<원 저>

*Helicobacter pylori*에 대한 천련자 추출물의 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서의 항균활성

이현아¹ · 김옥진^{1,2,*}

¹원광대학교 동물자원개발연구센터, ²원광대학교 소화기질환연구소
(접수: 2012년 2월 6일, 수정: 2012년 4월 8일, 게재승인: 2012년 5월 21일)

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of *Meliae fructus* extract against *Helicobacter pylori*

Hyun-A Lee¹, Okjin Kim^{1,2,*}

¹Center for Animal Resources Development, and ²Digestive Disease Research Institute, Wonkwang University,
Iksan 570-749, Korea

(Received: February 6, 2012; Revised: April 8, 2012; Accepted: May 21, 2012)

Abstracts : In this study, a medicinal herbal plant, *Meliae fructus*, was examined and screened for anti-*Helicobacter* (*H.*) *pylori* activity. Seventy percent ethanol was used for herbal extraction. For anti-*H. pylori* activity screening, inhibitory zone tests as an *in vitro* assay and *in vivo* study using a Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) model were performed. Also, the safety of herbal compounds was evaluated by animal study. As a result of inhibitory zone test, *Meliae fructus* extract demonstrated strong anti-*H. pylori* activities. Also, as results of *in vivo* animal studies, *Meliae fructus* demonstrated strong therapeutic effects against *H. pylori* infection according to the criteria of histological examination and rapid urease test. As results of the safety study, after 28 days treatment of the *Meliae fructus* extract, the animals were not detected any grossly and histological changes. These results demonstrate that it can be successfully cured against *H. pylori* infection and protected from *H. pylori*-induced pathology with *Meliae fructus*. It could be a promising native herbal treatment for patients with gastric complaints including gastric ulcer caused by *H. pylori*.

Keywords : antibacterial activity, anti-helicobacter, *Helicobacter pylori*, herb, *Meliae fructus*

서 론

Helicobacter(*H.*) *pylori*는 Marshall과 Warren에 의하여 최초로 1984년에 만성 위염 환자의 위점막 생검 조직에서 나선형의 만곡형 그람음성 간균으로 분리 보고되었고, 이후로 *H. pylori*는 급성 및 만성위염, 소화불량, 흡수장애증, 저산증, 위궤양, 십이지장궤양, 위암, 위림프종에 이르는 각종 소화기 질환의 주요한 원인 인자로 밝혀지고 있다 [3, 5, 17]. *Helicobacter* 속(Genus)은 현재 24개 종(species)이 보고되어 있으며, 사람과 동물에서 위염 및 위궤양의 주요 인자로 보고되고 있다 [6]. 또한 이들의 배설물들로 *Helicobacter* 세균들이 배출될 수 있으

며, 이들에 의한 음식물과 물의 오염 가능성이 보고되어 공중보건학으로 그 중요성이 대두되고 있다 [26]. *H. pylori* 치료방법으로 주로 사용되는 방법은 3제요법(Triple therapy)인데 이는 bismuth(BIS)와 Tetracyclin(TC) 및 metronidazole(MET)을 투여하는 방법이다 [24]. *H. pylori* 박멸의 1차 처방에는 bismuth 제제를 포함하는 3제요법, proton pump inhibitor(PPI)를 포함하는 2제요법, ranitidine bismuth citrate 제제를 포함하는 3제요법, BIS를 근간으로 하는 3제요법에 PPI를 추가하는 4제요법 등이 권고 된다 [9, 18]. 오늘날 *H. pylori* 박멸을 위하여 PPI를 기본으로 항생제를 포함한 3제요법이 치료의 주를 이루고 있는데 이와 같은 항생제의 사용은 필연적으

*Corresponding author
Tel: +82-63-850-6668, Fax: +82-63-850-7308
E-mail: kimoj@wku.ac.kr

로 이들 항생제에 대한 내성률의 증가를 초래 하며 우리나라는 서구보다도 높은 내성률을 보이고 있다 [2, 11]. 특히 clarithromycin(CLA)에 대한 내성률은 꾸준히 증가하고 있는 실정이다 [12]. *H. pylori* 감염을 뿐 만 아니라 항생제 내성률이 다른 나라에 비해 상대적으로 높은 우리나라에서 *H. pylori*의 제균 치료율을 높이기 위해서는 지속적으로 항생제 내성을 관찰할 필요가 있다 [11]. 현재 *H. pylori*에 관한 개발된 대책은 *H. pylori* 감염 진단 후 치료의 형태이며 이 때 사용되는 치료제는 항생제 MET를 주로 사용하고 있는데 이에 대한 내성과 항생제 부작용의 문제가 야기되고 있어 새로운 기전의 예방 및 치료제의 개발이 필요한 실정이다 [12]. 새로운 항생제의 개발 분야에서 크게 각광을 받고 있는 것으로 기존 화합물에 기초한 항생제와 연관 관계가 먼 천연물 유래의 안전한 항생 물질이 있으며 천연물은 화합물 보다 다양성이 크고 안전하여 천연물 유래 항생 물질의 사용은 높은 안전성과 항생제 내성 문제의 해결 측면에서 큰 장점을 가지고 있다 [13].

천련자(*Meliae fructus*)는 멸구슬나무과 식물 천련(*Melia azedarach*)의 열매이다. 천련자는 예로부터 습열을 제거하고 통증을 완화하고 기생충을 구제하는 효능이 있어 가슴통증과 산통 및 만성 회충증으로 인한 복통을 치료하는데 사용해 왔다 [10]. 현재까지 천련자의 *H. pylori* 항균 효과에 관한 연구는 없는 실정이다.

본 연구는 사람에 위암 및 위궤양을 유발하여 심각한 임상결과를 초래하는 *H. pylori*에 효과적인 천연물 유래 항균물질을 개발하고자 천련자 추출물의 *H. pylori* 항균 효과 연구가 수행되었다.

재료 및 방법

천연물 천련자 추출물 조제

시험에 사용된 천련자는 익산시 대학한약국으로부터 한국산으로 판매되고 있는 건조된 천련자(*Meliae fructus*)를 구입하여 분쇄기(DA700; 대성아트론, 한국)로 입자 크기가 30메시 이하가 되도록 분쇄하여 천연물 분말을 수득한 후, 상기에서 수득한 건조된 천연물 분말(1 kg) 질량의 3배(v/w)에 해당하는 증류수를 포함하는 70% 에틸알콜 수용액을 가하여 100°C에서 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 환류 냉각 추출한 후 추출물을 거어조로 1차 여과하고 3,000 × g에서 3분간 원심 분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2 µm filter(Nalgene, USA)로 각각을 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator(EYELA, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer(Nihon freezer, Japan)에서 동결시켰다. 동결된 각각의 천연물 추출물들을 동결

건조기(Labconco, USA)로 동결 건조하여 추출물 220 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20°C에 보관하였다.

H. pylori 배양

H. pylori(ATCC 43504; American Tissue Culture Collection, USA) 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종 후, 10% CO₂ 및 100% 습도가 유지되는 37°C incubator에서 3일간 배양 하였다. 배양된 *H. pylori*를 멸균된 PBS(pH 7.2)가 들어 있는 튜브에 모은 후, 1 mL당 2.0 × 10⁹ colony-forming unit(CFU)의 균수를 포함하게 준비하여 실험에 사용하였다.

실험동물

식품의약품안전청 실험동물자원과에서 Specific-pathogen free(SPF) 상태로 계통이 유지되고 있는 Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)을 공급받아 원광대학교 동물자원개발연구센터 실험동물사육실(II)에서 일주일 동안 순화 사육한 후 실험에 사용하였다. Mongolian gerbil에 *H. pylori*는 사람의 병태생리와 유사하게 만성으로 진행되어 위염, 위궤양과 위암을 유발하는 것으로 알려져 있다 [5]. 본 연구자들은 사람의 *H. pylori* 감염 동물모델인 Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 적용에 의한 치료효과를 확인하고자 하였다. 사육기간 중 온도는 23 ± 1°C, 습도 50 ± 5%, 소음 60 phone 이하, 조명시간 08:00~20:00(1일 12시간), 조도 150~300 Lux, 환기는 시간당 10~12회의 환경에서 사육되었으며, 사료는 실험동물 전용사료(샘타코, 한국)를 2.0 Mrad의 방사선으로 멸균시켜 자유급식 시켰으며, 음수는 filter 여과 후 자외선 멸균수를 자유급수 하였다. 본 연구에 사용된 동물실험에 관련된 모든 실험과정과 절차는 원광대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행되었다 (Approval No. WKU 09-026).

In vitro 헬리코박터 항균 효능 실험

H. pylori 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천 배지 플레이트에 도말(streak)하고 대조를 위한 항생제 디스크 겐타마이신(바이엘동물약품, 한국), 가나마이신(바이엘동물약품, 한국) 및 엔로플록사신(바이엘동물약품, 한국)을 적용용량으로는 각각 0.25 mg, 0.5 mg, 0.25 mg씩 적용하였다. 천련자 추출물 30 mg을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma, USA) 100 µL에 녹여 300 mg/mL 농도로 디스크 여과지에 5 µL씩 10⁰(1.5 mg), 10⁻¹(0.15 mg), 10⁻²(0.015 mg), 10⁻³(0.0015 mg)과 용매대조를 위한 DMSO를 각각 적용하였다. 본 실험에서는 균이 접종된 배지에 멸균된 디스크를 배치하고, 이후 10% CO₂,

100% 습도가 유지되는 항온기에서 배양하고 4일 후 평가하였다. 균을 접종한 후 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 및 60시간 후 각각 표준자를 이용하여 clear zone의 지름으로 표현되는 억제범위(the zone of inhibition)를 측정하여 균이 자라지 않은 clear zone을 관찰하였다. 디스크는 각 시료 당 3개씩 검사하여 억제 범위의 평균값과 표준편차를 구하였다. 결과의 평가는 항생제 디스크 각각의 주변 clear zone 형성 관찰하고 형성된 clear zone의 지름을 측정하여 지름이 클수록 항균 효과가 높은 것으로 판정하였다.

In vivo 헬리코박터 항균 효능 실험

1주일간 순화 사육한 7주령의 건강한 수컷 Mongolian gerbil 40두를 실험에 사용하였다. 각 군당 10두의 동물들을 사용하여 *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 적용군(I군), *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 무처리 적용군(II군) 및 *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 무처리 적용군(IV군)의 4개 군으로 나누어 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 7주령 Mongolian gerbil을 12시간 절식 시킨 후, I군 및 II군의 동물들은 1 mL 당 2.0×10^9 CFU의 *H. pylori* 균 수가 포함되게 준비된 배양액을 두당 0.5 mL씩 마우스용 종대를 이용하여 경구로 투여하여 *H. pylori* 감염을 유발하였다. III군 및 IV군의 동물들은 12시간 절식 후 멸균 PBS(pH 7.2)를 0.5 mL씩 경구로 투여하였다. 투여 후 각 군의 동물들은 12시간의 절식 후 사료를 급여하였다. 절식 동안에 음수는 자유 급이 할 수 있도록 하였다. *H. pylori* 또는 PBS를 투여한 I군과 III군의 동물들은 2주일 후인 9주령부터 천련자 추출물을 체중 기준으로 400 mg/kg 용량으로 경구 투여를 4주간, 즉 13주령까지 연일 투여하였다. 이 기간 동안 II군 및 IV군의 동물들은 다른 처치 없이 사료와 음수를 자유 급여하였다.

9주령에서 13주령까지, 즉 *H. pylori* 감염이 유지되는 시점으로부터 4주간의 시험물질 투여 기간, 각 시험군의 동물들은 1주에 1회 체중을 측정하고 실험 종료일인 13주령에 각 개체를 12시간 절식한 후 에테르 마취 하에 안락사 시킨 후 위를 적출하여 육안병변점수를 구하였다. 또한 신속요소분해효소검사를 통하여 감염 여부를 확인하였으며, 추가적인 병리조직학적 검사를 통하여 병리조직점수를 구하여 천련자 추출물 투여가 헬리코박터 세균 감염에 미치는 영향을 평가하였다.

위 점막의 육안병변점수(gross lesion score) 산정은 Yam 등 [28]의 방법에 따라 수행하였다. 시험방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 각 시험 군별로 시험 종료일에 적출된 위(stomach)는 큰굽이(great curvature)를 따

라 절개하여 펼친 후에 실체현미경($\times 10$)을 사용하여 병변을 관찰하고, 육안 병변의 점수를 산정하였다. 육안병변점수는 각 병변의 가로 $\times$ 세로 길이(mm²)의 총합으로 계산하였다. 각 개체의 점수를 구한 후 각 군별로 평균 점수를 구하였다.

위 점막의 조직병변점수(histological lesion score) 산정은 Yam 등 [28]의 방법에 따라 수행하였다. 시험방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 병리조직학적 검사를 위하여 적출된 위의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 선위(glandular stomach) 부위를 가로 방향으로 5 mm 간격으로 잘라, 개체 당 3개 부위를 선정하였고, 이때 선별된 부위들은 다른 개체들 간에 서로 동일한 부위가 되도록 주의하여 선정하였다. 선정된 부위들의 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin(H&E) 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다. 각 조직 소견의 병변에 대한 평가를 수행하여 0: no lesion, 1: mild, 2: moderate, 3: severe로 등급을 점수로 환산하여 기록하고, 개체당 3개 부위의 점수의 합을 구하여 개체의 조직병변점수를 구한 후, 각 군의 평균 점수를 구하였다.

신속요소분해효소검사(rapid urease test)는 CLO 검사 시약인 ASAN Helicobacter Test(Asan Pharmaceutical, Korea)를 이용하여 수행되었다. 무균적으로 적출한 위 날문부위(pyloric region) 점막의 조직을 채취하여 ASAN Helicobacter Test에 각각을 넣고 제조회사의 설명서에 따라 배양하여 노란색 배지가 적색으로 변하는 경우를 양성으로 판정하였다. 검사과정을 간략히 설명하면 미리 실온에 방치한 시약을 노란색 한천 겔이 보이도록 스틱커를 벗긴 후 무균 바늘을 사용하여 위점막 조직을 겔 속에 밀어 넣고 스틱커를 다시 덮은 후 동물번호와 시간을 기입하고 incubator를 이용하여 37°C로 12시간 배양 후에 판독하였다. 판독의 결과 노란색에서 적색으로 배지의 색깔이 바뀐 경우를 양성으로 판정하였다. 실험 종료 후 양성 판정된 개체의 수를 백분율로 구하여 양성율(Positive percent)을 구하였고 음성 개체수를 군 전체수로 나누어 백분율을 구하여 치료율(Therapeutic percent)을 구하였다.

Polymerase chain reaction(PCR) 검사는 실험 종료 후 공시동물들의 위 날문부위(pyloric region) 점막 일부를 무균 채취하여 DNA를 추출한 후 *H. pylori* 존재 유무를 확인하기 위한 PCR을 수행하였다. DNA 추출은 bead beater-phenol extraction method를 사용하였다 [19]. 겔체를 1 mL 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater (Biospec product, USA) 전용 2 mL tube에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1

mm size; Biospec product, USA) 200 μ L와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50 : 49 : 1) 200 μ L를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product, USA)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 mL tube에 옮겼다. 3 M sodium acetate 10 μ L와 ice-cold ethanol 250 μ L를 넣어 -20°C에서 10분간 정제시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% alcohol로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ L에 용해시켜 실험에 사용하였다. Genus *Helicobacter*의 *rpoB* DNA 분절을 증폭시킬 수 있는 PCR은 Oh 등 [19]의 방법에 따라 primer 쌍으로 Forward primer(HF; 5' ACTTTAACGCATGAAGATAT 3')와 Reverse primer(HR; 5' ATATTTTGACCTTCTGGGGT 3')를 사용하여 PCR은 *Taq* DNA polymerase 1 U, 각 dNTP 250 μ M, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 AccuPower PCR Premix(Bioneer, Korea)를 이용하였다. 추출된 DNA를 template로 50 ng, 각 primer 20 pmol을 AccuPower PCR Premix tube에 넣고 멸균 증류수로 최종 부피를 20 μ L로 맞춘 후, 94°C 30초, 52°C 30초, 72°C 45초의 30 cycle의 PCR을 수행한 후, 1.2% agarose gel에서 458 bp의 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

천련자 추출물의 독성 평가 실험

천련자 추출물을 오랜 기간 섭취함으로 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위한 독성 평가 실험을 수행하였다. 실험은 9주령 수컷 Mongolian gerbil을 사용하여 수행되었으며, 28일 동안 매일 400 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구 투여하였다. 실험 종료일 에테르 마취 하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 후, 대뇌(cerebrum), 소뇌(cerebellum), 연수(pons), 고환(Testis), 심장(Heart), 간(Liver), 폐장(Lung), 신장(Kidney), 근육

(Muscle), 비장((Spleen), 전립선(Prostate), 췌장(Pancreas), 흉선(Thymus), 부신(Adrenal gland), 소장(Small Intestine), 대장(Large Intestine), 골수(Bone marrow), 갑상선(Thyroid gland) 및 정낭(seminal vesicle)을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다. 고정이 완료된 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 μ m 두께로 절편하여 H&E 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다.

통계학적 분석

각 시험군의 양성률에 대한 통계는 Repeated Measured ANOVA SPSS(ver. 12, USA)(Duncan's multiple range test)을 실시하였으며 $p < 0.05$ 이하 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다. Rapid urease 검사인 CLO test의 각 시험 군의 양성률과 치료율에 대한 95% confidential interval(CI)이 MINITAB software(Minitab, USA)를 사용하여 구해졌다. 각 군의 양성률에 대한 CI가 차이가 있으면 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다.

결 과

In vitro 헬리코박터 항균 효능 실험 결과

H. pylori 세균 배양 플레이트에 적용한 대조 항생제 디스크들과 천련자 추출물을 적용한 후 37°C incubator에서 추가 배양 하면서 적용 디스크 주변 clear zone의 지름 크기를 측정하고 결과 각각의 디스크 주변에 *H. pylori* 세균이 증식하지 못하는 clear zone을 관찰할 수 있었다. 실험결과 Table 1과 같이 적용 후 12시간째 가장 큰 clear zone의 지름을 관찰할 수 있었는데, DMSO는 clear zone의 크기를 관찰할 수 없었고, 대조군으로 사용된 겐타마이신은 8.53 ± 0.58 mm, 가나마이신은 9.5 ± 0.58 mm, 엔로플록사신은 15.5 ± 1.15 mm이었으며, 천련자 추출물 1.5 mg은 12.5 ± 0.58 mm, 천련자 추출물 0.15 mg은 9.5

Table 1. Anti-*H. pylori* activities of *Meliae fructus* extract using the paper disk diffusion bioassay

Treatment	Clear zone (mm)				
	6 h	12 h	24 h	48 h	60 h
DMSO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Gentamycin	7.5 $\pm$ 1.53	8.5 $\pm$ 0.58	8.3 $\pm$ 1.00	7.5 $\pm$ 0.58	6.5 $\pm$ 0.58
Ganamycin	7.3 $\pm$ 1.00	9.5 $\pm$ 0.58	8.5 $\pm$ 0.58	7.3 $\pm$ 1.53	5.0 $\pm$ 1.00
Enrofloxacin	11.5 $\pm$ 1.00	15.5 $\pm$ 1.15	12.5 $\pm$ 1.53	10.5 $\pm$ 0.58	8.3 $\pm$ 0.58
<i>Meliae fructus</i>	10 ⁰ (1.5 mg)	10.5 $\pm$ 0.58	12.5 $\pm$ 0.58	10.0 $\pm$ 1.00	9.3 $\pm$ 1.53
	10 ⁻¹ (0.15 mg)	7.5 $\pm$ 0.58	9.5 $\pm$ 0.58	5.3 $\pm$ 0.58	5.0 $\pm$ 1.00
	10 ⁻² (0.015 mg)	4.7 $\pm$ 0.58	6.5 $\pm$ 1.00	3.8 $\pm$ 0.58	3.3 $\pm$ 0.58
	10 ⁻³ (0.0015 mg)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Table 2. Results of body weight changes of anti-*H. pylori* activities of *Melaleuca fructus* extract using *in vivo* study

Group	Treatment	Body weights (g)				
		0 w.p.i. ^a	1 w.p.i.	2 w.p.i.	3 w.p.i.	4 w.p.i.
I	<i>H. pylori</i> + <i>Melaleuca</i> ^b	132.7 ± 1.5	137.0 ± 2.0	140.5 ± 2.0*	142.8 ± 1.5*	144.5 ± 1.0*
II	<i>H. pylori</i> + PBS	132.5 ± 1.5	134.0 ± 2.1	135.0 ± 1.1	135.7 ± 2.0	137.0 ± 1.5
III	PBS + <i>Melaleuca</i>	133.0 ± 1.5	138.5 ± 2.0	142.5 ± 1.5*	144.8 ± 2.0*	145.5 ± 2.0*
IV	PBS + PBS	133.1 ± 2.0	138.8 ± 1.1	143.2 ± 1.5*	145.5 ± 2.0*	146.5 ± 2.5*

^aWeeks post inoculation. Treatment weeks with test materials after *H. pylori* infection. ^b*Melaleuca fructus* treatment was continuously inoculated with 400 mg/kg dose during 4 weeks after *H. pylori* infection. *Significantly different from the positive control Group II ($p < 0.05$).

Table 3. Gross and histopathological lesion scores of anti-*H. pylori* activities of *Melaleuca fructus* extract using *in vivo* study

Group	Treatment	Gross lesion scores	Histopathological lesion scores
I	<i>H. pylori</i> + <i>Melaleuca</i>	12.5 ± 3.0*	2.2 ± 0.50*
II	<i>H. pylori</i> + PBS	95.5 ± 5.0	8.5 ± 1.50
III	PBS + <i>Melaleuca</i>	0*	0*
IV	PBS + PBS	0*	0*

*Significantly different from the positive control Group II ($p < 0.05$).

Table 4. Results of rapid urease test and polymerase chain reaction with gastric mucosal tissues after the study on therapeutic effects of *H. pylori* infection *Melaleuca fructus* extract

Group	Inoculation ^a		n	Positive reaction (Positive percent) ^b	
	<i>H. pylori</i>	Treatment		Rapid urease test	Polymerase chain reaction
I	Yes	<i>Melaleuca</i>	10	0* (0 %, CI ^c 0–25.9)	0* (0 %, CI ^c 0–25.9)
II	Yes	PBS	10	10 (100 %, CI 74.1–100)	10 (100 %, CI 74.1–100)
III	No	<i>Melaleuca</i>	10	0* (0 %, CI 0–25.9)	0* (0 %, CI 0–25.9)
IV	No	PBS	10	0* (0 %, CI 0–25.9)	0* (0 %, CI 0–25.9)

^aTreatment was conducted daily during 2 weeks after *H. pylori* inoculation. ^bThe positive percent revealed *H. pylori* colonization, which was observed as red color change from yellow color medium. ^cIncidence percentage (95% confidential interval) was calculated with MiniTab statistic software program. *Significantly different from the positive control Group II ($p < 0.05$).

±0.58 mm, 천련자 추출물 0.015 mg은 6.5 ± 1.00 mm이었고, 천련자 추출물 0.0015 mg은 clear zone을 관찰할 수 없었다.

In vivo 헬리코박터 항균 효능 실험 결과

천련자 추출물을 *H. pylori* 세균 감염 및 비감염 동물에 투여한 후, 체중변화를 확인한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. *H. pylori* 세균 감염 후 천련자 추출물 투여군(I군)은 비투여군(II군)과 비교하여 유의한 체중 증가를 보였다($p < 0.05$).

천련자 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물

에 투여한 후, 위 육안병변점수 및 조직병변점수를 확인한 결과 Table 3과 같은 결과를 얻었다. *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 무처리 적용군(IV군)의 경우에 육안 및 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았다. 반면, 헬리코박터 파일로리 감염 후 천련자 추출물 무처리 적용군(II군)은 천련자 추출물 적용군(I군) 보다 육안병변점수 및 조직병변점수가 유의하게 높은 점수를 보였다($p < 0.05$). *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 투여군인 I군에서는 개체에 따라 가벼운 위점막 상피세포 위축 소견이 보이는 개체가 일부 관찰되었을 뿐 다른 유의한 병변은 관찰되

Fig. 1. Histopathological findings of the stomach in the study on therapeutic effects of *Helicobacter* (*H.*) *pylori* infection with or without *Meliae fructus* extract. A) Group I (*H. pylori* + *Meliae fructus*), B) Group II (*H. pylori* + PBS), C) Group III (PBS + *Meliae fructus*), D) Group VI (PBS + PBS). H & E stain. $\times 100$.

지 않았다(Fig. 1A). 반면 *H. pylori* 감염군인 II군에서는 개체에 따라 병변의 정도 차이는 있지만 위점막 상피세포의 손상과 상피세포 위축 소견이 관찰되었다(Fig. 1B). *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 적용군(III군)과 *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 무처리 적용군(IV군)의 경우에 병리조직학적으로 유의한 병변은 관찰되지 않았다(Figs. 1C and D).

신속요소분해효소검사는 천련자 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여하고 *H. pylori* 세균의 치료에 의한 제거 효과를 확인하기 위하여 수행되었으며, 실험결과는 Table 4와 같았다. 신속요소분해효소검사의 CLO test의 결과는 검체에 감염된 헬리코박터 세균 성장 시 요소효소분해와 제공된 배지의 요소와의 반응 결과로 유도되는 색깔 변화로 감염 여부를 손쉽게 알 수 있는 방법이다 [19]. 실험결과, *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 천련자 추출물 무처리 적용군(IV군)의 경우에 신속요소분해효소검사에 의하여 *H. pylori* 세균에 음성 결과를 보였

Fig. 2. The chemical structure of toosendanin.

다. 반면, *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 무처리 적용군(II군)은 10마리 개체 모두에서 강한 적색의 *H. pylori* 세균 양성반응이 검출되었다. *H. pylori* 감염 후 천련자

추출물 적용군(I군)은 10두 모두에서 음성의 결과를 보여 *H. pylori* 감염 양성대조군 II군과 유의한 변화를 보였다($p < 0.05$).

PCR 검사를 통하여 *H. pylori*에 특이적인 밴드를 확인함으로써 검사된 위조직 내에 *H. pylori* 감염 여부를 판정할 수 있었다(Table 4). *H. pylori* 양성 검체는 특이 밴드 유무로 확인할 수 있었다. 실험결과, *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 무처리 적용군(II군)은 10마리 개체 모두에서 양성반응이 검출되었다(Table 4). 반면, *H. pylori* 감염 후 천련자 추출물 적용군(I군)은 10두 모두에서 음성의 결과를 보여 *H. pylori* 감염 양성대조군 II군과 유의한 변화를 보였다($p < 0.05$).

천련자 추출물에 의한 독성 평가 결과

천련자 추출물을 오랜 기간 섭취함으로써 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위해 9주령 수컷 Mongolian gerbil을 사용하여 28일 동안 매일 400 mg/kg용량으로 시험물질을 경구 투여하고 지주의 독성 발현 유무를 평가한 결과 대조군 및 천련자 추출물 투여군의 모든 개체에서 폐사 또는 특이 임상증상은 관찰되지 않았다. 실험 종료일 에테르 마취 하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 결과 유의한 병변은 관찰할 수 없었다. 또한, 실질 장기들의 병리조직학적 검사에서도 별다른 세포손상은 관찰되지 않았다.

고 찰

H. pylori 감염은 만성 위염, 장상피화생(intestinal metaplasia) 및 소화성 궤양의 중요한 원인이며, 위암발생에 기여한다 [1]. 현재까지 우리나라에서 위암은 암으로 인한 사망의 주요 원인을 차지하고 있다 [1]. 한국인의 연간 위암 발생율은 10만 명당 남성 57.9명, 여성 25.1명으로 보고되고 있으며, 이는 다른 나라의 위암 발생율에 비교하여 매우 높은 수치임을 알 수 있다. 위암은 그 임상적 결과가 심각하여 한국 성인 사망률의 주요 원인 중의 하나로 보고되고 있다 [1]. *H. pylori*의 유병율은 한국인에서 8살에 80%, 20살 이상에서는 90%를 보이는 것으로 보고되고 있다 [7]. 이러한 자료들에 의하면 대부분의 한국인들은 *H. pylori*에 감염되어 있으며, 평균 40~45년 이상의 생애 동안, *H. pylori*에 감염된 상태로 지낸다는 것을 알 수 있다. 또한 국내의 높은 위암 발생율은 *H. pylori*의 높은 유병율과 연관된 결과임을 알 수 있다 [7]. 이러한 연구 결과들에 의하면 *H. pylori*는 위암의 유발 인자로서 *H. pylori* 치료 및 감염대책 마련이

시급한 것을 알 수 있다.

항균제내성은 *H. pylori* 제균 실패의 주요 원인이다 [4]. 일반적으로 일차 제균치료제로는 PPI, amoxicillin (AMO), CLA 또는 MET 3제요법이 권장되지만, 국내의 MET 내성률이 25.8~66.2% 정도로 보고되고 있다 [12, 14]. 국내의 CLA 내성률은 2.5~13.8%로 보고되어 있다 [14]. 해당 지역에서 또는 특정 환자군에서 CLA에 대한 원발성 내성률이 15%가 넘으면 경험적인 일차치료제로 CLA 사용이 어렵다 [14]. 이러한 제균율의 감소에 가장 많은 영향을 미치는 요인은 항생제 내성으로서 국내의 경우 AMX과 CLA은 1987년에는 0%의 내성율에서 2003년에는 각각 18.5%와 13.8%로 내성율이 증가하였으며 MET도 52.9%에서 66.2%로 내성율이 증가했음을 알 수 있다 [25]. 이러한 항생제 내성의 대안으로서 천연물 유래 항균 효능 물질의 개발이 새로운 대안으로 제시되고 있다 [15].

본 연구에서 항균효능이 기대되는 천련자 추출물의 anti-*H. pylori* 효능을 평가 결과 *in vitro* 실험에서 확인하였다. 또한 천련자 추출물을 이용하여 실험동물을 이용한 *in vivo* 실험으로 *H. pylori* 감염치료 효능 연구를 수행한 결과 천련자 추출물은 *H. pylori* 감염을 억제하고 감염에 의한 병변을 완화시켜주는 것을 알 수 있었다. 천련자 추출물을 적용한 *H. pylori* 감염에 대한 *in vivo* 치료효과 실험결과 위 점막의 *H. pylori* 제거 효과는 rapid urease CLO test와 PCR 결과로 확인할 수 있었다. 또한, 우수한 anti-*H. pylori* 효능을 확인한 천련자 추출물에 대한 28일 투여 안전성 평가를 수행한 결과, 천련자 추출물의 400 mg/kg 연일 투여에 의하여 유의한 독성 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 천련자 추출물은 안전성이 높은 것으로 판단되었다.

천련자는 구조가 확인된 몇 가지 화합물을 함유하고 있는데, toosendanin이 주성분이고, 그 외에 kulinone, methylkulonate, melianol, melianodiol, melialactone, azadiarachtin 등을 함유 한다 [29]. 천련자의 주요 생리활성 물질인 toosendanin은 화학구조식 $C_{30}H_{38}O_{11}$ 의 구조로 구성되어 있으며, 분자량 574.68, 밀도 1.44 g/cm³, 비등점 760 mmHg에서 714°C, 녹는점 178~180°C의 백색의 크리스탈 분말의 형태를 가지고 있다 [29]. 천련자의 생리활성에 대한 실험연구는 주성분으로 알려진 toosendanin으로 진행된 것이 주를 이루는데, 암세포에 대한 apoptosis 효과 [21] 및 성장억제 효과 [8], 항보툴리누스 효과 [22], 항균 효과 [16], 아세틸콜린 분비억제 효과 [23], 간의 약물대사효소 및 담즙 분비활성 효과 [8], 항고지혈증 효과 [20], 항산화 및 항염효과 [29] 등이 보고되어 있다. 최근에 마우스를 이용하여 천련자의 에탄올추출물과 여기서 분리된 두 가지 limonoid 성분

의 항염증 및 진통 효과에 대한 연구결과가 발표된 바 있다 [27]. 그러나 현재까지 천련자의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 보고는 없었다. 본 연구 결과 천련자는 *in vitro* 와 *in vivo* 실험 둘 다에서 우수한 anti-*H. pylori* 효능이 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구 결과는 천련자의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 최초 보고이다.

본 연구의 결과를 종합한다면, 항생제 내성문제가 없으며 섭취에 안전성이 높은 천연물 유래 *H. pylori* 항균 물질로서 천련자 추출물은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 모두 우수한 anti-*H. pylori* 효능이 확인되었기 때문에 향후 *H. pylori* 치료제 개발의 우수한 후보물질로서 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(2010-0021940)을 지원받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다. 또한 본 연구의 수행 동안 기술적인 지원을 아끼지 않은 원광대학교 동물자원개발연구센터(Center for Animal Resources Development)의 홍선화, 김동우, 최은정 연구원의 수고에 감사 드립니다.

참고문헌

- Ahn YO, Park BJ, Yoo KY, Kim NK, Heo DS, Lee JK, Ahn HS, Kang DH, Kim H, Lee MS, Park TS. Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. J Korean Med Sci 1991, 6, 7-14.
- Eun CS, Han DS. Current concepts in the treatment of *H. pylori* infection and *H. pylori* vaccines. Hanyang Med Rev 2007, 27, 81-95.
- Hansson LE, Nyrén O, Hsing AW, Bergström R, Josefsson S, Chow WH, Fraumeni JF Jr, Adami HO. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. N Engl J Med 1996, 335, 242-249.
- Harris A. Treatment of *Helicobacter pylori*. Drugs Today 1997, 33, 59-66.
- Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res 1998, 58, 4255-4259.
- Hong S, Lee HA, Kim Y, Kim O. Postpartum transmission as a major route of mother-to-child *Helicobacter felis* infection. Lab Anim Res 2010, 26, 319-321.
- Jung TS, Kang SC, Choi YJ, Jeon BS, Park JW, Jung SA, Song JY, Choi SH, Park SG, Choe MY, Lee BS, Byun EY, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH. Two-dimensional gel electrophoresis of *Helicobacter pylori* for proteomic analysis. J Korean Soc Microbiol 2000, 35, 97-108.
- Kim B, Choi JW, Lee CK. The effect of Meliae toosendan fructus on liver function (I)-Effects of each fractions from meliae toosendan fructus on drug metabolism enzyme system and bile secretion. Korean J Pharmacogn 1993, 24, 63-68.
- Kim BW, Choi MG, Choi H, Moon SB, Kim BK, Chae HS, Kim JK, Chung IS, Chung KW, Sun HS, Park DH. Pooled analysis of antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Korea. Korean J Gastroenterol 1999, 34, 42-49.
- Kim HY, Shin HS, Park H, Kim YC, Yun YG, Park S, Shin HJ, Kim K. In vitro inhibition of coronavirus replications by the traditionally used medicinal herbal extracts, Cimicifuga rhizoma, Meliae cortex, Coptidis rhizoma, and Phellodendron cortex. J Clin Virol 2008, 41, 122-128.
- Kim JM. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Hanyang Med Rev 2007, 27, 80-95.
- Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim N, Kim YJ, Song IS. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48, 4843-4847.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2005, 4, 206-220.
- Lee J, Kim SM, Im EH, Choi YW, Kim YM, Kim PS, Lee JH. The prevalence of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolated in Daejeon. Korean J Clin Microbiol 2005, 8, 47-50.
- Lim TH, Lee JM, Chang TH, Cha B. Antifungal activity and identification of an *Actinomyces* strain isolated from mummified peaches. Korean J Microbiol Biotechnol 2000, 28, 161-166.
- Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazio H, Ríos JL, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. Fitoterapia 2004, 75, 718-723.
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic

- ulceration. Lancet 1984, **1**, 1311-1315.
18. **Nam SW, Roe IH, Kim SB, Lee BS, Hwang YJ, Park HJ, Kim JW, Lee JH, Shin JH, Yu KA.** Detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. Korean J Gastroenterol 2000, **36**, 450-456.
19. **Oh HG, Kim Y, Lee HA, Kim O.** Detection of *Helicobacter heilmannii* infection in a cat. Lab Anim Res 2009, **25**, 385-391.
20. **Ryu MY, Kim BS, Choi JW, Lee CK.** Effects of *Melia toosendan* fructus on liver function (II) - effects of seed oil on lipid metabolism in rats. Korean J Pharmacogn 1994, **25**, 272-277.
21. **Shi YL, Tang MZ.** Cell death and apoptosis-induced effect of toosendanin. Chin J Neurosci 2004, **20**, 461-465.
22. **Shi YL, Wang ZF.** Cure of experimental botulism and antitubulismic effect of toosendanin. Acta Pharmacol Sin 2004, **25**, 839-848.
23. **Shi YL, Wang WP, Xu K.** Electrophysiological analysis on the presynaptic blocking effects of toosendanin on neuromuscular transmission. Acta Physiol Sin 1981, **33**, 259-265.
24. **Shim SG, Kim JJ, Kim YH, Sung IK, Son HJ, Lee KT, Rhee PL, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Choi KW, Kim CS, Choi MS, Ryu KH, Lee HY, Heo JS, Noh JH.** One-week triple therapy for *Helicobacter pylori*-a prospective, randomized study. Korean J Gastroenterol 2000, **35**, 16-22.
25. **van der Wouden EJ, Thijs JC, van Zwet AA, Sluiter WJ, Kleibeuker JH.** The influence of *in vitro* nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 1999, **94**, 1751-1759.
26. **Velázquez M, Feirtag JM.** *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. Int J Food Microbiol 1999, **53**, 95-104.
27. **Xie F, Zhang M, Zhang CF, Wang ZT, Yu BY, Kou JP.** Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit. J Ethnopharmacol 2008, **117**, 463-466.
28. **Yam MF, Ang LF, Salman IM, Ameer OZ, Lim V, Ong LM, Ahmad M, Asmawil MZ, Basir R.** *Orthosiphon stamineus* leaf extract protects against ethanol-induced gastropathy in rats. J Med Food 2009, **12**, 1089-1097.
29. **Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Kim BW, Park SD.** Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of *Melia toosendan* in mouse macrophage cells. Korean J Herbology 2008, **23**, 121-134.