은 기존 논문을 참조하여 제작하였다(Table 2). PCR product의 band intensity는 ImageLab software (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 측정하였고 *H. pylori*의 *efp* (*elongation factor P*) PCR product band intensity에 대한 비율로 정량화 하였다.

6. Western blot

농도별 95% 메탄올 오수유 추출물을 72시간 동안 처리한 *H. pylori*를 원심 분리하여 모은 후 PBS로 2번 세척하였다. 단백질 분해효소 저해제 카테일을 포함하는 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer로 박테리아를 4°C에서 10분간 방치하여 분해한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. Lowry Protein assay (Bio-Rad, CA, USA)로 상층액의 단백질을 정량한 후 SDS-PAGE를 통해 단백질을 분리하여

nitrocellulose막으로 이동시켰다. 5% (W/V) skim milk에 1시간 동안 막을 처리한 후 4°C에서 12시간 1차 항체로 처리하였다. 본 실험에 사용한 *H. pylori*에 대한 총 polyclonal antibody는 Thanos & Maniatis [20]의 방법으로 제작하였다. 이후 적당한 horse radish peroxidase (HRP)-연결 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 화학반응 시키고 band를 확인하였다.

7. 암모니아 생성 측정

농도별 95% 메탄올 오수유 추출물을 72시간 동안 처리한 *H. pylori*를 원심 분리하여 배양액과 세포를 나누었다. 세포는 단백질분해효소 저해제 카테일을 포함하는 RIPA buffer로 4°C에서 10분간 방치하여 분해한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 수거하여 사용하였다. 수거한 상층액은 Lowry Protein assay로, 배양액은 600 nm의 흡광도를 측정하여 각각의 단백질을 정량한 후 시료로 사용하였다. 배양액과 세포에 각각 20% urea를 5 µL 첨가한 후 추가로 37°C에서 10분 동안 배양하였다. 이후 암모니아의 양은 인도페놀법을 기반으로 한 암모니아 측정 키트(Asan pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 표준액의 흡광도를 이용하여 검량선을 작성한 후 시료의 암모니아의 함량을 계산하였다.

8. 통계 분석

실험은 독립적으로 3회 반복하여 그 결과 값은 평균값±표준오차로 나타내었다. 통계적 유의성은 시료 처리를 하지 않은 군과 각각의 시료처리군의 실험값을 one-way ANOVA와 Turkey's multiple comparisons를 통해 확인하였다. *P*값이 0.05보다 작은 실험값을 통계적으로 유의한 것으로 해석하였다.

Table 2. Primer sequences

Gene	Direction	Sequence(5'→ 3')	Size (bp)	Ref.
<i>cagA</i>	F	GTC ATA ATG GCA TAG AAC CTG AA	407	[16]
	R	ATT CCC TAG GGC GTC TAA ATA A		
<i>vacA</i>	F	AAA CGA CAA GAA AGA GAT CAG T	291	[17]
	R	CCA GCA AAA GGC CCA TCA A		
<i>ureA</i>	F	GCC AAT GGT AAA TTA GTT	411	[18]
	R	CTC CTT AAT TGT TTT TAC		
<i>ureB</i>	F	TCT ATC CCT ACC CCA CAA CC	252	[18]
	R	CCA TCC ACG AAC ACA TGG TA		
<i>efp</i>	F	GGC AAT TTG GAT GAG CGA GCT C	559	[19]
	R	CTT CAC CTT TTC AAG ATA CTC		

결 과

1. 95% 메탄올 오수유 추출물의 *H. pylori* 성장 억제 영향

오수유 추출물의 *H. pylori*에 대한 억제 효과는 보고된 적이 있다[11-13]. 오수유에 함유된 성분들중 *H. pylori* 성장 억제 효과가 있다고 알려진 quinolone alkaloids의 경우 10개 이상의 탄소로 구성된 사슬 구조가 있어 극성이 상대적으로 낮은 추출 조건에서 추출 효율이 높을 것으로 예상되나 극성을 높인 추출 조건에서 조제된 추출물에 *H. pylori* 억제 물질이 있을 수도 있어 우선 메탄올 농도를 다르게 하여 오수유를 추출한 후 *H. pylori*에 가장 효과적인 추출물을 선별하였다. 40, 60, 80과 95% 농도의 메탄올 추출물을 대상으로 agar dilution test를 실시하여 각 추출물의 *H. pylori*에 대한 MIC를 측정된 결과 각각 200, 100, 50, 25 µg/mL으로 추출 메탄올 농도를 높일수록 MIC 값이 낮아지는 것을 확인하였다(Table 3, Figure 1A). 95% 메탄올 추출물이 가장 효과가 있었으므로 이를 대상으로 이후 실험을 진행하였다. Mueller-Hinton 액체배지에서 95% 메탄올 추출물의 MIC 측정된 결과 3.1 µg/mL부터 억제 효과가 나타났으며, 50 µg/mL과 100 µg/mL에서 각각 62%, 95%의 성장억제 효과를 보였다(Figure 1B). 95% 메탄올 추출물이 *H. pylori*의 성장을 50% 이하로 저해하는 농도 범위에서 *H. pylori*의 병원성 인자에 미치는 영향을 확인하기 위해 이후 실험을 5, 10, 20 µg/mL 농도에서 진행하였다.

2. 95% 메탄올 오수유 추출물의 *H. pylori* 병원성 관련 유전자 전사 및 단백질량에 미치는 영향

CagA와 VacA는 *H. pylori*의 주요한 병원성 요소이기 때문에 메탄올 추출물이 이들 병원성 요소들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 RT-PCR과 Western blot으로 확인하였다. 추출물을 5, 10, 20 µg/mL 처리할 때 *cagA*와 *vacA*의 mRNA 생성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며(Figure 2), *efp* band intensity로 정량화하여 5, 10, 20 µg/mL 처리군과 무처리군을 비교하였다. *cagA*의 경우 각각 83, 69, 53%로, *vacA*의 경우에는 각각 85, 85, 51% 줄어들어 처리 농도를 높일수록 mRNA 발현이 억

제됨을 확인하였다. 이는 Western blot을 통한 단백질 확인 실험과도 일치한다(Figure 3). *H. pylori*의 urease는 UreA와 UreB의 결합으로 그 활성을 갖는다. 따라서 본 실험에서는 *ureA*와 *ureB*의 mRNA 발현량을 각각 확인하였는데, 추출물을 5, 10, 20 µg/mL 처리할 때 *ureA*의 경우 농도를 높일수록 발현량이 증가하였고 이에 비해 *ureB*의 경우에는 *cagA*와 *vacA*처럼 발현량이 감소하였다(Figure 2). 95% 오수유 추출물 5, 10, 20 µg/mL 처리군은 무처리군 대비 *ureA*의 경우 각각 116, 187, 202%로 증가하였으며 *ureB*의 경우에는 각각 93, 48, 39%로 줄어 들었다. 전사적 조절의 이런 경향은 단백질을 확인하였을 때 도 일치하였다(Figure 3). 95% 메탄올 오수유 추출물은 주요 병원성 인자인 *cagA*, *vacA*, *ureB*의 발현은 억제하나 *ureA*의 발현은 증가 시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

3. 95% 메탄올 오수유 추출물 처리가 *H. pylori*의 암모니아 생성에 미치는 영향

*ureA*와 *ureB*의 발현이 실제 *H. pylori* urease의 활성에는 어

Table 3. Agar dilution test for MIC determination against *H. pylori* (ATCC 49503)

Sample	MIC (µg/mL)
95% MeOH extract	25
80% MeOH extract	50
60% MeOH extract	100
40% MeOH extract	200

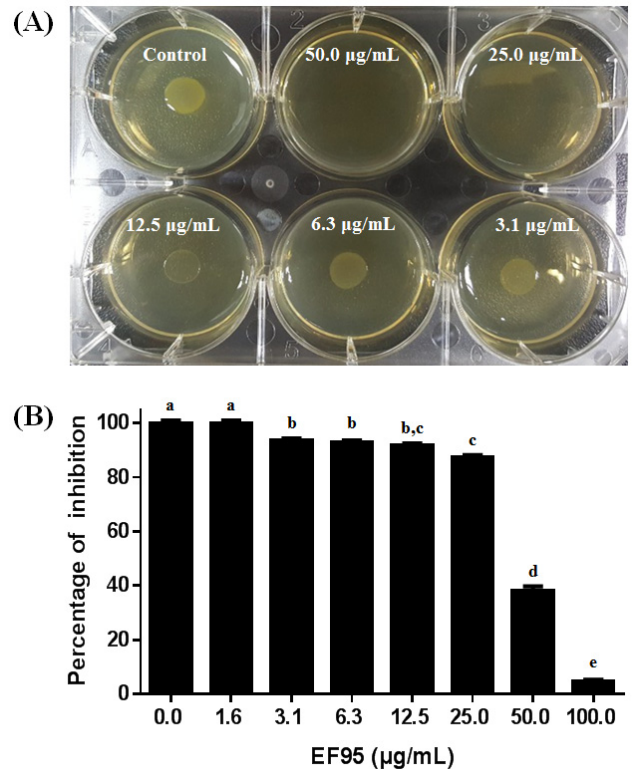


Figure 1. Determination of MIC of 95% MeOH *Evodiae fructus* extract using (A) agar dilution and (B) broth dilution method. Values represent mean±SEM of three independent measurements. Statistical analysis was performed via one-way ANOVA followed by Turkey's test. Means with different letters indicate the statistical difference.

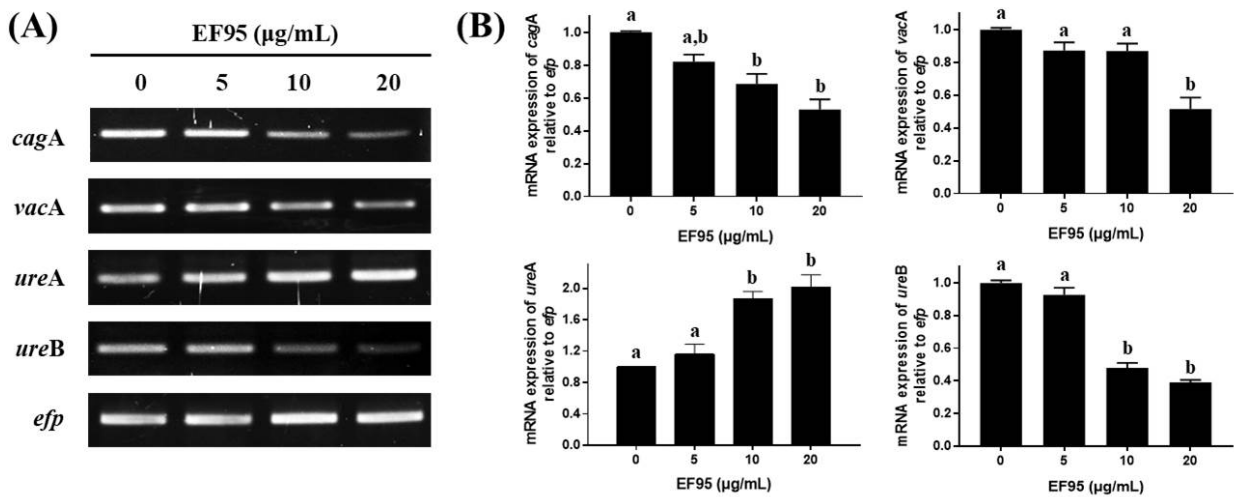


Figure 2. The effect of EF95 (95% MeOH extract of *Evodiae fructus*) on virulence-related gene expression. *H. pylori* was treated with indicated concentrations of EF95 (5, 10, 20 µg/mL) for 24 hrs. (A) RNA was extracted, and RT-PCR was performed to detect mRNA levels of *cagA*, *vacA*, *ureA*, *ureB* and *efp*. (B) Each band intensity is normalized using that of *efp* and was illustrated as a graph. Values represent mean±SEM of three independent measurements. Statistical analysis was performed via one-way ANOVA followed by Turkey's test. Means with different letters indicate the statistical difference.

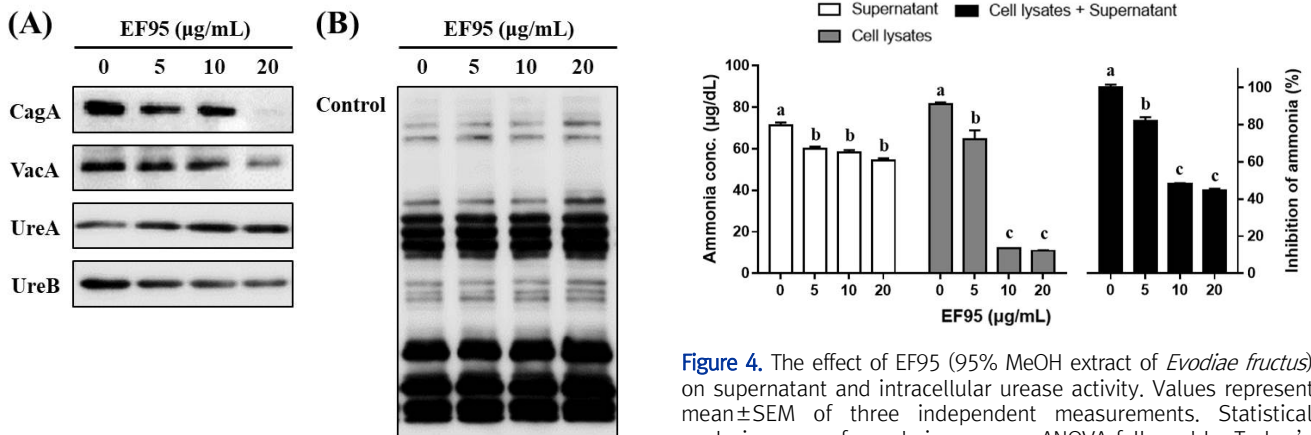


Figure 3. The effect of EF95 (95% MeOH extract of *Evodiae fructus*) on virulence-related protein. *H. pylori* was treated with indicated concentrations of EF95 (5, 10, 20 µg/mL) for 24 hrs. (A) Western blot of bacterial lysate was conducted to detect CagA, VacA, UreA and UreB. (B) Polyclonal anti-*H. pylori* antibody was used as an internal control.

Figure 4. The effect of EF95 (95% MeOH extract of *Evodiae fructus*) on supernatant and intracellular urease activity. Values represent mean±SEM of three independent measurements. Statistical analysis was performed via one-way ANOVA followed by Turkey's test. Means with different letters indicate the statistical difference.

면 영향을 주지는 확인하기 위해 urease의 효소 활성을 통해 생성된 암모니아의 생성량을 측정하였다. 실험은 시료를 *H. pylori*에 농도별로 처리한 다음 배양액과 세포내액 각각에 urea를 처리한 후 생성되는 암모니아 양을 측정하였다. 배양액에서의 암모니아의 양은 5, 10, 20 µg/mL 처리에서 무처리군 대비 각각 84, 82, 76%이었으며, 세포내 암모니아의 양은 각각 79, 15, 13%로 세포내 urease의 활성이 현저히 낮아졌음을 확인하였다. 배양액과 세포내 암모니아 양을 더했을 때 5, 10, 20 µg/mL 처리군은 무처리군 대비 각각 84, 48, 45%를 보였다

(Figure 4). 배양액과 세포내 암모니아의 생성은 *H. pylori*의 urease 활성의 결과로 보이며 이는 오수유 추출물이 *ureB* 발현 억제에 영향을 미친 것으로 예상해 볼 수 있다.

고찰

오수유는 예로부터 복통 등의 소화기관과 관련한 불편함을 해소하는데 사용했던 약물로 오수유에 함유된 quinolone alkaloids의 물질이 *H. pylori*의 성장을 억제한다는 보고는 있었으나 *H. pylori*의 주요한 병원성 인자에 어떤 영향을 주는지에 대해서는 보고가 없었다. 그래서 메탄올의 농도별 추출물의 *H. pylori* MIC를 구해 가장 효과가 뛰어난 추출물을 선택한 후

세균의 성장을 50% 이하로 저해하는 농도 범위에서 *H. pylori*의 주요 병원성 인자인 CagA, VacA, UreA, UreB의 mRNA와 단백질량을 RT-PCR과 Western blot으로 확인하였다. 40, 60, 80, 95% 메탄올 추출물 중에서 95% 메탄올 추출물이 25 µg/mL로 가장 낮은 MIC를 보여 95% 메탄올 추출물을 선택하였다. 오수유에 함유된 성분들 중 quinolone alkaloids가 *H. pylori* 성장을 억제한다고 알려져 있어 메탄올 추출농도를 높일수록 quinolone alkaloids 추출 정도가 증가한 것으로 생각할 수 있다. 95% 메탄올 추출물 5, 10, 20 µg/mL 처리에서 농도를 높일수록 cagA, vacA, ureB의 mRNA 발현량이 줄어들었으며 단백질량에서도 동일하게 확인할 수 있었다. 이는 오수유가 *H. pylori*의 병원성 요소를 줄여 상대적으로 고농도에서 성장 억제 뿐만 아니라 저농도에서 *H. pylori*의 독성을 줄일 수 있다는 것을 보여준다.

본 실험에서 UreA의 발현량은 mRNA와 단백질 수준 모두에서 처리농도를 늘릴수록 증가하였다. Urease를 구성하는 UreA와 UreB의 유전자인 ureA와 ureB는 동일 프로모터에 의해 지배받는 하나의 오페론을 형성하고 있다. 즉 ureA와 ureB는 연결된 하나의 전사체를 구성한다는 의미이며 ureA와 ureB는 같은 전사적 조절을 받기 때문에 발현 증가와 감소가 같은 방향으로 일어나는 것이 자연스럽게 여겨진다. 하지만 본 실험에서는 ureA 발현은 증가하지만 ureB 발현은 감소하였다. 시간상으로 ureA 부분이 먼저 전사가 일어나며 다음에 ureB가 전사되기 때문에 이런 결과는 추출물의 처리로 ureAB를 지배하는 전사인자가 활성화되어 ureA를 포함하는 전사체는 무처리군과 비교했을 때 발현량이 증가했으나 ureB를 포함하는 부분은 잘려진 짧은 형태의 전사체가 증가했을 것으로 예상 가능하다. 이와 관련하여 *H. pylori*의 ureAB가 동일한 프로모터에 지배받지만 다양한 형태의 전사체가 만들어 진다는 보고가 있다. ureAB의 프로모터에 결합하는 전사인자로서 HpNikR과 HpArsR이 있다. HpNikR은 니켈에 의해 활성화되어 ureAB 프로모터에 결합하여 전사를 활성화시킨다[21]. HpArsR은 pH가 낮아지면 인산화되어 ureAB 프로모터에 결합하여 전사를 활성화시키지만 인산화가 되지 않은 상태에서는 ureB 내부의 프로모터에 결합하여 anti-sense 전사체를 만들어 짧은 전사체를 증가시킨다[22]. 본 실험은 대조군과 실험군 모두 중성조건에서 진행하였다. 오수유가 중성 혹은 산성조건에서 HpNikR과 HpArsR의 발현 혹은 활성에 어떤 영향을 주는지 실험을 진행하려고 하고 있다.

Urease는 UreA와 UreB가 결합하여 활성을 갖는다. 본 실험에서 UreA는 증가하고 UreB는 감소하여 전체 urease의 활성이 어떻게 변할지 세포내액과 상층액을 대상으로 하여 urea 첨가

에 따른 암모니아량을 측정된 결과 두 곳 모두에서 암모니아 생성량이 감소하였다. 오수유의 urease 활성 저해와 관련하여 성장억제 효과를 갖는 quinolone alkaloids의 물질은 urease활성을 직접 억제하지 않는다는 보고가 있다[11]. 오수유내 물질들 중에 urease활성을 억제하는 물질이 없다고 확정할 수 없으나 본 실험에서는 urease를 구성하는 ureB의 발현 억제가 관여했을 것으로 예상된다. 천연물의 추출물에는 다양한 물질들이 혼합되어 있다. 본 실험에서 오수유의 95% 추출물이 병원성 인자의 발현에 영향을 주고 있음을 밝혔으나 이런 영향을 주는 물질(들)이 무엇인지는 확인하지 못하였다. *H. pylori*의 성장을 억제하는 오수유내 quinolone alkaloid류 물질(Table 1) 중 Hamasaki 등[12]은 evocarpine과 1-methyl-2-[(Z)-7-tridecenyl]-4(1H)-quinolone 혼합물이 agar dilution 방법으로 MIC를 측정했을 때 0.05 µg/mL의 높은 저해효과를 보인다고 보고했다. 본 실험에서도 성장을 억제하는 quinolone alkaloid류 물질들이 병원성 인자 발현에 영향을 주었을 가능성이 크다고 생각한다. 다만 다른 물질들이 영향을 주거나 혹은 여러 물질들이 혼합하여 영향을 줄 수도 있는 가능성 또한 배제할 수 없어 향후 이런 영향을 주는 오수유 함유 단일 물질에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 본 실험은 오수유가 성장억제 농도 미만에서 *H. pylori*의 병원성 인자의 발현 및 활성을 억제 시킨다는 것을 보여주고 있어 향후 *H. pylori*의 부정적 영향을 줄이는데 이용할 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

위에 군집을 형성하는 그람 음성 박테리아인 *Helicobacter pylori*는 위암을 일으킬 수 있는 1급 발암 인자로, *H. pylori*의 성장을 억제하거나 제거하는 물질을 탐색하는 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 오수유는 운향과에 속하는 오수유의 열매를 일컫는 생약으로 한방에서는 설사 및 복통에 사용되던 약재이다. 오수유 추출물이 *H. pylori*의 성장을 억제한다는 보고는 있었으나 병원성 요인에 어떤 영향을 주는지에 대한 연구는 보고된 바가 없었다. 본 연구에서는 각기 다른 메탄올 농도에서 추출한 오수유 추출물의 *H. pylori* 성장 억제 효과를 비교하였으며 또한 오수유 추출물이 *H. pylori*의 병원성 인자에 미치는 영향을 연구하였다. 95% 메탄올 오수유 추출물이 가장 낮은 최소저해농도(MIC) 값을 보였으며, 이 95% 추출물을 대상으로 하여 MIC 미만 농도에서 *H. pylori*의 병원성 인자의 발현 변화를 확인하였다. 95% 메탄올 오수유 추출물은 *H. pylori*의 주요 병원성 인자인 cagA, vacA 그리고 ureB의 mRNA 및 단백질의 발현

을 억제하였으나 흥미롭게도 *ureA*의 발현은 증가시켰다. 하지만 *H. pylori*의 배양액과 세포내의 암모니아의 양이 현저히 낮아졌음을 확인하였고, 이는 오수유 추출물이 *ureB*의 mRNA 및 단백질의 발현을 억제하여 *H. pylori*의 urease 활성을 억제한다는 것을 확인하였다. 오수유 추출물의 병원성 인자 조절 기전에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 보이나, 본 연구 결과는 오수유 추출물이 *H. pylori*로 인한 부정적 영향을 줄여줄 것으로 생각한다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Yang JY¹, Graduate student; Lee P², Professor; Kim JB¹, Professor.

REFERENCES

- Roesler BM, Costa SC, Zeitune JM. Eradication treatment of *Helicobacter pylori* infection: Its importance and possible relationship in preventing the development of gastric cancer. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:93540. <https://doi.org/10.5402/2012/935410>.
- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fisher W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 2000;287:1497-1500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1497>.
- Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development gastric cancer. *J Cell Biochem.* 2013;114:491-497. <https://doi.org/10.1002/jcb.24389>.
- Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2014;20:12767-12780. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12767>.
- Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* 2003;63:951-957.
- Jain P, Luo ZQ, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) engages the mitochondrial fission machinery to induce host cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:16032-16037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105175108>.
- Stingl K, Altendorf K, Bakker EP. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* 2002;10:70-74.
- Zhang PT, Pan BY, Liao QF, Yao MC, Xu XJ, Wan JZ, et al. Simultaneous quantification of limonin, two indolequinazoline alkaloids, and four quinolone alkaloids in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) benth by HPLC-DAD method. *J Anal Methods Chem.* 2013;2013:827361. <https://doi.org/10.1155/2013/827361>.
- Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory effects of *Evodia officinalis* DODE in mouse macrophage and human vascular endothelial cells. *Kor J Herbology.* 2008;23:29-38.
- Park SY, Park C, Park SH, Hong SH, Kim GY, Hong SH, et al. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* in HeLa human cervical cancer cells via activation of AMP-activated protein kinase. *BioScience Trends.* 2016;10:467-476. <https://doi.org/10.5582/bst.2016.01170>.
- Rho TC, Bae EA, Kim DH, Oh WK, Kim BY, Ahn JS, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from *Evodia fructus*. *Biol Pharm Bull.* 1999;22:1141-1143.
- Hamasaki N, Ishii E, Tominaga K, Tezuka Y, Nagaoka T, Kadota S, et al. Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a Chinese herbal medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against *Helicobacter pylori* in vitro. *Microbiol Immunol.* 2000;44:9-15.
- Tominaga K, Higuchi K, Hamasaki N, Hamaguchi M, Takashima T, Tanigawa T, et al. In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:547-552. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf159>.
- Lee MH, Yang JY, Cho Y, Woo HJ, Kwon HJ, Kim DH, et al. Inhibitory effects of menadione on *Helicobacter pylori* growth and *Helicobacter pylori*-induced inflammation via NF-kappaB inhibition. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1169. <https://doi.org/10.3390/ijms20051169>.
- Tharmalingam N, Kim SH, Park M, Woo HJ, Kim HW, Yang JY, et al. Inhibitory effect of piperine on *Helicobacter pylori* growth and adhesion to gastric adenocarcinoma cells. *Infect Agent Cancer.* 2014;9:43. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-43>.
- Yeon MJ, Lee MH, Kim DH, Yang JY, Woo HJ, Kwon HJ, et al. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83:166-173. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1528140>.
- Boonjakuakul JK, Canfield DR, Solnick JV. Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression in vitro and in the Rhesus macaque. *Infect Immun.* 2005;73:4895-4904. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4895-4904.2005>.
- Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1991;44:515-516. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.6.515>.
- Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>.
- Thanos D, Maniatis T. NF-kB: a lesson in family values. *Cell.* 1995;80:529-532. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90506-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90506-5).
- van Vliet AH, Kuipers EJ, Stoof J, Poppelaars SW, Kusters JG. Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect Immun.* 2004;72:766-773. <https://doi.org/10.1128/iai.72.2.766-773.2004>.
- Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G. A cis-encoded antisense small RNA regulated by the HP0165-HP0166 two-component system controls expression of *ureB* in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2011;193:40-51. <https://doi.org/10.1128/JB.00800-10>.