

Glycycoumarin 감초성분의 항진균효과

이주희 · 이영미 · 한용문[#]

동덕여자대학교 약학대학 천연물미생물학과

(Received April 25, 2011; Revised April 27, 2011; Accepted May 4, 2011)

Antifungal Activity of Glycycoumarin to *Candida albicans*

Jue-Hee Lee, Young Mi Lee and Yongmoon Han[#]

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — Glycycoumarin, a 3-arylcoumarine isolated from Glycyrrhizae radix (a family of Leguminosae), is reported to have anti-bacterial activity. However, its antifungal activity is still unknown. In this present study, the antifungal activity of glycycoumarin (GLM) against *Candida albicans*, a polymorphic fungus was investigated. Possible mechanism such as blocking of the hyphal induction was also analyzed. By the *in-vitro* susceptibility analysis, GLM showed anticandidal activity, resulting in an almost complete inhibition of the fungal growth at a concentration of 320 µg/ml, which was equivalent to the efficacy of fluconazole at the same dose. In the murine model of disseminated candidiasis GLM enhanced resistance of mice against the disseminated disease ($P<0.05$), resulting in 60% protection of GLM-treated mice group during a period of 21-day observation. As for its mechanism of the antifungal activity, GLM blocked hyphal production, one of the important of virulence factors by the fungus, from the yeast form of *C. albicans* ($P<0.01$). These data indicate that GLM may contribute to the perspectives that focus on the development of a novel agent with antifungal activity specific for *C. albicans* infection.

Keywords □ glycycoumarin, *C. albicans*, antifungal, disseminated candidiasis, hyphal induction, mice

*Candida albicans*는 병원성진균 중에서 가장 많은 문제를 야기하는 진균으로,^{1,2)} 주위의 영양조건에 따라 hyphae(균사), pseudohyphae(의사균사), blastoconidia(효모형) 형태의 다형태성(polymorphic)을 띄며 성장 한다.³⁾ *C. albicans*는 hyphae를 생성하여 다른 *Candida* Genus와 구분하기도 하는데, 이와 같이 균사를 생성하기 때문에 타 종류의 *Candia* 종(species) 보다도 병원성이 높다. 그러므로 균사생성은 *C. albicans*의 병원성 인자(virulence factor)로 간주되기도 한다. 미국 국립보건연구소에서 발행된 통계에 의하면, *C. albicans*는 전체 원내 감염균으로는 4위를 차지하며 진균 중에서는 1위를 차지하고 있을 정도여서 소모성 질환자인 당뇨병환자, 결핵환자, 암환자, 후천성 면역결핍환자에게는 특히 치명적이다.⁴⁾ 또한 면역기능이 정상적인, 건강한 여성에게도 *C. albicans* 기인성 질염을 일으키는 등 많은 문제점을 야기 한다.^{5,6)} 치료약물로는 polyene 계열의 amphotericin

B와 azole 계열의 fluconazole과 ketoconazole 등이 사용되나⁷⁾ 완치율이 낮고 내성이 높을 뿐 아니라 치료 후에도 재발률이 높고 신독성과 같은 부작용 때문에^{2,4)} 새로운 약물의 발견과 새로운 치료방법의 개발이 요구되고 있다. 이런 관점에서, 본 연구에서는 새로운 항진균제효과가 있는 물질 또는 성분의 발견에 주안점을 두고 다양한 한약성분들 중에서 감초를 선정하여 이 한약재에서 분리 정제된 성분들의 항진균효과를 검색하였다. 최근 전 세계적으로 각종질환에 대한 천연성분(natural compounds)의 효과규명에 많은 연구가 진행되고 있고 국내에서도 국가적 차원에서 천연성분의 약물효과에 관해서 다양한 연구가 진행 중에 있다. 이러한 목적으로, 본 연구실에서는 문헌고찰을 통해서 특정 천연성분들을 선정해서, 이 성분들의 병원성 진균인 *C. albicans*에 대하여 항진균효과를 검색하고 있는데, 본 연구에서는 한약재 중에서 가장 많이 사용되는 감초성분의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 실험 조사하였다.

감초(Glycyrrhizae Radix, a family of Leguminosae)는 지중해 지역과 러시아, 아시아 등지에서 자생하고, 유럽, 중동, 아시아에서 널리 재배되는 초본⁸⁾으로써, 고대 이집트 파라오의 무덤

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

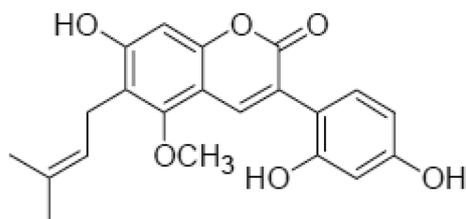


Fig. 1 – Chemical structure of glycoumarin.

에서 발견된 바 있으며 고대 그리스와 로마제국에서 주로 강장제나 감기 치료에 사용되었다.⁸⁻¹⁰⁾ 문헌고찰에 의하면, 감초의 coumarin 계열성분이 항균력이 있는 것으로 보고된 바가 있다. 즉, licopyranocoumarin과 licoaryl coumarin은 항바이러스 효과(antiviral effect)가 있고,¹¹⁻¹³⁾ glycyrol과 glycoumarin은 항세균효과(anti-bacterial effect)가 보고된 바 있다.¹⁴⁾ 그러나 이들 성분의 항진균효과(antifungal effect)에 관한 보고는 전무하다. 이에 본 연구에서는 glycoumarin(Fig. 1)의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 조사하고, 아울러 작용기전 조사의 일환으로 이 병원성 진균의 대표적인 병원성 인자(virulence factor)인 균사의 생성억제에 대한 glycoumarin의 효과를 검색하였다. 균사생성은 *C. albicans*의 효모형태(yeast form 또는 blastoconidial form)의 배양액에 혈청을 첨가하면 균사를 생성하여 *C. albicans*의 형태학적 전환(morphological switch)이 발생 하는데,¹⁵⁾ 균사는 조직내부로 침투가 용이하여 병원성을 증가시키므로¹⁶⁾ 균사형성의 억제유무 검색은 *C. albicans* 병원성조사에 매우 중요하게 간주된다.

재료 및 실험방법

실험균주 및 배양조건

본 연구실의 기 연구에서 특징이 규명된 *C. albicans* 균주인 CA-1와 A-9¹⁷⁻¹⁹⁾를 사용하였다. 배양조건은 실험에 사용하기 전에 Stock으로 저장된 균주를 Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYEP) 액체배지에 분주한 뒤, 37°C shaker incubator(150 rpm; N-Biotec, Seoul, Korea)에서 24시간 배양하고 동일한 배양조건에서 24시간씩 세 번 계대 배양한 다음에^{19,20)} 사용하였다. 이와 같이 배양된 *C. albicans* 세포는 4°C로 냉각시킨 인산완충용액(DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma, St. Louis, Mo, USA)으로 세척하였고, 세포농도는 hemocytometer (Marienfeld, Germany)를 사용하여 균의 수효를 측정해서 DPBS (pH=7.4)에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6~7주령의 BALB/c 암컷 생쥐(CAN.Cg-Foxn1nu/crl strain)를 Charles River Lab, NY, USA에서 구입하여 사용하였다. 이 생쥐들은 고압 멸균한 filter cages에서 사육되었고, 멸균된 사료

(Orient, Seoul, Korea)와 물은 자유롭게 먹게 하였다. 사육은 항원조와 공기여과장치가 완비된 청결한 동물사육실 안에서 1주일 간 적응시킨 후 사용하였다. 동물사육실의 환경은 온도 20±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하고 조명은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다.

Glycoumarin(GLM)

감초성분으로 3-aryl coumarin 계열에 속하는 GLM은 영남대학교 약학대학 이승호 교수님으로부터 기증받아서 사용하였다. 이 성분을 본 실험에 사용하기 전에 endotoxin 혼재여부를 상업용 LAL kit(Sigma)으로 검색하였고, 타 세균 및 진균의 오염 여부는 DPBS에 용해한 GLM을 혈액배지(blood agar plate)에 분주하고 37°C 배양기에서 48시간 배양해서 검색하였다. 그 결과, endotoxin의 혼재는 검출 되지 않았으며, 타 미생물에 의한 오염은 없는 것으로 확인되었다.

In-vitro 항진균효과 검색

In-vitro 상에서 *C. albicans*에 대한 GLM의 항진균효과를 검색하기 위해, 액체배지희석(broth dilution) 감수성법을 사용하여 항진균효과를 측정하였다.^{20,21)} 이 실험방법을 간략히 기술하면, 96 well plate(Falcon)에 RPMI 1640 medium(RPMI)으로 희석한 *C. albicans* CA-1 또는 A-9균주를 5×10² cells/well로 각 well에 100 μl씩 접종한 후, RPMI에 40, 80, 160, 320 mg/ml의 농도로 순차적으로 희석한 GLM을 100 μl씩 지정된 well에 첨가한 뒤 37°C-5% CO₂ incubator(Vision Scientific Co, Seoul, Korea)에서 배양하였다. 양성대조군은 임상에서 적용하는 fluconazole(대웅제약) 항진균제를 사용하였다. 48시간 배양 후, 각 well의 배양액을 micropipette을 사용하여 각 100 μl씩 수거하여 계대희석으로 1/1000 희석한 한 다음, 각 100 μl를 취하여 GYEP 고형배지에 pour plating 방법으로 접종하였다. 이 plate를 24시간 동안 37°C 배양기에서 배양한 뒤, 각 plate에 생성된 CFU(colony forming unit)를 측정하여 음성대조군(GLM이 첨가되지 않은 well)의 CFU value와 비교하여 항진균효과 여부를 측정하였으며, 약물효능을 비교하기 위해서 양성대조군으로 fluconazole(대웅제약)을 사용하였다.

전신성 칸디다증(Disseminated candidiasis)에 대한 효과검색

In vitro에서 GLM의 항진균 효과를 확인한 후, 이 성분의 치료효과를 기 연구에서 사용한 전신성칸디다증 동물모델^{17,19)}을 사용하여 조사하였다. 즉, 6~7주령의 BALB/c 암컷 생쥐에 DPBS로 희석한 GLM을 1 mg/mouse의 용량으로 복강주사 한 다음, 한 시간 후에 *C. albicans* CA-1(5×10⁵ cells/mouse)을 200 μl씩 꼬리정맥으로 주사하여 전신감염 시킨 뒤 생쥐의 생존기간을 검색하였다. 양성대조군 생쥐그룹에는 동일용량의 fluconazole으로

처리하였다.

균사생성(hyphal formation)의 억제효과 검색

이 실험은 본 연구실의 기 연구에서 이미 규명된 방법²¹⁾을 사용하였는데 간략히 기술하면 다음과 같다. 효모형태의 *C. albicans* (1×10^6 cells/ml) 배양액을 microcentrifuge tube에 분주한 후, RPMI 배지에 혈청(최종농도=10%)을 혈청을 첨가하고 20 또는 40 µg GLM/ml 농도로 투여하였다. (최종 부피=500 µl), 음성대조군에는 GLM을 첨가하지 않았다. 사용한 혈청은 BALB/c 정상 암컷 생쥐에서 수집하여 사용하였다. 이 조작 후, 모든 tube는 1시간 반 동안 37°C-CO₂ incubator에서 배양시킨 다음에 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 효모형태와 균사를 생성하는 *C. albicans* 수를 측정하였다. 이 실험에서는 의사균사도 균사로 간주하여 균사억제효과를 평가하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였고, 각 군간의 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하였다. P 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics of Windows; SPSS, Chicago, IL, U.S.A.)으로 산출하였다.

실험결과

GLM의 항진균 효과

GLM의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 일차적으로 *in-vitro* 실험조건에서 검색하였다. 액체배지희석법으로 감수성을 측정할 결과를 평가해 보면, GLM으로 처리된 *C. albicans*의 성장이 억제되었으며 이 성장억제효과는 GLM의 농도가 증가할수록 효과가 증진되었다(Table I). 또한, CA-1 보다는 A-9이 GLM에 감수성이 더 높았다(Table I). 이는 두 변종의 병원성이 다르다는 기

Table I – Glycycoumarin (GLM) inhibits growth of *C. albicans* yeast cells in dose-dependent manner

Conc. of GLM (µg/ml)	Enumeration of colony forming unit (CFU/ml)	
	Strains of <i>C. albicans</i> :	
	CA-1	A-9
0	$(4.21 \pm 0.46) \times 10^7$ *	$(4.58 \pm 0.26) \times 10^7$
40	$(3.67 \pm 0.29) \times 10^6$	$(2.96 \pm 0.26) \times 10^6$
80	$(1.93 \pm 0.22) \times 10^6$	$(1.24 \pm 0.18) \times 10^5$
160	$(2.53 \pm 0.16) \times 10^5$	$(2.4 \pm 0.49) \times 10^4$
320	(25.2 ± 0.91)	(2.14 ± 0.35)
FLC at 320 (µg/ml)	(91.6 ± 0.61)	(18.1 ± 0.52)

Note: The symbol (*) indicates mean±S.E. FLC stands for fluconazole.

연구의 결과와¹⁷⁻¹⁹⁾ 매우 유사하여 이 전의 결과인 CA-1이 A-9보다 병원성이 높다는 결과와 일치한다. 두 변종 중에서 CA-1에 대한 GLM의 항진균효과를 전반적으로 분석해보면, 40 µg/ml의 농도에서부터 160 µg/ml 농도까지는 완만한 억제효과가 있다(Table I). 하지만 고농도(320 µg/ml)에서는 CFU value가 (25.2 ± 0.91)로, 이는 GLM으로 처리하지 않은 음성대조군의 CFU value [$(4.21 \pm 0.46) \times 10^7$]에 비교할 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가 된다($P < 0.001$). 또한, 이 고농도에서의 항진균효과는 양성대조군으로 사용한 fluconazole(FLC)의 320 µg/ml 용량보다는 거의 3.6배 이상으로 약물효능이 높다. 이러한 유형은 A-9 변종을 사용한 실험결과와 유사하다(Table I). 이 결과를 토대로 하여서 동물을 사용한 항진균효과 검색과 작용기전 검색실험에서는 병원성이 높은 CA-1만을 사용하여 연구조사 하였다.

칸디다 전신성 감염증(Disseminated candidiasis)에 대한 효과

GLM의 *in-vitro* 항진균효과를 확인한 후, 이 효과의 *in-vivo* 상에서의 효과여부를 검색하기 위해서 동물(생쥐)을 사용하여 조사하였다. 21일 동안 이 생쥐들의 생존을 관측한 결과를 분석해보면, GLM으로 처리된 생쥐그룹의 평균생존시간(MST: mean survival time)은 [(17.6±6.2)일]로서 GLM을 투여 받지 못한 음

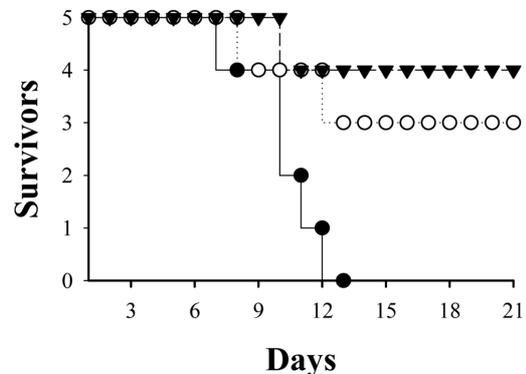


Fig. 2 – Glycycoumarin (GLM) enhances resistance of mice against disseminated candidiasis due to *C. albicans*. Mice groups given glycycoumarin (1 mg/mouse) before intravenous challenge with live yeast cells of *C. albicans* survived app. 6 days longer than the DPBS-received control mice group during the period of 21-day observation ($P < 0.05$). In addition, the survival pattern from GLM-treated mice group appeared to be similar to survival pattern from mice given FLC (fluconazole; 1 mg/mouse) used for a positive control. This indicates that the compound had prophylactic effect. Each group contained five mice. Three times repeats of these experiments displayed similar data.

성대조군의 평균생존시간[(11.0 ± 1.8) 일] 보다 6일 이상으로 평균 생존시간이 길고, FLC로 처리한 양성대조군의 생쥐그룹의 평균 생존시간[(19.8 ± 4.9) 일]과는 거의 유사함을 알 수가 있다(Fig. 2). 또한, 음성대조군의 생쥐는 12일 이내에 전신성칸디다증으로 기 인하여 모두 폐사한 반면에, GLM으로 처리된 실험군의 생쥐는 관측기간 끝까지 60%의 생쥐가 생존하였다. 이 결과를 통해서 GLM은 전신성 칸디다증(Disseminated candidiasis)에 대해서는 효과가 있는 것으로 평가되었다. 이를 바탕으로하여 GLM의 항진균작용기전을 검색하기 위해서 *C. albicans*의 주요 병원성인자(virulence factor)인 군사생성억제 여부를 검색하였다.

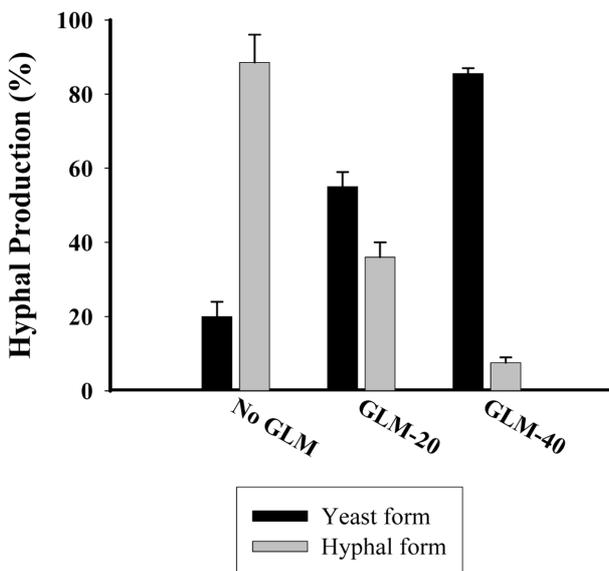


Fig. 3 – GLM blocks hyphal formation from *C. albicans* yeast. Yeast form of *C. albicans* treated with GLM at 20 or 40 $\mu\text{g/ml}$ resulted in app. 57% and 92% of hyphal production, respectively, as compared with the GLM-untreated control ($P < 0.05$). This experiment was repeated three times. Each of those experiments resulted in the very similar pattern of the reduction of hyphal production.

Hyphal formation 억제효과

효모형태의 *C. albicans* 세포를 5% 혈청이 함유된 배지에 분 주하고 20 $\mu\text{g/ml}$ 또는 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 GLM을 투여한 후, 일정 시간 동안 배양한 다음에 군사생성여부를 현미경하에서 관측하 였다. 그 결과, GLM으로 처리하지 않은 음성대조군에 비교해서 20 $\mu\text{g/ml}$ 과 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 GLM으로 처리된 경우에는 약 57% 와 92% 정도로 효모형태의 이 진균세포에서의 군사생성을 억제 하였다(Fig. 3). 이 실험과 병행하여 각 경우에 관측된 칸디다세 포의 군사 유무여부를 사진으로 찍은 결과와 비교하여도 Fig. 3 의 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 즉, 음성대조군의 경우(Fig. 4(a))에 비해서 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 GLM으로 처리한 경우(Fig. 4b) 에서 군사생성이 더 적으며 양쪽 모두 동일한 시간동안 배양하 였음에도 Fig. 4(b)에서의 군사길이가 Fig. 4(a)의 군사길이가 보다 훨씬 짧은 것을 알 수 있다. 더욱이 GLM의 농도를 2배(40 $\mu\text{g/ml}$)로 증가시키면 군사생성이 대부분 억제되었다(Fig. 4(c)). 이 결과로 GLM의 군사생성 억제효과가 항진균효과와 관련이 있을 을 알 수 있다.

고찰 및 결론

최근의 암환자 수효와 면역결핍성질환의 급증 등으로 인하여 병원성 진균증에 의한 문제점이 매우 심각한 상태이다.^{4,22,23)} 하지만 기존의 항진균제는 부작용과 내성으로 인하여 진균감염증 치료의 유효성에 대하여 문제점이 제기되고 있다. 이런 연유로 지난 30여 년 동안 새로운 항진균제 개발을 위해서 다양한 연구 가 진행 중에 있는데, 그 중에서도 항진균 가능성 물질을 천연약 용식물에서 획득하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 이에 문헌 고찰을 통해서 감초를 선택하였고, 감초에서 분리되는 성분 중 에서 이미 많은 연구를 통해서 약리작용이 규명된 성분을 제외 하고 선택한 성분이 GLM이었다. 이 성분의 항진균 효과에 관한 보고는 전무한 형편으로 본 연구에서는 GLM에 대한 항진균효

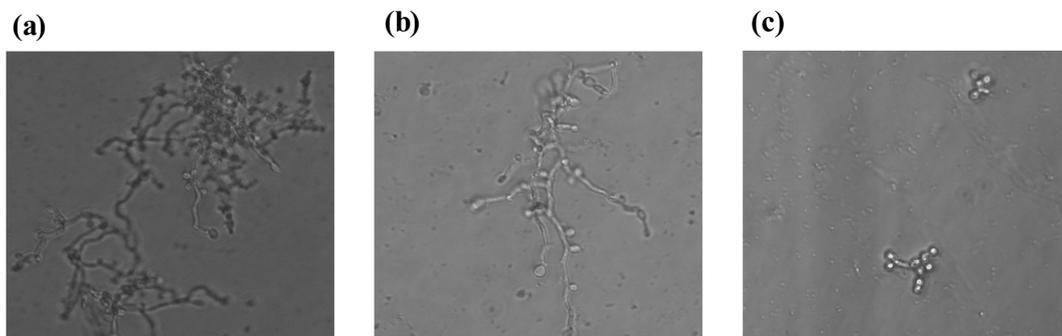


Fig. 4 – Microscopic observation confirms blockage of the hyphal formation by GLM. *C. albicans* yeast cells untreated with GLM (a) mostly formed hyphae, increasing cell numbers, whereas GLM-treated cells (b & c) resulted in reduction of hyphal formation when compared to the control (a). As GLM dose increases, cell numbers are decreased. Panels: *C. albicans* yeast cells treated with; a) none; b) 20 $\mu\text{g/ml}$; c) 40 $\mu\text{g/ml}$ of GLM, respectively.

과와 그 작용기전을 규명하였다.

기초실험에서 액체배지희석 시험방법을 통해 감수성을 측정 한 결과 GLM은 농도 의존적으로 *C. albicans*의 두 균주(CA-1, A-9)에 대하여 항진균효과가 있으며, 최소 320 µg/ml 농도에서는 거의 100%에 가깝운 항진균효과가 있었다. 이 결과는 동일한 농도의 fluconazole의 항진균효과와 거의 비견되는 효능이었다. 특히, 병원성이 더 높은 CA-1에 대해서도 항진균효과가 매우 높은 효능이 있다는 점은 매우 고무적이다. 이 결과를 근거로 하여, *in vivo* 상(전신성칸디다증 동물모델사용)에서 GLM의 항진균효과를 조사하였다. GLM을 투여 받은 생쥐들은 음성대조군보다 평균생존시간이 길었으며, 60%의 생쥐가 21일의 관측기간 동안에 생존하였다. 이는 생체실험에서도 GLM의 항진균 효능이 발휘되는 것을 입증하는 결과로서, 향후 항 *C. albicans* 제재로서의 개발 가능성이 대단히 높은 것으로 사료된다. 이 항진균효과의 작용기전을 조사하기 위해서 *C. albicans*의 대표적인 병원성인자인 균사생성억제 여부를 검색하였다. Glycyrol의 작용기전 검색 결과에서 감초성분인 GLM은 효모형태의 *C. albicans*에서 균사의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 작용이 있었다. 이 결과를 유추해 보면, 이 진균이 인체에 침투할 때 균사발현이 억제된다면 이 진균이 인체세포 안으로 침투가 차단되므로, 결과적으로 지속적인 감염이 방해될 수가 있다. 이는 궁극적으로 감염부위의 확장 실패를 초래해서 이 진균의 감염성 제거가 가능할 것으로 추정된다. 이런 점에서 보면 GLM은 전신성칸디다증 보다는 오히려 피부칸디다증(subcutaneous candidiasis)에 더 효율적인 항진균 효능이 있을 것으로 사료되어, 현재 본 연구실에서는 GLM의 피부칸디다증에 대한 효과검색이 진행 중에 있다.

지금까지의 모든 결과를 종합하면, 본 연구에서는 새로운 물질의 항진균제를 규명하기 위해서 감초의 3-arylcoumarin 성분인 GLM이 병원성 진균 중에서 가장 많은 문제를 야기하는 *C. albicans*에 대해서 항진균작용효과가 있음이 규명되었다. 이 항진균효과의 발현에는 GLM의 균사생성의 억제가 관여하는 것으로 규명되었도, 이 진균의 병원성인자가 균사생성 이외에도 여러 종류[예: 부착성물질생성(adhesins)]가 있기 때문에, 이들 병원성인자에 대한 GLM의 작용기전도 필요하다. 이런 연유로, 이 부분에 대해서 목차 연구 조사 중에 있다. 결론적으로, 본 논문의 연구결과는 감초성분의 일종인 GLM이 항 칸디다 효과가 있다는 것을 규명한 최초의 연구로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 사업(한약재 과학화)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 아울러, 자료정리 및 기초 실험 과정에 도움을 준 이주영 석사에게 감사를 표합니다.

참고문헌

- Schaberg, D. R., Culver, D. H. and Gaynes R. P. : Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* **16**, 72S (1991).
- Edwards, J. E. : Invasive *Candida* infections: evolution of a fungal pathogen. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1060 (1991).
- Gow, N. A., Brown, A. J. and Odds, F. C. : Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 366 (2002).
- Bodey, G. P. : The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* **11**, 411 (1988).
- Sobel, J. D. : Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**, 924 (1985).
- Sobel, J. D. : Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**, 547 (1988).
- Odds, F. C., Brown, A. J. and Gow, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272 (2003).
- Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J. : Herbal Medicine: expanded Commission E Monographs. *American Botanical Council, Newton*, 233 (2000).
- Crance, J. M., Lévêque, F., Bizziagos, E., van Cuyck-Gandré, H. and Jouan, A. : Deloince R. Studies on mechanism of action of glycyrrhizin against hepatitis A virus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **23**, 63 (1994).
- Davis, E. A. and Morris, D. J. : Medicinal uses of licorice through the millennia: the good and plenty of it. *Mol. Cell Endocrinol.* **78**, 1 (1991).
- Hatano, T., Yasuhara, T., Miyamoto, K. and Okuda, T. : Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **36**, 2286 (1988).
- Utsunomiya, T., Kobayashi, M., Herndon, D. N., Pollard, R. B. and Suzuki, F. : Glycyrrhizin (20 beta-carboxy-11-oxo-30-norolean-12-en-3 beta-yl-2-O-beta-D-glucopyranuronosyl-alpha-D-glucopyranosiduronic acid) improves the resistance of thermally injured mice to opportunistic infection of herpes simplex virus type 1. *Immunol. Lett.* **44**, 59 (1995).
- Takahara, T., Watanabe, A. and Shiraki, K. : Effects of glycyrrhizin on hepatitis B surface antigen: a biochemical and morphological study. *J. Hepatol.* **21**, 601 (1994).
- Tanaka, Y., Kikuzaki, H., Fukuda, S. and Nakatani, N. : Antibacterial compounds of licorice against upper airway respiratory tract pathogens. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **47**, 270 (2001).
- Anderson, M. L. and Odds, F. C. : Adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelia: significance of morphological form and effect of ketoconazole. *Mykosen.* **28**, 531 (1985).
- Li, R. K. and Cutler, J. E. : Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **168**,

- 18293 (1993).
- 17) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 18) 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**, 5771 (1998).
- 19) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834 (2007).
- 20) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 541 (2005).
- 21) Han, Y. : Synergic Anticandidal effect of epigallocatechin-O-gallate combined with amphotericin B in a murine model of disseminated candidiasis and its anticandidal mechanism. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1693 (2007).
- 22) Arturo, C. : Antibodies and fungi: an evolving paradigm with opportunities for the development of new antifungal therapies and vaccines. *Rev. Iberoam. Micol.* **14**, 2 (1997).
- 23) Baselski, V. S., Robison, M. K., Pifer, L. W. and Woods, D. R. : Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using cellufluor staining. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 393 (1990).