

*Helicobacter pylori*의 생육에 대한 Daidzein의 저해 특성

- 연구노트 -

배경미 · 이주연 · 이희섭[†]

부산대학교 식품영양학과

Inhibitory Mechanism of Daidzein on *Helicobacter pylori* Growth

Kyung Mi Bae, Ju Youn Lee, and Heeseob Lee[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the inhibitory effects of daidzein against *H. pylori* and its cholesterol α -glucosyltransferase (CHLaGcT). CHLaGcT is responsible for the production of α -glucosyl cholesterol which constitutes more than 25% of cell wall lipids in *H. pylori*, and it has been suggested that it is essential for *H. pylori* viability. CHLaGcT was inhibited by daidzein, in a dose-dependant manner, of which IC₅₀ value was 128.5 μ M. Daidzein also showed the inhibitory effect toward *H. pylori* growth by paper disc diffusion assay. Therefore, it is thought that the inhibition of daidzein on CHLaGcT was related to its anti-*Helicobacter* activity.

Key words: *Helicobacter pylori*, cholesterol α -glucosyltransferase (CHLaGcT), inhibition, soy isoflavones, daidzein

서 론

헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)는 전 세계 인구의 50%를 감염시키고 있는 소화기관계의 병원성 미생물이다(1). 그러나 대부분은 감염사실을 인지하지 못하거나, 가벼운 위염의 증상을 나타나게 된다(2). 감염된 상태가 오래 지속되거나 적절한 치료가 행해지지 않을 경우에는 위염, 위궤양, 위암 및 mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) 림프종과 같은 질병을 유발한다(3).

헬리코박터 파이로리의 제균 치료법으로 현재 가장 널리 사용되는 방법은 강력한 위산 분비 억제제인 proton pump inhibitor와 항생제인 amoxillin과 clarithromycin을 병행하여 처방하는 요법이다. 이 요법의 제균율은 초창기에는 효과적인 것으로 인정받았지만 항생제 내성률의 증가로 인하여 제균율이 감소하여 상당수의 환자들은 2차 치료가 필요한 경우가 많아졌다. 이로 인해 다양한 항생제 치료 요법들에 대한 연구가 진행되고 있다(4).

식품에는 소화흡수계, 순환계, 생체방어 면역계, 내분비계, 세포분화, 증식계, 신경계 등에 매우 중요한 역할을 하는 조절 인자들을 함유하고 있어서 이들을 적절히 섭취하면 건강을 증진시킬 수 있는 효과가 있다. 식품의 이러한 효능에 의하여 기능성식품에 대한 연구가 상당히 진행되고 있는 추세이다. 일반적으로 소화기계에 중요한 식품 중에서 위암을 예방하는 식품으로 알려진 것은 양배추, 차, 마늘, 양파, 대두, 된장, 비타민 C가 풍부하게 들어있는 과일과 채소 등이

있다. 또한 위궤양의 치료에 도움이 되는 식품으로는 바나나, 마늘, 양배추 주스, 콩류, 요구르트, 꿀, 조개류, 녹차, 감초 등이 권장되고 있다(5). 위염, 위궤양, 및 위암에 있어서 헬리코박터와의 상관성이 대두되면서 이런 질병을 치료하기 위하여 여러 가지 식품이나 식물체로부터 생리활성을 가지는 물질을 추출하여 헬리코박터의 생육 저해에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다. 이런 생리활성 추출물들이 보여주는 능력들은 주로 phenolics, 단순치환 된 phenol, glycoside, amide 등에 의한 것으로 알려져 있다(6-9).

이전 연구에서 UDP-glucose와 cholesterol을 기질로 사용하여 헬리코박터의 지질 성분의 약 25%를 차지하고 있는 물질인 α -glucosyl cholesterol을 생산하는 콜레스테롤 당전이 효소(cholesterol α -glucosyltransferase)의 활성과 헬리코박터 파이로리의 생육이 직접적인 연관성이 있는 것을 보고하였다(10,11). 본 연구에서는 대두에 존재하는 이소플라본인 daidzein의 콜레스테롤 당전이 효소 저해활성과 헬리코박터 파이로리 생육 저해 연구를 통해 daidzein의 헬리코박터에 대한 저해 메커니즘을 규명하고, 이를 토대로 새로운 헬리코박터 저해제의 개발에 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

추출물의 제조

시료를 grinder로 마쇄한 후 메탄올 100 mL당 6 g의 시료를 넣고 200 rpm, 37°C에서 24시간 동안 추출을 하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: heeseoblee@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2838, Fax: 82-51-583-3648

Whatman paper(Whatman International, Maidstone, England)로 거른 후 건조하였다. 건조된 시료를 Sep-Pak C18 cartridge(Waters Corp., Milford, USA)에 주입한 후 메탄올로 elution하여 소수성이 강한 fraction을 얻었다. Speed-Vac(Eyela CCA1111, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 건조 후, 에탄올에 녹여서 시료로 사용하였다.

콜레스테롤 당전이 효소 활성

콜레스테롤 당전이 효소의 활성은 Fukuda 등(12)의 방법을 변형하여 사용하였으며, 이 방법은 콜레스테롤 당전이 효소의 반응에 의해 생성된 UDP를 pyruvate kinase(PK)와 lactate dehydrogenase(LDH)의 coupling assay를 통하여 감소된 NADH의 양을 측정하여 콜레스테롤 당전이 효소의 활성을 간접적으로 측정하는 방법이다. 콜레스테롤 당전이 효소는 Lee 등(10)의 방법으로, 콜레스테롤 당전이 효소를 발현하는 pTKNd6xH-CHLaGcT vector를 *E. coli*에서 expression 한 후 Ni-NTA column(His Trap™ HP, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 정제 후 사용하였다. 이 효소 반응의 조건은 다음과 같다. 8 mM 콜레스테롤 30 μ L, 50 mM UDP-glucose 10 μ L, 2% Triton X100 50 μ L, 70 mM phosphoenolpyruvate 10 μ L, 15 mM NADH 15 μ L, PK/LDH 50 μ L, 500 mM MnCl₂ 10 μ L, 1 M MgCl₂ 5 μ L, 1 M KCl 50 μ L를 가한 후 콜레스테롤 당전이 효소를 첨가하여 반응용액을 최종적으로 1 mL로 30°C에서 30분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 저해제는 에탄올 또는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 효소 반응액에 첨가하여 사용하였다.

IC₅₀ 계산

효소의 활성을 50% 저해하는 데 필요한 농도인 IC₅₀값의 계산은 Marquardt-Levenberg four parameter model(13)을 이용하였으며, SigmaPlot Version 11.2(Systat Software Inc., San Jose, USA) 프로그램을 사용하여 fitting하였다. 계산에 사용된 식은 다음과 같다.

$$y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - \log x)^b}}$$

단, y는 % activity, Min과 Max는 저해제가 고농일 때의 y의 최소값과 저해제가 존재하지 않을 경우 y의 최대값에 대한 점근선, b는 변곡점에서의 기울기 및 x는 저해제의 농도를 나타낸다.

균주와 배양조건

H. pylori 26695 균주를 헬리코박터 파이로리 분리균주 은행(*H. pylori* Korean Type Culture Collection, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. 액체질소에 냉동 보관한 균주를 37°C 항온수조에서 녹인 뒤 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Brain Heart Infusion(BHI) 한천배지에 접

종하고 15% CO₂, 100% 습도가 유지되는 CO₂배양기(MC-20A, Science & Technology Inc., Jinju, Korea)에서 37°C에서 이틀간 배양하였다(14).

항균활성

헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성은 disc diffusion 방법에 의해 확인하였다(15). BHI 한천배지에서 배양한 헬리코박터 파이로리를 10⁸~10⁹ CFU/mL의 농도로 멸균된 생리식염수에 현탁액을 만들고 100 μ L를 BHI 한천배지에 도말하였다. 여기에 에탄올에 용해시킨 daidzein 50 μ L을 흡수시킨 8 mm paper disc를 올려놓은 후, 15% CO₂ 조건하에서 37°C로 이틀간 배양하여 disc 주위의 clear zone의 생성 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

헬리코박터 파이로리에 존재하는 효소인 콜레스테롤 당전이 효소(cholesterol α -glucosyltransferase)는 헬리코박터의 총 지질 함량의 25%를 차지하는 물질인 α -glucosyl cholesterol을 생성하는 데 관여하는 효소로서 헬리코박터의 생육에 중요한 역할을 하고 있다(10,16). 문헌상에 보고된 헬리코박터 저해와 관련된 식품 또는 식물체의 메탄올 추출물을 준비하여 콜레스테롤 당전이 효소의 저해활성을 확인하였다. 이들 중에서 효소의 저해활성이 상대적으로 높은 시료를 Fig. 1에 나타내었다. 대두, 감, 당근 및 인삼의 메탄올 추출물에서 콜레스테롤 당전이 효소에 대한 저해활성을 나타냈으며, 이 중에서 대두의 메탄올 추출물이 상대적으로 높은 저해활성을 나타내었다. 대두에 존재하는 생리활성 물질로는 isoflavone이 있으며, 이들은 헬리코박터 생육저해, 항암, 항산화, 골다공증예방 및 심혈관 기능의 증진 효과가 알려져 있다(17-21). 대두에는 46~195 mg/g의 isoflavone을 함유하고 있으며(22), 대두에 존재하는 대표적인 isoflavone으로는 daidzein, glycitein, genistein이 알려져 있다(23).

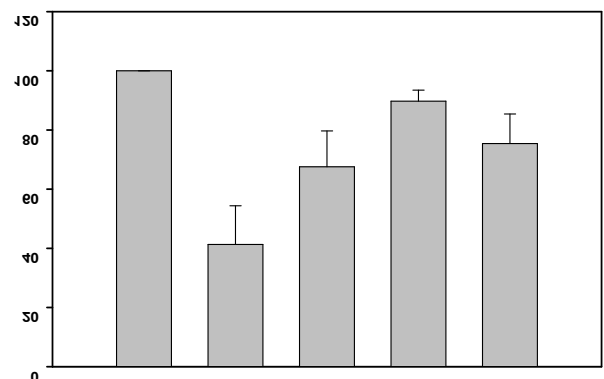


Fig. 1. Inhibition of cholesterol α -glucosyltransferase activities by plant extracts. 1, control; 2, soybean MeOH extract (0.04%); 3, persimmon MeOH extract (0.02%); 4, carrot MeOH extract (0.06%); 5, ginseng MeOH extract (0.043%).

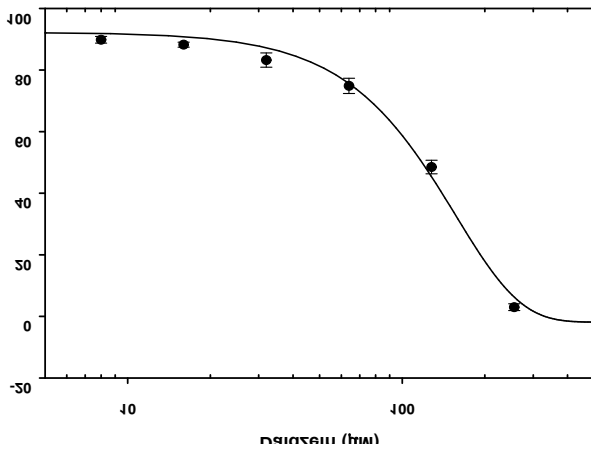


Fig. 2. Inhibition of cholesterol α -glucosyltransferase activities by daidzein in a dose-dependant manner.

대두에 존재하는 isoflavone 중에서 daidzein을 이용하여 콜레스테롤 당전이 효소에 대한 저해활성의 유무를 측정해보았다. 측정한 결과 daidzein은 이 효소에 대한 저해활성을 나타내었으며, daidzein의 콜레스테롤 당전이 효소에 대한 저해정도를 알아보기 위하여 daidzein의 농도에 따른 효소 저해실험을 수행하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 콜레스테롤 당전이 효소의 경우 daidzein의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 효소활성의 저해를 확인할 수 있었으며, 이 결과로부터 Marquardt-Levenberg four parameter model(13)을 사용하여 IC_{50} 값을 계산하였다. Daidzein의 콜레스테롤 당전이 효소에 대한 IC_{50} 값은 128.5 μ M이었으며, 이는 기존에 보고된 콜레스테롤 당전이 효소의 저해제(0.47~7.49 mM)보다 daidzein의 저해활성이 상당히 우수한 것으로 판단되었다(10). 대두 isoflavone은 phytoestrogen이라고 할 정도로 steroidal hormone과 구조적으로 상당히 유사하여, steroidal hormone의 전구체인 콜레스테롤 역시 isoflavone과 유사한 구조를 가지고 있다. 따라서 daidzein은 콜레스테롤 당전이 효소의 기질인 콜레스테롤과 유사한 구조를 가지고 있으므로, 콜레스테롤 당전이 효소의 반응 시에 콜레스테롤과 경쟁관계를 통하여 효소의 저해를 나타내는 것으로 추측된다.

Daidzein의 헬리코박터 파이로리에 대한 항균력을 paper disc diffusion 방법을 사용한 결과 Fig. 3과 같았다. 대조군

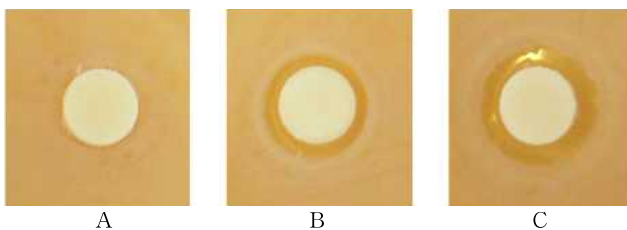


Fig. 3. Antibacterial activity of daidzein by paper disc diffusion test against *Helicobacter pylori*. A, control; B, 0.72 mM daidzein; C, 2.2 mM daidzein.

의 경우 저해환이 생성되지 않았으나, 0.72 mM과 2.2 mM의 daidzein을 처리한 경우에 있어서는 헬리코박터의 저해에 따른 저해환을 확인할 수 있었으며 그 크기는 각각 10.5 mm와 12.0 mm를 나타내었다. 이는 대두에 존재하는 genistein 및 daidzein이 항균활성을 보인다는 보고(17)와 유사한 결과를 나타내는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 통하여 대두에 존재하는 isoflavone인 daidzein의 헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성은 헬리코박터 파이로리의 생육에 중요한 역할을 하는 효소인 콜레스테롤 당전이 효소의 저해와 연관성이 있음을 간접적으로 증명하였다. 대두에는 daidzein 이외도 다양한 isoflavone이 존재하므로 이들에 대한 효소저해 및 항균활성에 대한 연구와 아울러 isoflavone들의 구조적 차이에 따른 효소저해 메커니즘에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 대두 isoflavone의 하나인 daidzein의 콜레스테롤 당전이 효소에 대한 저해효과와 헬리코박터에 대한 항균력을 측정하였다. 콜레스테롤 당전이 효소는 헬리코박터 파이로리의 세포벽 지질성분을 구성하는 α -glucosyl cholesterol을 생성하는 데 관여하는 효소로 헬리코박터의 생육에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. Daidzein을 농도별로 처리하였을 경우, 콜레스테롤 당전이 효소의 활성은 daidzein의 농도에 의존적으로 저해를 나타내었으며, daidzein의 IC_{50} 값은 128.5 μ M이었다. 또한 disc diffusion 방법을 이용하여 항균실험에 있어서도 daidzein은 헬리코박터의 생육을 억제하였다. 이상의 결과를 통하여 daidzein의 효소저해활성은 헬리코박터의 생육 저해와 밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구임(NRF-2007-331-F00047)

문 헌

1. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
2. Hidaka E, Ota H, Hidaka H, Hayama M, Matsuzawa T, Akamatsu T, Nakayama J, Katsuyama T. 2001. *Helicobacter pylori* and two ultrastructurally distinct layers of gastric mucous cell mucins in the surface mucous gel layer. *Gut* 49: 474-480.
3. Peek Jr RM, Blaser MJ. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2: 28-37.
4. Kim N. 2006. The effect of antibiotic resistance on the erad-

- ication of *Helicobacter pylori*. *Korean J Gastroenterol* 47: 82-86.
5. Hong YH. 2003. *Functional foods*. Chonnam National University Press, Kwangju, Korea. p 261.
 6. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kähkönen M, Heinonen M, Määttä-Riihinen K, Oksman-Caldentey KM. 2005. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J Appl Microbiol* 98: 991-1000.
 7. Correia RTP, McCue P, Vattem DA, Magalhães MMA, Macêdo GR, Shetty K. 2004. Amylase and *Helicobacter pylori* inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bio-processed by *Rhizopus oligosporus*. *J Food Biochem* 28: 419-434.
 8. De Marino S, Borbone N, Gala F, Zollo F, Fico G, Pagiotti R, Iorizzi M. 2006. New constituents of sweet *Capsicum annuum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *J Agric Food Chem* 54: 7508-7516.
 9. Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. 2006. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol* 108: 457-461.
 10. Lee H, Kobayashi M, Wang P, Nakayama J, Seeberger PH, Fukuda M. 2006. Expression cloning of cholesterol α -glucosyltransferase, a unique enzyme that can be inhibited by natural antibiotic gastric mucin *O*-glycans, from *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1235-1241.
 11. Lee H, Wang P, Hoshino H, Ito Y, Kobayashi M, Nakayama J, Seeberger PH, Fukuda M. 2008. α 1,4GlcNAc-capped mucin-type *O*-glycan inhibits cholesterol α -glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth. *Glycobiology* 18: 549-558.
 12. Fukuda M, Kawakubo M, Ito Y, Kobayashi M, Lee H, Nakayama J. 2006. Assay of human gastric mucin as a natural antibiotic against *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol* 415: 164-179.
 13. Vermeirssen V, Camp JV, Verstraete W. 2002. Optimization and validation of an angiotensin converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods* 51: 75-87.
 14. Jung KO, Kil JH, Kim KH, Park KY. 2003. Effect of kimchi and its ingredients on the growth of *Helicobacter pylori*. *Nutraceuticals & Food* 8: 149-153.
 15. Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ, Baek YJ. 1999. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J Food Sci Technol* 31: 764-770.
 16. Haque M, Hirai Y, Yokota K, Mori N, Jahan I, Ito H, Hotta H, Yano I, Kanemasa Y, Oguma K. 1996. Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. *J Bacteriol* 178: 2065-2070.
 17. Hong HH, Landauer MR, Foriska MA, Ledney GD. 2006. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *J Basic Microbiol* 46: 329-335.
 18. Naim M, Gestetner B, Bondi A, Birk Y. 1976. Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavone. *J Agric Food Chem* 22: 806-811.
 19. Caragay AB. 1992. Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol* 46: 566S-569S.
 20. Clarkson TB. 2002. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* 132: 566S-569S.
 21. Sarkar FH, Li YW. 2003. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 21: 744-757.
 22. Eldridge AC. 1982. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *J Agric Food Chem* 30: 353-355.
 23. Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D, Holden J. 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* 47: 2697-2704.

(2010년 7월 5일 접수; 2010년 7월 9일 채택)