

< Original Article >

## 항톡소포자충 효과를 가진 천연물 유래 추출물에 관한 연구

홍선화<sup>1</sup> · 이현아<sup>1</sup> · 정영호<sup>2</sup> · 김태완<sup>3</sup> · 김옥진<sup>1\*</sup>

원광대학교 동물자원개발연구센터<sup>1</sup>, 중부대학교 애완동물자원학과<sup>2</sup>, 경북대학교 수의과대학<sup>3</sup>

### Anti-Toxoplasmosis effects of herbal extracts against *Toxoplasma Gondii*

Sunhwa Hong<sup>1</sup>, Hyun-A Lee<sup>1</sup>, Yung-Ho Chung<sup>2</sup>, Tae-wan Kim<sup>3</sup>, Okjin Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Animal Resource Development, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Companion Animal and Animal Resources Science, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 12 March 2013; revised 23 April 2014; accepted 21 May 2014)

#### Abstract

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii*, with very few therapeutic treatment options. The choices for treatment are pyrimethamine and sulfadiazine, however their utility is limited because of drug toxicity and serious side effects. In this study, ethanol extracts of 13 traditional medicines used to treat *Toxoplasma gondii* were tested in vitro for their anti-*Toxoplasma gondii* cytotoxicity. The median effective concentration (EC<sub>50</sub>) values for the herbal extracts ranged from 173 mg/mL to 1995.35 mg/mL. In HeLa cell, the selectivity of *Alpinia oxyphylla* (2.75), *Mucunae Caulis* (2.96), *Dictamnus dasycarpus* (7.52) which was higher than sulfadiazine (2.08). This indicates that *Alpinia oxyphylla*, *Mucunae Caulis*, *Dictamnus dasycarpus* extracts may be sources of new anti-*Toxoplasma gondii* compounds.

**Key words :** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Herbal extract, Anti-toxoplasma, Selectivity

## 서 론

톡소포자충증(Toxoplasmosis)은 톡소플라즈마 원충에 의한 감염증으로 전 세계에 널리 분포하고 있으며 숙주영역도 넓다(Tenter, 2000). 이 원충은 세포내에 기생하는 기생충으로 사람을 비롯한 각종 포유동물 및 조류 등에 널리 감염되어 있는 대표적인 인수공통 기생충 중 하나이다(Hoffman, 2000). 인체감염에는 후천성 감염과 선천성 감염의 두가지 경로가 있는데, 전자는 흙이나 식품 중에 섞여 있는 오오시스트의 경구섭취에 의해서 발생하며, 어린이, 청소년기에 보통 이환되며 증상으로는 미열, 인두염, 임파종이 나타난다(Park, 2007). 선천성 감염에는 임신부가 감염되었

을 경우 태반감염에 의한 신생아의 기형 또는 유산이 일어날 수 있다(Petersen, 2007). 심한 경우 자궁내 사망, 유산, 뇌척수막염, 맥락막막염, 뇌수종, 소뇌증, 두 개내 석회화 및 신경학적 손상, 비종대, 자반증, 황달 등의 임상소견을 보인다(Lee, 1999). 현재 개발된 톡소포자충증의 치료제로는 설파디아진과 피리메타민 등이 있지만, 이들에 대한 내성이 점점 증가하고 있고 느린분열소체(bradyzoite) 단계의 톡소포자충에 대하여는 치료 효과가 적었다(Kim, 2008). 따라서 사람과 동물의 모든 세포에 부작용이 없고 내성을 일으키지 않으며 살충효과가 탁월한 항톡소포자충제의 개발이 절실히 요구된다(Kim, 2008). 항생제는 효능이 우수하더라도 시간이 지나면 내성이 생기는데, 천연 약물을 이용한다면 내성문제를 해결할 수 있을 것이라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 항톡소포자충

\*Corresponding author: Okjin Kim, Tel. +82-63-850-6668,  
Fax. +82-63-850-7308, E-mail. kimoj@wku.ac.kr

효과가 있는 한약재를 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 톡소포자충의 유지

본 실험에 사용된 톡소포자충(RH strain of *Toxoplasma gondii*, ATCC No.50174)의 빠른분열소체(tachyzoite)의 배양은 Song 등(2004)의 방법에 따라서 ICR mouse 암컷 마우스(female mouse)의 복강내 배양 방법을 실시하였다.  $1 \times 10^5$ 개의 톡소포자충의 영양형을 4주령 ICR mouse 암컷 마우스 복강에 주입한 뒤, 4일 후 마우스를 경추탈골 하였다. 그리고 2% FBS (GIBCO, Lot No. 1315128, USA)를 함유한 DMEM media (GIBCO, Lot No. 1300045, USA) 5 mL을 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지 해주었다. 다시 복수액을 10 mL짜리 주사기로 전부 뽑아내고 500 RPM에서 5분간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상층액을 새로운 50 mL tube에 옮겨서 500 RPM에서 5분간 원심분리 하였다. 이렇게 얻은 상층액을 새로운 50 mL tube에 옮겨서 2400 RPM에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 순수한 톡소포자충 영양형을 실험에 제공하였다.

### 천연물 추출물 샘플

본 실험에 사용된 한약재는 동의보감과 중의약대 사전에서 전통적으로 항기생충 약재나 항 염증에 사

용되는 13가지의 한약재를 선정하였으며, 익산시 신용동 소재 대한한약국에서 구입하여 사용하였다 (Table 1). 한약재는 분말 시료로 100 g을 70% 에탄올 수용액 600 mL에 100°C에서 2시간 동안 가온 환류 추출하여 여과한 후, 회전감압농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축 하여 추출하였다. 추출물은 실험 직전까지 4°C에 보관하여 사용하였다.

### 톡소포자충 선택성(selectivity) 측정

HeLa 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 공급받았고, 96 well에  $9 \times 10^3$ /mL 되게 접종하고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다. 6시간 후, 2%의 FBS가 함유된 배지로 교환 및 톡소포자충 영양형은 HeLa 세포주의 5배를 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 뒤, 배지를 교환함과 동시에 천연물을 농도별로 처리하였다. 이때 대조군으로서 설파다이아진(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S6387, Germany)을 사용하였다. 24시간 뒤 세포증식분석으로 EZ-Cytox Kit WST-1 (Daeil Lab.Co., Korea)을 처리하고, 15분 후, 흡광광도계로 450 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하여, 시그모이드 커브(sigmoidal curve)를 작성한 후 톡소포자충의 증식을 억제하는 농도 EC<sub>50</sub> (50% 세포 증식억제 농도)를 산출하였고, 항톡소플라즈마 효과에 대한 약효판정은 Kim 등(2008)의 방법에 따라서 선택성(selectivity)을 구하여 보다 높은 선택성을 가진 물질이 항톡소플라즈마 효과가 있는 것으로 판정하였다. 선택성을 구하는 식은 다음과 같았다. 선택성(selectivity) = HeLa 세포에 대한 각 시료의 EC<sub>50</sub>값/*T. gondii*에 대한 각 시료의 EC<sub>50</sub>값.

Table 1. Name of traditional herbs

Korean name	Herbal nomenclature
Cheukbaekyeop (側柏葉)	<i>Thuja orientalis</i> L.
Siho (柴胡)	<i>Bupleurum falcatum</i>
bangi (防己)	<i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson
ikjin (益智仁)	<i>Alpinia oxyphylla</i>
Gyehyeoldeung (鷄血藤)	<i>Mucunae Caulis</i>
Yukjongyong (肉從蓉)	<i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma
baksunpi (白鮮皮)	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz
Bakduong (白頭翁)	<i>Pulsatilla koreana</i>
Sangsimja (桑甚子)	<i>Mori Fructus</i>
Chenryeonja (川楝子)	<i>Melia Fructus</i>
Ildangwi (日當歸)	<i>Angelica acutiloba</i>
Sangiseang (桑寄生)	<i>Loranthus parasiticus</i>
mokhyang (木香)	<i>Aucklandia lappa</i> Decne
Sancho (山椒)	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>

### 통계처리

실험을 통하여 얻어진 모든 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 각 시험군의 유의성에 대한 통계는 대조군과 실험군 간의 통계학적 비교를 위해 SPSS 17.0 (SPSS INC., Chicago, USA)를 사용하여 분석하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 student's t-test를 이용하여 분석하였고,  $P < 0.05$  이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

Table 2. *In vitro* anti-*Toxoplasma gondii* cytotoxicity of traditional medicines

Herbs	EC <sub>50</sub> (µg/mL)		Selectivity*
	HeLa cells	<i>T. gondii</i>	
<i>Thuja orientalis</i> L.	1024.75	497.53	2.06
<i>Bupleurum falcatum</i>	296.42	1458.56	0.20
<i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson	376.24	957.28	0.39
<i>Alpinia oxyphylla</i>	2703.26	982.20	2.75
<i>Mucunae Caulis</i>	2722.50	920.34	2.96
<i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma	1543.00	2603.79	0.59
<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz	10619.60	1412.50	7.52
<i>Pulsatilla koreana</i>	173.81	197.64	0.88
<i>Mori Fructus</i>	285.11	2751.02	0.10
<i>Melia Fructus</i>	250.12	427.33	0.57
<i>Angelica acutiloba</i>	1995.35	1278.75	1.56
<i>Loranthus parasiticus</i>	375.07	1215.66	0.31
<i>Aucklandia lappa</i> Decne	364.91	397.76	0.92
<i>Zanthoxylum schnifolium</i>	426.68	610.35	0.10
<i>Sulfadiazine</i>	351.327	168.842	2.08

EC<sub>50</sub>, median effective concentration. \*Ratio of the EC<sub>50</sub> value for HeLa cells to the EC<sub>50</sub> value *T.gondii*.

## 결 과

### 톡소포자충 선택성(selectivity) 측정 결과

선택성은 신약 개발을 위한 항약물 스크리닝에 사용하는 지표중 하나이며, 선택성의 수치가 높으면 의약품으로서 인체에 대한 안전성이 높아지는 것을 의미한다(Kim, 2008).

한약재 중에서 가장 낮은 선택성은 상삼자(0.1), 산초(0.1), 그 다음으로는 시호(0.2), 상기생(0.3), 방기(0.39), 천련자(0.57), 육종용(0.59), 백두옹(0.88), 목향(0.92), 일당귀(1.56), 측백엽(2.06)이었다. 이번 실험에서 대조군인 설파디아제는 2.08의 선택성을 보였다. 대조군보다 더 높은 선택성을 보인 한약재는 익지인(2.75), 계혈등(2.96), 백선피(7.52)로 현재 톡소플라즈마 치료 약제인 설파디아제(Sulfadiazine sodium salt)보다 높은 선택성을 나타내었다. Table 2와 같이 한약재 13종 중에서 백선피(*Dictamnus dasycarpus* Turcz)가 가장 높은 선택성 7.52를 나타내었다(Table 2).

대조군보다 더 높은 선택성을 보인 익지인, 계혈등, 백선피 추출물 중 백선피 추출물을 1~200 µg/mL의 다양한 농도별로 처리하고, 24시간 동안 배양한 결과 세포의 생존도는 용량과 시간에 의존적으로 현저하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). 1 µg/mL를 처리한 군과 10 µg/mL 처리한 군의 경우 대조군보다 세포의 생존도가 높았으나, 100 µg/mL 처리한 군과 200 µg/mL 처

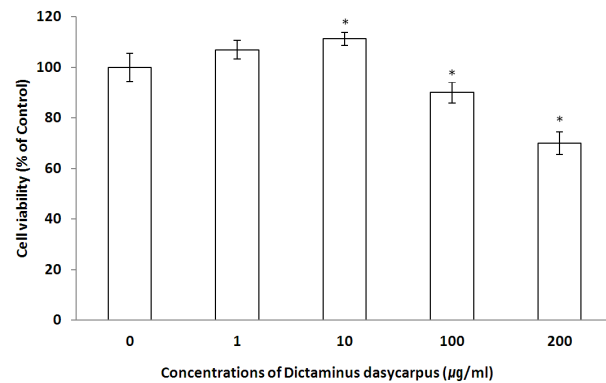


Fig. 1. The effect of *Dictamnus dasycarpus* on cell proliferation was shown after treatment with *T. gondii* by MTT Assay on HeLa cells. Values are Mean±SD. \*Significantly different ( $P < 0.05$ ).

리한 군에서는 톡소포자충에 감염된 헬라세포의 생존도가 유의하게 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 1) ( $P < 0.05$ ).

## 고 찰

톡소포자충은 임상적으로 감염 시 치명적인 뇌염이나 유산을 일으키는 병원체이다. 현재 톡소포자충의 치료제로 주로 설파디아진이 사용되고 있으나 부작용과 약물 내성에 의한 치료 실패 사례가 자주 있다(Olgica, 2002). 이러한 이유로 톡소포자충에 대한

새로운 치료제의 개발 필요성이 대두되고 있으며, 합성 화학약물들에 비교하여 부작용이 적고 안전성이 높은 천연물들을 원료로 한 톡소포자충의 치료가 모색되고 있다(Ferreira, 2006). 본 연구에서는 HeLa cell을 이용하여 선택성(selectivity)의 수치를 구하고, 수치가 높으면 안전성이 높은 것으로 판단하여 항톡소포자충의 효과가 있는 천연물들을 스크리닝하였다. 연구 결과, 톡소포자충의 치료제로 임상에서 실제적으로 사용되고 있는 설파디아진(Sulfadiazine sodium salt)의 선택성 2.08 보다 높은 선택성을 가진 2.75의 익지인(*Alpinia oxyphylla*), 2.96의 계혈등(*Mucunae Caulis*), 7.52의 백선피(*Dictamnus dasycarpus Turcz*)으로, 백선피 추출물의 선택성이 매우 높은 것으로 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 익지인(*Alpinia oxyphylla*), 계혈등(*Mucunae Caulis*), 백선피(*Dictamnus dasycarpus Turcz*) 추출물은 톡소포자충의 치료제로서 효능과 안정성이 우수한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 향후 톡소포자충 치료에 항생제를 대체할 수 있는 천연물 추출물로 개발 될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(NRF-2010-0021940)을 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Djurković-Djaković O, Milenković V, Nikolic A, Bobić B, Grujić J. 2002. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother* 50(6): 981-987.
- Ferreira R, Oliveira AB, Ribeiro MF, Tafuri WL, Vitor RW. 2006. *Toxoplasma gondii*: In vitro and in vivo activities of the hydroxy naphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1, 4-naphthoquinone alone or combined with sulphadiazine. *Exp Parasitol* 113: 125-129.
- Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter C. 2000. Plasmodium, human and anopheles genomics and malaria. *Nature* 415: 702-709.
- Kim HK, Jiang JH, Lee DH, Kim HS, Park H. 2008. Anti-Toxoplasmosis Effect of *Citrus Unshiu* Markovich against *Toxoplasma Gondii*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 22(1): 96-99.
- Lee DC, Ha MS, Chang MH, Choi WS. 1999. A case of congenital Toxoplasmosis in the Neonate. *J Korean Ophthalmol Soc* 40(5): 247-252.
- Park JY, Kim SO, Kim JS. 2007. Congenital toxoplasmosis: a case report. *J Korean Acad Pediatr Dent* 34(3): 526-531.
- Petersen E. 2007. Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12: 214-223.
- Song HO, Ahn MH, Ryu JS, Min DY, Joo KH, Lee YH. 2004. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 42: 185-193.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30: 1217-1258.