

## 호장근 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 생육억제 및 인간 위암세포주에 대한 유전적 손상 유도

<sup>1</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터 및 <sup>2</sup>계명대학교 식품가공학과

박정현<sup>1</sup> · 김현정<sup>1</sup> · 이지원<sup>2</sup> · 임효권<sup>2</sup> · 이인선<sup>1,2</sup>

### Growth Inhibition of *Helicobacter pylori* and Induction of Genetic Damage on Human Gastric Cancer Cell by *Reynoutria elliptica* (Koidz) Migo. Extracts

Jung-Hyun Park<sup>1</sup>, Hyun-Jeong Kim<sup>1</sup>, Ji-Won Lee<sup>2</sup>, Hyo-Gwon Im<sup>2</sup> and In-Seon Lee<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea; <sup>2</sup>Departments of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

*Helicobacter pylori* are related to gastric cancer. After screening of antimicrobial activities from various plants methanol extracts against *H. pylori* KCTC2948, we found *Reynoutria elliptica* methanol extract and further fractions have significant antibacterial effects especially hexane fr. and CHCl<sub>3</sub> fr. The growth inhibition effects on the gastric cancer cell lines such as KatoIII and AGS cells were investigated with MTT. After 48 hr treatments *R. elliptica* extracts and fractions were shown growth inhibition upto 70~80% at 0.4~1 mg/ml concentrations. The growth inhibition effects was higher AGS than KATO III. We applied comet assay to measure the DNA damage in the individual cells and exposed time course at IC<sub>50</sub>. All fractions have shown to time dependent on DNA damage and these fractions also observed higher than 80% in DNA strand breaks. These DNA strand breaks were transient, reaching a maximum level after 2 hr of exposure. In conclusion, we found that *R. elliptica* has *in vitro* growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects on gastric cancer cells.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*, *Reynoutria elliptica*, Comet assay, DNA damage

### 서 론

위암(胃癌)은 우리나라에서 발생하는 전체 암의

21.3%를 차지해 발생빈도 1위로 보고되고 있고<sup>1)</sup> 사람에서의 위암의 발생원인은 확실히 규명되지 않았으나 현재는 만성 표층성 위염에서 흔히 검출되는 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)가 밀접한 관

런이 있다고 알려지고 있으며, 이 균은 1994년 WHO에 의해 발암성이 확실한 carcinogen I으로 분류되었다.<sup>2)</sup>

그러나 현재까지 *H. pylori*에 의한 위암의 발생 과정은 정확히 밝혀져 있지는 않았지만 최근의 보고에 의하면, *H. pylori*에 감염된 경우 위점막 상피세포의 증식 능력이 *H. pylori*에 감염되지 않은 균에 비해 현저히 증가되어 있고, 발암과 관련 있는 단백질이 과잉 생산되면 점막세포 손상 후 세포 재생 과정에 유전자의 mismatch repair를 야기하고, 그 과정 중에 *H. pylori*의 활성산소 라디칼, 질소 화합물 등이 복합적으로 작용하여 위암이 발생한다고 한다.<sup>3)</sup> 또한 *H. pylori* 감염에 의해 일어나는 염증반응과 대식세포 작용에 의해 생성되는 반응성이 높은 유리산소에 의해 표피세포의 DNA를 손상시켜 위암 발생이 야기될 수도 있고,<sup>4)</sup> 위상피세포는 *H. pylori*와 반응하여 interleukin (IL)-8과 같은 chemokine과 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 일련의 친염증성 매개체를 활성화시키고, 최종적으로 apoptosis 과정을 밝게 된다.<sup>5~7)</sup> 그리고 사람 호중구와 림프구에서도 *H. pylori* 감염에 의해 친염증성 cytokine이 발현될 수 있음이 증명된 바 있어<sup>8~11)</sup> 이 균의 감염과 면역매체제(immune mediator) 및 위암과의 관계에 대한 연구들이 진행되고 있다.

우리나라의 성인의 약 80% 정도가 *H. pylori*에 감염되었으나 임상증상을 나타내지 않고 있다가 어떠한 발병촉진 인자의 영향으로 위염, 위궤양, 만성적인 위 십이지장 궤양, 나아가서는 위암을 유발한다는 보고<sup>12,13)</sup> 등을 감안하여, 위암의 치료 방법도 종양 자체에 대한 연구에 *H. pylori*에 대한 연구와 접목을 시켜 보다 근본적인 예방이나 치료를 위한 새로운 방법이 시도될 필요가 있다. 지금까지 많은 항생제들이 *H. pylori*에 대해 우수한 항균효과가 있음에도 불구하고 단일 항생제 및 복합치료 성공하지 못하고 있고, 항생제 투여에 의한 내성 균주 출현 및 위내에서의 약물의 침투성과 치료 후에 성장이 억제되었던 균의 재증식<sup>14)</sup> 등의 문제가 존재하므로 위암의 새로운 치료법 접근을 위해서 *H. pylori*에 대한 항균력이 있으면서 위암세포에 대한 항종양효과를 가지는 천연성분들의 생리적 효능에 대한 과학적인 연구들이

필요하다.

최근 들어 많이 사용되고 있는 comet assay라고 불리는 alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay는 음이온으로 전리된 파괴된 DNA가 전장을 걸어주었을 때 agarose gel 안에서 양극으로 이동하는 원리로,<sup>15)</sup> *in vivo*와 *in vitro* system에서 각 세포단위에서 DNA의 파괴를 신속하고 간단하며 경제적이고, 민감하게 측정할 수 있어 많은 화학적, 생물학적 인자에 의한 DNA 손상을 확인할 수 있는 유용한 기법이다.<sup>16)</sup> Comet assay는 apoptosis가 일어날 때 개개의 세포에서 DNA 단일 가닥 절단과 초기 DNA 파괴를 측정하는데 매우 유용하므로 초기의 apoptosis 단계를 예민하게 진단하기에 아주 뛰어난 장점을 가지고 있어<sup>17)</sup> 방사선 조사식품의 방사선 검지 실험, 유전독성 및 세포사멸 연구, DNA 손상에 미치는 free radical의 영향이나 식품 항산화제의 DNA 손상 방어 효과에 대한 연구 등에 많이 사용되고 있다.<sup>18)</sup>

한편, 다양한 천연물 소재들을 이용한 *H. pylori*에 대한 항균실험이 몇몇 시도되어 향신료인 백리향(白里香), 녹차, 유산균, 그리고 소목 등 몇 가지 약용식물로부터의 항균성이 보고되었다.<sup>19~22)</sup> 그러나 천연 약용식물 중에서 위장질환에 효과가 있다고 알려진 한국산 약용식물자원 중 호장근의 *H. pylori*에 대한 항균효과는 아직 보고된 바 없다.

호장근(*Reynoutria elliptica*)은 우리나라 산야에서 자라는 마디풀과의 다년초 식물로 한국·일본·타이완 및 중국 등지에 분포하고 어릴 때 줄기가 호피같이 생겨서 호장근이라는 이름이 붙여져 있으며, 한방에서 뿌리는 천식, 고혈압, 암, 동맥경화 등 여러 가지 질병의 치료제로 이용되었고, 민간에서도 이뇨, 통경제 및 진정제로 예로부터 사용되어왔다.<sup>23,24)</sup> 최근 호장근은 resveratrol, lignan sulfate, piceid, emodin 등과 같은 중요한 생리활성을 가진 물질이 함유되어 있고,<sup>25)</sup> 또한 호장근 methanol 추출물의 항염증효과, 항산화효과가 보고되었으며 고혈압, 동맥경화 등 여러 질병의 예방 및 치료에 대한 연구도 이루어지고 있으나 위질환과 관련된 연구는 아직 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 예부터 위장질환에 효과가 있다고 알려진 한국산 약용식물 자원 추출물 중 호장근 methanol 추출물 및 분획물을 제조한

다음 *H. pylori*에 대한 항균활성을 조사하고 나아가 위암세포주에 대한 생육저해 효과를 MTT로 확인하고 comet assay를 통하여 호장균의 위암세포에 대한 apoptosis 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 시료 및 시료조제

본 실험에 사용한 호장균은 대구광역시 약령시장에서 건조상태인 것을 구입하여 건조된 시료 100 g을 10배 용량의 80% methanol과 혼합하여 24시간 동안 정치 추출하고, 이를 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, England)로 여과한 다음 rotary evaporator (Buchi R-3000, Japan)로 농축한 후 동결건조하여 methanol 추출물로 사용하였다. 호장균 methanol 추출물은 Fig. 1에서와 같이 다시 20배(w/v)의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 동량의 n-hexane을 가하여 진탕하고 방치한 다음 분획한 후 농축하여 n-hexane 분획을 얻었고, 수용성 층은 다시 chloroform, ethyl acetate 및 n-butanol을 각각 첨가하여 순차 분획한 후 농축하고 남은 수용성 층도 농축하여 water 분획물을 제조하였다. 위 시료들은 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

### 2) 호장균 추출물 및 분획물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 효과

사용한 *H. pylori* KCTC 2948 (ATCC 43504) 균주는 생명공학원 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며 배양은 10% (v/v)의 calf serum (Gib-

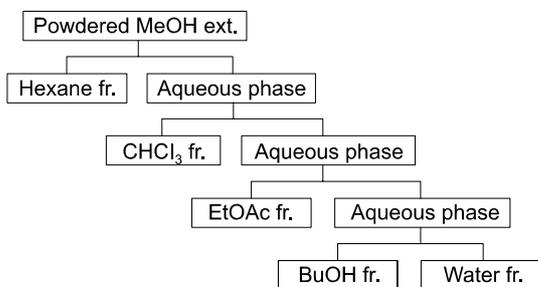


Fig. 1. Flow diagram for extraction and fractionation of *R. elliptica*.

co BRL, USA)을 함유하는 brucella broth (Difco, USA)에 *H. pylori*를 2% (v/v) 접종하여 10% CO<sub>2</sub>, 95% 이상의 습도가 유지되는 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

*H. pylori*에 대한 호장균 메탄올 추출물 및 분획물의 생육억제 활성은 inhibition zone diameter test로 조사하였다. 즉 brucella broth에 18시간씩 3회 계대 배양된 *H. pylori*를 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU/mL의 농도로 한천배지에 도말한 후 멸균된 cylinder (inner diameter 6 mm)를 올려놓았다. 이때 각종 추출물은 membrane filter (0.45µm)로 여과하고 cylinder의 최종농도가 2.5, 5, 10, 20 mg/mL가 되도록 cylinder에 첨가하여 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양 후 cylinder 주위에 생성된 inhibition zone의 유무 확인 및 직경을 측정하여 항균 활성을 나타내었다.

### 3) 호장균 추출물 및 분획물의 위암세포 성장 저해효과

본 실험에 사용한 human gastric cancer cell인 AGS와 KatoIII는 경상대학교 식품공학과에서 분양받아 사용하였으며, RPMI 1640배지(Gibco BRL, USA)에 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, USA)을 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2~3일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

시료의 cytotoxicity를 측정하기 위하여 Green 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 먼저 배양한 cell을 0.4% trypan blue으로 염색하여 세포를 계측한 후 5×10<sup>4</sup> cells/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 호장균 추출물과 분획물을 각각 적당한 농도로 용매에 희석한 후 0.22µm membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 96 well microtiter plate에 준비된 cell을 180µl씩 첨가하고 각 농도의 시료를 0.2~1 mg/ml 범위로 20µl씩 첨가하고, 대조군은 시료 대신 10% DMSO를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48 hr 배양하였다.

배양 후 MTT (5 mg/ml, Amresco Co. USA) 시약 10µl를 각 well에 첨가한 후 4시간 배양하였다. 배양 종료 시 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 DMSO를 100µl씩 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate

reader (Molecular devices Co., U.S.A)로 550 nm에서 측정된 흡광도로부터 다음과 같이 cytotoxicity를 구하여 세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

**4) Comet assay에 의한 호장균 추출물 및 분획물의 위암세포 DNA 손상 측정**

시료 처리의 농도범위는 MTT assay로 IC<sub>50</sub>을 설정하여 cell이 배양되어 있는 24 well에 10% DMSO 포함한 배지에 희석하여 처리하였고, 대조군은 10% DMSO를 같은 조건으로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 1, 2, 4, 및 8 hr 동안 반응시켰다. 각 반응시간이 지난 후 well을 PBS로 두 번 세척 한 다음, 0.25% trypsin-EDTA 100µl를 처리하여 cell을 수집한 후 500µl PBS에 현탁시켜 microcentrifuge tube에 옮겨 원심 분리하였다.

두 번의 원침세척 후 세포의 DNA 손상을 측정하기 위해 Bojana 등<sup>27)</sup>의 방법을 참고로 하여 comet assay를 실시하였다. 1% Normal melting point agarose (NMPA)가 pre-coating된 fully frosted slide 위에 현탁된 cell과 0.6% Low melting point agarose (LMPA)를 골고루 섞은 후 100µl loading 하여 cover glass로 덮고 4°C 냉장고에 넣어 굳힌 후 cover glass를 벗기고 그위에 다시 0.6% LMPA 용액 100µl를 올려 굳힌 뒤, lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 lysis시켰다. 그 후 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C buffer (10 N NaOH, 200 mM EDTA)를 채워 25분 동안 unwinding한 후 25 V/300 mA의 전압을 걸어 25분간 전기영동을 실시하고 전기영동이 끝난 slide는 neutralization buffer (0.4 M Tris, pH7.5)로 15분씩 세척하였다.

DNA damage 정도를 분석하기 위해 ethidium bromide (20µg/ml, Sigma Co.)로 nuclotide를 염색하여 형광현미경(Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포 핵 image를 comet image analyzing program인 Komet 5 (Kinetic Imaging Co. UK)로 컴퓨터 상에서

분석하였다. DNA damage 정도는 tail DNA (%)로 측정하여 나타냈으며, 각 처리구당 2개의 slide를 제작하여 그 중에서 100개의 세포를 관찰하여 측정하였고 각 처리구는 최소 2회 반복 실험하였다.

**5) 통계처리**

실험결과와 통계분석은 SAS program을 이용한 분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**1) 호장균의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 활성**

호장균 methanol 추출물 및 분획물의 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여, 각각 0, 2.5, 5, 10, 20 mg/ml의 농도로 첨가하고 이때 양성 대조군은 항생제인 ampicillin을 사용하여 37°C의 incubator에서 48 hr 배양 후 항균력을 측정하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 methanol 추출물 보다는 극성이 낮은 용매 분획물에서 항균활성이 보다 증가하였다. 그 중 hexane fr.에서 농도 의존적으로 inhibition zone diameter (mm)의 크기가 가장 크게 나타났고 다음으로 CHCl<sub>3</sub> fr.이 우수한 것으로 나타났다. 그러나 BuOH fr. 및 water fr.에서는 항균활성이 나타나지 않았는데 이는 순차적

**Table 1.** Antibacterial activities of *Reynoutria elliptica* extract and fractions against *Helicobacter pylori*

<i>Reynoutria elliptica</i>	Concentration (mg/ml)				
	0	2.5	5	10	20
	Inhibition zone diameter (mm)*				
Ampicillin	6	20	21	24	-
BuOH fr.	6	6	6	6	6
CHCl <sub>3</sub> fr.	6	12	13	15	17
EtOAc fr.	6	6	6	6	13
Hexane fr.	6	15	18	20	24
MeOH ext.	6	6	6	10	14
Water fr.	6	6	6	6	6

\*Cylinder diameter (6.0 mm) was included

으로 분획 시 극성을 띄게 될수록 항균효과가 떨어지는 것으로 보여진다. 이 등<sup>22)</sup>의 보고에서 황련(*Coptis japonica Makino*) 분획물 중 BuOH fr. 및 CHCl<sub>3</sub> fr.은 *H. pylori* KS 51 및 *H. pylori* ATCC 43504에 대하여 각각 강한 항균활성을 나타내었으나, EtOAc fr.은 *H. pylori* KS 51 균주에는 항균활성이 보이지 않은 결과와 비교하였을 때 호장근 추출물 및 분획물에 따라 항균 활성이 차이나는 것으로 보여진다. Tabak 등<sup>19)</sup>은 백리향 4.5 mg/mL에서 24 mm 정도의 clear zone을 얻어 *H. pylori*에 대한 항균활성을 보고하였고, Diker와 Hascelik<sup>20)</sup>은 차 추출물로부터 16~21 mm의 clear zone을 얻은 것으로 보고하였다. 이로 미루어 볼 때 호장근 분획물에서도 *H. pylori*에 대한 항균활성이 있음을 확인하였다.

현재 여러 가지 위암 발생설 중 *H. pylori*로 인해 중중구가 다량 침윤되며 다량의 활성산소 라디칼, nitric oxide 및 세포손상물질 등을 내게 되어 이로 인해 위 상피세포 손상이 발생하고 이러한 염증 반응은 반복적으로 지속되어 세포 위축이 발생되고 위산을 분비하는 위선(gastric gland)이 손실되면서 위 내의 산도가 저하되며 장상피화생으로 진행된 후, 위 내 박테리아의 과다 증가가 오며<sup>28,29)</sup> 만성화 된 경우는 반복적인 퇴행성 변화와 점막 상피세포의 재생성 증식이 유도되어 암으로 진행되기도 하므로,<sup>30~32)</sup> 호장근 추출물

및 분획물의 *H. pylori*에 대한 높은 항균력은 알려지고 있는 발암기전<sup>3~11)</sup>과 아울러 위질환에 대한 새로운 해석을 할 수 있을 것이다.

2) 호장근의 위암 세포에 대한 성장 저해효과

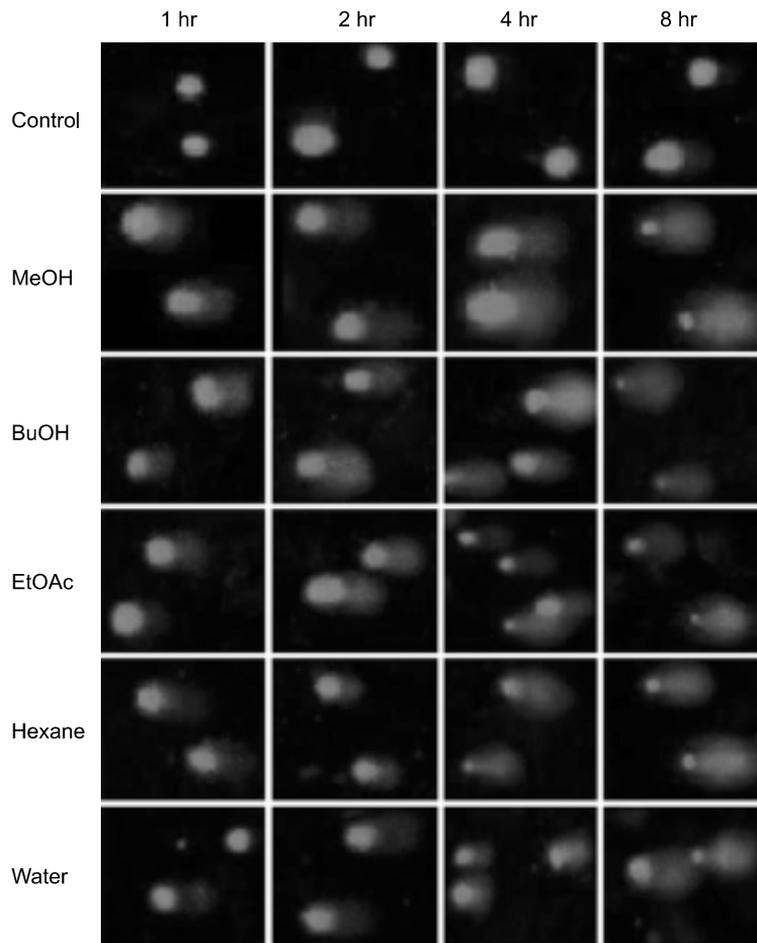
*H. pylori*에 대한 항균활성을 보이는 호장근 methanol 추출물 및 각 분획물이 인간유래 위암세포주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 human gastric cancer cell line 중 AGS에 대하여 시료를 각각 0.2~1.0 mg/mL의 농도로 24시간 및 48시간 처리한 결과, Table 2와 같이 시료 처리 후 시간이 경과할수록 더 큰 위암 세포주 저해율을 보였다. 24시간 처리 시 호장근 CHCl<sub>3</sub> fr.과 water fr.을 제외한 나머지 분획물은 0.6 mg/mL에서도 55% 이상의 저해율을 보였고, 1 mg/mL 농도에서는 모든 분획물에서 63~74% 정도의 저해율을 보였다. 그리고 48시간 처리 시 가장 낮은 농도인 0.2 mg/mL에서도 methanol 추출물과 hexan fr.에서 57~62% 정도의 비교적 높은 저해활성을 보였고, 0.6 mg/mL 이상의 농도에서는 대부분의 시료 처리군에서 70% 이상의 높은 저해 활성을 나타내었다. 특히 hexan fr.과 BuOH fr.은 1 mg/mL에서 가장 큰 86%의 저해 활성을 보였다. 이는 시료 처리 후 시간이 경과할수록 암세포주에 대한 저해율이 크게 증가되었고, *H. pylori*에 대한 항균력의 결과와 유사하게 methanol 추출물, EtOAc fr. 및 hexan

Table 2. The effects of *R. elliptica* methanol extracts and fractions on growth inhibition of AGS cells

Time	mg/ml	Inhibition (%)					
		BuOH fr.	CHCl <sub>3</sub> fr.	EtOAc fr.	Hexane fr.	MeOH ext.	Water fr.
24 hr	0.2	10.2	6.1	15.0	33.2	29.2	7.7
	0.4	39.9	11.3	50.9	50.1	44.9	16.1
	0.6	57.7	16.2	61.9	55.2	54.5	34.8
	0.8	63.4	42.1	67.5	61.3	62.0	56.4
	1.0	64.2	64.1	73.6	68.8	63.5	62.6
48 hr	0.2	10.1	20.4	48.1	61.8	57.1	27.1
	0.4	67.8	52.5	52.7	78.7	71.5	59.8
	0.6	77.4	62.9	67.3	79.9	75.0	72.6
	0.8	77.3	78.7	73.9	82.6	79.5	75.7
	1.0	86.2	81.0	76.0	86.5	82.9	80.3

**Table 3.** The effects of *R. elliptica* methanol extracts and fractions on growth inhibition of KatoIII cells

Time	mg/ml	Inhibition (%)					
		BuOH fr.	CHCl <sub>3</sub> fr.	EtOAc fr.	Hexane fr.	MeOH ext.	Water fr.
24 hr	0.2	4.4	8.5	13.3	2.7	22.3	5.7
	0.4	10.3	17.8	14.8	32.4	33.2	15.0
	0.6	37.6	27.0	26.7	46.1	50.9	25.6
	0.8	51.1	30.6	36.3	50.0	55.1	34.2
	1.0	58.5	35.7	42.8	65.4	63.4	39.5
48 hr	0.2	11.1	10.8	8.9	38.6	6.3	7.0
	0.4	21.1	15.5	26.7	52.4	49.1	16.9
	0.6	52.1	28.0	47.0	68.4	76.9	27.7
	0.8	70.5	40.0	66.6	78.9	77.8	44.9
	1.0	78.6	53.3	66.4	79.3	87.4	54.3



**Fig. 2.** Changes of comet images by time course of sample treatment to AGS cells.

fr.에서도 비교적 높은 저해율을 보였다. 또한 항균력이 보이지 않았던 water fr.에서도 암세포 성장 저해율이 높게 나타났으며, 특히 hexane fr.은 항균활성 및 AGS에 대한 저해활성이 가장 높게 나타났다.

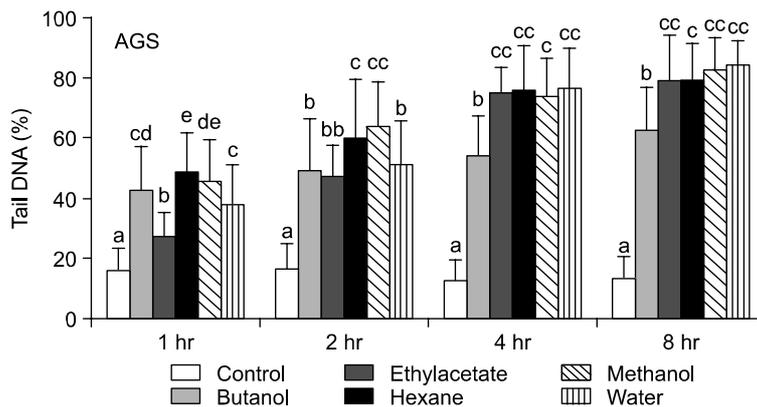
아울러, 인간유래 위암세포주 중 KatoIII에 대한 성장 저해효과를 확인한 결과, Table 3과 같이 24시간 처리 시 호장근 methanol 추출물과 hexan fr.에서 가장 큰 저해능을 보였고, 48시간 처리 시에는 역시 80% 정도의 높은 저해율을 보였으며, 주로 hexan fr., BuOH fr. 및 EtOAc fr.에서 비교적 높은 저해활성을 확인하였다. 그러나 AGS에 비해 KatoIII에 대한 호장근의 추출물 및 분획물의 성장 저해능이 적었는데, 이는 동일농도이지만 cell line에 따른 시료 효과의 차이가 다소 다른 것으로 보여진다. 또한 KatoIII의 경우에서도 CHCl<sub>3</sub> fr.과 water fr.을 제외한 나머지 시료들이 비교적 높은 저해율을 보였으며, *H. pylori*에 대한 항균활성 결과와 유사하게 methanol 추출물, EtOAc fr. 및 hexan fr.에서도 비교적 높은 저해율을 보였다. 그리고 AGS의 경우 시간에 따른 큰 저해율은 나타나지 않았으나 KatoIII의 경우 시간별 차이가 15% 이상 차이를 보였다.

*H. pylori* 감염 시 위점막 상피세포의 과다증식

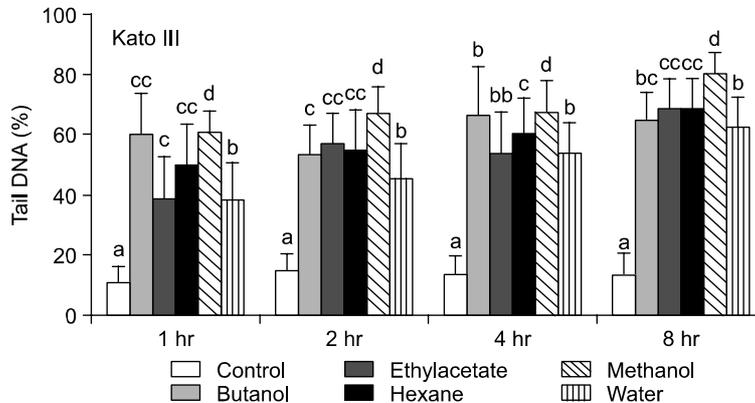
되고,<sup>33,34)</sup> 또한 *H. pylori*의 염증성 매개체의 하나인 호중구의 침윤<sup>35)</sup> 증가로 위점막 상피세포의 증식이 야기되어 악성 종양세포로 발전될 수 있다. 그러므로 호장근 추출물 및 분획물들은 *H. pylori*에 대한 항균력 뿐 아니라 암세포 성장저해 효과가 존재하므로 앞으로 호장근의 위염, 위암에 대한 보다 심도있는 연구가 진행되어야 하며, 특히 *H. pylori*에 대한 항균 활성과 위암세포주에 대한 성장 저해능의 연관성 있는 이러한 결과들을 바탕으로 새로운 암 해석의 기초자료가 될 수 있는 연구가 더 필요하다 하겠다.

### 3) Comet assay에 의한 호장근의 위암세포 DNA 손상 유발

호장근 추출물과 각각의 분획물에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 결정하여 시간별로 세포에 처리한 후 comet assay를 실시한 결과 comet image는 Fig. 2와 같다. 시료들의 위암 세포주에 대한 DNA 손상효과는 호장근 추출물과 분획물 모두 대조군에 비해 DNA 손상을 유도하는 것으로 나타났다. 그리고 현미경 상으로 보이는 image를 image analyze program인 Komet 5로 tail length 및 tail DNA (%)로 비교·분석하였다. Fig. 3과 같이, AGS에 대한 각 시료의 처리시간별 DNA 손상효과를 살펴보



**Fig. 3.** DNA damage induced by *R. elliptica* in AGS cells. Cells were exposed to IC<sub>50</sub> of these fractions for 1, 2, 4, 8 hr and DNA damage was assessed by the comet assay. DNA damage is expressed as the percentage of DNA in the comet tails, which correlates with the number of DNA strand breaks. One hundred cells were analysed per experimental point. Significant difference of % tail DNA between treated cells and vehicle control (Different superscripts in the same group of exposed time indicate significant differences between fractions at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple comparison test).



**Fig. 4.** DNA damage induced by *R. elliptica* in KatoIII cells. Cells were exposed to IC<sub>50</sub> of these fractions for 1, 2, 4, 8 hr and DNA damage was assessed by the comet assay. DNA damage is expressed as the percentage of DNA in the comet tails, which correlates with the number of DNA strand breaks. One hundred cells were analysed per experimental point. Significant difference of % tail DNA between treated cells and vehicle control (Different superscripts in the same group of exposed time indicate significant differences between fractions at  $p < 0.05$  by Duncans multiple comparison test).

면, 각각의 추출물 및 분획물은 2시간 처리 시 대조군과 비교하여 50% 이상의 DNA 손상효과를 나타내었고, BuOH fr.을 제외한 나머지 추출물과 분획물에서는 8시간 이내에 80% 이상의 높은 DNA 손상을 유도하였다. 또한 KatoIII에서는 AGS와 비교 시 더욱 높은 DNA 손상효과를 나타내었으며 EtOAc fr.과 water fr.을 제외한 나머지 시료에서 1시간 이내에 50% 이상의 높은 DNA 손상효과를 나타내었다(Fig. 4). 두 종류 위암세포주에 대해 모두 시간에 비례하여 우수한 손상효과를 보이고, 분획물과 추출물에서도 역시 DNA 손상효과가 높게 나타나므로 호장근의 위암세포에 대한 저해활성을 가지는 성분은 어느 한 분획으로 나누어지지 않고 무엇보다 단일 성분이 아닌 것으로 생각된다. DNA 손상에 대한 결과는 MTT에 의한 암세포 성장저해 결과와는 조금 다르게 KatoIII 세포주에서 더 좋은 효과를 보였는데, 이는 MTT에 의한 세포 성장저해효과와 DNA 손상 유도와는 다른 차원의 해석이 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 호장근 추출물 및 분획물은 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 가지고, 두 종의 위암 세포주에 대한 생육저해 활성 및 높은 DNA 손상 유도가 확인되어 위암세포의 apoptosis 유도

효과를 가지는 것으로 사료된다.

## 결론

호장근 추출물과 분획물을 제조하여 *H. pylori*에 대한 항균 활성, 인간 유래 위암세포주인 AGS와 KatoIII에 대한 생육저해 활성 및 DNA 손상 유도를 살펴본 결과, 먼저 호장근 hexane fr.에서 항균활성이 가장 높았고 CHCl<sub>3</sub> fr.도 우수한 것으로 나타났으나, BuOH fr. 및 water fr.에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 위암세포주에 대한 호장근의 세포성장의 저해효과는 48시간 시료 처리 시 두 가지 cell에서 모두 70~80%의 높은 저해율을 보였고, 특히 hexane fr.은 항균활성, AGS와 KatoIII 세포주에 대한 저해활성이 가장 높았다. 그러나 AGS에 비해 KatoIII에 대한 호장근의 추출물 및 분획물의 성장 저해능은 작았다. 각 시료의 IC<sub>50</sub> 농도로 시간별로 AGS와 KatoIII 세포주에 처리한 후 DNA damage 정도를 comet assay를 수행한 후 tail extent moment 및 tail DNA (%)로 나타낸 결과, 두 가지 세포주 모두 시료처리 2시간 이내 % tail DNA량이 50% 이상으로 증가하여 각 암세포주들의 DNA damage 유도 효과를 보였다. Butanol fr.을 제외한 나머지 시료들에서는 8시간

이내에 80% 이상의 높은 DNA 손상을 유도하였다. 이상의 결과에서 호장근 추출물 및 분획물은 *H. pylori*에 대한 항균 효과 및 두 종의 위암 세포주에 대한 생육저해 활성 및 높은 DNA 손상 유도가 확인되어 위암세포의 apoptosis 유도 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- 1) Yoo KY. Symposium: Epidemiologic evidences on association of Kimchi intake and cancer occurrence in Korea. *J Kor Ass Cancer Prev* 2002; 7: 215-220.
- 2) International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 177-240.
- 3) Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenj K, Okayasu I. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 26-34.
- 4) Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996; 56: 9464-9469.
- 5) Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim, CY. *Helicobacter pylori* induces an array of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, IL-1 $\beta$ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 473-480.
- 6) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor-alpha and soluble Fas ligands. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 40-48.
- 7) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2436-2443.
- 8) Kim JS, Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. Interleukin-8 expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1249-1255.
- 9) Kim JS, Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* water-soluble surface proteins activate human neutrophils and upregulate the expression of CXC chemokines. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 83-92.
- 10) Ihan A, Tepez B, Gubina M, Malovrh T, Kopitar A. Diminished interferon- $\gamma$  production in gastric mucosa T lymphocytes after *Helicobacter pylori* eradication in duodenal ulcer patients. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1740-1745.
- 11) Bamford KB, Fan X, Crowe SE. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-492.
- 12) Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, Nair N, Mehta AP. Lactonacillus acidophilus inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J Clinical Microbiology* 1989; 27: 2328-2330.
- 13) Rhee KH, Youn HS, Naid SC, Lee WK, Cho MJ, Choi HJ, Maeng KY, Ko KW. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea (in Korean). *J Kor Soc Microbiol* 1990; 25: 475-490.
- 14) Harris A. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Drugs In Today* 1997; 33: 59-66.
- 15) Olive PL, Frazer G, Nanath JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cell using the comet assay. *Radiation Res* 1993; 136: 130-136.
- 16) Ostling O, Johnson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-298.
- 17) Choi MC. Apoptotic changes in canine tumor cells using the comet assay. *Ann Rev Inst Anim Med* 1996; 5: 51-57.
- 18) Kim JE, Kim JS, Park YK, Kim TS, Kang MH. Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in chinese hamster lung cell using comet assay. *Kor J Nutr* 2003; 36: 24-31.
- 19) Tabak M, Armom R, Potasman I, Meeman I. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J Appl Bacteriol* 1996; 80: 667-672.
- 20) Diker KS, Hascelik G. The bactericidal activity of tea

- against *Helicobacter pylori*. *Lett Appl Microbiol* 1994; 19: 299-300.
- 21) Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Garyson ML. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* MCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 475-479.
- 22) Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ, Baek YJ. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Kor J Food Sci Technol* 1999; 31: 764-770.
- 23) McDonnell TJ, Marin MC, Hsu B, Nrisbay SM, McConnel K, Tu S, Campbell ML, Rodriguezvillanueva J. Apoptosis/programmed cell death; the balance of oncogenes: apoptosis and neoplasia. *Radiat Res* 1993; 136: 307-312.
- 24) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Houseman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.
- 25) Lee TK, Kim JH, So JN. Emodin from *Polygonum cuspidatum* showed angiogenesis inhibiting activity *in vitro*. *J Kor Soc Agric Chem Biotechnol* 2003; 46: 50-54.
- 26) Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Meth* 1984; 70: 257.
- 27) Bojana Z, Bojan S, Metka F. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol* 2003; 41: 41-48.
- 28) Nomura A, Stemmerman GN. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8: 294-303.
- 29) Personnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 89-104.
- 30) Bechi P, Baizi M, Becciolini A. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa possible implications for gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 271-276.
- 31) Nguyen T, Nrunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-3034.
- 32) Fraser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounce RE. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 197-173.
- 33) Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW. *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut* 1996; 38: 19-22.
- 34) Cahill RJ, Xia H, Kilgallen C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1627-1631.
- 35) Grisham MB, Ware K, Gilleband HE, Jr, Gilleland LB, Abell CL, Yamada T. Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 1260-1266.
-