

백지(*Angelica dahurica*) 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균력 및 *H. pylori*로 유도한 염증반응에 대한 항염 효과

최민경¹ · 임동술^{1,2} · 최성숙^{1*}

¹삼육대학교 약학대학, ²삼육대학교 약식동원연구소

Anti-bacterial and Anti-inflammatory Effects of *Angelica dahurica* Extracts in *Helicobacter pylori*-infected Human Gastric Epithelial AGS Cells

Choi Min Kyeong¹, Dongsool Yim^{1,2}, and Sungsook Choi^{1*}

¹College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea

²Re-creation Institute of Phytochemicals, College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea

Abstract – The aim of this study was to evaluate the anti-helicobacter activity and anti-inflammatory activity of *Angelica dahurica* (AD). The minimum inhibitory concentration(MIC) of AD against *Helicobacter pylori*(*H. pylori*), expression of the *H. pylori cagA* gene in the presence of AD was determined. Inhibition of *H. pylori* urease by AD, inhibition of nitric oxide (NO) production in AGS cells was measured. IL-8 mRNA expression in AGS cells which were infected with *H. pylori* and IL-8 level was measured. The MIC of MeOH Ex. of AD was 250 µg/mL and the expression of *cagA* gene was decreased about 88% in the presence of AD. The activity of *H. pylori* urease was inhibited 70% by AD. mRNA expression of IL-8 and the production of NO and IL-8 were significantly decreased in the presence of AD. In conclusion, AD showed anti-*Helicobacter* activity and has potent anti-inflammatory effect on *H. pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells.

Keywords – *H. pylori*, Anti-inflammatory, Anti-bacterial, *Angelica dahurica*, IL-8, AGS cell

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 그람음성 나선 간균으로 미호기적 환경에서 서식한다. 인체내 위장관의 위 유문부 점막에서 서식하는 이 균은 40세 이상의 한국인의 경우 70% 이상의 감염율을 보이고 있으며,¹⁾ 선진국 보다는 개발도상국에서 감염의 빈도가 더 높다. 이 균에 의해 발생하는 질병으로는 만성 위염, 위궤양 및 십이지장 궤양, 위암, MALT 림프종 등이 있고²⁾ 따라서 국제 암 연구소(IARC)에서는 *H. pylori*를 1급 발암물질로 분류하고 있다.

*H. pylori*의 주요 병인 요소에는 cytotoxin associated gene A(*cagA*), vacuolating cytotoxin A(*vacA*), 요소분해효소(urease)와 부착인자(adhesin) 등이 있다. CagA는 *cag* pathogenicity island(*cagPAI*)에 암호화 되어있는 분자량 120-140 kDa의 단백질이며³⁾ 서양인에서 분리된 균주의 경우 약 60%가 *cagA* 양성균주이나 동아시아에서 분리된 균주의 경우 대부분이 *cagA* 유전자를 가지고 있다.²⁾ CagA 단백질을

생성하는 균주는 생성하지 않는 균주보다 심한 염증반응을 유발하며 궤양이나 위암발생의 위험이 높다.^{4,5)} VacA는 위 상피세포에 공포(vacuolation)를 생성하는 독소 단백질로 독소 생성량의 차이를 나타내는 유전형의 다양성은 있으나 모든 균주에 존재한다.⁶⁾ 요소분해효소(urease)는 요소를 암모니아로 분해시켜 위산을 중화하여 *H. pylori*가 강한 산성 환경인 위에서 살아남을 수 있게 하고 그 결과 위 점막세포로 침투하여 염증반응 등의 병변을 일으키도록 한다.^{7,8)} 이 과정에서 전염증 cytokine인 interleukin 8(IL-8)과 NO등이 생성되고 그 결과 위상피세포에 세포 독성이 나타나고 이에 따른 각종 병변이 진행된다.

H. pylori 치료에 관한 표준 가이드라인은 삼제요법을 사용하도록 권장하고 있다.⁹⁾ 삼제요법은 proton pump inhibitor (PPI)를 기초로 하여 amoxicillin과 levofloxacin 또는 clarithromycin을 7-14일 정도 투여하는 것이다. 하지만 삼제요법을 실시하였을 때 환자의 약제 부적응, 질병의 재발 및 내성균주의 출현 등의 문제가 발생하고 있어 전체 환자의 20% 정도가 제균에 실패하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 따라서 삼

*교신저자(E-mail): sschoi@syu.ac.kr
(Tel): +82-2-3399-1606

제요법을 대체 할 다른 치료법들이 요구되고 있으며 천연물 유래 항 헬리코박터 성분,¹¹⁾ probiotics 등이 대안으로 등장하고 있다.¹²⁾

백지는 미나리과의 구릿대 식물의 뿌리를 말린 것으로, 고대 중국에서 주로 폐, 비장, 위를 치료하는데 환의 형태로 복용되어 왔다. Kwon 등의 연구에 따르면¹³⁾ 백지의 coumarin 성분중 psoralen, ferulic acid, byakangelicin 및 scopoletin등이 세균 및 곰팡이에 대한 항균력이 있는 것으로 보고되었으며 falcarindiol은 황색포도알균에 항균력이 있는 것으로 확인되었다.¹⁴⁾ 백지의 유효성분 중 furanocoumarin 성분인 byakangelicol(BYAK)은 항염 효능이 우수한 것으로 알려져 있으며¹⁵⁾ 일반적으로 천연물 유래 coumarin 성분들 중 구조특이성에 따라 *H. pylori*에 대한 항균력이 우수한 것으로 보고 되어 있다.¹⁶⁾ 따라서 본 연구에서는 백지 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균활성 및 균의 주요 병독성 인자 억제능을 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 시료인 백지(*Angelica dahurica*, AD)는 경동한약재시장에서 구입하여 임동술 교수가 검증한 후 85°C, 4시간 메탄올 추출한 추출물 [MeOH extracts of *Angelica dahurica*(MeOHEx)]은 임동술 교수 연구실에서 지원받았으며(수율 24.5%), byakangelicol(BYAK)과 scopoletin(SCOP)은 Corescience(Seoul, Korea)에서 구입하였다. AGS cell(KCLB #21739)은 Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 보관중인 것을 사용하였으며, *H. pylori* 26695(ATCC 700392)와 *H. pylori* KCTC 12083(ATCC 43504)는 본 연구실에 보관중인 균주를 사용하였다.

세포 배양 - AGS cell은 RPMI1640 배지(Sigma Co. St. Louis, USA)에 fetal bovine serum(FBS, Sigma Co. St. Louis, USA) 10%, glutamine(300 mg/L), 25 mM HEPES (Sigma Co. St. Louis, USA), 25 mM NaHCO₃ 및 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대배양 하였다. *H. pylori* 26695는 7% horse serum(Sigma Co. St. Louis, USA), 0.4% isovitalax (BBL, Sparks, MD, USA)를 첨가한 Brain Heart Infusion 배지(BHI, Difco, Spark, MD, USA)에 접종하여 37°C, 5% CO₂의 미호기적 환경에서 3일 간격으로 계대 배양하였다. AGS cell에 *H. pylori*를 감염시킬 때는 AGS:*H. pylori*가 1:300이 되도록 접종비율을 조정하였다.

항균력 측정 - *H. pylori* 26695에 대한 백지의 항균력은 Clinical Laboratory Standard Institute(CLSI)¹⁷⁾의 가이드라인을 따라 microdilution 법으로 실시하였다. 실험물질의 최고 농도를 MeOHEx는 1000 µg/mL에서, BYAK, SCOP은 400 µg/mL에서 2배씩 희석하고 *H. pylori*를 10⁷ CFU/mL로 각

well에 접종하고, 37°C, 미호기적 조건에서 3일간 배양 후 *H. pylori*가 자라지 못한 최저 농도를 minimum inhibitory concentration(MIC)로 하였고, 해당 배양액을 잘 섞어 항생제가 첨가되지 않은 BHI 고체배지에 10 µL씩 접종하여 3일간 배양하여 *H. pylori*가 배양되지 않은 최소 농도를 minimum bactericidal concentration(MBC)로 하였다. 실험의 정도 관리를 위해 표준 항생제로는 amoxicillin을 사용하여, *H. pylori* ATCC 43504에 대한 항균력을 측정하였다.

요소분해효소(Urease) 활성 억제능 측정 - *H. pylori*에서 urease를 얻기 위해 3일간 배양한 균 고체배지 1개당 PBS 3 mL로 현탁하였다. 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 UV-Spectrophotometry 법으로 단백질 정량을 한 후 최종 단백질 농도 0.3 µg/mL로 희석하여 조효소액으로 사용하였다. MeOHEx, BYAK, SCOP의 urease 활성 억제능을 측정하기 위해 phenol-hypochlorite 법을 사용하였다.¹⁸⁾ 억제능의 기준은 thiourea 0.1 M에 의해 억제되는 것을 100% 억제로 기준을 삼았다. 표준물질로는 대표적인 urease인 Jack Bean Urease(JBU, Sigma-Aldrich St. Louis, USA)를 사용하여 비교하였다.

효소활성은 다음의 식으로 계산하였다: $[1 - (As - A_s)/(Ac - A_c)] \times 100$, As는 실험물질을 첨가한 균의 흡광도 값, A_s는 thiourea를 첨가한 균의 흡광도 값, Ac는 PBS를 첨가한 균의 흡광도 값, A_c는 thiourea를 첨가한 균의 흡광도 값

cagA mRNA 발현억제능 - *H. pylori*의 대표적인 병원 유전자인 *cagA* 유전자의 발현 억제능을 확인하였다. *H. pylori*를 BHI 액체배지에 접종 후 37°C, 미호기적 조건에서 배양 후 새로운 배지에 옮긴 후 각 시료의 MIC 값의 1/5되는 농도의 시료를 가하고 6시간 더 배양하였다. 이후 GeneAll Hybrid-RTM reagent(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 total RNA를 분리 후 200 ng의 RNA를 사용하여 AccuPower CycleScript RT premix(dN12)(Bioneer, 대전)를 이용하여 c-DNA를 합성하였다. *cagA* 유전자 발현을 정량적으로 비교하기 위해 *csyS* 유전자를 house keeping 유전자로 real-time PCR을 실시하였다. 본 실험에 사용한 primer는 제노텍(Genotech, 대전)에서 합성하였으며 그 염기서열은 Table I에 나타내었다. Real-time PCR은 Power SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies, Carlsbad, CA,)를 사용하였으며 장비는 Step-One Plus Real-Time PCR System(Life-Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 ddCt 분석을 하여 비교 정량하였다.

세포독성 측정 - 실험물질의 세포독성을 확인하기 위하여 AGS cell을 96 well에 5×10⁵ cells/well로 처리하고 각 시료는 MeOHEx 1000 µg/mL, BYAK 및 SCOP 400 µg/mL를 최고농도로 하여 2배씩 희석하여 처리하였다. 시료 처리 24시간 후 상등액 제거 하고 PBS로 3번 세척하였다. 5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazoliu-

Table I. Primer sequences for qRT-PCR analysis

Gene	Primer	Sequence (5→3)	Tm(°C)	
<i>H. pylori</i> 26695	<i>cysS</i>	F	AGACGCTATGGTGGGCATGATTGA	60.5
		R	CTTGCACCAAACCAARACGGCCAA	60.5
	<i>cagA</i>	F	CAATCGTTGATAAGAACGATAGGG	60.3
		R	CAAATTTCTGAAAGCTCTTTGTGG	60.1
AGS cell	β -actin	F	ACCAACTGGGACGACATGGAG	61.8
		R	GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC	60.6
	IL-8	F	AACTTCTCCACAACCCTCTG	57.3
		R	TTGGCAACCTTCCTGATTTC	57.3

mbromide(MTT)(Sigma Co. St. Louis, USA)시약을 100 μ L/well로 가하고 37°C, 5% CO₂에서 4시간 더 배양하였다. 상등액을 제거 후 PBS로 3번 세척한 후, DMSO를 처리하여 37°C, 15분 shaking incubation 후 생성된 formazan을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 억제능 측정 - 백지 성분에 의한 NO 생성 억제능을 확인하기 위하여 AGS cell을 6 well에 1×10⁶ cells/well로 접종 후 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24 hrs 배양하였다. 상등액을 제거 후 PBS로 3회 세척하였다. 항생제를 넣지 않은 RPMI1640 배지에 각 시료를 MeOHEx 125, 100 μ g/mL, BYAK 12.5, 6.25 μ g/mL, SCOP 50, 25 μ g/mL 농도로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂에서 30 min 배양하였다. AGS cell:*H. pylori*의 비율이 1:300이 되도록 *H. pylori* 접종한 후 37°C, 5% CO₂에서 24 hrs 배양하였다. Griess 시약(Sigma Co. St. Louis, USA)을 처리 후 NaNO₂를 표준물질로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-8 mRNA 발현 억제능 - 백지 성분에 의한 전염증 인자 IL-8 유전자 발현 억제능을 확인하였다. AGS cell을 6 well에 1×10⁶ cells/well 로 접종 후 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24 hrs 배양하였다. 상등액을 제거 후 PBS로 3회 세척 후 항생제를 넣지 않은 RPMI1640 배지에 각 시료를 MeOHEx 125, 100 μ g/mL, BYAK 12.5, 6.25 μ g/mL, SCOP 50, 25 μ g/mL 농도로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂에서 30 min 배양하였다. *H. pylori*를 접종시켜(1:300) 37°C, 5% CO₂에서 6시간 배양 후 상등액을 제거하였다. AGS cell을 PBS로 3번 세척 후 mRNA 분리는 GeneAll Hybrid-R™ reagent (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하였다. total RNA 200 ng을 AccuPower® CycleScript RT PreMix(dT20)(Bioneer, Taejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. IL-8 발현을 정량분석하기 위해 house keeping gene으로 β -actin을 사용하여 Power-SYBR Green PCR Mastermix(Life Technologies Pty Ltd, NY, USA)시약을 사용하고, StepOne realtime PCR system (Life Technologies Pty Ltd, NY, USA) 기기를 사용하여 ddCt 분석하였다. 본 실험에 사용한 primer는 제노텍

(Genotech, 대전)에서 합성하였으며 그 서열은 Table I에 나타내었다.

ELISA를 이용한 IL-8 농도 측정 - AGS cell을 1×10⁶ cells/well 농도로 6 well plate에 접종한 후 24시간 배양하였다. PBS로 세포를 세척 후 각 실험물질 MeOHEx 125, 100 μ g/mL, BYAK 12.5, 6.25 μ g/mL, SCOP 50, 25 μ g/mL 농도로 AGS cell에 30분 처리후 1:300 비율로 *H. pylori*를 접종시킨 후 24 hrs 배양 후 상등액을 모아 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후, 잔해를 제거하였다. 상등액중 IL-8 농도는 ab214030-Human IL-8 SimpleStep ELISA® Kit (abcam)를 사용하여 분석하였다. *H. pylori*만 감염된 AGS cell을 양성대조군으로 사용하였으며 표준품 IL-8을 250 pg/mL을 최고농도로 하여 계열 희석하여 검량선 작성을 하였다. Sample diluent에 5배 희석한 상등액과 standard를 plate (human IL-8 specific mouse monoclonal antibody coating)에 50 μ L 씩 넣고 antibody cocktail 50 μ L를 넣어 1 hr 동안 실온에 방치하였다. 3번 세척하고 TMB solution 100 μ L 넣고 10분간 빛을 차단하고 반응시킨 후 stop solution 100 μ L를 넣고 1분간 섞어주고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석 - 각 군간의 통계처리는 GraphPad PRISM® Version 7.04(GraphPad Software, USA)를 사용하였다.

결 과

백지 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균력 - *H. pylori* 26695에 대한 각 시료의 MIC 값은 MeOHEx 250 μ g/mL, BYAK 100 μ g/mL, SCOP 100 μ g/mL이었으며 MBC 값은 MeOHEx 250 μ g/mL, BYAK 100 μ g/mL, SCOP 100 μ g/mL로 MIC와 동일한 값을 나타내었다(Table II).

백지 추출물의 Urease 활성 억제 - 백지성분인 MeOHEx, BYAK, SCOP의 *H. pylori* urease(HPU) 및 jack bean urease(JBU)에 대한 활성억제효과를 측정하였다. JBU의 효소활성은 MeOHEx 125, 100 μ g/mL에서 41.3%, 29%, BYAK 12.5, 6.25 μ g/mL에서 13.3%, 1.3%, SCOP 50,

Table II. Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of MeOHEx, BYAK and SCOP against *H. pylori* 26695

Samples	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
MeOHEx	250	250
BYAK	100	100
SCOP	100	100
Amoxicillin (against <i>H. pylori</i> ATCC43504)	<0.1	<0.1

MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*
 BYAK: Byakangelicol
 SCOP: Scopoletin

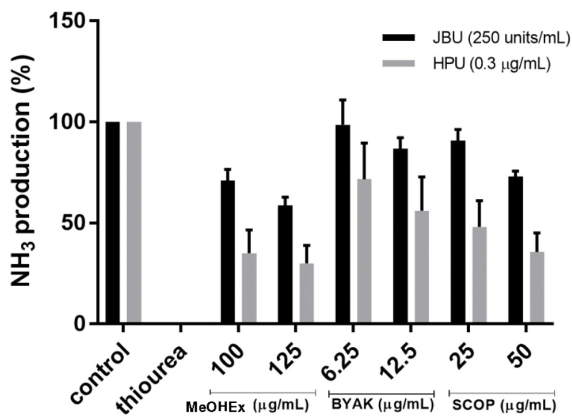


Fig. 1. Inhibition of urease activity by MeOHEx, BYAK and SCOP. MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*, BYAK: Byakangelicol, SCOP: Scopoletin

25 µg/mL에서 27%, 9.3% 억제되었다. HPU는 MeOHEx 125, 100 mg/mL에서 70%, 65%, BYAK 12.5, 6.25 mg/mL에서 44%, 28%, SCOP 50, 25 mg/mL에서 64%, 52% 억제됨을 확인하였다(Fig. 1).

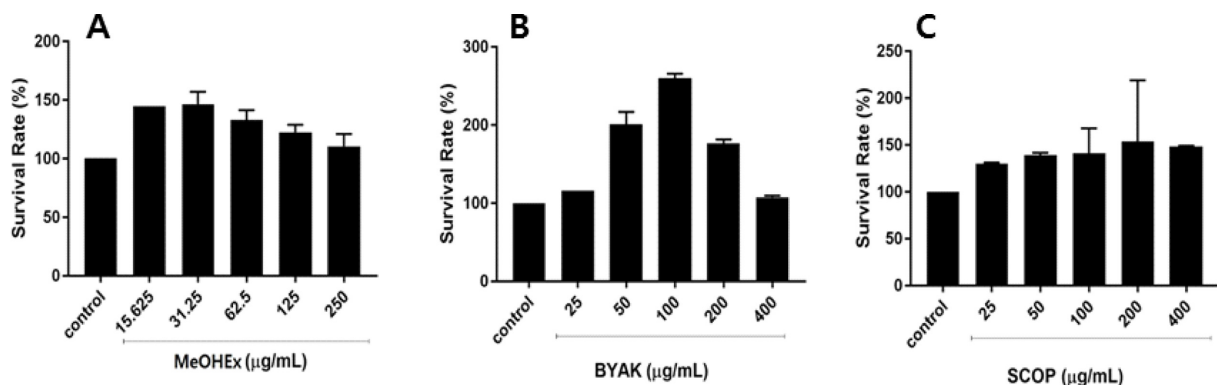


Fig. 3. AGS Cell viability was measured after 24 hours of treatment with different concentrations of (A) MeOH extracts of *Angelica dahurica* (MeOHEx), (B) byakangelicol (BYAK) and (C) scopoletin (SCOP).

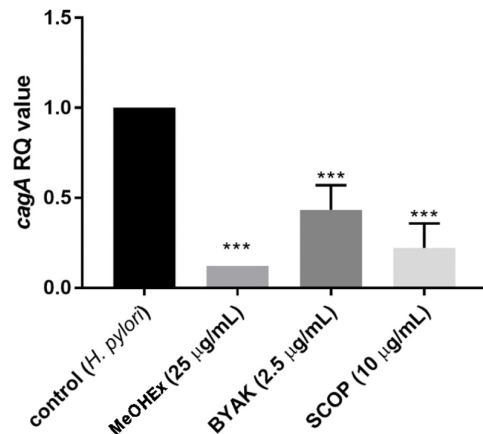


Fig. 2. Inhibition of *H. pylori* *cagA* mRNA expression in the presence of MeOHEx, BYAK and SCOP. MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*, BYAK: Byakangelicol, SCOP: Scopoletin. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with control. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test

백지 추출물의 *cagA* 유전자 발현 억제 효과 - MeOHEx, BYAK와 SCOP이 *H. pylori*의 *cagA* 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였다. *H. pylori*만 처리한 대조군의 *cagA* mRNA 발현을 100%로 하였을 때 MeOHEx는 88%, BYAK는 66%, SCOP는 87%까지 유전자 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 2).

백지 추출물의 AGS 세포에 대한 독성 - 각 시료의 AGS cell에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, MeOHEx 250 µg/mL, BYAK 400 µg/mL, SCOP 400 µg/mL 농도까지 독성이 없었으며 이 값은 각 성분의 MIC 값보다 높은 값이다(Fig. 3).

백지 추출물의 NO 생성 억제 - *H. pylori* 26695에 의해 NO생성을 유도한 AGS cell에서 백지추출물의 NO 생산 억제능을 측정된 결과 MeOHEx 125, 62.5 µg/mL에서 19%,

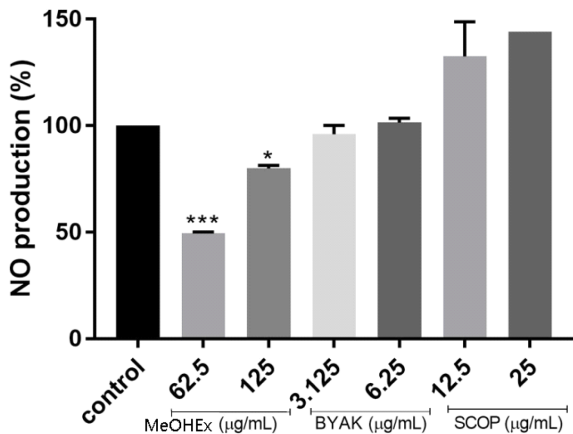


Fig. 4. Effects of MeOHEx, BYAK and SCOP on *H. pylori* induced NO production in AGS cells. Changes in NO production are presented as percentage of the control. MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*, BYAK: Byakangelicol, SCOP: Scopoletin. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with control. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test

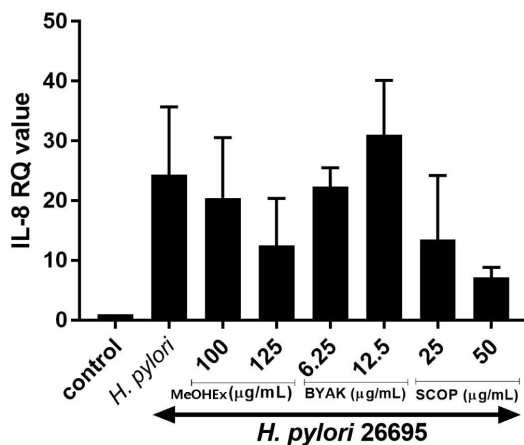


Fig. 5. Effects of MeOHEx, BYAK and SCOP on the IL-8 mRNA expression in the *H. pylori* infected AGS cell. MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*, BYAK: Byakangelicol, SCOP: Scopoletin

55% 감소하였고, BYAK과 SCOP에서는 NO 생성이 감소하지 않았다(Fig. 4).

백지 추출물의 IL-8 mRNA 발현 억제 - AGS cell에 *H. pylori*를 감염하여 IL-8 mRNA 발현량을 유도 후 백지추출물에 의한 억제능을 비교한 결과, MeOHEx 125, 100 µg/mL에서 49%, 17%, SCOP 50, 25 µg/mL에서 각각 71%, 51%까지 IL-8 mRNA의 발현이 감소하였고, BYAK 12.5 µg/mL에서 8% 감소하였다(Fig. 5).

백지 추출물의 IL-8 생성 억제 - AGS cell에 *H. pylori* 26695만 감염 시킨것을 대조군(100%)로, 상등액에 포함된 IL-8의 농도를 측정된 결과, BYAK 12.5 µg/mL에서는 40%,

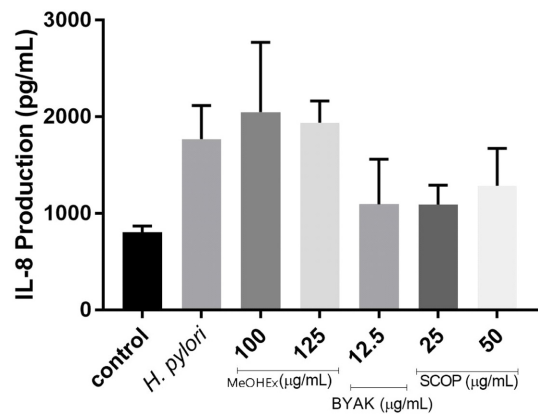


Fig. 6. Effects of MeOHEx, BYAK and SCOP on *H. pylori* induced IL-8 production in AGS cells. Changes in IL-8 production are represented as percentage of the control. MeOHEx: MeOH extracts of *Angelica dahurica*, BYAK: Byakangelicol, SCOP: Scopoletin

SCOP 50, 25 µg/mL에서 각각 28%, 38%의 IL-8이 생성이 감소하였다(Fig. 6).

고 찰

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 전 세계적으로 50% 이상의 인구에 존재하며 균종에 따라 다양한 위장 병변을 일으킨다.¹⁹⁻²¹ 삼제요법이 *H. pylori*의 표준 치료법으로 적용되고 있으나^{22,23} 내성균의 발달, 환자의 부적응등의 문제가 있어 항생제 치료법외의 다른 치료법에 대한 필요가 증가하고 있으며 probiotics, 천연물 및 광역동학적 치료법등이 대두되고 있다.²⁴⁻²⁶ 백지는 항 알러지 효능,¹⁵ 항산화 효능,^{27,28} 신경독성 억제능²⁹등의 효능이 있는 것으로 보고되고 있다. 몇몇 백지 성분의 경우 헬리코박터는 아닌지만 일반세균 및 곰팡이에 대한 항균효능도 보고되어 있다.¹³ 백지 성분인 byakangelicol의 항염작용이 알려져 있으며,³⁰ *H. pylori* 감염된 마우스에 *Angelica keiskei*를 처리하였을 때 염증매개 인자의 발현이 억제됨을 확인하였다.³¹ 따라서 본 연구에서는, 백지(*Angelica dahuricae*) 추출물을 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균력 및 여러 독성인자에 대한 억제능을 확인하였다. MeOHEx, BYAK, SCOP의 *H. pylori*에 대한 MIC와 MBC는 각각 250, 100, 100 µg/mL이었다(Table II). 이는 일반 항생제의 MIC값과 비교하면 높은 농도이나 이 농도에서 세포 독성이 없었으며(Fig. 3) 천연물임을 고려할 때 의미 있는 값이라 할 수 있다. 특히 Kawase 등의 연구 결과에 따르면¹⁶ coumarin의 6,7 위치의 hydroxyl기가 anti-helicobacter activity에 필수적인 그룹으로 설명하고 있으며 4번 위치의 methyl기가 항균력을 증가시키는 것으로 설명하고 있다. Scopoletin은 7번 위치에 hydroxyl기가 있는 구조

로 항균력을 나타낼 조건을 일부 갖추고 있으며 furanocoumarin 구조의 byakangelicol도 항균력을 보이는 것으로 확인되었다. *H. pylori*의 urease 억제능은 MeOHEx에서 65-70%까지 억제되었으며 특히 대표적인 요소분해 효소인 jack bean urease의 활성도 40% 정도 억제되어 백지추출물은 요소분해 효소 억제능이 우수한 성분임을 알 수 있었다(Fig. 1). 두 효소 사이의 억제능의 차이는 효소 농도차이에 기인한 것으로 볼 수 있으며 jack bean urease에 대한 효능을 확인한 것은 대표적 요소분해 효소에 대한 백지 추출물의 효능을 담보하기 위해서였다. 일반적으로 coumarin 유도체는 요소분해 효소 억제능이 우수한 것으로 알려져 있어 백지 추출물의 요소 분해효소 억제능은 백지성분중 coumarin 성분이 기인한 것으로 사료된다.³²⁾ *H. pylori*의 대표적인 병인 인자인 *cagA* 유전자 발현은 백지추출물에 의해 66-88%까지 유의적으로 감소하였다(Fig. 2). *H. pylori*를 감염시킨 AGS cell에서 NO 생성을 측정 한 결과, 대조군에 비해 MeOHEx는 NO 생성이 최대 55%까지 감소하였으나 BYAK 및 SCOP에서는 NO 생성이 억제되지 않았다. 염증이 심할 경우, NO 생성은 염증을 심화시킬 수 있지만, NO의 또 다른 작용은 혈관 확장 등의 효과도 있으므로 NO의 생성억제 효과가 없는 것을 부정적으로만 해석할 필요는 없을 것으로 사료된다. *H. pylori*에 감염된 AGS cell의 IL-8 mRNA 발현은 MeOHEx와 SCOP에서 유의적으로 감소하였으며(Fig. 5) 특히 SCOP의 경우 최대 71% 까지 발현이 억제되었다. 이는 *H. pylori*의 *cagA* 발현이 백지 추출물에 의해 억제되는 것에 기인한 것으로 사료된다. IL-8 단백질 농도를 측정 한 결과 MeOHEx에서는 유의적인 감소는 확인되지 않았으나 BYAK과 SCOP에서 대조군과 비교시 IL-8 농도가 30-40%까지 감소하였다(Fig. 6). BYAK에서 IL-8 mRNA 발현억제능이 관찰되지 않았지만 IL-8 단백질 농도는 유의적으로 감소한 것으로 보아 mRNA에서 단백질로 해독하는 과정에 BYAK이 개입하여 억제하는 것으로 사료된다. 결론적으로 백지 추출물은 *H. pylori*에 대하여 항균력이 우수하였으며, *cagA* 유전자 발현억제 및 그에 따른 IL-8 생성억제에 기인한 항염작용이 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구는 백지(*Angelica dahuricae*) 추출물이 *H. pylori*에 대한 항균 및 *H. pylori*에 감염된 AGS cell에 미치는 항염효과를 관찰하였다. 백지 추출물은 *H. pylori*에 대한 항균 효과가 있었으며, *H. pylori*의 *cagA* 유전자를 유의하게 감소시켰고, urease 효소활성을 최대 70%까지 억제하였다. 백지 추출물은 *H. pylori*에 감염된 AGS cell에서 IL-8 유전자의 발현을 유의적으로 감소하였으며, 전염증인자인 IL-8 생성을 유의적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 이상의 연구

를 통해 백지 추출물은 *H. pylori*에 대한 우수한 항염, 항균 효과가 있음을 확인하였다.

인용문헌

1. Kim, B. J. and Kim, J. G. (2015) Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infections in Korea. *Korean J. Med.* **89**: 133-141.
2. Kathleen, R. J., Jeannette, M. W. and Scott, M. D. (2010) A tale of two toxins: *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* modulate host pathways that impact disease. *Front. Microbiol.* **1**: 1-17.
3. Hatakeyama, M. and Higashi, H. (2005) *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* **96**: 835-843.
4. Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. and Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
5. Tegtmeyer, N., Wessler, S. and Backert, S. (2011) Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J.* **278**: 1190-1202.
6. Kabamba, E. T., Tuan, V. P. and Yamaoka, Y. (2018) Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol.* **60**: 109-116.
7. Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleantous, H., Cover, T. L., Peek, R. N., Chyou, P. G., Stemmerann, G. N. and Nomra, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**: 2111-2115.
8. Crabtree, J. E., Wyatt, J. I., Trejdosiewicz, L. K., Peichl, P., Nichols, P. M., Ramsay, N., Peichl, P., Nicolson, P. H., Ramsay, N., Primrose, J. N. and Lindley, I. J. (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* **47**: 61-66.
9. Kim, N. Y. (2003) Retreatment of *Helicobacter pylori* infection with triple therapy after initial treatment failure. *Korean J. Gastroenterol.* **42**: 195-203.
10. Francesco, V. D., Zullo, A., Hassan, C., Giorgio, F., Rosania, R. and Ierardi E. (2011) Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. An updated appraisal. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2**: 35-41.
11. Huang, H. L., Ko, C. H., Yan, Y. Y. and Wang, C. K. (2014) Antiadhesion and anti-inflammation effects of Noni (*Morinda citrifolia*) fruit extracts on AGS cells during *Helicobacter pylori* infection. *J. Agric. Food Chem.* **62**: 2374-2783.
12. Moon, K. H., Park, P. B. and Jeong, W. Y. (2005) Inhibitor activity and characterization of lactic acid bacteria from pig feces. *KSBB J.* **20**: 76-82.
13. Kwon, Y. S., Kobayashi, A., Kajiyama, S. I., Kawazu, K., Kanzaki, H. and Kim, C. M. (1997) Antimicrobial constituent

- of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry* **44**: 887-889.
14. Lechner, D., Stavri, M., Oluwatuyi, M., Pereda-Miranda, R. and Gibbons, S. (2004) The anti-staphylococcal activity of *Angelica Dahurica* (Bai Zhi). *Phytochemistry* **65**: 331-335.
 15. Li, D. and Wu, L. (2017) Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* cause anti-allergin inflammation. *Exp. Ther. Med.* **14**: 874-880.
 16. Kawase, M., Tanaka, T., Sohara, Y., Tani, S., Sakagami, H. Hauer, H. and Chatterjee, S. S. (2003) Structural requirements of hydroxylated coumarins for in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. *In Vivo* **17**: 509-512.
 17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th Informational Supplement*. CLSI, Wayne, PA, 2009. Document M100-S19.
 18. Weatherburn, M. W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**: 971-974.
 19. Warren, J. R. and Marshall, B. (1983) Unified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* **1**: 1273-1275.
 20. Correa, P. and Piazuelo, M. B. (2008) Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Liver Dis.* **40**: 490-496.
 21. Kabamba, E. T., Tuan, V. P. and Yamaoka, Y. (2018) Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol.* **60**: 109-116.
 22. Dupas, J. L. (2003) First line therapy for *Helicobacter pylori* eradication in France. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **27**: 467-472.
 23. Moradniani, M., Mirbeik-Sabzevari, Z., Jaferian, S., Shafiezhadeh, S., Ardakani, M. J. E., Roozbahany, M. M., Azadbakht, S. and Sherkatolabbasieh, H. (2018) Levofloxacin based vs clarithromycin based sequential therapy in *Helicobacter pylori* eradication; a randomized clinical trial. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* **11**: 20-26.
 24. Losurdo, G., Cubisino, R., Principi, M.B., Barone, M., Leandro, G., Ierardi, E. and Di Leo, A. (2018) Probiotics monotherapy for *Helicobacter pylori*: Systematic review and pooled data analysis. *World J. Gastroenterol.* **24**: 139-149.
 25. Park, H. S., Wijerathne, C. U. B., Jeong, H. Y., Seo, C. S., Ha, H. and Kwun, H. J. (2018) Gastroprotective effects of Hwanglyeonhaedok-tang against *Helicobacter pylori*-induced gastric cell injury. *J. Ethnopharmacol.* **216**: 239-250.
 26. Choi, S.S., Lee, H. K. and Chae, H. S. (2014) Synergistic in vitro photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and chitosan against *Helicobacter pylori* 26695. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**: 526-532.
 27. Lee, Y. S. and Kim, N. W. (2011) Antioxidant activity and irritation test of extracts obtained from *Angelica dahurica*. *Prev. Nutr. Food Sci.* **16**: 8-11.
 28. Kim, P. S., Lee, T. J., Kim, Y. H. and Kim, J. S. (2011) Antioxidative activities of *Angelica dahurica* Radix ethanol extract. *JKAIS* **12**: 4378-4384.
 29. Sim, Y., Park, G., Eo, H., Huh, E., Gu, P.S., Hong, S. P., Pak, Y. K. and Oh, M. S. (2017) Protective effects of a herbal extract combination of *Bupleurum falcatum*, *Paeonia suffruticosa*, and *Angelica dahurica* against MPTP-induced neurotoxicity via regulation of nuclear receptor-related 1 protein. *Neuroscience* **340**: 166-175.
 30. Lin, C. H., Chang, C. W., Wang, C. C., Chang, M. S. and Yang, L. L. (2002) Byakangelicol, isolated from *Angelica dahurica*, inhibits both the activity and induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**:1271-1278.
 31. Kim, A. R., Lim, J. W., Kim, H. G. and Kim, H. Y. (2016) Supplementation with *Angelica keiskei* inhibits expression of inflammatory mediators in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected mice. *Nutr. Res.* **36**: 488-497.
 32. Jadhav, S. G., Meshram, R. J., Gond, D. S. and Gacche, R. N. (2013) Inhibition of growth of *Helicobacter pylori* and its urease by coumarin derivatives: Molecular docking analysis. *J. Pharm. Res.* **7**: 705-711.
- (2018. 8. 28 접수; 2018. 9. 17 심사; 2018. 9. 21 게재확정)