

특소포자충에 대하여 항특소포자충효과가 있는 전승약물에 대한 연구

강경화 · 김화경 · 김춘매 · 조향정¹ · 김헌수¹ · 윤기중¹ · 박 현*

원광대학교 의과대학 감염생물학교실, 1: 원광대학교병원 병리학교실

Anti-Toxoplasma Activity of Traditional Medicine Against *Toxoplasma. gondii* in vitro

Jing Hua Jiang, Hwa Kyoung Kim, Chun Mei Jin, Hyang Jeong Jo¹, Hun Soo Kim¹, Ki Jung Yun¹, Hyun Park*

Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, Wonkwang University School of Medicine,

1: Department of Pathology, Wonkwang University School of Medicine

The aim of this study was to confirm traditional medicine of anti-*T. gondii* effect. We searched 16 traditional medicines that have antiparasite effect from dongyibogam and Traditional Chinese Medicine. We have searched 3 medicines that was *Quisqualis indica L. var villosa Clark*, *Artemisia scoparia Waldstein* and *Loranthi Ramulus*, Selectivity of these medicines was 2.9, 2.2 and 2.3, respectively, higher than spiramycin.

Key words : *Toxoplasma gondii*, traditional medicine, selectivity, in vitro

특소포자충은 콕시디아아강(coccidia亞綱, subclass of coccidia)에 속하는 침복포자충이다. 세포 내에 기생하는 원충류인 톡소플라즈마(*Toxoplasma gondii*)는 전 세계적으로 분포하는 인체 및 동물 톡소플라즈마증(toxoplasmosis)의 원인 원충으로서 니콜 및 만시양¹⁾에 의하여 발견되었고 허치슨²⁾ 프랭클³⁾에 의하여 생활사가 밝혀졌으며, 우리나라에서는 1965년 돼지에서 분리되었다. 톡소포자충은 임신에 의한 선천성감염의 중요한 원인중의 하나이다^{4,5)}. 또한 후천성면역결핍증(AIDS) 환자에서 톡소포자충은 톡소포자충성뇌염을 일으키고 생존율을 감소시킨다⁶⁾. 이러한 임상적인 중요성이 있음에도 불구하고 지금까지 항특소포자충제로 사용되는 설파제나 피리메타민(pyrimethamine) 등에 내성은 계속 증가하고 있고 브라디조이트(bradyzoite) 단계의 톡소포자충에 대하여는 별로 효과가 없다. 그리하여 내성기전을 이해하고 내성을 일으키지 않는 구조의 신중 항특소포자충제의 개발이 절실히 요구된다. 또한 이 신약의 구비해야 할 조건은 살충의 효과뿐만 아니라 사람과 동물의 세포에 부작용이 없는 안전한 약물이어야 한다. 항생제는 아무리 효능이 우수하다 하더라도 시간이 지나면 내성이 생기는데, 천연약물을 이용한다면 충분

히 이런 문제를 해결할 수 있으리라 예상된다. 본 연구에서는 총 16종(Table 1)의 전승약물로 시험관 내에서 항특소포자충 효과를 검증하였다.

본 실험에 사용된 톡소포자충(RH strain of *Toxoplasma gondii*, ATCC, No.50174)의 영양형(tachyzoite)은 KP100 CD-1 암컷 마우스(female mouse)에서 얻는다. 1×10^5 개의 톡소포자충의 영양형을 4주령 KP100 CD-1 암컷 마우스 복강에 주입한 뒤, 4일 후 마우스를 경추탈골 사망시킨다. 그리고 2 %의 FBS(GIBCO, Lot No. 1315128)를 함유한 RPMI 1640 media(GIBCO, Lot No. 1346255) 5 ml를 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지 해준다. 다시 복수액을 10 ml짜리 주사기로 전부 뽑아내고 500RPM에서 5분간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상등액은 새로운 50 ml tube에 옮겨서 500RPM에서 5분간 원심분리 한다. 이렇게 얻은 상등액은 새로운 50 ml tube에 옮겨서 2400RPM에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리법으로 얻은 비교적 순수한 톡소포자충의 영양형은 10 %의 FBS를 함유한 RPMI 1640배지에 재부유시키고 4 °C에서 5 내지 6일간 보관할 수 있었다. 이 중 일부는 시험관 내(in vitro) 실험에 사용하고 일부는 또 다시 새로운 KP100 CD-1 마우스에 주입하여 유지하였다⁷⁾.

본 실험에서는 동의보감과 중의약대사전에서 전통적으로 항기생충 약제로 사용되는 16종의 한약재를 선정하였으며 원광대

* 교신저자 : 박 현, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학

· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6768

· 접수 : 2007/04/02 · 채택 : 2007/04/13

학교 대학한약국에서 구입하여(Table 1) 약재 각각 15 g에 1000 ml의 증류수를 넣고 15 ml이 될 때까지 끓인다. 끓인 액을 거즈 두 겹으로 걸러서 동결 건조 시켰다. 동결 건조 시킨 전승약물을 녹여서 여러 농도로 만든 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Name of traditional herbs

Korean Name	Herbal nomenclatures
Daehyang(大黃)	<i>Rheum undulatum</i> L.
Bakduong(白頭翁)	<i>Pulsatillae Radix</i>
Seccangpo(石菖蒲)	<i>Acorus gramineus</i> Soland
Gosam(苦參)	<i>Sophora flavescens</i> Aiton
Guanzong(貫中)	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>
Sagunza(四君子)	<i>Quisqualis indica</i> L. var <i>villosa</i> Clark
Gamcho(甘草)	<i>Glycyrrhiza glaba</i> L.
Machihyun(馬齒莧)	<i>Portulaca oleracea</i> L.
Omiza(五味子)	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon.
Dangi(當歸)	<i>Angelica gigas</i>
Inzin(茵陳)	<i>Artemisia scoparia</i> Waldstein
Sangiseang(桑寄生)	<i>Loranthi Ramulus</i>
Hyangbuza(香附子)	<i>Cyper Rhizoma</i>
Ogapi(五加皮)	<i>Acanthopanax Cortex</i>
Gargn(葛根)	<i>Puerariae Radix</i>
Chencho(川椒)	<i>Zanthoxyli Pericarpium</i>

본 실험에 사용한 MDBK세포는 10 % FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 10 %의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 96 well에 8*10³/ml로 접종하고, 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 교환하고 그로부터 18 시간 후, 2 %의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 교환 배양하였다. 6시간 후, 2 %의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 및 특소포자충의 영양형을 세포수의 5배 되게 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 뒤, 배지를 교환함과 동시에 전승약물을 농도 별로 처리하였다. 이때 대조군으로서 스피라마이신(Spiramycin, SIGMA, China)을 사용하였다. 24시간 뒤, 세포증식분석(cell titer 96@ AQueous one solution cell proliferation assay(PROMEGA, Lot No: 22257902))을 실시하고 1시간 30분 후, 흡광광도계로 490nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하여 시그모이달 커브(sigmoidal curve)를 작성한 후, 특소포자충의 증식을 억제하는 농도(EC50 50 % 세포증식억제농도)를 산출하였고, 하기 수확식 1을 이용하여 약 효과정계수는 선택성(selectivity, 수확식 1)을 이용하여 구하였다⁹⁾.

【수확식 1】

선택성(selectivity)
= HeLa세포에 대한 각 시료의 EC50값/T.gondii에 대한 각 시료의 EC50값

선택성은 신약 개발을 위한 항약물스크리닝에 사용하는 지표의 하나이다. 이 수치가 높으면 높을수록 의약품으로서 인체에 대한 안전성이 높아지는 것을 의미한다. 본 실험에서는 MDBK세포에서 세포증식분석(cell titer 96@ AQueous one solution cell proliferation assay)을 실시하여 전승약물과 양성대조군 스피라마이신의 선택성을 산출하였다. 현재 시중에서 항특소포자충 시

약으로 쓰이는 스피라마이신은 선택성이 1.29이었다. 본 실험에서는 총 16종의 전승약물로 시험관 내에서 선택성을 구하였다. 이 16종의 전승약물 중에서 *Quisqualis indica* L. var *villosa* Clark, *Artemisia scoparia* Waldstein, *Loranthi Ramulus* 등 3개 약물의 선택독성이 각각 2.9, 2.2, 2.3으로서 스피라마이신의 1.29 보다 훨씬 높았다(Table 2). 추후 높은 선택성을 기초로 향후 이 세 가지 전승약물로부터 항특소포자충 효과가 있는 compound를 분리하여 증명함이 필요하다.

Table 2. Selectivity of traditional herbs

Herbs	EC50 in MDBK cell (μl/ml)	EC50 in <i>T. gondii</i> (μl/ml)	Selectivity
<i>Rheum undulatum</i> L.	158	187	-
<i>Pulsatillae Radix</i>	151	180	-
<i>Acorus gramineus</i> Soland	1759	2085	-
<i>Sophora flavescens</i> Aiton	160	188	-
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	172	209	-
<i>Quisqualis indica</i> L. var <i>villosa</i> Clark	1963	673	2.9
<i>Glycyrrhiza glaba</i> L.	210	241	-
<i>Portulaca oleracea</i> L.	1991	2297	-
<i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	1937	2335	-
<i>Angelica gigas</i>	1719	1991	-
<i>Artemisia scoparia</i> Waldstein	8685	3962	2.2
<i>Loranthi Ramulus</i>	3500	1500	2.3
<i>Cyper Rhizoma</i>	4200	3400	1.2
<i>Acanthopanax Cortex</i>	1900	1600	1.2
<i>Puerariae Radix</i>	3200	3600	-
<i>Zanthoxyli Pericarpium</i>	1800	1800	1.0
<i>Spiramycin</i>	2093.28	1624.04	1.29

- : selectivity<1

감사의 글

이 논문은 산업자원부 지방혁신기술사업(RIT05-03-02) 지원으로 수행된 연구임 및 2004년도 원광의과학연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Nicolle, M.M.C., Manceaux, L. Sun un protozoaire nouveau du gondii(*Toxoplasma* n. sp.), Arch Inst Pastrur Tunis, 2: 97, 1909.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K. Life cycle of *Toxoplasma gondii*, Br Med J. 4(5686):806, 1969.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenke, J.K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats, J Am Vet Med Assoc. 157(11):1767-1770, 1970.
- Tenter, A.T., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans, Int J Parasitol. 30(12-13):1217-1258, 2000.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, L. *Toxoplasmosis*, Lancet,

- 363(12):1965-1976, 2004.
6. Luft, B.J., Remington, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS, Clin Infect Dis. 15(2):211-222, 1992.
7. Song, H.O., Ahn, M.H., Ryu, J.S., Min, D.Y., Joo, K.H., Lee, Y.H. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*, Korean J Parasitol, 42(4):185-193, 2004.
8. 崔鎮瑞, 鄭坪林, 蘇鎮璋. Pyrimethamine이 톡소프라스마증에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. Yonsei journal of medical science 18(1):340-354, 1985.