

황련에서 분리된 단백질성분의 항진균효과

김현경 · 이주희 · 심진기* · 한용문#

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학교실, *한국생산기술연구원
(Received July 14, 2005; Revised August 17, 2005)

Anticandidal Activity of the Protein Substance from *Coptidis Rhizoma*

Hyunkyung Kim, Jue-Hee Lee, Jin Kie Shim* and Yongmoon Han#

College of Pharmacy Dongduk Women's University, 23-1 Wolgok-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul, Korea

*Korea Institute of Industrial Technology

Abstract — Antimicrobial peptides are evolutionary ancient weapons for animal and plant species to depend themselves against infectious microbes. In the present study, we investigated if an antimicrobial peptide was produced from *Coptidis Rhizoma*. For the determination, protein substance from the medicinal plant was isolated by various preparations. Among the preparations, the protein portion dissolved in phosphate-buffered saline solution (CRP-DS) that contained the most amount of protein (90%) resulted in maximal inhibition of *Candida albicans* which causes local and systemic infections. Analyses by gel-electrophoresis and gel-permeation chromatography showed the CRP-DS formed a single band of approximately 11.8 KDa as molecular size. Antifungal activity of the CRP-DS was almost equivalent to antifungal activity by fluconazole, resulting in MIC (minimal inhibitory concentration) of approximately 50 µg/ml. The antifungal activity was a dose-dependent. The antifungal activity appeared to be inactivated by heat-treatment and ionic strength, respectively. In a murine model, the CRP-DS enhanced resistance of mice against disseminated candidiasis. The HPLC analysis demonstrated maximum 4% of berberine as residual content in the CRP-DS preparation resulted in no influence on the antifungal activity. In addition, protein portion isolated from *Phellodendri Cortex* producing the alkaloid component like *Coptidis Rhizoma* had no such anticandidal effect. These results indicate that the protein substance from *Coptidis Rhizoma* was responsible for the antifungal activity.

Keywords □ *Coptidis Rhizoma* protein, *C. albicans*, anticandidal activity, disseminated candidiasis

*Candida albicans*는 인체에 가장 많은 문제를 일으키는 다형태성(polymorphic) 진균으로,¹⁾ 병원성 혈류감염(nosocomial blood stream infections)의 원인균으로는 4위를 차지하며 치사율이 40%에 달하는 병원성 진균이다.²⁾ 정상세균총(normal flora)에 속하는 *C. albicans*는 정상인에도 위장관, 구강, 직장관, 질 내에 존재하며³⁾ 특히, 면역력이 미성숙 또는 저하된 신생아, 에이즈 환자, 당뇨병 환자, 암환자와 같은 소모성 질환자나 장기이식 환자들에게는 국소감염뿐만 아니라 전신감염을 유발하여 치명적이다.⁴⁾ 이 진균은 건강한 사람에게는 주로 효모형태로 존재하지만 면역력 약화로 인한 환경변화 등의 경우에는 균사를 생성하여 병원성(virulence)이 증가되기도 한다.⁵⁾ 균사생성은 secreted aspartyl

proteinase, phospholipase 생성, 점막 표피세포에 대한 부착성, phagocytosis에 대한 저항성 등과 함께 주요 병원성인자로 알려져 있다.^{6,7)} 칸디다증(candidiasis)에 대한 화학요법치료에는 polyene 계열의 amphotericin B, azole 계열의 fluconazole, itraconazole, ketoconazole 등이 있으며, 최근에는 세포벽의 1,3-β-glucan 합성을 억제하는 echinocandins 등이 응용되고 있다.⁸⁾ 그러나 항진균제는 대부분 독성이 높고 생체투과율이 낮아 많은 부작용이 수반되며, 내성이 빈번하여 치료효과가 낮다.⁸⁻¹¹⁾ 심지어는 가장 최근에 개발된 caspofungin에 대하여도 내성이 보고되고 있다.¹²⁾

이런 이유로 새로운 항진균제 개발이 활발하게 진행되고 있는데, 주로 기존의 항진균제의 화학적 구조변형이 주종이며 생물학적 제제에 의한 치료법 개발도 추진되고 있다.¹³⁾ 후자의 경우, 진균백신개발¹⁴⁻¹⁶⁾을 예로 들 수 있다. 현재 개발된 항 *C. albicans* 백신의 경우, 세포벽의 β-1, 2-mannotriose를 epitope으로 하는 단항체 B6.1는 칸디다 전신감염증과 질염에 유효한 것으로 보고

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

된 바 있다.^{17,18)} 또 다른 개념의 생물학적 체제의 한 종류로 antimicrobial peptides^{8,19,20)}가 있는데, 이에 대한 연구는 1962년 개구리(*Bombina variegata*)의 표피 분비액에서 항균력 및 용혈력을 지닌 peptide의 존재가 처음 확인된 이후 많은 연구가 진행되고 있다.²¹⁾ 현재까지 조사된 바로는 antimicrobial peptides는 세균,²²⁻²⁵⁾ viruses,^{26,27)} fungi^{28,29)}에 대하여 광범위한 항균작용이 있음이 알려져 있다. 특히, 식물에서 발견된 antimicrobial peptides는 포유류나 곤충에서 발견된 peptides와는 달리 세균보다는 진균에 더 높은 항균효과가 있으며,^{30,31)} 분자량이 대략 2~6 kDa 정도로서 작용기전은 숙주내로 침입한 병원균이 Toll Like Receptor(TLR)로 인식되면 이 peptide가 분비되어 침입균을 사멸시키는 것으로 알려져 있다.^{32,33)}

본 연구에서는 생물학적 개념의 항생물질에 대한 연구 일환으로 수세기 동안 약용식물로 사용된 황련과 황벽을 선택하여 antifungal peptide 생성여부를 조사하였다. 근경부위를 사용하는 황련과 표피를 약용으로 이용하는 황벽의 대표적 성분은 알칼로이드계열로 berberine, coptisine, worenine, palmatine, jatrorrhizine 등이 있으며, 이 중에서 가장 활발하게 연구되고 있는 berberine은 항균효과³⁴⁻³⁷⁾가 알려져 있다. 본 연구에서는 분자생물학을 접목한 소위 proteogenomics 개념에 의한 새로운 방법의 항균제개발 토대를 위해 일차적으로 이 약용식물에서 단백질 성분을 분리하여 *C. albicans*에 대한 성장 억제효과를 *in vivo* 및 *in vitro* 조건하에서 조사하였다.

재료 및 방법

생약재료

황련(*Coptidis Rhizoma*)과 황벽(*Phellodendri Radix*)은 서울 경동시장에서 식품의약품안전청(KFDA)에서 인증된 제품을 구입하여 사용하였다.

Candida albicans

CA-1과 A9 strains를 사용하였으며, 이 균주들은 그 특성이 규명된 균주³⁷⁻³⁹⁾로 GYEP(glucose, yeast extract, peptone) 고형배지에 37°C에서 48시간 먼저 배양한 후 GYEP 액체배지에 분주하여 shaker incubator에서 동일한 온도에서 24시간씩 세 번 계대 배양하여^{37,38)} 사용하였다. 동물실험에서는 배양된 세포를 인산완충용액(DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma, St. Louis, Mo, USA)으로 세척하여 원하는 세포농도를 hemocytometer로 숫자를 측정하여 DPBS에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6~7주령의 BALB/c 암컷 생쥐(Charles River Lab, NY, USA)를 사용하였으며, 고압 멸균한 filter cages에서 사육하는 동안에

멸균된 사료(Orient, Seoul, Korea) 및 물은 자유롭게 먹게 하였다. 구입한 생쥐는 항원조와 공기여과장치가 완비된 청결한 동물사육실 안에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였고, 동물사육실의 환경은 온도 20±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하였으며 조명은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다.

황련단백질(Coptidis Rhizoma Protein)의 추출 및 단백질 분석

분말화 한 황련가루 50 g에 80% methanol(200 mL)을 가하여 간헐적인 진탕을 하면서 실온에서 3일간 방치하였다. Methanol로 추출한 상등액을 여과(TOYO No 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)한 후, 용액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan)으로 감압 농축하였다. 이 감압 농축한 추출물에 ammonium sulfate를 40%, 또는 60%로 처리한 다음 생성되는 침전물을 수집하여 dialysis tubing [MWCO=8,000 Da(Spectra/Por, Spectrum Lab. Inc., USA)을 이용하여 멸균한 증류수에 대하여 4°C에서 96 시간 투석 한 후 동결건조(FD-1000, Tokyo, Japan) 하였다(이 추출물을 CRP-40, CRP-60로 명칭 하였음). 또 다른 방법으로, 감압 농축한 추출물을 멸균증류수 또는 DPBS에 용해 한 다음 원심분리로 잔사를 제거한 상등액을 상기방법으로 투석한 후 동결건조 하였다. 이 경우 물에 용해되는 추출물을 CRP-WS, DPBS에 용해되는 추출물을 CRP-DS로 각각 명칭 하였다. 각 분말화 된 추출물은 냉동고에 보존하며 사용하였다.

단백질 확인과 농도측정은 BCA 시약(Pierce, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 BSA(Bovine Serum Albumin; Pierce, USA)를 표준단백질로 사용하여 실험물질과 비교하였다. 분자량 측정은 전기영동 방법과 gel-permeation chromatography(GPC)을 사용하였다. 전기영동은 본 연구실에서 많이 사용하는 SDS-PAGE 방법⁴⁰⁾을 사용하였다.

CRP의 순도 및 분자량 분석

각 CRP-DS 내 berberine의 혼재 가능성 조사는 berberine 확인 시약인 HCl-H₂O₂을 사용하여 조사하였다. 양성대조 약품으로 berberine을 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 또한, 정밀분석을 위해 HPLC 방법을 사용하였다. 사용된 HPLC에서 이동상은 Acetonitrile 0.005 M PIC-B6, 0.1% PA 혼합액(3 : 7, v/v)을 사용하였으며 CRP(0.2 mg/mL) 10 µL을 Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 × 150 mm) 칼럼에 주입한 다음 유속을 0.8 mL/min으로 조절하여 용출액을 파장 345 nm에서 측정하였다. 분석결과는 표준품 berberine을 상기 동일한 방법으로 용출된 결과와 비교 평가하였다. GPC 방법은 GPC 시스템(GPC PDA RI 040317)을 사용하여 DPBS 용매에 녹인 CRP-DS 시료 200 µL를 주입하고 60분 동안 신뢰구간 1.11에서 용출하는 형성된 Molecular peak의 분자량을 측정하였다.

각 CRP 추출물의 endotoxin 오염성여부는 LAL endotoxin kit

(Timed Gel formation, Sigma)을 사용하여 검색하였다.

항진균효과 검색

*C. albicans*을 DPBS에 적절한 세포농도(1×10^6 cells/ml)로 희석한 후, GYEP 고형배지에 멸균한 면봉으로 도말하고 직경 6 mm의 well을 만든 다음 이 wells에 다양한 농도의 CRP를 100 μ l씩 각 well에 넣어주었다. 사용된 농도는 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml였으며, 시료의 희석은 DPBS를 사용하였다. 대조군 well에는 DPBS 100 μ l만을 넣었다. 이 plates를 4°C에서 24시간 배양한 다음 37°C incubator에서 48시간 계속 배양한 후 성장저지환의 크기를 측정하였다. 한편, CRP를 10 mg/ml 농도로 준비한 용액을 멸균된 시험관에 넣고 100°C로 고정된 수욕조에서 다양한 시간동안 열처리 한 다음 DPBS로 원하는 농도로 희석하여 항진균효과를 검색하였다.³⁷⁻³⁹⁾

CRP 내에 혼재한 berberine에 의한 항진균효과 가능성 평가는, Sigma에서 구입한 berberine을 상기 기술한 Agar Diffusion Assay 방법을 이용하여 항칸디다 효과를 비교 측정하였다. 사용된 berberine 농도는 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/ml이었으며 DPBS를 이용하여 희석하였다.

CRP의 최소억제농도(MIC)는 Broth Dilution Susceptibility 방법⁴¹⁾으로 측정하였다. 이 방법과정은 다음과 같다. CRP를 RPMI 1640 medium(Cambrex, Bio-Whittaker Inc. USA)로 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/ml 농도로 순차적으로 희석하여 96 well plates에 100 μ l씩 넣은 후 동일한 배양액에 희석한 *C. albicans*를 각 well에 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 양성대조군은 동일 양의 fluconazole(50 μ g/ml)을 well에 CRP 대신 넣어 주었다. 성장유무 관찰은 배양 48시간 후에 관찰하여 최소억제농도를 측정하였다. 최소억제농도에서 균의 성장여부는 일정량의 배양액을 pour plating 방법으로 새 GYEP 고형배지에 접종한 후 colony 형성유무를 측정하였다.

전신칸디다증에 대한 CRP의 항진균효과 검색

동물에서 CRP의 항진균효과 검색 이전에 먼저 CRP의 생체 내 독성유무 검사를 하였다. 이 실험에서 BALB/c 생쥐에 CRP를 복강 내로 투여하고 DPBS를 투여 받은 대조군의 생존률과 비교하였다. CRP의 실험용량은 1, 2, 4, 5 mg/mouse이었다. 이 실험결과를 토대로 하여 CRP의 예방효과 검색실험에서는 BALB/c 생쥐에 CRP를 2 mg/mouse 농도로 생쥐의 복강 내로 먼저 투여한 다음에 4시간 후에 *C. albicans*(5×10^5 yeast cells/mouse)를 꼬리정맥으로 접종하여 이 생쥐들의 생존시간을 검색하여 평균생존시간(mean survival times; MST)을 측정하여 효과를 평가하였다.^{37,39)} 대조군 생쥐는 CRP 대신에 DPBS 만을 투여한 후 동일한 방법으로 감염시켰다. CRP는 DPBS에 녹여 여과멸균한 후 사용하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차(Mean±SE.)으로 계산하였으며 각 군 간의 유의성은 Student's *t*-test를 사용하여 *P* 값이 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 동물실험 결과 생존률의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics of Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)으로 산출하였다.

결 과

각 CRP의 단백질 농도 및 확인과 endotoxin 유무검색

다양한 방법으로 분리된 황련단백질을 BCA protein assay 방법으로 검색하였을 때, CRP-40, CRP-60 에는 단백질 농도가 대

Table I - Protein concentration in various preparations of Coptidis Rhizoma Protein (CRP)

Sample ¹	Protein conc (%)
CRP-40 ²	9.6±1.5
CRP-60	31.5±0.8
CRP-WS ³	15.6±0.9
CRP-DS ⁴	90.6±1.1

¹Concentration of each sample tested was at 100 μ g/ml.

²CRP-40 or -60: ammonium sulfate-precipitated part.

³CRP-WS: water-soluble part.

⁴CRP-DS: DPBS-soluble part.

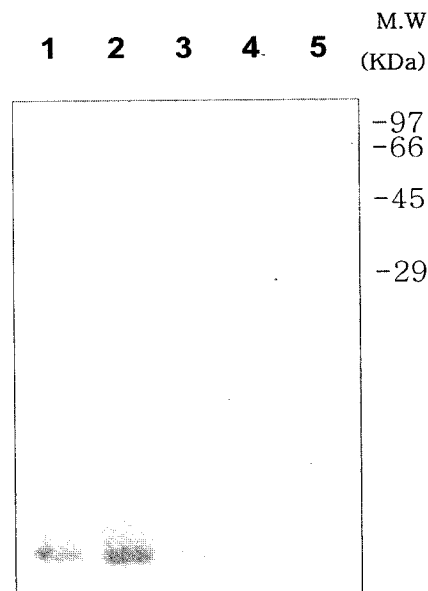


Fig. 1 - Various CRP preparations reveals migrated band at the same location on the SDS-PAGE. Electrophoresis results confirmed presence of protein in CRPs and determined possible molecular size. Lane: 1, CRP-60; 2, CRP-WS; 3, CRP-DS; 4, BSA; and 5, molecular marker. The BSA (bovine serum albumin, MW=66 KDa) was used as another molecular marker.

Table II – Growth-inhibitory effect of various CRPs on *C. albicans* determined by agar diffusion susceptibility test

Sample ¹	Size of inhibitory zone (mm) ²
CRP-60	10.5±0.7
CRP-WS	8.7±1.5
CRP-DS	25.0±1.0
Berberine ³	25.3±1.5

¹Concentration of all samples (100 µl) was at 2 mg/ml.

²Size of a well diameter was 6 mm.

³Berberine was used as a control in these tests.

약 9.7%, 32%로 각각 측정되었고 CRP-WS와 CRP-DS에는 16%, 91% 함유되어 있었다(Table I). CRP-40의 단백질 양은 대단히 극소량 검출되었다. 이 각종 CRP를 동일한 농도에서 SDS-PAGE 전기영동으로 검색한 결과 모두 29 KDa 이하로 분석되었으며 단일밴드로 규명되었다(Fig. 1). Gel-permeation chromatography 방법으로 분석하였을 때, molecular peak의 분자량은 대략 11.8 KDa 정도로 확인되었다. Endotoxin 검사에서 endotoxin이 검출되지 않았다.

항원단백질(CRP)의 항진균효과

Agar Diffusion Susceptibility 방법에 의한 각종 CRP의 *C.*

Table III – Antifungal activity of CRP-DS

Sample ¹	Size of inhibitory zone ³ (mm)
Intact ² CRP-DS	26.5±0.7
10 min-heated CRP-DS	23.8±0.4
30 min-heated CRP-DS	20.5±0.7
60 min-heated CRP-DS	16.0±0.0
Diluent (DPBS) ⁴	6.0±0.0

¹Concentration of all samples was at 2 mg/ml.

²Intact CRP means heat-untreated CRP.

³Size of a well diameter was 6 mm.

⁴DPBS stands for Dulbecco's phosphate-buffered saline solution.

*albicans*에 대한 항진균효과를 검색한 결과, 대조군 well과 비교하였을 때 CRP-DS가 성장을 최고로 억제하였으며($P < 0.05$), 항칸디다 효과가 이미 검증된³⁹⁾ berberine과 동일한 농도에서 비등한 효과를 가지며 CRP-60 보다 성장저지환의 크기가 2배 이상임을 알 수 있었다(Table II). 항진균활성이 가장 우수한 CRP-DS의 경우에 0.5, 1, 2.0 mg/ml 농도에서 각각 9.0±1.2, 13.0±1.4, 22.8±1.9 mm로 항진균효과는 농도의존성을 알 수 있었다. Broth Dilution Susceptibility 방법으로 MIC를 측정하였을 때, 대략 50 µg/ml 농도에서 성장억제가 관찰되었다. 이 효과는 양성 대조군으로 사용한 fluconazole과 유사함을 알 수 있었다. 그러

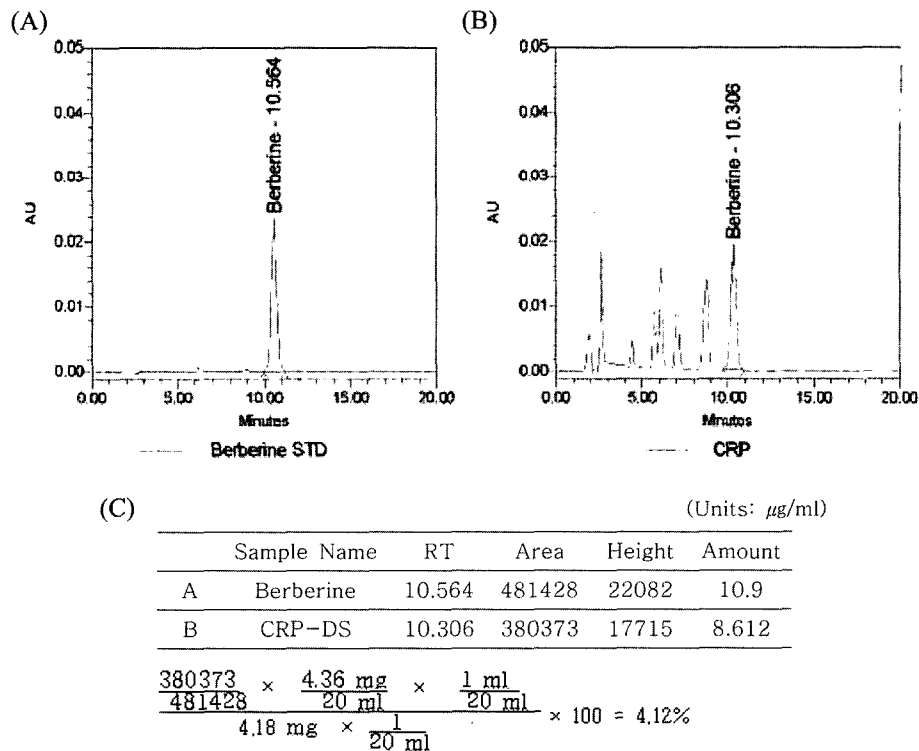


Fig. 2 – HPLC analysis of berberine in the CRP-DS. Ten µl of berberine alone (A) or CRP-DS (B) was loaded on a HPLC (Cosmosil 5C-18-AR-II, 4.6×150 mm) in equilibrium with 0.1% PA (Pic B6): MeCN=7 : 3, v/v) (A). The column was eluted at flow rate of 0.8 ml/min. The eluates was monitored at 345 nm for berberine-presence. Panel (C) shows the calculation of estimation of residual amount of berberine in CRP-DS. The HPLC fraction profiles displayed berberine eluted following the CRP-DS fragments which seemed to be caused by the harsh solvent.

나, 황련처럼 동일한 alkaloid 성분을 함유하고 있는 황벽에서 분리된 단백질은 항캔디다 효과가 없었다(data not shown).

열처리된 CRP-DS의 항진균효과

CRP-DS를 열처리한 후, 항진균효과를 검색에서, 10분간 열처리하는 거의 영향이 없었으나 30분 또는 60분간 열처리 했을 때, 20%와 40% 정도의 항진균효과가 감소되었다(Table III).

CRP의 항진균효과와 berberine 관련여부

CRP의 항진균효과가 CRP에 잔재된 berberine에 의한 것인지 확인하기 위해 다양한 berberine 농도에서 항진균효과를 Agar Diffusion Susceptibility 방법으로 측정하여 CRP-DS의 항진균효과와 비교하였다. 이 실험에 앞서 H₂O₂-HCl 반응에 미약한 양성 반응을 나타내는 CRP-DS 내의 berberine 잔재여부를 HPLC 방법으로 분석하였을 때, berberine 잔재율은 대략 4% 정도로 검색되었다(Fig. 2). 항진균효과검색에서 사용된 CRP-DS의 최고농도인 2 mg/ml 농도에서 100 μl씩 well에 투여할 경우, CRP-DS에 잔재된 berberine 양을 환산하면 100 μl에 약 8 μg 정도가 함유

된 것으로 계산된다. 이 결과를 berberine의 항진균효과와 비교하면, berberine 10 μg(0.1 mg/ml)에서는 전혀 항진균효과가 없으며 40 μg(0.4 mg/ml)에서 관측된 성장저지환의 크기도 20 mm로 CRP-DS 2 mg/ml에서 형성된 성장저지환보다 25% 이상 더 작음을 알 수 있다(Table IV).

CRP의 *C. albicans* 전신감염에 대한 효과

동물 생체 내 CRP-DS의 독성검사를 선행한 결과, 최고 5 mg CRP를 투여 받은 생쥐그룹과 음성 대조군 생쥐는 30일 관찰기간 동안 모두 생존하였다. 이 결과는 CRP-DS는 최고 5 mg에서 독성이 없는 것으로 간주되었다(data not shown). 이 결과를 근거로 하여 CRP-DS의 캔디다 전신감염 실험에 사용될 농도를 정하였다. 실험결과, 35일간의 관찰기간 동안에 CRP-DS로 투여받은 생쥐그룹의 평균생존율은 26.6±13.1(평균±표준오차)일이었으며, 반면에 대조군 생쥐그룹의 평균생존율은 8.6±1.5일로, CRP-DS를 투여 받은 생쥐그룹은 대조군보다 대략 18일 이상의 생존율이 연장되었다(P<0.01) (Fig. 3).

고 찰

본 연구에서는 새로운 항진균물질 발견의 일환으로 황련에서 분리된 단백질성분의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 검사하였다. 다양한 방법으로 획득한 황련단백질을 각각 BCA 단백질 정량방법으로 검사하였을 때, CRP-DS>CRP-60>CRP-WS>CRP-40 순서로 단백질 농도가 측정되었다. 이 중에서 CRP-DS는 전체 시료의 약 90% 정도로 대부분 단백질로 구성되어 있었다. 단백질 분리과정에서 ammonium sulphate에 의한 단백질 침전방법을 사용했을 때보다 수용성 부분을 제거한 후 DPBS에 용해하는 부분을 취했을 때 단백질농도가 3배 정도 높았다. 이 황련단백질(CRP) 시료들을 전기영동으로 검색하였을 때, 단일밴드로 분리되었으며 GPC 방법으로 분자량이 대략 11.8 KDa으로 추정할 수 있었다. 정제된 CRP-DS, CRP-60, CRP-WS의 항진균활성 검색에서, CRP-DS의 최소억제농도는 대략 50 μg/ml 농도로 관찰되었고 이 농도는 현재 상용되고 있는 fluconazole의 효과와 비견할 수 있는 것으로 사료된다. 또한 이 항진균효과는 농도의존성으로 관찰되었다. 동물을 이용한 실험결과를 고찰할 때, CRP-DS는 전신성 캔디다 감염에 유의성 있는 효과가 있음이 관측되었다.

항진균활성이 CRP-DS 내에 잔재하는 berberine에 기인되는지를 조사하기 위해 CRP-DS 내에 잔재하는 berberine양을 정량 분석하여 항진균활성을 분석하였다. 이론상 추정할 때, CRP-DS는 정제과정에서 분자량이 371.8인 berberine이 pore-size가 8,000 Da 이하인 투석막을 통과하여 제거되어야 하지만 실제로 정제 후 각 CRP들의 정성분석 결과에서 모두 berberine이 존재하였다. Berberine으로 인한 황색 투석액이 모두 소실한 후에,

Table IV - The antifungal activity of CRP-DS and berberine

Sample ¹	CRP-DS		Berberine			
	2	0	0.1	0.2	0.4	0.6
Concentration (mg/ml)	2	0	0.1	0.2	0.4	0.6
Size of inhibition (mm) ²	25	6	6	15	20	23

¹Each sample was diluted with the DPBS.

²Size of a well diameter was 6 mm.

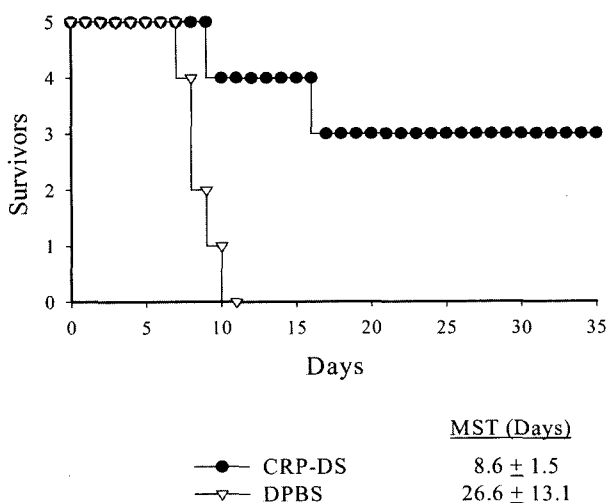


Fig. 3 - Antifungal effect of CRP-DS against disseminated candidiasis. Mice that were given CRP-DS (2 mg/mouse), peritoneally were challenged with *C. albicans* yeast cells (5×10⁵ yeast cells/mouse) by intravenous route, and their survivability was measured. The CRP-treated mice survived longer than control mice that received DPBS during a period of 35-day observation (P<0.01).

가장 항균력이 우수한 CRP-DS에 잔재하는 berberine량을 HPLC 방법으로 측정된 결과 약 4%(=8 µg) 정도의 berberine이 함유되어 있었다. 그러므로 CRP-DS의 항진균효과가 잔재된 berberine으로 인한 효과인지를 검색하기 위해 다양한 농도의 berberine의 항진균효과를 비교하였을 때 10 µg(0.1 mg berberine/ml)의 berberine은 항진균효과가 없었으며, 심지어는 20 µg(0.2 mg berberine/ml)에서 생성된 저지환의 크기도 CRP-DS의 항진균효과로 형성된 저지환의 크기보다 작았다. 이 실험결과로 CRP-DS의 항진균효과가 berberine으로 기인한 것이 아님을 확인하였다. 또한, 만약 항진균효과가 berberine 때문이라고 가정한다면, 황련처럼 berberine을 함유하고 있는 황벽을 CRP-DS 추출방법과 동일한 방법을 사용하여 분리된 단백질 성분에서도 항진균효과가 예상 될 수 있으나, 황련에서 분리된 단백질처럼 그 항진균효과가 없었다. 뿐만 아니라, CRP-DS는 열로 처리하였을 때 항진균효과가 소실되는 점도 CRP의 항진균효과는 단백질 성분에 의한 것으로 평가된다. 물론 한 시간의 열처리 후에도 효과가 50% 지속된 것은 열에 비교적 안정한 단백질성분이 이 항진균효과에 관여하는 것으로 추정된다.

황련에 antimicrobial peptide의 함유가능성은 이미 성상과 기전이 밝혀진 다른 종류의 antimicrobial peptide와 마찬가지로⁴²⁾ CRP가 ionic strength에 따라 활성이 달라진다는 점을 들 수 있다. 즉, DPBS에 용해하는 CRP-DS(pH=7.4)의 경우에는 양이온이 거의 없는 상태이며, 수용성 CRP-WS(pH=5.5)는 양이온이 많으므로, 본 연구 결과(Table II)에서도 이 경우처럼 이온세기가 커질수록 항진균효과가 감소하는 것으로 보아 황련에서 분리된 단백질도 antimicrobial peptide처럼 작동하는 것으로 확증된다.

연구 결과를 종합하면, 황련에서 분리된 단백질은 최근 antimicrobial peptides로 알려진 새로운 개념의 항생물질로 추정되며 현재, 구체적인 CRP의 항진균 작용기전은 본 연구실에서 조사 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국생산기술연구원의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 또한, HPLC 분석에 도움을 준 백주현 연구원에게 감사드립니다.

문 헌

- Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert H., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B. : Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**(3), 309 (2004).
- Loeffler, J. and Stevens, D. A. : Antifungal drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* **15**(Suppl. 1), S31 (2003).
- Perfect, J. R. and Schell, W. A. : The new fungal opportunists are coming. *Clin. Infect. Dis.* **22**(Suppl. 2), S112 (1996).
- Villar, C. C., Kashleva, H. and Dongari-Bagtzoglou, A. : Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. *Oral. Microbiol. Immunol.* **19**(4), 262 (2004).
- Vazquez-Torres, A. and Balish, E. : Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(2), 170 (1997).
- Ashman, R. B. and Papadimitriou, J. M. : What's new in the mechanisms of host resistance to *Candida albicans* infection? *Pathol. Res. Pract.* **186**(4), 527 (1990).
- Odds, F. C., Brown, A. J. and Gow, N. A. : Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**(6), 272 (2003).
- Conly, J., Rennie, R., Johnson, J., Farah, S. and Hellman, L. : Disseminated candidiasis due to amphotericin B resistant *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **165**, 761 (1992).
- Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., Guerra, T. M., Monzon, A. and Rodriguez-Tudela, J. L. : Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 475 (2000).
- Defever, K. S., Whelan, W. L., Rogers, A. L., Beneke, E. S., Veselenak, J. M. and Soll, D. R. : *Candida albicans* resistance to 5-fluorocytosine: frequency of partially resistant strains among clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 810 (1982).
- Hernandez, S., Lopez-Ribot, J. L., Najvar, L. K., McCarthy, D. I., Bocanegra, R. and Graybill, J. R. : Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida esophagitis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(4), 1382 (2004).
- Avrahami, D. and Shai, Y. : A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J. Biol. Chem.* **279**(13), 12277 (2004).
- Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**(12), 5771 (1998).
- Han, Y., Ulrich, M. A. and Cutler, J. E. : *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**(6), 1477 (1999).
- Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against

- disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**(7), 2714 (1995).
- 17) Han, Y., Riesselman, M. H. and Cutler, J. E. : Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* **68**(3), 1649 (2000).
 - 18) Han, Y. and Cutler, J. E. : Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anti-candidiasis monoclonal antibody in these animals. *J. Infect. Dis.* **175**(5), 1169 (1997).
 - 19) Lupetti, A., Nibbering, P. H., Campa, M., Del Tacca, M. and Danesi, R. : Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. *Trends. Mol. Med.* **9**(6), 269 (2003).
 - 20) McCutcheon, A. R., Ellis, S. M., Hancock, R. E. and Towers, G. H. : Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *J. Ethnopharmacol.* **37**(3), 213 (1992).
 - 21) Gibson, B. W., Poulter, L., Williams, D. H. and Maggio, J. E. : Novel peptide fragments originating from PGLa and the caerulein and xenopsin precursors from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **261**(12), 5341 (1986).
 - 22) Jasir, A., Kasprzykowski, F., Lindstrom, V., Schalen, C. and Grubb, A. : New antimicrobial peptide active against Gram-positive pathogens. *Indian. J. Med. Res.* **119**(Suppl), 74 (2004).
 - 23) Giacometti, A., Cirioni, O., Greganti, G., Quarta, M. and Scalise, G. : *In vitro* activities of membrane-active peptides against gram-positive and gram-negative aerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(12), 3320 (1998).
 - 24) Nibbering, P. H., Ravensbergen, E., Welling, M. M., van Berkel, L. A., van Berkel, P. H., Pauwels, E. K. and Nuijens, J. H. : Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect. Immun.* **69**(3), 1469 (2001).
 - 25) Moore, A. J., Beazley, W. D., Bibby, M. C. and Devine, D. A. : Antimicrobial activity of cecropins. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**(6), 1077 (1996).
 - 26) Zhang, L., Yu, W., He, T., Yu, J., Caffrey, R. E., Dalmasso, E. A., Fu, S., Pham, T., Mei, J., Ho, J. J., Zhang, W., Lopez, P. and Ho, D. D. : Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* **298**(5595), 995 (2002).
 - 27) Robinson, W. E. Jr., McDougall, B., Tran, D. and Selsted, M. E. : Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **63**(1), 94 (1998).
 - 28) Edgerton, M., Koshlukova, S. E., Araujo, M. W., Patel, R. C., Dong, J. and Bruenn, J. A. : Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(12), 3310 (2002).
 - 29) De Lucca, A. J. and Walsh, T. J. : Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(1), 1 (1999).
 - 30) Fujimura, M., Ideguchi, M., Minami, Y., Watanabe, K. and Tadera, K. : Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**(3), 642 (2005).
 - 31) Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. and Osborn, R. W. : Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**(4), 1353 (1995).
 - 32) Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. : Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(19), 10520 (2000).
 - 33) Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M. and Abreu, M. T. : Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **173**(9), 5398 (2004).
 - 34) Freile, M. L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzaret, V. and Enriz, R. D. : Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia.* **74**(7-8), 702 (2003).
 - 35) Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A. and Lewis, K. : Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydronecarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(4), 1433 (2002).
 - 36) [No authors listed] Berberine : *Altern. Med. Rev.* **5**(2), 175 (2000).
 - 37) Han, Y. : Berberine synergy with amphotericin B against growth of *Candida albicans*. *Dongduk Pharm. Res.* **6**(6), 49 (2002).
 - 38) Cutler, J. E., Granger, B. and Han, Y. : *Candida and Candidosis*. ASM Press, Washington, D.C. pp. 243-256 (2003).
 - 39) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(3), 541 (2005).
 - 40) Han, Y. and Lee, J. H. : A pneumococcal conjugate vaccine formula induces protection in mice against disseminated disease due to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Pharm. Soc. Korea* **48**(6), 345 (2004).
 - 41) Rex, J. H., Pfaller, M. A., Lancaster, M., Odds, F. C., Bolmstrom, A. and Rinaldi, M. G. : Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards--recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J. Clin. Microbiol.* **34**(4), 816 (1996).
 - 42) Brogden, K. A. : Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(3), 238 (2005).