

개똥쑥에서 분리 확인된 endoperoxide ring 구조를 갖는 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxa-bicyclo[3.2.2]nonane의 항톡소포자충 효과

강경화 · 김화경 · 김혜숙¹ · 카마타² · 와타야¹ · 박 현*

원광대학교 의과대학 인수공통감염병연구센터 및 감염생물학교실,
1: 오카야마대학교 약학대학 의약품정보학교실, 2: 니이가타대학교 교육인간 과학대학 자연정보강좌

1, 5 - bis (4 - methoxyphenyls) - 6, 7 - Dioxa-bicyclo [3.2.2] nonane's Anti-toxoplasmosis Effect that was Separated in Artemisin annula

Jing Hua Jiang, Hwa Kyoung Kim, Hye Sook Kim¹, Masaki Kamata², Yusuke Wataya¹, Hyun Park*

Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, Wonkwang University School of Medicine,
1: Faculty of Pharmaceuticalsciences, Okayama University,
2: Faculty of Education and Human Sciences Mathematical and Natural Sciences, Niigata University

The Chinese medicinal plant *Artemisia annua* is the source of the antimalarial compound artemisinin. By the way, *Artemisin annula* was known have endoperoxide ring structure is included and has anti-malarial effect. Malaria and *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is belong to Apicomplexa genera. So, confirmed whether we go compound 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxa-bicyclo[3.2.2]nonane that have endoperoxide ring structure and there is anti-toxoplasmosis effect. The efficacy of 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxa-bicyclo[3.2.2]nonane alone was examined *in vitro* and in a murine model of acute toxoplasmosis. *In vitro* studies were performed with HeLa cell cultures, with quantification of *Toxoplasma* growth by a cell proliferation assay. Selectivity of 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxa-bicyclo[3.2.2]nonane was 4.9 *in vitro* cell proliferation assay, this is higher than sulfadiazine (selectivity was 1.63). For *in vivo* studies, mice were acutely infected intraperitoneally with 10⁵ tachyzoites of the virulent RH strain and then treated perorally for 4 days from 6 hours postinfection. Efficacy was assessed by sequential determination of parasite burdens in peritoneal cavity. *In vivo*, 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxa-bicyclo[3.2.2]nonane inhibited *Toxoplasma* growth at a concentration of 150mg/kg of body weight per day, the inhibition ratio was estimated to be 85.72%.

Key words : *Artemisia annua*, *Toxoplasma gondii*, endoperoxide, *in vitro*, *in vivo*

서 론

콕시디움(coccidium)에 의해 일어나는 콕시디움증(coccidiosis)은 현재 소, 양, 토끼, 가금에 문제를 일으키는 원충성 질병 중 대표적인 질병으로서 특히 가금에 치명적인 손상을 유발한다. 콕시디움증은 치료 및 예방제로서 항생제를 주로 사용하여 왔으나 치료 효율이 비교적 낮고 항생제 내성균이 출현하였으며, 잔류독성

문제도 발생하였다. 최근 1998년도에 말라리아 및 크립토스포리디움에 대한 전체 유전자가 밝혀졌고 그 결과 미생물과는 많은 다른 특이구조가 존재한다는 것이 알려졌다. 따라서 이러한 원충의 성장, 분열 등에 대한 생물학 정보와 게놈 시퀀스(genome sequence)를 이용하여 침복포자충류에 맞는 약제 개발이 세계 각국에서 시도되고 있다^{1,2)}. 톡소포자충은 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 만시양³⁾에 의하여 발견되었고 허치슨⁴⁾ 프

* 교신저자 : 박 현, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학
· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6768
· 접수 : 2007/01/08 · 수정 : 2007/01/24 · 채택 : 2007/02/05

랭클⁵⁾에 의하여 생활사가 밝혀졌으며, 우리나라에서는 1965년 패지에서 분리되었다. 톡소포자충은 임신에 의한 선천성감염의 중요한 원인중의 하나이다^{6,7)}. 또한 후천성면역결핍증(AIDS) 환자에서 톡소포자충은 톡소포자충성뇌염을 일으키고 생존율을 감소시킨다⁸⁾. 이러한 임상적인 중요성이 있음에도 불구하고 지금까지 항톡소포자충제로 사용되는 설파제나 피리메타민(pyrimethamine) 등에 내성은 계속 증가하고 있고 브라디조이트(bradyzoite) 단계의 톡소포자충에 대하여는 별로 효과가 없다. 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, 천연물물을 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.

개똥쑥(*Artemisia annua*)은 국화과의 한해살이 풀로서 동의보감이나 중의약대사전에 의하면 항말라리아 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있다. 1971년 개똥쑥에서 분리한 물질 endoperoxide ring 구조를 가진 알테미시닌 계열의 화합물이 항말라리아 효과가 있어 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다⁹⁾. 하지만 개똥쑥에서 많은양의 endoperoxide ring 구조를 가진 물질을 얻어서 그대로 사용하는 것은 개똥쑥 자체의 endoperoxide ring 구조화합물의 함유율이 높지 않아 생산에 어려움을 겪고 있으며, 따라서 이 구조를 바탕으로 새로운 화합물을 합성하여 연구에 사용하고 있다¹⁰⁾.

말라리아와 톡소포자충은 같은 접록포자충류에 속하며 유사한 형태와 기능을 갖추고 있다. 본 연구에서는 개똥쑥의 활성필수 구조인 endoperoxide ring 구조를 중심으로 항톡소포자충 효과를 검토했다.

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 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) 5ml를 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지 해준다. 다시 복수액을 10ml짜리 주사기로 전부 뽑아내고 500RPM에서 5분간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상등액은 새로운 50ml tube에 옮겨서 500RPM에서 5분간 원심분리 한다. 이렇게 얻은 상등액은 새로운 50ml tube에 옮겨서 2400RPM에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리법으로 얻은 비교적 순수한 톡소포자충의 영양형은 10%의 FBS를 함유한 RPMI 1640배지에 재부유시키고 4℃에서 5 내지 6일간 보관할

수 있었다. 이중 일부는 생체 내(in vivo) 및 실험관 내(in vitro) 실험에 사용하고 일부는 또 다시 새로운 KP100 CD-1 마우스에 주입하여 유지하였다¹¹⁾.

2. Endoperoxide ring 구조를 바탕으로 한 유도체

Endoperoxide ring 구조를 바탕으로 한 화합물 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane은 아래의 Fig. 1의 구조를 가지고 있다.

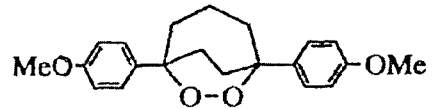


Fig. 1. 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane, $C_{21}H_{24}O_4$

3. 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 /ml 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 처리한다. 그 후 24시간 동안 배양한 뒤, 배지를 교환함과 동시에 endoperoxide ring 구조를 가진 화합물 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane을 농도별로 처리한다. 이때 대조군으로서 술파디아제(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S-3549, Germany)를 사용한다. 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 시그모이드 커브(sigmoidal curve)를 작성한 후, 톡소포자충의 증식을 억제하는 농도(EC50 50% 세포 증식억제농도)를 산출하였고, 하기 수화식 1을 이용하여 약효관정계수는 선택성(selectivity, 수화식 1)을 이용하여 구하였다¹²⁾.

【수화식 1】

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

4. 생체 내 실험(4days suppressive test)

톡소포자충의 영양형 1×10^5 개를 4주령 KP100 CD-1 암컷 마우스 복강에 주입한다(day0). 주입 2시간 후부터 화합물 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane을 존대로 경구 투입한다. 150mg/kg씩 연속 4일간 하루에 한 번씩 경구 투입하였다. 이때 양성대조군은 세 개 그룹으로 나누었다¹²⁾. 술파디아제(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S-3549, Germany)만 투여한 그룹(50mg/kg, 양성대조군1)과 피리메타민(pyrimethamine, SIGMA, P-7771, Germany)만 투여한 그룹(12.5mg/kg, 양성대조군2), 그리고 이 두 가지 시약을 연합하여 투여한 그룹(양성대조군3)인데 이들은 전부 2차 증류수에 녹여서 사용하였으며 피리메타민은 용해를 촉진하기 위하여 사용하기 전에 1시간 동안

sonication하여 사용하였다. 4일째(day4) 마우스를 경추탈골 사망 시키고, 독소포자충의 유지방법과 비슷한 방법으로 복강 내의 비교적 순수한 독소포자충의 영양형을 모두 얻어 계량하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

1. 시험관 내 실험

선택독성은 신약 개발을 위한 항약물스크리닝에 사용하는 지표의 하나이다. 이 수치가 높으면 높을수록 의약품으로서 인체에 대한 안전성이 높아지는 것을 의미한다. 본 실험에서는 HeLa 세포에서 세포증식분석(cell titer 96@ AQueous one solution cell proliferation assay)을 실시하여 endoperoxide 구조를 가진 화합물과 양성대조군 숄파디아제의 선택성을 산출하였다. 현재 시중에서 항독소포자충 시약으로 쓰이는 숄파디아제는 HeLa세포에서 선택성이 1.63밖에 되지 않았으나 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane은 선택성이 4.9였다. 숄파디아제에 비하여 약 세 배의 효과에 달하는 것으로 나타났다(Table 1).

Table1. Selectivity of compounds for anti-Toxoplasma gondii effects

	EC50 in HeLa cells(μl/ml)	EC50 in T. gondii(μl/ml)	selectivity
1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane	57.1	11.7	4.9
Sulfadiazine	4202.3	2575.3	1.63

2. 생체 내 실험

시험관 내에서 얻은 결과에서 화합물 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane은 숄파디아제의 세 배의 선택성을 보였다. 높은 선택성을 바탕으로 생체 내에서의 항독소포자충 효과를 확인하기 위하여 마우스를 사용하여 4일간 억제실험을 진행하였다. 화합물1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane을 4주령 된 KP100 CD-1 암컷 마우스에 150mg/kg씩 연속 4일간 하루에 한 번씩 경구 투여하였다. 복강내의 독소포자충의 영양형을 모두 얻어 계량해 보았더니 85.72%의 억제율을 보였다. 이는 숄파디아제만 투여한 그룹(97.13%)과 숄파디아제와 피리메타민을 연합하여 투여한 그룹(99.77%)보다는 낮지만 피리메타민만 투여한 그룹(57.68%)보다는 높은 억제율이었다(Fig. 2).

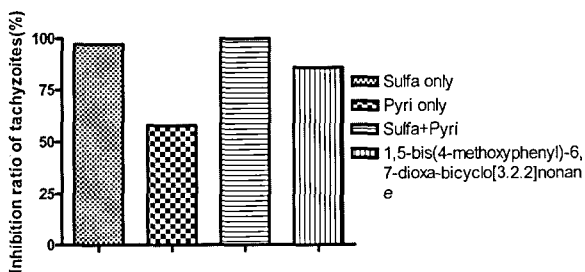


Fig. 2. Inhibition ratio of tachyzoites of *T. gondii* in mouse peritoneal cavity. Negative control: * and after 2hours given distilled water orally. Sulfa only: * and after 2hours given sulfadiazine sodium salt(50mg/kg) only. Pyri only: * and after 2hours given pyrimethamine (12.5mg/kg) only. Sulfa+Pyri: * and after 2hours given combine these two drugs orally. 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane: * and after 2hours given 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane orally. **: *T.gondii* (1×10^8) infected by peritoneal cavity.

결 론

개뿔속에서 항말라리아 효과가 있는 endoperoxide ring 구조를 가진 유도체를 독소포자충에 적용한 결과 시험관 내 실험에서는 현재 항독소포자충약제로 쓰이는 숄파디아제보다 높은 선택독성을 보였고, 생체 내 실험에서는 숄파디아제만 투여한 그룹(97.13%)과 숄파디아제와 피리메타민을 연합하여 투여한 그룹(99.77%)보다는 낮지만 피리메타민만 투여한 그룹(57.68%)보다는 높은 억제율(85.72%)을 보였다. 이로부터 항말라리아 효과가 있다고 알려진 endoperoxide ring 구조를 가진 1,5-bis(4-methoxyphenyl)-6,7-dioxo-bicyclo[3.2.2]nonane이 같은 침복포자충류에 속하는 독소포자충에도 높은 억제효과를 보인다는 것을 알 수 있다. 추후에 이에 대한 유도체합성을 통하여 보다 더 효과가 좋은 화합물을 합성하여 기존의 약제 숄파디아제와 피리메타민보다 더욱 효과가 높은 치료제 후보물질을 확보할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원으로 수행된 연구임(No.2006-00082) 및 산업자원부 지방기술혁신사업(RIT05-03-02)지원으로 수행됨.

참고문헌

- Hoffman, S.L., Subramanian, G.M., Collins, F.H., Venter, C. Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria, *Nature*, 415(6872):702-709, 2000.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y.P., Oazki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Pulu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipiri, S., Buck, G.A. The genome of *Cryptosporidium hominis*, *Nature*, 431(7012):1107-1112, 2004.
- Nicolle, M.M.C., Manceaux, L. Sun un protozoaire nouveau du gondi(*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.
- Luft, B.J., Remington, J.S. *Toxoplasmic encephalitis in AIDS*, *Clin Infect Dis*. 15(2):211-222, 1992.

9. 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.
10. Li, Y., Wu, Y.L. How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives?, *Med Trop.* 58(3):9-12, 1998.
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. 崔鎮瑞, 鄭坪林, 蘇鎮璋 Pyrimethamine이 [톡소프라스마]증에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, *Yonsei journal of medical science*, 18(1):340-354, 1985.
13. Park, H., Kim, M.S., Jeon, B.H., Kim, T.K., Kim, Y.M., Ahn, J.H., Kwon, D.Y., Takaya, Y., Wataya, Y., Kim, H.S. Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea, *Biol Pharm Bull.* 26(11):1623-1624, 2003.