

## 병원성 원생동물의 변이와 약물내성 : *Leishmania major*의 클로로퀸 내성

전경희 · 정시련\* · 바바라 밀러\*\* · 캐롤 시블리\*\*  
영남대학교 이과대학, \*약학대학, \*\*워싱턴대학교 유전학과  
(Received February 14, 1991)

## Drug Resistance in Protozoan Parasites : Chloroquine Resistance in *Leishmania major*

Kyung Hee Jeune, See Ryun Chung\*, Barbara Miller\*\* and Carol Sibley\*\*  
College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea  
\*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea  
\*\*Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, 98195, USA

**Abstract**—A comparative study was performed on two different strains of *Leishmania major*, chloroquine sensitive strains (Chl<sup>S</sup>) and its mutant chloroquine resistant strains (Chl<sup>R</sup>). Chl<sup>R</sup> strains were obtained at  $5 \times 10^{-4}$  M chloroquine. Remarkable differences were observed at the initial chloroquine uptake in Chl<sup>R</sup> and Chl<sup>S</sup>, i.e., the rate of uptake was very reduced in Chl<sup>R</sup> (Km values were 70 nM and 125 nM, respectively). Influx and accumulation of chloroquine were also compared between wild type and mutant. An increasing tendency in both influx and accumulation of chloroquine was shown in Chl<sup>S</sup>, but Chl<sup>R</sup> demonstrated a rapid release after a little uptake (influx) at the early stage. This result is thought to be basis of their resistance for Chl<sup>R</sup> strains.

**Keywords** □ Drug resistance, protozoan parasites, malaria, *Leishmania*, plasmodium

인체에 기생하는 병원성 원생동물로는 *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* 등 다수가 있다.<sup>1)</sup> 이들 중 가장 심각한 것은 사람에게 말라리아를 유발하는 *Plasmodium*이며, 이로 인한 피해는 근래 약물에 내성을 가진 *Plasmodium*의 출현 때문에 더욱 커지고 있는데, 특히 chloroquine(이하 CQ라 함)에 내성이 있는 *P. falciparum*의 출현과 이의 빠른 확산은 말라리아 퇴치의 중요 문제점으로 간주된다.<sup>2)</sup> 그러나 이 문제의 임상학적 중요성에도 불구하고, CQ에 감수성이 있는 CQ sensitive strain(Chl<sup>S</sup>)과 내성이 있는 CQ resistant strain(Chl<sup>R</sup>)을 구별하는 차이점에 대해선 알려진 바가 거의 없다. Krogstad 등<sup>3,4)</sup>은 *P. falciparum*의 Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup>의 두 변종을 대상으로 [<sup>3</sup>H]-CQ의 수용능력을 비교하였다. 그 결과 Chl<sup>R</sup>이 Chl<sup>S</sup>에 비해 CQ에 대한 유입현상은 차이가 없었지만,

유출은 증가한다는 점을 관찰하였다.

본 연구의 근본 목적은 *P. falciparum*의 CQ 내성을 발현하는 유전자의 성질구명에 있었다. 그러나 *P. falciparum*의 약물내성에 관한 실험은 지극히 어려운 것으로 알려져 왔는데, 이는 자연상태에서 직접 Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup>을 바로 채취할 경우 Chl<sup>R</sup>은 불과 10배 정도의 내성만이 발견되었는 바, 이는 임상적으로는 중요한 사실이었지만, 유전학이나 분자생물학의 관점으로는 대단히 작은 효과일 뿐이었으며,<sup>2)</sup> 또한, 약물내성 *P. falciparum*을 배양하는 일과, 숙주세포내에서의 배양대상으로 할 수 있는, 즉 *in vitro*에서 약물내성이 강한 종을 선별하는 일이 매우 힘들다는 사실이 발견되었다.<sup>5)</sup> 이런 등의 이유로 본 연구에서는 *Leishmania major*를 대상으로 우선 첫단계 실험을 시도 하였는데, *L. major*를 선택한 이유는 이의 생물학 및

분자생물학적 지식을 이용하여 *P. falciparum*에 있어서 CQ resistant phenotype을 이해하고 유전자를 clone할 수 있음이 가능한 것으로 추측되었기 때문이다. *Leishmania*는 일반적으로 visceral leishmaniasis와 cutaneous leishmaniasis의 질병을 유발하는 병원충으로서, *L. donovani*, *L. major* 등 많은 종류가 있다. 그 중 *L. major*는 주로 아시아의 사막지역 주민들에게 sandfly(*Phlebotomus papatasi*)가 매개체로 인체에 침투하여 심한 염증과 부스럼 딱지를 동반하는 급성 피부병을 유발시키는 풍토병의 병원체로 알려져 왔다. *L. major*와 *P. falciparum* 2종은 대단히 달라서, *L. major*의 연구결과에서 추측되는 것들이 *P. falciparum*에서는 사실이 아닐지도 모른다. 그러나 *L. major*에서의 약물 내성기전은 *P. falciparum*에 있어서 CQ 내성을 이해하는데 중요한 길잡이가 되리라고 믿는다.

### 재료 및 방법

*L. major*의 배양 및 클로로퀸 내성 변종의 선별 - 본 실험에 사용한 *L. major*는 Dr. Steven Beverley(Harvard University, School of Public Health)로부터 기증받았으며, 이 wild type은  $10^{-5}$  M CQ로 처리하였을 때 모두 사멸하는 것이었다. 이 농도는 *in vitro*에서 CQ에 내성이 있는 *P. falciparum*을 죽이는데 필요한 농도의 100배에 달하는 것이고 배양할 때 포유동물 세포를 죽일 수 있는 농도이다.<sup>2)</sup>

본 실험에서는 Ullman 등<sup>6)</sup>의 방법으로 배양액[M 199(Sigma) 용액 500 ml에 sodium bicarbonate 0.35 g/l, fetal bovine serum 50 ml, 1 M HEPES 20 ml, 10 mM adenine 5 ml, 0.25% Hemin 1 ml 그리고 penicillin과 streptomycin을 소량 함유시킨 것]속에 CQ의 농도를  $10^{-3}$  M까지 서서히 증가시키면서 배양하여 생존하는 *L. major*를 선별하는 방법으로 몇 종류의 CQ에 내성인 cell line을 얻었다.

**Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup> 변종의 초기 클로로퀸 수용량 측정** - Chl<sup>R</sup>과 Chl<sup>S</sup>를 대상으로 [<sup>3</sup>H]-CQ(New England Nuclear-Dupont)을 사용하여 초기 CQ 수용량을 측정하였다. Chl<sup>S</sup>는  $10^{-5}$  M CQ를 배양액에 처리한 뒤 12시간 방치 후 사멸하는 것을 시료로 했고, Chl<sup>R</sup>은  $5 \times 10^{-4}$  M의 CQ를 배양액에 7일간 투여하여 생존하는 것을 확인한 뒤, 원심분리하여 상층액을 제거

하고, 다시 CQ를 함유하지 않은 배양액에서 1주일 동안 배양 후 시료로 선택하였다.

microtiter plate를 이용하여 6개의 well에 각각 Chl<sup>S</sup>  $25 \mu\text{l}$  ( $2.5 \times 10^7$  cells/well), 또다른 6개의 well에는 Chl<sup>R</sup>을  $25 \mu\text{l}$ 씩 취하였다. 이어서 Chl<sup>S</sup>의 well에 10 nM [<sup>3</sup>H]-CQ  $25 \mu\text{l}$ 를 30초 동안 반응시키고, 계속해서 20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM의 [<sup>3</sup>H]-CQ을  $25 \mu\text{l}$ 씩 주입하고 30초 동안 반응시켰다. 또한 Chl<sup>R</sup>의 6개 well도 위와 같은 방법으로 반응시켰다. 그리하여 각 well은 전체가  $50 \mu\text{l}$ 이 되도록 하였으며, 최종 [<sup>3</sup>H]-CQ 농도는 Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup> well 모두 5 nM에서 50 nM의 농도로 처리된 것으로 하였다. 섭취량 측정은 각 well에서 30초 동안 반응한 시료를 PBS buffer로 여과시켜 여과지를 말려,  $200 \mu\text{l}$  BTS-450(0.5 N quart. ammonium hydroxide in toluene)으로 소화시킨 뒤, 1 M HCl  $100 \mu\text{l}$ 로 중화시켜 biosensitive scintillation fluid를 첨가하여 Scintillation Counter(Packard Tri-Carb 1500)로 방사능을 측정하였다.

**Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup> 변종에 있어서 클로로퀸의 축적 및 배출량 측정** - 이는 Krogstad의 방법<sup>3)</sup>을 응용하여 실시하였는데, Chl<sup>S</sup>는 그대로 3일 배양한 것을, Chl<sup>R</sup> 변종은  $5 \times 10^{-4}$  M CQ 함유배양 3일 후, CQ를 제거하고 8일간 더 배양한 것을 취하였으며, 본 실험은 [<sup>3</sup>H]-CQ을 함유시켜 짧은시간 동안 배양하여 이들 세포현탁액을 원심분리한 뒤, 침전물과 상층액에 잔류한 방사능을 측정하였다. 먼저 microtiter plate에서 Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup>을 각각 5개 well에 주입하고, 각 well에 cell volume  $25 \mu\text{l}$ 와, hot CQ  $25 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^{-8}$  M [<sup>3</sup>H]-CQ), cold CQ  $2.5 \mu\text{l}$  ( $5 \times 10^{-8}$  M CQ) 등을 넣고 1분, 5분, 10분, 15분, 20분씩 배양하여 시료로 하였다. 이 시료는 dibutyl phthalate를 함유한 tube로 옮겨 30초 동안 원심분리한 뒤, 상층액  $30 \mu\text{l}$ 는 scintillation fluid를 첨가하여 바로 방사능을 측정하였고, 침전물은 tube의 끝을 잘라서 scintillation vial에 넣고 base BTS-450을 첨가하여 하룻밤 소화시키고 1 M HCl로 중화한 뒤 측정하였다.

**Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE)** - 이 실험은 Van der Ploeg 등<sup>7)</sup>과 Scholler 등<sup>8)</sup>의 방법을 수정한 것으로 했다. 시료는 살아있는 배양세포(promastigote)를 배양액으로부터 분리하여  $1 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 PBS에 다시 현탁시켜 사용하였으며, 이 용액(1~2 ml)을 37°C로 가온하여 같은 양의 1% low

melting agarose(Seakem) 37°C 용액(agarose in 0.06 M PBS+50 mM EDTA)과 혼합시켰다. 이 때 빨리 tube를 2~3번 거꾸로 하여 잘 혼합한 뒤 block former에 붓고, 4°C에서 15분 정도 gel을 형성시킨 뒤 5×5 mm block으로 잘랐다. 그리고 block들을 분해 혼합액(lysis mixture : 0.5 M EDTA, pH 9.5, 1.0% SDS, 2 mg/ml proteinase K)에 담구어 하룻 동안 50°C로 반응시켰다(5 ml of lysis mixture for 4 ml of cell/agarose mixture).

반응이 끝난 block들은 TE buffer(10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA)에 2~3번 세척하여 부스러기를 제거하고, 분해혼합액에 다시 현탁(이 경우 1 mg/ml의 농도로 proteinase K 사용)시켜서, 50°C에서 하루 더 반응시켰다. 이후 block들은 TE buffer로 세척하여 4°C에서 0.5 M EDTA(pH 9.5) 용액속에 넣어 사용시까지 보관했다. 각각의 block들은 대략  $3.75 \times 10^7$  cells을 갖도록 했고, pulse field gradient apparatus에 주입시킬 때는 2~4개의 더 작은 block으로 잘라 사용했다.

PFGE 기구는 워싱턴대학 유전학과에서 개발한 것이었고, 시료는 1.2% agarose gel(Seakem ME)에 loading하여 TBE buffer(45 mM Tris, 45 mM boric acid, 0.05 mM EDTA, pH 8.3)로 전개시켰으며, 전압은 5 v/cm로 하고, 48시간 동안 5°C에서 전기영동시켰다. Gel은 ethidium bromide(0.5 mg/ml) 용액으로 1시간 동안 흔들며 주면서 염색하고 증류수를 2~3번 교환시키면서 45분 동안 탈색시켰다.

**Macrophage와 *L. major*의 lysosome 내부 pH 변화에 대한 비교 측정**—이 실험은 Ohkuma와 Pool<sup>9)</sup>의 방법을 응용하였고, FITC DX(Fluorescein isothiocyanate labeled dextran, Sigma)를 probe로 사용하여 macrophage와 *L. major*를 대상으로 염기성 약물을 투여하면서, 변화하는 내부 lysosome의 pH를 비교 측정하였다. Macrophage를 얻기 위해서는 Koefler 등<sup>10)</sup>의 방법을 응용하여 HL-60 cell을 분화시켜 사용했다.

HL-60 cell은 Dr. Grace Maresh(Dept. of Pathology, UW)로부터 분양받은 것을 RPMI 1640(Gibco) 배양액에 8% fetal calf serum(FCS : Rehies Chemical Co.)을 첨가하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% air를 공급하면서 세포 수를 항상  $5 \times 10^5$  cells/ml(20~24 시간 동안)로 유지되도록 배양하였다. 이 세포로부터

macrophage를 유도하기 위해선 대형 petri-dish(falcon 3025)에 50 ml의 HL-60 cell( $8 \sim 10^5$  cells/ml)을 옮기고,  $2 \times 10^{-8}$  M 농도의 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate ester)를 첨가하여 분화시켰다. 한편, *L. major* 배양액( $1 \times 10^7$  cells/ml)에는 FITC DX를 10 mg/ml의 농도로 주입하여 4일간 증식시켰고, macrophage 배양액에는 1.3 mg/ml의 농도로 FITC DX를 주입하여 24시간 동안 배양하였다. FITC DX 주입이 끝난 뒤, *L. major*는 3번 PBS로 원심분리하여(2000 rpm, 10 min.) 배양액 중의 FITC DX를 제거하고, 침전된 세포를 1 ml의 PBS에 현탁시켰다( $10^9$  cells/ml). 또한, macrophage 배양액도 PBS로 3번 세척하여 FITC와 필요없는 HL-60 cell을 제거한 뒤, petri-dish 바닥에 붙어있는 macrophage를 긁어 모아서 1000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤, 침전된 세포를 1 ml PBS에 현탁시켰다.

fluorescence spectrophotometer(Perkin-Elmer LS-5)를 사용한 실험은 macrophage의 경우 37°C, *L. major*는 25°C에서(excitation ; 495 nm, emission ; 519 nm) 형광도를 측정하였다. 형광도는 macrophage 현탁액만을 먼저 측정하고, 이어 5 M NH<sub>4</sub>Cl 용액과  $10^{-3}$  M CQ 용액을 각각 10 μl씩 첨가하여 그 형광도의 변화를 측정하였으며, 한편, *L. major*도 자체만의 형광도를 측정한 뒤, 같은 방법으로 그 변화를 측정하였다.

**전자현미경 관찰**—Langreth와 Balber<sup>11)</sup>의 방법을 응용하였으며, 배양한 ChI<sup>S</sup>와 ChI<sup>R</sup> 변종을 약  $10^7$  cells/tube가 되게 계산하여 3개의 tube를 준비한 뒤(control, sample 1, 2), 이를 2,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여(Beckman, TJ6) 배양액을 제거하고, 용액 C(10.057 M NaCl, 4.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.038 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl)로 3회 원심분리하여 세척했다. ferritin 용액은 19시간 동안 용액 C로 투석하여 사용하였고, ferritin을 첨가하여 20분 동안 실온에서 배양하였다. 배양을 끝내기 1분 전에 세포가 살아 있는지를 현미경으로 관찰한 뒤, 용액 C와 proline, bovine serum albumin(BSA)의 혼합액으로 한번 세척하고, 2% glutaraldehyde, 20 mM phosphate buffer(pH 6.5), 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 37.5 μl sucrose(2 M)의 혼합액으로 0°C에서 30분 동안 고정하였다. 이후 0.1 M phosphate와 citrate 용액(pH 5.8)으로 2번 세척하여 시험관에 옮긴 뒤, 0.1 M NaOAc(pH 6.2) 용액

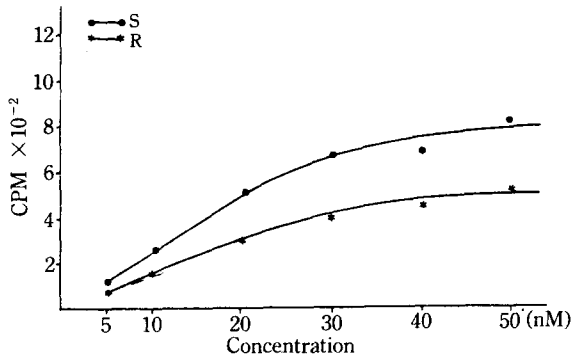


Fig. 1—Comparison of initial chloroquine uptake observed with wild type,  $Chl^S$  and mutant  $Chl^R$  (···,  $Chl^S$  strains; ····,  $Chl^R$  strains).

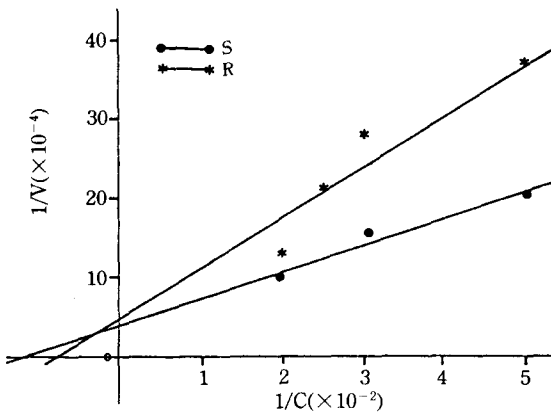


Fig. 2—Lineweaver Burk plot of Fig. 1 (V, rate of chloroquine uptake; C, concentration, nM).

으로 2번 세척하여 4%  $OsO_4$  용액 6방울과 0.1 M NaOAc 용액 6방울을 가하여 15분 동안 고정하고, 0.1 M NaOAc 용액으로 다시 2번 세척하고, 0.1 M NaOAc 0.5 ml과 2% uranyl acetate 0.5 ml를 가하여 1시간 동안 어둠속에서 배양하고, 증류수와 95% ethanol로 세척한 뒤, 100% ethanol을 2번 가하여 탈수했다. 탈수시킨 tube에 포매용 수지인 spurr 용액을 1 ml/tube(spurr 용액: dimethylamino ethanol 0.4g, diglycidyl ether of polypropylene glycol 4g, 4-vinyl cyclohexene dioxide 10g, nonenyl succinic anhydride 26g)씩 가하고, 1시간 후, 원심분리하여 상층액을 버리고 다시 fresh spurr 용액을 부어서 beam capsule에 넣은 뒤, 원심분리하여 가라 앉히고 65°C로 하루밤 방치 후 경검(Phillips EM 300; 3,300~20,000배)하였다.

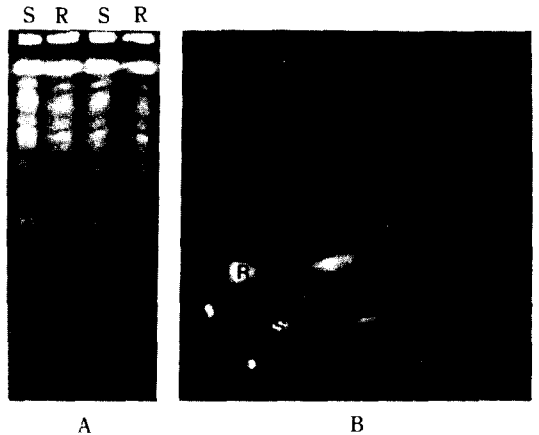


Fig. 3—Electrophoretic separation of  $Chl^S$  and  $Chl^R$  strains. A, one dimensional; B, bidimensional electrophoresis; S,  $Chl^S$  strains; R,  $Chl^R$  strains.

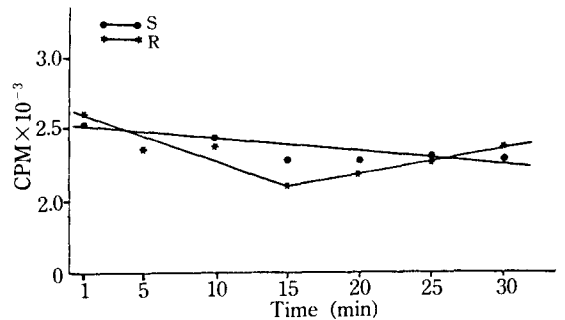


Fig. 4—Chloroquine release by  $Chl^S$  and  $Chl^R$  strains.

### 결과 및 고찰

**$Chl^R$ 과  $Chl^S$ 의 초기 클로로퀸 수용량 비교**—Fig. 1에서 보는 바처럼 이 때  $Chl^S$ 와  $Chl^R$ 의 초기 수용율은 쌍곡선 모양이었다. 이는 *Leishmania*에도 약물과 결합하는 부위가 하나가 아니고 일정량 존재함을 시사하는 것이었고, 또한 이 2종의 Km값 비교 결과(Fig. 2),  $Chl^S$ 는 70 nM이었으나,  $Chl^R$ 은 125 nM로서,  $Chl^R$ 의 CQ에 대한 수용능력이 시간이 갈수록 현저히 저하됨을 알 수 있고 이는  $Chl^R$  유전자에 변화가 초래된 것으로 판단된다.

**PFGE를 이용한  $Chl^S$ 와  $Chl^R$ 의 비교**—Fig. 3에서 나타난 것처럼 2종의 chromosomal DNA는 거의 유사하게 보였기 때문에 그 차이점을 구별하기는 어렵다는 것을 알 수 있었다. 이 사실은 *P. falciparum*의

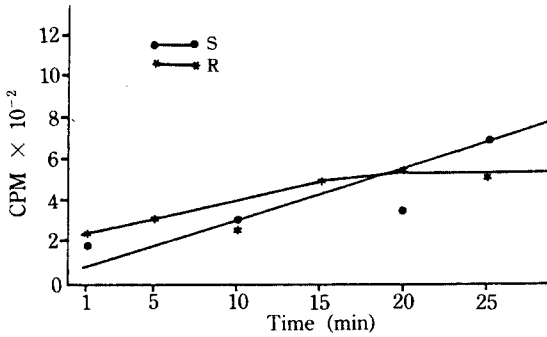


Fig. 5—Chloroquine accumulation by Chl<sup>S</sup> and Chl<sup>R</sup> strains.

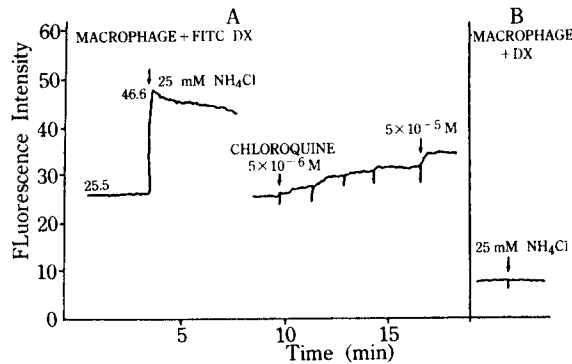


Fig. 6—Effect of ammonia and chloroquine on intralysosomal pH of macrophages. A: Macrophages containing FITC DX in their lysosomes were removed from medium and then perfused with PBS containing 25 mM NH<sub>4</sub>Cl and chloroquine at the concentrations of 5 × 10<sup>-6</sup> M ~ 5 × 10<sup>-5</sup> M. B: Control group, macrophages containing ordinary DX.

경우에 야외에서 발견되는 Chl<sup>R</sup>은 Chl<sup>S</sup>보다 불과 10배 정도의 약물내성 밖에 없다는 사실이 알려졌고, 이 경우 임상적으로는 중요한 의미를 지니지만 유전학의 관점에서는 대단히 작은 효과로서 그 차이점을 가리키는 매우 어렵다는 보고<sup>2)</sup>가 있음을 볼 때 본 실험의 경우도 5 × 10<sup>-4</sup> M CQ에서 생존하는 Chl<sup>R</sup>은 Chl<sup>S</sup>보다 50배 내지 100배의 내성을 가지는 종이므로 임상적으로는 큰 의미가 있으나 전기영동 실험에서는 구별이 어려웠다.

**Chl<sup>S</sup>와 Chl<sup>R</sup> 변종에서 클로로퀸의 축적 및 배출**  
—Fig. 4의 결과는 시간이 경과함에 따라 배양액에서 측정되는 CQ의 양이 Chl<sup>S</sup>의 경우는 서서히 감소하였고, Chl<sup>R</sup>의 경우는 15분까지는 서서히 감소하다가

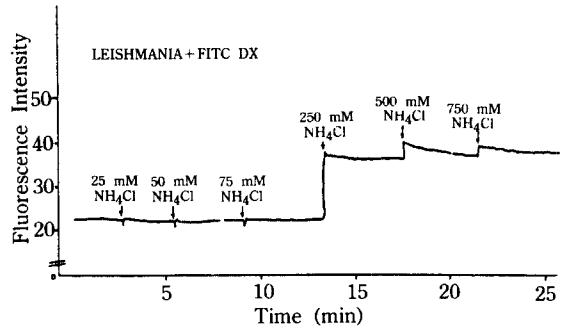


Fig. 7—Effect of ammonia on intralysosomal pH of *L. major*. *Leishmania* containing FITC DX in their lysosomes were removed from medium and perfused with PBS containing NH<sub>4</sub>Cl at the concentrations of 25 mM ~ 750 mM.

이후부터는 오히려 증가됨을 보여주었다. 한편 Fig. 5에서는 원생동물 세포 내부에서 측정되는 CQ의 양이 Chl<sup>S</sup>의 경우는 시간에 따라 서서히 증가하였고, Chl<sup>R</sup>의 경우는 15분까지는 증가하다가 이후 거의 정상상태(steady state)에 도달됨이 관찰되었다.

이 실험결과에서 Chl<sup>S</sup>는 CQ을 세포속으로 계속 유입시켜 축적한다는 사실을 알 수 있었고, 그 결과 세포가 사멸한다는 것을 추정할 수 있었다. 또한 Chl<sup>R</sup>은 초기에 약물을 유입시키기는 하지만, 곧 배출시키는 것을 확인하였고, 이 사실이 약물에 대한 내성의 원인이 아닐까 추정되었는데, 배출 channel에 대해서는 *Plasmodium*에 관한 추정보고가 있을 뿐<sup>3)</sup> 명확하게 밝혀지진 않았다.

**Macrophage와 *L. major*의 lysosome 내부 pH의 변화**—Fig. 6에서 보는 것처럼 macrophage는 25 mM NH<sub>4</sub>Cl을 가했을 때 형광도가 현저히 증가하였으며, 이는 Ohkuma와 Poole<sup>9)</sup>의 보고에서 macrophage에 FITC DX를 주입한 뒤 10 mM 이상의 NH<sub>4</sub>Cl을 가했을 때 현저한 형광도를 볼 수 있었고, 이는 macrophage lysosome 내부의 pH 증가를 의미하며, 이 때 변화하는 pH는 평소의 4.7~4.8에서 6 이상으로 증가한다는 사실을 관찰한 것과 일치하는 점이었다. 한편 CQ의 경우 5 × 10<sup>-6</sup> M부터 macrophage의 lysosome 내부 pH를 증가시키면 본 실험에서 입증되었다. 이로써 약염기 용액이 포유동물 세포 내부의 pH 증가를 유도할 수 있으며, 이 현상은 FITC DX로 측정할 수 있으므로 FITC DX를 probe로 하여 원생동물에

(a)



(b)



Fig. 8—Electronmicroscopic observation of *L. major* in culture form. Fig. 8(a),  $\text{Chl}^S$  strains ( $\times 8200$ ); Fig. 8(b),  $\text{Chl}^R$  strains ( $\times 16000$ ). N, nucleus; FP, flagellar pocket; K, kinetoplast; B, basal body; V, vacuole.

대해서도 실험이 가능한 것으로 추측되었다. 실지로 Yayon 등<sup>12)</sup>은 말라리아 병원충인 *P. falciparum*을 대상으로 이와 같은 실험을 전개하여 CQ에 의한 food vacuole의 pH 증가를 관찰하였으며, 그들은 이 현상이 food vacuole에 CQ의 축적이 일어나 그 결과 food vacuole이 기능을 잃어버리고 따라서 세포도 죽는 것으로 해석했다.

본 연구는 이런 결과들을 배경으로 *L. major*를 대상으로 실험하였는 바, 먼저 macrophage에서와 같은 조건(1.3 mg/ml FITC DX, 24시간 feeding)에서는 pH의 증가를 전혀 볼 수 없었다. 그리하여 FITC DX의 농도를 10 mg/ml로 증가시켜 4일간 섭취되도록 충분한 시간을 준 뒤 형광도를 측정할 결과 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 여기서 *L. major*는 macrophage나 *Plasmodium*과 현저히 다른 결과를 보였는데, 10배나 강한 농도인 250 mM의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에서 겨우 pH 증가를 보인 것이다. 그리고 CQ에 대해서는 변화를 볼 수 없었다. 이 결과에서 *L. major*는 약물섭취의 기전이 *Plasmodium*같은 다른 병원성 원생동물과는 현저히 다른 것으로 판단되었고, 이는 *L. major*의 두꺼운 세포외벽구조 때문일 것으로 추정된다.

**전자현미경 관찰**—Langreth와 Balber<sup>11)</sup>의 보고에서 *L. major*와 구조가 비슷한 *Trypanosoma*의 경우, ferritin이 세포 내부로 유입될 때, 배양시킨 원생동물의 경우는 flagella pocket을 통해서 세포내부로 들어온 뒤, lysosome으로 이동하는 현상이 관찰되었다는 사실이 있었으므로, *L. major*에서도  $\text{Chl}^S$ 와  $\text{Chl}^R$  변종의 ferritin 유입경로의 차이를 관찰할 수 있을 것으로 예상했으나, 실험결과 ferritin의 유입경로를 발견할 수 없었다. 그러나  $\text{Chl}^R$ 에서는  $\text{Chl}^S$ 에서 발견되지 않는 커다란 액포를 발견할 수 있었는데(Fig. 8), 그 이유는 알 수 없었으나 약물축적과 관련이 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

사막지방에서 피부질환을 유도하는 *L. major*를 대상으로 CQ에 감수성이 큰 종( $\text{Chl}^S$ )과 그 변종인 내성이 큰 종( $\text{Chl}^R$ )을 배양하여 다음과 같은 차이점을 관찰할 수 있었다.

1. CQ 농도  $5 \times 10^{-4}$  M에 내성이 있는 변종을 얻을 수 있었다.

2.  $\text{Chl}^S$ 와  $\text{Chl}^R$ 은 초기 CQ 수용율에서 현저한 차이를 보였는데,  $\text{Chl}^R$ 의 수용율이 많은 감소를 보였으며, 이 때 Km값은 각각 70 nM과 125 nM이었다.

3. CQ의 세포내 유입 및 축적은  $\text{Chl}^S$ 의 경우, 시간에 따라 계속 유입되고 축적되었으나,  $\text{Chl}^R$ 은 초기에 유입되다가 곧 체외로 배출되어 버림을 알 수 있었다.

4. 약물의 세포내 유입경로를 형광비색계와 전자현미경으로 관찰한 결과, 정확한 경로를 발견할 수는 없었고, 단지 *L. major*는 다른 병원성 원생동물과는 현저히 다른 견고한 외벽을 가진 것으로 추정되었고,  $\text{Chl}^R$ 은 특이한 액포를 함유하는 것으로 나타났다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1988~1989년 대학교수 국비 해외과제 연구 계획에 의해 이루어졌음을 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T. and Santi, D.V. : Overproduction of bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 2132(1983).
- 2) Peters, W. : *Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria*. 2nd Ed., Academic Press (1987).
- 3) Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Kyle, D.E., Oduola, A.M.J., Martin, S.K., Milhaus, W.K. and Schlesinger, P.H. : Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*. *Science* **238**, 1283(1987).
- 4) Krogstad, D.J. and Schlesinger, P.H. : Acid-vesicle function, intracellular pathogens and the action of chloroquine against *Plasmodium falciparum*. *New Engl. J. Med.* **317**, 542(1987).
- 5) Sibley, C. : *personal comm.* (1989).
- 6) Ullman, B. : Pyrazopyrimidine metabolism in parasitic protozoa. *Pharmaceutical Res.* **194**, 203(1984).
- 7) Van der Ploeg, L.H.T., Smits, M., Ponnudurai, T., Vermeulen, A., Meuwissen, J.H.E.T. and Langsley, G. : Chromosome-size DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. *Science* **229**, 658(1985).
- 8) Scholler, J.K., Reed, S.G. and Start, K. : Molecular

- karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**, 279(1986).
- 9) Ohkuma, S. and Poole, B. : Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3327(1978).
- 10) Koeffler, H., Bar-Eli, M. and Territo, M.J. : Phorbol diester-induced macrophage differentiation of leukemic blasts from patients with human myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* **66**, 1101(1980).
- 11) Langreth, S.G. and Balber, A.E. : Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* **22**, 40(1975).
- 12) Yayon, A., Cabantchik, Z.I. and Ginsburg, H. : Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 2784(1985).