

황련 유래 Antimicrobial Peptide의 *Candida albicans* 감염 억제효과

이 주 희[#]

부산대학교 한의학 전문대학원

(Received April 14, 2011; Revised May 6, 2011; Accepted May 12, 2011)

Effect of Antimicrobial Peptide from *Coptidis Rhizoma* on *Candida albicans* Infection

Jue-Hee Lee[#]

School of Korean Medicine, Pusan University, Yangsan 626-870, Korea

Abstract — We previously reported the protein isolated from *Coptidis Rhizoma* (CRP), which has antifungal activity against a fungal pathogen, *Candida albicans*. In the current study, we investigated what portion in the CRP is responsible for the antifungal activity. For the investigation, the CRP was fractionated on a Shepadex G-50 column. Data resulting from the fractionation, seven fractions were obtained. Fractions (Fr.) I, II, and III eluted initially from the column showed no inhibitory effect on the growth of *C. albicans*, whereas Fr. IV, V, and VI eluted later revealed inhibition of the growth, and Fr. IV and VI showed potent antifungal activity by broth susceptibility analysis. However, Fr. VI was contained in the CRP more than Fr. IV, which led us to select the VI for the following experiments. In a murine model of a subcutaneous candidiasis caused by *C. albicans*, the Fr. VI displayed a therapeutic effect on nude mice pretreated with anti-neutrophil monoclonal antibody (RB68C5) and then infected subcutaneously with live *C. albicans*. At day 16, these mice were healed almost up to 78% of the infected area when compared to infected area of control nude mice that received diluent (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; DPBS), instead of the Fr. VI ($P < 0.01$). The Fr. VI blocked hyphal formation from blastoconidial form of *C. albicans* ($P < 0.01$), which might prevent penetration of hyphae to the deeper site of skin and thus helps the healing. In the ionic strength test, the effect of Fr. was influenced by Ca^{2+} ion just like other known antimicrobial peptides, but the influence was affected at an extremely high concentration such as 500 mM. Thus, such ion-concentration is considered to be meaningless in the clinical situation. Considering all data together, *Coptidis Rhizoma* is appeared to produce an antimicrobial peptide that has therapeutic effect on subcutaneous infection caused by *C. albicans*.

Keywords □ *Coptidis Rhizoma* protein (CRP), antimicrobial peptide, *C. albicans*, antifungal activity, RB68C5, subcutaneous candidiasis, ionic strength

Antimicrobial peptides는 주로 원생동물(protozoa), 후생동물(metazoa), 개구리와 같은 양서류, 그리고 일부 고등식물과 동물에서도 분비되는 것으로 보고되고 있다.¹⁻³ 사람의 피부에서 분비되는 Psoriasin도 antimicrobial peptide(Apep)의 일종이다.⁴ 현재까지 알려진 종류는 약 900여종으로, 각 경우에 그 특성은 차이가 있지만 공통적으로 Apep은 모두 양이온성 아미노산을 함유하고 있다.³ 이 물질은 선천성 면역반응(Innate immune response)에 관여하며 감염성 병원균에 대한 방어 차원에서 분비되는 것으로 알려져 있다.^{3,4} Apep의 항균작용기전은 확실하

게 규명되지 않았으나, 최근까지 주요 작용기전에 의하면, 이 물질이 생체막(plasma membrane)에 반응 할 때, 양극성의 α -helix 구조로 변형되어 병원균 세포막으로 삽입되면 보체계의 MAC(membrane attack complex) 경우처럼 pore를 형성하여 삼투압에 의하여 파괴시키거나,^{5,6} 구조적으로 유사한 병원균 세포의 수용체에 결합하여 대사과정을 방해함으로써 감염성 병원균을 사멸하는 것으로 추정 된다.⁷ 이 외에도 proteinase와 α -amylase에 의한 억제효과와 단백질 전사과정의 억제 방어기전도 있으며,¹³ Apep의 항균활성은 ion의 영향을 받아 이온세기(ionic strength)의 증가에 따라 항균활성은 감소하는 것으로 알려져 있다.^{8,9}

본 연구실의 기연구에서, 황련(*Coptidis Rhizoma*)에서 분리된 단백질성분이 병원성 진균인 *C. albicans*에 대한 항균효과가 있음을 보고한바 있다.¹⁰ 이 항균효과는 임상에서 상용되고 있는

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

fluconazole의 효과와 거의 동등한 것으로 평가되었다. 황련단백질(Coptidis Rhizoma: CRP)로 명명된 이 단백질은 *Candida albicans*의 균사형성(hyphal formation)을 억제하는 효과가 있으며, macrophage를 활성화하여 탐식작용을 증진하는 효과가 있음을 확인한 바가 있다.¹⁰⁾ 또한, 자외선에 대한 안정성 조사에서 CRP는 10시간의 동안의 자외선 노출에도 안정하여 자외선에 영향을 받지 않는 덕분에 CRP의 피부적용에도 거의 무관함을 규명한 바가 있다.¹⁰⁾ 이를 근거로 하여, 지속적인 연구를 통해서 CRP는 *C. albicans* 기인성 피부감염에 대해서도 항균효과가 있음을 아울러 규명하였다.¹¹⁾ 그러나, CRP의 항균효과는 열에 불안정하여 CRP를 열처리 하였을 때는 항균효과가 감소되어 단백질의 특성이 열에 불활성화 됨을 알 수 있었다. 한편, 일반적인 Apep의 특성과 유사하게 이온세기에 영향을 받아서 CRP에 칼슘이온의 함유정도가 증가함에 따라서 CRP의 항균효과가 감소하는 특징이 있지만, 100 mM 정도의 $CaCl_2$ 고농도 까지도 항균효과는 지속이 되었고 500 mM 정도의 농도에서도 최대 20% 정도의 항균효과가 감소될 정도여서 현실적인 주변 환경에서는 거의 ionic strength(이온세기)에 영향을 받지 않음을 알 수가 있었다.¹¹⁾ 그러므로 이온세기 검색실험은 단순히 CRP가 기존에 알려진 Apep의 특성이 있는지의 여부를 검색하기 위한 것이므로 이 물질의 약품화에는 큰 지장은 없는 것으로 사료된다.

본 연구에서 분리된 Apep의 효능을 검색하기 위해 선정된 병원성 진균인 *C. albicans*는 다형태성 진균으로, 혈류감염의 병원균으로는 4위를 차지하며 치사율이 거의 40%에 이르는 병원균이다.^{12,13)} 건강한 사람에서도 기회성병원균(opportunistic pathogen)으로 존재하는데, 주로 효모균 형태(blastoconidia)로 존재하며, 숙주의 면역력이 약화되면 균사(hyphae)를 형성하여 병원성을 높이기도 한다.¹⁸⁾ 이렇게 *C. albicans* 균주의 형태변화(morphological transition)는 secreted aspartyl proteinase, phospholipase, 부착성(adherence) 물질분비 그리고 세포표면물질의 탐식작용(phagocytosis)에 대한 저항성등과 함께 *C. albicans*의 주요한 병원성 인자로 알려져 있으며,^{15,16)} 이러한 병원성 인자들 가운데, 균사생성은 이 진균의 발병성에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{17,18)} 감염의 종류를 보면, *C. albicans*는 전신감염은 뿐만 아니라 아구창(thrush)과 여성의 질염과 같은 국소감염을 유발한다,¹³⁾ 특히, 피부감염의 경우에는 기존의 항진균제에 대해서 내성이 많은데, 이는 최근에 당뇨병을 앓고 있는 소모성 질환자와 면역력이 약화를 유발하는 암환자의 증가에 의한 것으로 사료된다.¹⁹⁾ 이런 까닭에, 안전하고 내성이 없는 새로운 형태의 항진균제개발에 집중적인 연구가 국외에서는 활발하게 진행되고 있다.

이에, 본 연구에서는 본 연구실의 기 연구에서 황련에서 Apep 분비의 가능성을 최초로 제시한 후, 지속적인 연구를 통해서 CRP에 함유된 Apep에 대한 더 구체적인 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

생약재료

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

실험균주 및 배양조건

본 연구실에 기 연구에서 그 성상이 규명된 CA-1 strain^{5,19,20)}을 사용하였으며, 배양조건은 37°C에서 GYEP(glucose, yeast extract, peptone) 고형배지에 48시간 동안 배양한 후 GYEP 액체배지에 분주하여 shaker incubator에서 동일한 온도(37°C)에서 24시간씩 세 번 계대 배양한 다음에^{20,21)} 사용하였다. 이와 같이 배양된 세포를 인산완충용액(DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma, St. Louis, Mo, USA)으로 세척하고, 세포농도는 hemocytometer로 균의 수효를 측정하여 DPBS (pH=7.4)에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6~7주령의 BALB/c 암컷 생쥐와 BALB/c 암컷 nude mice (CAN.Cg-Foxn1nu/crl strain)를 Charles River Lab, NY, USA에서 구입하여 사용하였다. 이 생쥐들은 고압 멸균한 filter cages에서 사육하였으며, 멸균된 사료(Orient, Seoul, Korea) 및 물은 자유롭게 먹게 하였다. 사육은 항원기와 공기여과장치와 완비된 청결한 동물사육실 안에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였고, 동물사육실의 환경은 온도 20±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하고 조명은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다.

항체

정상적 생쥐의 면역력 저하를 위해, 생쥐에 anti-mouse neutrophil 단항체인 RB68C5(anti-Gr-1)을 사용하였다. 이 단항체의 특성은 이미 타 연구실에서 규명된 바 있으며,²¹⁻²⁵⁾ 본 연구실에서도 이 항체의 호중구에 대한 감소효과를 입증한 바 있다.^{26,27)}

황련단백질(CRP)의 추출 및 CRP의 분획

황련단백질은 본 연구실에서 규명된 방법^{10,11)}으로 추출 분리하였다. 추출방법을 간략히 기술하면, 황련가루에 80% methanol을 가하여 간헐적인 진탕을 하면서 실온에서 3일간 방치한 후, 상등액을 수집해서 여과한 다음에 여과용액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan)으로 감압 농축하였다. 농축액에 DPBS를 첨가하여 용해한 액을 dialysis tubing [MWCO=8,000 Da(Spectra/Por, Spectrum Lab. Inc., USA)]에 넣고 멸균 증류수에 대하여 4°C에서 96시간 투석하고 동결건조(FD-1000, Tokyo, Japan) 하였다. 단백질 함유정도는 BCA(Bicinchoninic acid assay; Pierce, USA) 방법을 사용하여 측정하였다.^{7,10)} CRP 추

출물의 endotoxin 오염성여부는 LAL endotoxin kit(Sigma)을 사용하여 검색하였다.

CRP의 항균활성 분획(Fraction: Fr.)을 분리하기위해 Gel-permeation chromatography 방법을 사용 하였다. 즉, CRP를 멸균한 DPBS에 녹인 후, syringe filter(0.45 µm; sartorius, Grtmany) 방법으로 여과하였다. 이 중 1 ml 시료를 취하여 Sephadex G-50 fine(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)로 충전한 Column(2 cm wide×70 cm long) 넣고 멸균 증류수로 용출하여 분자량 크기에 따라서 분리하였다. 유출 속도는 평균 0.67 ml/min 로 조정하고, 용출되는 용액을 1 ml씩 Fraction collector(EYELA, Japan)을 사용하여 수집하였다. 각 분획의 단백질 농도는 상기 BCA 방법을 사용하여 측정하였다. 분획(Fraction; Fr.)은 산출된 peak에 따라 각 그룹으로 pooling해서 동결건조 후 냉동실에 보관하였다.

CRP 분획물의 항진균효과 검색

분획물(fractions)의 항진균효과 검색은 CRP의 기연구에서 사용한 항균효과 검색 방법에 사용한 한천확산방법²⁸⁾을사용하고 본 실험에서 또 다른 방법인 액체배지희석법을 사용하였다. 액체배지희석법에서는 분획물을 RPMI 1640 medium(Sigma)에 다양한 농도로 희석해서 96 well plate에 100 µl(1 mg/ml) 넣은 후, *C. albicans* 수효가 5×10² cells/well이 되도록 접종한 다음에 37°C에서 배양하였다. 항균효과 측정은 48시간 배양하였다. 배양 후에 각 well의 배양액을 10 µl씩 GYEP 고형배지에 옮겨서 pour plating 방법으로 접종하고 이 plate를 4°C에서 24시간 배양한 다음에 동일한 온도에서 48시간 더 배양한 다음에 Colony forming units(CFU)를 측정하였다.

피부칸디디증(subcutaneous candidiasis)에 대한 Fr. VI의 효과 검색

Fr. VI의 피부칸디디증에 대한 효과를 조사하기 위해서, nude mice에 항호중구 단항체(RB68C5)를 25 µg/mouse 농도로 정맥 주사하여 전 처리 하였다. 전 처리 48시간 후, *C. albicans* (1×10⁷ yeast cells/mouse)를 생쥐의 등 피부부위에 접종하고 4 시간 후에 Fr. VI(100 mg/mouse)를 피하주사해서 일정기간 동안 감염부위의 감소 크기를 검색하였다. 치료효과 평가는 Fr. VI로 처리되지 않은 대조군과 비교하였다. 감염부위의 크기는 4일 간격으로 측정하였다.

Fr. VI의 균사생성 억제효과 검색

효모형태(blastoconidia, yeast form)의 *C. albicans*에서 균사유도를 하기 위해서, GYEP 액체배지에 정상생쥐의 혈청(최종농도를 5%)을 넣고 Fr. VI(10 µg/ml 농도)를 첨가한 다음에 *C. albicans*균(3×10⁶ cells/ml)을 접종하고 37°C에서 배양기

에서 1.5~2시간 배양하였다. 배양 후, 200개 이상의 세포를 hemocytometer를 사용하여 현미경하에서 균사형성의 유무를 측정하였다. 음성대조군은 Fr. VI로 처리하지 않았으며, 또 다른 비교 평가를 위해서 항균효과가 없는 Fr. II를 사용하였다. 혈청은 *C. albicans*의 균사형성을 유도하는 작용이 있다.¹⁴⁾

Fr. VI에 대한 이온세기(ionic strength)의 영향 검색

Apep의 항균효과는 칼슘의 이온세기에 영향을 받는다.^{8,9)} 본 실험에서는 Fr. VI가 이온세기의 영향을 유무를 조사하기 위해서, Fr. VI를 다양한 농도의 칼슘으로 전 처리한 후, *C. albicans*에 대한 성장억제효과를 상기 기술한 한천확산 항균방법으로 검색하였다. CaCl₂의 농도는 20, 40, 80, 100, 500 mM에서 검색하였으며, Fr. VI의 농도는 0.1 mg/ml에서 시험하였다. 대조군 well에는 희석액으로 사용한 DPBS 100 µl 만을 넣었다.

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

CRP 분획 및 단백질 성상 확인

Sephadex G-50 resin을 사용하여 CRP를 분획한 결과, 6개의 주요 Peaks로 분획됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 각 Peak를 분획 [Fraction(Fr.)]별로 다음과 같이 I(24-25), Fr. II(36-44), Fr. III(45-50), Fr. IV(51-60), Fr. V(61-61), 그리고 Fr. VI(69-82)로 구분하였다. BCA 단백질 검색결과 모든 분획이 모든 단백질 양성

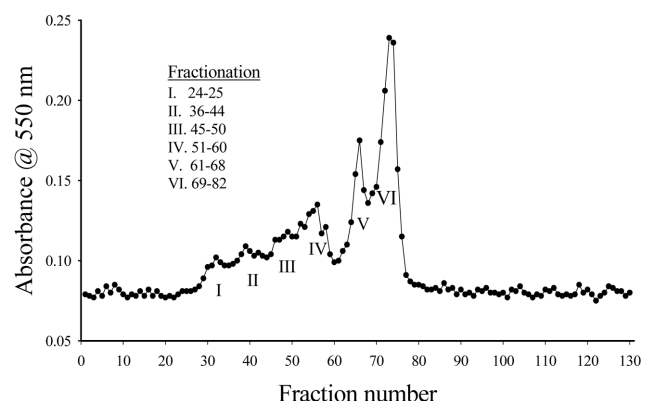


Fig. 1 – Separation of the Coptidis Rhizoma protein on a Sephadex G-50 column. CRP fractions were loaded on a Sephadex G-50 Fine [Column size=2 cm (diameter)×70 cm (length); Pharmacia] and eluted with sterile distilled-water. Each fraction was determined by the BCA protein assay. This fractionation results in, at least, six distinctive peaks.

반응을 나타내었다(data not shown), 각 분획의 단백질 농도는 각각 0.01(Fr. I), 0.04(Fr. II), 0.05(Fr. III), 0.09(Fr. IV), 0.11(Fr. V), 0.1 mg/ml(Fr. VI)으로, 분획별로 pooling한 다음에 냉동 건조기로 분말화 한 후에 실험에 사용하기 전에 DPBS에 용해하여 동일한 농도로 조정하여 다음에 방법 내에서 기술한 바와 같이 실험에 사용하였다.

CRP 분획의 항균효과

각 분획에서 항칸디다 효과가 있는 분획을 분리하기 위해 상기 기술한 항균효과를 검색하였다. 분획물은 사용에 앞서 0.45 μm Syringe filter로 여과하고 Blood Agar 배지에 일정량을 도말하여 다른 균의 오염 여부를 확인하고 사용하였다. 실험결과 균의 오염성은 없었다(data not shown). 항균효과 검색 실험결과, Fr. IV, V, VI 모두에서 항균효과가 평가되었다(Fig. 2). 일례로, Fr. IV와 VI의 경우 어떤 분획으로 처리가 되지 않은 음성대조군과 비교하였을 때, 대략 93% 이상의 항균효과 확인되었다($P < 0.01$) (Fig. 2). 하지만, 분획 중에서 Fr. I, II, III은 BCA 방법으로 단백질성 물질로 확인이 되었지만 항균효과는 없었다(data not shown). 이 결과를 바탕으로 하여, Fr. IV, V, VI 중에서 분획량이 가장 많은 Fr. VI를 우선적으로 선정하여 황련 Apep의 평가를 하였다.

Fr. VI 분획의 피부칸디다증에 대한 효과

Fr. VI의 *C. albicans* 기인성 피부감염증에 대한 치료효과여부

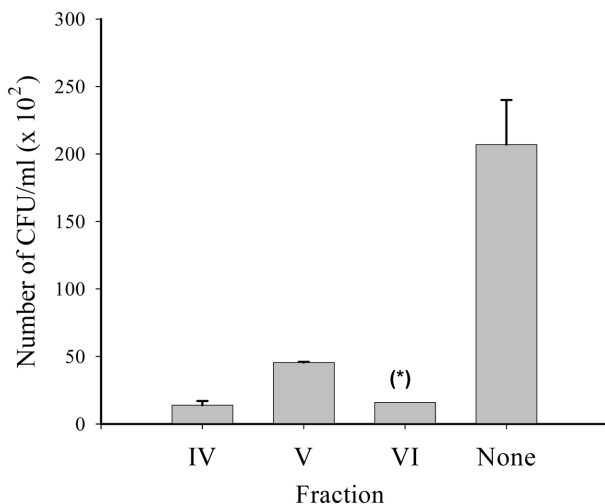


Fig. 2 – Antifungal effect of the various fractions separated from the CRP by the Broth Dilution Susceptibility method. Data resulting from the separation of the CRP show that Fr. IV, V and VI inhibit of growth of *C. albicans* yeast cells as compared to the control (None). For instance, difference between the antifungal activity by Fr. VI (*) and antifungal activity by the control is statistically significant ($P < 0.01$). Note that Fr. IV and VI had almost the same efficacy in blocking of the growth. Values are \pm S.E.

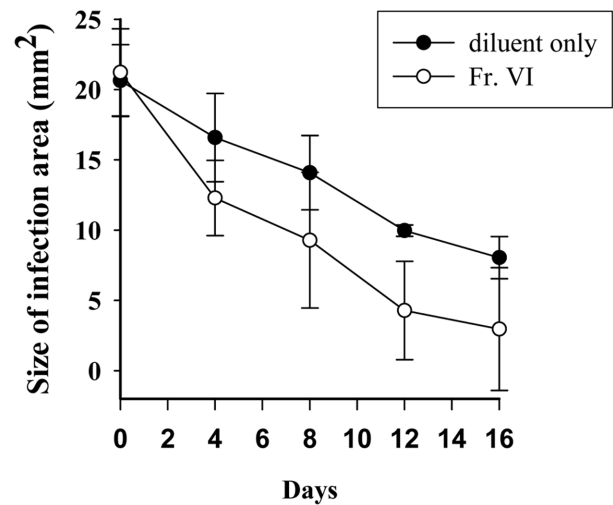


Fig. 3 – The Fr. VI has therapeutic activity to subcutaneous candidiasis due to *C. albicans*. During the entire 16 day-observation, the Fr. VI-treated nude mice reduced the sizes of *C. albicans*-infected area in a similar rate as compared to Fr. VI-untreated nude mice. Difference between the two groups is statistically significant ($P < 0.05$). Error bar: mean \pm S.E.

를 4일 간격으로 16일 동안 관측한 결과, 관측 12일째는 Fr. VI를 투여 받은 생쥐균의 감염크기는 Fr. VI를 투여 받지 못한(음성대조군) 생쥐균에 비교해서 거의 70% 정도 감소하였으며 관측종결일인 16일째는 거의 78% 정도 감염부위가 감소되었다($P < 0.05$)(Fig. 3). 또한, 전체 관측기간을 통해서 두 그룹간의 감염부위의 감소는 거의 유사한 형태의 비율로 감소하였다(Fig. 3). 반복실험에서도 그 결과는 거의 동일하였다. 이 실험결과로, Fr. VI는 피부칸디다증에 치료효과가 있음을 알 수 있었다.

Fr. VI의 균사형성 억제효과

효모형태의 *C. albicans*에 Fr. VI로 처리하고 균사생성의 정도를 현미경하에서 관측한 결과, 희석액(DPBS)만으로 처리한 음성대조군은 거의 균사생성을 100%으로 기준을 할 때, Fr. VI로 처리한 *C. albicans*는 약 63% 정도의 균사생성이 억제되었고($P < 0.01$)(Fig. 4A). 또 다른 대조군으로 항균효과가 없는 Fr. II로 처리 시, 균사생성은 음성대조군의 경우와 거의 동일한 수치였다(Fig. 4A). 반복 실험에서도 동일한 실험결과가 획득되었다. 현미경하에서 관측한 균사생성의 차이점을 사진으로 제시한 결과(Fig. 4B)도 상기 실험결과를 반영한다. 이로써, Fr. VI는 *C. albicans*의 가장 중요한 병원성인자인 균사생성을 방해하여 항균효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Fr. VI의 항진균효과에 대한 이온세기의 영향

Fr. VI에 대한 이온세기의 영향 조사 결과를 보면, Ca^{2+} 이온

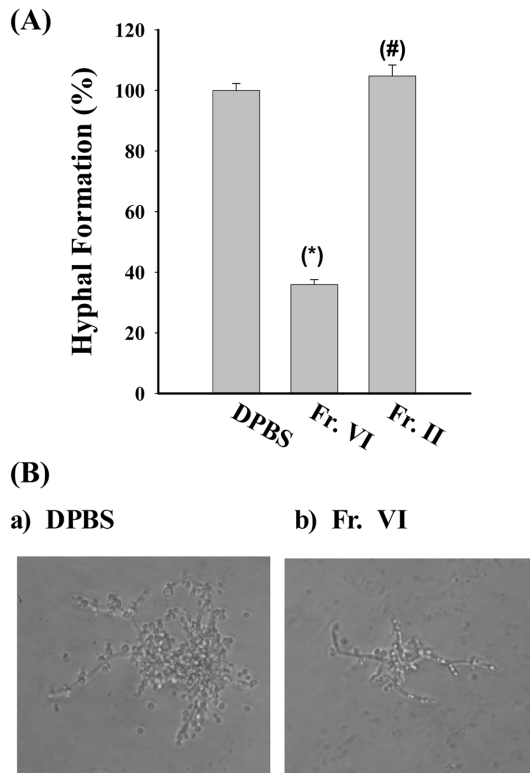


Fig. 4 – Fraction VI inhibits hyphal formation from blastoconial form of *C. albicans*. Panel (A): There was app. 63% hyphal reduction by Fr. VI treatment (*) on the basis of hyphal induction by DPBS-treated control as 100%. This difference between the two groups is statistically significant ($P < 0.01$). Fr. II (#) having no antifungal activity induces as many hyphae as the control. Values are \pm S.E. Panel (B): Microscopic examination shows the different degree of hyphal formation between a) Fr. VI-untreated (DPBS alone) and b) Fr. VI-treated *C. albicans* yeast cells, confirming the results displayed in Panel (A).

Table I – Antifungal activity of the Fr. VI¹ is influenced by the ionic strength

[CaCl ₂] (mM)	Size of inhibitory zone ² (mm)
0	25.5 \pm 2.1 ³
20	24.5 \pm 0.9
40	25.3 \pm 0.7
80	23.5 \pm 0.4
100	21.0 \pm 0.0
500	19.0 \pm 2.4

¹The concentration was at 1 mg/ml.

²Size of a well diameter was 6 mm.

³mean \pm S.E.

의 농도가 증가함에 따라 Fr. VI의 항진균효과가 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Table I). CaCl₂의 농도가 100 mM과 500 mM인 경우에는 DPBS만을 넣은 음성대조군에 비하여 각각 약 18%와 26%의 항진균효과가 감소됨을 관찰할 수 있었

다. 그러므로, 이온세기에 의한 CRP의 효과감소는 기존의 Apep의 작용기전과 유사한 것으로 추정된다.^{5,8,9,11)}

결론

본 연구실의 기연구에서 황련에서 추출된 단백질(CRP)이 *C. albicans*의 성장을 억제함을 보고한 바가 있다. CRP의 작용기전은 *C. albicans*의 가장 중요한 병원성인자인 균사생성의 억제와 숙주의 macrophages 활성화에 의한 탐식작용증진에 의한 것으로 규명된바 있다.¹⁰⁾ 이 항균효과는 *in-vivo* 실험조건에서 전신성칸디다증에도 효과가 있지만, 피부칸디다증 효과에서는 더 유의성이 있는 치료효과가 검색되었다.¹¹⁾ 이 결과를 바탕으로 하여 CRP가 Apep 일 가능성이 예견되어서 CRP의 이온세기에 의한 영향여부를 조사하였는데, CRP를 고농도의 칼슘이온으로 처리 하면 CRP의 항균효과 감소가 규명되어서,¹⁰⁾ 한층 더 CRP가 Apep일 가능성이 예상되었었다. 이에, CRP에 함유된 진정한 의미의 Apep임을 증명을 위해서 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 항균작용에 관련이 있는 최소 단위의 단백질물질을 규명하기 위해서 CRP를 분획하여 Size exclusion chromatography 방법을 이용하여 CRP를 분획한 후 구체적인 분석을 하였다. 이 분획을 통해서 모두 6 종류의 분획을 획득하였는데, 초반에 용출된 세 분획(Fr. I, II, III)은 단백질 성상임을 확인했지만 항균효과는 없는 반면에, 후반에 용출된 분지량이 더 작은 분획물(Fr. IV, V, VI)은 *in-vitro* 상에서 항균효과가 검색되었다. 이에 대한 집중적인 평가를 위해서, 이 분획 중에 항균효과가 제일 높고 분획량이 제일 많은 Fr. VI을 선정하여 기연구^{10,11)}에서 사용한 평가 방법을 적용해서 Fr. VI의 특성을 조사하였다. 피부칸디다증 동물모델을 사용하여 Fr. VI의 효과를 검색한 결과에서 Fr. VI는 유효성이 있는 치료효과를 나타내었다. 이에 대한 작용기전을 검색하기 위해서 *C. albicans*의 가장 주요한 병원성인자인 균사생성에 대한 Fr. VI의 효과를 조사했는데, 예상한 바와 같이 균사생성을 억제하여 CRP에서 검색한 결과와 거의 동일한 결과를 획득할 수가 있었다. 결론적으로, 항균효과와 작용기전까지 CRP의 효과와 매우 유사한 효과가 있는 Fr. VI는 Apep일 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어졌다.

이런 관점에서 Fr. VI에 대한 이온세기 영향의 유무를 검색한 결과도 일반적인 Apep의 특성과 동일한 결과를 획득하여 더욱 Fr. VI는 Apep의 가능성이 높게 평가되었다. 이 결과를 기연구의 결과와 합하여 고찰해 보면, 기연구에서 SDS-PAGE 전기영동법으로 CRP를 검색 시, 대략 1.2 KDa의 저분자량의 band를 검색한 바가 있는데, 만약 황련에서 Apep가 분비된다면 이는 최대 10-mers의 양이온성 아미노산으로 조성된 peptide일 가능성이 높다. Fr. IV와 V도 항균효과가 있어서, Fr. VI의 경우처럼 구체적인 추후 실험평가는 하지 못했어도, 황련에는 최소한 세 중

류 이상의 Apep이 존재할 것으로 추측이 된다. 이런 까닭에 본 실험실에서는 Fr. IV와 V에 대한 추가연구가 수행 중에 있다. 지금까지 산출된 결과를 음미해보면, 가장 중요한 것은 Fr. VI의 아미노산 조성서열을 규명하여, 이 아미노산 서열에 따른 peptide를 인공적으로 합성해서 항균효과 검색의 유무를 확인할 필요가 있다. 그래서 현재 본 연구실에서 진행 중에 있는 실험이 비록 초기 단계이지만, Fr. VI는 최소 8개의 아미노산으로 구성된 것으로 확인되었고(unpublished data), Peptron 회사(대전)에 의뢰하여 합성한 peptide에 대한 평가가 진행될 예정이다. 단점은 합성비용이 매우 고가라는 점인데, 이런 점을 타파하기 위해서, 소위 proteogenomic biotechnology를 응용한 Apep을 대량으로 생산할 수 있는 방법을 모색 중에 있다.

종합하면, 본 연구의 결과는, 황련에서 Apep으로 알려진 새로운 개념의 펩타이드성 항생물질 분비의 가능성이 있음을 제시하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구는 산자부 중기거점/차세대신기술개발 사업의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 아울러 CRP 분획과정에 많은 도움을 준 이주영 석사에게 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Danilova, N. : The evolution of immune mechanisms. *J. Exp. Zool.* **306B**, 496 (2006).
- 2) Desgagné-Penix, I., Khan, M. F., Schriemer, D. C., Cram, D., Nowak, J. and Facchini, P. J. : Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biol.* **10**, 252 (2010).
- 3) Dzik, J. M. : The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 443 Epub (2010).
- 4) Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L. : Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169 (2004).
- 5) Zasloff, M. : Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389 (2002).
- 6) 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**, 1006 (2002).
- 7) 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**, 14421 (1996).
- 8) Brogden, K. A. : Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238 (2005).
- 9) 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**, 1353 (1995).
- 10) Kim, H., Lee, J. H., Shim, J. K. and Han, Y. : Anticandidal activity of the protein substance from *Coptidis Rhizoma*. *Yakhak Hoeji* **49**, 323 (2005).
- 11) Lee, J. H., Shim, J. K. and Han, Y. : Mode of action of *Coptidis Rhizoma* protein and its activity against subcutaneous candidiasis due to *Candida albicans*. Anticandidal activity of the protein substance from *Coptidis Rhizoma*. *Yakhak Hoeji* **49**, 422 (2005).
- 12) 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**, 309 (2004).
- 13) Perfect, J. R. and Schell, W. A. : The new fungal opportunists are coming. *Clin. Infect. Dis.* **22**, S112 (1996).
- 14) Villar, C. C., Kashleva, H. and Dongari-Bagtzoglou, A. : Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 262 (2004).
- 15) Vazquez-Torres, A. and Balish, E. : Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 170 (1997).
- 16) Ashman, R. B. and Papadimitriou, J. M. : What's new in the mechanisms of host resistance to *Candida albicans* infection? *Pathol. Res. Pract.* **186**, 527 (1990).
- 17) Leberer, E., Ziegelbaue, R. K., Schmidt, A., Harcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. and Thomas, D. Y. : *Curr. Biol.* **7**, 539 (1997).
- 18) 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**, 3485 (2000).
- 19) Cutler, J. E., Granger, B. L. and Han, Y. : Vaccines, antibodies, and passive immunity in candidiasis. In: Fungal Pathogenesis. Principles and clinical application. (Ed) Calderone R. A. and Cihlar R. A. Marcel Dekker, Inc. New York. *Mycology* **14**, 325 (2002).
- 20) Cutler, J. E. : Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**, 187 (1991).
- 21) Jutila, M. A., Kroese, F. G. M., Jutila, 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).

- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 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**, 1169 (1997).
- 27) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 541 (2005).