

한약 처방 (복합제)의 Influenza Virus Type A에 대한 항바이러스 활성 효과

한국한의학연구소 기초연구부, ¹한약연구부 및 ²건국대학교 생물학과
정재득 · 고병섭¹ · 이형환² · 최환수 · 박갑주

=Abstract=

Antiviral Activity of Korean Traditional Prescriptions against Influenza Virus Type A

Jae Deuk Jung, Byoung Seob Ko¹, Hyung Hoan Lee², Hwan Soo Choi, and Kap Joo Park

*Department of Basic research, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

*¹Department of Herbal medicine, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

²Department of Biology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

In order to search for anti-influenza virus type A agents from Korean traditional prescriptions (herb complexes), we selected 63 traditional prescriptions, based on a review of the Korean traditional medicine books. Both methanol extracts and boiling-water extracts were tested, by means of the Haemagglutination Inhibition Test (HIT).

Three of the 63 methanol extracts: CM-22, CM-26, CM-48 (see explanation of nomenclature below), showed efficacy against influenza virus type A. CM-22 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 313 μ g/ml to 9.75 μ g/ml, CM-26 showed antiviral activity at the range of 156 μ l/ml to 4.87 μ g/ml, CM-48 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 625 μ g/ml to 19.5 μ g/ml, respectively. Three of the water extracts: CW-14, CW-34, CW-61 were active. CW-14 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 10mg/ml to 78 μ g/ml, CW-34 showed antiviral activity at the range of 10mg/ml to 625 μ g/ml and CW-61 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 10mg/ml to 313 μ g/ml, respectively. In order to determine cytotoxicity of each extracts, chicken red blood cells were incubated with the various concentration of extracts of Korean traditional prescriptions. CW-14, CW-34 and CW-61 did not show cytotoxic effect against red blood cells whereas CM-22, CM-26 and CM-48 showed cytotoxic effect against red blood cells at the range of 10mg/ml to 625 μ g/ml, 10mg/ml to 313 μ g/ml and 10mg/ml to 313 μ g/ml, respectively. These results indicated that Korean traditional prescriptions may be inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of the virus into cell during the initial stage of infection.

Key Words: Influenza virus type A, Haemagglutination Inhibition Test (HIT), Korean traditional prescriptions.

Abbreviations: CM (methanol extracts of traditional prescriptions), CW (water extracts of traditional prescriptions)

서 론

감기 혹은 독감환자의 호흡기에서 발견되는 호흡기 바이러스는 influenza virus, respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus 등이며 [1] 이 바이러스들은 사람의 비강, 구강에서 흔히 발견되며 드물게 분변에서도 발견되는 바이러스로 일반적인 감기 또는 독감, 소아성 호흡기 질환의 원인이 된다. 한방에서 감기 또는 감모로 불리는 병변을 유발하는 호흡기 바이러스의 감염기간은 1-4일로 짧으며 대개의 경우 급성 병변이 약 7일 정도 지속되고 기침은 1-3주 계속된다. 보통 성인의 경우 1년에 한, 두 차례 이들 바이러스의 공격을 받는다. 이들 바이러스에 감염될 경우 상부 호흡기의 동통, 콧물, 두통, 오한, 불쾌감, 기침 등 호흡기 질환 증상이 나타나며 열은 대개 3-7 일간 지속된다. 특히, RSV는 어린아이들의 호흡기성 질환에 관여하며 기관지염이나 폐염의 원인이 되기도 한다 [2].

보통 성인의 경우 1년에 한, 두차례 또는 두, 세차례 이들 바이러스의 공격을 받으며 influenza virus에 감염될 경우, 이 바이러스에 의해 유발되는 감기나 유행성 독감 그 자체보다 이 질환으로부터 야기되는 합병증에 의해 많은 사망자가 발생하고 있다. 역사적으로 인플루엔자의 중요성은 격심한 합병증에 대한 피해로부터 유래되고 있다. 이와같은 사실은 1918-1919년에 있었던 독감의 유행으로 세계적으로 2천만명 이상이 희생된 "스페인 인플루엔자"의 피해에서 너무나 잘 인식되었다 [3, 4]. 사람 호흡기 바이러스 감염은 환자집단의 다양성에서 오는 합성병으로 전 세계적으로 양적팽창을 해 왔고, 지금 현재도 지구상의 많은 지역에서 많은 사람들이 이들 호흡기 바이러스에 의해 야기되는 질병으로 고통을 받고 있다. 병원성인 호흡기성 바이러스의 연구는 바이러스 복제의 선택적, 특이적 억제작용이 있는 항바이러스성 약제의 개발과 함께 병행되었다 [5]. 독성이 없으면서도 탁월한 예방과 치료효과를 주는 influenza virus에 대한 항바이러스제 개발의 필요성은 오래 전부터 인류의 숙원이 되어 왔는데 이러한 연구 활동결과 몇몇 화학요법제 및 항생물질들이 개발되었으나 이들 항생제 및 화학 요법제들은 정도의 차이가 있을 뿐 그들 자신이 지닌 약리학적 특징으로 일어나는 독 작용 (toxic reaction)과 항원성의 획득

으로 유발되는 과민반응등 여러가지 부작용과 호흡기 질환에 관여하는 바이러스 자체가 가지는 다양한 내성기작으로 말미암아 사용에 제한을 받고 있고 많은 경우 아직도 독성이 많거나 효능이 만족할 만한 수준에 이르지 못하는 못하고 있다 [6]. Influenza virus type A형 바이러스에 cyclic 복합물인 amantadine과 rimantadine등이 화학요법제로 이용되어 왔으나 나이든 연령층에서 부작용이 심하게 나타나고 [7], 이들 약제에 내성을 가진 새로운 influenza virus의 출현으로 점차 예방 및 치료에 어려움을 겪고 있다 [8, 9]. 따라서 범 세계적으로 부작용이 최소화 되고 사용상 안전성이 보장되는 새로운 항바이러스제의 탐색 및 개발에 박차를 가하고 있으나 화학 합성제나 항생제 자체가 가지고 있는 한계성으로 말미암아 큰 효과를 보지 못하고 있는 실정이며 효능이 탁월한 무독성 약품의 개발이 절실히 요청되고 있다 [6]. 선진국에서는 최근 수년 전부터 자연계에 무궁무진하게 존재하는 동, 식물자원이나 생약재를 이용한 천연화합물의 개발 및 탐색에 새로운 개념을 토대로 한 새로운 개발 전략을 추진하고 있는데 국내 한의학에서는 전래로 내려오는 수많은 감염성 질환에 대한 처방을 가지고 수많은 바이러스성 질병을 치료하고 있고 이들 처방이 한방 방제론인 군신좌사 및 칠정 이론에 기초하고 있는 바, 이들 처방을 이용한 항바이러스 활성의 조직적인 연구를 통해 한방 군신좌사 및 칠정이론을 과학적인 데이터를 통해 규명함과 더불어 새로운 항인플루엔자 바이러스 제제를 개발하여, 한의학 처방을 객관화 시켜야만 진정한 한의학의 과학화 및 세계화를 이룩할 수 있으리라 생각되어 본 연구를 착수하게 되었다.

재료 및 방법

바이러스

본 연구에서는 influenza virus [A/Taiwan/1/86 (H₁N₁)]형을 국립보건원 바이러스과로부터 분양 받아 사용하였다.

숙주세포와 배지

본 실험에 사용할 influenza virus에 대한 숙주 세포는 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 계대 세포주를 국립보건원 바이러스과로부터 분양받아 사용하였고 MDCK 세포주의 세포배양액은

Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY), 0.22% sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis, MO), 1ml당 50 μ g의 gentamicin (Gibco, Grand Island, NY)을 첨가하여 사용하고 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위하여서는 2% FBS가 함유된 배지를 사용하였다.

적혈구 용액 준비

닭의 익하정맥에서 혈액을 채취하여 혈액응고를 방지하기 위하여 Alsever 용액에 모은 후 1800g에서 5분간 원심분리하여 적혈구만을 모은 후 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)로 현탁시키고 4 $^{\circ}$ C에서 5일간 보관하면서 적혈구응집시험 (haemagglutination assay) 및 적혈구응집 억제시험 (haemagglutination inhibition test, HIT)에 이용하였다.

바이러스의 감염

바이러스를 증식시키기 위하여 SPF 수정계란 (specific pathogen free embryonated hen's egg)을 37 $^{\circ}$ C 부란기에서 10일간 부화시킨 후 오염된 란과 무정란을 제외한 수정계란을 이용하였다. 수정계란의 장노액 (allantoic fluid)에 바이러스 (0.08 HA units)를 0.2ml씩 접종 후 paraffin wax로 구멍을 막았다. 접종 후 37 $^{\circ}$ C에서 바이러스를 3일간 증식시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 방치시키고 장노액을 계란당 10ml씩 얻었다. 바이러스가 들어있는 장노액을 4 $^{\circ}$ C, 8000g에서 10분간 3회에 걸쳐 원심분리한 후 배양 상층액을 0.45 μ m filter로 여과하여 사용하였다 [12].

바이러스의 역가 측정

장노액에서 증식된 바이러스의 역가를 측정하기 위하여 haemagglutination assay를 실시하였다. 장노액에서 분리된 바이러스 배양원액을 PBS로 2배 계단 희석하여 96 well plate에 0.025ml씩 분주하였다. PBS를 이용하여 0.5%로 희석된 RBC 용액을 0.05ml씩 각 well에 넣고 흔들어진 후 25 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 응집역가를 측정하였다 [11].

세포배양

계대 세포주들의 세포증식을 위해서는 조직배양용 플라스크에 2% sodium bicarbonate, 10%

FBS, gentamicin (50 μ g/ml)을 첨가한 EMEM 배지를 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 세포단층이 될 때까지 배양하였다. 계대 배양을 위해서는 조직배양용 플라스크에 배양한 세포를 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크에 1:3으로 분주하여 10% EMEM 배지를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다 [13].

바이러스 증식과정 관찰

세포단층을 이룬 플라스크에 바이러스를 0.1 M.O.I 되게 감염시켜 34 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 한 시간동안 흡착시킨 후 2% FBS가 첨가된 EMEM 배지를 첨가하고 34 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 계속 배양하면서 바이러스에 감염된 세포의 변화를 도립현미경으로 관찰하였다 [13].

한약처방(복합제) 시료의 조제

한약제는 본 연구소 한의사들이 가지고 있는 특수처방, 사상방처방 [14] 및 동의 임상방제학 [15]을 기초로 하여 한약 도매시장에서 구입하였다 (Table 1). 시료는 methanol과 열수를 이용하여 추출하였는데 methanol로 추출한 경우에는 한약제 시료에 각각 500ml의 methanol을 넣은 후 60 $^{\circ}$ C 수조에서 18시간 침적하여 추출하였고, 각 시료에서 추출된 methanol 용액은 8,000g에서 15분간 원심분리한 후 여과하여 evaporator로 농축하고 동결건조하였다 [16]. 이것을 0.8% methanol에 녹이고 filter (0.45 μ m)로 여과하여 검액으로 사용하였다. 열수 추출한 경우에는 시료에 증류수 1,300ml을 넣어 2시간 30분동안 끓인 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8,000g에서 15분간 원심분리한 후 2차 여과하여 evaporator로 농축시킨 후 동결건조하였고, 0.8% methanol에 녹인 후 filter (0.45 μ m)로 여과하여 검액으로 사용하였다 [16].

시료의 항인플루엔자 바이러스 활성

Methanol과 증류수로 추출된 한약 처방의 항인플루엔자 바이러스 활성을 측정하기 위해 HIT시험을 시행하였다. 원액시료 (100mg/ml)를 10배 희석한 후 이것을 원액으로하여 이후 각각 2배 계단희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주하였다. 적혈구응집역가시험에서 측정된 바이러스

Table 1. The list of korean traditional prescriptions for boiling water and methanol extraction

Number	Name of Prescription	Number	Name of Prescription
1	Samso ũ m (I)	33	Kamrosodoksan
2	Samso ũ m (II)	34	Ch' ō ngjohupyetang
3	Kungsosan (I)	35	Talwon ũ m (I)
4	Kungsosan (II)	36	Talwon ũ m (II)
5	Hyangsosan (I)	37	Sos ũ nggitang
6	Hyangsosan (II)	38	Kwakhyangch ō nggisang
7	Sinch'ultang (I)	39	Kumiganghwaltang
8	Sinch'ultang (II)	40	Kyejigabuja
9	Ch ō nggisang	41	Tongmaeksay ō ktang
10	Hyangsosan (III)	42	Say ō ktang
11	Sokaltang	43	Sihos ũ ngmatang
12	Kochangch'ul	44	K ũ mbulchosan
13	Kumigang	45	Kyejitang
14	Ogapichangch' ō ktang	46	Samso ũ m
15	Ch' ō nkunggyejitang	47	Hyungso tang
16	Kungkwihyangsosan	48	Mahwangtang
17	Poch ũ ngkigitang	49	Kamihyangsosan
18	P'almulgunjatang	50	Kalg ũ nhaegitang
19	Hyungbangpaedoksan	51	Hyangsosan
20	Hyungbangjihwangtang (I)	52	Hyanggaltang
21	T'ae ũ mjowitang	53	Kungjihyangsosan
22	Mahwangchuntang	54	Chaso ũ m
23	Kalk ũ nnabokjatang	55	Ssang ũ mtang
24	Mahwangtang	56	Puhwang ũ mjunggisang
25	Taech' ō ngnyoungtang	57	S ũ ngmagalg ũ ntang
26	Mahwangbujasesintang	58	Sochungyongtang
27	Sosihotang (I)	59	Insampaedoksan
28	Sihogakyejitang	60	Ssanghwatang
29	Sosihotang (II)	61	Ihyangsan
30	Sangguk ũ m	62	Hyungbangjihwangtang (II)
31	ũ nkyosan	63	Yukhwatang
32	Hyangyu ũ m		

용액을 4 HA units/0.025ml로 희석시켜 각 well에 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후로 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05ml씩 분주하고 가볍게 흔들어준 후 60분 동안 25℃에서 반응시켰다. 반응 시킨 후 양성대조군과 음성대조군을 비교하여 추출된 한약처방이 바이러스와 RBC가 흡착하는 과정을 저지하는 효과를 검색하였다.

시료의 적혈구에 대한 세포독성 시험

Methanol과 D. W로 추출된 한약처방 원액시료 (100mg/ml)를 10배 희석한 후 이것을 원액으로 하여 이후 각각 2배 계단희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주하였다. 각 well에 PBS를 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05ml씩 분주하고 가볍게 흔들어준 후 60분 동안 25℃에서 반응시켰다. 반응 시킨 후

양성대조군과 음성대조군을 비교하여 추출된 한약처방이 RBC에 미치는 세포독성을 조사하였다.

결 과

MDCK세포에 감염된 인플루엔자바이러스의 증식과정 관찰

장노액에서 분리된 바이러스를 MDCK세포에 감염시켜 72시간동안 배양하면서 도립현미경으로 증식과정을 관찰하였다. 감염시킨 후 8시간부터 섬유아세포의 모양이 변형되기 시작하였고 24시간 후 MDCK세포는 부분적으로 플라스크로부터 분리되어 원형상태로 세포배양액 위에 떠다니기 시작했고 48시간 후 MDCK세포는 플라스크로부터 대부분 분리된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

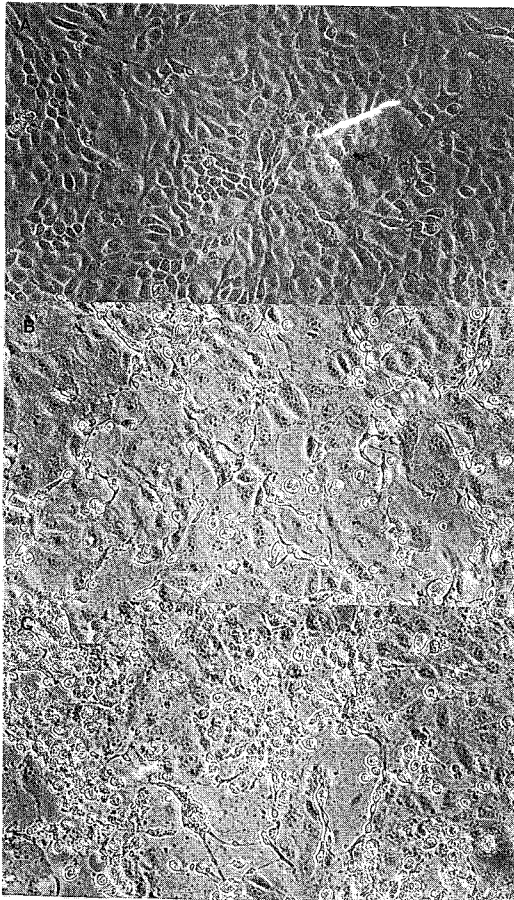


Fig. 1. Micrographs of MDCK cells infected with influenza virus type A (H₁N₁). A: normal MDCK cells B: 24 hrs post-infection (×200) c: 48 hrs post-infection (×200).

SPF 수정계란에 증식된 인플루엔자 바이러스의 역가 측정

10일 된 SPF 수정계란 3개에 바이러스를 증식시켜 얻은 후 적혈구응집반응을 통해 역가를 측정 한 결과 A SPF 수정계란에서 증식된 바이러스의 역가는 4 HA units/0.025ml로 나타났고 B SPF 수정계란에서 증식된 바이러스는 역가가 나타나지 않았으며 C SPF 수정계란에서 증식된 바이러스의 역가는 256 HA units/0.025ml로 나타났다 (Fig. 2). 이 중 C SPF 수정계란에서 증식된 바이러스를 적혈구응집시험 및 적혈구응집억제시험에 사용하였다.

시료에 대한 항바이러스 활성 측정

증류수와 methanol로 추출된 한약처방 63종을

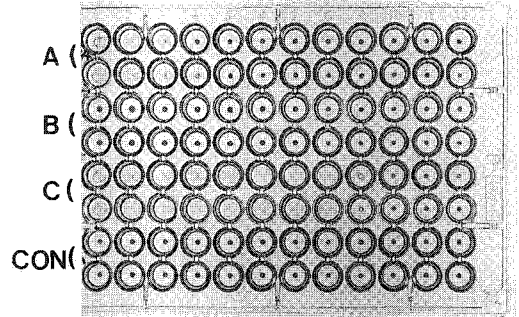


Fig. 2. Haemagglutination titration of influenza virus type A (H₁N₁). A, B, C: Allantoic fluid (containing influenza virus) which was extracted from each eggs. CON: negative control.

추출된 용매 및 각 처방의 일련번호에 따라 열수 추출된 처방은 CW-1부터 CW-63까지 methanol 추출된 처방은 CM-1부터 CM-63까지 등으로 표시한 후 이들 126개 샘플에 대한 항바이러스 활성을 측정하기 위해 장노액 에서 분리된 바이러스를 4 HA units/0.025ml로 희석하여 1차 적혈구응집억제시험을 시행한 결과 CW-1, 9, 13, 14, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 33, 34, 35, 37, 44, 56, 58, 59, 60, 61 및 CM-9, 14, 21, 22, 25, 26, 44, 48, 58, 61에서 항바이러스 활성을 나타냈다 (Table 2). 이들중 넓은 시료농도 구간에서 강한 항바이러스 활성을 나타낸 것과 비교적 낮은 시료농도 구간에서 항바이러스 활성을 나타낸 CW-14, 34, 61 및 CM-22, 26, 48을 influenza virus type A 저해제인 amantidine · HCl 과 국내에서 시판중인 한방감기 엑기스제 4종, 일본에서 시판중인 한방감기 엑기스제 2종을 양성 대조구로 사용하여 2차 HIT를 시행 하였다. 그 결과 CW-14는 10mg/ml-2.5mg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 1.25mg/ml-78µg/ml 사이에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고, CW-34는 10mg/ml-2.5mg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 1.25mg/ml-625µg/ml 사이에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖으며, CW-61은 10mg/ml-2.5mg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 1.25mg/ml -313µg/ml 사이에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 3, Table 3). CM-22는 78µg/ml-19.5µg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 313µg/ml-156µg/ml, 9.75µg/ml에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고, CM-26은 78µg/ml-9.75µg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고

156 μ g/ml, 4.87 μ g/ml에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며 CM-48은

78 μ g/ml -19.5 μ g/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 625 μ g/ml-156 μ g/ml 사이에서 비교적

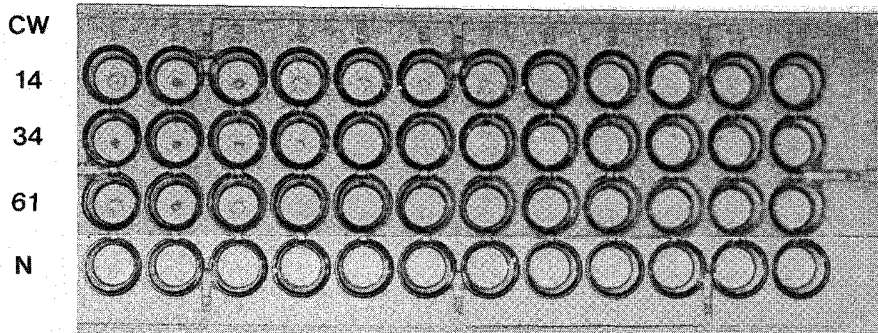


Fig. 3. Haemagglutination inhibition test of boiling water extracts which were extracted from Korean traditional prescriptions (herb complexes). Boiling water extracts which were extracted from Korean traditional prescriptions are diluted from left to right. Four haemagglutination units (HA units) per 0.025 ml of an influenza virus are added to each well. CW: boiling water extracts of traditional prescription, N: negative control.

Table 2. Inhibitory effects of Korean traditional prescriptions against influenza virus type A

Con.	-1 (10mg)	-2 (5mg)	-3 (2.5mg)	-4 (1.25mg)	-5 (625 μ g)	-6 (313 μ g)	-7 (156 μ g)	-8 (78 μ g)	-9 (39 μ g)	-10 (19.5 μ g)	-11 (9.75 μ g)	-12 (4.87 μ g)
CW-1	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
13	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
21	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
29	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
34	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
35	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-
37	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-
44	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
58	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
61	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CM-9	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
44	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
58	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-influenza virus type A effects of Korean traditional prescriptions determined by haemagglutination inhibition test with boiling water extracts of Korean traditional prescription (CW) and methanol extracts of Korean traditional prescription (CM). Con.: concentration of each extract, ++, + and - : strong positive, weak positive and negative, respectively.

약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 4, Table 3). 한편 양성대조구로 사용한 시료들 가운데 amantadine·HCl은 6.25mg/ml에서만

항바이러스 활성을 보였고, K-1은 5mg/ml-313µg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 나타냈으며 K-2는 5mg/ml-1.25mg/ml 사이에서, K-3는 10mg/ml-

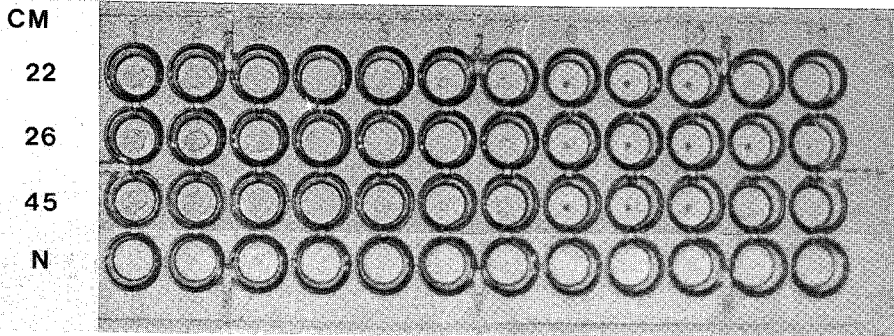


Fig. 4. Haemagglutination inhibition test of methanol extracts which were extracted from Korean traditional prescriptions (herb complexes). Methanol extracts which were extracted from Korean traditional prescriptions are diluted from left to right. Four haemagglutination units (HA units) per 0.025ml of an influenza virus are added to each well. CM: methanol extracts of traditional prescription, N: negative control.

Table 3. Inhibitory effects of Korean traditional prescriptions against influenza virus type A

Con. NO.	-1 (10mg)	-2 (5mg)	-3 (2.5mg)	-4 (1.25mg)	-5 (625µg)	-6 (313µg)	-7 (156µg)	-8 (78µg)	-9 (39µg)	-10 (19.5µg)	-11 (9.75µg)	-12 (4.87µg)
CW-14	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-
34	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
61	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CM-22	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+	-
26	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	+
48	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++	-	-

Note. Anti-influenza virus type A effects of Korean traditional prescriptions determined by haemagglutination inhibition test with boiling water extracts of Korean traditional prescription (CW) and methanol extracts of Korean traditional prescription (CM). Con.: concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, weak positive and negative, respectively.

Table 4. Inhibitory effects of control drugs against influenza virus type A

Con. NO.	-1 (100mg)	-2 (50mg)	-3 (25mg)	-4 (12.5mg)	-5 (6.25mg)	-6 (3.13mg)	-7 (1.56mg)	-8 (780µg)	-9 (390µg)	-10 (195µg)	-11 (97.5µg)	-12 (48.7µg)
A	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
K-1	-	+	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
K-2	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
J-2	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-influenza virus effects of each control drug determined by haemagglutination inhibition test. A: amantadine HCl, K-1: control drug 1 which was made in Korea, K-2: control drug 2 which was made in Korea, K-3: control drug 3 which was made in Korea, K-4: control drug 4 which was made in Korea, J-1: control drug 1 which was made in Japan, J-2: control drug 2 which was made in Japan, Con: concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, weak positive and negative, respectively.

1.25mg/ml 사이에서, K-4는 5mg/ml-2.5mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며, J-1은 10mg/ml-625 μ g/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 313 μ g/ml-156 μ g/ml 사이에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고 J-2는 10mg/ml-625 μ g/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 313 μ g/ml에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 5, Table 4). 이상의 결과로 볼 때 CW-14, CW-34, CW-61은 모두 amantadine · HCl 이나 국내 한방감기 엑기스제에 비해 훨씬 강한 항바이러스 활성을 나타냈으며, 일본 한방감기 엑기스제에 비해서는 비슷하거나 더 강한 항바이러스 활성을 나타냈다. 또한 CM-22, CM-26, CM-48은 마이크로그램 단위인 낮은 농도에서 강한 항바이러스 활성을 보여 국내 및 일본에서 판매되는 한방감기 엑기스제에 비해 influenza virus A type 에 강한 활성을 보인 것으로 나타났다. 특히 이

들 약제들이 1, 2차 적혈구응집억제시험 (HTT) 에서 모두 비슷한 양상을 보여 상당히 유의성 있는 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

시료의 RBC에 대한 세포독성시험

항바이러스 활성 측정에서 강한 항바이러스 활성을 나타낸 CW-14, CW-34, CW-61, CM-22, CM-26, CM-48 및 양성대조구로 사용된 시판 약제들의 RBC에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 세포독성시험을 실시 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다 (Table 5, 6). 화학요법제인 amantadine · HCl은 100mg/ml-12.5mg/ml에서 세포독성을 보였고, 국내 및 일본에서 판매되는 한방감기 엑기스제들은 RBC에 세포독성을 전혀 나타내지 않은 반면에 CM-22는 10mg/ml -625 μ g/ml, CM-26과 CM-48은 10mg/ml-313 μ g/ml 농도에서 RBC에 세포독성을 나타냈고 열수추출한 CW-14, CW-34, CW-61등은 RBC에 전혀 세포독성을

Table 5. Cytotoxic effects of Korean traditional prescriptions against influenza virus type A

Con. NO.	-1 (10mg)	-2 (5mg)	-3 (2.5mg)	-4 (1.25mg)	-5 (625 μ g)	-6 (313 μ g)	-7 (156 μ g)	-8 (78 μ g)	-9 (39 μ g)	-10 (19.5 μ g)	-11 (9.75 μ g)	-12 (4.87 μ g)
CW-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM-22	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxic test to red blood cells with boiling water extracts of Korean traditional prescription (CW) and methanol extracts of Korean traditional prescription (CM). Con.: concentration of each extract, + and -: positive and negative, respectively.

Table 6. Cytotoxic effects of control drugs against influenza virus type A

Con. NO.	-1 (100mg)	-2 (50mg)	-3 (25mg)	-4 (12.5mg)	-5 (6.25mg)	-6 (3.13mg)	-7 (1.56mg)	-8 (780 μ g)	-9 (390 μ g)	-10 (195 μ g)	-11 (97.5 μ g)	-12 (48.7 μ g)
A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxic test to red blood cells with each control drug. A: amantadine.HCl, K-1: control drug 1 which was made in Korea, K-2: control drug 2 which was made in Korea, K-3: control drug 3 which was made in Korea, K-4: control drug 4 which was made in Korea, J-1: control drug 1 which was made in Japan, J-2: control drug 2 which was made in Japan, Con.: concentration of each extract, +and-: positive and negative, respectively.

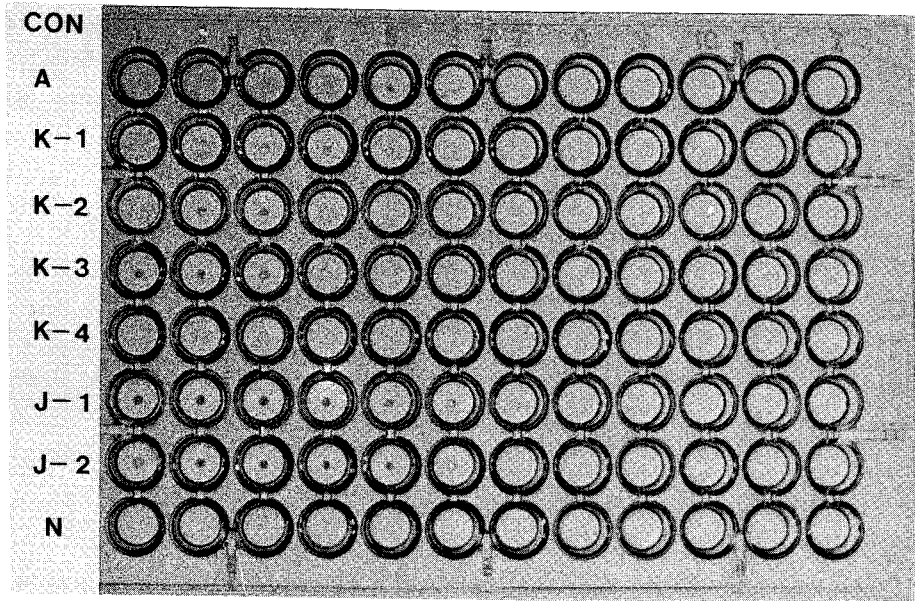


Fig. 5. Haemagglutination inhibition test of control drugs. Control drug is diluted left to right. Four Haemagglutination units per 0.025ml of an influenza virus are added to each well. CON: control, A: amantadine · HCl, K-1: control drug 1 which was made in Korea, K-2: control drug 2 which was made in Korea, K-3: control drug 3 which was made in Korea, K-4: control drug 4 which was made in Korea, J-1: control drug 1 which was made in Japan, J-2: control drug 2 which was made in Japan, N: negative control.

나타내지 않았다.

고 찰

Influenza virus는 외막으로 부터 돌출되어 있는 당단백질인 혈구응집소(haemagglutinin, HA)와 뉴라미다제(neuramidase, NA)를 지닌 점이 특징이다. 현재까지 인플루엔자 A 바이러스의 경우 13종류의 HA와 9종의 NA 아형이 동정되었다. HA는 target cell에 있는 수용체를 포함한 sialic acid에 결합하여 바이러스와 세포가 상호작용을 하도록 만들어 주고 바이러스가 세포질에 들어가도록 매개체 역할을 하고 바이러스의 주요한 표면 항원으로서 항원성이 변화게되며 혈구응집 시험 및 혈구응집억제 실험에 중요한 역할을 한다 [17]. HA 폴리펩티드는 *in vitro*상에서 trypsin에 의해 적혈구응집 활성에 영향을 미치지 않고 HA₁과 HA₂로 분해된다 [18]. Influenza virus는 감염초기에 특수부위에서 HA분자가 완전히 또는 적어도 부분적으로 분해되어야 감염율이 증가된다는 것이 입증되었다 [19, 20].

Influenza virus type A에 대해 항바이러스 활성을 지닌 amantadine HCl에 비해 본 실험에서 선

택된 시료들은 넓은 시료농도구간 및 훨씬 더 낮은 농도에서도 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타난 반면 amantadine HCl은 6.25mg/ml농도에서만 항바이러스 활성을 나타냈는데 이는 amantadine HCl은 바이러스 감염을 직접적으로 불활성화시키지 못하고 바이러스가 세포에 부착되는 것을 억제시키지 못한다고 보고한 Kanto의 결과와도 일치 한다 [21]. amantadine과 rimantadine은 influenza virus type A에 제한되어 화학요법제로 사용되어 왔으나 항상 효과적인 것은 아니고 [22] 부작용 및 내성 [23]을 초래하게 된다. 따라서 influenza virus type A에 대한 새로운 항바이러스제의 개발이 절실히 요구되어 한방처방에 근거하여 복합탕제를 열수 추출 및 methanol 추출 하여 새로운 항바이러스 활성처방 및 성분을 탐색하게 되었다. 시료들 가운데 특히 CW-14, CW-61은 넓은 시료농도구간에서 항바이러스 활성을 보였으며 전혀 세포독성이 없었고 CM-22, CM-26 및 CM-48은 저농도에서 항바이러스 활성을 보였고 활성을 나타 내는 저농도 구간에서는 세포 독성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 또한 이들 약제들은 현재 국내 및 일본에서 시판되고 있는 한방 감기 엑기스제에 비해 훨씬 넓은 시료농

도구간 및 저농도에서 강한 항바이러스 활성을 나타내고, 세포에 대한 독성은 없거나 아주 낮은 결과를 나타내 효과가 탁월한 새로운 한방감기 엑기스제로의 개발이 유망할 것으로 사료된다.

Influenza virus의 감염은 HA 폴리펩티드와 직접 관련되어 있으므로 혈구응집억제시험에 근거한 결과들을 살펴보면 CW-14, CW-61, CM-22, CM-26 및 CM-48은 바이러스가 세포의 수용체에 결합하는 과정을 억제시키는 항바이러스제로 예방 및 치료 효과에 이용될수 있음을 시사해 주며 특히 대사나 면역학적으로 결합이 있거나 폐질환, 심장혈관 질환을 지닌 소아들에게 부작용이 작아서 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

결 론

세포독성, 부작용 및 내성을 최소한으로 줄인 새로운 항인플루엔자 바이러스제제를 개발하고 한방 방제이론을 과학적으로 규명하기 위해 전통한방처방을 이용하여 항바이러스 활성을 탐색한 결과는 다음과 같다.

1. 63종의 한약처방을 열수추출 및 methanol 추출한 126종 시료의 항바이러스 활성을 시험하기 위해 적혈구응집억제시험 (HIT)을 실시한 결과 열수추출한 한약처방 20종 및 methanol 추출한 한약처방 10종에서 항바이러스 활성이 나타났으며 이중 비교적 강한 항바이러스 활성을 나타낸 CW-14, CW-34, CW-61 및 CM-22, CM-26, CM-48을 2차로 적혈구응집억제시험 및 세포독성시험을 통해 항바이러스 활성 및 세포독성을 측정하였다.

2. CW-14는 10mg/ml-78 μ g/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고, CW-34는 10mg/ml-625 μ g/ml 사이에서 항바이러스 활성을 가지며, CW-61은 10mg/ml-313 μ g/ml 사이에서 비교적 강한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다.

3. Methanol로 추출한 복합탕제인 CM-22는 313 μ g/ml-9.75 μ g/ml에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고, CM-26은 156 μ g/ml-4.87 μ g/ml에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며 CM-48은 625 μ g/ml-19.5 μ g/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타나 세 시료가 모두 비교적 낮은 시료농도에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다.

4. 양성대조구로 사용한 시료들 가운데 amantadine · HCl은 6.25mg/ml에서만 항바이러스 활성을 보였고, K-1은 5mg/ml-313 μ g/ml 사이에서 항바이러스 활성을 나타냈으며 K-2는 5mg/ml-1.25mg/ml 사이에서, K-3는 10mg/ml-1.25mg/ml 사이에서, K-4는 5mg/ml-2.5mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며, J-1은 10mg/ml -156 μ g/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고 J-2는 10mg/ml-313 μ g/ml에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다.

5. 화학요법제인 amantadine · HCl은 100mg/ml-12.5mg/ml농도에서 세포독성을 보였고, 국내 및 일본에서 판매되는 한방감기 엑기스제들은 RBC에 세포독성을 전혀 나타내지 않은 반면에 CM-22는 10mg/ml-625 μ g/ml, CM-26과 CM-48은 10mg/ml-313 μ g/ml 농도에서 RBC에 세포독성을 나타냈고 열수 추출한 CW-14, CW-34, CW-61등은 RBC에 전혀 세포독성을 나타내지 않았다.

6. 이상의 결과로 볼 때 CW-14, CW-34, CW-61 및 CM-22, CM-26, CM-48은 현재 국내 및 일본에서 시판되고 있는 한방 감기 엑기스제에 비해 훨씬 넓은 시료농도구간 및 저농도에서 강한 항바이러스 활성을 나타내고, 세포에 대한 독성은 없거나 아주 낮은 결과를 나타내 효과가 탁월한 새로운 한방감기 엑기스제로의 개발이 유망 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Alan PK, Margaret, SP: Concepts and procedures for laboratory-based Influenza surveillance. Center for disease control. WHO .U.S Public health Service Atlanta GA, 1982.
2. Ballew HC, Forrester FT, Lyeria HC: Basic laboratory methods in virology course #8200-C, 1981.
3. 세균(바이러스) 검사요원 과정. 국립보건원, 1993.
4. Aokerlind-Stopner B, Mufson MA: Respiratory viruses in Clinical Virology Manual(Specter S, Lancz, G eds)pp 243-249, Elsevier science publishing, New York, 1992.
5. Kang-Hyun: Cloning and expression of glycoprotein genes of Herpes simplex virus

- type1 and type2, PhD. thesis, Konkuk Univ, 1995.
6. WHO: Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO offset publication No. 47. WHO Geneva, 1979.
 7. Monto AS, Arden NH: Implications of viral resistance to amantadine in control of influenza A. *Clin Infect Dis* 15:362-367, 1992.
 8. Cochran KW, Maassab HF, Tsunoda A, Berlin BS: Studies on the antiviral activity of amantadine hydrochloride. *Ann NY Acad Sci* 130:432-9, 1965.
 9. Mast EE, Harmon MW, Graven S et al: Emergence and possible transmission of amantadine resistant viruses during nursing home outbreaks of influenza A(H3 N2). *Ann J Epidemiol* 134:988-997, 1991.
 10. WHO: Rapid laboratory techniques for the diagnosis of viral infections. Reported of a WHO Scientific group-technical report series 661, WHO, Geneva, 1981.
 11. McLaren, LC: Hemagglutination inhibition and hemadsorption in *Clinical Virology Manual* (Specter S, Lancz, G, eds) pp 243-249, Elsevier science publishing, New York, 1992.
 12. Mogabgab WJ, Simson GZ, Green IJ: Growth characteristics and cytopathogenic effects of influenza A and B in cultures of human embryo tissues. *Proc Soc Exper Biol and Med* 76:314-327, 1955.
 13. Chung, Hey-Kyung, Seong-Hun Lee, Hyung Hoan Lee, Dae-Sil Lee, Yong-Sung Kim: Nucleotide sequence analysis of genome segment A of Infectious Pancreatic Necrosis Virus DRT strain. *Mol Cell* 4:349 - 354, 1994.
 14. 윤길영: 四像體質醫學論, 한일문고, 1973.
 15. 윤길영: 東醫臨床方劑學, 명보출판사, 1992.
 16. 이시경, 주현규: 人蔘 Saponin이 *Rhodotorula glutinis*의 脂肪造成에 미치는 影響. 韓國產業微生物學會紙 13 (2):109-114, 1985.
 17. Wiely DC, Skehel TT: The Structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann Rev Biochem* 56: 365-394, 1987.
 18. Lazarowifz SG, Compans RW, Choppin PW: A proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the un-cleaved polypeptide HA. *Virology* 52:199-212, 1973.
 19. Lazarowitz SG, Choppin, PW: Enhancement of infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68:440-454, 1975.
 20. Klenk HD, Roh R, Orich M, Blorlorin J: Activation of influenza A viruses by trypsin. *Treatment* 68:426-439, 1975
 21. Kanto N, Eggers HJ: Inhibition of uncoating of fowl plague virus by 1-adamantanamine hydrochloride(amantadine). *Virology* 37:632-641, 1969.
 22. Hirsch MS, Kaplam JC: Antiviral agents. In *virology* (Fields BN, Knipe D M, eds) pp 441-468. Raver press, New York, 1990.
 23. Shaw MW, Arden NH, Massab HF: New aspects of influenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 5:74-92, 1992.