열대열 말라리아에 대한 상피목 및 죽과의 항 말라리아의 효과

박 현 · 김명수[1] · 전병훈[2] · 이존화[3] · Yoshiaki Takaya[4] · Yusuke Wataya[5] · 김혜숙[5*]

원광대학교 의과대학 기생충학교실, 1 : 한국과학기술 연구원 생체과학부, 2 : 원광대학교 한의과대학 병리학교실
3 : 전북대학교 수의과대학 공중보건학실, 4 : 메이조대학교 약학대학, 5 : 오까야마대학교 약학대학 의약품 정보학교실

In vitro Antimalarial Effect of Bamboo Family Aganist *P. falciparum*

Hyun Park, Myung Soo Kim[1], Byung Hun Jeon[2], John Hwa Lee[3], Yoshiaki Takaya[4], Yusuke Wataya[5], Hye Sook Kim[5*]

Department of Parasitolgy, College of Medicine, Wonkwang University, 1 : Life Sciencees Division, Korea Institute of Science and Technology, 2 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 3 : College of Veterinary Medicine4, Chonbuk National University 4 : Faculty of Pharmacy, Meijo University, Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya, Japan, 5 : Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima Okayama, Japan

Among extracts prepared from Alstonia scholaris, Phyllostachys pubescens and Bambusa veitchii, methanol fraction of Alstonia scholaris was found to have antiplasmodial effect by inhibiting growth of the chloroquine-resistant Plasmodium falciparum strain FCR-3 with less than 14 μg/ml of EC50 values. Methanol fraction 2 of Alstonia scholaris revealed the strongest antiplasmodial effect with 40 μg/ml of EC50 value. Especially, this fraction showed higher than 3-folds selective toxicity on a Plasmodium as the EC value was 116 μg/ml on the host FM3A cell. This is the first report on which an extract compound from Alstonia scholaris showed antimalarial effect.

Key words : Plasmodium falciparum, Alstonia scholaris, antiplasmodial effect

서 론

최근 들어 새로이 발생되는것과 재유행되는 감염증이 세계규모로 문제가 되고 있으며, 그 중에서도 특히 말라리아가 맹위를 떨치고 있다[1,2]. 말라리아는 국내에서 1984년 2예가 발생한 이후, 1예도 보고된바 없어, 국내 말라리아는 소멸되었다고 보아져 왔다. 그러나, 1993년도부터 휴전선 부근에서 말라리아 환자가 발견 보고된 이래로 매년 약 3000명 가량의 환자 발생 보고가 있다[3]. 또한 최근의 국제 사회의 일일화 및 환경변화에 의해 토착 말라리아가 아닌 수입성 말라리아가 국내에 유입될 가능성이 높아졌으며, 매개모기인 Anopheles 족 모기가 국내에서 서식하고 있어 수입성 말라리아에 의한 말라리아가 재유행 할 가능성이 크다고 보아진다. 국내에서 유행했던 토착 말라리아는 삼일열 말라리아로, 이 말라리아에 감염되어도 인명엔 문제가 없으나, 수입성 말라리아가 들어옴으로 인해서 악성 말라리아인 열대열 말라리아의 유행을 고려하지 않을 수 없다. 열대열 말라리아는 발병시 말라리아 약물로 즉시 치료를 하지 않으면 생명을 빼앗는 위험한 말라리아이다. 현재 말라리아 치료제로 이용되고 있는 약제는 7종류(Chloroquine, quinine, mefloquine, pyrimethamine, artemisinin, atovaquone, halofantrine)가 있으나, Pyrimethamine 과 Atovaquone 을 제외하곤 나의 치료약은 작용기전이 아직까지 밝혀지지 않았지만 현재에도 약제로 말라리아 치료를 하고 있다. 그러나 최근에 약제내성 말라리아가 출현해 문제가 되고 있으며, 동남 아시아 전역에 걸쳐 아래 약제에 효과가 없는 다약제 내성 말라리아가 보고되어 있으며, 확산되고있는 추세이다[4]. 이런 현실을 감안하여 약제 내성 말라리아에 효과가 있는 새로운 말라리아 약물을 개발하는 것은 말라리아 치료 및 콘트롤의 측면에서 대단히 중요한 연구라고 생각한다. 말라리아에 효과가 있는 새로운 치료제를 개발하는 방법에는 분자표적을 정하지 않고 약효를 나타내는 화합물이나 천연물을 중심으로 후보 물질을 선별하는 방법, 기존 말라리아 약물 구조를 골격으로 하는 유도체 연구, 및 민간 요법에서 말라리아에 효과가 있다고 사용되어온 전통생약 중에서 항 말라리아 효과가 있는 활성분획을 정제해서 화합물의 구조결정 후, 대량 유기 합성방법을 개발하여 새로

* 교신저자 : 김혜숙, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima Okayama 700-8530, Japan
· E-mail : hskim@eagle.pharm.okayama-u.ac.jp · Tel : 81-86-251-7976
· 접수 : 2003/03/27 · 수정 : 2003/04/25 · 채택 : 2003/05/30

운 말라리아 약제 후보로 결정하는 방법으로 크게 나눌 수 있다.

본 연구에서는 민간 요법에서 말라리아치료에 효과가 있는 걸로 보고 된 전통생약, 상피목1종과 죽과 2종의 천연 생약을 실험재료로 이용해서 물과 메탄올 추출물의 항 말라리아 효과 및 세포독성을 조사한 결과, 항 말라리아 활성 분획을 검출하였고 이 결과를 보고 하고자한다.

재료 및 방법

1. 시료

상피목1종과 죽과2종 (Alstonia scholaris, Phyllostachys pubescens, Bambusa veitchii) ,총 3종을 이용해서,메탄올과 물로 하여 추출 분획을 얻었다.

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 O_2농도 5%, CO_2농도 5%, N2농도 90%, 온도는 37℃로 행했다. 적혈구 용적률 (적혈구 부유 액중에 차지한 적혈구의 체적의 비율)은 5%에서 이용했다. Trager와 Jensen의 방법을 변형시켜 사용하였다[5]. 24 well 배양 플레이트을 이용하여 배양하고, 배지는 매일 교환했다. 감염율은 박층도말 표본을 작성하고, 김자 염색 또는 Diff-Quik염색을 행한후, 광학현미경(유침, 1000x)을 이용해서, 말라리아 원충 감염율을 아래의 식으로 산출했다.

말라리아원중 감염율(%)={(감염 적혈구 수)/(총 적혈구 수)} x 100

3. 말라리아 원충 증식 저해 스크리닝 시험

배양한 말라리아 원충 감염 적혈구을 원심분리해서 모아, 혈청을 포함한 배지에서 세척한 후, 비감염 적혈구을 가하여, 말라리아 초기 감염율이 0.3%가 되도록 하였다. 이때의 적혈구 용적률은 3%가 되도록 하였다. 실험에 이용한 샘플은 멸균 수, 디메틸 설폭시드(DMSO)에 용해하고, 소정 농도의 샘플이라고 했다. 24 well 배양 플레이트에 샘플을 5ul/well 가했다. 샘플은 duplicate에 취했다. 컨트롤은 멸균수, DMSO를 5ul/well 가했다. 다음에, 미리 준비해 두었던 열대열 말라리아 원충 배양액을 995uL씩 가하여 현탁 시켰다. 배양 플레이트는 CO_2 CO_2 N_2(5%, 5%, 90%) 배양기에서 72시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 박층도말 Table본을 작성하고, 염색한 후, 현미경으로 관찰하고, 시료을 가한 것의 감염율 및 컨트롤의 감염율을 산출했다. 하나의 박층혈액도말당 총10,000개의 적혈구를 카운트했다. 상기로 구한 말라리아 원충 감염율로부터 다음식에 의하여 증식율을 산출하여, sigmoidal curve 를 작성한후, 말라리아원충에 대한 50% 증식 저해 농도(EC50%)를 구했다[6,7]

증식율(%)={([b]-[a])/([c]-[a])} x 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 F28-7주을 일본 암연구 자원은행(Japanese Cancer Research Resources Bank, JCRRB)으로부터 받아서 이용했다. 세포배양은 ES 배지에 비동화 한 송아지 혈청을 2%로 되도록 첨가하고, CO_2농도 5%, 37℃로 배양하였다. 이 조건하에서의 FM3A세포의 배가 시간은 약 12시간 이었다. 전 배양을 해서 대수 증식기에 들어갔던 세포를 5 x 10^4 cells/ml가 되도록 배지로 희석했다. 샘플은 말라리아 원충의 항 말라리아 활성 측정시 조제한 것을 이용했다. 24well 배양 플레이트에 샘플 용액을 5uL 씩 가했다(배양기등을 가한다면 최종 농도는 0.1 - 20ug/ml로 됐다). 샘플은 duplicate로 시행하였으며, 컨트롤으로서 멸균수, DMSO를 5uL가한 24well도 동시에 준비했다. 다음에, 준비해 두었던 배양 세포 부유액을 995uL씩 가하고, 배양액이 균일해지도록 조용히 현탁 하였다. 48시간 배양한 후, 각각의 well에 관하여 세포수을 셀 카운터(CC- 130, Toa Medical Electrics, Japan)로 계수하고, 하기식으로부터 증식율을 산출했다[8].

증식 율(%)={([C]-[A])/([B]-[A])} x 100

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

세포 증식 저해 활성은, 샘플을 첨가한 24well의 세포수 및 컨트롤의 세포수로부터 산출했다. 이것에의해, 샘플의 세포 독성을 평가하고, 50%세포증식을 억제하는 농도 (EC50)를 sigmoidal curve 를 작성해서 산출했다. EC50값이란 말라리아 원충, 또는 FM3A 세포의 배양기에 샘플을 첨가하고 있지 않은 컨트롤의 증식율, 또는 말라리아 원충 감염율을 100%로 하여, 샘플 첨가에 의하고 컨트롤의 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 강하다는것을 나타내므로, 새로운 말라리아 치료약의 후보로 판정한다.

$$\text{약효 판정 요법 계수} = \frac{\text{(마우스 FM3A 세포에 대한 샘플의 EC50 값)}}{\text{(열대열 말라리아 원충에 대한 샘플의 EC50값}}$$

결과 및 고찰

Table 1은 상피목 과 죽 추출물을 표시했다. 상피목은 3종의 메탄올 분획 과 물분획 으로 추출했으며, 죽과 는 2종을 각각 물로 추출해서 실험에 이용했다. 이상의 결과로, 상피목과 죽 추출물을 열대열 말라리아 원충을 이용한 항 말라리아 효과와 FM3A 세포주을 이용하여 세포독성을 검사한 결과, Table 2와 같이 2종의 상피목 메탄올추출물에서 강한 말라리아 증식 저해효과를 나타냈다. 이들의 말라리아 원충에 대한 EC50는 14와 40ug/ml의 농도에서 강한 항 말라리아 효과를 나타냈다. 특히, 1종의 상피목 메탄올추출물은 세포독성이 약하면서 말라리아 원충을 선택적으로 증식을 억제하였다(선택독성이 3이상). 그러나 2종류의 죽의 물추출물 및, 상피목의 메탄올과 물

추출물에서는 100ug/ml의 농도에서도 항 말라리아 효과를 보이지 않았다.

Table 1. Extracts of Bamboo family used in the experiment

ID	Compound	Family name (Natural products)	Extract condition
1	Sho-396	*Alstonia scholaris*	$MeOH_1$
2	Sho-397	*A. scholaris*	$MeOH_2$
3	Sho-398	*A. scholaris*	H_2O
4	Sho-399	*A. scholaris*	$MeOH_3$
5	Sho-400	*Phyllostachys pubescens*	D/W
6	Sho-401	*Bambusa veitchii*	D/W

Table 2. Antimalarial and cytotoxic effects of Bamboo family extracts

ID	Compound	Family name (Natural products)	% growth at final conc	P. falciparum EC_{50} (ug/ml)	FM3A EC_{50} (ug/ml)	Selectivity
1	Sho-396	*Alstonia scholaris*		14	〉20.6(74%)[b]	〉1
2	Sho-397	*A. scholaris*		40	〉115.6(84)[b]	〉3
3	Sho-398	*A. scholaris*	88[a]		〉67.65(98%)[b]	
4	Sho-399	*A. scholaris*	75[a]		〉55.5(81%)[b]	
5	Sho-400	*Phyllostachys pubescens*	99[a]		〉50.1(91%)[b]	
6	Sho-401	*Sasa veitchii*	77[a]		〉38.65(94%)[b]	

a:The value shows growth rate at 39-68ug/ml, b:The value parenthesis shows the growth rate n each dose

죽과의 식물은 [중약대사전]에 의하면, 물추출물이 해열작용 및 항 말리리아 효과를 나타낸다고 보고 되어있다[9]. 죽과 물추출물중에는 다당류가 많이 포함되어 있는 것으로 보고 되고 있으나, 이번 실험에서 사윤물 추출물의 항 말라리아 효과는 적거나 거의 없었다. 이 결과에서 죽에 포함된 다당류에는 항 말라리아 활성이 없는 것으로 여겨지나, 향후, 자세한 실험이 더 필요할 것으로 여겨진다. 상피목에 관해서도 [중약대사전]에 말라리아 치료를 위해 천연식물 자체를 열탕해서 마시면 해열 효과가 있는 것으로 보고되어 있어, 이번 결과는 [중약대사전]에 기록된 내용과 일치된다고 보아진다. 그러나, 항 말라리아 활성 물질에 관해서 아직까지 아무런 보고가 없었으며, 이런 의미에서 이번 실험결과는 큰 의미를 가진다고 하겠다. 앞으로 상피목의 항 말라리아 활성을 나타내는 분획을 더 정제하여 활성물질을 규명해서 약제내성에 효과가 있는 새로운 말라리아 치료제 개발에 힘써야 할 것이다.

결 론

상피목 1종 및 죽과에 속하는 2종의 물과 메탄올 분획을 이용해서 항 말라리아 활성을 측정한 결과, 클로로퀸 내성 열대열 말라리아의 성장을 억제하는 상피목 메탄올 분획을 발견했다. 이 식물의 EC50의 농도는 14ug/ml이었다. 특히, 상피목 메탄올 분획2는 말라리아 원충에 대한 EC50는40ug/ml이었으나, 숙주세포인 FM3A 세포에 대한 EC50는 116ug/ml 이상으로, 말라리아 원충에 3배 이상의 선택독성을 나타내었다. 이번 실험결과는 상피목에서 항 말라리아 효과가 있는 물질을 찾은 첫번째 경우이다.

참고문헌

1. World Health Organization: The World Health Report 2001. Mental health: New understanding, new hope. World Health Organization, Geneva, 2001.
2. Butler, D.; Maurice, J. O?rien, C. Time to Put Malaria Control on the Global Agenda. Nature 386, 535?41, 1997.
3. 국립보건원 보고. 2000년 한국의 말라리아 상황. 월간 질병 보고서 11:102-104, 2000.
4. Winstanley PA. Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and prospects. Parasitol Today 16: 146-153, 2000.
5. Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675, 1976.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. [중약대사전] , 3270, 상해과학출판사, 일본 소학사 편,1986년.