

## 약용식물 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성

이정준 · 김성훈 · 장병식\* · 이중복\* · 허철성 · 김태종\* · 백영진

(주) 한국야쿠르트 중앙연구소, \*건국대학교 수의학과

## The Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Extracts against *Helicobacter pylori*

Jeong-Jun Lee, Sung-Hoon Kim, Byung-Sik Chang\*, Joong-Bok Lee\*,

Chul-Sung Huh, Tae-Jong Kim\* and Young-Jin Baek

R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

\*School of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University

### Abstract

Antimicrobial activities were assayed through the hot-water extracts from 41 species of medicinal plants against *Helicobacter pylori* which is known as the ulcerogenic pathogen. *Opuntia ficus-indica*, *Houttuynia cordata*, *Sinomenium acutum*, and *Coptis japonica* showed the MIC at the concentrations less than 100 ppm, *Pulsatilla koreana*, *Forsythia koreana*, *Rheum undulatum*, and *Perilla frutescens* less than 200 ppm, *Belamcanda chinensis*, *Arctium lappa*, *Cassia tora*, *Citrus tachibana*, *Siegesbeckia orientalis*, and *Caesalpinia sappan* less than 300 ppm by the 2-fold dilution method. In disc method only three of them were confirmed to have antimicrobial activities which were increased in the order *Perilla frutescens*, *Coptis japonica*, *Caesalpinia sappan*. Three extracts were partitioned with chloroform, ethyl acetate and butanol in sequence and examined for the activity to inhibit *H. pylori*. The major activities were observed in ethyl acetate fraction of *Caesalpinia sappan*, butanol fraction of *Perilla frutescens*, butanol and chloroform fraction of *Coptis japonica*. The partitioned fractions were found to have increased antimicrobial activities in all extracts. The experiments in which the extracts were added into urea R broth containing the crude urease derived from *H. pylori* resulted in the increase of pH and optical density at 560 nm to 8.15 and 1.7 respectively. Urease activity of *H. pylori* was inhibited over 80% by *Caesalpinia sappan*, *Perilla frutescens*, and *Coptis japonica*, of which *Caesalpinia sappan* suppressed up to 95%.

Key words: *Helicobacter pylori*, antimicrobial activity, medicinal plants

### 서 론

만성 위십이지장 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*는 1983년 Warren과 Marshall이 환자의 위 유문부로부터 분리하여 보고<sup>(1)</sup>한 이후 많은 연구가 이루어졌다. *H. pylori*는 위점막 상피세포 간 접합부에서 서식하면서 만성적인 위궤양을 유발하는 Gram 음성 간균이다<sup>(2,3)</sup>. 위점막에서 *H. pylori*는 만곡형 또는 S자형의 간균으로 관찰되며, 크기는 0.4~1.25  $\mu\text{m}$  정도이다. *In vitro* 상의 agar 배지에서는 S자형을 찾아보기 어렵고, 배양시간이 길어질수록 원형

으로 변형된다<sup>(4)</sup>. *H. pylori*는 30~37°C의 미호기적 환경에서 잘 자라며, 25°C 또는 45°C에서는 자라지 않고, 혐기적 환경에서도 자라지 않는다<sup>(5)</sup>. 강산성인 위 내의 점막에 기생하는 세균이기 때문에 *H. pylori*가 산성에 잘 견디는 균일 것으로 기대하기 쉽지만, 이 균의 최적성장 pH는 7.0~7.4이며, 이 범위를 벗어난 산성이나 알칼리성 조건에서는 발육하지 않는다. *H. pylori*는 urease, catalase, oxidase 양성이다<sup>(6-8)</sup>. 또한 *H. pylori*는 대부분의 carbohydrates를 이용하지 못하며, Krebs cycle을 통해 organic acids와 amino acids로부터 energy를 얻는다<sup>(9)</sup>. *H. pylori*의 가장 특이한 생화학적 특성은 매우 강한 urease 생산능이 있다는 것이다. 이 특성을 이용하여 위점막 생검절편에서 urease를 직접 검출하므로써 *H. pylori*의 존재여부를 확인할 수 있고,

Corresponding author: Jeong-Jun Lee, R & D center, Korea Yakult Co., Ltd., #418-12, Komae-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si, Kyunggi-Do, 449-900, Korea

배양한 집락은 urea broth에서 1분 이내에 양성반응을 나타내기 때문에 이를 균 동정에 이용하기도 한다<sup>(10,11)</sup>. Urease는 요소를 암모니아와 CO<sub>2</sub>로 분해하는 효소(urea amidohydrolase)이다. 이 균은 위점막의 혈장 삼출액이나 조직액내에 있는 요소를 분해하여 균체주위를 알칼리성으로 만듦으로써 위내 강산을 중화하는 것으로 알려져 있다. *H. pylori*의 또 다른 특징은 균체의 한쪽 혹은 양쪽에 막으로 둘러싸인 flagella가 하나씩 또는 타래뭉치로 존재하고 있어서 끈적끈적한 환경에서도 이동할 수 있다는 것이다. *H. pylori*의 운동성은 *E. coli*가 움직일 수 없는 점도를 가진 점액보다 약 20배 이상의 점액에서도 움직일 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>(11)</sup>. 이런 특성 때문에 salicylate나 ethanol 같은 화합물 외에는 침투하기가 어려운 위점막층을 뚫고 들어갈 수 있고 점액내에서도 자유로이 이동하면서 위상피세포의 접합부에 쉽게 부착할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>(12)</sup>. *H. pylori*의 정확한 오염경로나 전염원에 대하여서는 아직까지 정확히 증명된 바는 없지만 경구적 방법에 의하여 전달·감염되는 것으로 추정하고 있다. 우리나라 성인의 약 80%정도가 이 균에 감염되었으나 임상증상을 나타내지 않고 있다가, 어떠한 발병촉진인자의 영향으로 만성적인 위십이지장 궤양을 유발한다는 보고<sup>(12,13)</sup> 등을 감안하여 볼 때, *H. pylori* 자체에 대한 연구와 병행하여 *H. pylori*에 대한 근본적인 예방이나 치료를 위한 새로운 방법이 시도 될 필요가 있다. 최근에는 Rauws 등<sup>(14)</sup>이 bismuth 제제와 amoxicillin, metronidazole의 3가지 항균제를 동시에 투여하는 것을 발표하였고, Borody 등<sup>(15)</sup>은 bismuth 제제와 tetracycline, metronidazole을 소화성 궤양환자에 동시에 투여하는 triple chemotherapy를 통해 80% 내외의 치료효과를 얻은 것으로 보고하였다. 국내에서는 박 등<sup>(16)</sup>이 amoxicillin, tripotassium dictrato bismuthate, metronidazole을 이용한 병용투여를 통해 50% 내외의 치료효과를 얻었다고 보고하였다. 그러나 이런 항균제 치료는 이에 사용되는 항생제에 대한 내성이 나타나고, 재발가능성이 내재한다는 면에서 지속적인 연구가 필요하다. 한편 천연물을 이용한 *H. pylori* 항균 활성 실험은 *in vitro*를 벗어나지는 못했으나 여러 소재들이 시도되고 있다. Tabak 등<sup>(17)</sup>은 백리향(thyme)에서, Diker와 Hascelik<sup>(18)</sup>은 차(tea)로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성을 보고하였으며, Midolo 등<sup>(19)</sup>은 유산균으로부터, Bhatia 등<sup>(20)</sup>은 *Lactobacillus acidophilus*로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성을 확인하였다.

본 연구에서는 전통동양약물 데이터베이스<sup>(21)</sup>와 한국의 자원식물<sup>(22)</sup> 등에서 항균특성을 가진 것으로 알려

진 한국산 약용식물을 토대로 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 탐색하였기에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 시료의 제조

약용식물은 주로 전통동양약물 데이터베이스<sup>(21)</sup>와 한국의 자원식물<sup>(22)</sup> 등에서 항균효과가 있다고 기록된 소재를 사용하였으며, 그 식물명은 Table 1과 같다. 소재는 5배의 물과 혼합(v/w)하여 100°C에서 2시간 동안 열수 추출하였으며, 추출액은 filter paper (Whatman No. 1, England)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하였고, 농축액은 동결건조를 통해 분말화하여 시료로 사용하였다.

### 사용균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 위·십이지장궤양 원인균인 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504와 경상대학교 의과대학에서 분양 받은 KS 51 균주를 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 brucella broth (Difco, U.S.A.)에 1% (v/v)의 agar와 10% (v/v)의 calf serum을 첨가한 brucella 한천배지를 사용하였다. Urease 활성 측정에는 urea R broth (Difco, U.S.A.) 조성 중에서 yeast extract를 제외하고 제조, 사용하였다.

*H. pylori*의 배양은 microaerobic condition을 유지시켜주기 위해서 10% CO<sub>2</sub> incubator를 이용하였으며, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였다. Agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다.

### 추출물의 항균활성 검색

*H. pylori*에 대한 추출물의 항균활성 검색은 다음의 2가지 방법으로 실시하였다.

2-fold dilution 방법: Brucella broth를 96 well microplate에 200 µL씩 분주한 후, 각 추출물을 0.45 µm membrane filter로 제균하여 2-fold dilution을 실시하였다. 여기에 *H. pylori*를 10<sup>6</sup> cfu/mL의 농도로 각 well에 100 µL씩 접종하여 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 37°C, 12시간 배양하였다. 각 well에서 배양액 100 µL씩을 취하여 brucella 한천배지에 도말하고, 이 plate를 37°C에서 72시간동안 10% CO<sub>2</sub> incubation을 실시하였다. 배양 후 brucella 한천배지상에 colony 생성유무를 확인하여 해당 추출물에 대한 최소저지농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)를 측정하므로써 *H. pylori*에 대한 추출물의 항균활성을 비교, 검색하였다.

**Table 1. List of medicinal plants used for antimicrobial experiment**

| Korean name | Botanical name   | Part used |
|-------------|--|-----------|
| 가지육         | <i>Terminalia chebula</i> Retz                           | Fruit     |
| 갈근          | <i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.                      | Root      |
| 감초          | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.                      | Root      |
| 결명자         | <i>Cassia tora</i> L.                                    | Seed      |
| 계피          | <i>Cinnamomum cassia</i> Blume                           | Bark      |
| 고삼          | <i>Sophora flavescens</i> Ait.                           | Root      |
| 골쇄보         | <i>Davallia mariesii</i> Moore                           | Root      |
| 귤피          | <i>Citrus tachibana</i> Tanaka                           | Bark      |
| 금불초         | <i>Inula japonica</i> Thunb.                             | Fruit     |
| 금앵자         | <i>Rosa laevaigate</i> Michx                             | Fruit     |
| 목향          | <i>Saussurea lappa</i> Clarke                            | Root      |
| 방기          | <i>Sinomenium acutum</i> Rehd. et Wils.                  | Stem      |
| 백굴채         | <i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiaticum</i> Ohwi      | Whole     |
| 백두옹         | <i>Pulsatilla koreana</i> Nakai                          | Root      |
| 백현초         | <i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>          | Fruit     |
| 사간초         | <i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC.                     | Root      |
| 산초          | <i>Zanthoxylum piperitum</i> A. P. DC.                   | Bark      |
| 선화초         | <i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb                            | Whole     |
| 소목          | <i>Caesalpinia sappan</i> L.                             | Wood      |
| 소엽          | <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> KUDO         | Leaves    |
| 소자          | <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> KUDO         | Leaves    |
| 시호          | <i>Bupleurum falcatum</i> L.                             | Root      |
| 어성초         | <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.                         | Whole     |
| 연교          | <i>Forsythia koreana</i> Nakai                           | Bark      |
| 오미자         | <i>Schisandra chinensis</i> Baill.                       | Fruit     |
| 우방자         | <i>Arctium lappa</i> L.                                  | Seed      |
| 유근피         | <i>Ulmus davidiana</i> Planch var. <i>japonica</i> Nakai | Bark      |
| 익모초         | <i>Leonurus sibiricus</i> L.                             | Whole     |
| 정향          | <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.                      | Flower    |
| 종대황         | <i>Rheum undulatum</i> Linne'                            | Root      |
| 지모          | <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge                   | Root      |
| 진교          | <i>Gentiana macrophylla</i> Pall                         | Root      |
| 참작약         | <i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>trichocarpa</i> Bunge  | Root      |
| 창이자         | <i>Xanthium strumarium</i> L.                            | Fruit     |
| 편측          | <i>Polygonum aviculare</i> L.                            | Whole     |
| 현초          | <i>Geranium thunbergii</i> Siebold et Zuccarini          | Whole     |
| 황기          | <i>Astragalus membranaceus</i> Bunge                     | Root      |
| 황련          | <i>Coptis japonica</i> Makino                            | Root      |
| 황백          | <i>Phellogendron amurense</i> Ruprecht                   | Bark      |
| 황정          | <i>Polygonatum sibirium</i> Redout                       | Root      |
| 회침          | <i>Siegesbeckia orientalis</i> L. var.                   | Whole     |

Disc 방법: 2-fold dilution 방법에 의해 선발된 추출물의 항균활성을 disc 방법<sup>(23)</sup>에 의해 확인하였다. *Brucella* 한천배지에서 48시간 배양된 *H. pylori*를 멸균된 면봉으로 긁어 brucella broth에 흡광도(450 nm)가 1.2가 되도록 현탁하였다. 현탁액 200  $\mu$ L를 취해 25 mL로 제조된 새로운 brucella 한천배지에 도말한 후, 여기에 멸균된 Bacto Concentration Disk (Difco, U.S.A.)를 올려놓았다. 각 소재 추출물을 0.45  $\mu$ m

membrane filter로 여과하고 최종농도가 1 mg/mL이 되도록 하여 10  $\mu$ L씩 disc에 흡수시켰다. 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서 37°C로 72시간 배양한 후 disc 주위의 clear zone 생성 유무로 항균활성을 확인하였다.

#### 추출물의 분획

열수추출하여 얻은 추출물을 물에 녹인 후 극성이 서로 다른 chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차 분획하여 각각 농축하므로써 각 용매에 대한 분획물을 얻고 최종적으로 물층을 분획, 농축하였다. 얻어진 각각의 분획물들은 disc 방법으로 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정하였다.

#### 추출물의 urease 활성억제 효과

먼저 *H. pylori*로부터 crude-urease를 분리하였다. *Brucella* agar plate에 배양한 *H. pylori*를 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 현탁시키고 2회 세척하였다. *H. pylori*를 4°C에서 6분간 sonication (Sonics & Materials Inc, Vibra cell, U.S.A.) 시키고 110×g에서 10분간 원심분리하여 상등액만 수거하였다. 상등액의 단백질 농도를 bradford 방법<sup>(24)</sup>에 따라 측정하였으며, urease 활성은 Tabak 등<sup>(17)</sup>의 방법을 응용하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 1 mL urea R broth에 50  $\mu$ L urease를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키면서 pH 변화와 560 nm에서의 흡광도 변화를 측정하므로써 urease 활성을 확인하였다.

추출물에 따른 urease 활성억제효과는  $\Delta$ pH 방법을 응용하여 측정하였다. 10 mL urea R broth에 각 소재 추출물을 최종농도가 10 mg/mL이 되도록 첨가한 후, pH를 7.0으로 보정하였다. 여기에 500  $\mu$ L의 urease를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키면서 10분 간격으로 pH 변화를 측정하였다. 반응 2시간 후 소재가 들어가지 않은 대조군의 pH 변화정도를 100%로 기준하여, 반응시간과 추출물에 따른 urease 활성 억제율을 환산하였다.

## 결과 및 고찰

#### 추출물의 항균활성 검색

약용식물은 보통 약탕기에 달여 음용하기 때문에 본 실험에서도 약용식물에 대한 열수추출을 실시하여 항균활성을 검색하고자 하였다. 41종의 약용식물을 열수추출한 결과 추출물의 pH가 3.0~7.0까지 폭넓게 나타남으로써, *H. pylori*에 대한 항균효과가 초기 pH에 의해 나타나는 것을 방지하기 위해 각 추출물의

pH를 7.0 정도로 보정한 후 항균활성을 측정하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 백련초, 어성초, 방기, 황련은 100 ppm 이하의 농도에서 *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타내었으며, 백두옹, 연교, 종대황, 소엽은 200 ppm 이하의 농도에서 항균활성을 보였다. 사간, 우방자, 결명자, 굴피, 회침, 소목도 300 ppm 정도의

농도에서 항균활성을 나타내었다. 그리고 골쇄보, 오미자, 편측, 황기도 1,000 ppm 이하의 농도에서 항균활성을 보였다.

Tabak 등<sup>(17)</sup>이 백리향으로부터 *H. pylori*의 증식억제를 실험한 결과, 액체배지의 경우 3,500 ppm, 고체배지의 경우 4,500 ppm에서 항균활성을 확인한 것으로 보고하였다. 이와 비교해 볼 때, 본 실험에서 항균활성이 확인된 약용식물 추출물은 1,000 ppm 이하의 농도에서도 항균활성을 나타내므로 분리, 정제 단계를 통한다면 보다 높은 항균활성을 얻을 수 있으리라 생각된다.

**Table 2. Minimum inhibitory concentration of medicinal plants against *H. pylori***

| Medicinal plants                 | MIC <sup>1)</sup><br>(mg/mL) | Initial pH of<br>medicinal plant<br>extracts |
|----------------------------------|------------------------------|--|
| <i>Terminalia chebula</i>        | 1.90                         | 3.74   |
| <i>Pueraria thunbergiana</i>     | - <sup>2)</sup>              | 6.00   |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i>     | 1.47                         | 6.38   |
| <i>Cassia tora</i>               | 0.33                         | 5.30   |
| <i>Cinnamomum cassia</i>         | 3.48                         | 5.77   |
| <i>Sophora flavescens</i>        | -                            | 6.02   |
| <i>Davallia mariesii</i>         | 0.95                         | 6.53   |
| <i>Citrus tachibana</i>          | 0.33                         | 5.58   |
| <i>Inula japonica</i>            | 3.02                         | 5.67   |
| <i>Rosa laevaigate</i>           | 14.80                        | 5.96   |
| <i>Saussurea lappa</i>           | 3.80                         | 6.00   |
| <i>Sinomenium acutum</i>         | 0.04                         | 6.59   |
| <i>Chelidonium majus</i>         | 5.14                         | 5.53   |
| <i>Pulsatilla koreana</i>        | 0.12                         | 5.60   |
| <i>Opuntia ficus-indica</i>      | 0.01                         | 4.83   |
| <i>Belamcanda chinensis</i>      | 0.24                         | 5.91   |
| <i>Zanthoxylum piperitum</i>     | -                            | 6.03   |
| <i>Agrimonia pilosa</i>          | 3.48                         | 5.15   |
| <i>Caesalpinia sappan</i>        | 0.35                         | 5.30   |
| <i>Perilla frutescens</i>        | 0.19                         | 6.20   |
| <i>Perilla frutescens</i>        | 3.83                         | 6.58   |
| <i>Bupleurum falcatum</i>        | 14.13                        | 5.26   |
| <i>Houttuynia cordata</i>        | 0.03                         | 6.86   |
| <i>Forsythia koreana</i>         | 0.12                         | 4.84   |
| <i>Schisandra chinensis</i>      | 0.63                         | 3.05   |
| <i>Arctium lappa</i>             | 0.27                         | 6.91   |
| <i>Ulmus davidiana</i>           | -                            | 7.00   |
| <i>Leonurus sibiricus</i>        | 33.06                        | 5.71   |
| <i>Eugenia caryophyllata</i>     | -                            | 4.16   |
| <i>Rheum undulatum</i>           | 0.16                         | 4.88   |
| <i>Anemarrhena asphodeloides</i> | -                            | 5.50   |
| <i>Gentiana macrophlla</i>       | 10.00                        | 6.14   |
| <i>Paeonia lactiflora</i>        | -                            | 5.14   |
| <i>Xanthium strumarium</i>       | 3.60                         | 6.45   |
| <i>Polygonum aviculare</i>       | 0.97                         | 6.81   |
| <i>Geranium thunbergii</i>       | 10.70                        | 5.36   |
| <i>Astragalus membranaceus</i>   | 0.45                         | 6.33   |
| <i>Coptis japonica</i>           | 0.06                         | 5.11   |
| <i>Phellogendron amurense</i>    | 23.15                        | 5.28   |
| <i>Polygonatum sibirium</i>      | -                            | 6.00   |
| <i>Siegesbeckia orientalis</i>   | 0.33                         | 5.77   |

<sup>1)</sup>Minimum inhibitory concentration.

<sup>2)</sup>No inhibition.

**Disc 방법에 의한 항균활성 확인**

약용식물 추출물 중 2-fold dilution 실험결과에 따라 300 ppm 이하의 농도에서 *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타낸 추출물에 대해, disc 방법으로 항균활성을 확인하였다. 2-fold dilution 실험은 액체배지상에서 *H. pylori*와 추출물이 혼합되어 항균활성을 측정할 반면, disc 방법은 고체배지상에서 *H. pylori*에 대한 항균활성을 확인하는 것이기 때문에 두 방법에 의한 결과가 차이를 보일 가능성을 배제할 수 없다.

Table 3에서 보는 바와 같이 2-fold dilution 실험에서 항균활성을 나타낸 추출물의 대부분이 clear zone을 형성하지 못하고 소목, 소엽, 황련에서만 clear zone이 각각 13, 13, 8 mm 정도의 크기로 형성되었다. Disc 방법에 의한 결과에서 추출물들의 항균활성은 *H. pylori* 균주간에 차이가 없었으며 소목, 황련, 소엽의 순으로 강한 항균활성을 나타내었다. Tabak 등<sup>(17)</sup>은 백리향의 물추출물로부터 24 mm 정도의 clear zone을 얻었으며, Diker와 Hascelik<sup>(18)</sup>는 차추출물로부터 균주별로 16~21 mm의 clear zone을 얻은 것으로 보고하였다. Disc 방법과 2-fold dilution 방법의 결과 차이는 추출물의 확산정도에 의한 것으로 생각되며, 이는 Tabak 등<sup>(17)</sup>의 결과에서도 고체배지보다 액체배지에서 항균활성이 강하게 나타난 것과 동일한 결과로 생각된다.

**Table 3. Antimicrobial activities of medicinal plants against *H. pylori* by disc method**

| Medicinal plants          | Diameter of clear zone (mm)    |                           |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
|                           | <i>H. pylori</i><br>ATCC 43504 | <i>H. pylori</i><br>KS 51 |
| <i>Caesalpinia sappan</i> | 13                             | 12                        |
| <i>Perilla frutescens</i> | 8                              | 8                         |
| <i>Coptis japonica</i>    | 13                             | 11                        |

**Table 4. Antimicrobial activities of different solvent fractions from medicinal plants against *H. pylori***

| Medicinal plants          | Solvent       | Diameter of clear zone (mm) |                        |
|---------------------------|---------------|-----------------------------|------------------------|
|                           |               | <i>H. pylori</i> ATCC 43504 | <i>H. pylori</i> KS 51 |
| <i>Caesalpinia sappan</i> | Chloroform    | 12.5                        | 9.5                    |
|                           | Ethyl acetate | 20.2                        | 17.0                   |
|                           | Butanol       | 18.0                        | 16.0                   |
|                           | Water         | - <sup>1)</sup>             | -                      |
| <i>Perilla frutescens</i> | Chloroform    | 18.9                        | 16.5                   |
|                           | Ethyl acetate | 9.0                         | 12.5                   |
|                           | Butanol       | 10.2                        | 15.0                   |
|                           | Water         | -                           | -                      |
| <i>Coptis japonica</i>    | Chloroform    | 20.0                        | 15.0                   |
|                           | Ethyl acetate | 10.0                        | -                      |
|                           | Butanol       | 21.5                        | 19.0                   |
|                           | Water         | -                           | -                      |

<sup>1)</sup>No inhibition.

#### 추출물의 분획별 항균활성 검색

항균활성이 액체배지와 고체배지에서 모두 나타난 3종류의 약용식물에 대해 항균활성 물질을 분리할 목적으로 극성이 다른 chloroform, ethyl acetate, butanol의 순으로 분획하여 각 분획물에 대한 항균활성을 disc 방법으로 검색하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 소목의 경우는 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 항균활성을 나타내면서 butanol과 chloroform 분획물에서도 각각 항균활성을 보였다. 이는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113을 대상으로 한 소목 분획물의 항균활성 실험<sup>(25)</sup>과 동일한 결과로, 소목 ethyl acetate 분획물에 대한 보다 세밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 소엽의 경우는 butanol 분획물에서 가장 강한 항균활성을 보였으며, chloroform과 ethyl acetate 분획물에서도 각각 항균활성을 나타냈다. 분획물의 항균활성은 소목과 소엽 분획물에서는 *H. pylori* 균주별로 차이가 없었으나, 황련 분획물의 경우는 약간의 차이를 보였다. 황련은 butanol과 chloroform 분획물에서 각각 강한 항균활성이 나타났으며, ethyl acetate 분획물은 *H. pylori* ATCC 43504에서만 항균활성을 확인할 수 있었다.

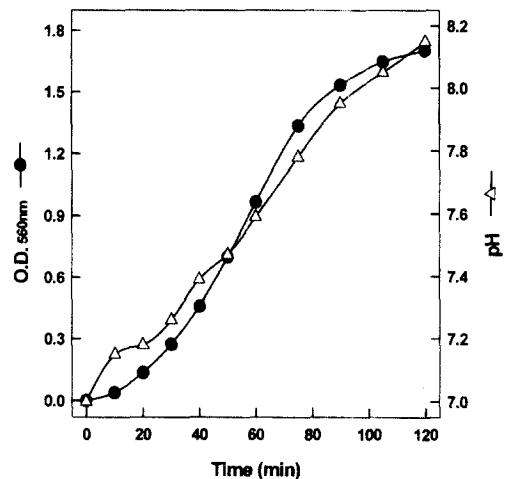
추출물의 분획에 따른 항균활성 상승효과는 모든 추출물에서 확인할 수 있었으며, 대부분의 분획 용매에서 항균활성이 나타나는 것으로 미루어 볼 때 항균활성 물질이 단일물질이 아닐 것으로 생각된다.

#### 추출물의 urease 활성 억제 효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 특이한 점은 강력한 urease (urea aminohydrolase) 활성을 가지고 있다는 것이다<sup>(6,26)</sup>. *H. pylori*의 urease 생산능력은 *Proteus*

균종의 생산능에 비해 100배 이상이며, 균체 단백질의 약 6% 정도가 urease로 알려져 있다<sup>(26,27)</sup>. Urease는 urea를 암모니아와 CO<sub>2</sub>로 분해하는 효소이며, K<sub>m</sub>값이 0.8 mM로 *Proteus* 균종의 urease에 비해 10~20배 낮은 정도로 효소의 친화력이 높다. *H. pylori*의 urease는 위액의 강산성 조건에서도 *H. pylori*가 살아갈 수 있도록 도와주는 물질이거나 특이한 발병결정인자로 추정한다<sup>(26)</sup>. 따라서 *H. pylori*의 urease 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염 예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있으리라 생각한다.

*H. pylori*로부터 crude-urease를 분리하고 urea R broth를 이용한 흡광도와 pH 변화를 측정하여 urease 활성을 확인하였다(Fig. 1). 분리된 *H. pylori* urease의



**Fig. 1. The activity of crude urease from *H. pylori* in urea R broth.**

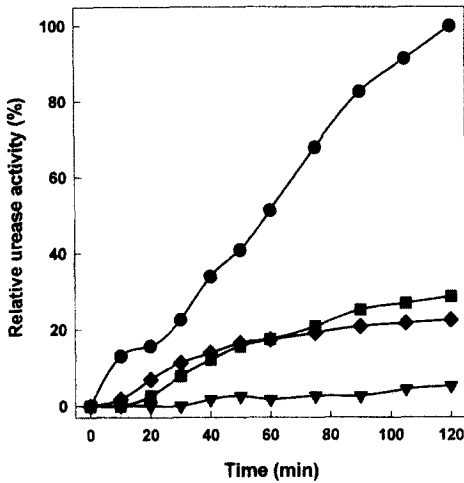


Fig. 2. Inhibition of *H. pylori* urease by various medicinal plants in urea R broth. ●—●: Control, ▼—▼: *Caesalpinia sappan*, ◆—◆: *Perilla frutescens*, ■—■: *Coptis japonica*

단백질 함량은 bradford 방법으로 정량한 결과 1.056 mg/mL로 측정되었다. 이 urease의 활성을 측정된 결과, 초기 pH 7.0의 urea R broth에서 urea를 암모니아와 CO<sub>2</sub>로 분해하여 반응 2시간 동안 pH 8.15까지 계속적인 증가를 보였다. pH가 알칼리성으로 변함에 따라 phenol red에 의해 흡광도(560 nm)도 1.7까지 계속 증가하는 것으로 나타났다.

*H. pylori*에 항균활성을 나타낸 3가지 소재 추출물이 위의 *H. pylori* urease 활성을 억제하는지를 확인하였다. 추출물이 첨가되지 않은 대조군이 반응 2시간 후 나타낸 pH 변화정도를 urease 억제율 100%로 기준하여, 반응시간과 추출물에 따른 pH 변화정도를 urease 억제율로 환산하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 소목, 소엽, 황련 모두 반응 2시간 후에 *H. pylori*의 urease 활성을 80% 이상 억제하는 것으로 나타났다. 이는 백리향이 crude-urease 활성을 45% 감소시킨다는 Tabak 등<sup>(17)</sup>의 보고에 비해 매우 양호한 결과로 해석된다. 특히 항균활성에서도 가장 높은 효과를 보인 소목에서 urease 활성이 95% 이상 억제되는 것으로 나타나, 소목을 이용한 *H. pylori*의 예방법 개발이 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

41종의 약용식물을 열수추출하여 위궤양 원인균으로 보고된 *Helicobacter pylori*에 대해 항균활성을 탐

색하였다. 2-fold dilution 방법에 의해서는 백련초, 어성초, 방기, 황련은 100 ppm 이하, 백두옹, 연교, 종대황, 소엽은 200 ppm 이하, 사간, 우방자, 결명자, 굴피, 회침, 소목은 300 ppm 이하의 농도에서 *H. pylori*에 대해 항균활성을 나타냈다. 이중 3가지 추출물만이 disc 방법을 통해 항균활성이 재확인되었으며, 소목, 황련, 소엽의 순으로 강한 항균활성을 나타냈다. 항균활성이 확인된 3가지 추출물을 chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차 분획하여 *H. pylori*에 대한 항균활성을 확인하였다. 소목의 경우는 ethyl acetate 분획물에서, 소엽의 경우는 butanol 분획물에서, 황련의 경우는 butanol과 chloroform 분획물에서 가장 강한 항균활성을 나타내었다. 추출물의 분획에 따른 항균활성의 상승효과는 모든 추출물에서 확인할 수 있었다. *H. pylori*의 crude-urease를 분리하여 urea R broth에서 흡광도와 pH를 조사한 결과, 반응 2시간 후 pH가 8.15까지, 560 nm에서의 흡광도는 1.7까지 증가하는 것으로 나타났다. *H. pylori*의 urease 활성은 소목, 소엽, 황련에 의해 80% 이상 억제되었으며, 이중 소목은 urease 활성을 95% 이상 억제시켰다.

문 헌

- Warren, J.R. and Marshall, B.J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, **1**, 1273-1275 (1983)
- Hazell, S.L., Lee, A., and Hennessy, W.: *Campylobacter pyloridis* and gastritis: Association to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Inf. Dis.*, **153**, 658-663 (1986)
- Steer, H.W.: Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J. Clin. Pathol.*, **28**, 639-646 (1975)
- Jones, D.M. and Curry, A.: The genesis of coccal forms of *Helicobacter pylori*, in *Helicobacter pylori* gastritis and peptic ulcer. Malfertheiner, P. and Ditschuneit, H., Eds., Springer-Verlag, Berlin, p. 29 (1990)
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., MacConnell, W. and Harper, W.E. S.: 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 (1989)
- Rhee, K.H., Cho, M.J., Kim, J.B., Choi, S.K. and Kim, Y.C.: Bacteriological characteristics of *Campylobacter pylori* (in Korean). *J. Korea Soc. Microbiol.*, **23**(1), 17-26 (1988)
- Jones, D.M., Lessells, A.M. and Eldridge, J.: *Campylobacter* like organisms on the gastric mucosa: culture, histological, and serological studies. *J. Clin. Pathol.*, **37**, 1002-1006 (1984)
- Megraud, F., Brassens-Rabbe, M.P., Denis, F., Belbouri,

- A. and Hoa, D.Q.: Characterization of "Campylobacter pyloridis" by culture, enzymatic profile and protein content. *J. Clin. Microbiol.*, **22**, 1007 (1987)
9. Goodwin, C.S. and Worsley, B.W.: *Helicobacter pylori* : Biology and clinical practice. CRC press, Inc. U.S.A. (1993)
  10. Hazell, S.L. and Lee, A.: *Campylobacter pyloridis* urease, hydrogen ion back-diffusion and gastric ulcers. *Lancet*, **1**, 15-17 (1986)
  11. Lee, A. and Hazell, S.L.: *Campylobacter pylori* in health and disease: An ecological perspective. *Microbial Ecology in Health and Disease*. **1**, 1-16 (1988)
  12. Baik, S.C., Kim, J.B., Cho, M.J., Kim, Y.C., Park, C.K., Ryou, H.H., Choi, H.J. and Rhee, K.H.: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among normal Korean adults (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.*, **25**(6), 455-462 (1990)
  13. Rhee, K.H., Youn, H.S., Baik, S.C., Lee, W.K., Cho, M. J., Choi, H.J., Maeng, K.Y. and Ko, K.W.: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.*, **25**(6), 475-490 (1990)
  14. Rauws, E.A.J., Langenberg, W., Houthoff, J.H., Zanen, H. C. and Tytgat, G.H.J.: *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral gastritis : a prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcera treatment. *Gastroenterol.*, **94**, 33-40 (1988)
  15. Borody, T., Lenne, J. and Moore-Jones, D.: Is doxycycline more effective than tetracycline HCl in triple therapy of *Helicobacter pylori*? *Gastroenterol.*, **98**, A24 (1990)
  16. Park, C.K., Choi, H.J., Youn, H.S., Lee, W.K., Cho, M. J., Kang, K.H., Baik, S.C. and Rhee, K.H.: Chemotherapy of *Helicobacter pylori* infection (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.*, **29**(5), 421-435 (1994)
  17. Tabak, M., Armom, R., Potasman, I. and Neeman, I.: *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 667-672 (1996)
  18. Diker, K.S. and Hascelik, G.: The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 299-300 (1994)
  19. Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M.L.: *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. of Appl. Bacteriol.*, **79**, 475-479 (1995)
  20. Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. and Mehta, A.P.: *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* *In vitro*. *J. of Clinical Microbiology*, **27**, 2328-2330 (1989)
  21. TradiMed: *Traditional oriental medicines database* (in Korean). Seoul National University Natural Products Research institute, Korea (1996)
  22. Kim, T.J.: Korean resources plants (in Korean). Seoul National University Press, Korea (1996)
  23. Gavidson, P.H. and Parish, M.E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, **43**, 148 (1989)
  24. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
  25. Shin, D.H., Kim, M.S. and Han, J.S.: Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(4), 808-816 (1997)
  26. Kim, J.I., Baik, S.C., Cho, M.J., Lee, W.K. and Rhee, K.H.: Purification of the urease of *Helicobacter pylori* and production of monoclonal antibody to the urease of *Helicobacter pylori* (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.*, **26**(6), 531-540 (1991)
  27. Park, C.K., Lee, W.K., Doh, Y.M., Cho, M.J. and Rhee, K.H.: Development of diagnostic method of *Helicobacter pylori* infection : I. Molecular cloning and DNA sequencing of urease (in Korean). *J. Korean Soc. Microbiol.*, **26**(6), 541-552 (1991)

---

(1998년 12월 23일 접수)