

생체 내·외에서 *Helicobacter pylori* 성장 억제 물질의 탐색 및 효능의 검증

단국대학교 의과대학 외과학교실, 내과학교실*, 해부학교실† 및 소화기 연구소‡

김정택 · 남승우* · 노임환* · 명나혜† · 신지현‡

In Vitro and *In Vivo* Investigation and Verification of the Substances with Anti-*Helicobacter pylori* Activity

Jung Taik Kim, M.D., Seung Woo Nam, M.D.*, Im Hwan Roe, M.D.*,
Na Hye Myung, M.D.†, and Ji Hyun Shin‡

Departments of Surgery, Internal Medicine*, and Pathology†, Institute for Gastroenterology‡,
Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Background/Aims: The aim of the study was to investigate and verify the *in vitro* and *in vivo* anti-bacterial activity of wine, alcohol, and vitamin C on *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. **Methods:** Red and white wines, two alcoholic solutions (11% soju of pH 7.8 and pH 3.5, respectively), and vitamin C of variable concentrations were tested. Suspension of 1×10^8 CFU/mL of *H. pylori* and *E. coli* were added to the test solutions and then inoculated on the solid agar medium for 0, 5, 15, and 60 minutes, measuring bacterial growth as the number of colonies. *In vivo* effects of wine and vitamin C on *H. pylori*-infected gerbil model were also determined. **Results:** Red and white wines were effective in reducing the number of *H. pylori* colonies in the first 5 minutes, and interfered the growth completely after 15 minutes, whereas soju of the same alcoholic concentration and the same pH had no inhibitory effects. *In vitro* bactericidal activity of vitamin C was also observed. Treatment of red wine, white wine, and vitamin C for *H. pylori* infected gerbils significantly reduced inflammatory scores. **Conclusions:** Red wine, white wine, and vitamin C provide an excellent anti-bacterial effect against *H. pylori*. (Korean J Gastroenterol 2002;40:166-172)

Key Words: Wine; Ascorbic acid; *Helicobacter pylori*; Anti-bacterial activity

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 감염에 의한 위염은 무증상을 보이는 경우도 있으나 시간 경과에 따라 만성적 감염 상태는 위축성 위염은 물론 위암으로 진전되는 위험요소를 제공한다는 주장이 일반적이다.^{1,2} 최근 일본에서 시행된 전

향적 연구³에서는 *H. pylori* 양성인 환자들을 평균 7.8년간 추적 관찰한 결과 감염 양성인 소화불량 환자들의 4.7%, 위궤양의 3.4%에서 위암이 발생한 반면 *H. pylori* 음성인 환자에서는 위암 발생이 없음을 보고하여 *H. pylori* 감염이 위암의 원인이 된다는 것을 보고하였다. 이와 같이 *H. pylori*가 위암의 위험인자로 인정되는 몇 가지 역학적 연구³⁻⁶에

접수: 2002년 4월 25일, 승인: 2002년 8월 1일
연락처: 김정택, 330-714, 천안시 안서동 29
단국대학교 의과대학 외과학교실
Tel: (041) 550-3929, Fax: (041) 568-4775
E-mail: jtkim@dankook.ac.kr

※ 이 연구는 2001년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

Correspondence to: Jung Taik Kim, M.D.
Department of Surgery, Dankook University College of Medicine
29 Anseo-dong, Cheonan 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3929, Fax: +82-41-568-4775
E-mail: jtkim@dankook.ac.kr

도 불구하고 일반적으로 *H. pylori* 양성 위염은 제균치료의 대상에서 제외되고 있는데 그 이유에는 환자 개개인마다 위염 정도의 차이가 있고 환자들 중 소수에서만 위암으로 진행되며, 제균치료를 하는 경우 제균요법에 따른 항생제 내성, 부작용 및 의료보험 재정 상의 문제 등이 있다.

현재 *H. pylori* 감염의 주 치료대상은 세계 모든 합외도 출회의에서 추천하고 있는 *H. pylori* 양성 위궤양, 십이지장 궤양이다.⁷⁻⁹ 그러나 *H. pylori* 밀도가 높을수록 조직학적으로 심한 위염을 일으키고 심한 형태의 위염이 장기화되면 위축이 발생하고 위암의 위험요소가 더 많아진다는 것¹⁰을 감안할 때 소화성궤양만을 대상으로 하는 제균치료가 근본적이고 이상적인 치료라고 하기는 어렵다. 그러므로 최근에는 항생제를 사용하지 않고 *H. pylori* 감염을 치료, 억제 또는 방어를 할 수 있는 광범위한 의미에서의 새로운 치료개념을 가진 물질을 탐색하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이와 같은 연구는 항생제를 이용한 제균 치료를 해야 하는 대상이든 혹은 제균치료가 인정되지 않는 대상이든 포괄적으로 *H. pylori*의 감염상태를 호전시키고자하는 필요에서 나온 것이라 할 수 있다. 따라서 일상적으로 대하는 부작용 없는 식품들 가운데 *H. pylori* 균을 억제 내지 감소시킬 수 있는 물질을 찾아내는 일은 무엇보다 중요할 것으로 생각한다. 이에 대한 연구의 일환으로 국내에서도 *H. pylori*를 억제시켜 줄 수 있는 유산균,¹¹ *H. pylori* 항원을 산란계에 면역시켜 얻은 난황 항체 IgY (immunoglobulin yolk) 등의 연구¹²가 되어 있다.

본 연구에서는 일상 식이를 통하여 사람들이 쉽게 얻을 수 있는 물질 중에서 *H. pylori*의 생육을 억제할 수 있는 물질을 탐색하고자 하는 시도로서 포도주와 비타민 C의 *H. pylori* 성장억제에 관한 효능을 검토하였다. 포도주의 우수한 항세균 효과에 대해서는 익히 잘 알려져 있으며 특히 장내 병원성 세균이 원인인 설사에 좋은 효과가 있다는 것도 보고되었다.¹³ 또한 비타민 C는 항산화제로서 반응성 산소 대사물질(reactive oxygen metabolites)을 제거하는 기능이 있으며 *H. pylori* 양성 위장 질환에서는 위액의 비타민 C의 농도가 의미있게 저하되어 있다.¹⁴ 본 연구는 항세균효과를 보이는 포도주와 항산화제인 비타민 C가 *H. pylori*를 억제시키는 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. *H. pylori*의 배양

*H. pylori*는 표준균주(ATCC 43504)를 사용하였으며 배양은 5% (vol/vol) bovine calf serum (PAA Laboratories Inc., Parker Ford, PA, USA)과 항생제(amphotericin B 2.5 µg/mL,

vancomycin 10 µg/mL, trimethoprim 5 µg/mL, polymyxin B 2.5 IU/mL, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)가 첨가된 brucellar broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 *H. pylori*가 1×10^8 CFU/mL (OD₆₀₀=1)이 될 때 까지 37°C, 10% CO₂ 조건에서 150 rpm으로 진탕배양하였다.

비교실험 균주로서 *Escherichia coli* (*E. coli*, KCTC 1116)를 이용하였다. *E. coli*는 luria-bertani (LB) 배지를 이용하여 37°C, 호기 조건에서 24시간 배양하고 OD₆₀₀=1이 되도록 LB broth로 희석하였다.

2. 생체의 실험상의 포도주와 비타민 C에 대한 *H. pylori*의 성장억제 효과

포도주에 대한 *H. pylori* 성장억제 효과를 관찰하기 위한 실험군은 다음의 5가지로 정하였다. 적포도주군(Beaujolais Nouveau, France, pH 3.9, 12%), 백포도주군(Majuang, 한국, pH 3.2, 11%), 11% 소주군(pH 7.8, 11% 농도-증류수로 1:1로 희석한 소주), pH 3.5 소주군(pH 3.5, 11%-증류수로 1:1로 희석하고 HCl을 이용하여 pH를 조절한 소주) 및 HCl 군(pH 3.5)으로 각각 나누었다. 비타민 C (Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 각각 0, 0.1, 1, 2, 5, 그리고 10 mg/mL (wt/vol)의 농도가 되도록 PBS용액(pH 7.2)에 녹인 후 0.2 µm filter를 이용하여 여과하였다.

위의 각 용액 10 mL에 1×10^8 CFU/mL의 *H. pylori* 배양액 1 mL 넣고 각각 0, 5, 15, 60분 동안 37°C, 10% CO₂ 조건에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 또한 비교 실험을 위하여 각 실험용액 10 mL에 1×10^8 CFU/mL의 *E. coli* 배양액 1 mL 넣고 각각 0, 5, 15, 60분 동안 37°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 이 후 각 시간별로 반응시킨 *H. pylori* 배양액 100 µL와 *E. coli* 배양액 10 µL를 취하여 각각 한천 함유 배지에 접종하고 *H. pylori*는 72시간 후에 *E. coli*는 24 시간 후에 집락 수를 관찰하였다.

3. *H. pylori* 감염 모델에 대한 포도주와 비타민 C의 효과

생체 내 실험을 위한 동물 모델로는 6 주령의 Mongolian gerbil (Bio-Animal, 성남, 한국)을 이용하여 1×10^8 CFU/mL의 활발한 간균형 상태의 *H. pylori* 배양액으로 감염시켰다. *H. pylori* 감염 여부는 *H. pylori*에 감염된 gerbil에 대한 2차 항체(rabbit anti-gerbil IgG HRP conjugates, 단국대 소화기 연구소 제작)를 이용하여 ELISA 역가로 감염이 확인된 gerbil을 사용하였다. 실험군은 대조군을 포함하여 모두 6군(각 군당 8마리)이었으며 적포도주군, 백포도주군, 11%에탄올군의 3군은 각각 1 mL/kg/일의 양을 음용시켰고 비타민 C는 100 mg/kg/일과 300 mg/kg/일의 농도로 30일 동안 음용시켰다. 실험 종료시 1일간 금식하여 희생시켰으며 위를 적출한 후 위전정부를 따로 떼어 2% 포르말린 용액에