

Tanshinone 단삼성분의 전신성 캔디다증에 대한 항균효과

한용문[#] · 주인경

동덕여자대학교 약학대학 면역 미생물학교실

(Received February 27, 2013; Revised March 29, 2013; Accepted April 1, 2013)

Antifungal Effect of Tanshinone from *Salvia miltiorrhiza* against Disseminated Candidiasis

Yongmoon Han[#] and Inkyung Joo

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

Abstract — The aim of this present study was to investigate the antifungal effect of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans*, a polymorphic fungus. For the work, tanshinone IIA (TSN), cryptotanshinone (CTS), and dihydrotanshinone I (DTS) were chosen. Initially, their antifungal effect was analyzed by *in-vitro* susceptibility test. Data from the susceptibility test showed that while all of these three compounds had antifungal activity, DTS was the most potent. At 100 µg DTS/ml, there was about 80% CFU (colony forming unit) reduction as compared to DTS-untreated *C. albicans* yeast cells ($P < 0.05$). Thus, DTS was selected to determine its antifungal activity in a murine model of disseminated candidiasis due to *C. albicans*. Results showed that DTS enhanced resistance of mice against disseminated candidiasis. During the entire period of 30-day observation, 60% of DTS-given mice groups survived whereas control animals all died within 14 days ($P < 0.05$). Moreover, DTS inhibited the hyphal production, one of the virulence factors of this fungus, from the blastoconidial form of the fungus. Therefore, the tanshinone appears to have antifungal activity specific for *C. albicans* infection, which could possibly be mediated by the blockage of hyphal production.

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

미국 국립보건연구소에서 발표된 통계에 의하면, *Candida albicans*는 병원성 세균과 진균을 모두 포함해서 원내감염균으로는 4위를 차지하며 진균 중에서는 1위를 차지하는 진균으로 소모성 질환자와 암환자 등에게는 치명적이다.¹⁻⁴ 또한, 건강한 여성에게도 질감염을 일으키는데, 세계의 전체 여성의 70% 이상이 일생에 한번은 *C. albicans* 기인성 질감염의 경험이 있을 정도로 문제가 많은 진균이기도 하다.^{5,6} 이 진균은 감염되면 균사를 생성하여 인체세포 내로 침투하여 감염을 악화시키는데 감염 부위에서 관찰되는 이 진균의 형태는 진정균사(true hyphae), 균의 증식 분열 시 출아(budding)에 실패하여 마치 균사로 보이는 의사균사(pseudohyphae), 그리고 효모형태(yeast; blastoconidia) 등 소위 다형태(polymorphism)의 모습으로 증식한다.³ 그러므로 균사의 생성은 *C. albicans*의 중요한 병원성인자(virulence factor)로 간주된다. 치료약물로는 polyene 계열의 amphotericin B와

azole 계열의 fluconazole, ketoconazole 등이 사용된다.⁷ 하지만 이들 항진균제의 완치율이 낮고 내성이 높아서 완치 후에도 재발률이 높는데, 특히 신장에 손상을 많이 끼치는 부작용 때문에^{2,4} 새로운 항진균제의 발견 또는 새로운 치료방법의 개발이 필요하다. 이러한 측면에서 본 연구실에서는 항진균효과가 있는 성분의 발견에 주안점을 두고 다양한 약용식물에 함유된 성분들을 검색해 왔다. 그 중 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)의 추출물(엑기스; extract)은 진균성 피부증에 효과가 있다는 민간요법이 전래되고 있지만 단삼의 단일성분에 관한 항진균효과에 관해서는 확립된 연구결과가 없는 형편이었다.

단삼은 인삼의 형태를 닮고 빛깔이 붉어서 단삼이라고 하는데 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 약초로서 약용부위는 뿌리이며 약성(藥性)은 약간 차고 고미성이다. 이 약용식물에 함유된 성분은 크게 phenolic 성분과 diterpenoid 두 계열로 구분한다.^{8,9} phenolic 성분에는 rosmarinic acid, lithospermic acid 등이 있고, diterpenoid 성분에는 대표적으로 tanshinone I, II, IIA, IV, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I 등이 있다. Tanshinones의 약리작용으로는 항암 및 항염효과, 면역조절효과, 순환계 및

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

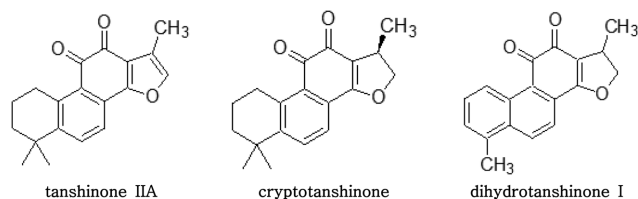


Fig. 1 – Chemical structures of various tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*.

혈관확장 작용, 심혈관확장 효과, 간세포 보호효과 등이 있다.¹⁰⁻¹⁶⁾

이에 본 연구에서는 tanshinone 성분들 중에서 문헌고찰을 통해서 연구에 빈번하게 사용되는 tanshinone IIA, cryptotanshinone, 그리고 dihydrotanshinone I 세 종류의 tanshinone 성분들(Fig. 1)을 선정하여 *C. albicans*에 대한 항 진균효과를 조사하고 아울러 작용기전 조사의 일환으로 이 병원성 진균의 대표적인 병원성인자(virulence factor)인 균사생성에 대한 효과를 검색하였다.

재료 및 실험방법

실험균주 및 배양조건

본 연구실의 많은 기 연구에서 사용하고 특성이 규명된 *C. albicans* CA-1 균주¹⁷⁻¹⁹⁾를 본 연구에 사용하였다. 배양조건은 기 연구에서 사용한 동일한 방법을 적용하였다.⁹⁾ 간략히 기술하면, Stock으로 저장된 균주를 Glucose-Yeast Extract-Peptone(GYEP) 액체배지에 분주한 뒤에 37°C shaker incubator(150 rpm; Vision Scientific Co., Korea)에서 24시간 배양하고 24시간씩 세 번 계대 배양한 다음에 사용하였다. 배양된 *C. albicans* 세포는 인산 완충용액(DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline solution, Sigma, St. Louis, Mo, USA)으로 세척하였고, 세포농도는 hemocytometer를 이용하여 균수를 측정해서 DPBS(pH=7.4)에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6~7주령의 BALB/c 암컷 생쥐를 중앙실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다. 이 생쥐들은 고압 멸균한 filter cages에서 사육되었고, 멸균된 사료와 물은 자유롭게 먹게 하였다. 사육은 항온조 및 공기여과장치가 완비된 동물사육실 안에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육실의 환경은 온도 20±2°C, 상대습도는 50±10%로 유지하고 조명은 12시간 간격으로 주야를 조절하였다.

Tanshinones

단삼성분으로 diterpenoid 계열에 속하는 tanshinone IIA, cryptotanshinone, 그리고 dihydrotanshinone I를 R&D System (USA)에서 구입하여 사용하였다. DPBS에 용해하고 filter(pore

size=0.45 μm)로 여과멸균 한 다음에 본 실험에 사용하였다.

In-vitro 항 진균 효과검색

세 종류의 tanshinone의 항진균효과의 검색은 본 연구실의 기 연구에서 사용한 액체배지희석 감수성 시험방법을 사용하여 측정하였다.^{20,21)} 이 실험방법을 간략히 기술하면, 96 well plate에 RPMI 1640 medium(RPMI)으로 희석한 *C. albicans* 균주를 각 well에 100 μl씩 접종한 후, RPMI에 순차적으로 희석한 성분을 지정된 well에 첨가한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific Co, Korea)에서 배양하였다. 양성대조군은 임상에서 적용하는 fluconazole(대웅제약) 항진균제를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 농도는 1, 10, 100 μg/ml이다. 48시간 배양 후, 각 well의 배양액을 100 μl씩 수거하여 계대희석으로 1/1000 희석한 한 다음에 각 100 μl를 취하여 GYEPA 고형배지에 pour plating 방법으로 접종하였다. 이 plate를 동일한 배양조건에서 추가 배양한 뒤 생성된 CFU(colony forming unit)를 측정하여 음성대조군(tanshinone 성분이 첨가되지 않은 well)의 CFU 수와 비교하여 항진균효과를 평가하였다.

전신성 캔디다증(Disseminated candidiasis)에 대한 효과검색

In vitro 감수성 방법에 의해서 가장 항진균 효과가 우수한 tanshinone을 선정하여 본 연구실의 기 연구에서 사용한 전신성 캔디다증 동물모델^{17,19)}을 사용하여 항진균효과를 조사하였다. 즉, 생쥐에 DPBS에 용해한 tanshinone 성분을 5 mg/kg of body weight/mouse의 용량으로 복강 주사하고, 한 시간 후에 25×10⁵ cells/ml 농도로 준비된 *C. albicans*를 200 μl씩 꼬리정맥으로 주사하여 전신감염시킨 뒤 생쥐의 생존시간을 측정하였다. 양성대조군으로 fluconazole(FLC; 5 mg/kg of body weight/mouse)을 투여하였다.

균사생성(hyphal formation)의 억제효과 검색

이 실험은 본 연구실의 기 연구에서 이미 규명된 방법²¹⁾을 사용하였다. 효모형태의 *C. albicans*(1×10⁶ cells/ml) 배양액을 microcentrifuge tube에 분주한 후, RPMI 배지에 정상생쥐의 혈청(최종농도=10%)을 첨가하고 20 또는 40 μg/ml 농도로 투여하였다. 음성대조군에는 성분을 첨가하지 않았다. 이 후, 모든 tube를 90분 동안 37°C-CO₂ 배양기에서 배양시킨 다음에 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 효모형태 또는 균사를 생성하는 *C. albicans* 수효를 각각 측정하였다. 이때, 의사균사(pseudohyphae)도 균사로 간주하여 균사 억제효과를 평가하였다.

통계

실험결과는 평균±표준오차로 계산하였으며 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였다. 만약 *P* 값이 5% 미만

일 때에는 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics of Windows; SPSS, U.S.A.)으로 산출하였다.

실험결과

Tanshinones의 항진균효과

세 종류의 tanshinones[tanshinone IIA(TSN), cryptotanshinone(CTS), dihydrotanshinone I(DTS)]의 항진균효과를 *in-vitro* 실험조건에서 검색한 결과, 음성대조군(diluent; 희석액 사용)의 결과와 비교할 때, 항진균효과는 TSN, CTS, DTS 순으로 증가함을 알 수가 있었다(Fig. 2). 특히 CTS와 DTS의 경우에 이 효과는 농도 의존적으로 증가하는 반면에, TSN의 경우는 농도차이에 따른 효과의 비례성이 오차범위를 고려하면 확연하지는 않았다. 세 성분들 중에서 항진균효과는 DTS가 가장 우수한 효과가 있으며, 10과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서의 효과를 음성대조군의 결과와 비교하면, 약 60 및 80%의 CFU 수효의 감소가 검색되었다. 이 차이는 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가 된다($P < 0.01$). 하지만 양성대조군으로 사용된 fluconazole(FLC)의 항진균효과에 비교하면 DTS의 효능은 매우 저조하였다(Fig. 2). 이 결과를 토대로, 항진균효과가 가장 뛰어난 DTS를 선택하여 전신성 칸디다

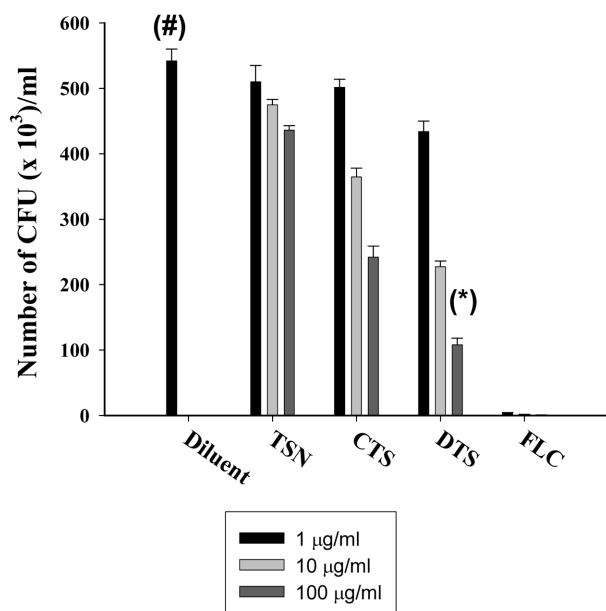


Fig. 2 – Antifungal activities of tanshinones. Data resulting from *in-vitro* susceptibility test showed that although the three tanshinones resulted in antifungal activity. DTS had the most potent inhibition of *C. albicans* growth. DTS at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (*) decreased almost 80% CFU numbers compared with those from *C. albicans* that received diluent (DPBS) (#) ($P < 0.01$). TSN, tanshinone IIA; CTS, cryptotanshinone; DTS, dihydrotanshinone I; FLC, fluconazole.

증 동물모델에서 항진균효과를 조사하였다.

전신성 칸디다 감염증(Disseminated candidiasis)에 대한 효과

DTS의 *C. albicans* 기인성 전신 감염증에 대한 효과를 조사하였다. 30일 간의 관측기간 동안에 생쥐들의 생존율을 분석해보면, DTS를 투여 받은 생쥐그룹의 평균생존시간(MST: mean survival time)은 [(23.0 \pm 11.0)일]로서 음성대조군의 평균생존시간[(11.2 \pm 1.8)일]보다 약 12일 이상으로 평균생존시간이 길고($P < 0.05$), 양성대조군의 평균생존시간[(27.0 \pm 8.9)일]과는 약 4일 정도의 차이가 있었다(Fig. 3). 또한, 음성대조군의 생쥐는 관측 14일 이내에 모두 폐사한 반면에, DTS로 처리한 생쥐는 60% 그리고 양성대조군의 생쥐는 80%가 관측기간 종결까지 생존하였다(Fig. 3). 이 결과를 통해서 DTS는 전신성 칸디다증(Disseminated candidiasis)에 대해서 효과가 있는 것으로 평가되었다.

Hyphal formation 억제효과

항진균효과 조사결과를 바탕으로 하여 DTS의 항진균작용기전 검색의 일환으로 *C. albicans*의 주요 병원성인자(virulence factor) 중 하나인 균사 생성억제 여부를 조사하였다. 그 결과, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 DTS로 처리한 *C. albicans* 세포의 경우에 음성대조군에 비교해서 각 41%와 62% 정도의 균사생성이 억제

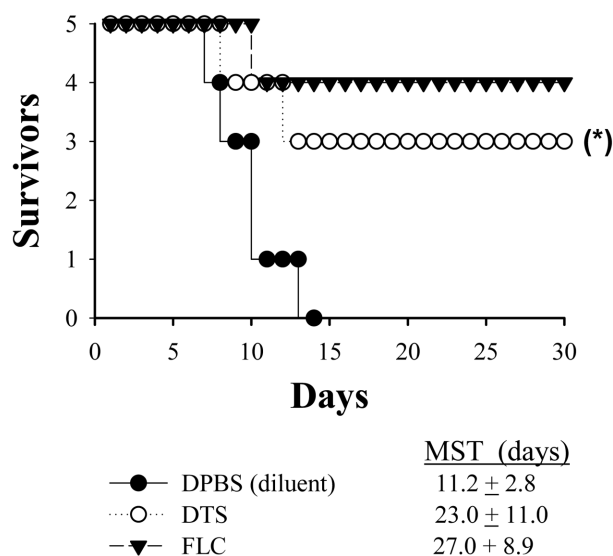


Fig. 3 – DTS (dihydrotanshinone) enhances resistance of mice against disseminated candidiasis due to *C. albicans*. Mice groups given DTS (5 mg/kg of body weight per mouse) (*) before the i.v.-challenge with live *C. albicans* yeast cells survived approx. 12 days longer than DPBS-received control mice during the period of 30-day observation ($P < 0.05$). The survival rate from DTS-treated mice appeared to be similar to survival rate from mice that were given FLC (fluconazole), indicating that DTS had a prophylactic effect. Each group contained five mice.

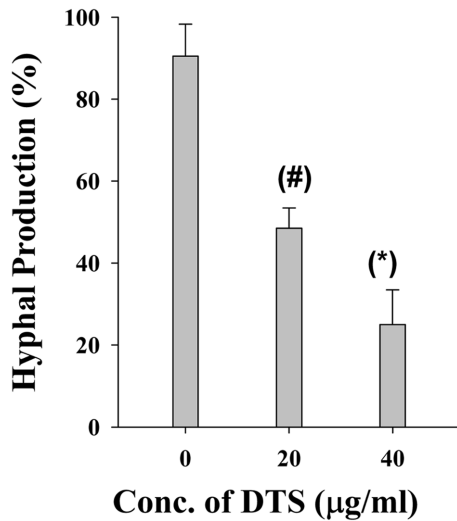


Fig. 4 – DTS blocks hyphal formation from blastoconidial form of *C. albicans*. The DTS treatment resulted in about 41% and 62% reduction of the hyphal production corresponding to 20 (#) or 40 µg/ml (*), respectively, compared with untreated control ($P < 0.05$).

되었다(Figs. 4 & 5). 사진으로 찍은 결과에서, DTS(20 µg/ml)로 처리한 균의 형태(Fig. 5b)를 음성대조군(Fig. 5a)에 비교하면, 균사의 생성율이 낮으며 동일한 기간 동안 배양하였지만 균사의 길이가 음성대조군에 비해 짧은 것을 알 수 있다. DTS의 농도를 2배(40 µg/ml)로 증가한 결과 균사생성이 더 억제되었다(Fig. 5c). 이 결과로 DTS의 항진균 효과에 균사생성 억제가 관여함을 알 수 있다.

고찰 및 결론

최근에 면역력 결핍성 질환자와 아울러 다양한 종류의 암발생으로 기인한 암환자의 수의 급증 때문에 감염성 병원균에 의한 문제가 많이 대두되고 있다. 세균성 감염증은 물론이고 심지어

는 진균증으로 인한 문제도 매우 심각하다.^{4,22,23)} 특히, 진균 감염증 치료에 관한 항생물질의 종류는 세균용 항생제에 비해 그 종류가 다양하지 못할 뿐만 아니라 부작용도 많기 때문에 새로운 항진균제의 개발과 같은 대안책이 요구되고 있다. 이런 맥락에서, 천연성분에서 항진균효과 발견은 매우 중요하게 여겨질 것으로 사료된다. 이에 본 연구실에서는 그간 10여년이 넘게 약용식물의 성분에서 항진균작용이 있는 성분들을 조사해오고 있다. 이의 일환으로 본 연구에서는 단삼의 성분 중에서 diterpenoid 계열에 속하는 tanshinone 성분들에 대한 항진균효과를 연구조사하였다. 본 연구에서 조사에 사용한 성분은 tanshinone IIa, cryptotanshinone, 그리고 dihydrotanshinone I으로서, *C. albicans* 진균에 대한 *in-vitro* 감수성 테스트를 통해 세 종류 중에서 후자의 두 성분은 확실하게 항진균효과가 검색되었다. 특히, dihydrotanshinone I(DTS) 성분이 가장 우수한 항진균효과를 발현하였다. 이 성분의 *in-vivo* 효과를 검색하기 위해서 실험용 전신성 캔디다증 동물모델을 사용해서 조사한 결과 DTS로 처리된 생쥐의 생존율이 음성대조군에 비해 증가하였다. 일례로, 실험동물의 60%가 30일간의 관측기간 동안에 생존하는 결과를 산출하였다. 이 항진균효과의 작용기전을 조사하기 위해, 효모모양(yeast shape; blastoconidia)의 *C. albicans* 세포에서 균사의 생성억제 여부를 검사한 결과, DTS가 균사의 생성을 억제하는 것으로 규명이 되었다. 이는 *C. albicans*가 인체에 감염하여 인체세포 안으로 침투 시 핵심적인 역할을 하는 균사의 생성을 억제하는 것으로, 결과적으로 이 진균의 지속적인 감염을 차단하거나 방해할 수 있으므로 궁극적으로 감염부위의 확장 실패를 초래할 것으로 추정된다. 이 이외에도 DTS의 또 다른 작용기전도 유추해볼 수도 있지만, 이는 이 성분에 대한 지속적인 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다. 한편, 본 연구에서 발견한 DTS의 항진균효과를 양성대조군으로 사용한 fluconazole의 효과와 비교하면 용량 측면에서는 효율이 떨어진다. 그렇다면 효율성에 문제가 있다고 생각할 수 있겠으나 기존의 항진균제

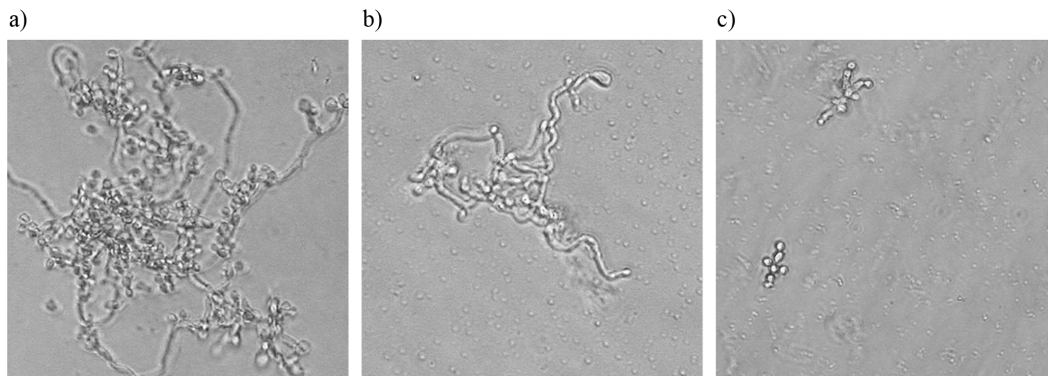


Fig. 5 – Microscopic observation confirms blocking of the hyphal production by DTS. DTS-untreated *C. albicans* yeast cells (a) mostly formed hyphae with increased cell numbers, whereas DTS-treated cells (b & c) caused decreasing hyphal production in a dose-dependent manner. Panels: a) none: b) 20 µg/ml: c) 40 µg/ml of DTS.

와의 병용요법(combination therapy)의 측면에서 고려해 본다면 의미가 있을 것이다. 즉, 기존의 항진균제는 부작용이 많기 때문에 DTS와 같은 천연물질과의 병용요법을 통해서 기존 약물의 용량을 감소하고 비슷하거나 증진된 효과를 얻을 수 있다면 이는 매우 고무적일 것이다. 본연구실의 기 연구결과를^{24,25)} 고찰해보면 병용효과로서의 항진균효과가 있는 약용성분의 발견은 매우 중요한 것으로 사료된다.

종합하면, 본 연구에서는 새로운 물질의 항진균제를 검색하고자 하였고 단삼에서 유래하는 tanshinone 성분이 *C. albicans* 감염에 항진균효과가 있음이 규명되었다. 이 항진균효과의 발현에는 균사생성의 역제가 관여하는 것도 아울러 밝혀졌다. 이러한 연구결과는 최초의 연구로서 의미를 갖는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2012년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

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 Review (2003).
- Hu, P., Liang, Q. L., Luo, G. A., Zhao, Z. Z. and Jiang, Z. H. : Multi-component HPLC fingerprinting of *Radix Salviae Miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **53**, 677 (2005).
- Liu, M., Li, Y. G., Zhang, F., Yang, L., Chou, G. X., Wang, Z. T. and Hu, Z. B. : Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS). *J. Sep. Sci.* **30**, 2256 (2007).
- Gong, Y., Li, Y., Abdolmaleky, H. M., Li, L. and Zhou, J. R. : Tanshinones inhibit the growth of breast cancer cells through epigenetic modification of Aurora A expression and function. *PLoS One.* **7**, e33656 (2012).
- Kim, W. S., Kim, D. O., Yoon, S. J., Kim, M. J., Yoon, S. R., Park, Y. J., Jung, H., Kim, T. D., Kwon, B. M. and Choi, I. : Cryptotanshinone and tanshinone IIA enhance IL-15-induced natural killer cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 340 (2012).
- Tao, S., Zheng, Y., Lau, A., Jaramillo, M. C., Chau, B. T., Lantz, R. C., Wong, P. K., Wondrak, G. T. and Zhang, D. D. : Tanshinone I activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects against As(III)-induced lung inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Antioxid. Redox. Signal.* [Epub ahead of print] (2013).
- Lee, W. Y., Cheung, C. C., Liu, K. W., Fung, K. P., Wong, J., Lai, P. B. and Yeung, J. H. : Cytotoxic effects of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* on doxorubicin-resistant human liver cancer cells. *J. Nat. Prod.* **73**, 854 (2010).
- Jin, D. Z., Yin, L. L., Ji, X. Q. and Zhu, X. Z. : Cryptotanshinone inhibits cyclooxygenase-2 enzyme activity but not its expression. *Eur. J. Pharmacol.* **549**, 166 (2006).
- Kang, B. Y., Chung, S. W., Kim, S. H., Ryu, S. Y. and Kim, T. S. : Inhibition of interleukin-12 and interferon-gamma production in immune cells by tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Immunopharmacology* **49**, 355 (2000).
- Ho, J. H. and Hong, C. Y. : Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J. Biomed. Sci.* **18**, 30 (2011).
- Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 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).
- 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).
- Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 541 (2005).
- 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).
- 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).
- 24) 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).
- 25) Han, Y. and Lee, J. H. : Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 541 (2005).