

Friend Anemia Virus에 감염된 BALB/c 생쥐를 이용한 항AIDS약물의 생체내 약효검색

안형수[#] · *염윤기 · **장영수

동덕여자대학교 약학대학, *순천향대학교 자연과학대학, **보건복지부 마약과

(Received September 20, 1995)

In Vivo Screening Method for the Anti-AIDS Drugs in the BALB/c Mice Inoculated by Anemia Strain of Friend Virus

Hyung Soo Ann[#], Yoon Ki Yom* and Young Soo Chang**

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

*College of Natural Science, Soon Chun Hyang University, Choongnam 337-745, Korea

**Division of Narcotics Control, Ministry of Health & Welfare, Kyungki-do 427-760, Korea

Abstract—Inoculation of Friend anemia virus, which was a kind of retro virus such as HIV, results splenomegaly, anemia, the increase of WBC counts and reverse transcriptase activity in serum. These results were due to the inhibition of the differentiation of erythroid progenitor cell by the FVA at the spleen. Using these as index of antiviral effects, we pursued the establishment of *in vivo* screening method for the new anti-AIDS drugs. Among zidovudine, didanosine and zalcitabine, which were already approved as anti-AIDS drugs, treatment of zidovudine for 18 days in BALB/c mice inoculated with Friend anemia virus resulted the most potent inhibitory effects on the splenomegaly, the increase of WBC counts and reverse transcriptase activity, but did not recovered the anemia due to the toxicity of zidovudine itself on the bone marrow. The antiviral effects of zidovudine was reduced in case of zidovudine treatment 7 days after Friend anemia virus inoculation. These results suggested that the sooner treatment of zidovudine would be better improved when the virus was inoculated. Human recombinant interferon α did not showed the antiviral activity against Friend anemia virus and did not also affected the antiviral activity of zidovudine. These results suggested that Friend anemia virus would be used as a tool *in vivo* screening method for the inhibitor of reverse transcriptase.

Keywords □ Anemia strain of Friend virus, zidovudine, didanosine, zalcitabine, Human recombinant interferon α , anti-AIDS activity.

항AIDS약물은 HIV의 증식과정 중 여러 단계에 작용점을 두고 있다. 즉, HIV가 helper T4 세포에 부착되는 단계, 그후 핵이 T4 세포내로 침입하는 단계, HIV의 reverse transcriptase에 의해 RNA로부터 DNA로 역전사되는 단계, 이 DNA가 숙주세포의 핵내 DNA로 삽입하는 단계, 숙주세포의 DNA를 이용하여 RNA로 전사되는 단계, m-RNA로부터 단백질을 합성하는 단계, 이렇게 합성된 단백질을 virus에 필요한 단

백질로 전환하는 단계, 또는 glycosylation을 통해 glycoprotein을 합성하는 단계 및 숙주세포로부터 빠져나오는 단계 등이 항AIDS약물의 작용점이 될 수 있다.¹⁾

이중에서도 reverse transcription 과정이 RNA virus의 life cycle에 있어 가장 필수적인 단계로 알려져 있다. 따라서 기존의 항AIDS약물인 zidovudine, didanosine, zalcitabine은 이 reverse transcriptase 활성을 억제하므로써 HIV의 증식을 억제한다.^{2,3)} 즉, nucleoside 유도체들인 이들 약물은 생체내에서 활성형인 deoxynucleoside triphosphate로 대사된 후, 정상

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-940-4420 (팩스) 02-940-4182

적인 nucleotide 와 구조가 유사하기 때문에 reverse transcriptase와 대신 결합할 수 있다.^{4,5)} 그후 DNA 나선중에 삽입되면 약물의 3' 위치가 변형되므로서 추가로 정상적인 nucleotide의 연결이 되지 못하기 때문에, DNA의 chain termination을 초래하여 HIV의 증식을 억제하게 된다.

따라서, 항AIDS약물의 약효검색시 *in vitro* 실험만으로는 생체내 대사에 의한 활성화나 또는 불활성화의 예측이 곤란하기 때문에, *in vivo* 실험방법에 의한 약효검색이 필요하다. 그러나, HIV가 직접 감염되는 병태동물 모델이 원숭이 이외에는 아직 개발되어 있지 않다.⁶⁾ 다만 최근에, transgenic animal이나 SCID 생쥐 등의 면역결핍 동물을 이용한 실험법이 개발되었으나⁷⁾, 효과의 신뢰성, 기술 및 조작의 번거로움, AIDS 감염의 위험 등으로 인해 feline immunodeficiency virus⁸⁾나 murine leukemia virus^{9,10)} 또는 생쥐 sarcoma virus 등의 retro virus를 사용하는 방법이 이용되고 있다.^{11,12)} 이들은 HIV와 유사하게 생체내에서 reverse transcriptase에 의해 virus의 RNA가 DNA로 역전사되어 증식하게 된다. Ostertag 등은 최초의 AIDS 치료제로 알려진 zidovudine에 대한 약효검색 연구에서도 retro virus의 일종인 Friend leukemia virus로 감염시킨 생쥐를 사용하여 복제가 억제된다는 것을 제시하였었다.¹³⁾

이에, 본 연구에서는 이중에서 인체에 대한 감염성이 비교적 없는 것으로 보고된¹⁴⁾ Friend anemia virus를 사용하여 reverse transcriptase 억제작용을 지닌 약물의 *in vivo* 약효검색 방법에 활용코져 한다. 또한, Friend anemia virus는 면역기능이 떨어진 BALB/c 생쥐에서 비장비대와 빈혈을 일으키므로, 이를 지표로 하여 간편하게 약효검색을 할 수 있으며, 그외에도 혈청 중 reverse transcriptase 활성을 지표로 측정할 수 있다.

이러한 Friend anemia virus를 사용한 항AIDS약물의 생체내 약효검색 방법을 확립하고자, 현재 임상적으로 쓰이고 있는 항AIDS약물인 zidovudine, didanosine, zalcitabine의 각각 단독투여시 효과를 검토할 뿐만 아니라, 투여시기 및 투여경로 등을 변화시켜 검토코자 하였다. 또한 zidovudine과는 작용기전이 다르면서도 임상적으로 병용투여시 zidovudine의 항 virus효과를 증가시키는 것으로 보고된¹⁵⁾ interferon α 와의 병용투여시 효과도 각각의 단독투여시와 비교 검

토하고자 하였다.

실험방법

시약 및 시료 - Friend anemia virus (FVA): 미국 Missouri 대학 Im 교수로부터 공급 받아 사용하였다. Zidovudine (31-Azido-31-deoxythymidine; AZT), didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), human recombinant interferon α (INF α), [³H] Thymidine-triphosphate ([³H]d-TTP)은 미국의 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. Fetal calf serum은 Difco사로부터, [³H]thymidine (specific activity 2.0 Ci/mmol)은 NEN사로부터 구입하여 사용하였다.

실험동물 - 외관상 건강한 BALB/c 수컷 생쥐를 사용하였다. 사료와 식수를 자유롭게 공급하여 1주일 정도 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

약물투여군 - Zidovudine, didanosine, zalcitabine 각각 단독투여군; 현재 임상적으로 사용하고 있는 기존의 약물인 zidovudine, didanosine, zalcitabine의 항FVA효과를 비교 검토하였다. 각군당 6마리의 생쥐를 사용하여 다음과 같이 군을 나누었다. 즉, 제 1군은 정상군이며, 제 2군은 대조군으로서 Friend anemia virus가 감염된 BALB/c 생쥐의 혈청을 생리식염수로 25배 희석하여 생쥐 한마리 당 0.2 ml/씩 꼬리정맥에 1회 주사하였다. 제 3군 이하는 약물투여군으로서, 대조군과 같이 Friend anemia virus를 감염시킨 후, 각 약물의 다음과 같은 용법, 용량, 투여시기에 따라 다양하게 투여하였다. 각 약물투여군으로는 zidovudine 투여군: 1 mg/ml의 농도로 식수에 용해하여 투여하므로써, 약 150~200 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과였다. 이때 투여시기에 따른 차이를 검토하고자, Friend anemia virus 투여와 동시에 zidovudine의 투여를 시작한 군 (zidovudine)과 FVA 투여 후 7일째 부터 zidovudine의 투여를 시작한 군 (zidovudine-7)의 2군으로 나누었다. Didanosine 투여군: 1 mg/ml의 농도로 식수에 용해하여 투여하므로써, 약 150~200 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과였다. Zalcitabine 투여군: 0.1 mg/ml의 농도로 식수에 용해하여 투여하므로써, 약 15~20 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과였다. 또한 투여경로에 따른 차이를 검토하고자, 20 mg/kg의 용량으로 복

강내 주사하였다. Zidovudine 과 interferon α 와의 병용투여군; Zidovudine 과 interferon α 를 각각 단독 또는 병용투여하여 Friend anemia virus에 대한 억제 효과를 비교 검토하였다. 각군당 6마리의 생쥐를 사용하여 다음과 같이 군을 나누었다. 즉, 제 1군은 정상군이며, 제 2군은 대조군으로서 Friend anemia virus가 감염된 BALB/c 생쥐의 혈청을 생리식염수로 25배 희석하여 생쥐 당 0.2 ml씩 꼬리정맥에 1회 주사하였다. 제 3군 이하는 약물투여군으로서, 대조군과 같이 Friend anemia virus를 감염시킨 후, zidovudine 과 interferon α 를 각각 다음과 같은 용법, 용량으로 투여하였다. 각 약물투여군으로는, zidovudine 과 interferon α 투여군; 1 mg/ml의 농도로 식수에 용해하여 투여하므로써, 약 150~200 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과였다. Interferon 투여군; 100,000 U/ml를 0.2 ml/생쥐씩 복강내 주사하므로써, 결국 약 1,000,000 U/kg/day를 투여한 결과였다. Zidovudine 및 interferon α 병용투여군; zidovudine은 1 mg/ml의 농도로 식수에 용해하여 투여하므로써, 약 150~200 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과였으며, 동시에 interferon α 는 1,000,000 U/kg/day를 복강내 주사하였다.

비장무게 변화 - Friend anemia virus 및 약물을 처치하기 전, 각군 생쥐의 체중을 측정하여 동일하게 분류하였다. Friend anemia virus 투여 후 18일째에 치사직전 체중을 칭량하여 비교하였다. 또한, ether 마취하 복부를 절개하여 비장을 즉시 적출하고, 여지로 압착한 후 습한 상태의 무게를 칭량하였다.

빈혈지수 측정 - Friend anemia virus 투여 후 18일째에 ether 마취하 복부 대정맥에서 채혈하여 C. B. C 튜브에 넣은 후, 잘 혼합하였다. Coulter counter 로 WBC, RBC, hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) 등을 측정하였다.

혈청중 Reverse Transcriptase 활성 측정 - 혈액중 Friend anemia virus의 치사여부를 간접적으로 측정하며, 또한 reverse transcriptase 억제작용을 지니는 항virus 약물의 약효를 생체내에서 직접적으로 측정하고자, 혈청중 reverse transcriptase 활성을 Ohnota 등⁹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 간략히 설명하면

Friend anemia virus 투여 후 18일째에 ether 마취하 복부대정맥에서 혈액을 채취하였다. 원심분리하여 얻은 혈청 0.1 ml를 다시 16,000 rpm으로 약 90분간 원심분리한 다음 pellets을 취하여 15 μ l의 lysing buffer (50 mM Tris, HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.6% Triton X-100)를 넣고 현탁액을 흔들어 혼합하였다. 그 후 10 μ l를 취하여 30 μ l의 reacting buffer (50 mM Tris, HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ (pH 8.3), 5 mM dithiothreitol, 10 M [³H]d-TTP, 25 μ g poly(rA)/dT/ml)를 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 다음 glass fiber filter (12 mm)에 10 μ l를 점적하고 0.5 M Na₂HPO₄ 용액으로 5회 세척하였다. 다시 2차 증류수로 5회 세척하고 ethanol로 2회 세척하였다. 여지를 건조한 후에 scintillation counter로 방사능치를 측정하였다.

재감염시 비장무게 및 빈혈지수 측정 - 약물투여에 의해 Friend anemia virus가 억제되었는지 여부를 확인하기 위한 목적으로 실험하였다. 즉, Friend anemia virus 감염 과 동시에 각 약물을 투여한 각군 생쥐의 혈청을 취하여 처음에서와 같이 생리식염수로 25배 희석한 후, 새로운 정상 BALB/c 생쥐에게 감염시켰다. 그 후 18일후에 생쥐를 ether 마취하 virus 억제의 지표가 되는 각각의 비장무게를 측정하고, 채혈하여 hematocrit, hemoglobin, RBC 등의 빈혈지수를 측정하였다. 각군의 분류는 제 1군은 정상군이고, 제 2군은 1차 Friend anemia virus 투여시 대조군의 혈청을 투여한 군, 제 3군부터는 Friend anemia virus 투여 후, 각 약물을 투여한 군의 혈청을 투여한 군으로 나누어 실험하였다.

결과 및 고찰

Zidovudine, didanosine, zalcitabine 투여시 항FVA 효과

비장무게 변화 - BALB/c 생쥐에게 Friend anemia virus를 감염시킨 후, zidovudine, didanosine, zalcitabine을 각각 식수에 용해하여 18일간 경구로 투여시 각 군간에 체중의 변화를 초래하지 않았다. 반면에, 비장의 무게는 정상군인 경우 0.12 \pm 0.01 g에 비해 Friend anemia virus가 감염된 대조군의 경우 1.62 \pm 0.13 g으로 13.5배나 증가되었다(Table I). 이것은 Friend anemia virus가 비장내 적혈구의 전구세포

Table I—Inhibitory effects of zidovudine, didanosine and zalcitabine on the splenomegaly in Friend anemia virus inoculated BALB/c mouse

Drug Treatment	Dose	Body wt. (g)	Spleen wt. (g)	Spleen /body wt.(%)	Inhibition (%)
Normal		22.5 ±0.9	0.12 ±0.01	0.53	-
Control		23.9 ±1.7	1.62 ±0.13	6.77	-
AZT	(200 mg/kg/day, p. o)	22.9 ±0.9	0.28*** ±0.04	1.22	89
AZT-7	(200 mg/kg/day, p. o)	23.3 ±0.8	1.17* ±0.12	5.02	30
ddI	(200 mg/kg/day, p. o)	21.6 ±1.7	1.44 ±0.39	6.67	18
ddC	(200 mg/kg/day, p. o)	24.9 ±1.0	1.05** ±0.07	4.21	38
ddC	(200 mg/kg/day, i. p)	25.1 ±2.1	1.34 ±0.08	5.56	15

Abbreviation: AZT: zidovudine, AZT-7: zidovudine treatment was started 7 days after Friend anemia virus inoculation, ddI: didanosine ddC: zalcitabine.

The data represent the mena±S.E. (n=7).

* p<0.05: Significantly different from control.

** p<0.05: Significantly different from control.

*** p<0.001: Significantly different from control.

Table II—Inhibitory effects of zidovudine, didanosine, and zalcitabine on the index of anemia and leukemia in Friend anemia virus inoculated BALB/c mouse

Drug Treatment	Dose	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (d/dl)	HCT (%)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Normal		9.5 ±0.8	18.1 ±1.9	47.2 ±3.0	7.4 ±1.2
Control		6.4 ±0.6	12.5 ±0.8	29.8 ±4.7	36.6 ±10.9
AZT	(200 mg/kg/day, p. o)	6.3 ±0.5	13.4 ±1.2	35.5 ±4.0	11.2** ±2.5
AZT-7	(200 mg/kg/day, p. o)	8.3* ±0.8	17.6** ±1.2	37.3 ±4.0	43.2 ±12.1
ddI	(200 mg/kg/day, p. o)	7.4 ±1.0	14.4 ±1.5	29.8 ±4.0	45.9 ±8.1
ddC	(200 mg/kg/day, p. o)	8.2* ±0.9	15.6* ±1.2	39.1* ±2.6	25.5* ±2.1
ddC	(200 mg/kg/day, i. p)	7.5 ±0.9	15.0 ±0.9	37.3* ±3.7	33.2 ±3.4

Abbreviation: AZT: zidovudine, AZT-7: zidovudine treatment was started 7 days after Friend anemia virus inoculation, ddI: didanosine, ddC: zalcitabine.

* p<0.05: Significantly different from control.

** p<0.05: Significantly different from control.

포인 erythroid progenitor cell에 침입하여 더 이상 성숙되지 못하도록 하므로써 비장내 축적을 초래한 때문이다. 이 결과는 Koury등¹⁶⁾이 Friend anemia virus의 감염후 2~3주후에 BALB/c 생쥐의 비장이 0.1~0.2 g으로부터 1.0~1.8 g으로 비대해졌다는 보고와 일치된다. 또한, 이렇게 비장이 비대해진 경우 비장내 핵이 존재하는 erythroid progenitor cell의 수는 약 1.5

~ 2.0×10^8 개 정도라고 보고되었다.

이러한 비장 비대를 지표로하여 항virus약물인 zidovudine, didanosine, zalcitabine의 효과를 비교해 보았다. 이때 Friend anemia virus 감염과 동시에 zidovudine을 식수에 용해하여 1일 약 150~200 mg/kg의 용량으로 18일간 경구투여한 경우에는 비장의 무게가 0.28 ± 0.04 g으로 유의성 있게 89% 억제되었다.

그러나, zidovudine을 Friend anemia virus 감염후 7일째부터 동일 용량으로 투여한 경우에는 억제효과가 30% 밖에는 초래되지 않았다. 이러한 결과는 Friend anemia virus 감염후 가능한 항virus약물의 투여가 빠를수록 억제효과가 좋다는 것을 제시해준다.

한편, didanosine과 zalcitabine은 각각 18%와 38%의 억제효과로서 zidovudine에 비해 억제효과가 적었다. 단, 이 경우에 zalcitabine은 원래 효력이 크므로 zidovudine 이나 didanosine에 비해 투여용량을 1/10로 적게 투여하였다. 또한 zalcitabine의 경우 경구 투여시와 복강내 투여시 비장비대를 억제한 효과를 비교한 결과 각각 38%와 15%로 복강내 주사보다는 경구 투여시 좋은 효과를 나타내었다.

빈혈지수 - BALB/c 생쥐에게 Friend anemia virus를 감염시킨 후, zidovudine, didanosine, zalcitabine을 각각 식수에 용해하여 18일간 경구로 투여시 각 군에 있어 빈혈의 지표가 되는 혈액중 RBC, hemoglobin, hematocrit등의 측정치를 Table II에 나타내었다. 정상군에 비해 Friend anemia virus가 감염된 대조군의 경우 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 모두 유의성 있게 감소되어 빈혈이 초래되었음을 입증하였다. 이것은 앞의 비장 비대와 관련되어 즉, Friend anemia virus가 비장내 적혈구의 전구세포인 erythroid progenitor cell에 선택적으로 침입하여 더 이상 적혈구로 성숙하지 못하게 하였기 때문이다.

한편, zidovudine 단독투여시 비장의 비대는 유의성 있게 억제하였으나, 빈혈의 지표는 회복시키지 못했다. 반면에 7일후부터 zidovudine을 투여한 경우에는 비장의 비대를 억제하는 효과는 적었으나, 빈혈의 지표는 일부 회복시켰다. 이것은 zidovudine 자체가 골수에서 megaloblast의 변화 및 erythroid cell의 hypoplasia 나 aplasia를 초래하므로서 빈혈을 초래하는 독성을 지니기 때문이다.¹⁷⁾ 따라서 임상적으로 zidovudine의 투여시에는 적혈구 조혈을 촉진할 목적으로 erythropoietin을 병용처치한다.¹⁸⁾

또한 비장비대의 억제효과가 뚜렷하지 못했던 didanosine의 경구투여시 및 zalcitabine의 복강내 투여시 빈혈에 대해서도 억제효과를 나타내지 못했다. 반면에, zalcitabine의 경구투여시에는 앞의 비장비대를 일부 회복시켰던 것과 유사하게 빈혈의 지표가 되는 RBC, hemoglobin, hematocrit의 수치를 유의성 있게 회복시켰다. 이러한 결과는 특이적으로 골수에 손상을

Table III— Effects of the zidovudine and interfero α on the splenomegaly induced by Friend anemia virus in BALB/c mouse

Drug treatment	Body. wt (g)	Spleen wt.	Spleen/Body wt.	Inhibition (%)
Normal	22.5 ± 0.9	0.12 ± 0.01	0.5	
Control	23.9 ± 1.8	1.72 ± 0.13	7.2	-
AZT	22.9 ± 0.9	0.28*** ± 0.04	1.2	90
INF α	19.9 ± 1.6	1.42 ± 0.20	7.1	19
AZT + INF α	22.5 ± 0.9	0.26*** ± 0.15	1.2	91

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α .

The data represent the mean \pm S.E. (n=6).

*** p<0.001 Significantly different from control.

초래하는 zidovudine의 경우를 제외하고는 대조군, didanosine 및 zalcitabine 투여군의 경우 비장의 비대와 빈혈이 서로 상관성이 있음을 제시한다.

한편, 백혈구수는 Friend anemia virus를 감염시 유의성 있게 증가되었으나, 비장의 비대를 억제한 zidovudine 및 zalcitabine을 경구로 투여시 역시 백혈구의 증가를 억제하였다. 반면에 zidovudine을 7일후부터 투여한 경우나, zalcitabine을 복강내 주사한 경우는 비장의 비대를 억제하지 못한 것처럼 백혈구의 증가도 억제하지 못했다. Zidovudine의 이러한 효과는 임상적으로 zidovudine의 독성으로 초래되는 granulocytopenia와도 관련된 것으로 고려되며, 이것을 줄려면 투여용량과 투여간격을 조절해야한다.

Zidovudine 과 interferon α 병용투여시 항FVA효과

비장무게 변화 - 정상 BALB/c 생쥐에 Friend

anemia virus를 감염 시켰을 때와 Friend anemia virus 감염과 동시에 zidovudine 과 interferon α 를 각각 단독 또는 zidovudine과 interferon α 를 병용하여 18일간 매일 투여했을때 비장의 무게변화를 Table III에 나타내었다. 즉, 정상군인 경우 비장무게는 0.12 ± 0.01 g이던 것이 Friend anemia virus투여시는 1.72 ± 0.13 g으로 약 14배 증가되었다. Zidovudine을 단독투여한 군은 0.28 ± 0.04 g으로 대조군에 비해 비장비대를 90% 억제하였으며, interferon α 는 1.42 ± 0.15 g으로 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다. 이 둘을 병용투여시에도 0.26 ± 0.15 g으로 대조군에 비해 91% 억제효과를

Table IV— Effects of the zidovudine and interferon a on the index of anemia induced by Friend anemia virus in BALB/c mouse

Drug Treatment	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (μ^3)	MCH (μg)	NCHC (%)
Normal	9.6	18.1	47.2	49.3	19.0	38.5
control	± 0.5	± 0.7	± 3.0	± 2.2	± 0.4	± 2.4
AZT	6.7	12.5	29.8	44.5	18.8	42.3
	± 0.6	± 0.8	± 3.3	± 1.4	± 1.0	± 3.4
INF α	7.2	15.5	35.5	49.1**	21.4**	43.6
	± 0.2	± 2.2	± 1.5	± 1.4	± 0.8	± 2.2
AZT + INF α	7.0	14.2	30.3	43.2	20.3	47.0
	± 0.2	± 0.5	± 2.2	± 1.7	± 1.0	± 2.3
AZT	7.4	16.3	34.3	46.3*	22.2**	48.0
+INF α	± 0.2	± 0.9	± 2.2	± 2.5	± 1.0	± 0.7

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α , RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin, Hct: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC).

The data represent mean \pm S.E. (n=6).

* p<0.05 Significantly different from control.

** p<0.01 Significantly different from control.

나타내어 zidovudine 단독투여시와 유사한 결과이다. 따라서 interferon α 는 zidovudine의 항virus효과에 영향을 미치지 못했다. 이러한 결과는 혈액세포인 erythroid progenitor cell에 선택적으로 독성을 나타내는 Friend anemia virus에 대해 zidovudine과는 달리 interferon α 가 억제효과를 나타내지 못했기 때문인 것으로 고려된다.

빈혈지수 - 정상 BALB/c 생쥐에 Friend anemia virus를 감염시켰을 때와 Friend anemia virus 감염과 동시에 zidovudine 과 interferon α 를 각각 단독 또는 병용하여 18일간 매일 투여했을때, 각군의 빈혈지수로서 RBC, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration를 측정 한 결과는 Table IV와 같다. 즉, 정상군에 비해 Friend anemia virus를 감염시킨 대조군의 경우 RBC, hemoglobin 및 hematocrit치가 모두 유의성 있게 억제되어 빈혈이 초래되었음을 제시하였다. Zidovudine 단독투여군은 대조군에 비해 이들 빈혈지수가 유의성있는 차이가 없었다. 이것은 앞에서와 같이 zidovudine이 비장의 비대를 억제하는 등 Friend anemia virus 억제효과를 지니지만, 반면에 그 자체가 또한 혈액독성을 지니기 때문인 것으로 고려된다. 한편, interferon α 단독투여군도 RBC, hematocrit치 및 hemoglobin치가 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 따라서, zidovudine 과 interferon α 를 18일간 매일 병용 투여했을때도 각각의 단독투여

Table V— Inhibitory effects of the zidovudine and interferon α on the increase of WBC induced by Friend anemia virus in BALB/c mouse

Drug treatment	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Inhibition (%)
Normal	7.4 \pm 1.2	-
Control	36.6 \pm 11.1	-
AZT	11.2 \pm 2.5***	87
INF α	21.2 \pm 6.1*	52
AZT + INF α	13.5 \pm 3.7**	79

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α .

The data represent the mean \pm S.E. (n=6).

* p<0.05 Significantly different from control.

** p<0.01 Significantly different from control.

*** p<0.001 Significantly different from control.

시와 유사하게 대조군에서의 RBC, hemoglobin 및 hematocrit치 감소로 초래된 빈혈을 유의성있게 회복시키지 못했다.

한편, 백혈구수는 Friend anemia virus의 감염시 유의성 있게 증가되었다(Table V). 이때 zidovudine 단독투여시에는 비장비대의 억제와 유사하게 87%의 억제효과를 나타내었으며, interferon α 와 병용투여시에도 79%의 억제효과를 나타내었다. 이 결과는 interferon α 가 zidovudine의 백혈구 증가에 대한 억제효과에 영향을 미치지 않았음을 제시해 준다.

혈청중 Reverse Transcriptase 활성 - Friend anemia virus를 BALB/c 생쥐에 감염시 정상군에 비해 혈청중 reverse transcriptase 활성이 유의성 있게 증가되었다(Table VI). Zidovudine 단독투여시에는

Table VI— Inhibitory effects of the zidovudine and interferon α on the increase of serum reverse transcriptase activity induced by Friend anemia virus in BALB/c mouse

Drug treatment	Reverse transcriptase activity (cpm)	Inhibition (%)
Normal	1,100 \pm 240	
Control	2,570 \pm 265	-
AZT	1,326 \pm 262*	84
INF α	2,025 \pm 352	37
AZT + INF α	750 \pm 214***	100

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α .

The data represent the mean \pm S.E. (n=6).

* p<0.05 Significantly different from control.

*** p<0.001 Significantly different from control.

Friend anemia virus 감염에 의해 증가된 reverse transcriptase 활성을 85% 억제하였으나, interferon α 단독투여시에는 유의성있는 억제효과를 나타내지 못했다. 그러나, zidovudine 과 interferon α 를 병용투여한 군에 있어서는 reverse transcriptase 활성의 증가를 100% 억제하므로서 보다 억제효과의 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 zidovudine이 reverse transcriptase 활성 억제효과가 있다는^{4,5)} 기 보고와 일치되는 결과이며, 또한 앞에서의 비장비대 및 백혈구 증가를 억제한 항FVA효과와 일치된 결과이다. 반면에 interferon α 는 면역증강 능력에 의한 항virus작용을 지니므로 reverse transcriptase 활성의 억제효과는 유의성 있는 차이를 나타내지 못한 것으로 고려된다.

혈청을 재감염시 비장무게 및 Reverse transcriptase 활성 - 약물 투여에 의해 혈액중의 Friend anemia virus가 치사되었는지 여부를 확인하고자, 약물을 투여한 각군의 혈청을 취해 정상 생쥐에 재감염시켜 보았다. 즉, BALB/c 생쥐에 Friend anemia virus 감염과 동시에 zidovudine 과 interferon α 를 각각 단독 또는 병용하여 18일간 매일 투여한 후, 각군의 혈청을 취하여 다른 정상의 BALB/c 생쥐에게 감염시킨 후 약물투여없이 다시 18일동안 사육한 뒤 비장무게를 측정하여 대조군과 비교하였다(Table VII).

비장무게의 변화에 있어 zidovudine을 투여하였던 군은 대조군에 비해 비장비대가 88% 억제되므로서 직접 약물을 투여하였던 결과와 유사하게 억제효과를 나타내었다. 이것은 zidovudine 약물의 투여에 의해 Friend anemia virus가 혈액 중에서 억제되었음을 제시해 준다.

Table VII— Inhibitory effects of zidovudine and interferon α treated serum on the splenomegaly in normal BALB/c mouse. Serum was obtained from the BALB/c mouse inoculated Friend anemia virus and treated zidovudine and interferon α

Drug treatment	Body wt. (g)	Spleen wt.	Spleen/Body wt.	Inhibition (%)
Normal	22.5 \pm 0.9	0.12 \pm 0.01	0.5	
Control	23.3 \pm 2.5	1.42 \pm 0.26	6.2	-
AZT	23.3 \pm 3.4	0.16 \pm 0.03***	0.7	96
INF α	24.8 \pm 1.1	1.42 \pm 0.16	5.7	0

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α .

The data represent the mean \pm S.e. (n=6).

*** p<0.001 Significantly different from control.

Interferon α 를 단독투여하였던 군의 혈청을 투여시에는 역시 직접 약물의 처치시와 마찬가지로 비장의 비대를 억제하지 못했다. 이 결과는 interferon α 의 투여에 의해 혈액중의 Friend anemia virus가 치사되지 않았음을 제시해 준다. 한편, zidovudine과 interferon α 를 병용투여한 군의 혈청을 재감염시에도 zidovudine 단독투여군의 혈청을 감염시와 유사하게 비장 비대가 89% 억제되므로서 혈액중에 virus가 치사되었음을 제시해 준다. 그러나 이러한 효과는 zidovudine의 항virus효과가 interferon α 와 병용투여에 의해 영향을 받지 않았음을 제시해준다.

각 약물투여군의 혈청을 정상 BALB/c 생쥐에게 감염시킨 후 18일후에 혈액을 취해 혈청중의 reverse transcriptase 활성을 측정할 때, Table VIII과 같다. 즉, zidovudine단독 또는 interferon α 와 병용투여한 군의 혈청을 정상 BALB/c 생쥐에 재감염시 혈청중 reverse transcriptase 활성이 거의 모두 억제되므로서 비장의 비대를 거의 모두 억제한 결과와 일치되게 나타났다. 이러한 결과는 결국 zidovudine단독 또는 interferon α 와 병용투여시 Friend anemia virus가 치사되었음을 제시해 준다.

Zidovudine이 이렇게 retro virus의 reverse transcriptase 활성을 억제하는 효과가 있음에도 불구하고, AIDS에 대해 뚜렷한 치료효과를 나타내지 못하는 이유 중 하나는 AIDS를 유발시키는 virus인 HIV-1이 사용하는 reverse transcriptase가 매우 정확하지 못해서 평균적으로 대략 매 2,000개의 nucleotides를 삽입할

Table VIII—Inhibitory effects of zidovudine and interferon α treated serum on the reverse transcriptase activity in normal BALB/c mouse. Serum was obtained from the BALB/c mouse inoculated Friend anemia virus and treated zidovudine and interferon α

Drug treatment	Reverse transcriptase activity (cpm)	Inhibition (%)
Normal	1,100 \pm 240	
Control	5,015 \pm 2,177	-
AZT	657 \pm 193***	100
INF α	6,480 \pm 141	0
AZT + INF α	780 \pm 375***	100

Abbreviation: AZT: zidovudine, INF α : recombinant human interferon α .

The data represent the mean \pm S.E. (n=6).

*** p<0.001 Significantly different from control.

때 마다 하나 정도의 착오를 범하기 때문이다.¹⁹⁻²¹⁾ 그 결과 변이원성을 초래하게 되므로서 zidovudine과 같은 치료약물을 사용시 수개월 이내에 새로운 변형균이 초래된다. 따라서 일시적인 효과 밖에는 나타내지 못하게 된다.

결 론

HIV와 유사하게 reverse transcriptase를 이용하여 증식하는 retro virus의 일종인 Friend anemia virus를 BALB/c 생쥐에게 감염시 비장의 erythroid progenitor cell 증식이 억제되므로서 비장 비대, 빈혈, 백혈구 증가와 혈청중 reverse transcriptase 활성의 증가를 초래한다. 이를 지표로 하여 reverse transcriptase 억제작용을 지니는 기존의 항AIDS약물을 사용하여 생체내 약효 검색방법을 확립하고, 나아가 미지의 천연성분으로부터 새로운 항AIDS약물의 약효검색 방법으로 활용하고자 하였다.

기존의 항AIDS약물인 zidovudine, didanosine, zalcitabine를 Friend anemia virus가 감염된 BALB/c 생쥐에게 18일간 연속투여시 zidovudine이 대조군에 비해 비장의 비대, reverse transcriptase 활성 및 백혈구 증가를 90% 정도 억제하여 가장 강력한 항virus작용을 나타내었다. 또한 zidovudine의 경우 혈청을 취해 다른 BALB/c 생쥐에게 재투여시 역시 항virus작용이 지속되었다. 그러나, 혈액중 hemoglobin 등 빈혈의 지표는 대조군과 유사한 수치를 나타내

로서 억제효과를 나타내지 못했다. 이것은 zidovudine 자체가 지니는 골수억제에 의한 부작용 때문인 것으로 고려된다. 또한, Friend anemia virus 감염 후 7일째 부터 zidovudine을 투여한 경우에는 Friend anemia virus 감염과 동시에 zidovudine을 투여한 경우에 비해 억제효과가 감소되었다. 따라서, zidovudine의 투여는 virus 감염 후 빠를수록 효과가 좋다는 것을 제시한다. 또한, human recombinant interferon α 를 단독투여시 Friend anemia virus 감염에 대한 억제효과를 나타내지 못했으며, zidovudine과 병용투여시에도 zidovudine의 항virus효과에 영향을 미치지 못했다. 이것은 interferon α 가 reverse transcriptase에 대한 억제효과를 지니고 있지 않기 때문인 것으로 고려된다.

문 헌

- 1) Mitsuya, H. and Broder, S.: Molecular targets for AIDS therapy. *Science* **249**, 1533 (1990).
- 2) Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St. Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolgonesi, D., Barry, D. W. and Broder, S.: 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7096 (1985).
- 3) Mitsuya, H. and Broder, S.: Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* **325**, 773 (1987).
- 4) Furman, P. A., St. Clair, M. H. and Spector, T.: Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 8333 (1986).
- 5) Yarchoan, R. and Broder, S.: Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. *N. Engl. J. Med.* **316**, 557 (1987).
- 6) Kelly, J. A., Litterst, C. L., Roth, J. S., Vistica, D. T., Poplack, D. G., Cooney, D. A., Nadkarni, M. Balis, F. M., Broder, S. and Johns, D. G.: The disposition and metabolism of 2', 3'-dideoxycytidine, an *in vitro* inhibitor of human T-

- lymphotrophic virus type III infectivity, in mice and monkeys. *Drug Metabolism and Disposition* **15**, 595 (1987).
- 7) Balzarini, J., Pauwels, R., Baba, M., Herdewijn, P., Clercq, E., Broder, S. and Johns, D. G.: The in vitro and in vivo anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine and 2', 3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cell species. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 897 (1988).
 - 8) Tavares, L., Roneker, C., Johnston, K., Lehrman, S. N. and Noronha, F.: 3'-Azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: A model for therapy and prophylaxis of AIDS. *Cancer Research* **47**, 3190 (1987).
 - 9) Ohnota, H., Okada, Y., Ushijima, H. and Kitamura, T.: 3-Azido-3-deoxythymidine prevents induction of murine acquired immunodeficiency syndrome in C57BL/10 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses, a possible animal model for antiretroviral drug screening. *Antimicrob. Agent Chemother.* **34**, 605 (1990).
 - 10) Ruprecht, R. M., Mullaney, S., Sosa, G., Hom, R. and Finberg, R.: Anti-viral therapy induces T cells which protect against viral challenge. *Annals New York Academy of Sciences*. 344 (1989).
 - 11) Inouye, Y.: Screening for inhibitors of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and effect on the replication of AIDS-virus. *J. Antibiotics*. **40**, 100 (1987).
 - 12) Morry, J. D., Warren, R. P., Okleberry, K. M., Burger, R. A., Chirigos, M. A. and Sidwell, R. W.: Effect of imexon treatment on Friend virus complex infection using genetically defined mice as a model for HIV-1 infection. *Antiviral Research* **15**, 51 (1991).
 - 13) Ostertag, W., Roesler, G., Krieg, C. J., Kind, J., Cole, T., Crozier, T., Gaedicke, G., Steinheider, G., Lluje, N. and Dube, S.: Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 4980 (1974).
 - 14) Beng, H. and Graf, T.: Cooperation between viral oncogenes in avian erythroid and myeloid leukemia. *Eur. J. Clinical Investigation* **9**, 491 (1989).
 - 15) Hammer, S. M. and Gillis, J.M. Synergistic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 3'-azido-3'-deoxythymidine against human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1046 (1987).
 - 16) Koury, M. J., Sawyer, S. T. and Bondurant, M. C.: Splenic erythroblast in Anemia-Inducing Friend Disease: a source of Cellular Studies of Erythropoietin-Mediated Differentiation. *J. of Cell. Physiol.* **21**, 526 (1984).
 - 17) Walker, R. E., Parker, R. I. and Kovacs, J. A.: Anemia and erythropoiesis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and Kaposi's sarcoma treated with zidovudine. *Ann. Intern Med.* **108**, 372 (1988).
 - 18) Johnson, R. W., Rudnick, S. A. and Raritan, N. J.: Human recombinant erythropoietin (r-HuEpo): A double-blind placebo controlled study in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients with anemia induced by disease and AZT. *Proceeding of Asco*. **8**, 2 (1989).
 - 19) Weiss, R. A.: How does HIV cause AIDS? *Science* **260**, 1273 (1993).
 - 20) Feinberg, M. B. and Greene, W. C.: Molecular insights into human immunodeficiency virus type-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* **4**, 466 (1992).
 - 21) Greene W. C.: The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Eng. J. Med.* **324**, 308 (1991).