

메트로니다졸 내성 질편모충에 대한 한약제재의 성장 억제

경희대학교 의과대학 기생충학교실
박원식 · 조유정 · 주종필

Growth Inhibitory Effects of Various Herbal Extracts on Metronidazole Resistant Strain of *Trichomonas vaginalis*

Won Sik Park, M.D., Ph.D., You Jung Cho, Ph.D. and Jong Phil Chu, M.D., Ph.D.

Department of Parasitology, College of Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Background : Metronidazole has been known as the most effective drug for treatment of *Trichomonas vaginalis*-related diseases. However, it has been reported that metronidazole has adverse effects and incidence of metronidazole-resistant *T. vaginalis* (CDC085) has increased. Development of new drug, which is effective against metronidazole-resistant *T. vaginalis* and showing no adverse effects, has been required.

Methods : The purpose of this study was to investigate effects of various extracts from herbs such as *Quisqualis indica*, *Gleditsia sinensis*, *Prunus armeniaca*, *Morus alba*, *Platycodon grandiflorum*, *Ailanthus altissima*, *Stemona japonica*, *Biota orientalis*, *Dryobalanops aromatica*, and *Cimicifuga heracleifolia* on metronidazole resistant strain of *T. vaginalis* *in vitro* (CDC085).

Results : Anti-*Trichomonas* activities were observed in *T. vaginalis* treated with *G. sinensis*, *P. armeniaca*, and *P. grandiflorum* on the growth and fine structure of metronidazole resistant strain of *T. vaginalis*. Of the three standard extracts that showed the most effective anti-trichomonas activity, *G. sinensis* was the most effective. The inhibitory effects of fraction extracts of this drug were shown on the growth of *T. vaginalis*. The fine structure of the cytoplasm was changed after application of *G. sinensis* extract. The number of polyribosome and hydrogenosome decreased whereas the number of food vacuole and vacuole in the cytoplasm increased, compared with that of untreated control group.

Conclusion : The results of our study indicate that *G. sinensis* may induce the inhibition of cell multiplication as well as impairment of protein synthesis of metronidazole resistant strain of *T. vaginalis* *in vitro*.

Key Words : *Trichomonas vaginalis*, *Gleditsia sinensis*, *Prunus armeniaca*, *Platycodon grandiflorum*, Ultra structure

서 론

질편모충(*Trichomonas vaginalis*)은 감염률이 높은 기생충 질환으로 세계적으로 해마다 17억 정도에 해당되는 여성이 감염되는 것으로 추정되고 있다(WHO 보고)(1).

이들 질편모충은 임상적으로 요도염, 질염, 전립선염을 일으키는 원인이 되고, 비바이러스성 성병 중 가장 흔한 질병 중 하나로서, 경부암, 비특이성 골반염, 불임 등 여러 질병에도 관련이 있다(2). 또한 질편모충증은 cytomegalovirus의 요도내 전염이나 HIV type 1 virus에 감염될 위험성을 증가시키는 것으로 보고되고 있어 주목을 받고 있다(3-6).

이들의 치료약으로 사용되는 메트로니다졸은 그 치료율이 95% 이상으로 높은 편이지만, 1962년 이후 최근까지 약물에 대한 내성을 보이는 질편모충이 해마다 증가

접수: 2003년 3월 21일, 승인: 2004년 1월 18일
교신저자: 주종필, 서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 의과대학 기생충학교실
Tel: 02)961-0278, Fax: 02)967-8401
E-mail: depara@khu.ac.kr

하고 있다(7-9). 미국 내에서만 적어도 100여건 이상, 유럽에서는 20건 정도가 보고된 바 있으며 Lossick (10)은 1989년 CDC (the Centers for Disease Control)에서 질편모충 환자 중 5% 정도가 메트로니다졸에 내성을 보였으며, 이 환자들을 더 많은 용량으로 장기간 치료하였을 때, 그 중 80%만이 효과를 보였고, 고용량에 대한 부작용을 나타내거나 메트로니다졸에 대한 알러지 반응을 보이는 환자들도 있었다고 보고하고 있다. 더욱이 이 약물은 돌연변이나 암을 유발시킬 수 있는 위험성이 있는 것으로 거론되고 있다. 그러므로, 한약제재와 같은 생약제재가 낮은 위험성을 가지면서 높은 약제의 활성을 가진 새로운 약제 원료가 될 수 있다고 생각되었다.

한약 제재는 전통적으로 여러 가지 질병 치료에 사용되어 왔다. 특히 지난 십 년 동안 기생충 치료에 있어서 화학 치료의 대체제로 한약 제재를 이용한 치료가 상당한 관심을 받아왔다. 국내에서도 한약제재와 질편모충에 관한 연구가 수 편 있는데, 정(11)은 고련피가 질편모충에 미치는 영향에 대하여, 최(12)는 고삼이 질편모충에 미치는 효과에 대하여, 최(13)는 인삼에서 추출한 kalopanaxsaponin A의 질편모충에 대한 항원충 작용을 연구 보고한 바 있다. 그러나 아직도 많은 생약제재의 항원충 작용에 대하여는 연구되어 있지 않다.

따라서 이 연구에서는 우리나라 한의학에서 기생충의 치료제로 사용되고 있어 기생충에 대한 구충효과가 있으리라고 생각되는 한약제; 사군자(*Quisqualis indica*), 조협(*Gleditsia sinensis*), 행인(*Prunus armeniaca*), 상백피(*Morus alba*), 길경(*Platycodon grandiflorum*), 저근백피(*Ailanthus altissima*), 백부(*Stemona japonica*), 백자인(*Biota orientalis*), 용뇌(*Dryobalanops aromatica*), 승마(*Cimicifuga heracleifolia*)를 대상으로 메트로니다졸-감수성, 내성을 보이는 질편모충에 대한 시험관내 효능을 알아보고자 하였다. 특히 메트로니다졸 감수성과 내성을 보이는 질편모충에 대하여 효과가 있는 약제의 분획 성분들이 이들 질편모충에 일으키는 반응의 차이를 조사하였다. 또한, 전자현미경을 사용하여 약제에 의한 질편모충 내부의 미세구조적 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 질편모충의 충주(strains)와 배양(cultures)

메트로니다졸-감수성을 나타내는 질편모충(KT4)과 메트로니다졸-내성을 가진 것으로 알려진 ATCC 50143 질

편모충(CDC085)을 구입하여 실험에 사용하였다. 내성을 가진 CDC085 충주는 메트로니다졸 100 mg/mL을 투여한 배지에서 90% 이상의 생존율을 나타낸 충주를 선정, 배양하여 사용하였다.

2) 한약제

한방에서 구충제로 널리 사용되어지는 약제들로 사군자, 조협[주염나무(*Gleditsia horrida* Makino)의 열매를 말린 것으로 글레라닌이라는 사포닌 성분이 있으며, 용혈 작용을 하고, 한방에서는 항염증, 배농 살충약으로 끓은 곳, 부스럼, 혀암에 사용](14), 행인, 상백피[상근백피(桑根白皮)라고도 불리며, 피부병을 치료, 기침을 치료할 때 사용한다. 또한, 갖가지 암에 치료약으로 사용하기도 한다], 길경[도라지 뿌리를 말한다. 기침약으로 이름이 높다. 사포닌 성분이 가래를 삭이고 염증을 삭이는 작용을 한다. 배농 효과도 높아서 끓는데, 기관지염, 편도염, 인후염등에도 사용한다. 소염 작용, 위액분비 억제작용, 항 궤양 작용, 항 아나필락시스 작용 등이 밝혀졌다](14), 저근백피[가중나무의 뿌리껍질 또는 줄기껍질을 벗겨 말린 것으로 디테르펜락톤인 쓴 맛 물질(일일란틴)과 쿠아신, 탄닌질, 피토스테롤, 알카로이드가 있다. 지혈, 설사, 산후심한 하혈, 봉루대하, 장출혈, 이질에 사용해 왔다](14), 백부[성분에는 알카로이드인 스테모닌(stemonine), 스테모니딘(stemonidine), 이소스테모니딘(isostemonidine) 등이 함유되어 있다. 살충제로 민간에서는 피부기생충을 없애는데 사용하였고, 그 외에도 요충, 질편모충 등을 사멸하는 작용이 있다](14), 백자인, 용뇌, 승마의 재료를 엄선하여 구입하였다. 약제를 분쇄하여 분쇄된 재료(건량 20 g)에 3차 증류수(200 mL)를 넣어 24시간 동안 실온에서 우려내서 filter paper로 거른 후, 동결 건조하여 표준추출물을 추출하였다.

2. 방 법

1) 추출물의 분획

표준추출물을 증류수로 녹인 다음, 4배의 메탄올을 넣어 침전시켜 2개의 분획(A분획; 메탄올-불용성과 B분획; 메탄올-용해성)을 얻어 각각 감압 건조시켰다. 분획 B를 다시 증류수에 녹인 다음, 동량의 부탄올을 넣어 2개의 분획(C분획; 부탄올-용해성, D분획; 부탄올-불용성)으로 분리하는 것을 5번 반복한 다음 감압 건조시켜 각각의 분획물들을 추출하였다.

추출한 분말은 PBS나 배지로 녹여, 각 산물마다 3개의 stock solution (2, 10, 20 mg/mL)을 만들었다. 만든 stock solution 100 μ L씩 질편모충이 있는 배양액 1.9 mL

에 첨가하여 최종 농도가 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 처리하였다.

2) 질편모충에 대한 약제의 살충효과

10% 비활성 horse serum이 포함된 TYM (Trypticase-yeast-maltose, pH6.0) 배지로 37°C, 5% CO_2 농도 하에서 배양한 질편모충을 24 well plate에 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 로 최종 부피가 2 mL가 되게 취하였다. 검사할 추출물은 배지로 녹인 다음 질편모충을 넣은 후 6시간 배양 후 첨가하였다. 24시간 후 살아있는 질편모충 수를 계산하였다. 각 실험을 3번씩 반복하였다.

24시간 후 살아있는 원충의 수와 0시간에서 측정한 원충 수의 관계를 성장률(GR, growth rate)로 표시하였다. 그리고, 성장 저해율(% GI, the percentage of growth inhibition)은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\% \text{ GI} = \left(1 - \frac{\text{GR}_{\text{extract}}}{\text{GR}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

3) 투과전자현미경(Transmission electron microscope) 관찰을 위한 실험

각 농도별 실험군을 배양 후 수거하여 전자현미경 관찰을 위하여 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 버리고 2.5% glutaraldehyde에 4시간 고정 한 후

PBS로 세척하고 다시 1% osmium tetroxide (pH 7.4)로 2시간 동안 후고정시킨 다음 알코올로 탈수하였다. 그리고 propylene oxide로 치환한 후 Epon 812에 포매하였다. 조직을 LKB III ultratome으로 1 μm 의 초박절편을 작성하여 alkali toluidin blue로 염색하고, 관찰부위를 결정 한 후 40-60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 하고, Hitachi H 600 Å 전자현미경으로 가속전압 60-80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 질편모충에 대한 약제들의 살충효과

사군자, 조협, 행인, 상백피, 길경, 저근백피, 백부근, 백자인, 용뇌, 승마의 질편모충에 대한 약제 효능의 실험 결과는 Table 1에 나타내었다.

사군자에 의한 메트로니다졸 감수성 질편모충의 성장 억제 효과를 보면, 농도에 따라 8% (100 $\mu\text{g/mL}$), 39% (500 $\mu\text{g/mL}$), 64% (1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 증가하였으며, 내성군에서는 농도에 따라 0%, 28% 및 31%로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, 감수성군에 비해 성장억제 효과가 감소했다.

조협의 경우, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 감수성 군이 76%,

Table 1. Effects of the Standard Extracts of Crude Drugs on Growth of *T. vaginalis* after 24 Hours of Incubation

Herbal extract	Strain	% Growth inhibition		
		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1,000 $\mu\text{g/mL}$
<i>Q. indica</i>	KT4	8 \pm 7.2*	39 \pm 25.4 [†]	64 \pm 31.3 [†]
	CDC085	0 \pm 0.0	28 \pm 10.7	31 \pm 16.9
<i>G. sinensis</i>	KT4	76 \pm 16.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	62 \pm 2.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]	100 \pm 0.0 [†]
<i>P. armeniaca</i>	KT4	62 \pm 9.1 [†]	70 \pm 11.0 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	20 \pm 19.5	26 \pm 15.3	100 \pm 0.0 [†]
<i>P. grandiflorum</i>	KT4	11 \pm 8.1	28 \pm 7.1*	57 \pm 21.9 [†]
	CDC085	0 \pm 0.0	3 \pm 2.5	32 \pm 16.8
<i>M. alba</i>	KT4	2 \pm 21.1	-13 \pm 26.1	-20 \pm 23.6
	CDC085	-13 \pm 11.5	-35 \pm 33.7	-46 \pm 50.4
<i>A. altissima</i>	KT4	2 \pm 2.1	-4 \pm 3.8	-1 \pm 12.1
	CDC085	-2 \pm 3.8	-2 \pm 2.9	0 \pm 12.5
<i>S. japonica</i>	KT4	7 \pm 7.0*	2 \pm 5.3	-21 \pm 25.9
	CDC085	-50 \pm 30.0	-60 \pm 20.0	-100 \pm 20.0
<i>B. orientalis</i>	KT4	-1 \pm 4.6	-3 \pm 10.8	6 \pm 6.7
	CDC085	-7 \pm 11.6	-10 \pm 10.0	-10 \pm 2.0
<i>D. aromatica</i>	KT4	-5 \pm 5.0	-3 \pm 3.5	6 \pm 6.0
	CDC085	-31 \pm 30.1	-20 \pm 20.0	-6 \pm 5.1
<i>C. heracleifolia</i>	KT4	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	CDC085	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	7 \pm 9.1

Data was expressed as means (n=3) \pm S.D. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests of SAS

* $P < 0.05$ vs control group, [†] $P < 0.01$ vs control group

내성균이 62%로 비교적 높은 억제 효과를 보였고, 그 이상의 농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 두 군 모두에서 100%의 억제 효과가 있었다.

행인의 경우, 감수성 군에서는 농도의 증가에 따라 62% (100 $\mu\text{g/mL}$), 70% (500 $\mu\text{g/mL}$), 100% (1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 비교적 높은 억제 효과를 보인 반면, 내성 군에서는 20%, 26% 및 100%로 저농도에서는 성장 억제 효과가 비교적 저조하였다.

길경의 경우, 감수성 군에서 11% (100 $\mu\text{g/mL}$), 28% (500 $\mu\text{g/mL}$), 57% (1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 증가하였고, 내성군에서도 0%, 3% 및 32%로 농도가 증가하면서 억제 효과는 처음보다는 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

상백피, 저근백피, 백부근, 백자인, 용뇌 및 승마는 질편모충(메트로니다졸 감수성 군 및 내성군)에 대한 성장 억제 효과가 없었다.

2. 질편모충에 대한 약제 추출물 분획의 살충효과

표준추출물에서 효과가 있었던 조합, 행인, 길경의 분획물들을 추출하여 질편모충에 대한 약제 효능의 실험을 수행하여 얻은 결과는 Table 2-4와 같다.

Table 2에서 조합에 의한 메트로니다졸 감수성 질편모충과 메트로니다졸 내성 질편모충에 성장 억제 효과를 보면 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 분획의 종류에 관계없이 질편모충 성장이 완전히 억제되었다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 고정시켰을 때 A 분획(메탄올 불용성) 경우, 감수성군에서는 100%의 억제 효과를 보였고, 내성군에서는 87%이었다. B 분획(메탄올 용해성) 및 C 분획(부탄올 용

해성)의 경우 감수성 군에서는 96%, 97%의 억제를 보였으며, 내성군에서는 공히 69%의 성장 억제를 보였다. D 분획(부탄올 불용성)의 경우 각각 60%, 38%의 질편모충 성장 억제를 보였다.

Table 3에서 행인에 의한 메트로니다졸 감수성 질편모충과 메트로니다졸 내성 질편모충에 성장 억제 효과를 보면, 약제 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로부터 1000 $\mu\text{g/mL}$ 로 농도를 증가시켰을 때 질 편모충 성장 억제가 증가되었으나 모두 50% 미만으로 낮았다.

Table 4에서 길경 A 분획의 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가시켰을 때 A 분획의 경우 감수성 군에서는 각각 25%, 76%, 90%로 성장이 억제된 반면 내성군에서는 7%, 8%, 16%로 억제효과가 낮았다. B

Table 3. Effects of the Fraction Extract of *Prunus armeniaca* on Growth of *T. vaginalis* after 24 Hours of Incubation

Fraction	Strain	% Growth inhibition		
		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1,000 $\mu\text{g/mL}$
A	KT4	14 \pm 7.0*	25 \pm 4.7 [†]	42 \pm 3.5 [†]
	CDC085	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	5 \pm 5.0
B	KT4	3 \pm 3.5	21 \pm 3.5 [†]	35 \pm 5.0 [†]
	CDC085	3 \pm 4.2	18 \pm 1.5	21 \pm 3.6 [†]
C	KT4	15 \pm 7.0 [†]	25 \pm 4.7 [†]	25 \pm 5.9 [†]
	CDC085	3 \pm 3.5	11 \pm 10.1	20 \pm 11.4 [†]
D	KT4	10 \pm 10.0	14 \pm 8.5*	31 \pm 4.5 [†]
	CDC085	9 \pm 7.2	9 \pm 7.2	18 \pm 8.5 [†]

Data was expressed as means (n=3) \pm S.D. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests of SAS

* P <0.05 vs control group, [†] P <0.01 vs control group

A: methanol-insoluble fraction, B: methanol-soluble fraction, C: butanol-soluble fraction, D: butanol-insoluble fraction.

Table 2. Effects of the Fraction Extracts of *Gleditsia sinensis* on Growth of *T. vaginalis* after 24 Hours of Incubation

Fraction	Strain	% Growth inhibition	
		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
A	KT4	100 \pm 0.0 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	87 \pm 4.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]
B	KT4	96 \pm 1.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	69 \pm 6.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]
C	KT4	97 \pm 1.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	69 \pm 5.7 [†]	100 \pm 0.0 [†]
D	KT4	60 \pm 4.4 [†]	100 \pm 0.0 [†]
	CDC085	38 \pm 11.5 [†]	100 \pm 0.0 [†]

Data was expressed as means(n=3) \pm S.D. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests of SAS

* P <0.05 vs control group, [†] P <0.01 vs control group

A: methanol-insoluble fraction, B: methanol-soluble fraction, C: butanol-soluble fraction, D: butanol-insoluble fraction

Table 4. Effects of the Fraction Extract of *Platycodon grandiflorum* on Growth of *T. vaginalis* after 24 Hours of Incubation

Fraction	Strain	% Growth inhibition		
		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1,000 $\mu\text{g/mL}$
A	KT4	25 \pm 13.5*	76 \pm 14.6 [†]	90 \pm 8.4 [†]
	CDC085	7 \pm 9.5	8 \pm 10.4	16 \pm 8.5
B	KT4	41 \pm 6.1 [†]	63 \pm 24.6 [†]	78 \pm 17.5 [†]
	CDC085	38 \pm 1.0 [†]	38 \pm 1.0 [†]	42 \pm 7.0 [†]
C	KT4	65 \pm 15.9 [†]	90 \pm 2.7 [†]	91 \pm 4.9 [†]
	CDC085	29 \pm 11.6 [†]	66 \pm 22.9 [†]	89 \pm 5.7 [†]
D	KT4	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	4 \pm 3.5
	CDC085	16 \pm 7.6	16 \pm 7.6	23 \pm 13.1*

Data was expressed as means (n=3) \pm S.D. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests of SAS

* P <0.05 vs control group, [†] P <0.01 vs control group

A: methanol-insoluble fraction, B: methanol-soluble fraction, C: butanol-soluble fraction, D: butanol-insoluble fraction

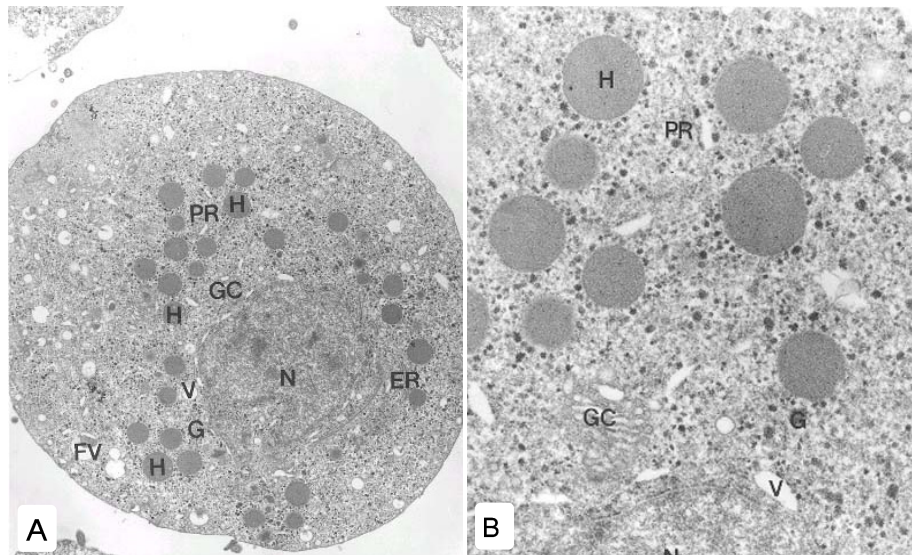


Figure 1. TEM of Metronidazole Resistant Strain of *T. vaginalis* cultivated in TYM medium without any extract (control). **(A)** *T. vaginalis* consists of an irregularly shaped nucleus (N), hydrogenosomes (H), Golgi complex (GC), glycogen granules (G), polyribosomes (PR), vacuoles (V), and food vacuole (FV) in the cytoplasm ($\times 5,000$). **(B)** Magnification of **(A)**. Nucleus (N) encircled by rough endoplasmic reticulum (ER) contains clusters of chromatinic materials in the nucleoplasm. Hydrogenosomes (H) are located around the nucleus and surrounded by polyribosomes and glycogens ($\times 17,000$).

분획의 경우 감수성 군에서는 41%, 63%, 78%로 증가된 반면 내성 군에서는 38%, 38%, 42%로 비슷하였다. C 분획의 경우는 감수성 군에서는 65%, 90% 및 91%로 분획들 중에 가장 높은 억제 효과를 보였고, 내성 군에서는 29%, 66%, 89%의 억제 효과를 보였다. D 분획의 경우는 감수성 군에서는 0%, 0%, 4%로 낮은 억제 효과를 보였고, 내성 군의 경우도, 16%, 16%, 23%의 낮은 억제 효과를 보였다.

3. 전자현미경 관찰

조협의 메트로니다졸 내성 질편모충에 대한 살충효과를 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 약제 처리를 하지 않은 메트로니다졸 내성 대조군에서 질편모충은 불규칙한 모양의 핵과 핵 주위의 둥근 hydrogenosome 및 polyribosome, translucent area가 적었으며 세포질 내의 공포가 그리 많지 않게 관찰되었다(Figure 1A, 1B). 핵의 염색질은 염색성이 엷어져 보이고 진정 염색질(euchromosome)보다 이질 염색질이 많아 보였다. 세포질 내에 식공포(food vacuole)와 골지체 및 rER이 관찰되었다(Figure 1A, 1B).

조협을 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여한 군에서는 핵의 염색질은 염색성이 엷어져 보이고 진정 염색질보다 이질 염색질이 많아 보였고, 식공포의 수가 크게 증가하였으며 공포의

수도 같이 증가한 것을 볼 수 있다. 공포 및 식공포도 커졌으며 글리코젠 과립이 빠져나간 것으로 보이는 electron lucent한 곳이 보였다. Hydrogenosome의 수는 대조군에 비해 감소하였으며 그 형태도 원형에서 타원형으로 변하였고, 확대 소견에서는 막이 없어지고 성분들이 세포질 내로 흘러나오는 듯한 소견을 보여 준다. 또한 주위에 밀집되어 있던 polyribosome의 수도 감소되었고 전반적으로 ribosome의 수가 감소된 소견을 보였다. 그러나 질편모충의 외피막은 파괴되지 않아 보였다(Figure 2A, 2B).

고 찰

한의학에서는 일찌기 아메바성 원충, 질편모충, 람블편모충 등의 감염 시에 고삼, 고련피, 빈랑 등의 생약제를 치료제로 사용하여 왔다는 보고가 있다(15, 16). 그러나 고삼, 고련피, 빈랑 같은 한약 제제의 질편모충에 대한 살충효과 및 그 기전에 대한 구체적인 연구 보고가 없을 뿐더러 효능에 관하여도 입증되지 않은 것들이 대부분이라고 할 수 있다. 이에 한약으로 오래 전 동양 의서에 기재되어 온 약들 가운데 기생충에 대한 구충 효과가 있다고 알려진 수종의 약제 중 사군자, 조협, 행인, 상백피, 길경, 저근백피, 백부근, 백자인, 용뇌, 승마를 가지고 질편모충에 대한 약제 효능과 살충 효과를 파악하기 위하여

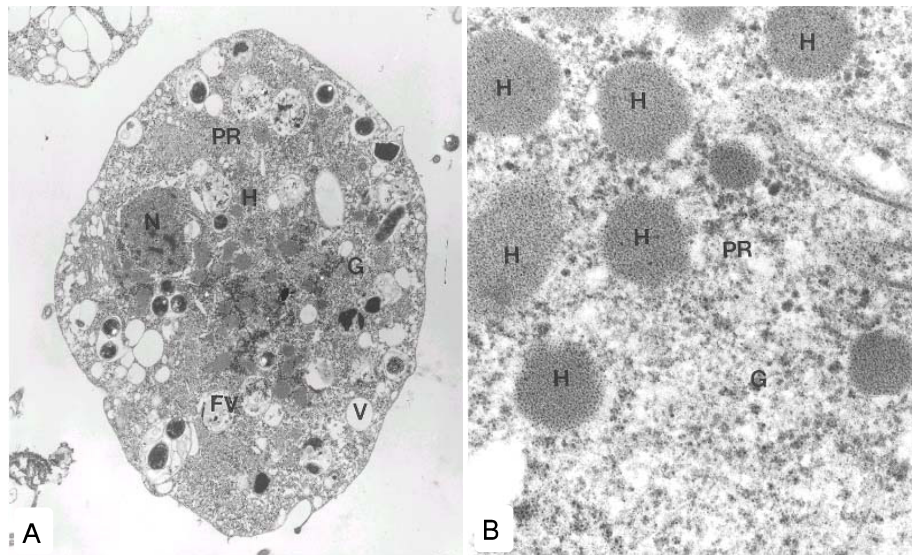


Figure 2. TEM of Metronidazole Resistant Strain of *T. vaginalis* cultivated in TYM medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ extract of *G. sinensis* for 24 hours. **(A)** The free ribosomes in the cytoplasm are mostly present as polyribosomes (PR). Nucleus (N), perinuclear bleb, glycogen granules (G), vacuoles (V), and food vacuole (FV) in the cytoplasm are also visible **(A)** and **(B)**. Nucleus (N), some of the perinuclear endoplasmic reticulum (ER) are also visible. Large food vacuoles (FV) are shown in cytoplasm ($\times 5,000$). **(B)** Magnification of **(A)**. The number of polyribosomes (PR) and hydrogenosome (H) were found to have decreased compared with control trophozoites. Hydrogenosomes show ellipsoidal shape, and demarcation of their membrane is unclear ($\times 37,000$).

실험을 하였다. 그 결과 몇 가지 약제의 성분이 현재 사용하고 있는 메트로니다졸, 니트로이미다졸 등과 어떤 성분에서 유사한지는 알 수 없으나, 메트로니다졸 감수성 질편모충과 메트로니다졸 내성 질편모충에 성장 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 조협과 행인이 효과가 있음을 알 수 있었고, 한약제 중 질편모충에 대한 약제 추출물 분획의 살충효과에서는 조협과 길경의 일부 추출물에서 성장 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다. 조협의 질편모충에 대한 미세관찰에서 조직내의 hydrogenosome의 수적 감소와 polyribosome 및 ribosome의 감소가 이들의 성장 억제에 직접적으로 영향을 미친 것이 아닌가 사료된다. 메트로니다졸은 1950년대 이후 질편모충증 치료에 널리 사용되는 약으로 메트로니다졸의 항원충 작용 기전은 nitro radical을 생성하여 DNA에 손상을 주어 세포를 죽이는 것으로 보고 있다. 말하자면, 정상적인 조건에서는 질편모충의 미토콘드리아 유사세포 소기관인 hydrogenosome내에 있는 pyruvate-ferrodoxin oxireductase (PFO)와 ferrodoxin 관련 효소들이 작용하여 pyruvate가 acetyl Co-A를 거쳐 acetate로 산화되는 과정에서 ATP를 얻는데 반하여, 메트로니다졸이 존재하게 되면, 이 약물이 ferrodoxin으로부터 전자를 빼앗아 nitro radical을 생성하여 세포에 손상을 주면서 질편모충을 죽이

게 된다(17). 김(18)도 철분이 결핍된 배지에서 질편모충은 hydrogenosome의 수가 줄고 주위의 polyribosome도 없어지고 공포로 둘러싸여 있다고 보고하였다. 또한 정(11)의 고련피를 이용한 실험에서도 고련피 150 $\mu\text{L/mL}$ 의 농도에서 시간 경과에 따라 질편모충 세포벽의 손상이 관찰되었고, 또 200 $\mu\text{L/mL}$ 이상의 농도에서는 기생충체의 세포벽에 손상이 오며 핵도 얇아지고 세포질에 많은 공포화 현상이 관찰되고 죽은 세포들도 관찰되었는데, 이것은 충체의 퇴행성 변화가 많이 진행된 것을 의미한다고 하였다. 이러한 소견은 연구자의 결과와 유사하여, 질편모충에서 에너지 생산에 관여하는 것으로 알려진 소기관인 hydrogenosome의 소실이 질편모충의 에너지 생산에 영향을 줄 것으로 사료된다. Palade and Siekevitz (19)는 polyribosome이 외부로 배출될 단백질 생산에 관여한다고 하였는데, 조협, 길경의 투여에 있어서도 세포 내에서 필요한 단백질이나 외부로 배출될 단백질 합성에 장애를 초래한다고 생각된다.

사군자는 초기임상실험에서 성분중의 사군자산칼륨이 인체에 기생하는 회충, 요충을 구제하는 작용이 있고, 돼지회충의 두부에 대하여 마비작용이 있다는 것이 증명되었다. 또 그 유효성분이 수용성이며, 메탄올에도 용해되고 석유에테르에는 용해되지 않으며, 클로로포름 및 순

에탄올에도 마찬가지로 용해되지 않는 것이 증명되었다. 그 중에 함유되는 피리딘이 구충작용과 관계가 있다는 보고도 있고 사균자의 불취발성유와 피마자유의 혼합제는 동물이나 인간에 대한 배충율이 높고 현저한 부작용도 없다고 하였다(14). 이번 실험에서 원충성 기생충인 질편모충에 대하여 약물의 효과를 보면, 농도에 따라 약간의 그 억제 효과가 있었으나, 큰 효과를 보기는 어려웠다.

조협은 이번 실험에서 가장 좋은 실험 결과를 보여 앞으로 메트로니다졸의 대체 약물로 개발을 기대할 수 있겠다.

길경은 이번 실험에서 조협보다 못하나 메트로니다졸 내성 질편모충에 성장 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 앞으로 성분 분석을 통한 보다 많은 연구가 기대된다.

상백피는 이번 실험에서 질편모충에 대한 성장 억제 효과가 거의 없었고 저근백피, 백부근 등도 이번 실험에서 질편모충에 대한 성장 억제 효과를 보기 어려웠다.

요 약

목 적 : 질편모충의 치료약으로 사용되어온 메트로니다졸에 대한 내성이 있는 질편모충의 증가와 이 약물로 인한 변이나 암을 유발할 수 있는 위험성이 거론되는 시점에서, 낮은 위험성을 가지면서도 높은 효과를 보일 수 있는 약제의 개발이 필요하다. 이 연구에서는 전통적으로 사용되어 왔던 한약과 같은 생약제재를 실험 재료로 내성 질편모충의 성장에 미치는 효과를 관찰함으로써, 새로운 약제 개발을 모색하고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

방 법 : 사균자, 조협, 행인, 상백피, 길경, 저근백피, 백부근, 백자인, 용뇌, 승마에 의한 추출물로 메트로니다졸 감수성 질편모충과 메트로니다졸 내성 질편모충(CDC085)에 성장 억제 효과를 검사하여 억제 효과가 있는 조협, 행인, 길경의 추출물 분석을 얻어 다시 질편모충에 대한 약제 효능의 실험을 하였으며 특히 조협에 대한 효과를 미세 구조적으로 관찰하였다.

결 과 :

1) 질편모충에 대한 약제 추출물의 살충효과 : 사균자, 조협, 행인, 상백피, 길경, 저근백피, 백부근, 백자인, 용뇌, 승마에 의한 질편모충 성장에 대한 약제 효능의 실험 결과에서 사균자, 조협, 행인, 길경이 성장 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

2) 질편모충에 대한 약제 추출물 분석의 살충효과: 질

편모충에 대한 한약제의 분획 추출물의 약제 효능의 실험 결과, 조협과 길경의 분획에서 성장 억제 효과가 있었다.

3) 전자현미경적 관찰: 투과전자현미경 관찰에서도 약제의 농도와 배양 시간에 따라 조협을 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여한 내성균에서는 식공포, 공포의 수와 크기의 증가를 볼 수 있었다. Hydrogenosome의 수는 대조군에 비해 감소하였으며 주위에 밀집되어 있던 polyribosome의 수도 감소되었다.

결 론 : 여러 한약제재중 조협, 행인, 길경이 질편모충 성장 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 그 중에서도 조협이 가장 큰 효과를 보였다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 경희대학교 지원에 의한 결과임 (KHU-20031118).

참 고 문 헌

- 1) World Health Organization: *WHO factsheet. Office of HIV/AIDS and Sexually Transmitted Disease, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997*
- 2) Heine P, McGregor J: *Trichomonas vaginalis: a re-emerging pathogen. Clin Obstet Gynecol 36:137-144, 1993*
- 3) Jackson D, Rakwar J, Kishorchandra Mandaliya B, Bwayo J, Ndinya-Achola J, Nagelkerke N, Kreiss J, Moses S: *Urethral infection in a workplace population of East African men: evaluation of strategies for screening and management. J Infect Dis 175: 833-838, 1997*
- 4) Jackson D, Rakwar J, Bwayo J, Kreiss J, Moses S: *Urethral Trichomonas vaginalis infection and HIV-1 transmission. Lancet 350:1076-1077, 1997*
- 5) Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzola N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M, Heyward WL, Ryder RW, Piot P: *Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. AIDS 7:95-102, 1993*
- 6) Sorvillo F, Kerndt P: *Trichomonas vaginalis and amplification of HIV-1 transmission. Lancet 351: 213-214, 1998*
- 7) Muller M, Meingassner J, Miller W, Ledger W: *Three metronidazole-resistant strains of Trichomonas vaginalis from the United States. J Obstet Gynecol 138:808-812, 1980*

- 8) Muller M, Gorrell TE: *Metabolism and metronidazole uptake in Trichomonas vaginalis isolates with different metronidazole susceptibilities*. *Antimicrob. Agents Chemother* 24:667-673, 1983
- 9) Muller M, Lossick JG, Gorrell TE: *In vitro susceptibility of Trichomonas vaginalis to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis*. *Sex Transm Dis* 15:17-24, 1988
- 10) Lossick JG: *Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis*. *Rev Infect Dis Suppl* 6:S665-681, 1990
- 11) 정인배: 질편모충에 대한 고련피(*Melia azedarach*)의 약제 효과에 따른 미세 구조적 변화. 경희대학교 박사 학위 논문. 미발표자료, 1998
- 12) 최원규, 조유정, 주종필: 질편모충에 대한 고삼(*Sopora flavescens*)의 약제 효과에 따른 미세 구조적 변화. *감염* 33(4):248-254, 2002
- 13) 최재웅, 조유정, 주종필: *Kalopanaxsaponin A*가 질편모충에 미치는 영향. *경희의학* 26(1):103-110, 2001
- 14) 문관심: 약초의 성분과 이용. p755. 서울. 한국. 일월서각, 1994
- 15) 장홍선: *현대중약약리학*. p220. 중국. 천진과학기술출판사, 1997
- 16) 진존인: *도설 한방의약대사전*(한국판). 4권 p110-113. 서울, 한국. 송악출판사, 1990
- 17) Edwards D: *Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action*. *J Antimicrob Chemother* 31:9-20, 1993
- 18) 김창민, 안덕균: *완역 중약대사전*. p340, 서울. 정담출판사, 1999
- 19) Palade G, Siekevitz E: *Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study*. *J Biochem Cytol* 2:171-200, 1956
- 20) Favel A, Steinmetz MD, Regli P, Vidal-Ollivier E, Elias R and Balansard G: *In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins*. *Planta Med* 60(1):50-53, 1994
- 21) Kim MC: *Ultrastructural changes of Trichomonas vaginalis after iron chelate (2,2'-dipyridyl) treatment*. Phd. Thesis. Personal communication, 1998
- 22) Moulin-Traffort J, Favel A, Elias R, Regli P: *Study of the action of alpha-hederin on the ultrastructure of Candida albicans*. *Mycoses* 41(9-10):411-416, 1998
- 23) Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS: *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. *Biochemistry* 27(24):8706-8711, 1988
- 24) Hibbs JB, Jr Vavrin Z, Taintor RR: *Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite*. *Science* 235(4787):473-476, 1987
- 25) Stuehr DJ and Nathan CF: *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells*. *J Exp Med* 169(5):1543-1555, 1989
- 26) 박원식: 고련피가 질 편모충에 미치는 영향. 경희대학 석사논문. 미발표자료, 1999