pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 4, pp. 286~293 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.4.286

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Ursolic acid의 위 손상에 대한 방어 효과

김선회 · 황인영 · 이선이 · 정춘식*
덕성여자대학교 약학대학

Protective Effects on Gastric Lesion of Ursolic acid

Sun Whoe Kim, In Young Hwang, Sun Yi Lee, and Choon Sik Jeong*
College of Pharmacy, Duksung women's University, Seoul 01369, South Korea
(Received May 30, 2016/Revised June 20, 2016/Accepted July 12, 2016)

ABSTRACT - This study is an experiment for gastric protective effects of ursolic acid. In order to identify the effects of ursolic acid on gastrointestinal disorder, acute and chronic gastritis were also observed using HCl·ethanol and indomethacin-induced gastric lesion models, respectively. As for gastric acid, it was also identified through proton pump (H^+/K^+-ATPase) inhibiting activity. In regards to protective factor for gastric damage, prostaglandin E_2 (PGE_2) was quantitatively analyzed. Antibacterial activity experiment was done on *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), which is known to be the causing factor of chronic gastritis, gastric ulcer and gastric cancer. By making use of AGS cell, it was confirmed that ursolic acid was involved in apoptosis of gastric cancer cell through 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) staining and flow cytometry analysis. As a result, ursolic acid reduced gastric lesions caused by HCl·ethanol and indomethacin. Ursolic acid inhibited acid secretion by inhibiting proton pump (H^+/K^+-ATPase), which is the gastric acid secreting enzyme involved at the final phase of gastric acid secretion. And ursolic acid was identified with gastric mucosa protection effects by increasing the concentration of PGE_2, a protective factor of gastric mucosa preservation. The antibacterial activity on *H. pylori*, which is aggressive factor in gastrointestinal disorder, ursolic acid showed inhibitory effects on *H. pylori* colonization. In the DAPI nuclear staining, unlike the control group, shape of the nucleus has deformed, and has been observed either shrinked cell or chromatin condensation phenomenon. In the Flow cytometry assay, confirmed the growth rate of apoptosis in a concentration-dependent manner.

Key words : H^+/K^+-ATPase, PGE_2, *H. pylori*, Apoptosis

위는 위장의 운동 및 소화액 분비 등의 특징에 의해 급만성 위염, 소화성 궤양, 소화불량, 위암 등 여러 가지 병리가 발생하는 기관이다. 본 연구에서는 경험적으로 효능과 안전성이 입증된 천연물 유래 성분에서 위 손상을 개선할 수 있는 물질을 찾기 위해 열을 내리고 답답함을 없애 열병, 흉통, 위산과다, 구내염, 황달, 담낭염 등에 효능이 있는 치자시탕(梔子豉湯)의 조성물 중 치자(梔子)의 성분인 ursolic acid를 이용하여 실험하였다. Ursolic acid는 항균 항염작용 항암작용을 이용한 의약품의 연구[1,2], 치과영역에서 구강염증에 활용방안연구[3,4,5], 항산화작용을 이용한 피부미용의 미백, 청각세포 보호 연구[6], 골격근에서의 에너지 소비증가[7], 등 국내외적으로 연구가 많이 되고 있는 성분으로 알려져 있다. 올레아놀산과 구조가 유사하여 비슷한 항암작용을 하며 특히, 다제내성 암세포를 효과적으로 억제하고 혈관신생을 저지하여 암세포의 성장과 침습, 전이를 봉쇄하는 것으로 보고되었다. 또한 ursolic acid는 NF-κB 활성도를 차단하여 암유전자의 핵내 전사를 못하게 하여 암 증식을 억제시킨다고 2003년도 Cancer Research 논문에 에 보고된 바 있다. 이외에도 ursolic acid는 caspase 3을 통하여 apoptosis를 유도한다고 한다[8]. 또한 우리 국민들의 사랑을 많이 받는 오매추출물이 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)의 urease활성에 강한 억제력을 나타내었는데 NMR분석에 의해 정제된 오매추출물에 함유된 활성성분이 ursolic acid로 확인되었다. 오매에 함유된 이 성분이 항생제를 대신하여 *H. pylori*의 항균작용을 돕는 약물로 활용될 수 있음을 시사하고 있다[9].

이러한 연구결과를 토대로 본 실험에서는 ursolic acid의 위장관 질환 및 위암에 대한 효능을 확인하고자 한다. 에탄올과 염산의 경구투여는 위장 점막 방어체계를 손상시켜 위 점막의 necrosis와 apoptosis를 가속화 시켜 급성위

*Correspondence to: Choon Sik Jeong, College of Pharmacy, Duksung women's University, Seoul 01369, Republic of Korea
Tel: 82-2-901-8382, Fax: 82-2-901-8386
E-mail: choonsik@duksung.ac.kr

염을 발생시킨다. 또한 nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID)인 indomethacin을 경구투여 시 위장관에 직접적인 국소적 손상과 간접적인 점막 저항성 감소 뿐아니라 점막의 Prostaglandin E_2 (PGE_2) 분비의 억제로 인한 점액층과 HCO_3^-의 감소에 의해 궤양이 만들어진다. 이를 이용하여 각각 위염 및 위궤양 동물 모델을 만들어 ursolic acid의 위 손상 억제 효과를 확인하였다. 또한, 위 손상에 있어 중요한 공격인자인 과도한 위산에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 흰 쥐 기초 위액 분비량, pH 및 산분비량에 미치는 작용을 확인하였다. Proton pump (H^+/K^+-ATPase)는 위 내에서 H^+가 Cl^-와 반응하여 염산을 만드는 벽세포의 자가항체로 알려져 있으며 이에 대한 억제 활성도 함께 확인하였다. 위 손상에 대한 보호인자로는 아라키돈산 캐스케이드(arachidonate cascade)에서 생성되어 위 점막에 대한 방어 인자로 작용하는 PGE_2에 대한 정량을 실시 하였다. *H. pylori*는 만성위염, 위궤양, 위축성 위염 및 위암의 발병 원인으로 잘알려져 있는 균이다. 궤양의 치료에 있어 위산분비억제제와 더불어 항생제 투여를 할 경우 *H. pylori*의 제균 치료는 재발률을 현저히 낮추는 것으로 보고 되었다. 따라서 *H. pylori*에 대한 항균 활성 효능을 확인해보았다. 위암 세포로는 AGS 세포주를 사용 하여 암세포에 대한 세포 독성을 MTT assay을 통해 확인 하였다. 또한 DAPI 핵 염색법 및 flow cytometry analysis를 실시함으로써 ursolic acid가 암세포의 apoptosis를 유발함을 확인하였다.

Materials and Methods

재료

본 실험에 사용된 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), phosphate buffer saline (PBS) 10X, penicilin-streptomycin, RPMI medium 1640 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Massachusetts, USA)에서 구입하여 사용하였고, ampicillin, adenosine triphosphate (ATP), cimetidine, DAPI, indomethacin, phenol red, Tris-HCl은 Sigma-Aldrich (Missouri, USA)에서, magnesium chloride는 Wako (Osaka, Japan)에서, potassium chloride, eher, ethanol, trichloroacetic acid는 삼천화학(Kyunggi-do, Korea)에서, ApoScreen^{TM}annexinV-FITC kit는 Southern Biotech (Alabama, usa)에서 rebamipide는 대희화학(Kyunggi-do, Korea)에서, HCl, sodium biocarbonate, sodium hydroxide, methyl orange는 덕산화학(Kyunggi-do, Korea)에서, PGE_2 assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타시약 및 용매는 분석용 일급시약을 사용하였다.

실험동물

샘다코(주)에서 분양 받은 체중 170~190 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 및 체중 28-32 g의 ICR계 웅성 생쥐를 22 ± 2°C에서 2주간 사육하여 적응 시킨 뒤 실험에 사용하였으며 동물실 내의 명암 은 12시간씩 자동조절 시켰고 고형사료(삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

위암 세포주 및 균주

AGS cell은 Korean Cell Line Bank (KCRB)에서 구입하였고, SNU638, AGS 배양액은 RPMI1640에 10% FBS, 100 units/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin을 혼합하여 사용하였다. 세포배양액은 5% CO_2로 조정된 배양기 내에서 37°C로 배양하였으며 배양된 세포는 1% trypsin-EDTA에 부유시킨 후 사용하였다. *Helicobacter pylori*는 Korean Type Culture Collection (KTCC)에서 구입하였다.

위염 및 위궤양에 대한 실험

HCl·ethanol에 의한 위염

급성위염에 대한 보호 효과를 알아보고자 체중 180 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후, 검체를 경구 투여하고 30분 뒤 에 HCl·ethanol (60% ethanol에 150 mM HCl을 함유) 1 mL를 경구 투여하고 절식, 절수 하에 1시간 방치한 뒤 ether로 치사시켜 위를 적출하였다. 적출한 위를 2% formalin 수용액으로 10분간 침적하여 위 내외를 가볍게 고정한 다음 대만부를 절개하여 선위부에 발생한 손상의 길이(mm)를 현미경(× 10)하에서 측정하여 gastric lesion index로 하였다[10].

Indomethacine에 의한 위궤양

위궤양에 대한 보호효과를 알아보고자 체중 180 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후, Kasuya[11] 등의 방법에 따라 30 mg/kg의 indomethacin을 50 mM sodium biocarbonate solution에 함께 녹여 2 mL/kg의 용량으로 피하 주사하였다. 정상 군에서는 동 일한 양의 50 mM sodium biocarbonate solution을 투여하였다. 실험 동물은 indomethacin투여 7시간 후에 희생하여 위를 적출하였다. 적출 한 위는 2% formalin 수용액으로 10분간 침적하여 위 내외를 가볍게 고정한 다음 대만부를 절개하여 선위부에 발생한 손상면적(mm^2)을 현미경(× 10)하에서 측정하여 gastric lesion index로 하였다.

위액분비량, pH 및 산분비량에 미치는 작용

위 손상의 공격인자로 작용할 수 있는 위액의 분비량과 pH 및 산분 비량(total acid output)을 알아보기 위하여, 체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후 ether 마취하에 개복하고 위의 유문부를 결찰하고 측정하였다[12]. 즉, 흰쥐를 ether 마취하에 개복하고 위의 유문부를 결찰하고 ursolic acid를 십이지장내로 주입한 뒤 4

시간 후에 치사시켜 위를 적출하여 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 위액량, pH 및 산분비량을 측정하였다. 산도는 phenol red를 지시약으로 하여 0.1 N NaOH로 적정하였으며 pH는 electrode pH meter로 측정하였다.

H^+/K^+-ATPase의 활성

H^+/K^+-ATPase는 위산을 분비하는 효소로서 H^+펌프(proton pump)이다. 냉동된 pig의 gastric membrane protein을 bradford법으로 정량한 후 300 μg protein으로 실험하였다. 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)와 ursolic acid를 assay medium에 가하고 37°C에서 30분간 preincubation시킨다. 2 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 2 mM KCl, 20 mM Tris-HCl(pH7.4)를 포함하는 substrate mixture를 0.5 mL씩 가하고 37°C에서 정확히 30분간 배양한다. 여기에 22% trichloroacetic acid 0.2 mL를 가하여 반응을 종결시키고 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리 후 상징액을 취해 ATP hydrolysis에 의해 생성된 무기인산염의 정량을 실시한다. Inorganic phosphate의 정량은 이상의 과정을 통해 얻은 상징액에 molybdic acid solution 0.4 mL를 가한 후, 400 nm에서 흡광도(ASIS UVM340)를 측정하였다.

Prostaglandin E_2 정량

Prostaglandin E_2 (PGE_2)는 대표적인 위 손상에 대한 보호인자로, 음성 대조군으로 indomethacin과 양성대조군으로 rebamipide를 사용[13]하여 PGE_2 assay kit (R&D Systems, KGE004)로 정량하였다. 즉, 96 well plate에 AGS cell의 농도를 1×10^4/well이 되도록 하고, ursolic acid를 농도에 맞게 처리하여 1시간 preincubation 하고 50 μL의 primary antibody solution을 가하여 1시간 동안 shaking 후 50 μL conjugate를 첨가하고 2시간 shaking 후 wash buffer를 이용하여 4번 씻어주고 200 uL의 substrate solution을 가하여 30분 암실에서 방치 후 100 μL의 stop solution을 넣어 반응을 종결시키고 30분 이내에 450 nm와 540 nm에서 흡광도(ASIS UVM340)를 측정하였다.

Helicobacter pylori 균에 대한 항균활성

만성위염 및 위궤양, 위암의 원인인자로 잘 알려진 *H. pylori*[14] 생장 억제효과를 확인하기 위하여 Bae의 방법[15] 및 Kim의 방법[16]을 조금 변형하여 실험 하였다. 먼저 7 mL의 brucella agar 배지 및 7%의 horse serum이 담긴 petri dish에 해당 농도로 녹인 1 mL의 ursolic acid를 주입한다. 여기에 5×10^5CFU의 *H. pylori* 를 분주하고 37°C에서 AnaeroPak Campylo (Mitsubishi Gas chemical, 85% N_2, 10% CO_2 and 5% O_2) 를 이용하여 3일간 배양한다. 양성대조군으로써 ampicillin 을 사용하였다.

위암 세포 사멸에 대한 실험

DAPI(4,6-diamidino-2-phenylinodole dihydrochloride) 핵 염색법

DAPI는 핵을 염색하는 dye로, apoptosis가 일어나면 DAPI의 결합능이 좋아져 brightness의 intensity가 증가하며 핵의 분절(nuclear fragmentation)이 관찰된다. 이를 이용하여 체외 배양중인 AGS cell에 ursolic acid 처리 시 세포의 핵변화를 시각화하기 위하여 DAPI 핵 염색법을 수행하였다. 24 well plate에 AGS cell (2×10^5 cells/mL)를 넣은 후 37°C 배양기에 증식 시켜 ursolic acid를 처리하여 24시간 37°C 배양기에서 배양 후, 1 × PBS로 3번 깨끗이 세정해 주고, 4% p-form aldehyde solution으로 20분간 고정하여, 최종농도를 4 μg/mL의 DAPI로 10분간 염색하였다. 그 후 PBS로 10분간 3회 세척하고 mounting 후 형광현미경에서 무작위로 선정된 현미경(Zeiss LSM 700) 시야의 세포를 촬영 기록한 후 그 영상에서 세포 사멸을 분석하였다.

Flow cytometry assay

세포를 4°C에서 16시간 이상 방치한 후, flow cytometry로 DNA content를 분석한다. 세포를 PBS로 세척한 후, trypsinization하여 세포를 배양용기로부터 탈리시킨 다음, 원심분리(1,200 rpm)하여 세포 pellet을 얻고, 다시 PBS와 McIlvaine's buffer (0.2 M Na2HPO4, 0.1 M citric acid, pH 7.5) 1:1 혼합액으로 세척 후 찬(4°C) ethanol 2 vol을 가하여 조심스럽게 섞어서 고정시킨 세포를 0.1% Triton X-100, 32 μg/ml RNase A 및 50 μg/mL propidium iodide를 포함하는 4 mM sodium citrate 용액에 현탁시킨다. 세포를 4°C에서 16시간 이상 방치한 후, flow cytometry (Easycyte guava, Merck Millipore)로 DNA content를 분석한다.

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student't-test를 사용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 여러 가지 실험방법에 의해 위염 및 위궤양을 유발시켰을 때 실험약물에 의한 위염 및 위궤양의 억제작용은 다음과 같이 inhibition (%)로 나타내었다.

$$*\text{Inhibition}(\%) = \frac{\text{Control lesion index} - \text{Sample lesion index}}{\text{Control lesion index}} \times 100$$

Table 1. Effect of ursolic acid on HCl·ethanol-induced gastritis in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
Control	-	99.5 ± 19.9	-
Ursolic acid	50	92.8 ± 8.7	6.7
	100	91.5 ± 11.0	8.0
Hydrotalcite	100	65.0 ± 12.7*	34.7

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.01 compared to the control.

Table 2. Effect of ursolic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Lesion index (mm^2)	Inhibition (%)
Control	-	22.3 ± 9.4	-
Ursolic acid	50	18.6 ± 9.2	16.6
	100	17.0 ± 12.2	23.6
Cimetidine	150	12.0 ± 3.7	46.1

The value represents the mean ± S.D.

Table 3. Effect of ursolic acid on gastric secretion in pylorus-ligated rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	Total acid output (mEq/4hrs)
Control	-	7.0 ± 0.7	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Ursolic acid	50	6.0 ± 0.5	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	100	5.3 ± 0.5**	1.5 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*
Cimetidin	150	3.5 ± 0.6***	2.2 ± 0.4**	0.3 ± 0.0***

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control.

Results and Discussion

위염 및 위궤양에 대한 실험

HCl·ethanol에 의한 위염

동물모델을 사용하여 HCl·ethanol로 유발된 위염에 대한 효과를 알아보고자 실험한 결과, 대조군의 경우 위 손상 지수가 99.5 ± 19.9 mm인 것에 비하여 ursolic acid는 100 mg/kg 투여 시 91.5 ± 110 mm로 8.0%억제하였고 양성대조군으로 사용한 hydrotalcite는 100 mg/kg 투여 시 65.0 ± 12.7 mm로 손상지수를 34.7% 억제하였다. 이는 위장점막 방어 체계의 손상을 억제함으로써 나타난 결과로 생각된다(Table 1).

Indomethacin에 의한 흰 쥐 위궤양

Indomethacin을 경구 투여하였을 때 산화적 손상을 특징으로, 점막 혈류의 감소와 PG 분비의 억제로 인한 점액층과 HCO_3^-의 감소에 의해 위장내 병변이 유도된다. 동물모델을 이용하여 indomethacin 투여 후 위 손상을 살펴보았다. 대조군에서는 22.3 ± 9.4 mm^2로 궤양병소가 확인되었고 ursolic acid 50 mg/kg 18.6 ± 9.2 mm^2, ursolic acid 100 mg/kg 17.0 ± 12.2 mm^2의 궤양변소가 관찰되어, 대조군에 비하여 각각 16.6%, 23.6% 억제된 결과로 양성대조군인 cimetidine 46.1%에 비해 유의성 있게 억제되었다. 이는 ursolic acid가 유의성 있는 방어효과가 있었으며, indomethacin에 의한 위 손상에 대해 점액 분비의 증가나 방어 인자의 존재를 확인 할 수 있다(Table 2).

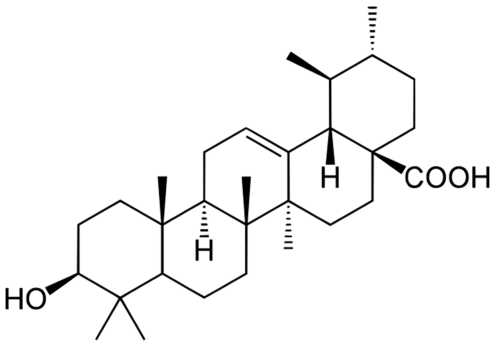


Fig. 1. Structure of Ursolic acid.

위액분비량, pH 및 산 분비량 실험

흰쥐의 위액분비량과 pH 및 산분비량에 미치는 작용 실험을 통해 공격인자인 위액에 의한 위 손상 억제 mechanism을 확인하였다. 그 결과, 대조군의 위액 volume은 7.0 ± 0.7 ml, pH는 1.4 ± 0.1이었으며 total acid output (TAO)은 0.7 ± 0.1 mEq/4hrs로 나타났다. ursolic acid를 투여하였을 때 위액 volume은 5.3 ± 0.5 mL, pH는 1.5 ± 0.1이었으며 total acid output (TAO)은 0.5 ± 0.1 mEq/4hrs로 나타났다. Ursolic acid는 양성대조군으로 사용한 cimetidine 보다는 약하지만 위액의 volume을 줄이고, pH를 약간 올렸으며 TAO를 줄인 것으로 나타나 공격인자에 대한 방어작용을 보이는 것으로 생각된다(Table 3).

H^+/K^+-ATPase의 활성 억제

H^+/K^+-ATPase의 활성을 측정한 결과는, 양성대조군인 pantoprazole이 50 μM과 100 μM에서 각각 33.7%, 36.2%의 억제효과를 보였으며 ursolic acid는 35.0%, 32.4%로 억제하였다. 따라서 ursolic acid는 용량 의존적으로 H^+/K^+-ATPase활성을 억제하지는 않았으나 위산분비억제의 효능을 보여 ursolic aicd의 위산 분비 억제 기전을 제시하였다(Fig. 2).

Prostaglandin E_2정량

AGS cell을 이용하여 ursolic acid를 처리하여 PGE_2를 정

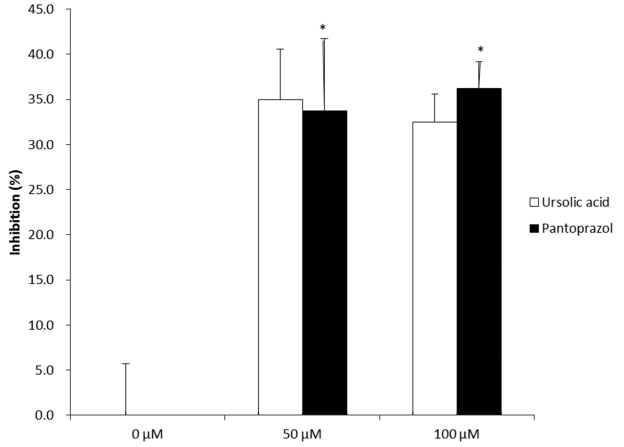


Fig. 2. H^+/K^+-ATPase inhibitory activity of ursolic acid. The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05 compared to the control.

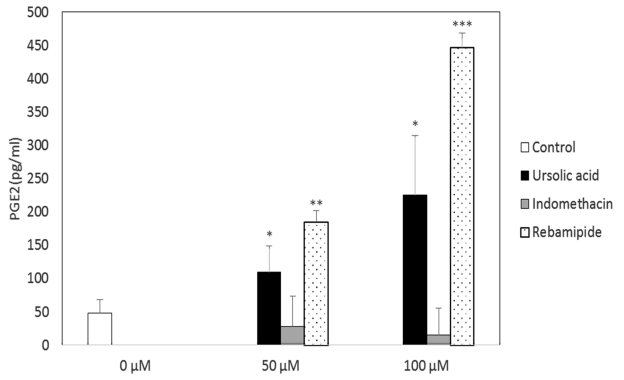


Fig. 3. Quantification of Prostaglandin E_2 of ursolic acid in AGS cell. The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control.

량 하였다. 실험 결과, 위점막 보호제로 사용하는 rebamipide는 50 μM과 100 μM에서 각각 184.9 pg/mL, 446.8 pg/ml의 PGE_2가 생성되어 농도 의존적으로 증가되었다. 반면 아라키돈산에서 PGE_2로의 생합성을 억제하는 indomethcin은 50 μM과 100 μM에서 각각 28.5 pg/mL, 15.2 pg/mL로 농도 의존적으로 감소시켰다. 50 μM과 100 μM로 처리시 ursolic acid는 109.3 pg/mL, 224.9 pg/mL로 확인되어 우수한 작용을 나타내었으며 같은 농도에서 rebamipide 보다는 낮지만 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, ursolic acid가 위 점막 방어 인자를 증강시킴으로써 위를 보호함을 나타냈다(Fig. 3).

Helicobacter pylori 균에 대한 항균활성

만성 위염, 위궤양 및 위암의 원인으로 알려진 *H. pylori*에 대한 항균효과를 실험한 결과 대조군에 비하여(++++) ursolic acid 10 μg/mL 및 50 μg/mL에서 *H. pylori* 에 대한 항균작용(++)을, 100 μg/mL에서 *H. pylori* 에 대한 항균작용(+)을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 ampicillin

Table 4. Colonization inhibiting activity of ursolic acid on *H.pylori*

Material	Dose (μg/mL)	Colonization
Control	-	++++
Ursolic acid	10	++
	50	++
	100	+
Ampicillin	10	-
	50	-
	100	-

–: none, +: 1-64 colonies, ++: 65-84 colonies, +++: 85-104 colonies, ++++: > 105 colonies

보다는 약하지만 용량을 증가하거나 장기간 복용 시 상당한 효과가 있을 것으로 기대된다(Table 4).

위암 세포 사멸에 대한 실험

DAPI 핵 염색법

DAPI staining은 핵을 염색하여 세포의 형태학적 변화를 시각화하는 분석 방법으로 DAPI가 intact cell membrane을 투과하여 DNA와 binding 하여 약 358 nm (Max) 파장대의 빛을 흡수하여 파랑~남색의 형광을 나타내는 것으로 확인한다.

DAPI는 nucleus 상태에 따라 의존적으로 막 투과성이 다르게 나타나며 apoptosis 혹은 necrosis가 일어나 세포막의 막 투과성이 높아지게 되면 normal cell에 비하여 더 많은 양의 DAPI가 핵을 투과하여 light intensity가 높아지는 경향을 보인다. Ursolic acid를 투여하였을 때 대조군과 달리 핵의 모양에 변형이 일어났으며 세포 모양이 수축되거나 염색질 농축 현상이 관찰되었다. 또한 light intensity가 높아짐을 확인 할 수 있었다. 이것은 ursolic acid가 apoptosis를 유도하여 암세포주들의 사멸에 관여함을 나타낸 것이다(Fig. 4).

Flow cytometry assay

Apoptosis가 일어난 세포는 단편화된 DNA를 소실하므로, flow cytometry 방법을 이용하여 sub-G1 DNA content를 가진 세포 수를 측정함으로써 apoptosis를 확인, 정량할 수 있다. Ursolic acid는 early apoptosis가 일어나고 있는 세포수의 증가를 보여 암세포의 apoptosis에 관여함을 나타냈다(Fig. 5).

Ursolic acid는 많은 종류의 약용 식물과 인간식이에 널리 분포되어 있는 펜타사이클릭 트리테르펜 화합물이다. 다양한 약리학적 성질을 가지고 있는데, 특히 종양과 관련된 인자 중 NF-κB의 활성화를 억제 하는 것으로 보고되었는데 ursolic acid가 NF-κB의 DNA 결합을 억제 하고 NF-κB 유도 키나제(NIK)에 의해 활성화 된 NF-κB 의존

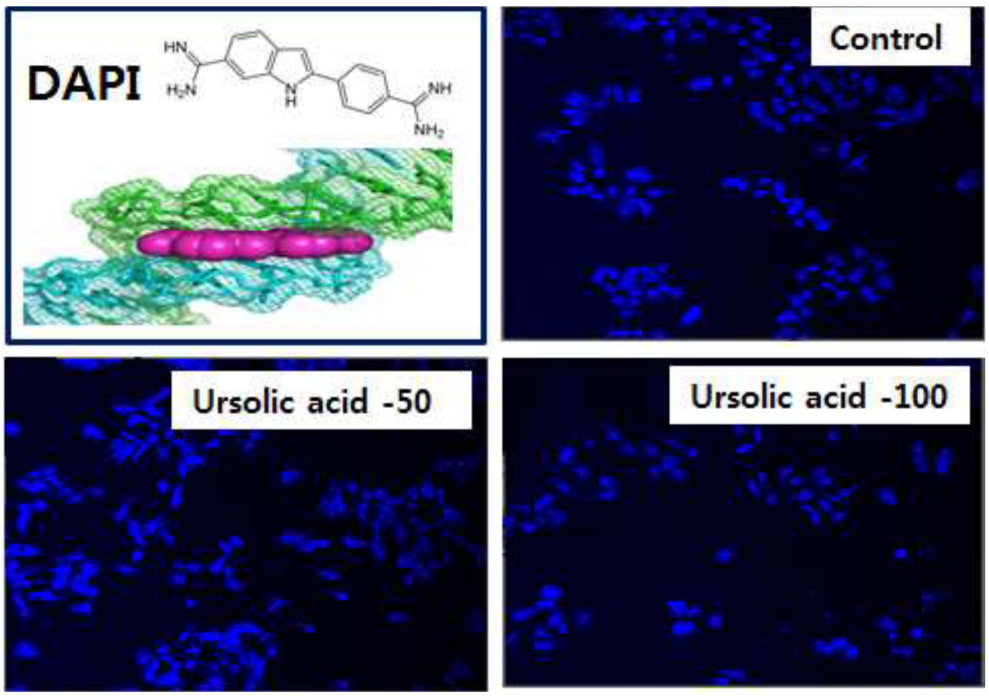
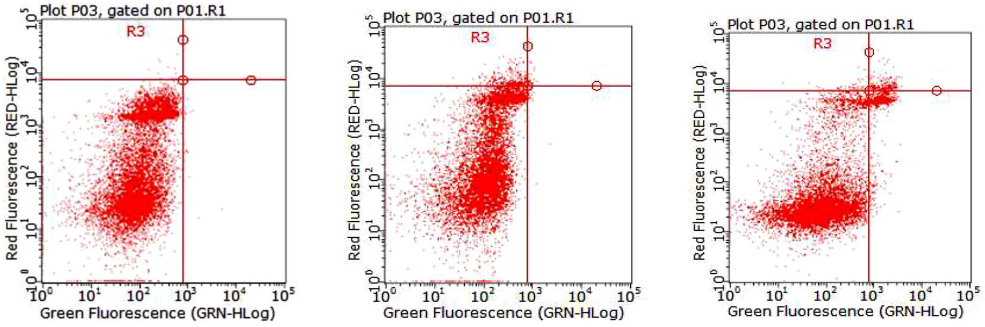


Fig. 4. Morphological change of ursolic acid in AGS cells.



A Control B Ursolic acid 50 μg/mL C Ursolic aid 100μg/mL

Fig. 5. Flow cytometry analysis of ursolic acid.

수용체 유전자의 발현 및 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 신호 전달을 억제함으로써 세포 사멸을 가져오는 것으로 알려져 있다.[17]

Uursolic acid의 위에 대한 작용을 알아보고자 실험한 결과, 위염 및 위궤양에 대한 실험 중 HCl·ethanol에 의한 흰 쥐 위염, 실험에서는 대조군 보다 위 손상지수를 억제하였고, indomethacine에 의한 흰 쥐 위궤양 실험에서도 대조군에 비해 궤양병소를 억제함을 확인하였다. 흰쥐의 위액분비량, pH 및 산분비량에 미치는 작용 실험에서는 공격인자로 작용할 수 있는 위액 volume을 줄이고, pH는 증가시켰으며 total acid output (TAO)도 억제함을 알 수 있었다. H^+/K^+-ATPase의 활성 실험 결과에서는 ursolic acid가 용량 의존적으로 H^+/K^+-ATPase활성을 억제하지는 않았으나 위산분비억제의 효과가 있음을 알 수 있었다. *H. pylori* 균에 대한 항균활성 실험결과로 *H. pylori* 균에 대한 항균작용(+)을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 ampicillin보다는 약하지만 용량을 증가하거나 장기간 복용 시 상당한 효과가 있을 것으로 기대된다. 대표적인 위 보호 인자인 PGE_2 정량 실험결과, 양성 대조군으로 사용된 rebamipide 보다는 낮지만 농도 의존적으로 PGE_2를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

기능성 소화불량에 있어 위저류를 개선시키는 것이 중요한데, ursolic acid는 위배출능 및 장관 수송능을 향상시켰다. 위암 세포 사멸에 대한 실험으로 실시한 DAPI 핵염색법에서는 대조군과 달리 핵의 모양에 변형이 일어났으며 세포 모양이 수축되거나 염색질 농축 현상이 관찰되었다. 또한 light intensity가 높아짐을 확인 할 수 있었는데 이것은 ursolic acid가 암세포의 apoptosis에 효과가 있

음을 나타낸다. Flow cytometry assay결과는 농도 의존적으로 early apoptosis가 일어나고 있는 세포수의 증가를 보여 암세포의 apoptosis에 관여함을 나타냈다.

본 연구 결과, ursolic acid는 HCl·ethanol에 기인한 급성 위염과 indomethacin 유발 위궤양에 실험에서 약물을 투여하지 않은 대조군에 비해 위손상 지수를 감소시켰으나 유의성 없는 결과를 보였지만, gastric secretion 실험에서 공격인자로 작용할 수 있는 산을 중화하는 효능이 대조군에 비해 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 위산 분비에 관여하는 H^+/K^+-ATPase에서 위산 분비억제의 효과가 있어 위를 보호하였고, PGE_2 양을 증가시켜 방어인자를 증강함으로써 위 점막을 보호하는 효능을 나타냈다. *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타냈고, AGS 위암 세포주로 실험한 DAPI 핵 염색법과 FACS 실험에서 암세포의 apoptosis에 관여하는 것으로 나타났다. 이에 따라 ursolic acid는 공격인자인 산, proton pump, *H. pylori*의 작용을 억제하고 PGE_2의 양을 증가시켜 방어인자를 증강, 위 점막을 보호하여 위염 및 위궤양에 효과를 나타내며 암세포에 대한 세포독성을 나타내고 apoptosis에 관여하여 위암에 대한 효과를 나타내는 것으로 볼 수 있었다.

위염 및 위궤양에 대한 실험 중 HCl·ethanol에 의한 흰 쥐 위염, 실험에서는 대조군의 경우 위 손상지수가 99.5 ± 19.9 mm인 것에 비하여 ursolic acid는 91.5 ± 11.0 mm로 억제하였고 양성대조군으로 사용한 hydrotalcite는 100 mg/kg 투여 시 65.0 ± 12.7 mm로 위 손상지수를 억제하였다. 대조군과는 약간의 차이만 있을 뿐이고 양성대조군에 비해서 억제율이 현저히 낮은 편이었다.

Indomethacine에 의한 흰 쥐 위궤양 실험에서는 대조군에서는 22.3 ± 9.4 mm^2로 궤양병소가 확인 되었고 ursolic acid는 17.0 ± 12.2 mm^2의 궤양병소가 관찰되었는데 이것은 대조군에 비하여 23.8% 억제된 결과이며 양성대조군의 cimetidine 12.0 ± 3.7 mm^2 (46.1%)보다는 낮은 결과였다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년 덕성여자대학교의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 ursolic acid의 위의 보호효과를 위한 실험을 실시하였다. 위장 질병에 대한 ursolic acid의 효과를 확인하기 위해서 급성, 만성위염은 각각의 HCl·ethanol과 indomethacin에 의해 유도된 위염 동물 모델을 사용하여 관찰하였다. 대표적인 공격인자인 위산에 관해서는 PPI activity를 통해서 확인하였고, 위의 손상에 대한 보호인자에 관해서는, PGE_2를 정량적으로 분석하였다. 항균활성 실험은 만성위염, 위궤양, 위암에 원인인자로 잘 알려진 *H. pylori*로 실험하였다. AGS cell를 이용하여 DAPI 염색, Flow cytometry assay를 통하여 ursolic acid가 위암세포의 apoptosis에 관여하는지를 확인하였다. 그 결과 ursolic acid는 HCl·ethanol과 indomethacin에 의해 유도된 급성, 만성에 대한 위손상을 억제하였다. Ursolic acid는 위산분비의 마지막 단계인 위염분비효소인 proton pump를 억제시킴으로써 산의 분비를 억제하였다. 그리고 ursolic acid는 위 점막의 보호인자인 PGE_2의 농도가 증가함으로써 위 점막 보호 효과를 확인하였다. 또한 ursolic acid는 공격인자인 *H. pylori* colonization을 억제하였다. DAPI를 이용한 핵 염색에서, 대조군과는 달리, 핵 형상의 변형과 함께 수축 된 세포 또는 염색질의 응축현상이 관찰되었다. Flow cytometry assay에서 ursolic acid에 의해 apoptosis가 증가하는 것을 확인 하였다. 이를 통하여 ursolic acid는 위 손상에 대한 방어 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

References

1. Yie, Y.Y., Zhao, S.Y., Tang, Q., Zheng, F., Wu, J.J., Yang, L.J., Deng, S.G. and Hann, S.S.: Ursolic acid inhibited growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells through AMPKα-mediated reduction of DNA methyltransferase., 1. *Mol. Cell. Biochem*., **402**, 63-74 (2014).
2. Heo, J.K., Hwang, D.S. and Lee, K.S.: Inhibitory Effects of Ursolic Acid from Prunella Vulgaris on Osteoclast Differentiation. *J. Korean Obstet. Gynecol*., **27**, 59-70 (2014).
3. Kim, S.Y., Song, M.J., Roh, B.D., Park, S.H. and Park, J.W.: Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation on composite resins containing ursolic acid. *Restorative Dentistry & Endodontics(RDE)*, **38**, 65-72 (2013).
4. Park, S.N. and Kook. J.K.: Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, and Sophoraflavanone G against Periodontopathogens. *Intern. J. Oral Biol*., **38**, 149-154 (2013).
5. Jo, E.J., Choi, M.H., Kim, H.S., Park, S.N., Lim, Y.K., Kang, C.K. and Kook, J.K.: Antimicrobial Effects of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, and Sophoraflavanone G against Enterococcus faecalis and Propionibacterium acnes. *Intern. J. Oral Biol*., **39**, 75-79 (2014).
6. Yu, H.H., Seo, S.J., Hur, J.M., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H. and You, Y.O.: Protective Effect of Ursolic Acid from Corni fructus on the Hydrogen Peroxide-induced Damage of HEI-OC1 Auditory Cells. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol*., **20**, 1524-1529 (2006).
7. Chu. X., He, X., Shi, Z.P., Li, C.J., Guo, F.C., Li, S.T., Li, Y., Na, L.X. and Sun, C.H.: Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and β-oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle. *Molecular Nutrition & Food Research*, **59**, 1491-1503 (2015).
8. Viver R. Yadav, Sahdeo Prasad, Bokyung sung, Ramaswamy Kannappan, and Bharat B. Aggarwal.: Targeting Inflamma-

tory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins,* **2**, 2428-2466 (2010)
9. Park, C.E. and Park C.H.: Ursolic Acid Isolated from Mume Fructus Inhibits Urease Activity of Helicobacter pylori. *Korean Chem. Eng. Res.,* **51**, 591-596 (2013).
10. Mizui, T. and Dodeuchi, M.: Effect of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.,* **33**, 939-945 (1983).
11. Kasuya, Y., Urushidani, T., and Okabe, S.: Effects of various drugs and vagotomy on indomethacin-induced gastric ulcers in the rat. *Jpn. J. Pharmacol.,* **29**, 670-673 (1979).
12. Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S. and Meranze, D.: A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.,* **4**, 43-61 (1945).
13. Suetsugu, H., Ishihara, S., Moriyama, N., Kazumori, H., Adachi, K., Fukuda, R., Watanabe, M. and Kinoshita, Y.: Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa, *J. Lab. Clin. Med.,* **136**, 50-57 (2000).
14. Sipponen, P., Kosunen, T.U., Valle, J., Riihela, M. and Seppala, K.: Helicobacter pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer, *J. Clin. Pathol.,* **45**, 319-323 (1992).
15. Bae, E.A., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D.H.: *In vitro* anti *Helicobacter pylori* activity of panaxtriol isolated from ginseng. *Arch. Pharm. Res.,* **24**, 297-299 (2001).
16. Kim, J.M., Shin, J.E., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D.H.: Inhibitory Effect of Ginseng Polyacetylenes on Infection and Vacuolation of Helicobacter pylori. *Nat. prod. sci.,* **9**, 158-160 (2003).
17. Aggarwal, B.B., Sung, B., Prasad, S., Yadav, V.R. and Kannappan, R.: Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer, *Toxins*, **2**, 2428-2466 (2010).