

Propolis 유효성분의 항위염 및 항위궤양 작용

김은주 · 정춘식 · 정기화*
덕성여자대학교 약학대학

Antigastritic and Antiulcer action of Effective Compounds from Propolis Extract

Eun Joo KIM, Choon Sik JEONG and Ki Hwa JUNG*

College of Pharmacy, Duksung women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received October 28, 1991; accepted December 4, 1999)

Abstract – Propolis, a natural resinous compound collected from honey bees, contains many biochemical constituents(wax, flavonoids, phenolic compounds, etc.) and has been used in traditional medicines as early as 300 B.C. It has been demonstrated that ethanol, acetylsalicylic acid, ischemia reperfusion, non-steroidal anti-inflammatory drugs and stress induce gastric lesions by promoting the generation of reactive oxygen metabolites. Therefore, some drugs that are capable of scavenging or inhibiting the generation of reactive oxygen radicals might be expected to prevent the gastric mucosal injury. The aim of this study was 1) to examine the antiulcer effect of propolis, 2) to investigate the mechanism of action by determining gastric acid secretion, lipid peroxidation, mucus content and proton pump (H^+/K^+ -ATPase) activity on gastric mucus in various experimental models, and finally, 3) to isolate and identify the pure compounds that exert antiulcer activity. Step 2-1 and 2-3 sub-sub fraction showed a significant reduction of severity of gastric damage at the dose of 25 mg/kg in various experimental models. We isolated 4 sub-sub-sub fractions by flash column chromatography of Step 2-1 sub-sub fraction and one sub-sub-sub fraction by recrystallization of Step 2-3 sub-sub fraction. The protective effects of propolis sub-sub-sub fraction manifested significant effects in HCl-ethanol induced gastric erosion model and aspirin induced gastric ulcer model. These results showed that the gastric mucosal protective effect of propolis might result from the increase of mucus secretion, free radical scavenging effect as well as the reduction of acid secretion in accordance with the reduction of H^+/K^+ -ATPase activity. Three compounds were isolated and identified from sub-sub fraction of propolis which showed antiulcer effects. Subsequently, these compounds were identified as a flavonoid, namely, 2-acetoxy-5,7-dihydroxy- flavanone, galangin and chrysin.

Keywords □ Propolis, Gastritis, HCl-ethanol induced gastric lesion, Shay ulceration, Gastric secretion, Mucus content, Acetic acid ulcer, Lipid peroxidation, H^+/K^+ ATPase activity, 2-acetoxy-5,7-dihydroxy- flavanone, Galangin, Chrysin.

소화성 궤양은 위산과 펩신의 작용으로 상부소화관이 손상을 받아 발생한 결손이 위점막근층 이하까지 침범한 상태를 말한다.

소화성 궤양으로 고통받고 있는 환자는 미국의 경우 약 400~600만명에 이르며 환자의 거의 반 이상이 *Helicobacter pylori*(이하 *H. pylori*라 함)에 감염되어 있다고 알려져 있다. 또한 우리나라를 비롯한 많은 개발도상국가에서도 내과 내원 환자의 상당수가 소화성 궤양으로 진단되며 이들 중 70% 이상이 *H. pylori*에 감염되어 있다(한국보건연감, 1996).

위내에 염산이 존재한다는 사실은 이미 150여년 전 William Beaumont에 의해 주장되었다. 그 후 계속된 연구

를 통해 위산이 위점막 손상과 위궤양을 일으키는 가장 주된 원인이라고 인식되어왔다. 그러나 대부분의 위궤양환자가 산의 과다분비를 나타내지 않고, 십이지장궤양환자 중의 상당수가 정상적인 산분비를 보임에 따라 위·십이지장 점막 손상이 산분비와 관계없이 일어날 수 있다는 사실이 알려지게 되었다(Soll과 Isenberg, 1983).

현재 소화성 궤양의 치료약물인 H_2 -antagonist의 경우 cimetidine, ranitidine의 비강내 투여 또는 지속성제제에 대한 연구와 현재 사용되고 있는 약물보다 더욱 강한 산분비 억제 작용과 긴 작용지속시간을 가진 제제에 대한 연구개발이 이루어지고 있다. Proton pump(H^+/K^+ -ATPase) inhibitor인 경우 가장 널리 사용되고 있는 omeprazole 보다 작용 지속시간은 길고 부작용은 감약시킨 제제에 대한 연구가 이루어지고 있는데 특히 장기간 복용에도 위산저하

*To whom correspondence should be addressed.

의 부작용 없이 산분비를 억제할 수 있는 가역적 proton pump inhibitor의 연구 개발에 관심이 집중되고 있다 (Takaji 등, 1993). 또한 아직까지 *H. pylori*가 소화성 궤양의 발병과 재발에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 의견이 많으며 다양한 방법으로 이 균의 박멸이 임상에서 시도되고 있다(Koga 등, 1996). 이외에도 PAF-antagonist, phosphodiesterase inhibitors, 선택적 M₁- antagonists, gastrin inhibitor 및 위점막 상피세포의 성장을 촉진하는 상피세포증식인자 같은 세포보호약물에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

Propolis에 대한 연구는 1960년대부터 성분분석(Kezia 등, 1991; Bankova 등, 1992; Kujumgiev A. 등, 1993; Vennat 등, 1995)과 항염증작용을 중심으로 하여 진행되어 왔으나 최근들어 propolis 추출물의 면역조절작용에 대한 연구결과가 보고되면서 이에 대한 연구는 전환점을 맞게 되었다(Ivanovska 등, 1995; Chopra 등, 1995). 그 외 항염증작용, chemopreventive effect(Rao 등, 1995), 자유유리기 제거작용(Rapta 등, 1995), HIV-1 저해작용(Amoros M. 등, 1992, 1994; Fesen 등, 1994), 항당뇨작용(Said 등, 1990), 간장보호작용(Ramirez 등, 1994), 면역조절작용, 항균작용(Serkedjieva 등, 1992; Takaisi-Kikuni와 Schilcher, 1994) 및 항궤양효과 등 다양한 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 propolis 추출물과 catechin, SOD 및 vitamine E 등을 비교한 실험에서 xanthine-xanthine oxidase reaction에 의해 생성된 superoxide와 alkoxy radical에 대해 항산화작용을 발휘한다고 보고하였다(Pascual 등, 1994)

본 실험에서는 propolis의 toluene 분획물을 각각 비율을 달리한 toluene/ethyl acetate 혼합용매로 하여 silicagel column chromatography를 시행하고 그 subfraction을 이용하여 HCl-ethanol 유발 위손상 실험을 시행한 결과 혼합비율 [6 : 4]와 [5 : 5]를 제외한 모든 투여군에서 유의성 있는 위손상 억제효과를 관찰할 수 있었고 그중 92.2%의 강한 억제율을 나타낸 [7 : 3] subfraction을 선택하여 실험을 진행하였다. [7 : 3] subfraction을 hexane/ethyl acetate 혼합용액(7 : 3)으로 silicagel column chromatography를 시행하고 R_f값에 따라 step 2-1과 step 2-2 및 step 2-3의 sub-sub fraction을 얻었으며 이들을 사용하여 HCl-ethanol 유발 위손상과 유문결찰 후의 위액분비, pH 및 산분비량에 미치는 영향, aspirin 유발 위손상 실험, 초산 유발 만성위궤양에 대한 효과, 14시간 유문 결찰에 의한 위궤양, 점액 분비량실험, 지질과산화물 함량 및 H⁺/K⁺-ATPase 활성화에 미치는 효과를 관찰한 결과 step 2-1, step 2-3, sub-sub fraction에서 유의성있는 항궤양효과를 확인할 수 있었으며 대조약물인 sucralfate 또는 cimetidin과 비교하여 우수한 항궤양효과를 나타내어 유효성분을 분리하였다.

분리하여 동정된 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone,

galangin 및 chrysin을 이용하여 위염 및 위궤양에 미치는 영향을 실험모델을 통해 살펴보고 조직학적 소견을 통해 효과를 관찰하였으며 점액분비량 실험, 지질과산화물 실험 및 H⁺/K⁺ ATPase활성 실험을 통해 그 기전을 확인하였다.

재료 및 방법

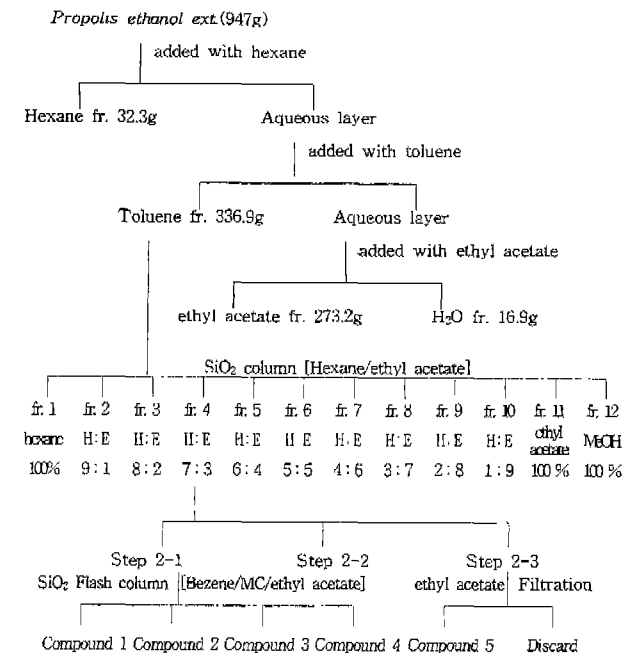
재료

본 실험에 사용한 propolis는 오스트레일리아의 propolis ethanol 추출물을 선인상사로부터 공급받아 사용하였다.

시약 및 기기

실험에 사용한 시약으로서 D-2-dioctyl sodium sulfosuccinate, alcian blue 8GS(Janssen Chimica), sucrose (Shinyo Pure Chemicals Co., Ltd), carboxymethyl cellulose(Junsei Chemical Co.), absolute ethanol, n-butyl alcohol, formaldehyde, cimetidine, sucralfate(중외제약), aspirin, omeprazole(영진약품), Kieselgel 60, Kieselgel 77(Merk, Art. 7734), TLC(Kieselgel F 254, precoated, Merk, Art. 5549)을 사용했으며 기타 시약 및 추출용매는 분석용 일급시약을 사용하였다.

기기로서 손상 및 궤양의 측정에 쓰인 현미경은 Kyowa Tokyo의 No. 870518을 사용하였으며, 그 외 pH meter(Metrohm pH meter), high speed centrifuge(Sorvall RT-6000), UV spectrophotometer(Hewlett Packard HP 8452 A Diode-Array), 용점측정기(Mitamura-ricken ap-



Scheme 1. Fractionation and isolation of the compound from propolis.

paratus), $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (Bruker AC-200, Germany), DEPT(Gemini 300, 300 MHz, Varian Co.), gas chromatography(Hewlett Packard Model 5890 Series II의 GC/MS system) 등을 사용하였다.

실험동물

체중 150-250 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 2주 이상 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였고, 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

H^+/K^+ -ATPase의 활성을 측정하기 위한 돼지의 신선한 위는 마장동에서 구입하였다.

유효 성분의 분리 및 동정

Propolis의 ethanol 추출물은 Scheme 1과 같이 hexane, toluene 및 ethyl acetate를 사용하여 계통적으로 분획하고 각 분획물은 감압농축시켰다.

Toluene 분획물을 ethyl acetate로 용해시키고 silicagel에 coating시켰다. 이 분말을 silica gel 7734를 충전시킨 silicagel column에 넣고 hexane으로 용출시킨 후 hexane과 ethyl acetate 혼액을 이용하여 ethyl acetate 농도를 10%씩 gradient elution(0%→100%)하여 용출액을 TLC 및 UV lamp로 관찰하여 TLC상에서 같은 Rf값을 나타내는 분획을 합하여 12개의 subfraction을 얻었다.

이 중 subfraction [7:3]을 다시 silicagel column에 걸어 hexane:ethyl acetate(7:3)로 용출시켜 3개의 sub-sub fraction을 얻었다. Rf 값에 따라 step 2-1, step 2-2 및 step 2-3 sub-sub fraction으로 분리하고 각 분획물은 감압농축하였다.

Step 2-1 sub-sub fraction을 취하여 flash column chromatography를 시행하였다. 즉, 200 mesh의 silicagel을 사용하고 benzene:methylene chloride:ethyl acetate (1:1:0.2) 혼액을 전개용매로 하여 column chromatography를 시행하였고, Rf 값에 따라 분리하여 compound 1, compound 2, compound 3 및 compound 4를 얻었다. 또한 step 2-3 sub-sub fraction에 ethyl acetate를 가하고 여과하여 가용분획과 침전물 compound 5를 얻었다. 이때 발색시약으로는 anisaldehyde를 사용하였다.

Compound 1: MS spectrum pattern, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum, DEPT spectrum을 통해 3-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone으로 동정하였다.

Compound 3: MS spectrum, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 3,5,7-trihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one인 galangin으로 확정되었다.

Compound 5: MS spectrum, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one인 일반명 chrysin으로 동정하였다.

HCl-ethanol에 의한 위손상

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 Mizui 등의 방법(1983)으로 실험하였다.

위액분비량, pH 및 산분비량 측정

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 Shay의 방법(1945)으로 측정하였다.

Shay 위궤양

체중 200g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후 ether 마취하여 개복한 뒤 위의 유문부를 결찰한 후 위궤양을 Shay 등(1945)의 방법을 이용하여 실험하였다. 즉, 흰쥐를 ether 마취하여 개복하고 위의 유문부를 결찰한 후 봉합한 다음 14시간 경과 후 ether로 치사시켜 위를 적출한 다음 2% formalin 용액 10 ml를 넣고 formalin 용액에 10분간 담구어 고정시켰다. 고정이 완료되면 대만부를 절개하여 발생된 궤양 면적(mm^2)을 현미경($\times 10$)하에서 측정하여 궤양지수 6단계 분류를 기준으로 표시하였다. 선위부에 손상이 발생되지 않은 경우의 지수를 0, 손상면적의 총화가 1-5 mm^2 인 경우 1, 6-10 mm^2 인 경우에 지수 2, 11-15 mm^2 인 경우 3, 16-20 mm^2 인 경우 4, 21-25 mm^2 인 경우 5, 26 mm^2 이상 또는 천공인 경우에 지수를 6으로 하여 평균을 구하였다. 검체는 위의 유문결찰 후 십이지장내로 즉시 주입하였다.

Aspirin에 의한 위궤양

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 Okabe 등(1974)의 방법에 따라 실험하였다.

초산에 의한 위궤양

체중 약 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 Takagi 등(1969)의 방법을 개량하여 실험하였다.

무수 ethanol 위손상에 의한 점액분비량

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후 Robert 등(1979)의 방법을 따라 검체를 경구투여하고 30분 만에 무수 ethanol을 1 ml/100 g씩 경구투여하였다. 투여 1시간 후에 ether 치사시켜 적출한 위점액량을 Kitagawa 등의 방법(1986)에 따라 측정하였다. 즉, 적출한 위의 대만부를 절개하고 뒤집어서 선위부 점막면을 밖으로 노출시킨 후 냉 0.25 M sucrose 용액으로 선위부를 세척한 후 0.1% alcian blue용액(0.16 M sucrose를 함유한 0.05 M CH_3COONa 로 조제)으로 실온에서 2시간 염색한다. 염색된 피복점액층을 채취하고 부착된 alcian blue 결합점액은 30% dioctyl sodium sulfosuccinate를 함유한 70% EtOH 용액 20 ml로 30°C 에서 2시간 추출하였다. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 점액량은 alcian blue의 점량선으로부터 alcian blue의 양(μg)으로서 표시하였다.

지질과산화물 함량 측정

위조직의 지질과산화물은 Uchiyama 등의 방법(Uchiyama와 Mihara, 1979)에 따라 시행하였다. 위조직

균질액 0.5 ml에 1% H_3PO_4 와 0.67% TBA시약을 가하고 95°C에서 45분간 수욕상에서 가열한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4 ml을 가해서 진탕추출한 후 10분간 원심분리하여 butanol층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다

H^+/K^+ ATPase의 활성측정

H^+/K^+ ATPase의 활성은 냉동된 membrane protein(80 μ g protein)을 25 mM Imidazole buffer pH 7.4와 propolis ethanol 추출물, toluene 및 ethyl acetate fraction, 대조약물로서 omeprazole을 assay medium에 가하고 37°C에서 30분간 preincubation 시킨다. 20 mM $MgCl_2$, 20 mM ATP, 200 mM imidazole buffer (pH 7.4) 및 100 mM KCl 또는 증류수를 포함하는 substrate mixture를 0.5 ml 씩 가하고 37°C에서 정확히 15분간 배양한다. 여기에 22% TCA(trichloroacetic acid) 1.0 ml를 가하여 반응을 종결시키고 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리한 후 상정액을 취해 ATP hydrolysis에 의해 생성된 무기인산염의 정량을 실시한다.

Inorganic phosphate의 정량은 이상의 과정을 통해 얻은 상정액에 molybdc acid solution 0.4 ml와 aminonaphthol sulfonic acid 0.2 ml 및 증류수 2.4 ml를 가하여 혼화, 20분간 암소에서 방치 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. H^+/K^+ ATPase preparation 중의 protein 함량은 bovine serum albumin을 표준액으로 하여 Lowry 등 (1951)의 방법에 준하여 측정하였다.

조직학적 검경

1% formalin액에서 고정시킨 검체를 위체부에서 육안손상이 관찰된 부위가 포함되도록 절취하여 다시 10% formalin액으로 고정시킨 후 일반적인 방법에 따라 조직학적 관찰을 실시하였다. 즉, 위조직 절편을 파라핀에 포매한 다음 5~7 μ m의 두께의 microtome으로 세절 후 he-matoxylineosin으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

위염 및 위궤양의 억제율 계산

여러 가지 실험 방법에 의해 위염 및 위궤양을 유발시켰을 때 실험약물에 의한 위염

억제율(%)=

$$\frac{\text{대조군의 지수 (길이)} - \text{약물군의 지수 (길이)}}{\text{대조군의 지수 (길이)}} \times 100$$

및 위궤양의 억제 작용은 다음과 같이 그 지수 또는 길이의 억제율(%)로 나타내었다.

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타냈으며 대조

Table I. Effects of sub-sub fraction of Propolis on HCl-ethanol-induced gastric lesion in rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Lesion length (mm)	Inhibition (%)
Control	-	6	87.5±19.2	-
Step 2-1	25	6	22.5± 8.6**	74.3
Step 2-3	25	6	27.5±15.4*	68.6
Sucralfate	324	6	19.4±10.2**	77.8

The values are mean±S.D.

** : Significantly different from the control group (p<0.05)

** : Significantly different from the control group (p<0.001)

군과 실험군간의 차이는 student's t-test를 사용하여 p 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

Propolis sub-sub fraction의 위염 및 위궤양에 미치는 영향

HCl-ethanol에 의한 위손상

Propolis sub-sub fraction이 HCl-ethanol 유발 위손상에 대해 미치는 영향을 Table 1에 나타내었고 조직학적 검경은 Fig 1, 2, 3에 나타내었다.

대조군의 위손상 길이는 87.5±19.2 mm였으나 propolis step 2-1 sub-sub fraction 25 mg/kg 및 step 2-3 sub-sub fraction 25 mg/kg 투여군에서의 위손상억제율은 각각 74.3 및 68.6 % 였다. 특히 step 2-1 sub-sub fraction의 억제율은 대조군에 비해 유의성이 있었으며 77.8 %의 억제율을 나타낸 sucralfate 투여군과 비교하였을 때 유사



Fig. 1. A photomicrograph of gastric lesion from HCl-ethanol-induced rats. Control (X100). Histological sections of stomach from representative control rat treated orally with HCl-ethanol. Note submucosal edema and extensive erosion.



Fig. 2. A photomicrograph of gastric lesion from HCl-ethanol-induced rats (X 100). Histological section obtained from a rat pretreated orally with propolis step 2-1 sub-sub fraction (25 mg/kg) 1hr before the insult of HCl-ethanol. No abnormalities were observed.

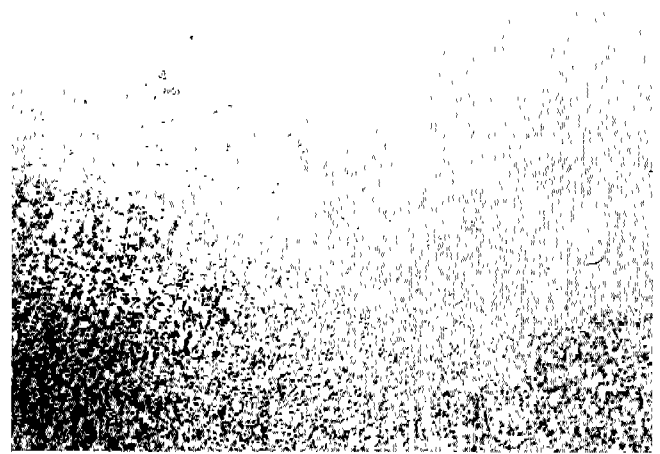


Fig. 3. A photomicrograph of gastric lesion from HCl-ethanol-induced rats (X 100). Histological section obtained from a rat pretreated orally with propolis step 2-3 sub-sub fraction (25 mg/kg) 1 hr before the insult of HCl-ethanol. No abnormalities were observed.

한 위손상 억제효과를 보였다. 조직학적 검경에서 Step 2-3 투여군에서 대조군에서 나타난 점막하층의 부종과 erosion이 치유된 것을 확인하였다.

위액분비량, pH 및 산분비량

Propolis sub-sub fraction이 위액분비량, pH 및 산분비량에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다.

대조군의 위액분비량은 6.70 ± 1.74 ml/4 hrs 였으나

step 2-1 sub- sub fraction 및 step 2-3 sub-sub fraction 투여군에서는 각각 1.73 ± 0.92 및 4.62 ± 0.53 ml/4hrs 의 위액분비 감소를 보였다. 특히 step 2-1 sub-sub fraction 투여는 74.2 %의 위액분비 효과를 나타내어 유의성 있는 감소효과를 관찰할 수 있었으며 이결과는 cimetidine 투여군과 비교하였을 때 유사한 위액분비억제효과를 나타내었다. pH의 경우는 대조군의 경우 1.77 ± 0.41

Table II. Effects of sub-sub fraction of Propolis on gastric secretion in pylorus ligated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.d.)	No. of animals	Volume (ml)	pH	TAO (mEq/4 hrs)
Control	-	6	6.70 ± 1.74	1.76 ± 0.42	551.7 ± 178.0
Step 2-1	25	6	$1.73 \pm 0.92^{***}$	2.65 ± 0.70	$104.5 \pm 55.2^{***}$
Step 2-3	25	6	$4.62 \pm 0.53^*$	1.82 ± 0.07	427.0 ± 74.2
Cimetidine	150	6	$1.75 \pm 0.42^{***}$	$3.12 \pm 0.40^{**}$	$125.8 \pm 84.4^{***}$

The values are Mean±S.D.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

** : Significantly different from the control group ($p < 0.01$)

Table III. Effects of sub-sub fraction of Propolis on Shay-ligated, aspirin, acetic acid-induced ulcer in rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.d.)	No. of animals	Ulcer index	Lesion length (mm)	Ulcer area (mm ²)
Control	-	6	5.1 ± 1.6	46.3 ± 27.6	32.5 ± 18.5
Step 2-1	25	6	$1.9 \pm 1.2^{**}$	$13.3 \pm 5.7^*$	$0.8 \pm 0.4^{***}$
Step 2-3	25	6	$2.4 \pm 1.5^*$	16.5 ± 12.1	$5.0 \pm 2.6^*$
Cimetidine	150	6	$2.0 \pm 1.2^{**}$	$11.4 \pm 4.9^{**}$	4.5 ± 0.6

The values are mean±S.D.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

** : Significantly different from the control group ($p < 0.01$)

***: Significantly different from the control group ($p < 0.001$)

의 강한 산성을 나타내었으며 step 2-1 sub-sub fraction에서는 2.65 ± 0.70 로 약간의 pH 상승을 확인할 수 있었으며 step 2-3 sub-sub fraction 투여군에서는 1.82 ± 0.07 를 나타내었다. 대조약물인 cimetidine 투여군에서는 위액량의 감소 뿐만 아니라 pH의 증가도 관찰되었다. 4시간 산분비량을 관찰한 결과 대조군에서는 551.67 ± 177.97 mEq/4 hrs 였으나 step 2-1 sub-sub fraction에서는 104.5 ± 55.20 , step 2-3 sub-sub fraction에서는 427 ± 74.24 mEq/4 hrs 를 나타냄으로써 감소를 보였고 특히 step 2-1 sub-sub fraction에서는 80 %의 산분비량 억제율을 나타내어 산분비 억제 작용을 갖는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

Shay, aspirin, 초산에 의한 급·만성 위궤양

Propolis sub-sub fraction이 Shay, aspirin에 의한 급성 위궤양과, 초산에 의한 만성위궤양에 미치는 영향은 Table 3와 같다.

24시간 절식시킨 흰쥐의 위문을 결찰하여 십이지장으로 검체를 주입하고 14시간 경과 후 Shay 위궤양에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군에서는 선위부에 반점형의 극심한 출혈성 위손상을 관찰되었고 천공에 따른 사망수의 증가로 5.1의 ulcer index를 나타내었다. Propolis의 step 2-1 sub-sub fraction 투여군에서 사망수도 낮았으며 ulcer index가 1.9로 나타나 62.8%의 우수한 항궤양 효과를 관찰할 수 있었다.

Propolis sub-sub fraction의 aspirin 유발 위궤양에 대한 실험에서 24시간 절식시킨 흰쥐를 유문결찰시킨 후 propolis sub-sub fraction을 십이지장 내로 주입하고 aspirin을 200 mg/kg 경구투여하여 위저부에 발생한 위손상의 길이(lesion length)를 측정된 결과 대조군은 45.2 mm의 위손상을 나타내었으나 propolis step 2-1 sub-sub fraction 25, step 2-2 sub-sub fraction 25 mg/kg 투여군에서는 각각 71.3% 및 63.3%의 위손상 억제율을 나타냈으며 특히 step 2-1 투여군에서는 cimetidine 투여군과 유사한 위궤양 억제효과를 확인할 수 있었다.

Shay, aspirin에 의한 급성위궤양실험에서 위저부의 뚜렷

한 반점형의 위손상과 천공의 형태학적 변화의 주된 원인에 대해 산의 과다분비에 의한 것이라기 보다는 유문을 결찰함으로써 15시간 동안 과량의 위액을 저류시켜 저류된 위액내의 산과 pepsin이 위벽의 손상을 일으킨다고 주장하였으며 유문결찰에 의한 위장의 허혈은 호중구에서의 자유유리기의 유리를 초래하여 조직에 산화적 손상을 일으켜 실험적 위궤양에 있어서 중요한 역할을 담당한다고 한다 (Takeuchi 등, 1988). 약물 투여군에서 40% 이상의 위손상 억제율을 확인할 수 있었고 대조군인 cimetidine군과 유사한 억제효과를 나타냄으로써 sub-sub fraction투여군이 축적된 위액에 대한 방어작용을 강화시키고 산화적 스트레스에 저항성을 갖게 하는 항궤양 물질이 존재함을 추정할 수 있었다.

초산에 의한 만성위궤양실험에서 궤양을 유발시킨 후 11일 동안 step 2-1 25 mg/kg, step 2-3 25 mg/kg과 대조약물인 cimetidine 100 mg/kg을 1일 1회 경구투여한 후 궤양 면적(ulcer area)을 구한 후 위손상 억제율을 측정된 결과 각각 97.9%, 84.6% 및 86%로 유의성있는 결과를 나타내었으며 특히 step 2-1 투여군은 우수한 궤양억제작용을 나타내었다. Uchida 등 (1989) 은 초산위궤양의 자연치유효과에 대한 PGE의 생성에 관한 연구를 통해 초산 궤양의 치유가 PGE₂의 증가에 의한 효과라고 보고하였다. Propolis sub-sub fraction투여군의 억제효과는 점액의 증가 및 유리기의 감소에 의한 효과일 것으로 생각된다.

무수 ethanol 위손상에 의한 점액분비량

Propolis sub-sub fraction이 무수 ethanol 위손상에 의한 점액량에 미치는 작용을 Table 4에 나타내었다.

24시간 절식시킨 흰쥐에 무수 ethanol을 경구투여 한 후 점액량을 측정된 결과 대조군에서는 180.2 ± 44 μ g의 함량을 보였으나 propolis sub-sub fraction 투여에 의해 증가

Table IV. Effects of sub-sub fraction of Propolis on mucus contents in absolute ethanol-induced rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Mucus contents (μ g as alcian blue)
Control	-	6	180.2 ± 44.1
Step 2-1	25	6	$388.4 \pm 246.2^{**}$
Step 2-3	25	6	$324.0 \pm 172.0^*$
Cimetidine	150	6	204.5 ± 92.7

The values are mean \pm S.D.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

** : Significantly different from the control group ($p < 0.01$)

Table V. The malondialdehyde level sub-sub fraction of Propolis on HCl.ethanol-induced gastric lesion and aspirin-induced ulcer in rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.d.)	No. of animals	Malondialdehyde level (nmol/mg protein)	
			HCl.ethanol lesion	ASA-induced ulcer
Control	-	6	4.68 ± 1.46	6.37 ± 2.14
Step 2-1	25	6	4.78 ± 1.47	$3.08 \pm 1.50^*$
Step 2-3	25	6	$1.11 \pm 0.05^{**}$	$2.18 \pm 0.46^*$
Cimetidine	150	6	-	4.65 ± 1.14
Sucralfate	324	6	10.33 ± 3.70	-

The values are mean \pm S.D.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

** : Significantly different from the control group ($p < 0.01$)

Table VI. Inhibitory effects of sub-sub fraction of Propolis and omeprazole on H⁺/K⁺ ATPase activity at pH 6.4 in hog gastric microsomes

Treatment	Final Conc. (mg/ml)	K (+)	K (-)	K (+)-K (-)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
Control	-	0.511	0.162	0.349	-	
Step 2-1	1	0.069	0.083	-0.014	103	0.096
	0.1	0.310	0.112	0.198	43.3	
	0.01	0.487	0.157	0.330	5.6	
	0.001	0.501	0.159	0.342	2.0	
Step 2-3	1	0.100	0.121	-0.022	105	0.110
	0.1	0.372	0.140	0.232	33.7	
	0.01	0.492	0.160	0.333	4.7	
	0.001	0.508	0.163	0.346	1.0	

되는 경향을 보였다. 특히 step 2-1 투여군에서는 388.4±246.2 µg으로 대조약물로 투여한 cimetidine 투여군의 204.5±92.7 µg보다 증가하였다. 부수에탄올 투여 점액에서 채취한 점액량을 측정된 결과 대조약물인 cimetidine 투여군에서는 증가 경향을 관찰할 수 없었으나, step 2-1 sub-sub fraction에서는 116%의 우수한 증가율을, step 2-3 sub-sub fraction에서는 80%의 증가율을 나타내 propolis의 항궤양효과가 부분적이기는 하지만 cimetidine과는 달리 점막의 방어인자인 점액분비 생성을 증가시킴으로써 발휘하는 것임을 추정할 수 있었다. 본 실험에서 propolis sub-sub fraction 투여군이 나타내는 위염 및 위궤양에 대한 억제 효과의 한 요인으로서 위점막의 점액층의 증가를 확인할 수 있었다.

지질과산화물 함량

Propolis sub-sub fraction이 지질과산화물에 미치는 영향은 Table 5와 같다.

자유유리기는 세포와 조직 손상의 강력한 매개체로 알려져 있고 그 자유유리기들이 alcohol(Salim, 1990), aspirin, 스트레스 또는 허혈·재관류(Glavin과 Szabo, 1992) 자극 하에서 위점막을 손상시키는데 중요한 역할을 한다는 연구 결과에 의해 HCl-ethanol 유발 위손상 실험과 aspirin 유발 위궤양 실험에 대한 propolis sub-sub fraction의 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 측정된 결과 HCl-ethanol 유발 위손상 실험에서는 step 2-3 sub-sub fraction에서 1.11±0.05 nmol/mg protein의 유의적인 지질과산화물의 감소효과를 확인할 수 있었다.

또한 Aspirin 유발 위궤양 실험에서는 step 2-1 sub-sub fraction 투여군에서 3.08±1.50 nmol/mg protein, step 2-3 sub-sub fraction 투여군에서 2.18±0.46 nmol/mg protein 및 cimetidine 투여군에서는 4.65±1.14 nmol/mg protein으로 감소경향을 보였다. 이러한 연구결과들을 고려할 때 본 연구자는 propolis 추출물의 다양한 약리 작용에 의한 알코올 유발 출혈성 급성 위궤양과 aspirin에 의한 급성 위

궤양에 대해 보호작용은 부분적이거나 자유유리기 제거작용이 관여하는 것으로 생각된다.

H⁺/K⁺-ATPase의 활성

Propolis sub-sub fraction 투여군이 H⁺/K⁺ ATPase의 활성에 미치는 영향은 Table 6과 같다.

대조군의 H⁺/K⁺ ATPase 활성 저하로 인한 흡광도는 0.349였으며 propolis step 2-1 sub-sub fraction 1, 0.1, 0.01 및 0.001 mg/ml의 용량에서 각각 103, 43.3, 5.6 및 2.0%의 저해율을 나타내었다. Step 2-3 sub-sub fraction의 경우는 1, 0.1, 0.01 및 0.001 mg/ml의 용량에서 105, 33.7, 4.7 및 1.0%의 저해율을 나타내었다. 각각의 IC₅₀은 0.096과 0.110 mg/ml였고 대조약물인 omeprazole의 경우 IC₅₀은 5 µg/ml였다.

2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin의 위염 및 위궤양에 미치는 영향

HCl-ethanol에 의한 위손상

대조군의 위손상 길이는 101.0±18.0 mm였으나 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin를 그 수득율에 따라 10, 3 및 15 mg/kg 투여한 군에서는 각각

Table VII. Effects of 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin and chrysin on HCl-ethanol⁻ induced gastric lesion in rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Lesion length (mm)	Inhibition ratio (%)
Control	-	101.0±18	-
2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone	10	60.2±15.9**	40.4
Galangin	3	56.3±23.4*	44.4
Chrysin	15	66.0±32.5	34.7
Sucralfate	324	39.5±9.3**	60.9

The values are Mean±S.D.

*: Significantly different from the control group (p<0.05)

** : Significantly different from the control group (p<0.001)

Table VIII. Effects of 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin and chrysin on aspirin-induced ulcer in rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.d.)	Lesion length (mm)	Inhibition (%)
Control	-	25.60±6.58	-
2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone	10	9.27±4.97*	64.2
Galangin	3	13.25±6.80*	48.2
Chrysin	15	20.50±12.28	19.9
Sucralfate	324	7.40±6.31**	71.7

The values are mean±S.D.

*: Significantly different from the control group (p<0.05)

** : Significantly different from the control group (p<0.001)

40.4, 44.4 및 34.7%의 억제율을 나타내었다. Sucralfate 투여군은 60.9%의 억제율을 나타내었다.(Table 7)

Aspirin에 의한 위궤양

24시간 절식시킨 흰쥐를 유문결찰시킨 후 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin을 십이지장 내로 주입하고 aspirin을 200 mg/kg 경구투여하여 위저부에 발생한 위손상의 길이를 측정된 결과 대조군은 25.60±6.58 mm의 위손상을 나타내었으나 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin에서 각각 9.17±4.97, 13.25±6.80 및 20.50±12.28 mm의 위손상을 나타내었다. 대조약물인 cimetidine 투여군에서는 7.40±6.31 mm의 위손상을 나타내어 71.5%의 억제효과를 나타내었다. 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin에서 각각 64.2, 48.2 및 19.9%의 억제율을 나타내었다.

Table IX. The malondialdehyde level of 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin and chrysin on HCl-ethanol-induced gastric lesion and aspirin-induced ulcer in rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	Malondialdehyde level (nmol/mg protein)	
			HCl-ethanol lesion	ASA induced ulcer
Control	-	6	4.27±0.64	8.12± 3.27
2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone	10	6	2.34±1.47*	4.50±2.81
Galangin	3	6	3.14±1.00**	2.00± 0.72**
Chrysin	15	6	2.85±0.49*	0.98±0.87**
Cimetidine	150	6	-	4.65±1.14*
Sucralfate	324	6	10.33±3.70	-

The values are mean±S.D.

*: Significantly different from the control group (p<0.05)

** : Significantly different from the control group (p<0.001)

다. (Table 8)

지질과산화물 함량

propolis 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin의 HCl-ethanol 유발 위손상 실험군에 있어서 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 측정된 결과 유의성 있는 감소의 경향을 보였으며 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone의 지질과산화물 함량이 가장 낮았다. 반면 sucralfate 투여군에서는 지질과산화물생성의 지표물질인 malonaldehyde의 함량이 2배 이상 증가되는 경향을 보였다.

Aspirin 유발 위손상 실험의 지질과산화물에 대한 함량을 측정된 결과 cimetidine 대조약물군을 포함한 모든 군에서 감소를 보였고 특히 chrysin에서는 유의성있는 저하를 관찰할 수 있었다. (Table 9)

H⁺/K⁺-ATPase의 활성

대조군의 H⁺/K⁺ ATPase의 활성 저하로 인한 흡광도는 0.349였으며 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin 각 66 µg/ml(pH 7.4)에서는 각각 10, 4 및 0%였다. 이것을 10배 희석했을 경우(6.6 µg/ml) pH 7.4에서의 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin의 효소억제율은 각각 2, 3 및 0%였다. pH 6.4에서 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin 66 µg/ml는 각각 40, 12 및 0%의 효소억제율을 나타내었다. 또한 이것을 10배 희석한 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin(6.6 µg/ml)에서는 각각 5, 11, 5 및 38%의 효소억제율을 보였다. 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone의 IC₅₀은 100 µg/ml로 나타났으며 galangin과 chrysin은 측정할 수 없었고 대조약물인 omeprazole의 경우 IC₅₀은 5 µg/ml였다. (Table 10)

본 연구자는 일련의 실험을 통해 propolis sub-sub fraction은 위내 acid output과 위액량을 저하시키고 pH를 증가시켜 ulcer index와 궤양의 크기가 감소됨으로써 항위염 및 항위궤양 효과를 나타내었으며 활성 성분이 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin 및 chrysin이라

Table X. Inhibitory effects of 2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone, galangin and omeprazole on H⁺/K⁺ ATPase activity at pH 7.4, 6.4 in hog gastric microsomes

Treatment	Stock Conc. (µg/ml)	% inhibition				IC ₅₀ (µg/ml)
		pH 7.4		pH 6.4		
		A	A*1/10	A	A*1/10	
2-acetoxy-5,7-dihydroxy-flavanone	66	10	2	40	5	100
Galangin	66	4	3	12	11	-
Chrysin	66	0	0	0	5	-
OME	35	57	2	95	38	5

는 것을 확인하였다. 이들 fraction 및 활성 성분의 항위염 및 항위궤양 작용은 위점막의 점액분비의 촉진, 지질과산화물의 생성억제 및 H^+/K^+ ATPase 활성 억제에 의한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Amoros M., Simoes C. M., Girre L., Sauvager F. and Cormier M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1732-1740.
- Amoros M., Lurton E., Boustie J., Girre L. and Cormier M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.*, **57**, 644-647.
- Bankova V., Christov R., Stoev G. and Popov S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography *J. Chromatogr.* **607**, 150-153.
- Chopra S., Pillai K. K., Husain S. Z. and Giri D. K. (1995). Propolis protects against doxorubicin-induced myocardio-pathy in rats *Exp. Mol. Pathol.* **62**(3), 190-198.
- Fesen M. R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yung J. and Kohn K. W. (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds *Biochem. Pharmacol.* **48**(3), 595-608.
- Glavin, G. and Szabo, S. (1992). Experimental gastric mucosal injury; laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J.* **6**, 825-831.
- Ivanovska N. D., Dimov V. B., Bankova V. S. and Popov S. S. (1995). Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo* *J. Ethnopharmacol.* **47**(3), 145-147.
- Kedzia, B. and Holderna-Kedzia E. (1991). Chemical composition of propolis in up-to-date studies. *Herba Polonica (Poland)*, **37**(2), 95-110.
- Kitagawa H., Takeda F. and Kohei H. (1986) *Arzneim. Forschung*, **36**, 1240.
- Koga T., Kawada H., Utsui Y., Domon H., Ishii C. and Yasuda K. (1996). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of plaunotol, a cytoprotective antiulcer agent, against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**(5), 919-929.
- Kujumgiev A., Bankova V., Ignatova A. and Popov S. (1993). Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie (Germany)*, **48**, 785-786.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mizui T. and Doteuchi M. (1983). Effect of polyamines on acidified HCl-ethanol induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **33**, 939.
- Okabe S., Takeuchi K., Nakamura K. and Takagi K. (1974) *Jpn. J. Pharmacol.* **24**, 363.
- Pascual C., Gonzalez R. and Torricella R. G. (1994). Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol.* **41**, 1-2, 9-13.
- Ramirez D., Gonzalez A., Rodriguez S., Gonzalez R. and Ramos M. E. (1994). Hepatoprotective effect of the cuban red propolis on the toxicity induced in mice by the administration of acetaminophen *Revista Cubana de Farmacia (Cuba)*, **28**(1), 45-54.
- Rao C. V., Desai D., Rivenson A., Simi B., Amin S. and Reddy B. S. (1995). Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res.* **55**, 2310-2315.
- Rapta P., Misik V., Stasko A. and Vrabel I. (1995). Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free. Radic. Biol. Med.* **18**, (5) 901-8.
- Robert, A., Nezaims, J. E., Lancaster, C. and Hanchar, A. J. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats; Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* **77**, 433-443.
- Said M. M. and Abdel-Aziz S. F. (1990). Some biological aspects of propolis (bee glue). Part 2. Propolis as hypoglycemic agent *J. Drug Res.*, **19**, 245-253.
- Salim A. S. (1990). Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion* **47**, 24-28.
- Serkedjieva J., Manolova N. and Bankova V. (1992). Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogs (esters substituted cinnamic acids) *J. Nat. Prod.*, **55**, 294-297.
- Shay H., Komarov S. A., Fels S. S. and Meranze D. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* **5**, 43-61.
- Soll A. H. and Isenberg J. I. (1983). Duodenal ulcer diseases. In: Sleisinger MH, Fordtran JS (eds). *Gastrointestinal Disease*. Philadelphia, WB Saunders, 625-672.
- Takagi K. and Okabe S. (1969) *Jpn. J. Pharmacol.* **24**, 363.
- Takaisi K. N. B. and Schilcher H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* **60**(3), 222-227.
- Takaji Y., Kazuyuki A., Shinichi Y., Senichi N. and Kentaro K. (1993). Biochemical and pharmacological properties of newly synthesized proton pump (H^+/K^+ -ATPase) inhibitor, TY-11345 in experimental animals. *Jpn. J. Pharmacol.* **62**, 363-371.
- Takeuchi K. and Okabe S. (1988) *Digestive Disease and Science* **33**, 1.
- Uchida, M., Kawano, O., Misaki, N. and Irino, O. (1989). Healing process of acetic acid-induced gastric ulcer and gastric mucosal prostaglandin E generation level in rats. *J. J. Pharmacol.* **50**, 366.
- Vennat B., Arvouet G. A., Gross D. and Pourrat A. (1995). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract *J. Pharmacie. Belgique.*, **50**, 438-444.