

열대열 말라리아에 대하여 항 말라리아 효과가 있는 해조류에 대한 연구

김혜숙¹ · Yusuke Wataya¹ · Yoshiaki Takaya² · 안주홍³ · 전병훈⁴ · 신호준⁵ · 신창호⁶ · 김용만⁶ · 박 현^{6*}

1: 오카야마대학교 약학대학, 2: 메이조대학교 약학대학, 3: 광주과학기술원 생명과학과,
4: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 5: 아주대학교 의과대학 미생물학교실, 6: 원광대학교 의과대학 기생충학교실

Antimalarial activity of marine alga against *P. falciparum* in vitro

Hye Sook Kim¹, Yusuke Wataya¹, Yoshiaki Takaya², Joo Hong Ahnn³, Byung Hun Jeon⁴,
Ho Joon Shin⁵, Chang Ho Shin⁶, Yong Man Kim⁶, Hyun Park^{6*}

1: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima Okayama, 2: Faculty of Pharmacy, Meijo University, Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya, Japan, 3: Department of Life Science, Kwangju Institute of Science and Technology, Kwangju, 4: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 5: Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, 6: Department of Parasitology, College of Medicine, Wonkwang University

To produce anti-malarial drugs, natural products were extracted from 18 species of marine algae by various mechanical methods. Twelve species of marine algae were found to have antiplasmodial activity by inhibiting the growth of the chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* strain FCR-3 with EC₅₀ values less than 100 µg/ml. The methanol extract of *Neoholmeria japonica* had the strongest antiplasmodial activity with EC₅₀ value of 62 µg/ml.

Key words : *Plasmodium falciparum*, *Neoholmeria japonica*, antiplasmodial activity

서 론

말라리아는 플라즈모디움 (*Plasmodium*) 속에 속한 말라리아 원충의 감염에 의해 나타나는 전염성 질환이다. 학질모기 속 (genus *Anopheles*) 모기를 매개로 하여 감염된다. 증상으로는 간헐적인 발열작, 빈혈, 비종 등으로 근래에는 자연이나 환경의 이상 변화로 맹위를 떨치고 있다. 2002년 WHO보고에 따르면 추정 감염 환자수는 연간 3억-5억명, 연간 사망자수는 112만명으로 세계 3대 전염병중의 하나이다¹⁾. 인간에게 감염된 말라리아 원충에는 아프리카, 아시아, 라틴 아메리카의 열대 지역 전체에 분포한 열대열 말라리아 원충 (*P. falciparum*), 세계 각지의 열대와 온대의 일부에 분포한 3일열 말라리아 원충 (*P. vivax*), 세계 각지에 분포한 4일열 말라리아 원충 (*P. malariae*) 및 주로 하고 열대 서 아프리카에 분포한 달걀꼴 말라리아 원충 (*P. ovale*) 등이 있다. 그 중에서도 열대열 말라리아가 가장 위독한 증상을 나타낸다. 말라리아 감염후 1-2주간에 뇌증, 신증, 용혈성 빈혈, 폐수종, 심장 장

해, 중증 장염 등을 수반한다. 또한 단 기간 내에 장기 부전을 나타내고 심하면 숙주가 죽음에 이르기기도 한다. 현재 사용되고 있는 약제의 대표적인 것으로 클로로퀸, 푸리마킨, 알테미신, 메푸로퀸, 피리메사민 등이 있다. 이들 약제는 독성이 강하여 부작용이 유발되며 또한 대부분의 약제에 대한, 약제내성 말라리아의 확산이 화학요법의 문제점으로 대두되고 있다. 이와 같이 약제내성 및 부작용을 극복하기 위해서는 항 말라리아 활성이 높고 또한 안정성이 높은 신약의 개발을 필요로 하고 있다²⁾. 현재 말라리아가 유행하는 지역에서는 민간요법에서 해열작용을 가진 생약성분의 전통 약제들을 사용하고 있다. 그러나, 이러한 전통 약제들에 대한 과학적 자료나 효과에 대한 검증이 거의 없는 편이다. 단지 전통적으로 중국에서 항 말라리아 약제로 써오던 개똥속 (*Artemisia annua*)으로부터 추출된 세스키테르펜 구조의 알테미신 성분만 항 말라리아 약효 및 이에 대한 검증이 이루어진 경우이다³⁾. 이의 성공에와 같이 기존에 전통적으로 사용해왔던, 전통약제 및 천연물에 대한 항 말라리아 효과를 재검토해야 할 필요가 있다.

본 실험에서는 우리나라가 삼면이로, 주변의 어느 곳에서나 쉽게 구할 수 있는 해초류에서 항 말라리아 효과가 있는 성

* 교신저자 : 박 현, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학
· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6769
· 접수 : 2003/08/4 · 수정 : 2003/09/26 · 채택 : 2003/10/06

본 유무를 확인하기 위하여, 18종의 해조류를 메탄올로 분획하여 각 메탄올 분획 중에서 항 말라리아 효과를 가진 해조류를 선별하고, 성분 규명을 실험 목적으로 한다. 이러한 효과를 검증하기 위하여, 클로로킨 억제내성을 가지고 있는 열대열 말라리아 및 독성 유무는 숙주세포 모델인 FM3A 세포주를 이용하였다.

재료 및 방법

1. 시료

해조류 (Marine alga) 18종을 모으고, 이 연구를 위하여 메탄올로하여 추출 분획을 얻었다. 각각의 해조류의 이름은 *Undaria peterseniana* (Kjellman) Okamura, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh, *Cystoseiraodatensis* (Yendo) Fensholt Okamura, *Enteromorpha linza* (Linnaeus) J. Agardh, *Desmarestia ligulata* (Stackhouse) Lamouroux, *Dictyopteris divaricata* (Okamura) Okamura, *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link, *Desmarestia viridis* (Muller) Lamouroux, *Desmarestia viridis* (Muller) Lamouroux, *Costaria costata* (Turner) Saunders, *Neoholmesia japonica* (Okamura) Mikami, *Delesseria serrulata* Harvey, *Gelidium elegans* Kuetzing, *Campylaeophora hypnaeoides* J. Agardh, *Laminaria japonica* Areschoug, *Codium fragile* (Suringar) Hariot *Undaria, undarioides* (Yendo) Okamura, *Ecklonia stolonifera* Okamura 이었다.

2. 열대열 말라리아 원충의 배양 시험

본 실험에서는 열대열 말라리아 원충으로서 *P. falciparum* (FCR-3 strain, ATCC 30932)을 이용하였다. 실험조건은, 여과 멸균한 RPMI 1640배지 (Gibco, NY)를 pH 7.4에 맞추고, A형 인간 혈청을 10%로 되도록 첨가하였다. 말라리아 원충의 배양은 O₂농도 5%, CO₂농도 5%, N₂농도 90%, 온도는 37°C로 행했다. 적혈구 용적을 값 (적혈구 부유액 중에 차지한 적혈구의 체적의 비율)은 5%에서 이용했다. 이와 같이 Trager와 Jensen의 방법을 변형시켜 실험하였다⁴⁾. 24 well 배양 플레이트를 이용하여 배양하고, 배지는 매일 교환하고, 감염율은 박충도말 표본을 작성하고, Giemsa염색 또는 Diff-Quik염색을 행한 후, 광학현미경 (유침, 1000 ×)을 이용해서, 말라리아 원충 감염율을 아래식으로부터 산출했다.

$$\text{말라리아 원충 감염율(\%)} = \frac{\text{감염 적혈구 수}}{\text{총 적혈구 수}} \times 100$$

3. 말라리아 원충 증식 저해 스크리닝 시험

배양한 말라리아 원충 감염 적혈구를 원심침전하여 모으고, 혈청을 포함한 배양기에서 세척을 시행한 후, 비 감염 적혈구를 가지고, 말라리아 초기 감염율이 0.3%가 되도록 하였다. 이때의 적혈구 용적을 값은 3%가 되도록 하였다. 실험에 이용한 샘플은 멸균수와 디메틸 설펝시드 (DMSO)에 용해하고, 소정 농도의 샘플이라고 했다. 24 well 배양 플레이트에 샘플을 well 당 5 μl씩 첨가했다. 복수로 샘플을 취하여, 컨트롤은 멸균수와 DMSO를

각 well당 5 μl씩 첨가했다. 다음에, 미리 준비해 두었던 열대열 말라리아 원충 배양액을 995 μl씩 가하고, 현탁한 후, 배양 플레이트는 CO₂ - O₂ - N₂ (5%, 5%, 90%) 항온기에서 72시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 박충도말 표본을 작성하고, 염색한 후, 현미경하로 관찰하고, 시료를 가한 것의 감염율 및 컨트롤의 감염율을 산출했다. 하나의 박충혈액 도말 당 총 10,000개의 적혈구가 포함되도록 하여 현미경으로 관찰하였다. 앞서 구한 말라리아 원충 감염율로부터 다음 식에 의하여 증식율을 산출하여 sigmoidal curve를 작성한 후, 말라리아 원충에 대한 50%증식 저해 농도 (EC50%)를 구했다^{5,6)}.

$$\text{증식율(\%)} = \frac{([b]-[a])}{([c]-[a])} \times 100$$

a: 초기 감염율, b: 샘플 첨가시의 감염율, c: 샘플비 첨가시 (컨트롤)의 감염율

4. 마우스 FM3A 세포 증식 저해 시험

마우스 유암 유래 FM3A세포의 야생주인 F28-7주를 일본 암 연구 자원은행 (Japanese Cancer Research Resources Bank, JCRR) 으로부터 제공받아서 실험에 사용했다. 세포배양은 ES 배지에 비동화한 송아지 혈청을 2%로 되도록 첨가하고, CO₂농도 5%, 37°C로 배양하였다. 이 조건 하에서의 FM3A세포의 배가 시간은 약 12시간 사이였다. 전 배양을 시행하고, 대수 증식기에 들어갔던 세포를 5 × 10⁴ cells/ml가 되도록 희석했다. 샘플은 말라리아 원충의 항 말라리아 활성 측정시 조제한 것을 이용했다. 24-well 배양 플레이트에 샘플 용액을 5 μl씩 첨가했다 (배지등을 가한다면 최종 농도는 0.1 - 100 μg/ml로 된다.). 각 샘플 시료는 복수 (duplicate)로 시행하였으며, 대조군으로써 멸균수와 DMSO를 5 μl씩 첨가한 24-well도 동시에 준비했다. 다음에, 준비해 두었던 배양 세포 부유액을 995 μl씩 첨가하고, 조용하게 혼합하였다. 48시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 세포수를 셀카운터 (CC-130, Toa Medical Electrics, Japan)로 계수하고, 아래식으로부터 증식율을 산출했다⁷⁾.

$$\text{증식율(\%)} = \frac{([C]-[A])}{([B]-[A])} \times 100$$

A: 초기 세포수, B: 48시간 후의 컨트롤의 세포수, C: 샘플 첨가한 후의 48시간 후의 세포수

세포 증식율은, 샘플을 첨가한 24-well의 세포수 및 대조군의 세포수로부터 산출했다. 이것에 의해, 샘플의 세포 독성을 평가하고, 말라리아 원충 때와 마찬가지로 세포증식 저해 농도 (EC50)를 산출했다. EC50값이란 말라리아 원충, 또는 FM3A 세포의 배양액에 샘플을 첨가하지 않은 대조군의 증식율, 또는 말라리아 원충 감염율을 100%로 하여, 샘플 첨가에 의해 대조군의 증식율이 50% 저해한 샘플의 농도를 말한다. 샘플의 항 말라리아 작용은, FM3A 세포에 대한 말라리아 원충의 샘플의 EC50값의 비 (selectivity, 식 참조) 로부터 평가하고, 이 수치가 1이상이면 말라리아 원충에 효과적으로 항 말라리아 활성을 나타내는 것으로 판단한다.

$$\text{약효 판정 요법 계수} = \frac{\text{(마우스 FM3A 세포에 대한 샘플의 EC50값)}}{\text{(열대열 말라리아 원충에 대한 샘플의 EC50값)}}$$

결과 및 고찰

Table 1.은 여러 해조류의 분획을 다음과 같이 준비했다. 18종의 해조류를 메탄올 분획으로 추출하여 실험에 이용하였다.

Table 1. Methanol extracts of marine algae used in this experiment

ID	Compound	Family name (Natural products)	Extract condition
1	TAC-001	Sargassum horneri (Turner) C. Agardh	MeOH
2	TAC-002	Undaria peterseniana (Kjellman) Okamura	MeOH
3	TAC-003	Cystoseira hakodatensis (Yendo) Fensholt	MeOH
4	TAC-004	Enteromorpha linza (Linnaeus) J. Agardh	MeOH
5	TAC-005	Desmarestia ligulata (Stackhouse) Lamouroux	MeOH
6	TAC-006	Dictyopteris divaricata (Okamura) Okamura	MeOH
7	TAC-007	Scytosiphon lomentaria (Lyngbye) Link	MeOH
8	TAC-008	Desmarestia viridis (Muller) Lamouroux	MeOH
9	TAC-009	Desmarestia viridis (Muller) Lamouroux	MeOH
10	TAC-010	Costaria costata (Turner) Saunders	MeOH
11	TAC-011	Neoholmesia japonica (Okamura) Mikami	MeOH
12	TAC-012	Delesseria serrulata Harvey	MeOH
13	TAC-013	Gelidium elegans Kuetzing	MeOH
14	TAC-014	Campylaeophora hypnaeoides J. Agardh	MeOH
15	TAC-015	Laminaria japonica Areschoug	MeOH
16	TAC-016	Codium fragile (Suringar) Hariot	MeOH
17	TAC-017	Undaria undarioides (Yendo) Okamura	MeOH
18	TAC-018	Ecklonia stolonifera Okamura	MeOH

Table 2. Antimalarial activity and cytotoxicity of extracts from marine algae

ID	Compound	Family name (Natural products)	% growth at final conc.	P. falciparum EC50 (µg/ml)	FM3A EC50 (µg/ml)	Selectivity
1	TAC-001	Sargassum horneri (Turner) C. Agardh	100 ^a			
2	TAC-002	Undaria peterseniana (Kjellman) Okamura	100 ^a			
3	TAC-003	Cystoseira hakodatensis (Yendo) Fensholt	100 ^a			
4	TAC-004	Enteromorpha linza (Linnaeus) J. Agardh	100 ^a			
5	TAC-005	Desmarestia ligulata (Stackhouse) Lamouroux	100 ^a			
6	TAC-006	Dictyopteris divaricata (Okamura) Okamura	100 ^a			
7	TAC-007	Scytosiphon lomentaria (Lyngbye) Link		100	87.5%(at 101.5µg/ml) ^b	
8	TAC-008	Desmarestia viridis (Muller) Lamouroux		100	72 µg/ml	
9	TAC-009	Desmarestia viridis (Muller) Lamouroux		87	93 µg/ml	>1
10	TAC-010	Costaria costata (Turner) Saunders		100	55.5µg/ml	
11	TAC-011	Neoholmesia japonica (Okamura) Mikami		62	70.6%(at 99µg/ml) ^b	>1
12	TAC-012	Delesseria serrulata Harvey		100	67.2%(at 110µg/ml) ^b	>1
13	TAC-013	Gelidium elegans Kuetzing		96	60.5%(at 102µg/ml) ^b	>1
14	TAC-014	Campylaeophora hypnaeoides J. Agardh		100	82.4%(at 104.5µg/ml) ^b	>1
15	TAC-015	Laminaria japonica Areschoug		100	97.5%(at 96.5µg/ml) ^b	>1
16	TAC-016	Codium fragile (Suringar) Hariot		100	85.1%(at 108µg/ml) ^b	>1
17	TAC-017	Undaria undarioides (Yendo) Okamura		100	87.5%	>1
18	TAC-018	Ecklonia stolonifera Okamura		100	86.7%	>1

a: The value shows growth rate at 20 µg/ml, b: The value shows the growth rate in each dose

이상의 결과로, 본 해조류를 열대열 말라리아에 이용한 항말라리아 효과와 FM3A 세포주를 이용하여 세포독성을 검사한 결과 표 2와 같이 12종류의 해조류 분획의 말라리아에 대한 EC50이 100 µg/ml의 농도에서 중간이상의 항 말라리아 효과를 나타냈다. 그러나 6종류의 해조류 분획은 100 µg/ml의 농도에서 항 말라리아 효과를 보이지 않았다. 해조류 중 홍조류에 속하는 *Neoholmesia japonica*은 세포 독성이 낮고, 말라리아 원충에 높은 저해 활성을 갖는 것이 판명됐다. *Neoholmesia* 속의 그림을 Fig.1에 표시했다.

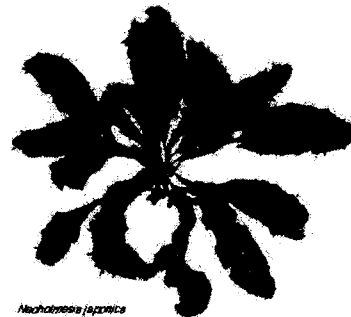


Fig. 1. The shape of *Neoholmesia japonica*

이 홍조류는 살아있는 동안은 선홍색이나 건조하면 암 적갈색으로 바뀐다. 일본 북해도 일원에 분포하며 심해바위에 생육하는 해조류이다. 한국처럼 삼면이 바다인 지리조건상, 바다에서 손쉽게 채취되는 해조류를 이용해서, 활성이 있는 분획을 이번 발견한 것은 대단히 의미 있는 결과라고 하겠다. 특히 이번 실험 결과는 메탄올 추출물을 이용했기 때문에, 해조류에 많은 다당류는 포함되어 있지 않아, 새로운 항 말라리아 활성 물질이 포함되어 있을 가능성이 크므로 향후 활성화합물의 구조 규명이 필요하리라 본다. 이번 연구는 해조류가 항 말라리아 효과를 갖는다는 첫 번째 연구 결과이고, 앞으로 이 홍조류의 메탄올 분획을 정제해서, 항 말라리아 활성을 나타내는 화합물의 구조 결정이 필요하리라 본다. 그러하기 위해서 이에 대한 보다 많은 연구가 앞으로 필요하다고 생각된다.

결론

항 말라리아 약제를 개발하기 위하여, 해조류 18종을 분획한 결과, 클로로킨 내성 열대열 말라리아의 성장을 억제하는 12종의 해조류를 얻었으며, 이의 EC50의 농도는 100 µg/ml이었다. 특히 홍조류인 *Neoholmesia japonica*의 메탄올 추출은 62 µg/ml에서 EC50의 항 말라리아 효과를 나타냈으며, 해조류에서 제일 강한 항 말라리아 활성을 보였다. 이번 보고서는 해조류에서 항 말라리아 효과가 있는 물질을 찾은 첫 번째 경우이다.

참고문헌

1. World Health Organization: The World Health Report 2001.

- Mental health: New understanding, new hope. World Health Organization, Geneva, 2001.
2. Winstanley PA. Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and prospects. *Parasitol Today* 16: 146-153, 2000.
 3. Ridley, RG. Medical need scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415, 686-693, 2002.
 4. Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675, 1976
 5. Kim, H-S.; Miyake, H.; Arai, M.; Wataya, Y.; A potent antimalarial activity of 5-fluoroorotate in combination with sulfamonomethoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in mice. *Parasitol. Int* 47, 59-67, 1998
 6. Kim, H-S., Shibata, Y., Wataya, Y., Tsuchiya, K., Masuyama, A. and Nojima, M. Synthesis and antimalarial activity of cyclic peroxides, 1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetroxanes. *J. Med. Chem* 42(14), 2604-2609, 1999.
 7. Yoshioka, A.; Tanaka, S.; Hiraoka, O.; Koyama, Y.; Hirota, Y.; Ayusawa, D.; Seno, T.; Garrett, C.; Wataya, Y. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J. Biol. Chem* 262, 8235-8241, 1987.