

황련단백질의 항칸디다 작용기전 및 항피부칸디다증 효과

이주희 · 심진기* · 한용문#

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학교실, *한국생산기술연구원

(Received August 30, 2005; Revised October 11, 2005)

Mode of Action of Coptidis Rhizoma Protein (CRP) and Its Activity Against Subcutaneous Candidiasis due to *Candida albicans*

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 — Our previous data showed the protein isolated from Coptidis Rhizoma (CRP) had antifungal activity. In present study, we examined mode of action of the CRP and its activity against subcutaneous candidiasis due to *C. albicans* yeast cells. Results showed that the CRP blocked hyphal production from yeast form of *C. albicans*. The CRP also activated RAW 264.7 monocyte/macrophage cell line, which resulted in nitric oxide (NO) production from the cells. This activation seemed to increase macrophage phagocytosis to destroy the invaders. Like other antimicrobial peptides, CRP was influenced by ionic strength, thus resulting in a decrease of antifungal activity. In murine model of a subcutaneous candidiasis, the sizes of infected areas of the nude mice given the CRP after subcutaneous injection of *C. albicans* yeast cells to the dorsal skin were 90% less than those of the nude mice groups that received DPBS instead of the CRP. All data indicate that the CRP, which appeared to act like an antimicrobial peptide and to inhibit the morphological transition from blastoconidia, was effective against the subcutaneous disease.

Keywords □ *C. albicans*, Coptidis Rhizoma, subcutaneous candidiasis, mode of action, antimicrobial peptide

*Candida albicans*는 다형태성 진균으로 병원성 혈류감염의 원인균으로는 4위를 차지하고 치사율이 거의 40%에 달하는 병원균이다.^{1,2)} 건강한 숙주에서는 주로 효모균 형태(blastoconidia)로 존재하며 면역력이 약화되면 germ tube를 형성하여 균사를 형성하기도 한다.³⁾ 이런 형태변화는 secreted aspartyl proteinase, phospholipase 등의 효소생성, 부착성(adherence), 세포표면물질의 phagocytosis에 대한 저항성 등과 함께 주요한 병원성 인자로 알려져 있으며,^{4,5)} 이 중에서도 균사생성은 *C. albicans*의 발병성(pathogenesis)에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} *C. albicans*는 전신감염과 질염같은 국소감염을 유발하며,²⁾ 특히 피부감염의 경우에는 기존의 항진균제에 대해 내성이 많이 보고되고 있으며, 이는 당뇨병과 같은 소모성 질환자와 면역력이 약화된 암환자의 증가로 기인하는 것으로 추정된다.⁸⁾ 그

리므로 새로운 형태의 항진균제 개발이 요구된다.

본 연구실의 이전 연구결과에서, 황련(Coptidis Rhizoma)에서 추출된 단백질성분이 *C. albicans*의 성장을 억제하는 항진균효과가 있음이 *in-vitro*와 *in-vivo* 실험조건하에서 관측된바 있다.⁹⁾ 분자량이 대략 12 kDa인 황련단백질(Coptidis Rhizoma Protein; CRP)의 항진균효과는 한천확산 감수성테스트방법으로 검색하였을 때 임상에서 상용되고 있는 fluconazole의 효과와 거의 동등한 것으로 판정되었으며, 또한 동물실험에서는 예방효과가 있었다.⁹⁾ 그러나, CRP의 항진균효과는 열에 불안정하여 CRP를 열처리하였을 때는 항진균효과가 감소되어 단백질의 특성인 열에 불활성화됨을 알 수 있었다.

실제로 Antimicrobial peptides의 모든 작용기전은 확실하게 규명되지 않았으나 지금까지 알려진 주요 작용기전에 의하면, antimicrobial peptides가 생체막(plasma membrane)에 반응할 때, 양극성의 α -helix 구조로 변형되어 병원균 세포막으로 삽입되면 보체계의 MAC(membrane attack complex)처럼 pore를 형성하여 삼투압에 의하여 파괴시키거나,^{10,11)} 구조적으로 유사한

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

병원균 세포의 수용체에 결합하여 대사과정을 방해함으로써 감염균을 사멸하는 것으로 추정된다.¹²⁾ 이 외에도 proteinase와 α -amylase에 의한 억제효과와 단백질 전사과정의 억제 방어기전도 있으며,¹³⁾ antimicrobial peptides의 항균활성은 이온 영향으로 이온세기(ionic strength)가 증가할수록 항균활성이 감소하는 것으로 알려져 있다.^{13,14)}

본 연구에서는 *C. albicans*의 병원성인자와 antimicrobial peptide의 작용기전의 상관성을 고려하여 CRP의 *C. albicans*에 대한 성장억제기전을 조사하여 *C. albicans*로 인한 피부질환에 대한 CRP의 효과를 측정하였다. 부수적으로 본 실험에서 제시된 피부 칸디다증 동물모델은 약물의 피부칸디다증 효과검색에 이용될 수 있는 새로운 방법으로 기대된다.

재료 및 방법

생약재료

황련(Coptidis Rhizoma)은 서울 경동시장에서 식품의약품안전청(KFDA)에서 인증된 제품을 구입하여 사용하였다.

실험균주 및 배양조건

본 연구실에 이전의 다른 연구에 많이 사용된 *C. albicans* CA-1과 A9 strains^{9,15,16)}를 사용하였으며, GYEP(glucose, yeast extract, peptone) 고형배지에 37°C에서 48시간 먼저 배양한 후 GYEP 액체배지에 분주하여 shaker incubator에서 동일한 온도에서 24시간씩 세 번 계대 배양하여^{15,16)} 사용하였다. 동물실험에서는 배양된 세포를 인산완충용액(DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma, St. Louis, Mo, USA)으로 세척하여 원하는 세포농도를 hemocytometer로 숫자를 측정하여 DPBS(pH =7.4)에 희석하여 사용하였다.

합체

정상적 동물(생쥐)의 면역력 저하를 위해, 생쥐에 anti-mouse 호중구 단항체인 RB68C5(anti-Gr-1)을 투여하였다. 이 단항체의 특성은 이미 타연구실에서 규명된 바 있으며,¹⁷⁻²¹⁾ 본 연구실의 다른 연구에서 사용되어 호중구 감소효과를 입증한 바 있다.²²⁾

실험동물

6~7주령의 BALB/c 암컷생쥐와 암컷 nude mice(CAN.Cg-Foxn1nu/crl strain)를 Charles River Lab, NY, USA에서 구입하여 사용하였다. 이 생쥐들은 고압멸균한 filter cages에서 사육하였으며, 멸균된 사료(Orient, Seoul, Korea) 및 물은 자유롭게 먹게 하였다. 사육은 항원조와 공기여과장치가 완비된 청결한 동물사육실 안에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였고, 동물사육실의 환경은 온도 22±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하고 조명

은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다.

황련단백질(CRP)의 추출

황련단백질은 본연구실에서 규명된 방법⁹⁾으로 추출 분리하였다. 간략하게 기술하면, 황련가루 50 g에 80% methanol(200 ml)을 가하여 간헐적인 진탕을 하면서 실온에서 3일간 방치한 다음 상등액을 수집하여 여과(TOYO No 2. Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)한 용액을 rotary vacuum evaporator(Eyele, Tokyo, Japan)으로 감압 농축한 후, DPBS를 첨가하여 용해한 액을 dialysis tubing [MWCO=8,000 Da(Spectra/Por, Spectrum Lab. Inc., USA)]에 넣고 멸균 증류수에 대하여 4°C에서 96시간 투석한 후 동결건조(FD-1000, Tokyo, Japan) 하였다. 분말화된 CRP는 -20°C에 보존하며 사용하였다. 단백질 함유정도는 BCA시약(Pierce, USA)을 사용하여 측정하였고, 단백질 순도측정은 이전에 보고한 방법과 동일하게 전기영동 방법과 HPLC 방법을 사용하였으며,^{9,12)} CRP 추출물의 endotoxin 오염성 여부는 LAL endotoxin kit(Timed Gel formation, Sigma)을 사용하여 검색하였다.

CRP의 균사생성(hyphal production) 억제효과검색

CRP의 항진균효과의 작용기전 검색을 위해, *C. albicans*의 주요 병원성인자의 한 종류인 균사생성 억제효과를 조사하였다. 균사유도를 위해 정상생쥐(BALB/c strain)의 혈청을 5%로 GYEP 액체배지에 첨가하고 CRP를 0.5 mg/ml 농도로 투여한 다음 효모형태(blastoconidia, yeast form)의 *C. albicans*(3×10⁶ cells/ml)를 접종하여 37°C shaker incubator(150 rpm)에서 1.5~2시간 배양한 후, 200개 이상의 세포를 hemocytometer(Hausser Scientific Horsham, PA, USA)를 사용하여 현미경하에서 균사형성 유무를 측정하였다. 혈청은 *C. albicans*의 균사형성을 유도하는 작용이 있음이 알려져 있다.³⁾

CRP의 macrophage 활성화에 의한 Nitric Oxide(NO) 생성시험

CRP의 macrophage 활성을 조사하기 위해 NO 생성여부를 본 연구실에서 사용하는 방법으로 이행하였다.^{23,24)} 간략히 기술하면, RAW 264.7 monocyte/macrophage cell line [한국세포주은행(KCLB)]을 2×10⁵ cells/well의 세포농도로 96-well plates (Falcon, USA)에 넣고 지정된 well에 다양한 농도(20, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 µg/ml)로 희석한 CRP를 100 µl 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 24, 48시간 동안 배양하였다. 양성대조군 well에는 LPS (*Escherichia coli*. 026:B6, L-2654, Sigma)를 1 µg/ml 투여하였고 음성대조군 well에는 DPBS 100 µl만을 첨가하였다. 24, 48시간 배양 후에 세포배양액(100 µl)을 새로운 96-well plate에 각각 넣고 Griess 시약²³⁾을 첨가하여 30분 동안 반응시킨 다음 550 nm

의 파장에서 microplate reader(Winooski, Vermont, USA)로 흡광도 값을 측정하였다. 표준검량곡선은 NaNO_2 (Chameleon, Osaka, Japan)을 사용하여 시험군의 NO 생성정도를 비교 측정하였다.

CRP 항진균작용에 대한 이온세기(ionic strength)의 영향

일부 Antimicrobial peptides의 항균효과는 칼슘의 이온세기에 영향을 받는 것으로 보고 된바 있다.^{13,14} 본 실험에서는 CRP의 항진균효과가 이온세기의 영향을 받는지 조사하기 위해서 CRP를 다양한 농도의 칼슘으로 전 처리한 후, *C. albicans*에 대한 성장억제효과를 상기 기술한 한천확산방법^{9,15,16}으로 검색하였다. CaCl_2 의 농도를 0, 20, 40, 80, 100, 500 mM로 조정된 DPBS에 CRP의 최종농도가 2 mg/ml가 되도록 준비하여 사용하였다. 대조군 well에는 DPBS 100 μl 만을 넣었으며 모든 plates는 4°C에서 24시간 배양한 후, 37°C incubator에서 48시간 배양하고 성장저지환의 크기를 측정하였다.

피부칸디디증(subcutaneous candidiasis)에 대한 CRP의 항진균효과 검색

CRP의 피부칸디디증에 대한 효과를 조사하기 위해 nude mice에 항호중구 단항체(RB68C5)를 25 mg/mouse 농도로 정맥주사한 후, 48시간 후에 *C. albicans*(1×10^7 yeast cells/mouse)와 CRP 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 를 이 생쥐 등부분에 피하주사하고 감염부위의 크기를 측정하여 CRP를 투여하지 않은 대조군과 비교하였다. 또 다른 실험군으로는 RB68C5 항체로 전처리하지 않고 CRP와 *C. albicans*를 투여한 대조군 nude mice그룹과 비교하였다. 감염부위의 크기는 48시간 간격으로 측정하여 검사하였다.

자외선(Ultraviolet)의 CRP 항진균효과에 대한 영향검사

피부칸디디증에 대한 CRP의 효과를 조사하기 전에, CRP의 피부적용시 안정성을 검색하기 위하여 CRP를 UV로 처리한 다음에 한천확산방법^{9,15,16}을 사용하여 항균효과 감소여부를 조사하였다. 즉, DPBS에 용해한 CRP를 멸균 유리시험관에 넣고 UV-lamp 하에서 1, 4, 5, 10시간 동안 조사(exposure)한 후 그 효과를 한천확산방법으로 측정하였다. UV-lamp는 fluorescent-typed lamp(15 Watts; 파장@ 312 nm; Uvitec, Korea)로 시료와 UV-lamp와의 거리는 20 cm이었으며, 사용된 CRP의 농도는 2 mg/ml으로 DPBS로 희석하여 사용하였다. 대조군 well에는 DPBS 100 μl 만을 넣었으며 모든 plates는 4°C에서 24시간 배양한 다음 37°C incubator에서 48시간 계속 배양한 후 성장저지환의 크기를 측정하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)으로 계산하였으며,

각 군 간의 유의성은 Student's *t*-test를 사용하여 *P* 값이 0.05 미만일 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

CRP의 균사형성 억제

CRP로 처리한 효모형태의 *C. albicans*를 90분 이후 현미경하에서 형태변화를 관찰했을 때, CRP로 처리한 *C. albicans*는 50% 정도의 균사생성이 억제되었고, 균사를 생성한 *C. albicans* 중에서도 진균사(true hyphae) 생성은 27.5%로 관측된 반면에 DPBS로 처리한 음성대조군은 거의 90%가 균사를 생성하였다(Table I). 이는 출아(budding) 실패로 생성되어 균사처럼 보이는 소위 가균사(pseudohyphae) 생성이 CRP로 처리된 실험군이 음성대조군 보다 6배 정도 높아서 CRP의 작용기전은 세포막에 작용하여 성장 번식을 억제하는 것으로 인식된다. 반복 실험에서도 거의 동일한 실험결과가 획득되었다. 결과적으로, CRP는 *C. albicans*의 가장 중요한 병원성인자인 균사생성을 방해하여 균의

Table I - The CRP inhibits the hyphal production from blastoconidial *C. albicans* (unit : %)

Forms of <i>C. albicans</i> (Ca)	CRP-untreated	CRP-treated
Hyphal-forming Ca	85.6±4.9 ¹	27.5±3.7
Pseudohyphal-forming Ca	3.8±0.7	22.0±2.5
Blastoconidial Ca	10.6±1.9	50.5±6.7

Note: ¹mean±S.D.

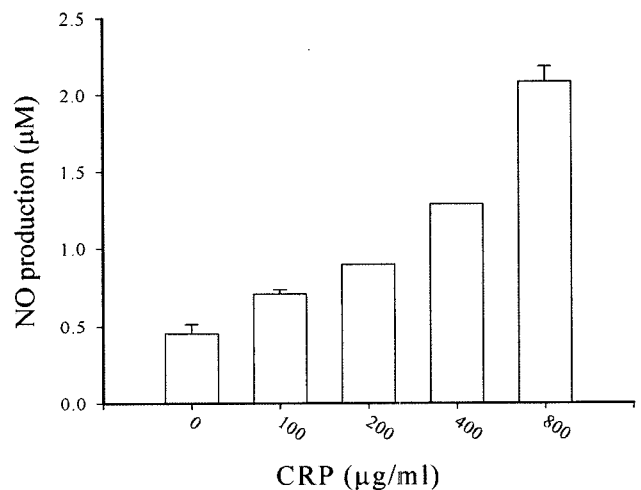


Fig. 1 - The CRP induces NO production by the macrophages activation. RAW264.7 monocyte/macrophage cell line was treated with various doses of the CRP, and NO production from the macrophages were measured with use of Griess reagents. Results showed that NO was produced from the CRP-treated macrophages in a dose-dependent fashion. The LPS used as a positive control resulted in NO production of (14.0±0.87) μM .

병원성을 감소시킬 수 있는 것으로 사료된다.

CRP의 macrophage 활성화에 의한 NO 생성 유도

CRP의 직접적인 항칸디다 효과 이외에 탐식세포에 의한 항진균효과를 관찰하기 위해 대식세포(macrophages)의 활성화 여부를 검색하였다. CRP를 macrophages에 처리한 다음에 24시간 후에 상등액을 취해 NO 생성을 측정된 결과, CRP는 macrophage를 활성화시켜 NO를 생성하게 하였으며 이 효과는 농도 의존적으로 검색되었다(Fig. 1). 음성대조군의 경우 배양동안 자연적으로 생성된 NO 농도는 0.45 μM 이었으며, 양성대조군인 LPS로 활성화된 경우 NO 생성은 대략 14.0 μM 정도로 측정되었다(Fig. 1). CRP의 macrophages 활성화는 CRP의 직접적인 접촉에 의한 균의 성장도 억제하고(Table I 참조바람), 간접적으로 macrophage를 활성화하여 탐식작용의 증대로 균을 제거하는 것으로 추정된다.

CRP 항진균효과에 대한 이온세기의 영향

CRP의 항진균효과에 대한 이온세기의 영향 조사에서 Ca^{2+} 이온의 농도가 증가함에 따라 CRP의 항진균효과가 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Table II). CaCl_2 의 농도가 100 mM과 500 mM인 경우에는 DPBS만 넣은 음성대조군에 비하여 각각 25%와 45%의 항진균효과가 감소됨을 관찰할 수 있었다. 그러므로, 이온세기에 의한 CRP의 효과감소는 기존의 antimicrobial peptide의 작용기전과 유사한 것으로 추정된다.^{10,13,14)}

Table II – Antifungal activity of the CRP¹ is influenced by the ionic strength

[CaCl ₂] (mM)	Size of inhibitory zone ² (mm)
0	23.5±2.1 ³
20	22.5±0.7
40	21.0±0.0
80	20.5±0.7
100	20.0±0.0
500	17.0±1.4

NOTE : ¹The concentration was at 2 mg/ml. ²Size of a well diameter was 6 mm. ³mean±S.D.

Table III – The CRP has preventive effect against cutaneous candidiasis caused by *C. albicans*

Mice groups	Treatments			Size of infected area (mm ²) ¹
	α -neutrophil Ab	CRP	<i>C. albicans</i>	
I	+ ²	+	+	8.78±6.48
II	- ³	+	+	1.03±0.06
III	-	-	+	9.47±4.39

Note : ¹The measurement was evaluated in mean±S.D. ²(+) indicates the test animals received treatment. ³(-) indicates the test animals received no treatment.

Table IV – UV-ray has no influence on the antifungal activity of the CRP¹

Duration of UV-exposure (hr)	Size of inhibitory zone ² (mm)
0	27.0±1.5
1	26.0±0.9
4	27.0±1.3
5	25.0±0.5
10	24.0±0.8

Note : ¹Concentration of all samples was at 2 mg/ml. ²Size of a well diameter was 6 mm.

CRP의 피부칸디다증에 대한 효과

CRP의 *C. albicans*으로 기인한 피부감염증에 대한 억제효과 여부를 검사하였을 때, CRP를 투여 받은 생쥐군의 감염크기는 CRP를 투여받지 못한 대조생쥐군에 비교할 때 거의 90% 정도의 감염부위가 감소되어($P<0.05$) 치료효과가 있음을 알 수 있었다(Table III). 또한, RB68C5로 전 처리하고 CRP를 투여 받은 생쥐그룹의 경우에도 CRP를 투여 받지 못한 음성대조군보다 감염크기가 작으나 통계적으로는 유의성이 없는 것으로 판정되었다(Table III). 상기 결과는 CRP가 *C. albicans*로 유발된 피부칸디다증에 효과가 있는 것으로 사료된다. 그러나, 피부적용시에 햇빛에의 노출을 고려하여야 하므로 최소한적으로 CRP의 자외선 노출에 대한 안정성 유무를 조사하였다.

CRP 항진균효과에 대한 자외선의 영향

CRP에 대한 자외선 영향을 검사한 결과, 자외선으로 처리하지 않은 CRP로 처리된 *C. albicans*의 성장억제력의 크기는 대략 27 mm로, 이 크기는 1시간 또는 4시간 동안 자외선으로 조사(exposure)된 CRP의 항진균효과와 비교할 때 차이가 거의 없었으며, 그 이상의 기간인 5시간 또는 10시간 동안 자외선에 노출한 경우에도 CRP의 항진균효과는 거의 변동이 없었다(Table IV). 이 결과는 CRP가 자외선에 영향을 받지 않는 것으로 평가되어지므로 *C. albicans*로 유발된 피부감염증에 CRP를 피부에 적용시 햇빛에의 노출에 안정할 것으로 사료되어 진다.

결 론

본 연구실의 이전 연구에서 황련에서 추출된 단백질(CRP)이 *C. albicans*의 성장을 억제함을 규명한바 있다. 계속적인 연구로 CRP의 *C. albicans*에 대한 성장억제 기전을 조사하고 *C. albicans*로 기인한 피부질환에 대한 CRP의 효과를 조사결과, CRP의 항진균작용 효과는 *C. albicans*의 가장 중요한 병원성인자인 균사생성을 방해하여 균의 병원성을 감소시키는 것으로 조사되었다. 또한, macrophages 활성화에 의한 NO 생성이 검색되었다. 이 결과는 본 연구실의 다른 연구결과에서, 동종의 RAW264.7 cell line이 활성화 되었을 때 탐식작용이 증진되는 것과 비견하면, 탐

식작용의 증대가 추정된다. 한편, 이온세기에 의한 CRP의 효과 감소는 기존의 antimicrobial peptide의 작용기전과 유사한 것으로 추정되어, 본 연구에서 최초로 밝혀진 CRP가 antimicrobial peptide의 한 종류로 사료된다. 이에 대한 근거로, 현재 진행 중인 실험에서 CRP가 최소 6 소단위의 peptide로 구성되어 있는 것으로 확인 되었다(unpublished data). 동물실험에서, CRP는 *C. albicans*로 유발된 피부칸디다증에 효과로 인하여, 음성대조군에 비교할 때 거의 90%의 효과가 있는 것으로 평가되었다. CRP의 피부 적용시 햇빛노출을 고려하여 CRP의 자외선 노출에 대한 안정성 유무를 조사한 결과, CRP의 항진균효과는 자외선에 영향을 받지 않는 것으로 밝혀져서 CRP의 외용적용에 안정한 것으로 고려된다. 본 실험의 부수적인 결과는 본 연구에서 제시된 피부 칸디다증 동물모델은 타 종류 약물의 피부칸디다증 효과검색에 적용가능성이 기대된다. 이 모든 결과를 종합할 때, 황련에서 분리된 단백질은 최근 antimicrobial peptides로 알려진 새로운 개념의 항생물질의 가능성이 있을 것으로 추정되며, 임상적인 적용가능성이전에 진균기인성 피부질환에 예방차원의 제제(예 : 기능성 화장품)로서의 가능성을 제시 할 수 있다. 또한 독성으로 인해 부작용이 많은 기존의 항진균제와 병용 사용하여 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구결과를 바탕으로 CRP를 구성하는 peptides에서 항진균효과가 있는 sequence를 규명하여 biotechnology를 응용한 대량의 antimicrobial peptides를 생산하기 위한 방법을 실험연구 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 산자부 중기거점/차세대신기술개발 사업의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 그리고 시료혼합용 기체를 제공해준 네비온주식회사의 최문재 소장님께 아울러 감사드립니다.

문헌

- 1) 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).
- 2) Perfect, J. R. and Schell, W. A. : The new fungal opportunists are coming. *Clin. Infect. Dis.* **22**(Suppl. 2), S112 (1996).
- 3) 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).
- 4) Vazquez-Torres, A. and Balish, E. : Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(2), 170 (1997).
- 5) 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).
- 6) Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Marcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. and Thomas, D. Y. : *Curr. Biol.* **7**(8), 539 (1997).
- 7) Phan, Q. T., Belanger, P. H. and Filler, S. G. : Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**(6), 3485 (2000).
- 8) Kamai, Y., Maebashi, K., Kudoh, M., Makimura, K., Naka, W., Uchida, K. and Yamaguchi, H. : Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *Microbiol. Immunol.* **48**(12), 937 (2004).
- 9) Kim, H., Lee, J. H., Shim, J. K. and Han, Y. : Anticandidal activity of the protein substance from *Coptidis Rhizoma*. *Yakhak Hoeji* **49**(4), 323 (2005).
- 10) Zasloff, M. : Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**(6870), 389 (2002).
- 11) Lee, D. G., Park, Y., Kim, H. N., Kim, H. K., Kim, P. I., Choi, B. H. and Hahm, K. S. : Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2--20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**(4), 1006 (2002).
- 12) Fleury, Y., Dayem, M. A., Montagne, J. J., Chaboisseau, E., Le Caer, J. P., Nicolas, P. and Delfour, A. : Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.* **271**(24), 14421 (1996).
- 13) Brogden, K. A. : Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(3), 238 (2005).
- 14) 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).
- 15) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(3), 541 (2005).
- 16) Han, Y. : Berberine synergy with amphotericin B against growth of *Candida albicans*. *Dongduk Pharm. Res.* **6**(6), 49 (2002).
- 17) Jutila, M. A., Kroese, F. G. M., Julita, K. L., et al. : Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1819 (1998).

- 18) Fleming, T. J., Fleming, M. L. and Malek, T. R. : Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 Mab to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* **151**, 2399 (1993).
- 19) Jutila, M. A., Kishimoto, T. K. and Finken, M. : Low-dose chymotrypsin treatment inhibits neutrophil migration into sites of inflammation *in vivo* : effects on Mac-1 and MEL-14 adhesion protein expression and function. *Cell Immunol.* **132**, 201 (1991).
- 20) Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Maroushek, N., Wagner, R. D. and Steinberg, H. : Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **152**, 1836 (1994).
- 21) Pekarek, L. A., Starr, B. A., Toledano, A. Y. and Schreiber, H. : Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 435 (1995).
- 22) 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).
- 23) Han, Y. : Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **5**(6), 1049 (2005).
- 24) Han, Y., Jin, B. S., Ko, S. K. and Lee, J. H. : Immunoactivity of ginsenosides Re and Rg1 that enhances resistance of mice against experimental disseminated candidiasis. *Natural Product Sciences* **10**(3), 134 (2004).