



Antibacterial Activity of *Sanguisorba officinalis* against *Helicobacter pylori*

Hyun-A Lee¹, Sunhwa Hong¹, Hong-Geun Oh², Sang-Ho Park³, Youn-Chul Kim⁴,
Hyun Park⁵, Gil-Saeng Jeong⁵ and Okjin Kim^{1,6*}

¹Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, Iksan, Korea

²Huvet Co. Ltd, Iksan, Korea

³Korea DNA Valley Co. Ltd, Iksan, Korea

⁴College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Korea

⁵Zoonosis Research Center, Wonkwang University, Iksan, Korea

⁶Institute of Animal Experiment & Efficacy Evaluattion, Wonkwang University, Iksan, Korea

In this study, a medicinal herbal plant, *Sanguisorba officinalis*, was examined and screened for anti-*Helicobacter pylori* (*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, *Sanguisorba officinalis* extract demonstrated strong anti-*H. pylori* activities. Also, as results of *in vivo* animal studies, *Sanguisorba officinalis* extract 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 *Sanguisorba officinalis* 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 *Sanguisorba officinalis* extract. It could be a promising candidate herb treatment for patients with gastric complaints including gastric ulcer caused by *H. pylori*.

Key words: *Sanguisorba officinalis*, *Helicobacter pylori*, antibacterial activity, herb, therapy

Received 25 February 2010; Revised version received 21 July 2010; Accepted 2 September 2010

Helicobacter pylori (*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, 위림프 종에 이르는 각종 소화기 질환의 주요한 원인 인자로 밝혀지고 있다(Marshall and Warren, 1984; Hansson et al., 1996; Honda et al., 1998). *Helicobacter* 속(genus)은 현재 24개 종(species)이 보고되어 있으며, 사람과 동물에서 위염 및 위궤양의 주요 인자로 보고되고 있다(Kim and Kim, 2004). 또한 이들의 배설물 내에 *Helicobacter* 세균들이 배출될 수 있으며, 이들에 의한 음식물과 물의

오염 가능성이 보고되어 공중보건학적으로 그 중요성이 대두되고 있다(Velazquez and Feirtag, 1999).

H. pylori 치료방법으로 주로 사용되는 방법은 3제요법 (triple therapy)인데 이는 bismuth와 tetracycline 및 metronidazole 또는 amoxicillin을 투여하는 방법이다(Shim et al., 2000). *H. pylori* 박멸의 1차 치료에는 bismuth 제제를 포함하는 3제요법, omeprazole과 같은 proton pump inhibitors (PPI)를 포함하는 2제요법, ranitidine, bismuth citrate 제제를 포함하는 3제요법, bismuth를 근간으로 하는 3제요법에 PPI를 추가하는 4제요법 등이 권고 된다(Kim et al., 1999; Park et al., 2000). 오늘날 *H. pylori* 박멸을 위하여 PPI를 기본으로 항생제를 포함한 3제요법이 치료의 주를 이루고 있는데 이와 같은 항생제의 사용은 필연적으로 이들 항생제에 대한 내성을 증가를 초래하며 우리나라라는 서구보다도 높은 내성을 보이고 있다(Han, 2007; Kim, 2007). 특히 clarithromycin에 대한 내성을 꾸준하게 증가하고 있는 실정이다(Kim et al., 2004). *H. pylori* 감염률 뿐만 아니라 항생제 내

*Corresponding author: Okjin Kim, Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, 344-2 Shinyoung-dong, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

Tel: +82-63-850-6668

Fax: +82-63-850-7308

E-mail: kimoj@wku.ac.kr

성률이 다른 나라에 비해 상대적으로 높은 우리나라에서 *H. pylori*의 제균 치료율을 높이기 위해서는 지속적으로 항생제 내성을 관찰할 필요가 있다(Lee et al., 2005; Kim, 2007).

현재 *H. pylori* 감염에 대한 대책은 *H. pylori* 감염 진단 후 치료의 형태이며 이 때 사용되는 치료제는 항생제 metronidazole을 주로 사용하고 있는데 이에 대한 내성과 항생제 부작용의 문제가 야기되고 있어 새로운 기전의 예방 및 치료제의 개발이 필요한 실정이다(Kim et al., 2004). 새로운 항생제의 개발 분야에서 크게 각광을 받고 있는 것으로 기존 화합물에 기초한 항생제와 연관 관계가 먼 천연물 유래의 안전한 항생물질이 있으며 천연물은 화합물보다 다양성이 크고 안전하여 천연물 유래 항생물질의 사용은 높은 안전성과 항생제 내성 문제의 해결 측면에서 큰 장점을 가지고 있다(Koehn and Carter, 2005).

지유(*Sanguisorbae officinalis*)는 장미과에 속하는 다년생 초본으로 중국, 일본 및 한국에 자생하며, 방종형으로 주근의 울곡이 불규칙하고, 다수의 분지가 있는데 길이가 10~20 cm, 직경이 0.5~1.5 cm에 이르며, 근도에는 개개 아경이 있고, 이면은 암갈색을 띠고 세로주름이 현저하다(An et al., 2004). 지유의 뿌리는 지혈제, 진통제, 수렴효과를 가지며, 화상, 내인성 뇌출혈 치료제로 전통 중국 약제로 이용되어져 왔다(An et al., 2004). 지유에서 분리된 dimeric ellagitanin의 sanguinin H-6는 DNA topoisomerases 저해와 세포독성활성과 관련되어진 것으로 알려져 있으며(Bastow et al., 1993), sanguinin H-6와 H-11은 질소 산화물을 억제하는 것으로 알려져 있다(Yokozawa et al., 2000; An et al., 2004). 또한 지유에는 사포닌배당체, pomolic acid, vitamin A, tritepenoides (Reher et al., 1992), 탄닌과 관련 화합물(Tanaka, 1983; An et al., 2004)인 phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone 및 3가지 ellagitanins인 sanguinins H-1, H-2, H-3 (An et al., 2004) 등을 17% 정도 함유하며, 그 중 탄닌 성분은 생리활성 기능 중 고혈압 억제, 통풍예방, 항산화 효과, 항암 등 다양한 약리효과가 검증된 바 있으나, 현재까지 지유의 *H. pylori* 항균 효과에 관한 연구는 없는 실정이다.

본 연구에서는 사람에 위암 및 위궤양을 유발하여 심각한 임상결과를 초래하는 *H. pylori*에 효과적인 천연물 유래 항균물질을 개발하고자 지유의 *H. pylori* 항균효과를 탐색하였다.

재료 및 방법

지유 추출물 조제

시험에 사용된 지유는 익산시 대학한약국으로부터 한국산으로 판매되고 있는 건조된 지유를 구입하여 대성아

트론 분쇄기 DA700로 입자 크기가 30 mesh 이하가 되도록 분쇄하여 천연물 분말을 수득한 후, 상기에서 수득한 건조된 천연물 분말(1 kg) 질량의 3배(v/w)에 해당하는 종류수를 포함하는 70% 에탄올 수용액을 가하여 100°C에서 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 여과 및 감압 농축한 후, 동결 건조하여 분말상태의 지유 추출물 600 g을 수득하여 실험의 시료로 사용하였다.

H. pylori 배양

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

실험동물

식품의약품안전청 실험동물자원과에서 specific-pathogen free 상태로 계통이 유지되고 있는 Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)을 공급받아 원광대학교 동물자원개발연구센터 실험동물사육실에서 1주일 동안 순화사육한 후 실험에 사용하였다. Mongolian gerbil에 *H. pylori*는 사람의 병태생리와 유사하게 만성으로 진행되어 위염, 위궤양과 위암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Honda et al., 1998). 본 연구자들은 사람의 *H. pylori* 감염 동물모델인 Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 감염 후 지유 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 10회~12회의 환경에서 사육되었으며, 사료는 실험동물 전용사료(Samtaco, Osan, Gyeonggi, Korea)를 2.0 Mrad의 방사선으로 멸균시켜 자유급식 시켰으며, 음수는 filter 여과 후 자외선 멸균수를 자유 급수하였다. 본 연구에 사용된 동물실험에 관련된 모든 실험과정과 절차는 원광대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행 되었다.

In vitro 헬리코박터 항균 효능 실험

H. pylori 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천 배지 플레이트에 도말(streak)하고 대조를 위한 항생제 디스크 Gentamicin (바이엘동물약품, Suweon, Korea), Kanamycin (바이엘동물약품) 및 Enrofloxacin (바이엘동물약품)을 적용용량으로는 각각 0.25, 0.5, 0.25 mg씩 적용하였다. 천연물 추출물 30 mg을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μL에 녹여

300 mg/mL 농도로 디스크 여과지에 5 µL씩 10^0 (1.5 mg), 10^{-1} (0.15 mg)과 용매대조를 위한 DMSO를 각각 적용하였다. 본 실험에서는 균이 접종된 배지에 멸균된 디스크(지름 0.7 mm)를 배치하고, 이후 10% CO₂, 100% 습도가 유지되는 항온기에서 배양하고 4일 후 평가하였다. 균을 접종한 후 6, 12, 24, 48 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 군주 당 6개씩 검사하여 억제 범위의 평균값을 분석하였다. 결과의 평가는 항생제 디스크 각각의 주변 clear zone 형성을 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 40마리를 실험에 사용하였다. 각 군당 10마리의 동물들을 사용하여 *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 적용군(I군), *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 무처치 적용군(II군) 및 *H. pylori* 감염 없이 지유 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 지유 추출물 무처치 적용군(IV군)의 4개 군으로 나누어 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 7주령 Mongolian gerbil은 12시간 절식시킨 후, I군 및 II군의 동물들은 1 mL 당 2.0×10^9 CFU의 *H. pylori* 균수가 포함되게 준비된 배양액을 두당 0.5 mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구로 투여하여 *H. pylori*를 감염시켰다. 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 자유급이 할 수 있도록 하였다. *H. pylori* 또는 PBS를 투여한 I군과 III군의 동물들은 2주일 후인 9주령부터 지유 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 ether 마취 하에 안락사시킨 후 위를 적출하여 육안병변 점수를 구하였다. 또한 신속 요소분해효소 검사를 통하여 감염 여부를 확인하였으며, 추가적인 병리조직학적 검사를 통하여 병리 조직 점수를 구하여 지유 추출물 투여가 헬리코박터 세균 감염에 미치는 영향을 평가하였다.

위 점막의 육안병변 점수(gross lesion score) 산정은 Yam et al. (2009)의 방법에 따라 수행하였다. 시험방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 각 시험 군별로 시험 종

료일에 적출된 위(stomach)는 큰 굽이(great curvature)를 따라 절개하여 펼친 후에 실체현미경($\times 10$)을 사용하여 병변을 관찰하고, 육안 병변의 점수를 산정하였다. 육안병변 점수는 각 병변의 가로길이 \times 세로길이(mm^2)의 총합으로 계산하였다. 각 개체의 점수를 구한 후 각 군별로 평균 점수를 구하였다.

위 점막의 조직병변 점수(histological lesion score) 산정은 Yam et al. (2009)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, 이 때 선별된 부위들은 다른 개체들 간에 서로 동일한 부위가 되도록 주의하여 선정하였다. 선정된 부위들의 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 µm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 병리조직학적 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 조직병변 점수를 구한 후, 각 군의 평균 점수를 구하였다.

신속 요소분해효소 검사(rapid urease test)는 CLO 검사 시약인 ASAN Helicobacter Test (Asan Pharmaceutical Co., Seoul, 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 젤이 보이도록 스티커를 벗긴 후 무균 바늘을 사용하여 위점막 조직을 젤 속에 밀어 넣고 스티커를 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 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(Kim and Kim, 2004). 검체를 1 mL 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater (Biospec product) 전용 2 mL tube에 무균 채취하여 세척한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead (0.1 mm

size, Biospec product) 200 μL와 phenol-chlorform-isoamyl alcohol 용액 (50:49:1) 200 μL를 넣어 Mini-Bead Beater로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멀균 2 mL tube에 옮겼다. 3 M sodium acetate 10 μL와 ice-cold ethanol 250 μL를 넣어 -20°C에서 10분간 정체시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 침전물을 70% alcohol로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA (pH 8.0) 60 μL에 용해시켜 실험에 사용하였다. Kim et al. (2004)의 방법에 따라 genus *Helicobacter*의 *rpoB* DNA 분절을 증폭시킬 수 있는 primer 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. Forward primer (HF; 5' ACTTT AACCGCATGAAGATAT 3')와 Reverse primer (HR; 5' ATA TTTTGACCTTCTGGGCT 3')를 사용하여 PCR은 *Taq* DNA polymerase 1 U, 각 dNTP 250 μM, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였다. 추출된 DNA를 template로 50 ng, 각 primer 20 pmol을 AccuPower PCR Premix tube에 넣고 멀균 증류수로 최종 부피를 20 μL로 맞춘 후, 94°C에서 30초, 52에서 30초, 72°C에서 45초의 30 cycles의 PCR을 수행한 후, 1.2% agarose gel에서 458 bp의 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

지유추출물의 독성 평가

지유 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 경구투여하였다. 실험 종료일 ether 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 μL 두께로 절편하여 H&E 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다.

통계학적 분석

각 시험군의 양성률에 대한 통계는 Repeated Measured ANOVA SPSS v.12 USA (Duncan's 사후검정)을 실시하였으며 $P<0.05$ 이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다. Rapid urease 검사인 CLO test의 각 시험 군의 양성을과 치료율에 대한 95% confidential interval (CI)이 MINITAB software (Minitab Inc., State College, PA, USA)를 사용하여 구해졌다. 각 군의 양성률에 대한 CI가 차이가 있으면 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다.

결과

In vitro 헬리코박터 항균 효능

H. pylori 세균 배양 플레이트에 적용한 대조 항생제 디스크들과 지유 추출물을 적용한 후 37°C incubator에서 추가 배양하면서 적용 디스크 주변 clear zone의 지름 크기를 측정한 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, DMSO의 경우 clear zone크기를 관찰할 수 없었고 대조군으로 사용된 Gentamicin의 경우 9 mm, Kanamycin 8 mm, Enrofloxacin 13 mm이었으며, 지유 추출물 1.5 mg 적용시 13 mm이었다.

In vivo 헬리코박터 항균 효능

지유 추출물을 *H. pylori* 세균 감염 및 비감염 동물에 투여한 후, 체중변화를 확인한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. *H. pylori* 세균 감염 후 지유 추출물 투여군은 비투여군인 II군에 비교하여 유의한 체중 증가를 보였다($P<0.05$).

지유 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여한 후, 위 육안병변 점수 및 조직병변 점수를 확인한 결과 Table 3과 같은 결과를 얻었다. *H. pylori* 감염 없이

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

Treatment	Clear zone (mm)				
	6 hrs	12 hrs	24 hrs	48 hrs	60 hrs
Dimethyl sulfoxide	0	0	0	0	0
Gentamicin	6	9	7	7	7
Kanamycin	5	8	8	7	7
Enrofloxacin	9	13	13	12	9
<i>Sanguisorba officinalis</i>	10 ⁰ (1.5 mg)	8	13	12	10
	10 ⁻¹ (0.15 mg)	4	6	5	5

Table 2. Change in body weights (g) of mice treated with *H. pylori* and/or *Sanguisorba officinalis* extract *in vivo* study

Group	Treatment	Week after inoculation				
		0	1	2	3	4
I	<i>H. pylori</i> + <i>Sanguisorba</i> ^a	132.5±2.0	136.0±2.1	140.0±2.1*	142.5±1.6*	144.0±1.1*
II	<i>H. pylori</i> +PBS	132.5±1.5	135.0±2.0	135.0±2.1	135.5±2.0	136.5±1.6
III	PBS+ <i>Sanguisorba</i>	133.0±2.1	138.0±2.1	142.0±2.0*	144.5±2.0*	145.0±2.5*
IV	PBS+PBS	133.5±2.1	138.5±1.1	143.0±1.5*	145.0±2.0*	146.0±2.5*

^a*Sanguisorba officinalis* treatment was continued with 400 mg/kg dose during 4 weeks after *Helicobacter pylori* infection. PBS, phosphate-buffered saline. *Significantly different from the positive control group II ($P<0.05$).

Table 3. Gross and histopathological lesion scores of mice treated with *H. pylori* and/or *Sanguisorba officinalis* extract *in vivo* study

Group	Treatment	Gross lesion scores	Histopathological lesion scores
I	<i>H. pylori</i> + <i>Sanguisorba</i>	12.0±3.5*	2.0±0.50*
II	<i>H. pylori</i> +PBS	95.0±5.5	8.0±1.50
III	PBS+ <i>Sanguisorba</i>	0*	0*
IV	PBS+PBS	0*	0*

PBS, phosphate-buffered saline. *Significantly different from the positive control group II ($P<0.05$).

Table 4. Results of rapid urease test (CLO) and polymerase chain reaction (PCR) with gastric mucosal tissues after the study on therapeutic effects of *H. pylori* infection with *Sanguisorba officinalis* extract

Group	Inoculation ^a		n	Positive reaction (positive percent) ^b	
	<i>H. pylori</i>	Treatment		CLO	PCR
I	Yes	<i>Sanguisorba</i>	10	0* (0 %, CI ^c 0-25.9)	0* (0 %, CI 0-25.9)
II	Yes	PBS	10	10 (100 %, CI 74.1-100)	10 (100 %, CI 74.1-100)
III	No	<i>Sanguisorba</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; CI) was calculated with MiniTab statistic software program. *Significantly different from the positive control group II ($P<0.05$).

지유 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 지유 추출물 무처치 적용군(IV군)의 경우에 병변이 관찰되지 않았다. 반면, *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 무처치 적용군(II군)은 지유 추출물 적용군(I군) 보다 육안병변 점수 및 조직병변 점수가 유의하게 높은 점수를 보였다($P<0.05$)

신속 요소분해효소 검사는 지유 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여하고 *H. pylori* 세균의 치료에 의한 제거 효과를 확인하기 위하여 수행되었으며, 실험결과는 Table 4와 같았다. 신속 요소효소분해 검사인 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(Lee et al., 2006). 실험결과, *H. pylori* 감염 없이 지유 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 지유 추출물 무처치 적용군(IV군)의 경우에 신속 요소분해효소 검사에 의하여 *H. pylori* 세균에 음성 결과를 보였다. 반면, *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 무처치 적용군(II군)은

10마리 개체 모두에서 강한 적색의 *H. pylori* 세균 양성 반응이 검출되었다. *H. pylori* 감염 후 지유 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(Figure 1). 실험결과, *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 무처치 적용군(II군)은 10마리 개체 모두에서 양성반응이 검출되었다(Table 4). 반면, *H. pylori* 감염 후 지유 추출물 적용군(I군)은 10두 모두에서 음성의 결과를 보여 *H. pylori* 감염 양성대조군 II군과 유의한 변화를 보였다($P<0.05$).

지유 추출물의 독성

지유 추출물을 오랜 기간 섭취함으로 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위해 9주령

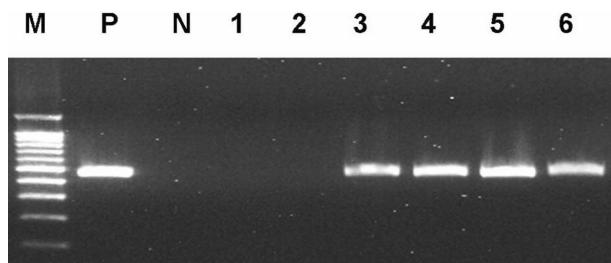


Figure 1. Results of polymerase chain reaction in the study of anti-*H. pylori* activity with *Sanguisorba officinalis* extract. M: 100 bp marker, P: DNA from *H. pylori* ATCC 43504, N: negative control, 1~2: Group I (*H. pylori*+*Sanguisorba officinalis*), 3~6: Group II (*H. pylori* + phosphate-buffered saline).

수컷 Mongolian gerbil을 사용하여 28일 동안 매일 400 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구투여하고 지유의 독성발현 유무를 평가한 결과 대조군 및 지유 추출물 투여군의 모든 개체에서 폐사 또는 특이 임상증상은 관찰되지 않았다. 실험 종료일 ether 마취 하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 결과 유의한 병변은 관찰할 수 없었다. 또한, 실질 장기들의 병리 조직학적 검사에서도 별다른 세포손상은 관찰되지 않았다.

고 찰

H. pylori 감염은 만성 위염, 장상피화생(intestinal metaplasia) 및 소화성 궤양의 중요한 원인이며, 위암발생에 기여한다(Ahn et al., 1991). 한국에서 위암은 암으로 인한 사망의 주요 원인을 차지하고 있다(Ahn et al., 1991). 한국인의 연간 위암 발생율은 10만 명당 남성 57.9와 여성 25.1로 보고되고 있으며, 이는 다른 나라의 위암 발생율에 비교하여 매우 높은 수치임을 알 수 있다. 위암은 그 임상적 결과가 심각하여 한국 성인 사망률의 주요 원인중의 하나로 보고되고 있다(Ahn et al., 1991). *H. pylori*의 유병율은 한국인에서 8살에 80%, 20살 이상에서는 90%를 보이는 것으로 보고되고 있다(Jung et al., 2000). 이러한 자료들에 의하면 대부분의 한국인들은 *Helicobacter*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(Jung et al., 2000). 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 (Harris, 1997). 일반적으로 1차 제균 치료제로는 PPI, amoxicillin, clarithromycin 또는 metronidazole 3제요법이 권장되지만, 국내의 metronidazole 내성률이 25.8-66.2%

정도이며(Kim et al., 2004; Lee et al., 2005), clarithromycin 내성률은 2.5-13.8%로 보고되어 있다(Kim et al., 2004). 해당 지역에서 또는 특정 환자군에서 clarithromycin에 대한 원발성 내성률이 15%가 넘으면 경험적인 1차 치료제로 clarithromycin 사용이 어렵다(Lee et al., 2002; Kim et al., 2004). 이러한 제균율의 감소에 가장 많은 영향을 미치는 요인은 항생제 내성으로서 국내의 경우 amoxicillin과 clarithromycin은 1987년에는 0%의 내성율에서 2003년에는 각각 18.5%와 13.8%으로 내성율이 증가하였으며 metronidazole도 52.9%에서 66.2%로 내성율이 증가했음을 알 수 있다(Wouden et al., 1999). 이러한 항생제 내성의 대안으로서 천연물 유래 항균효능 물질의 개발이 새로운 대안으로 제시되고 있다(Lim et al., 2002).

본 연구에서 항균효능이 기대되는 지유 추출물의 anti-*H. pylori* 효능을 *in vitro* 실험에서 확인하였다. 또한 지유 추출물을 이용하여 실험동물을 이용한 *in vivo* *H. pylori* 감염치료 효능 연구를 수행한 결과 지유 추출물은 *H. pylori* 감염을 억제하고 감염에 의한 병변을 완화시켜주는 것을 알 수 있었다. 지유 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 지유 추출물에 대한 28일 투여 안전성 평가를 수행한 결과, 지유 추출물의 400 mg/kg 연일 투여에 의하여 유의한 독성 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 지유 추출물은 안전성이 높은 것으로 판단되었다.

지유는 중국, 일본 및 한국에 널리 분포하는 장미과에 속하는 다년생 식물로서 그 동속식물의 뿌리를 생약에서 지유라 부르며, 산비탈의 습기가 많은 곳에서 잘 자라는 것으로 알려져 있다. 지유의 약리성분으로 뿌리에 tannin, triterpenoid계 saponin이 함유되어 있고 가지에는 quercetin과 kaempferol의 배당체인 ursol과 triterpenoid계 saponin이 함유되어 있으며, 잎에는 vitamin C, 꽃에는 chrysanthemin, cyanin이 함유되어 있다(An et al., 2004). 현재 지유에 대한 연구는 그 성분(An et al., 2004)과 신경세포보호작용(Nguyen et al., 2008), 알러지 억제효과(Park et al., 2004)에 대한 연구는 있으나 현재까지 지유의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 보고는 없었다. 본 연구 결과 지유는 *in vitro*와 *in vivo* 실험 들 다에서 우수한 anti-*H. pylori* 효능이 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구 결과는 지유의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 최초의 보고이다. 지유의 성분으로 현재 보고된 tannin과 관련 화합물 phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone 및 3가지 ellagitanins인 sanguins H-1, H-2, H-3 (Tanaka, 1983; An et al., 2004)이 다른 천연물 추출물 성분에서 활성을 가지고 있는 성분으로 알려져 있어 이를 성분이 본 연구

에서 확인한 지유 추출물의 *H. pylori* 항균효과에 관여하는 생리활성물질이 아닐까 추정해 볼 수 있으며, 향후 지유의 anti-*H. pylori* 효능에 관여하는 성분에 대한 추가 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

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

감사의 글

본 연구는 2010년 원광대학교 교비 연구비를 지원 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- An, B. J., Lee, J. T., Lee, S. A., Kwak, J. H., Park, J. M., Lee, J. Y. and Son, J. H. (2004) Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(2), 244-250.
- Ahn, Y. O., Park, B. J., Yoo, K. Y., Kim, N. K., Heo, D. S., Lee, J. K., Ahn, H. S., Kang, D. H., Kim, H., Lee, M.S. and Park, T.S. (1991) Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. *J. Kor. Med. Sci.* 6, 7-14.
- Bastow, K. F., Bori, I. D., Fukushima, Y., Kashiwada, Y., Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I. and Lee, K.-H. (1993) Inhibition of DNA Topoisomerases by sanguin H-6, a cytotoxic dimeric ellagitannin from *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med.* 59, 240-245.
- Han, D.S. (2007) Treatment of *H. pylori* infection and current status of vaccine development. *Hanyang Med. Rev.* 27, 81-95.
- Hansson, L. E., Nyren, O., Hsing, A. W., Bergstrom, R., Josefsson, S., Chow, W. H., Fraumeni, J. F. and Adami, H.O. (1996) The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* 335, 242-249.
- Harris, A. (1997) Treatment of *Helicobacter pylori*. *Drugs Today* 33, 59-66.
- Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A. and Nasu, M. (1998) Development of *Helicobacter pylori* induced-gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* 58, 4255-4259.
- Jung, T. S., Kang, S. C., Choi, Y. J., Jeon, B. S., Park, J. W., Jung, S. A., Song, J. Y., Choi, S. H., Park, S. G., Choe, M. Y., Lee, B. S., Byun, E. Y., Baik, S. C., Lee, W. K., Cho, M. J., Youn, H. S., Ko, G. H. and Rhee, K. H. (2000) Two-dimensional gel electrophoresis of *Helicobacter pylori* for proteomic analysis. *J. Korean Soc. Microbiol.* 35, 97-108.
- Kim, B. W., Choi, M. G., Choi, H., Moon, S. B., Kim, B. K., Chae, H. S., Kim, J. K., Chung, I. S., Chung, K. W., Sun, H. S. and Park, D.H. (1999) Pooled analysis of antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Korea. *Korean J. Gastroenterol.* 34, 42-49.
- Kim, J. M. (2007) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Hanyang Med. Rev.* 27, 80-95.
- Kim, J. M., Kim, J. S., Jung, H. C., Kim, N., Kim, Y. J. and Song, I. S. (2004) Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4843-4847.
- Kim, S. H. and Kim, O. J. (2004) Application of consensus polymerase chain reaction for monitoring of *Helicobacter* species. *Lab. Animal. Res.* 20, 316-320.
- Koehn, F. E. and Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206-220.
- Lee, J., Kim, S. M., Im, E. H., Choi, Y. W., Kim, Y. M., Kim, P. S. and Lee, J. H. (2005) The prevalence of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolated in Daejeon. *Korean J. Clin. Microbiol.* 8, 47-50.
- Lee, J. Y., Kim, W., Gawk, G. Y., Park, S. C., Ye, B. D., Lee, S. H., Kim, S. G., Kim, J. S., Jun, H. C. and Song, I. S. (2002) Reinfection rate and clinical manifestation of *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer disease after triple therapy containing clarithromycin. *Korean J. Gastroenterol.* 39, 93-100.
- Lim, T. H., Lee, J. M. and Cha, B. J. (2002) Antifungal activity and identification of an *Actinomycetes straun* isolated from mummified peaches. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 161-166.
- Marshall, B. J. and Warren, J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
- Nguyen, T.T., Cho, S.O., Ban, J.Y., Kim, J.Y., Ju, H.S., Koh, S.B., Song, K.S. and Seong, Y.H. (2008) Neuroprotective effect of *Sanguisorbae radix* against oxidative stress-induced brain damage: *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(11), 2028-2035.
- Park, H. J., Kim, J. W., Lee, J. H., Shin, J. H. and Yu, K. A. (2000) Detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. *Korean J. Gastroenterol.* 47, 459-461.
- Park, K.H., Koh, D., Kim, K., Park, J. and Lim, Y. (2004) Antiallergic activity of a disaccharide isolated from *Sanguisorba officinalis*. *Phytother. Res.* 18(8), 658-662.
- Reher, G. and Budenský, M. (1992) Triterpenoids from plants of the angiospermae. *Phytochemistry* 31, 3909-3914.
- Shim, S. G., Kim, J. J., Kim, Y. H., Sung, I. K., Son, H. J., Lee, K. T., Rhee, P. L., Koh, K. C., Paik, S. W., Rhee, J. C., Choi, K. W., Kim, C. S., Choi, M. S., Ryu, K. H., Lee, H. Y., Heo, J. S. and Noh, J.H. (2000) One-week triple therapy for *Helicobacter pylori*: a prospective, randomized study. *Korean J. Gastroenterol.* 35, 16-22.
- Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1983) 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* 22, 2575-2578.
- Velazquez, M. and Feirtag, J. M. (1999) *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int. J. Microbiol.* 53, 95-104.
- Wouden, E., Thijss, J., Zwet, A., Sluiter, W. and Kleibeuker, J. (1999) The influence of *in vitro* nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1751-1759.
- Yam, M.F., Ang, L.F., Salman, I.M., Ameer, O.Z., Lim, V., Ong, L.M., Ahmad, M., Asmawil, M.Z. and Basir, R. (2009) Orthosiphon stamineus leaf extract protects against ethanol-induced gastropathy in rats. *J. Med. Food* 12(5), 1089-1097.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Tanaka, T. and Kitani, K. (2000) A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *Sanguisorbae Radix* components. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 717-722.