

애엽 추출물의 *Helicobacter pylori* 세포 내 Urease 활성 억제

박 찬 엘 · † 박 창 호

경희대학교 화학공학과

(접수 : 2004. 7. 7., 게재승인 : 2004. 9. 27.)

Inhibition of Urease Activity of *Helicobacter pylori* by *Artemisia asiatica* Nakai

Chan-El Park and Chang-Ho Park†

College of Environment and Applied Chemistry, Kyung Hee University, Yongin-si, Kyunggi-do 449-701, Korea

(Received : 2004. 7. 7., Accepted : 2004. 9. 27.)

Ethanol (70%) extract of *Caesalpinia sappan* L. and *Forsythiae suspensa* Vahl. showed 84% and 72% of anti-urease activity against *Helicobacter pylori*, respectively. Among the fraction of *Artemisia asiatica* Nakai extract using methanol (80%), water, ethyl acetate and butanol ethyl acetate fraction showed 90% of the anti-urease activity.

Key Words : Urease activity, *Helicobacter pylori*, *Artemisia asiatica* Nakai, ethyl acetate fraction

서 론

*H. pylori*는 위염, 위궤양, 십이지장 궤양 및 위암의 원인균으로 알려져 있다. *H. pylori*는 위 점막을 덮고 있는 점액층에서 최초 발견되었고(1), 그람 음성간균으로서 미호기적 조건에서 잘 자라며 최적 성장 온도와 pH는 각각 30-37°C와 7.0-7.4이다(2). *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 조직액내에 있는 요소를 분해하여 암모니아와 CO₂를 발생시켜 균체 주위를 알칼리성으로 만들어 위 내부의 강산을 중화하는 작용이 있다(3).

*H. pylori*의 또 다른 특징은 균체의 한쪽 혹은 양쪽에 막으로 둘러싸인 flagella가 하나, 또는 타래뿔치로 존재하고 있어서 운동성이 강하다는 점으로 *H. pylori*의 운동성은 *E. coli*와 비교하여 약 20배 이상의 점도를 가진 점액에서도 움직일 수 있는 것으로 알려져 있다(4).

*H. pylori*에 의한 감염을 치료하는 방법으로는 bismuth 제제, metronidazole, amoxicillin, tetracycline 등을 포함하는 3가지 항균제를 동시에 투여하는 방법이 유효한 것으로 보고되었다(5). 그러나 이러한 치료법은 환자의 순응도를 필요로 하

고, 항생제에 대한 내성, 재발 가능성의 내재, 고비용 등의 문제가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에 백리향(6), 중국차(7), Cashew apple(8), 소목과 황련(9), 연교(10) 등 여러 천연물의 *H. pylori*에 대한 항균활성이 연구되었다.

본 연구에서는 민간에서 많이 이용되는 애엽 및 갈근, 그리고 시중의 유제품에 함유된 소목(9)과 최근 본 실험실에서 연구된 연교(10) 추출물의 urease 활성 억제 능력을 비교하였고, 또한 한방치료에서 살균 및 항균 효과가 있다고 알려진 (11) 애엽 추출물을 분획하여 urease 활성 억제 능력을 측정하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

*Helicobacter pylori*는 경상대학교 의과대학에서 분양 받은 ATCC 43504를 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 10% horse serum (JRH Bioscience, USA)을 첨가한 brucella broth (Difco, USA)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 진탕배양기 (Vision Science, Korea)에 고정하여 회전속도 (180 rpm)를 제어하였다.

균주의 단기보존 및 CFU (colony forming unit) 측정을 위한 고체배지 또한 brucella agar 배지를 이용하였으며 이때도

† Corresponding Author : College of Environment and Applied Chemistry, Kyung Hee University, Yongin-si, Kyunggi-do 449-701, Korea

Tel : +82-31-201-2531, Fax : +82-31-202-1946

E-mail : chpark@khu.ac.kr

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 냉장보관 하였고, 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 염색하였다. Ethanol (Becton Dickinson, USA)에 1분간 세척한 후 carbol fuchsin (Becton Dickinson, USA)으로 10분간 염색하였다. 모든 과정이 끝난 후 건조하여 광학 현미경 (×1500)으로 morphology를 관찰하여 오염여부를 확인하였다.

대상 한약재의 선정 및 용매추출

대상 한약재는 주로 전통동양약물 데이터베이스(12)와 한국의 자원식물에 관한 문헌자료(13) 중 urease 활성억제 효과가 입증된 소목(9)과 연교(10), 그리고 민간에서 많이 쓰이고 있는 대표적 야생종인 애엽과 갈근을 선별하였다(Table 1). 각 한약재에 대하여 에탄올 추출과 함께 한약재를 복용하는 조건에서의 효능을 알아보기 위하여 물 추출도 병행하였다. 에탄올 추출은 각 한약재 10 g을 70%의 에탄올 100 ml에 넣고 80℃에서 1시간 동안 추출하였고, 물 추출은 각 한약재 10 g을 물 100 ml에 넣고 100℃에서 1시간 동안 추출하였다. 각 추출물은 여과지(Whatman No.1, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 감압농축기 (Eyela NE, Japan)에서 농축하였다. 각 추출액은 제균을 위하여 0.2 μm의 syringe filter로 여과하였고, 농축액의 최종농도는 100 mg/ml로 하였다.

Table 1. Medicinal plants used for the experiments

Korean name	Botanical name
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.
소목	<i>Caesalpinia sappan</i> L.
연교	<i>Forsythiae suspensa</i> Vahl.
애엽	<i>Artemisia asiatica</i> Nakai

한약재 추출물의 Urease 활성억제 효과검색

4종의 한약재에 대하여 urease 활성억제능을 측정하였다. Urease 활성억제능은 *H. pylori* bacterial suspension (20 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 이

용하여 560 nm에서 측정하였다. Urease의 작용에 대한 한약재의 억제 효과가 커질수록 요소가 적게 분해되어 pH 증가가 적을 것이며 phenol red는 오렌지색이 유지되어 Optical Density가 상대적으로 낮은 성질을 이용하였다.

애엽 추출물의 분획 실험 및 *H. pylori*의 urease 활성 억제 측정

*H. pylori*의 urease 활성억제 실험에서 한국의 산야에 널리 자생하고 있는 애엽 (*Artemisia asiatica* Nakai)을 대상으로 메탄올로 1차 추출하고, 물, 에틸아세테이트 (ethyl acetate) 및 부탄올을 이용한 분획 실험을 수행하였다. 건조된 애엽 50 g을 분말로 하여 80% 메탄올 (Ducksan Pharm, Korea) 2.5 L로 24시간 추출하여 여과 (Whatman No.1, Whatman International Ltd., Maidstone, England)하였다. 여과하여 얻어진 여과액 1.5 L를 감압농축기로 감압 농축하여 암갈색의 농축물 200 ml를 얻었다. 이 농축물 200 ml에 에틸아세테이트 (Ducksan Pharm, Korea) 200 ml와 증류수 100 ml를 가하여 혼합시킨 후 물 층과 에틸아세테이트 층으로 나누었다. 물 층은 다시 부탄올 (Ducksan Pharm, Korea) 100 ml을 넣어 혼합하여 물 층과 부탄올 층으로 나누었다. 물, 에틸아세테이트 및 부탄올 층을 감압 농축하여 각 분획별로 농축물을 얻었고, 각 분획 농축물의 최종 농도를 100 mg/ml로 하여 *H. pylori*에 대한 urease 활성억제능을 측정하였다.

결과 및 고찰

한약재 추출물의 urease 활성억제 효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 주목할 만한 것으로서 다량의 urease (urea aminohydrolase) 생성 능력이 보고되었고 이 urease는 1분자의 urea에서 2분자의 ammonia와 하나의 수소이온을 생성함으로써 pH를 상승시켜 위액의 강한 산성조건에서도 *H. pylori*가 살아갈 수 있도록 도와주는 것으로 추정된다(14). 따라서 urease의 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있기 때문에 본 연구에서 한약재 추출물의 urease 활성 억제 효과를 연구하였다.

4가지 한약재 추출액의 최종농도를 100 mg/ml로 맞추고 urease 활성억제 효과를 spectrophotometer를 사용하여 O.D.로 측정하였다. 4가지 약재 중 소목 (*Caesalpinia sappan* L.)과 연교 (*Forsythiae suspensa* Vahl.)의 70% 에탄올 추출물은 O.D. 값이 0.15와 0.2로서 강한 urease 활성억제 효과가 있었으며, 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 각각 84%와 72%의 활성이 억제되었다. 이러한 결과는 문헌상의 결과와 유사하였다(9, 10). 소목 및 연교에 비해 낮기는 하지만 애엽과 갈근의 경우에도 urease 활성 억제능력이 있음이 확인되었다. 연교, 애엽, 갈근의 경우 에탄올 추출물과 물 추출물의 urease 활성억제 효과에 큰 차이점이 없었으나 소목은 에탄올 추출물이 물 추출물 비해 더 강한 urease 활성억제를 나타내었다(Fig. 1, 2). 소목과 연교의 경우에는 분획물의 urease 활성 억제에 대해 이미 보고된 문헌이 있기 때문에(9, 10) 본 연구에서는 한국에서 자생하는 대표적인 야생종으로

식용 또는 약용으로 많이 이용되고 있는 애엽을 대상으로 분획물의 urease 활성억제를 연구하였다.

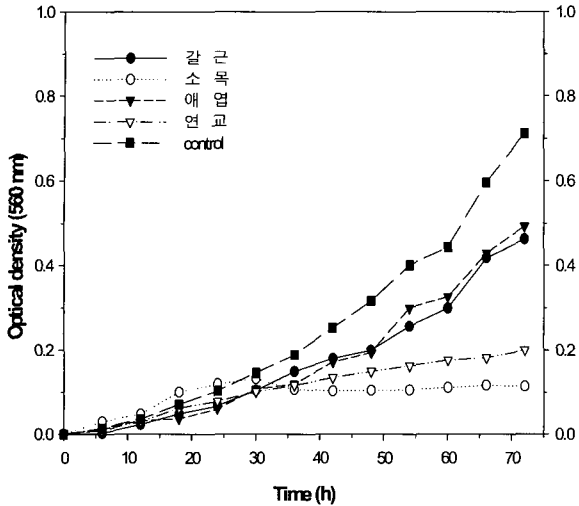


Figure 1. Inhibition of *H. pylori* urease activity by medicinal plant extracts (70% ethanol extraction at 80°C).

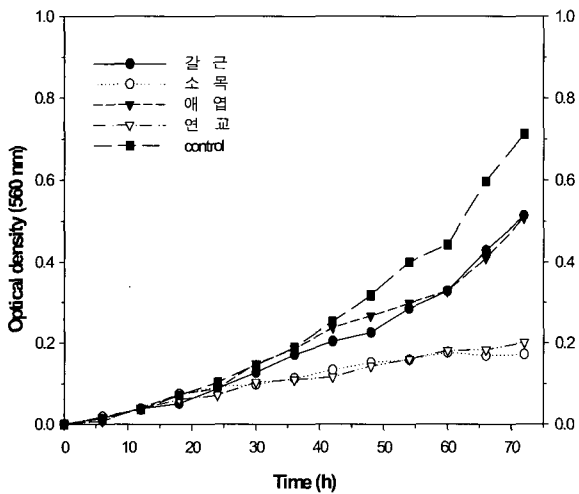


Figure 2. Inhibition of *H. pylori* urease activity by medicinal plant extracts (water extraction at 100°C).

애엽 분획물에 대한 *H. pylori* 세포 내의 urease 활성 억제 효과

애엽은 한방에서 지혈제, 소화제, 구충제 등으로 사용되며 위장병, 변비, 신경통, 천식, 부인병 등의 치료에 효험이 있다고 하며, 향기성분이나 정유성분은 살균, 항균 및 항종양 등의 여러 가지 생리적 활성이 있는 것으로 알려져 있다(11, 15). 애엽을 메탄올로 1차 추출한 후 2차로 극성이 다른 용제인 물, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 각 분획물에 대한 urease 활성억제 효과를 검색하였다. 메탄올을 사용한 1차 추출물의 경우 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 O.D. 값이 62% 감소하였다. 물과 부탄올을 이용한 2차 추출에서는 대조군과 비교하여 O.D. 값이 64% 및 52% 감소하였다. 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 대조군과 비교하

여 O.D. 값이 90% 감소하는 것으로 보아 에틸아세테이트 분획물 중에 urease 활성억제 물질이 가장 많이 포함되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

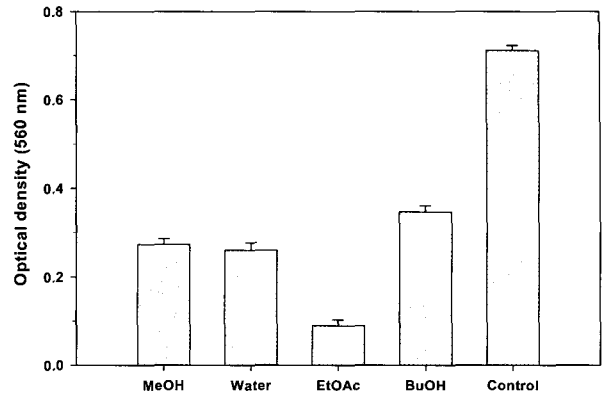


Figure 3. Inhibition of *H. pylori* urease activity by different fractions of *Artemisia asiatica* Nakai (MeOH : Methanol, EtOAc : Ethyl acetate, BuOH : Butanol).

애엽에는 일반적으로 cineol, thujone, caryophyllene, humulene, linalool, artemisia alcohol, camphor, farnesol, borneol 등이 함유되어 있으며, 앞에는 tetracosanol, β -sitosterol, *l*-chebulachitol, *l*-inositol 등을 함유하고 있다(16, 17). 이러한 애엽의 성분 중 항균효과가 있는 것으로 보고된 (11) caryophyllene과 farnesol이 *H. pylori*의 urease 활성억제 능력을 가지는 성분이라고 생각된다. 그러나 유효성분을 확인하기 위해서 에틸아세테이트 분획으로부터 단일성분을 분리, 동정하여 활성을 검색하는 실험이 필요하다.

요 약

4종 한약재에 대한 70% 에탄올 추출물의 *Helicobacter pylori* 세포 내 urease 활성억제능은 한약재 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 소목 (*Caesalpinia sappan* L.) 추출물의 경우 84%, 연교 (*Forsythiae Fructus*)의 추출물의 경우 72%, 애엽 (*Artemisia asiatica* Nakai) 추출물의 경우 31%이었다. 그러나 애엽의 80% 메탄올 추출물을 2차로 물, 에틸아세테이트 및 부탄올로 분획하였을 때 에틸아세테이트 분획에서 urease 활성억제 능력이 90%로 향상되었다.

감 사

이 연구는 2004년도 경희대학교 지원에 의한 결과입니다. 실험을 도와준 송기로 및 양은희 학생에게 감사한다.

REFERENCES

1. Warren, J. R. and B. J. Marshall (1983), Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet*. 1, 1273-1275.

2. 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.
3. 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.
4. Hazell, S. L. and A. Lee (1988), *Campylobacter pylori* in health and disease: an ecological perspective. *Microbial Ecology in Health and Disease.* **1**, 1-16.
5. 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.
6. Tabak, M., R. Artom, I. Potasman, and I. Neeman (1996), *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme, *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 667-672.
7. 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.
8. Kubo, J., J. R. Lee, and I. Kubo (1999), Anti-*Helicobacter pylori* agents from the Cashew Apple, *Agric. Food Chem.* **47**, 533-537.
9. 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*, *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 764-770.
10. Yoon, Y. S., S. H. Lee, N. I. Baek, H. Y. Kim, and C. H. Park (2004), Inhibition of Cell Growth and Urease Activity of *Helicobacter pylori* by Medicinal Plant Extracts, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**(3), 187-191.
11. Kim, Y. S., M. N. Kim, J. O. Kim, and J. H. Lee (1994), The effect of hot water-extract and flavor compounds of Mugwort on microbial growth, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**(6), 994-1000.
12. Seoul National University Natural Products Research Institute (1996), TradiMed - *Traditional oriental medicines database*, Seoul Systems Co., Ltd.
13. Kim, T. J. (1996), Korean resource plants, Seoul National University Press, Seoul, Korea.
14. 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*, *J. Korean Soc. Microbiol.* **26**, 531-540.
15. Lee, S. J. (1975), Studies on the origin of Korean folk medicines, *Korean J. Pharmacog.* **6**(2), 75-92.
16. Seoul National University Natural Products Research Institute (2003), Treatise on Asian herbal medicines, p273, Seoul National University Press, Seoul, Korea.
17. Kang, B. S. (1999), *Herbology*, 5th ed., p405, Young Lim Press, Seoul, Korea.