

## Antiviral Effects of Sulfated Exopolysaccharide from the Marine Microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03

임정환, 김성진, 박규진, 안세훈, 이현상, 이홍균

한국해양연구원 해양자원본부 미생물실

전화 (031) 400-6241, FAX (031) 406-2495

### ABSTRACT

The sulfated exopolysaccharide p-KG03, which is produced by the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03, exhibited impressive antiviral activity *in vitro* ( $EC_{50} = 26.9 \text{ g/ml}$ ) against the encephalomyocarditis virus (EMCV). Depending on the p-KG03 concentration, the development of cytopathic effects in EMCV-infected HeLa cells was either inhibited completely or slowed. Moreover, p-KG03 did not show any cytotoxic effects on HeLa cells, even at concentrations up to 1,000 g/ml. The polysaccharide was purified by repeated precipitation in ethanol, followed by gel filtration. The p-KG03 polysaccharide had a molecular weight of  $1.87 \times 10^6$ , and was characterized as a homopolysaccharide of galactose with uronic acid (2.96%, w/w) and sulfate groups (10.32% w/w). The biological activities of p-KG03 suggest that sulfated metabolites from marine organisms are a rich source of antiviral agents. This is the first reported marine source of antiviral sulfated polysaccharides against EMCV. The p-KG03 polysaccharide may be useful for the development of marine bioactive exopolysaccharides for use in biotechnological and pharmaceutical products.

### 서론

AIDS의 치료를 위하여 해양 조류의 추출물인 천연 다당류를 바이러스의 치료에 이용하려는 시도가 있어 왔는데, 이는 황합유 다당류(sulfated polysaccharide)로 특히 해양에 서식하는 조류에 광범위하게 존재한다. 천연다당류의 항바이러스 효과에 대한 최초의 보고는 Gerber 등 (1958)에 의하여 *Gelidium cartlagenium*의 다당류가 influenza B 및 mumps virus에 대하여 항바이러스 효과가 있다는 보고 이 후 황 성분이 높은 미세조류의 다당류가 효과적인 항바이러스 효과를 가지고 있다는 것이 보고되었다 (Flexner *et al.*, 1991). 그러나 천연 다당류의 항바이러스 효과가 특이적이지 못하고 광

범위하다는 이유로 천연 다당류의 항바이러스 효과에 대한 관심이 크지 못하였다가 조류에서 분리된 황함유 다당류가 human immune deficiency virus (HIV), herpes enveloped virus type 1 및 type 2 (HSV-1 및 HSV-2), influenza A virus, RSV, simian immunodeficiency virus (SIV), pseudorabies virus, bovine herpes virus, and human cytomegalovirus (HCMV) 등의 enveloped viruses에 대한 항바이러스 효과가 있다는 보고가 있는 이후 해조류 유래, 황함유 다당류에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다 (Witvrouw and De Clereq, 1997). 특히 해양성 미세조류로 와편모조인 *Cochlodinium polykrikoides*의 황함유 다당류는 A1 ( $1.3 \times 10^6$  Da) 및 A2 ( $6.3 \times 10^5$  Da)이며, A1 및 A2가 influenza virus type A, B (in MDCK cells), HIV-1 ( $IC_{50}$   $1.7 \mu\text{g}/\text{ml}$  in MT-4 cells) 및 RSV Types A, B (in Hep-2)에, A1은 HSV-1 (in HMV-2), A2는 parainfluenza virus type 2 (HMV-2)에서 항바이러스 효과를 가지며 세포독성은 없는 것으로 보고하였다 (Hasui *et al.*, 1995). 따라서 본 연구는 순수분리한 *G. impudicum* strain KG03이 생산하는 p-KG03의 항바이러스 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주배양

*Gyrodinium impudicum* strain KG03의 세포외다당류인 p-KG03의 생산은 1ℓ ALBTPR을 이용하여 최적배지인 M-KG03 액체배지 800 ml에 시료농도를  $1 \times 10^3$  cells/ml의 농도로 접종한 후 22°C, 16L : 8 D로 CO<sub>2</sub> 1%, 50 cc/min, 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  광도로 유지하여 21일간 배양하였다.

### 세포외다당류의 분리 및 정제

배양액에서 균체를 제거한 후 상등액을 2 배의 100% cold ethanol을 첨가하여 4°C에 냉침하고, 이를 70% cold ethanol로 2회 세척한 후 다시 증류수에 녹인 후 4°C에서 3 배의 3차 증류수를 연속적으로 첨가하여 연속 투석기(Pellicon 2, Millipore, USA)로 투석하고 2 배의 100% cold ethanol을 첨가하여 4°C에서 24시간 냉침하고 침전된 p-KG03을 회수하였다. 투석이 완료된 p-KG03은 동결, 건조하여 조다당으로 분리하였다. 정제시료는 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)처리, 투석막(cut off 11,000 Da, Sigma, USA), 및 Sepadex G-200에 의한 gel chromatography를 이용하여 정제한 후 동결, 건조하여 얻은 p-KG03을 항바이러스 조사에 이용하였다.

### 항바이러스 활성조사

Anti-HSV, Anti-HIV, Anti-PC로 Anti-HSV 약효검색으로 HSV-1 strain F, HSV-2 strain MS, Mock (Cytocidal effects) 및 Mock (Cytocidal & cytostatic effects)이며, Anti-PC 약효 검색은 CoxB3 strain Nancy, EMCV strain EMC, VSV strain Indiana 및 Mock (Cytocidal effects)이고, Anti-HIV 약효검색은 HIV-1 strain IIIb (or RF), HIV-2 strain CBL20 (or ROD), Mock (Cytostatic effects)이다. 또한 사용세포는 Vero (African Green monkey kidney cell), HeLa (human cervical carcinoma cell) 및 MT-4 (HTLV-1-infected human T lymphocyte)이다. 각 시험에 사용한 표준 약물은 Anti-HSV는 Acyclovir (ACV), Cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC)이며, Anti-PC는 Ribavirin (Riv)이고 Anti-HIV는 Azidothymidine (AZT), 2',3'-dideoxycytidine (ddC) 및 2',3'-dideoxyinosine (ddI)이었다. p-KG03은 10~40 mg/ml로 100% DMSO에 녹이고, 20°C에 보존하다가 배양액에 시험 농도의 1 배 또는 2 배로 희석하여 사용하였고, 96-well culture flask 내에 DMSO의 농도가 0.5% 또는 1%가 넘지 않도록 하였다. Anti-HSV (Herpes simplex virus) 항바이러스 조사는 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 96 well plate에 Vero세포를 증식시킨 다음 DME 2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID<sub>50</sub> (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100  $\mu$ l씩 접종하고 1시간동안 37°C에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하고 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일 배양한 다음, MTT 검색법으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC<sub>50</sub> (50% effective concentration)로 결정하였다. Anti-RNA virus의 항바이러스 효과 조사는 성장이 멈춘 HeLa세포에 희석된 바이러스를 96-well plate의 well당 100 CCID<sub>50</sub>가 되도록 100  $\mu$ l씩 접종시키고 30분 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 흡착시켰다. 바이러스 용액을 제거하고 HSV에서와 같이 약물을 100  $\mu$ l씩 duplicate로 첨가한 후 2일 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 HSV와 같은 방법으로 MTT용액을 첨가하여 약효를 평가했다. Anti-HIV의 항바이러스 효과 조사는 CPE 저해법을 이용하였다. 즉, MT-4 세포를 원심분리한 다음 상등액은 제거하고 세포침전물에 바이러스를 100 CCID<sub>50</sub>가 되도록 접종의 다음, RPMI 1640/10%를 첨가하여 세포를 1x10<sup>5</sup> cells/ml이 되도록 희석하였다. 두 배 희석된 약물이 담겨져 있는 plate에 well당 100  $\mu$ l의 세포 희석액을 첨가하고, 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일 배양하였다. MTT검색법으로 시료의 독성 및 약효를 평가하였다. 바이러스가 접종되지 않은 세포가 약물에 더해지는 mock-infected well의 살아남은 세포 수를 약물이 첨가되지 않은 cell control well 과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration)으로 결정하여 약물의 독성을

조사하였다. 바이러스에 감염된 세포의 50%를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC<sub>50</sub> (50% effective concentration)으로 항바이러스 약효를 평가하였다.

### 약물의 독성 검사

약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 3일 배양 후 MTT검색법으로 약물이 첨가된 각 mock-infected well의 살아남은 세포 수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration)으로 결정하였다. 세포독성 측정을 위한 mock-infected의 세포 생존율(% survival)은  $\{[A(\text{agent}) - A(\text{Blank})] / [A(\text{Cell control}) - A(\text{Blank})]\} \times 100$  (%)으로 생존율이 100%이면 독성이 없는 것이고, 0%일 경우 독성이 가장 강하다. 항바이러스 효과는  $\{[A(\text{agent/virus}) - A(\text{Virus control})] / [A(\text{Cell control}) - A(\text{Virus control})]\} \times 100$  (%)으로 생존율이 100%이면 항바이러스 효과를 100%로 하고, 생존율이 0%이면 항바이러스 효과가 없는 것으로 하였다. Anti-HSV로부터 EC<sub>50</sub>과 세포독성 값으로부터 CC<sub>50</sub>을 구한 후 selectivity index (SI, CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>)를 구하였다

### 결과 및 고찰

**Anti-HSV:** p-KG03의 Anti-HSV에 대한 항바이러스 검색결과는 Table 1과 같다. p-KG03의 Anti-HSV에 대한 항바이러스 검색 결과, p-KG03은 HSV-1 및 HSV-2에 대하여 antiviral activity (EC<sub>50</sub>)가 각각 159.85로 항바이러스 효과가 대조약품인 ACV의 0.83, 2.39 및 Ara-C의 1.63, 2.97로 p-KG03은 selectivity index가 1이하로 대조약품에 비교하여 우수하지 못한 것으로 조사되었으며, 세포독성은 159.85로 ACV의 10 및 Ara-C의 4.83 등의 대조약품에 비교하여 세포독성이 적은 것으로 조사되었다.

**Table 1.** Anti-HSV activity of p-KG03

Code	Toxicity	Antiviral activity (EC <sub>50</sub> )		Selectivity index	
		HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
ACV	> 10,0	0.83	2.39	> 12.05	> 4.18
Ara-C	4.83	1.63	2.97	2.96	1.63
<b>KG03</b>	<b>159.85</b>	<b>159.85</b>	<b>159.85</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>&lt; 1</b>

**Anti-HIV:** p-KG03의 Anti-HIV에 대한 항바이러스 검색을 위하여 HIV-1 strain IIIB (or RF), HIV-2 strain CBL20 (or ROD), Mock (Cytostatic effects)를 대상으로 약효검색을 한 결과는 Table 2와 같다. p-KG03의 Anti-HIV에 대한 항바이러스 검색 결과,

p-KG03는 IIIB 및 ROD에 대하여 antiviral activity ( $EC_{50}$ )가 각각 540.14로 항바이러스 효과가 대조약품인 Heparin의 0.86, > 1,000, PS의 0.85, 2.24, AZT-2의 0, 0.1, ddC의 0.06, 0.06 및 ddI의 2.1, 11.05로 p-KG03은 selectivity index가 1이하로 대조약품에 비교하여 우수하지 못한 것으로 조사되었으며, 세포독성은 540.14로 ddC 및 AZT-2보다는 세포독성이 비교적 적은 것으로 조사되었다.

**Table 2.** Anti-HIV activity of p-KG03.

Code	Toxicity	Antiviral activity ( $EC_{50}$ )		Selectivity index	
		IIIB	ROD	IIIB	ROD
heparine	> 1,000	0.86	> 1,000	>1,159	ND
PS	> 1,000	0.85	> 1,000	> 1,169	> 446
AZT-2	1.94	0	0.01	2,508	278
ddC	11.02	0.06	0.06	187	184
ddI	> 100	2.1	11.05	> 48	> 9
<b>KG03</b>	<b>3.41</b>	<b>&gt; 3.41</b>	<b>&gt; 3.41</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>&lt; 1</b>

**Anti-RNA virus:** p-KG03의 Anti-RNA virus 대한 항바이러스 검색 결과는 Table 3과 같다. p-KG03의 Anti-PC에 대한 항바이러스 검색 결과, p-KG03은 EMCV, Cox. B3 및 VSV에 대하여 antiviral activity ( $EC_{50}$ )가 각각 26.9, 1,000, 1,000으로 항바이러스 효과가 대조약품인 Rib의 27.15, 236.35, 13.65에 대하여 EMCV의 경우에만 대조약품과 유사한 antiviral activity ( $EC_{50}$ )의 항바이러스 효과가 있었다. 특히 p-KG03의 세포독성이 없는데, 비교하여 Rib의 세포독성이 > 300으로 p-KG03은 selectivity index가 > 37.18로 대조약품보다 우수하였다. 따라서 p-KG03은 조사된 바이러스 중 EMCV에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 조사되었다.

**Table 3.** Anti-RNA virus activity of p-KG03.

Code	Toxicity	Antiviral activity ( $EC_{50}$ )			Selectivity index		
		EMCV	Cox.B3	VSV	EMCV	Cox.B3	VSV
Rib	> 300	27.15	236.35	13.65	> 11.05	> 1.27	> 21.98
<b>KG03</b>	<b>1,000</b>	<b>26.9</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>&gt; 37.18</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

## 요 약

*Gyrodinium impudicum* strain KG03의 세포외 다당류인 p-KG03은 황함유 다당류로 항바이러스 검색 결과, 조사대상 바이러스 중 특히 뇌심근 경색바이러스 (encephalomyocarditis virus; EMCV)에 항바이러스 활성을 가지는 것으로 조사되었다.

## 참고문헌

1. Chaisson, R. E., K. M. Bell, K. J. Lorentsen, C. W. Hendrix and B. G. Petty. 1991. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 2544-2550.
2. Flexner, C., P. A. Braditch-Crovo, Kornhauser, D. M. Farzadegan, L. J. Nerhood, R. E. Chaisson, K. M. Bell, K. J. Lorentsen, C. W. Hendrix and B. G. Petty. 1991. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 2544-2550.
3. Gerber, P., J. D. Dutcher, E. V. Adams and E. V. Sherman. 1958. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 99, 590-593.
4. Hasui, M., M. Matsuda, K. Okutani and S. Shigeta. 1995. *Int. J. Biol. Macromol.*, 17, 293-297.
5. Witvirouw, M., J. A. Easter, M. E. Quinones Mateu, D. Reyman, G. Andrei, R. Snoeck, S. Ikeda, R. Pauwels, N. Vittori Bianchini, J. Desmyter and E. Witvrouw, M., and E. De Clercq. 1997. *Gen. Pharmacol.*, 29, 497-511.