

Obacunone 황백성분의 *Candida albicans*에 대한 항진균효과

한용문[#] · 김정현

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학실

(Received September 23, 2013; Revised November 22, 2013; Accepted December 2, 2013)

Antifungal Effect of Obacunone on *Candida albicans*

Yongmoon Han[#] and Jeonghyeon Kim

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

Abstract — In the present study, we determined the antifungal effect of obacunone isolated from Phellodendri Cortex against *Candida albicans*, a pathogenic fungus. The antifungal effect was analyzed by an *in-vitro* susceptibility test and in a murine model of disseminated candidiasis. Possible mechanism of the antifungal activity was also examined. Analyses of data resulting from the susceptibility test revealed that the compound inhibited *C. albicans* growth. At 25 µg obacunone/ml, there was app. 45% reduction of CFUs (colony forming units) as compared to obacunone-untreated *C. albicans* yeast cells ($P < 0.01$). In the murine model of disseminated candidiasis due to *C. albicans*, obacunone enhanced resistance of mice against disseminated candidiasis. During an entire period of 30-day observation, control animals all died within 14 days, whereas 60% of obacunone-treated mice survived ($P < 0.05$). In addition, obacunone inhibited the hyphal production, a major virulence factor of *C. albicans*, from the blastoconidial form. Thus, obacunone appears to have antifungal activity for *C. albicans* infection. This may possibly be mediated by the blockage of hyphal production.

Keywords □ obacunone, *C. albicans*, antifungal, disseminated candidiasis, hyphal production

최근에 다양한 의료기술의 발전과 의약품개발에도 불구하고 소모성 질환자의 수효는 증가하고 있는 추세이다. 이들 환자의 치료과정에서 문제가 되는 것 중에서 하나가 진균감염(fungal infection)이다. 이런 진균감염 중에서 문제를 가장 많이 야기하는 진균이 *Candida albicans*로, 미국 국립보건연구소(NIH)의 보고에 의하면 *C. albicans* 기인성 감염률은 전체 원내감염균 중에서 서열 4위를 차지하며, 특히 진균에서는 1위를 차지하는 병원균으로 알려져 있다.¹⁻⁴⁾ *C. albicans* 감염은 소모성 질환자인 당뇨병환자, 결핵환자, 암환자, 후천성 면역결핍환자에게는 치명적이며 면역기능이 정상인 건강한 여성에게도 질감염(vaginal infection)을 유발해서 일상생활에 많은 지장을 초래하기도 한다.^{5,6)} 치료에 주로 사용하는 항진균제로는 polyene 계열의 amphotericin B와 azole 계열의 fluconazole, itraconazole 등이 있다.⁷⁾ 하지만

amphotericin B는 진균감염증 치료에 선택약물임에도, 신독성(renal toxicity) 인한 문제점이 있고 azole 계열 항진균제처럼 높은 재발율 때문에 문제점이 많다.^{2,4)} 그러므로 새로운 항진균제의 발견이 시급한 실정이다.

본 연구실에서는 지난 10여 년 동안 약용식물에서 유래하는 다양한 성분들의 *C. albicans* 병원성 진균에 대한 항진균효과를 검색해왔다. 예를 들면, EGCG⁸⁾ 또는 berberine⁹⁾과 기존의 항진균제를 병용하는 소위 병용요법(combination therapy)^{6,7)}을 연구하여 학회에 보고한 바가 있다. 이는 병용요법을 통해서 기존의 항진균제의 사용량을 줄임으로서 치료효과는 유지하되 기존의 항진균제로 유발하는 독성과 같은 부작용을 감소시키기 위함이다. 본 연구에서는 이런 측면에서 비록 항진균효과는 기존의 약물에 비해서 단독으로 사용할 때 다소 약물효과가 떨어지더라도 병용사용의 효과여부를 고려해서 여러 종류의 천연성분에 대한 항진균효과를 검색해왔다. 이에, 본 연구에서는 문헌고찰과 기초실험을 근거로 하여 황백에 많이 함유되어 있는 obacunone의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 조사하였다.

황백(Phellodendri Cortex)은 황백나무의 내피를 건조한 한약

[#]Corresponding Author

Yongmoon Han

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

Tel.: 02-940-4521 Fax.: 02-940-4195

E-mail: ymhan@dongduk.ac.kr

재로서 예로부터 위장병 치료약으로 주로 사용되어 왔다. 이 약용식물의 주성분 중의 일종인 berberine은 의약품으로서 더욱이 고미진위제로 많이 사용되고 있다.¹⁰⁾ 황백에서 유래하는 대표적인 성분으로는 alkaloid, limonoid, 그리고 phenolic compound 크게 세 종류가 있다.¹¹⁾ alkaloid 계열에 속하는 성분으로는 berberine, palmatine, jateorrhizine, magnoflorine 등이 손꼽히며, limonoid 계열에는 obacunone(또는 obakunone)과 limonin 성분이 있으며, phenolic 성분으로는 lyoniresinol, syringin, coniferin 등이 대표적이라고 할 수 있다.¹²⁾ 본 연구에서 관심이 있는 limonoid 계열 성분은 grapefruit와 같은 다수의 과일에도 많이 함유되어 있다.¹³⁾

Obacunone의 항균효과에 관련한 보고는 거의 전무하다. *Escherichia coli* O157:H7 세균에 대한 항세균효과가 보고¹³⁾된 바가 있지만 *C. albicans* 기인성 진균감염에 관해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 향후 병용요법의 가능성을 염두에 두고, 일차적으로 *C. albicans*에 대한 항진균효과가 있는 새로운 천연성분을 발견과 아울러 이 성분의 주요 항진균 작용기전을 연구조사 하였다.

재료 및 실험방법

C. albicans 및 배양조건

본 연구실의 기 연구에서 빈번하게 사용해진 *C. albicans* CA-1 균주¹²⁻¹⁴⁾를 본 연구에 사용하였다. 배양조건은 기 연구에서 사용한 방법¹⁴⁾과 동일하게, Stock으로 저장된 균주를 Glucose-Yeast Extract-Peptone(GYEP) 액체배지에 분주한 후 37°C shaker incubator(150 rpm)에서 24 시간씩, 세 번 계대 배양한 다음에 사용하였다. 배양한 *C. albicans* 세포를 인산완충용액(pH=7.4; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma)으로 세척하고 hemocytometer를 이용하여 균수를 측정해서 DPBS에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6 주령의 BALB/c 암컷 생쥐(중앙실험동물(주))는 고압 멸균한 filter cages에서 사육하였으며 멸균된 사료와 물은 자유롭게 먹게 하였다. 이들 생쥐는 항온조 및 공기여과장치가 완비된 동물 사육실에서 사육하였다. 사육실의 환경은 온도 20±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하고 조명은 12시간 간격으로 주야를 조절하였다.

Obacunone

본 실험에서 사용한 obacunone(C₂₆H₃₀O₇; obacunoic acid ε-lactone; CAS: 751-03-1)는 황백에서 분리한 것으로 미국 Stanford 회사에서 구입하여 사용하였다(Fig. 1).

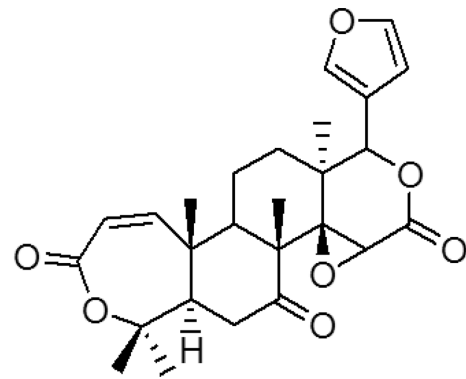


Fig. 1 - Chemical structures of obacunone.

In-vitro 감수성 테스트

Obacunone의 항진균효과 검색은 본 연구실의 기 연구에서 사용한 액체배지희석 감수성 시험방법을 사용하였다.^{8,9)} Obacunone의 농도는 12.5, 25, 50, 100 µg/ml에서 항진균효과를 검색하였다. 양성대조군으로 fluconazole(대용제약) 항진균제를 사용하였으며, 사용농도는 10 µg/ml이었다. 산출된 결과를 동일한 배양조건에서 obacunone이 첨가하지 않은 well(음성대조군)에서 측정된 CFU(colony forming unit) 수효와 비교하여 항진균효과를 평가하였다.

전신성 칸디다증에 대한 효과검색

동물실험은 본 연구실의 기 연구에서 사용한 전신성칸디다증 동물모델(disseminated candidiasis)^{14,16,17)}을 사용하여 obacunone의 *C. albicans* 기인성 전신성감염증에 대한 항진균효과를 조사하였다. 간략히 이 실험을 기술하면, 사용량은 DPBS(희석액)에 용해한 obacunone을 5 mg/kg of body weight/mouse의 용량으로 생쥐에 복강으로 주사 하고 한 시간 후에 2.5×10⁶ cells/ml 농도로 준비된 *C. albicans* 세포를 200 µl씩(=5×10⁵/mouse) 꼬리 정맥으로 주사하여 전신감염 시켰다. 그리고 생쥐 사망 정도를 30일간 측정하여 평균생존시간을 검색하였다. 양성대조군에 속하는 생쥐그룹에는 obacunone 대신에 fluconazole(FLC; 0.5 mg/kg of body weight/mouse)을 투여하고 동일한 수효의 *C. albicans*로 감염시켰다.

균사생성의 억제효과 검색

기 연구에서 사용한 방법⁸⁾을 사용하여 obacunone으로 처리된 *C. albicans*의 균사 생성(hyphal formation)정도를 측정하였다. 시험방법은, 정상생쥐의 혈청을 첨가한 RPMI 배지(최종농도=10%)가 담긴 시험관에, 효모형태(blastoconidia)의 *C. albicans*(1×10⁶ cells/ml)를 분주하고 obacunone(20 µg/ml 또는 40 µg/ml)을 첨가하였다. 음성대조군에는 obacunone 성분을 첨가하지 않았다. 이 시험관들을 37°C-CO₂ 배양기에서 90분 동안 배양시킨 다음

에 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 효모형태 또는 균사를 생성하는 *C. albicans* 수효를 각각 측정하였다. 이때, 의사균사(pseudohyphae)도 균사로 간주하여 obacunone의 균사생성 억제효과를 평가하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차로 계산하였으며 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였다. *P* 값이 5% 미만일 때에는 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics of Windows; SPSS, USA)으로 산출하였다.

실험결과

Obacunone의 *in-vitro* 항진균효과

Obacunone의 항진균효과를 *in-vitro* 실험조건에서 검색한 결과, 이 성분은 항진균효과 있음을 알 수가 있었다. 즉, obacunone 없이 희석액(DPBS)만으로 처리된 *C. albicans*(음성대조군)의 결과를 obacunone으로 처리된 실험군과 비교할 때, obacunone은 농도 의존적으로 *C. albicans*의 성장을 억제하였다(Fig. 2). 일례로, 25 µg/ml과 50 µg/ml의 obacunone 농도에서의 항진균효과를 음성대조군의 결과와 비교해보면 약 45% 및 71%의 CFU 수효의 감소가 각각 있었다. 이 차이는 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가 된다($P < 0.01$)(Fig. 2).

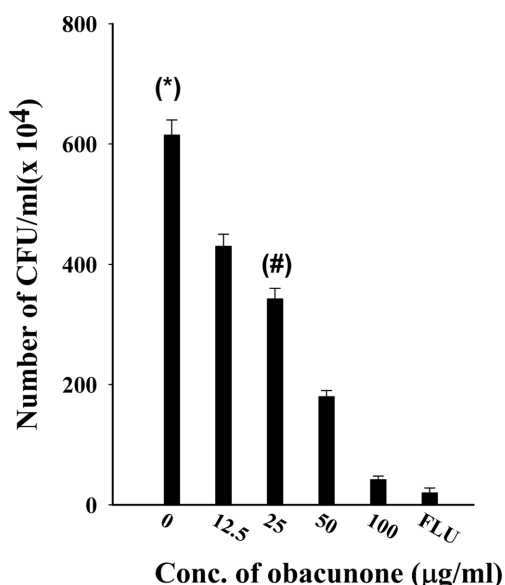


Fig. 2 – Obacunone inhibits the growth of *C. albicans*, dose-dependently. Analysis of data resulting from *in-vitro* susceptibility method revealed that the compound has antifungal activity. For example, obacunone at 25 µg/ml (#) decreased almost 45% CFU numbers as compared to negative control (*) ($P < 0.01$). FLU; fluconazole. Bar, SE.

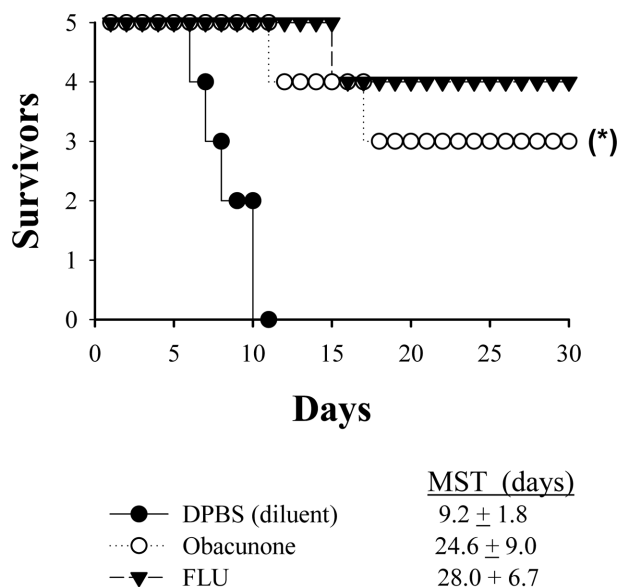


Fig. 3 – Obacunone enhances resistance of mice against disseminated candidiasis due to *C. albicans*. Mice groups treated with obacunone at 5 mg/kg of body weight per mouse (*) before i.v.-challenge with live *C. albicans* yeast cells survived app. 15 days longer than obacunone-untreated control mice ($P < 0.05$). Three out (60%) of five obacunone-given mice survived during the period of 30-day observation. Each group contained five mice. FLU; fluconazole.

칸디다 전신성 감염증에 대한 효과

상기 *in-vitro* 감수성 실험결과를 바탕으로 하여 전신성 칸디다증 동물모델을 사용하여 obacunone의 항진균효과를 조사하였다. 30일 간의 관측기간 동안에 생쥐들의 생존율을 분석해보면, obacunone을 투여 받은 생쥐그룹의 평균생존시간(MST: mean survival time)은 [(24.6±9.0)일]로서 음성대조군의 평균생존시간 [(9.2±1.8)일]보다 평균생존시간이 15일 이상 연장되었으며($P < 0.05$), fluconazole을 투여 받은 생쥐그룹의 평균생존시간[(28.0±6.7)일]과는 약 4일 정도 밖에 차이가 없었다(Fig. 3). 또한, 음성대조군의 생쥐는 관측 11일 이내에 모두 폐사한 반면에 obacunone을 투여 받은 생쥐그룹의 60%는 관측종결 때 까지 생존하였다(Fig. 3).

균사생성 억제효과

Obacunone의 항진균효과의 작용기전 검색의 일환으로 *C. albicans*의 주요 병원성인자(virulence factor)의 하나인 균사생성(hyphal production)의 억제 여부를 조사하였다. 그 결과, 20 µg/ml과 40 µg/ml 농도의 obacunone으로 처리한 *C. albicans*의 경우를 음성대조군의 결과와 비교하면, 각 40%와 66% 정도의 균사생성이 억제되어서 이 억제효과는 농도의존적임을 알 수가 있었다(Fig. 4). 현미경 관측 하에서도 이 억제효과는 농도의존적인 것을 확인할 수가 있는데, 음성대조군(Fig. 5a)의 경우와 20 µg/

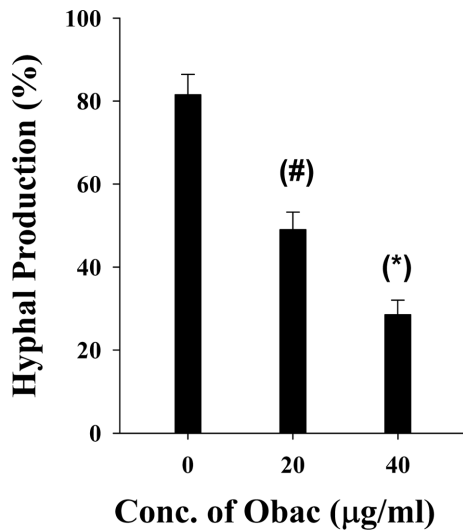


Fig. 4 – Obacunone inhibits the hyphal production from blastoconidial form of *C. albicans*. The blastoconidia treated with obacunone resulted in app. 40% and 66% reduction of the hyphal production corresponding to 20 µg/ml (#) or 40 µg/ml (*), respectively, when compared to untreated control ($P < 0.05$). Obac; obacunone.

ml 농도의 obacunone으로 처리한 *C. albicans*의 균사생성의 정도(Fig. 5b)를 분석 비교해보면, 균사의 생성율이 낮고 동일한 기간 동안 배양했음에도 불구하고 균사의 길이가 음성대조군에 비해 짧았다. 이런 현상은 obacunone의 농도를 2배로 증가하면 더욱 분명하였다(Fig. 5c).

고찰 및 결론

지난 수 십 여 년 동안의 의학의 발전과 약물개발에도 불구하고 암환자와 면역력 결핍성 질환자의 수효는 감소보다는 오히려 증가하는 추세에 있다. 이들 환자들은 감염성질환에 취약하게 되

는데, 이는 면역력의 약화에 기인하는 것으로 여겨진다.^{4,18,19} 본 연구에서 대상이 된 *C. albicans*는 면역력이 정상적인 건강한 경우에는 거의 문제를 야기하지 않으나 면역력이 감소되면 환자에게 치명적인 손상을 일으켜 사망에 이르게 하는 대표적인 기회성 병원성 진균(opportunistic fungal pathogen)에 속한다. 이미 서론에서 언급하였듯이 주요 문제점은 기존의 항진균약물이 독성이 높아서 부작용이 많고 아울러 내성(resistance)으로 인한 재발율이 높다는 점이다. 이런 관점에서 약용식물에 함유된 다양한 성분들의 항진균효과 여부를 조사해왔다.

이런 연구목적의 일환으로, 황백의 성분들 중의 한 종류인 obacunone의 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 조사하였다. 이 검색을 위해서 먼저 *in-vitro* 감수성 실험방법으로 조사하여 항진균효과의 여부를 확인하였다. 25, 50, 그리고 100 µg/ml 농도에서는 45, 71, 94% 정도의 성장억제 효과가 있었다. 동물실험에서도 obacunone의 항진균효과는 검색이 되어서 전신성 칸디다증에 효과가 있음이 확인하였다. 이 결과를 근거로 해서 이 항진균효과의 작용기전을 검색하였다. *C. albicans*에 관하여 여러 종류의 병원성인자가 있는데,²⁰ 그 중에서도 대표가 되는 병원성인자가 균사생성 능력으로 알려져 있다. 이에, obacunone의 균사생성에 대한 영향여부를 조사한 결과, obacunone은 균사생성을 차단하는 효과가 있었다. 따라서 *C. albicans*가 인체세포에 침투했을 때 주변의 장기로 확산되는 것을 차단할 수 있음을 예측할 수 있다. 결론적으로, obacunone은 *C. albicans*에 대하여 항진균효과가 있고 이 효과는 진균생성 억제제를 통해서 발현될 수 있을 것으로 사료가 된다. obacunone의 또 다른 작용기전은 지속적인 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다. 한편, 본 연구에서 규명한 obacunone의 항진균효능을 fluconazole의 효능과 비교하면 용량 면에서 효율이 떨어져서 약물의 효율성에 문제가 제기될 수도 있으나 기존의 항진균제와의 병용요법(combination therapy)의 고려해보면 나름 의미가 있을 것으로 사료된다. 일에

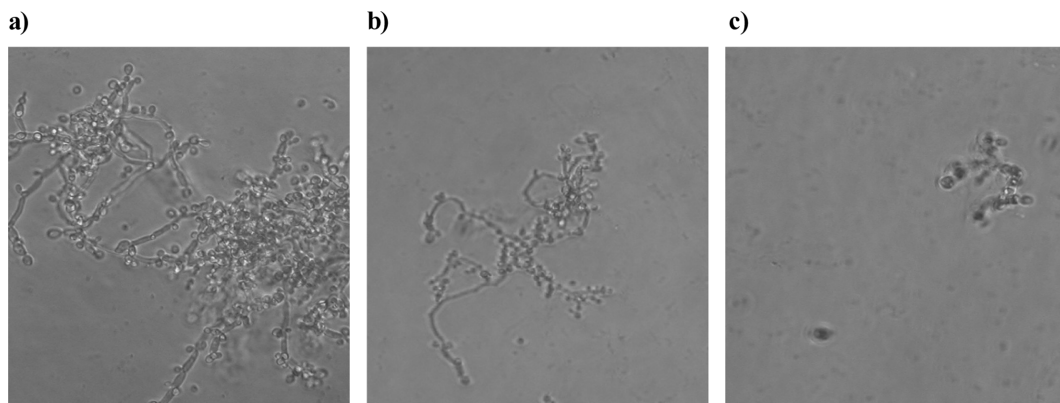


Fig. 5 – Microscopic observation confirms blocking of the hyphal production by obacunone. Whereas obacunone-untreated yeast cells (a) mostly formed hyphae with increased number of cells, obacunone-treated cells (b & c) were suppressed production of hyphae dose-dependently. Panels: obacunone treatment at a) 0, b) 20 µg/ml, and c) 40 µg/ml.

로, amphotericin B 항진균제는 부작용이 많기 때문에, 병용요법으로 이 약물의 용량감소를 통한 부작용의 감소를 고려해볼 수가 있을 것이다. 본 연구실의 기 연구결과를^{8,9)} 고찰 해볼 때 병용효과에 응용이 가능한 성분의 발견은 매우 중요한 것으로 사료된다. 이런 관점에서 본 연구를 통해 규명된 obacunone의 항진균효과와 기존의 항진균제를 사용한 병용효과는 흥미로운 것으로 사료된다.

요약하면, 본 연구에서는 황백에 함유되어 있는 obacunone 성분이 *C. albicans*에 항진균효과가 있고 이 항진균효과는 균사(hyphae)의 생성억제가 관여함을 아울러 규명하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2013년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 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).
- 2) Edwards, J. E. : Invasive *Candida* infections: evolution of a fungal pathogen. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1060 (1991).
- 3) Gow, N. A., Brown, A. J. and Odds, F. C. : Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 366 (2002).
- 4) Bodey, G. P. : The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* **11**, 411 (1988).
- 5) Sobel, J. D. : Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**, 924 (1985).
- 6) Sobel, J. D. : Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**, 547 (1988).
- 7) Odds, F. C., Brown, A. J. and Gow, N. A. : Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272 Review (2003).
- 8) 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).
- 9) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 541 (2005).
- 10) Uchiyama, T., Kamikawa, H. and Ogita, Z. : Anti-ulcer effect of extract from phellodendri cortex. *Yakugaku Zasshi.* **109**, 672 (1989).
- 11) Zhou, H. Y., Wang, D. and Cui, Z. : Ferulates, amurenolactone A and amurenamide A from traditional Chinese medicine cortex *Phellodendri Amurensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **10**, 409 (2008).
- 12) Wada, K., Yagi, M., Matsumura, A., Sasaki, K., Sakata, M. and Haga, M. : Isolation of limonin and obacunone from phellodendri cortex shorten the sleeping time induced in mice by alpha-chloralose-urethane. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2332 (1990).
- 13) Vikram, A., Jesudhasan, P. R., Jayaprakasha, G. K., Pillai, B. S. and Patil, B. S. : Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *Int. J. Food Microbiol.* **15**, 140 (2010).
- 14) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 15) 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).
- 16) 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 b-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834 (2007).
- 17) Han, Y. and Rhew, K. Y. : Ginsenoside Rd induces protective anti-*Candida albicans* antibody through immunological adjuvant activity. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 651 (2013).
- 18) 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).
- 19) 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).
- 20) Cutler, J. E. : The *Candida albicans* phosphomannan complex in *Candida*-host interactions. *Res. Immunol.* **149**, 299 (1998).