한약제 진피의 항 톡소포자충 효과 확인

김혜경 · 강경화 · 이동환[1] · 김혜숙[2] · 박 현*

원광대학교 의과대학 인수공통감염병연구센터 및 감염생물학교실, 1 : 전북대학교 공과대학 기계항공시스템 공학부,
2 : 오까야마대학교 약학대학 의약품정보학교실

Anti-Toxoplasmosis Effect of *Citrus Unshiu* Markovich against *Toxoplasma Gondii*

Hye Kung Kim, Jing Hua Jiang, Dong Hwan Lee[1], Hye Sook Kim[2], Hyun Park*

Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, Wonkwang University School of Medicine,
1 : College of Engineering, Jeonbuk National University, 2 : Faculty of Pharmaceuticalsciences, Okayama University

*Toxoplasma gondii*is a widespread apicomplexan parasite which is able to infect virtually all warm-blooded vertebrates. Twenty-two percent of the U.S. population is infected, but severe disease in adults is mainly limited to immunosuppressed patients. In patients with acquired immunodeficiency syndrome(AIDS), *T. gondii* causes a life-threatening opportunistic infection, with Toxoplasma encephalitis as its most severe manifestations. *T. gondii* is also known to cause congenital infection and is among the pathogens with the highest incidence of complications in pregnancies. Despite its clinical importance, only very few therapeutic drugs against *T. gondii* are available, all of which target the rapidly dividing tachyzoites, leaving the dormant encysted bradyzoite stage unaffected. We searched 15 traditional medicines that have anti-inflammatory effect from dongyibogam and Traditional Chinese medicine. *In vitro* studies were performed with HeLa cell cultures, with quantification of *Toxoplasma* growth by a cell proliferation assay. The result of experiment shows the selectivity of *Citrus unshiu Markovich* is 6.0. This is higher than sulfadiazine (selectivity was 1.63). For in vivo studies, mice were acutely infected intraperitoneally with 10^5 tachyzoites of the virulent RH strain and then treated per orally for 4 days from 6 hours postinfection. Efficacy was assessed by sequential determination of parasite burdens in peritoneal cavity. *In vivo*, *Citrus unshiu Markovich*e inhibited *Toxoplasma* growth at a concentration of 10㎎/㎏ of body weight per day, the inhibition ratio was estimated to be 64.01%.

Key words : *Citrus unshiu Markovich, Toxoplasma gondii*, Traditional herb medicine, *in vitro, in vivo*

서 론

톡소포자충은 콕시디아아강(coccidia亞綱, *subclass of coccidia*)에 속하는 첨복포자충이다. 세포 내에 기생하는 원충류인 톡소플라즈마(*Toxoplasma gondii*)는 전 세계적으로 분포하는 인체 및 동물 톡소플라즈마증(toxoplasmosis)의 원인 원충으로서 니콜[1] 및 만시앙에 의하여 발견되었고 허치슨[2] 프랭크[3]에 의하여 생활사가 밝혀졌으며, 우리나라에서는 1965년 돼지에서 분리되었다.

톡소포자충의 수평전이는 환경으로부터 감염된 접합자(oocysts)를 섭취하거나 다른 동물들의 내장이나 고기에 포함되어 있는 조직포낭(tissue cyst: bradyzoite)나 영양형(tachyzoite)를 섭취하는 세가지 생활주기를 포함한다. 전이는 혈액제품, 조직 이식, 저온 살균하지 않은 우유를 통해 일어난다[4].

미국에서 최근 급성 톡소포자충이 인간에게서 일어나는 것은 환경으로부터 오염된 접합자(oocyst)과 관련이 있다[5].

반면에, 한국에서의 발병은 조리하지 않은 돼지고기를 먹는 것과 관련이 있다[6].

톡소포자충은 임신에 의한 선천성 감염의 중요한 원인중의 하나이다[7]. 또한 후천성면역결핍증후군(AIDS) 환자에서 톡소포자충은 톡소포자충성 뇌염을 일으키고 생존율을 감소시킨다[8,9]. 이러한 임상적인 중요성이 있음에도 불구하고 지금까지 항톡소포자충제로 사용되는 설파제나 피리메타민(pyrimethamine)등에

* 교신저자 : 박 현, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학
· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6768
· 접수 : 2008/01/03 · 채택 : 2008/01/17

내성은 계속 증가하고 있고 브라디조이트(bradyzoite) 단계의 톡소포자충에 대하여는 별로 효과가 없다. 이렇게 감염되는 톡소포자충의 치료 적응증을 살펴보면 정상 숙주에서 중추신경계, 심장, 간에 퍼져있을 때 pyrimethamine과 sulphonamide를 사용하며, 임신 중에 감염되었을 때는 Spiramycin(태아의 감염이 확인되면 때 pyrimethamine과 sulphonamide), 선천적 톡소포자충에는 때 pyrimethamine과 sulphonamide, 안구 톡소포자충에는 때 pyrimethamine과 sulphonamide과 스테로이드, 후천적 면역결핍증과 장기이식, 급성 질환에는 때 pyrimethamine과 sulphonamide를 사용해야 한다[10]. 이와 같이 단일 약제가 없고, 그래서 2가지 이상의 화합물의 복합에 의하여 치료한다. 그리하여 내성기전을 이해하고 내성을 일으키지 않는 구조의 신종 항톡소포자충제의 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, 천연 약물을 이용한다면 충분히 이런 문제를 해결할 수 있으리라 예상된다. 그 이유는 천연물은 현재까지 알려지지 않은 새로운 성분이며, 개개의 작용이 다양한 단일성분의 혼합물이므로, 복합물상호간의 약리 작용으로 내성 등의 부작용을 감소할 것이라고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 항톡소포자충 효과가 있는 한약제을 파악 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 톡소포자충의 유지

본 실험에 사용된 톡소포자충(RH strain of *Toxoplasma gondii*, ATCC, No.50174)의 영양형(tachyzoite)은 KP100 CD-1 암컷 마우스(female mouse)에서 얻었다. 1× 10^5개의 톡소포자충의 영양형을 4주령 KP100 CD-1 암컷 마우스 복강에 주입한 뒤, 4일 후 마우스를 경추탈골 사망시켰다. 그리고 2%의 FBS(GIBCO, Lot No. 1315128)를 함유한 RPMI 1640 media(GIBCO, Lot No. 1346255) 5 ㎖을 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지 해주었다. 다시 복수액을 10 ㎖짜리 주사기로 전부 뽑아내고 500RPM에서 5분간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상등액은 새로운 50 ㎖ tube에 옮겨서 500RPM에서 5분간 원심분리 하였다. 이렇게 얻은 상등액은 새로운 50 ㎖ tube에 옮겨서 2400RPM에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리법으로 얻은 비교적 순수한 톡소포자충의 영양형은 10%의 FBS를 함유한 RPMI 1640배지에 재부유시키고 4℃에서 5 내지 6일간 보관하였다. 이중 일부는 생체 내(in vivo) 및 실험관 내(in vitro) 실험에 사용하고 일부는 또 다시 새로운 KP100 CD-1 마우스에 주입하여 유지하였다[11].

본 실험에서는 동의보감과 중의약대사전에서 전통적으로 항기생충 약재나 항 염증에 사용되는 15가지의 한약재를 선정하였으며 원광대학교 대학한약국에서 구입하여(Table 1) 약재 각각 15 g에 1000 ml의 증류수를 넣고 15 ml이 될 때까지 끓였다. 끓인 액을 거즈 두 겹으로 걸러서 동결 건조시켰다. 동결 건조시킨 전승약물을 녹여서 여러 농도로 만든 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Name of traditional herbs

Korean name	Herbal nomenclature
빈랑자(檳榔子)	*Arecae semen*
고련피(苦楝皮)	*Melia azedarach L*
대황(大荒)	*Rheum undulatum L.s*
백두옹(白頭翁)	*Pulsatilla koreana Nakai*
석창포(石菖蒲)	*Acorus gramineus*
고삼(苦蔘)	*Sophora flavescens*
관중(貫衆)	*Dryopteris crassirhizoma*
진피(陳皮)	*Citrus unshiu Markovich*
감초(甘草)	*Glycyrrhiza glaba L.*
마치현(馬齒莧)	*Portulaca oleracea L*
오미자(五味子)	*Schisandra chinensis Baillon*
당귀(當歸)	*Angelica gigas*
상기생(桑寄生)	*Loranthi Ramulus*
갈근(葛根)	*Puerariae Radix*
천초(茜草)	*Rubia akane Nakai*

2. 시험관 내 실험

HeLa 세포(한국세포주은행, 10002)는 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃의 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 96 웰에 6×10^3/㎖ 되게 접종하고, 37℃의 5% CO_2 배양기에서 배양한다. 6시간 후, 2%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 교환하고 그로부터 18시간 후, 2%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 교환 및 톡소포자충의 영양형을 HeLa 세포수의 5배 되게 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 뒤, 배지를 교환함과 동시에 전승약물을 농도 별로 처리하였다. 이때 대조군으로서 술파디아제(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S-3549, Germany)을 사용하였다. 24시간 뒤, 세포증식분석(cell titer 96® AQueous one solution cell proliferation assay(PROMEGA, Lot No.: 22257902))을 실시하고 1시간 30분 후, 흡광광도계로 490 ㎚에서 흡광도(absorbance)를 측정하여 시그모이달 커브(sigmoidal curve)를 작성한 후, 톡소포자충의 증식을 억제하는 농도(EC50 50% 세포증식억제농도)를 산출하였고, 하기 수학식 1을 이용하여 약효판정계수는 선택성(selectivity, 수학식 1)을 이용하여 구하였다[12].

【수학식 1】

$$\text{선택성(selectivity)} = \frac{\text{HeLa 세포에 대한 각 시료의 EC50값}}{\textit{T.gondii}\text{에 대한 각 시료의 EC50값}}$$

3. 생체 내 실험(4days suppressive test)

톡소포자충의 영양형 1× 10^5개를 4주령 KP100 CD-1 암컷 마우스 복강에 주입하였다(day 0). 주입 2시간 후부터 진피(Citrus unshiu Markovich)을 존대로 경구 투입하였다. 10 ㎎/㎏씩 연속 4일간 하루에 한 번씩 경구 투입하였다. 이때 양성대조군은[12] 술파디아제(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S-3549, Germany)을 투여한 그룹(50 ㎎/㎏, 양성대조군)인데 이들은 전부 2차 증류수에 녹여서 사용하였다. 4일째(day 4) 마우스를 경추탈골 사망시키고, 톡소포자충의 유지방법과 비슷한 방법으로 복강 내의 비교적 순수한 톡소포자충의 영양형을 모두 얻어 계량하였다[13].

결과 및 고찰

1. 선택성

선택성은 신약 개발을 위한 항약물 스크리닝에 사용하는 지표의 하나이다. 이 수치가 높으면 높을수록 의약품으로서 인체에 대한 안전성이 높아지는 것을 의미한다. HeLa세포에서 세포증식 분석(cell titer 96® AQueous one solution cell proliferation assay)을 실시하여 전승약물의 선택성을 산출하였다.

본 실험에서는 총 15종의 전승약물로 시험관 내에서 선택성을 구하였다.

가장 낮은 선택성을 나타낸 한약재는 0.2의 고련피이고 그 다음은 0.5의 빈랑자이며 그 다음으로는 0.8의 선택성을 나타낸 대황, 백두옹, 관종, 당귀이며 0.9의 선택성을 나타낸 것으로는 석창포, 고삼, 감초, 마치현, 상심자, 갈근이다. 현재 치료 약제로 쓰이고 있으며 이번 실험에서 대조군인 설파디아제은 1.29의 선택성을 보였다. 대조군보다 더 높은 선택성을 보인 한약재는 상기생(2.3), 진피(6.0)로 현재 치료 약제인 스피라마이신(spiramycin)보다 인체에 대한 더 높은 안전성을 나타내었다. 이 15종의 전승약물 중에서 진피(*Citrus unshiu Markovich*)가 가장 높은 선택성 6.0을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Selectivity of traditional herbs

Herbs	HeLa cell EC50 (μg/ml)	*T. gondii* EC50 (μg/ml)	Selectivity
Arecae semen	172	324	0.5
Melia azedarach L	162	678	0.2
Rheum undulatum L.s	158	187	0.8
Pulsatilla koreana Nakai	151	180	0.8
Acorus gramineus	1.759	2.085	0.9
Sophora flavescens	160	188	0.9
Dryopteris crassirhizoma	172	209	0.8
Citrus unshiu Markovich	2.303	387	6.0
Glycyrrhiza glaba L.	210	241	0.9
Portulaca oleracea L	1.991	2.297	0.9
Schisandra chinensis Baillon	1.937	2.335	0.8
Angelica gigas Nakai	1.719	1.991	0.9
Loranthi Ramulus	3.5	1.5	2.3
Puerariae Radix	3.2	3.6	0.9
Rubia akane Nakai	1.8	1.8	1.0
Sulfadiazine	2093.28	1624.04	1.29

2. 생체 내 실험

시험관 내에서 얻은 결과에서 진피(Citrus unshiu Markovich)은 술파디아제의 약 네 배의 선택성을 보였다. 높은 선택성을 바탕으로 생체 내에서의 항톡소포자충 효과를 확인하기 위하여 마우스를 사용하여 4일간 억제실험을 진행하였다. 진피(Citrus unshiu Markovich)을 4주령 된 KP100 CD-1 암컷 마우스에 0.1, 1, 10 ㎎/㎏씩을 각각 연속 4일간 하루에 한 번씩 경구 투여하였다. 복강내의 톡소포자충의 영양형을 모두 얻어 계량해 보았더니 진피0.1, 1, 10 mg에서 각각 45.46%, 56.37%, 64.01%의 억제율을 보였다. 이는 술파디아제만 투여한 그룹(93.17%)보다는 낮은 억제율이었다(Fig. 1).

이러한 결과로, 진피(*Citrus unshiu Markovich*)로부터 미래의 톡소포자충 치료에 한약재 사용의 의미를 되짚어 볼 수 있으며 치료에 효과가 있는 성분을 분리 증명하여 인체에 더욱 안전하고 효과적인 약제의 개발이라는 과제를 안겨주었다.

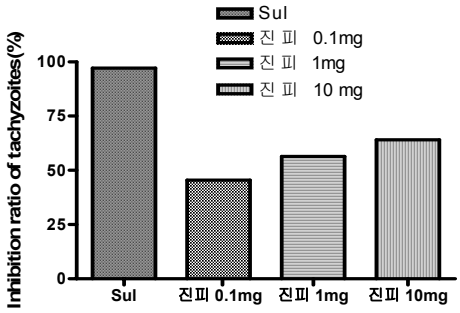

Fig. 1. Inhibition ratio of tachyzoites of *T. gondii* in mouse peritoneal cavity. ＊: *T.gondii* (1×10^5) infected by peritoneal cavity. Sul.: Positive control, Sulfadiazine group: ＊ and from after 2hours given sulfadiazine sodium salt(50㎎/㎏) orally, once a day; Natural drug groups: ＊ and after 2hours given orally, once a day.

결 론

현재 톡소포자충의 치료로 사용되고 있는 설파다이아진(Sulfadiazine sodium salt)의 선택성 1.29보다 높은 6.0의 선택성을 가진 진피를 기초로 향후 톡소포자충 치료에 효과가 있는 compound를 분리하여 증명함이 필요하며 새로운 약제의 개발을 기대해 볼 수 있겠다.

감사의 글

이논문은 2007년도 원광대학교 교비 지원에 의해 연구됨.

참고문헌

1. Nicolle, M.M.C., Manceaux, L. Sun un protozoaire nouveau du gondi(Toxoplasma n. sp.), Arch Inst Pastrur Tunis. 2: 97, 1909.
2. Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K. Life cycle of Toxoplasma gondii. In: Br Med, 1969.
3. Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenke, J.K. Toxoplasma gondii life ctcle in cats. In: J Am Vet Med Assoc. 157(11):1767-1770, 1970.
4. Montoya, J.G., Liesenfeld, L. Toxoplasmosis, Lancet, 363(12):1965-1976, 2004.
5. Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. Toxoplasma gondii: from animals to humans. International Journal for Parasitology. 30: 1217-1258, 2000.
6. Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H. et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. Journal of Infectious Diseases. 175: 1280-1282, 1997.
7. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A. Structures of

Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews. 11: 267-269, 1998.

8. Luft, B.J., Remington, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. In: Clin Infect Dis. 1992.
9. Petersen, E. Toxoplasmosis. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. 12: 214-223, 2007.
10. Abdin, M.Z., Israr, M., Rehman, R.U., Jain, S.K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production, Plasta Med. 69(4):289-299, 2003.
11. 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.
12. Park, H., Kim, M.S., Jeon, B.H., Kim, T.K., Kim, Y.M., Ahnn, J.H., Kwon, D.Y., Takaya, Y., Wataya, Y., Kim, H.S. Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea, Biol Pham Bull. 26(11):1623-1624, 2003.
13. 崔鎭瑞, 鄭坪林, 蘇鎭琸. Pyrimethamine이 [톡소프라스마]증에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. Yonsei journal of medical science, 18(1):340-354, 1985.