

전통적으로 말라리아 처방에 다용되는 한약재에 대한 항 말라리아 효능과 세포독성에 대한 연구

김윤철 · 김종호¹ · 박 현¹ · 김용만¹ · 김민경¹ · 전병훈² · 김혜숙³ · 윤기중^{4*}

원광대학교 약학대학, 1: 원광대학교 의과대학 감염생물학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학 교실, 3: 오카야마대학교 약학대학 의약품 정보학교실, 4: 원광대학교 의과대학 병리학교실

Antimalarial Activity and Cytotoxicity of Herb-medicine Against *P. falciparum* in vitro

Youn Chul Kim, Jong Ho Kim¹, Hyun Park¹, Yong Man Kim¹, Min Kyeong Kim¹, Byung Hun Jeon², Hye-Sook Kim³, Ki Jung Yun^{4*}

College of Pharmacy, Wonkwang University. 1: Department of Infection Biology, College of Medicine, Wonkwang University. 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University. 3: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University. 4: Department of Pathology, College of Medicine, Wonkwang University

Eighteen methanol extracts of herb-medicine used for malarial and antipyretic therapies in Korea were assessed for their antimalarial activities. Eighteen extracts showed evident antimalarial activity with EC₅₀ values ranged from 2.8 to 110mg/ml. *Evodia fructus* showed the antimalarial activity of EC₅₀ = 4.1 mg/ml and higher selective toxicity(>8) with no cytotoxicity for mammalian cells. This indicated that *Evodia fructus* is potent for a new effective and safe antimalarial agent. The methanol extract of *Physalli radix* had also strongest antiplasmodial activity with EC₅₀ value of 2.8µg/ml

Key words : *Plasmodium falciparum*, traditional medicine, antimalarial drug, drug-resistant malaria, *Evodia fructus*, *Physalli radix*

서 론

말라리아는 플라스모디움(Plasmodium)속에 속한 말라리아 원충의 감염에 의해 나타나는 전염성 질환이다. 학질모기 속 (genus Anopheles) 모기를 매개로 하여 감염된다. 증상으로는 간헐적인 발열작, 빈혈 등으로 근래에는 자연이나 환경의 이상 변화로 맹위를 떨치고 있다. 2002년 WHO 보고에 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 분포

한 4일열 말라리아 원충(*P. malariae*) 및 열대 서 아프리카에 분포한 달걀꼴 말라리아 원충(*P. ovale*)등이 있다. 그중에서도 열대열 말라리아가 가장 위독한 증상을 나타낸다. 말라리아 감염후 1-2 주간에 뇌증, 신증, 용혈성 빈혈, 폐수종, 심장 장애, 중증 장염 등을 수반한다. 또한 단기간내에 장기 부전을 나타내고 심하면 숙주가 죽음에 이르기도 한다. 현재 사용되고 있는 약제의 대표적인것으로 클로로킨, 푸리마킨, 알테미신, 메푸로킨, 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 유행지에서는 민간요법에서 해열작용을 가진 생약성분의 전통 약제들을 사용하고 있다. 그러나, 이러한 전통 약제들에 대한 과학적 자료나 효과에 대한 검증이 거의 없는 편이다. 단지 전통적

* 교신저자 : 윤기중, 전북 익산시 신용동 원광대학교 의과대학 병리학교실

E-mail : kiyun@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-1555

· 접수 : 2004/11/27 · 수정 : 2004/12/30 · 채택 : 2005/01/29

로 중국에서 항 말라리아 약제로 써오던 개똥쑥(*Artemisia annua*)로부터 추출된 세스키테르펜 구조의 Artemisin 성분만 항 말라리아 약효 및 이에 대한 검증이 이루어진 경우이다³⁾. 이의 성공예와 같이 기존에 전통적으로 사용해왔던, 전통약제 및 천연 물에 대한 항 말라리아 효과를 재검토 해야 할 필요가 있다.

우리나라에서 전통적으로 사용된 한약재에 대한 기록이 있는, 東醫寶鑑^{4,5)}과 실제 임상에 적용하는 瘧疾에 대한 처방을 살펴보면, 한약은 주로 해열제로 사용되는 것을 유추 할 수 있다. 그러나, 이러한 한약의 치료효과를 분석하기 위한 현대 과학적인 정보는 거의 없다. 그러므로, 항 말라리아 약제의 개발을 위한 새로운 원천으로서 한약재를 이용하기 위하여, 한약재의 항 말라리아 효능을 연구하는 것은 중요하다.

본 실험에서는 우리나라에서 전통적으로 사용해오던 한약재에서 항 말라리아 효과가 있는 성분 유무를 확인하기 위하여, 18종의 한약재를 페탄올로 분획하여 각 페탄올 분획중에서 항 말라리아 효과를 가진 한약재를 선별함을 실험 목적으로 하였다. 이러한 효과를 검증하기 위하여, 클로로퀸 약제내성을 가지고 있는 열대열 말라리아 및 독성 유무는 숙주세포 모델인 FM3A 세포주를 이용하여 조사한 결과, 항 말라리아 활성 분획을 검출 하였고 이 결과를 보고 하고자한다.

재료 및 방법

1. 시료

화질치료 작용과 해열 작용의 정보는 1613년 집필된 許濂의 『동의보감』^{4,5)} 「탕액편」의 문헌연구와 실제 임상에서 적용하는 한의학적 치료방법을 근거로 하였으며, 이에 적용하는 한약재를 선정하였다. *Picrasmae lignum*(고목), *Pulsatillae radix*(백두옹), *Lonicerae flos*(금은화), *Rhei undulati rhizoma*(종대황), *Saussureae radix*(목향), *Gentianae scabrae Radix*(용담), *Forsythiae fructus*(연교), *Physalii radix*(산장근), *Artemisiae asiaticae herba*(쑥=애엽), *Plantaginis herba*(차전초), *Artemisiae iwayomogii herba*(한인진), *Evodia fructus*(오수유), *Meliae fructus*(천련자), *Meliae cortex*(고련피), *Stemonae radix*(백부근), *Santalini lignum rubrum*(자단향)는 경동시장(Seoul, Korea)에서 일반적으로 많이 쓰는 것으로 구입하였다(Table 1.).

2. 열대열 말라리아 원충의 배양

본 실험에는 열대열 말라리아 원충으로서 *P. falciparum* (FCR-3 strain, ATCC 30932)을 이용하였다. 실험조건은, 여과 멸균한 RPMI1640배지(Gibco, NY)를, pH 7.4에 맞춘뒤, A형 인간 혈청을 10%로 되도록 첨가 하여 배지로서 사용했다. 말라리아 원충의 배양은 O₂농도 5%, CO₂농도 5%, N₂농도 90%, 온도는 37℃로 행했다. 적혈구 용적률(적혈구 부유 액중에 차지한 적혈구의 체적의 비율)은 5%에서 이용하였으며 Trager와 Jensen의 방법을 변형시켜 사용하였다⁶⁾. 24 well 배양 플레이트를 이용하여 배양하고, 배지는 매일 교환하였다. 감염율은 박충도말 표본을 작성하고, Gimsa 염색 또는 Diff-Quik염색을 행한후, 광학현미경

(유침, 1000x) 을 이용해서, 말라리아 원충 감염율을 아래의 식으로 산출하였다.

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

Table 1. Herbal medicines used in this study.

| 번호 | 생약명 | 학명 |
|----|----------|-------------------------------------|
| 1 | 고목(苦木) | <i>Picrasmae lignum</i> |
| 2 | 백두옹(白頭翁) | <i>Pulsatillae radix</i> |
| 3 | 금은화(金銀花) | <i>Lonicerae flos</i> |
| 4 | 종대황(種大黃) | <i>Rhei undulati rhizoma</i> |
| 5 | 목향(木香) | <i>Saussureae radix</i> |
| 6 | 용담(龍膽) | <i>Gentianae scabrae radix</i> |
| 7 | 연교(連翹) | <i>Forsythiae fructus</i> |
| 8 | 산장근(酸漿根) | <i>Physalii radix</i> |
| 9 | 애엽(艾葉) | <i>Artemisiae asiaticae herba</i> |
| 10 | 차전초(車前草) | <i>Plantaginis herba</i> |
| 11 | 한인진(韓茵陳) | <i>Artemisiae iwayomogii herba</i> |
| 12 | 오수유(吳茱萸) | <i>Evodia fructus</i> |
| 13 | 강진향(降眞香) | <i>Dalbergiae odoriferae lignum</i> |
| 14 | 천련자(川楝子) | <i>Meliae fructus</i> |
| 15 | 고련피(苦楝皮) | <i>Meliae cortex</i> |
| 16 | 백부근(百部根) | <i>Stemonae radix</i> |
| 17 | 자단향(紫檀香) | <i>Santalini lignum rubrum</i> |

3. 말라리아 원충 증식 저해 스크리닝 시험;

배양한 말라리아 원충 감염 적혈구를 원심분리해서 모아, 혈청을 포함한 배지에서 세척한 후, 비감염 적혈구를 가하여, 말라리아 초기 감염율이 0.3%가 되도록 하였다. 이때의 적혈구 용적률은 3%가 되도록 하였다. 실험에 이용한 샘플은 멸균 수, 디메틸 설펝사이드(DMSO)에 용해하고, 소정 농도의 시료로 사용하였다. 24 well 배양 플레이트에 샘플을 5ul/well 가했다. 샘플은 duplicate에 취하였다. 대조군은 멸균수, DMSO를 5ul/well 가하였다. 다음에, 미리 준비해 두었던 열대열 말라리아 원충 배양액을 995ul씩 가하여 현탁 시켰다. 배양 플레이트는 CO₂, CO₂, N₂(5%, 5%, 90%) 배양기에서 72시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 박충도말 표본을 작성, 염색한 후 현미경으로 관찰하고, 시료를 가한 것의 감염율 및 대조군의 감염율을 산출하였으며 하나의 박충혈액도말당 총 10,000개의 적혈구를 카운트하였다. 상기로 구한 말라리아 원충 감염율로부터 다음식에 의하여 증식율을 산출하여, sigmoidal curve를 작성한후, 말라리아원충에 대한 50%증식 저해 농도(EC₅₀%)를 구하였다^{7,8)}.

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

a: 초기 감염율

b: 샘플 첨가시의 감염율

c: 샘플비 첨가시(대조군)의 감염율

4. 마우스 FM3A 세포 증식 저해 시험;

마우스 유암 유래 FM3A 세포의 야생주인 F28-7주를 일본 암 연구 자원은행(Japanese Cancer Research Resources Bank,

JCRRB)으로부터 받아서 이용하였다. 세포배양은 ES 배지에 비동화 한 송아지 혈청을 2%가 되도록 첨가하고, CO₂농도 5%, 37°C로 배양하였다. 이 조건하에서의 FM3A세포의 배양 시간은 약 12시간이었다. 전 배양을 해서 대수 증식기에 들어갔던 세포를 5 × 10⁴ cells/ml가 되도록 배지로 희석했다. 샘플은 말라리아 원충의 항 말라리아 활성 측정시 조제한 것을 이용하였다. 24well 배양 플레이트에 샘플 용액을 5μl 씩 가하였다(배양기 등을 가한다면 최종 농도는 0.1 - 20μg/ml로 되었다). 샘플은 duplicate로 시행하였으며, 대조군으로서 멸균수, DMSO를 5μl 가한 24well도 동시에 준비하였다. 다음에, 준비해 두었던 배양 세포 부유액을 995μl씩 가하고, 배양액이 균일해지도록 조용히 현탁 하였다. 48시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 세포수를 셀 카운터(CC-130, Toa Medical Electrics, Japan)로 계수하고, 하기식으로부터 증식율을 산출하였다⁹⁾.

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

A:조기 세포수
B:48시간 후의 컨트롤의 세포수
C:샘플 첨가한 후의 48시간 후의 세포수

세포 증식 저해 활성은, 샘플을 첨가한 24well의 세포수 및 컨트롤의 세포수로부터 산출하였다. 이것에의해, 샘플의 세포 독성을 평가하고, 50%세포증식을 억제하는 농도(EC₅₀)를 sigmoidal curve를 작성해서 산출하였다. EC₅₀값이란 말라리아 원충, 또는 FM3A 세포의 배양기에 샘플을 첨가하고 있지 않은 컨트롤의 증식율, 또는 말라리아 원충 감염율을 100%로 하여, 샘플 첨가에 의하고 대조군의 증식율을 50% 저해한 샘플의 농도를 말한다. 샘플의 항 말라리아 약효 판정 요법 계수는, FM3A 세포에 대한 말라리아 원충의 샘플의 EC₅₀값의 비(selectivity, 식 참조)로부터 평가한다. 약효 판정 요법 계수가 1 이상인 경우엔 이 샘플의 항 말라리아 효과가 세포독성보다 강하다는 것을 나타내므로, 새로운 말라리아 치료약의 후보로 판정한다.

약효 판정 요법 계수 =

(마우스 FM3A 세포에 대한 샘플의 EC₅₀ 값) / (열대열 말라리아 원충에 대한 샘플의 EC₅₀ 값)

실험결과 및 고찰

Table 2는 18종의 메탄올 분획으로 추출했으며, 이상의 결과로 추출물을 열대열 말라리아 원충을 이용한 항 말라리아 효과와 FM3A 세포주를 이용하여 세포독성을 검사한 결과, Table 2와 같이 4종의 한약제 메탄올추출물에서 강한 말라리아 증식저해효과를 나타내었다. 이들의 말라리아 원충에 대한 EC₅₀는 2.1-21μg/ml의 농도에서 강한 항 말라리아 효과를 나타내었다. 특히, 2종의 오수유와 산장근뿌리 메탄올추출물은 세포독성이 약하면서 말라리아 원충을 선택적으로 증식을 억제하였다(선택독성이 7이상). 그러나 14종류의 한약제 메탄올추출물에서는 항 말라리아 효과를 보이지 않았다.

Table 2. In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of eighteen herbal medicines.

| 번호 | 학명 | P. falciparum EC ₅₀ (ug/ml) | FM3A EC ₅₀ (ug/ml) | Selectivity |
|----|-------------------------------------|--|-------------------------------|-------------|
| 1 | <i>Picrasmae Lignum</i> | 20 | 32 | 2 |
| 2 | <i>Pulsatillae Radix</i> | 100.0 | 27.5 | |
| 3 | <i>Lonicerae Flos</i> | 50 | 15 | |
| 4 | <i>Rheum undulati Rhizoma</i> | 21.0 | 19 | 1 |
| 5 | <i>Saussureae Radix</i> | 35 | 19 | |
| 6 | <i>Gentiana scabrae Radix</i> | 110.0 | 17.8 | |
| 7 | <i>Forsythiae Fructus</i> | 40 | 1.8 | |
| 8 | <i>Physalii Radix</i> | 2.8 | 20 | 7 |
| 9 | <i>Artemisiae asiaticae Herba</i> | 100 | 22 | |
| 10 | <i>Plantaginis Herba</i> | 99.0 | 0.9 | |
| 11 | <i>Artemisiae iwayomogii Herba</i> | 85.0 | 22 | |
| 12 | <i>Evodiae Fructus</i> | 4.1 | 32 | 8 |
| 13 | <i>Dalbergiae odoriferae Lignum</i> | 11.0 | 1.7 | |
| 14 | <i>Meliae Fructus</i> | 110 | 0.4 | |
| 15 | <i>Meliae Cortex</i> | 105.0 | 0.2 | |
| 16 | <i>Stemona Radix</i> | 105 | 106.5 | |
| 17 | <i>Santalini Lignum rubrum</i> | 30.0 | 10 | |

a : Selectivity refers to the ratio of the EC₅₀ value for the FM3A cells and the the EC₅₀ value for P. falciparum. b : The value in parenthesis shows the growth inhibition(%) of each dose.

오수유는 [중약대사전]에 의하면, 운향과의 낙엽 소교목이며, 한방에서는 9월경에 녹갈색의 미숙과를 채취하여 말린 것을 오수(吳棗) 또는 오수유라고 하며, 건위·구충(驅蟲)·해독(解毒) 및 이뇨제(利尿劑)로 사용하여 왔다. 오수유의 성분으로는 열매에 정유 약 2%가 있다. 정유의 주성분은 에보넨, 알칼로이드인 에보디아민, 히드록시에보디아민, 루테카르핀, 쓴맛물질인 리모딘(에보넨), 에보놀이 있고 기름 25%의 주성분은 오수유산이다. 이번 실험에서는 오수유의 메탄올 추출물이 항말라리아효과가 있는 것으로 나타났으며 향후 자세한 실험이 더 필요할것으로 여겨진다.

산장근은 가지과의 다년초로, 열매는 장과(漿果)로 둥글고 지름이 1.5 cm 정도로 빨갭게 익어야 먹을 수 있다. 이 열매를 '산장근'이라고 하는데, 생약에서 전체를 말린 것을 산장(酸漿)이라 하며 해열약으로 쓴다. 이의 효능으로 뿌리와 열매를 기생충구제, 해열, 통경, 안질, 임파선염, 거풍, 황달, 난산, 진통, 해독, 간염, 간경화, 자궁염, 이뇨, 조경 등이 있다. 산장근에 관해서도 [중약대사전]에 확실히 치료를 위해 천연식물 자체를 열탕해서 마시면 해열 효과가 있는 것으로 보고 되어 있어, 이번 결과는 [중약대사전]에 기록된 내용과 일치된다고 보아진다. 그러나, 항 말라리아 활성물질에 관해서 아직까지 아무런 보고가 없었으며, 이런 의미에서 이번 실험결과는 큰 의미를 가진다고 하겠다. 앞으로 오수유 및 산장근의 항 말라리아 활성을 나타내는 분획을 더 정제하고 활성물질을 규명하여 억제내성에 효과가 있는 새로운 말라리아 치료제 개발에 힘써야 할 것이다.

결 론

본 연구는 학질과 해열 치료에 사용되고 있는 18종의 한약재를 메탄올로 추출하여, *Plasmodium falciparum*(FCR-3 strain, ATCC 30932)에 대한 항 말라리아 효능과 마우스 위암 유래 FM3A 세포의 야생주인 F28-7주에 대한 세포독성을 연구하였다. 이에 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다. 항 말라리아 약제를 개발하기 위하여, 한약재 18종을 분획한 결과, 크로로퀸 내성 열대열 말라리아의 성장을 억제하는 4종의 한약제를 얻었으며, 이의 EC₅₀의 농도는 2.8-21 μ g/ml이었다. 특히 오수유의 메탄올 추출은 4.1 μ g/ml에서 EC₅₀의 항 말라리아 효과를 나타냈으며, 한약제에서 제일 강한 항 말라리아 활성을 보였다. 이번 보고서는 한약제에서 강한 항 말라리아 효과가 있는 물질을 찾은 경우이다.

산장근의 메탄올 추출은 2.8 μ g/ml에서 EC₅₀의 항 말라리아 효과를 나타냈으며, 한약제에서 강한 항 말라리아 활성을 보였다. 이것 역시 한약제에서 강한 항 말라리아 효과가 있는 물질을 찾은 경우이다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

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. Hur J. 'Dong-yi-bo-gam', 613~623, China Traditional Chinese Medicine Press, 1st ed., Beijing, China, 1995.
5. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 대성문화사. 1992.
6. Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675, 1976.
7. Kim, H-S.; Miyake, H.; Arai, M.; Wataya, Y.; A potent antimalaria activity of 5-fluoroorotate in combination with sulfamonomethoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in mice. Parasitol. Int 47,59-67, 1998.
8. 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.
9. 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.
10. [중약대사전] , 3270, 상해과학출판사, 일본 소화사 편, 1986.