

## 수종 생약의 로타바이러스 감염 억제효과

송미정, 김동현\*

경희대학교 약학대학

## Inhibitory Effect of Herbal Medicines on Rotavirus Infection

Mi-Jeong Song and Dong-Hyun Kim\*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract**—Sporadic diarrhea occurring predominantly in infants and young children is a significant illness of worldwide importance. Rotaviruses are the etiologic agents for 47% of the cases of infantile diarrhea in Seoul, Korea. This research was undertaken to investigate the inhibitory effect of traditional herbal medicines on rotavirus infection. Among tested 50 kinds of herbal medicines, *Coptidis Rhizoma* was best on inhibitory activity of rotavirus infection, followed by *Astragali Radix* and *Anthriscisci Radix*. The active component of *Coptidis Rhizoma* was berberine.

**Key words**—antirovirus activity; herbal medicine; *Coptidis rhizoma*; berberine.

1943년 Light와 Hodes가 위장관염이 있는 유아의 분변에서 처음 분리한 로타바이러스는 소아 및 소, 말, 돼지, 원숭이 등의 어린 동물에서 급성설사 및 장염을 일으키는 주된 원인체로 알려져 있다. 바이러스는 분변에서 경구의 경로로 감염되며, 만 2세 이하의 나이 어린 유아에게서 전염성 급성설사증의 원인이 되는데 이런 감염 상태는 흔히 유아성 위장관염, 또는 급성 위장관염으로 불린다.<sup>1-3)</sup> 설사가 나타나는 것은 로타바이러스 감염으로 장관 점막세포의 흡수기능에 장애가 생기기 때문으로 알려졌다. 바이러스가 소장 의 융모 세포에 감염되고 이들 세포의 세포질에서 증식하여, 수송기전에 장애를 일으킨다. 손상된 세포는 장관으로 떨어지고 다량의 바이러스를 방출해서 분변에서 바이러스가 발견된다. 로타바이러스에 의한 설사는 융모의 손상된 세포가 흡수능이 없는 미숙한 crypt cell로 대체됨으로써 발생하는 sodium, glucose의 흡수 기능 손상에서 기인한 것이다.<sup>4,5)</sup> 임상증상은 장관계의 증상이 주로

서 구토, 설사에 복통을 동반하며 다소의 발열현상도 나타난다. 유아에서는 탈수현상과 전해질 불균형의 상태가 급속도로 발전하게 되고 심한 경우에는 사망할 수도 있다.<sup>1)</sup>

세계보건기구의 통계자료에 의하면 지구상의 5세 이하의 어린이들 중 설사증으로 사망하는 숫자가 매년 500만명에 달하며, 이들중 20%에 해당하는 100만 여명이 로타바이러스로 인한 설사증으로 사망하고 있다고 한다. 우리나라 서울 지역의 소아 설사군을 대상으로 12개월 동안 12종류 이상의 설사 유발원인체들을 조사한 연구보고에 의하면 로타바이러스가 설사군의 47%에서 검출되어 가장 높은 출현빈도를 나타내었으며, 이는 세계보건기구의 통계치인 20%의 두배 이상인 수치이다.<sup>6,7)</sup>

대부분의 환자는 수분공급 등의 적절한 치료를 받으면 회복하지만 개발도상국에서는 이러한 치료 조차 보편화되어 있지 않은 형편이며, 깨끗한 식수공급과 위생처리 등에 의해 세균성 설사환자의 발생빈도는 감소하고 있으나 로타바이러스에 의한 감염은 이 방법으로 큰 효과를 보지 못하고 있다. 따라서

\*교신저자 : Fax 02-957-5030

로타바이러스에 대한 백신 개발은 매우 시급한 문제이며 지난 10여년 간 백신 개발을 위한 많은 노력이 경주되어 왔고, 현재 전통적인 개발 방법과 분자생물학적인 방법이 모두 시도되고 있다.<sup>8)</sup> 그럼에도 불구하고 로타바이러스에 대한 백신의 개발이 좋은 결과를 얻지 못하고 있어 이에 대한 치료 및 예방을 위해 로타바이러스의 감염을 억제하는 약물의 개발이 시급하다. 이러한 점을 감안하여 로타바이러스의 감염억제 생약을 검색하고 활성성분을 분리하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**세포와 바이러스** - 본 실험에서 사용한 cell line은 Macaccus' Rhesus monkey kidney cell (MA-104)로 국립보건연구원으로부터 분양 받았으며, virus는 human rotavirus의 wild type인 Wa virus로 일본 국립예방위생시험연구소(國立豫防衛生試驗研究所)에서 분양 받았다.

**시약** - Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)은 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입하였고, antibiotics-antimycotics는 Gibco Co.(U.S.A.)에서, fetal bovine serum(FBS)은 Biofluids Inc.(U.S.A.)에서 구입하였다. Sodium bicarbonate는 化光純藥工業(株)(Japan)에서, trypsin-EDTA(X10)와 trypsin(1:250)는 Gibco Co. (U.S.A.)에서 구입하였고, phosphate buffered saline(PBS)는 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입하였다. 우슬, 구기자, 고본, 목단피, 맥문동, 정향, 결명자, 백지 등의 50여가지의 생약은 경동시장에서 위와 같은 품목으로 시판 되어지고 있는 것을 구입하였다.

**MA-104 cell의 배양** - MA-104 cell은 10%의 FBS를 첨가하고 antibiotics-antimycotics 1%와 sodium bicarbonate 3.5 g/L를 보강한 DMEM을 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gas로 포화된 조건에서 배양하였다.

**Wa virus액의 제조**<sup>9,10)</sup> - Tissue culture(T.C.) flask(25 cm<sup>2</sup> 기준)에 MA-104 cell의 갯수가 1-2×10<sup>6</sup> cells/flask가 되도록 분주한 뒤에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 1시간 동안 cell을 부착시켰다. 상등액을 걷어내고 FBS가 포함되지 않은 washing

배지인 DMEM 배지로 세척한 뒤에, Wa virus액 400 μl에 trypsin 5 μg/ml를 포함한 DMEM 배지(infection 배지) 20 μl를 가하고 37°C에서 30분간 처리하여 미리 활성화시킨 Wa virus액 400 μl을 가하여 cell 표면에 고르게 퍼준 다음 37°C에서 1시간 동안 감염시켰다. 감염이 끝난 후에는 상등액을 걷어내고 infection media를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 배양시켰다. 5일 후에 cpe(cytopathic effect)를 관찰, 확인하고 냉동시켰다. 냉동 후에 빠르게 녹이는 과정을 3회 반복하여 cell의 세포막을 완전히 깨뜨리고 4°C, 500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. Virus액인 상등액만을 취해 냉동보관하였다. 사용할 때 Wa virus액의 역가를 측정하여 사용하였다. 역가의 측정은 먼저 MA-104 cell을 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 떼어낸 다음 new media를 가하고 이것을 1200 rpm에서 5분동안 원심분리한 후 상등액을 버리고 원하는 농도인 5×10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 infection media로 ml수를 맞추었다. Wa virus stock solution으로부터 10<sup>-1</sup>에서 10<sup>-8</sup>까지 희석계를 만들고 한 가지 농도당 8개의 well에 100 μl씩 분주했다. 여기에 cell을 동량 분주하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gas로 포화된 조건에서 7일간 배양했다. 배양후 역상현미경으로 각 well에 나타난 cpe를 관찰하여 TCID<sub>50</sub>(50% Tissue-culture infectious dose)/ml을 구하고 여기에 계수 0.69를 곱하여 pfu(plaque forming unit)/ml를 구하였다. 본실험에서 사용한 바이러스의 TCID<sub>50</sub>(50% Tissue-culture infectious dose)/ml와 pfu(plaque forming unit)/ml는 각각 1.27×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml, 8.8×10<sup>5</sup> pfu/ml이었다(Table I).

**Wa virus 감염억제효과의 검색** - 생약 시료 100 g을 물 500 ml넣고 3회 반복 추출하여 환류하면서 물분획을 얻었다. 이 물분획을 건조 중량 0.4 mg/ml로 만들어 가압증기멸균을 하였다. 이 시료를 well당 50 μl씩 분주하고 여기에 MA-104 cell과 Wa virus 희석액을 가하고 배양후 cpe를 관찰하였다. 감염저해율(%)은 감염시킨 총 well 수에 대해 감염되지 않은 well 수를 백분율로 표시했다.

**황련으로부터 Wa virus 감염억제물질의 분리** - 황련 500 g에 약 4배의 물 2 liter를 넣고 수욕상에서 2회 반복하여 8시간 동안 추출하여 여과, 농축하

**Table I.** Measurement of Wa virus titer by EPD method

Dilutions	Infected wells	Uninfected wells	% of infection <sup>a</sup>
10 <sup>-1</sup>	8(32) <sup>b</sup>	0(0)	100.0
10 <sup>-2</sup>	8(24)	0(0)	100.0
10 <sup>-3</sup>	8(16)	0(0)	100.0
10 <sup>-4</sup>	5(8)	3(3)	72.7
10 <sup>-5</sup>	2(3)	6(9)	25.0
10 <sup>-6</sup>	1(1)	7(16)	5.9
10 <sup>-7</sup>	0(0)	8(24)	0.0
10 <sup>-8</sup>	0(0)	8(32)	0.0

<sup>a</sup>calculated by accumulation number.<sup>b</sup>accumulation number.

였다(56 g). 여기에 ethylacetate를 넣어 분획하여 농축하였다(11 g). 이중 2 g을 silica gel(70~230 mesh, Merck)을 칼럼 (2.5×30 cm)에 채운후 위에서 얻은 시료 농축분을 loading 하였다. 이 때에 용매는 chloroform:methanol(4:1(v/v))을 사용

하였고, 5개의 화합물을 분리하였다. 그의 화합물은 더이상 분리하지 않았다. 위에서 분리한 5개의 화합물은 TLC에서의 Rf치는 0.9(compound 1, 15 mg), 0.56(compound 2, 24 mg), 0.475(compound 3, 10 mg), 0.47(compound 4, 50 mg), 0.25(compound 5, 20 mg)였다. MA-104 cell과 Wa virus 희석액을 가한 well에 각 분획의 최종 농도가 0.001, 0.01 mg/ml이 되도록 가하여 배양후 cpe를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

**Wa virus 감염에 대한 생약의 영향** - 한방에서 널리 사용되는 생약에 대해 항 Wa virus 감염효과를 측정된 결과, 황련, 황기, 전호, 진피가 28.6%의 가장 낮은 감염율을 보였고, 맥문동, 감초, 천궁, 지실도 우수한 바이러스 감염 억제효과를 나타냈다(Table II). 그러나 그의 생약들은 거의 효과가 없었다. 이러한 현

**Table II.** Inhibitory effect of herbal medicines on Wa virus infection

Herbal medicines	Inhibition (%)	Herbal medicines	Inhibition (%)
Achyranthis Radix	28.6	Aurantii Nobilis Pericarpium	28.6
Lycii Fructus	- <sup>a</sup>	Atractylodis Rhizoma Alba	28.6
Angelicae Tenuissimae Radix	14.3	Aurantii Fructus	71.4
Moutan Cortex Radicis	-	Rhei Rhizoma	-
Liriopsis Tuber	57.2	Glycyrrhizae Radix	57.2
Caryophilli Flos	-	Cyperi Rhizoma	14.3
Cassiae Semen	14.3	Anthrisci Radix	71.4
Angelicae Dahuriae Radix	14.3	Paeoniae Radix	-
Cinnamomi Ramulus	-	Hoelen	14.3
Menthae Herba	-	Angelicae Koreanae Radix	28.6
Galla Rhois	-	Amomi Semen	-
Scutellariae Radix	14.3	Cnidii Rhizoma	57.2
Artemisiae Capilaris Flos	-	Zingiberis Rhizoma(생강)	14.3
Cimicifugae Rhizoma	-	Fritillariae Bulbus	28.6
Lithospermi Radix	-	Garendniae Fructus	43.3
Phellodendri Cortex	14.3	Atractylodis Rhizoma	20.0
Bupleuri Radix	-	Zingiberis Rhizoma(건강)	40.0
Coptidis Rhizoma	71.4	Hordei Fructus Germinatus	20.0
Ginseng Radix	28.6	Pinelliae Tuber	40.0
Perillae Herba	-	Armeniaca Semen	28.6
Schizandrae Fructus	28.6	Ponciri Fructus	60.0
Astragali Radix	71.4	Chrysanthemi Flos	14.3
Ephedrae Herba	-	Araliae Radix	42.9
Puerariae Radix	-	Angelicae Gigantis Radix	14.3
Forsythiae Fructus	-	Lonicerae Flos	28.6
Saussureae Radix	14.3	Platycodi Radix	-

<sup>a</sup>not inhibited

**Table III.** Inhibitory effect of compounds isolated from *Coptidis Rhizoma* on Wa virus infection

Compound	Inhibition (%)	
	0.001 <sup>a</sup>	0.01
4	57.1	71.4
5	57.1	71.4
Berberine	57.1	71.4

<sup>a</sup> final concentration (mg/ml).

상은 Simian virus인 SV11 rotavirus을 이용한 경우에도 비슷한 결과를 나타냈다.

**황련중의 Wa virus 감염억제물질** - 한방에서 항바이러스제로 사용되는 생약중에서 황련이 우수한 Wa virus 감염 억제효과를 나타냈다. 그래서, 이 황련으로부터 감염억제성분 분리를 시도하였다. 황련의 물 추출물을 EtOAc로 추출하여 silica gel column chromatography로 분리한 결과, compound 4와 5가 0.01 mg/ml에서 71.4%의 감염억제효과를 보였으며 그외의 화합물은 효과가 거의 없었다. 이 화합물들중 효과가 우수한 compound 4에 대하여 기기분석(FAB Mass, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR)을 통하여 구조를 분석한 결과 berberine인 것으로 밝혀졌다. 황련중의 Wa virus에 대한 감염억제효과는 상당부분이 이 berberine에 기인된 것으로 생각되었다. 또한 이보다 TLC에서 Rf값이 낮은 compound 5의 화합물도 로타바이러스의 감염을 억제할 수 있는 물질이었으나 그 구조는 아직 밝혀지지 못했다(Table III).

앞으로 황련중의 Wa virus 감염억제성분 뿐만 아니라 효과가 우수했던 생약들에 대해 생리활성성분을 조사할 필요가 있다고 생각된다.

## 인용문헌

1. Joklik, W. K. (1988) Virology, 193-197. Prentice-Hall International Inc. 3rd edition.
2. Hodes, H. L. (1977) Viral gastroenteritis, *Am. J. Dis. Child.*, 131: 729-731.
3. Bridger, J. C. (1987) Novel rotaviruses in animals and man, 5-23. John Wiley & Sons, Inc.
4. Offit, P. A. (1994) Rotaviruses: Immunological determinants of protection against infection and disease, *Adv. Virus Res.*, 44: 161-202.
5. Konno, T., Suzuki, H., Imai, A., Kutsuzawa, T., Ishida, N., Katsushima, N., Sakamoto, M., Kitaoka, S., Tsuboi, R. and Adachi, M. (1978) A long-term survey of rotavirus infection in Japanese children with acute gastroenteritis, *J. Infec. Dis.*, 138: 569-576.
6. De Zoysa, I. and Feachem, R. G. (1985) Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization, *Bull WHO* 63: 569-583.
7. Kim, K. H., Suh, I. S., Kim, J. M., Kim, C. W. and Cho, Y. J. (1989) Etiology of childhood diarrhea in Korea, *J. Clin. Microbiol.*, 27: 1192-1196.
8. Ellis, R. W. (1992) Rotavirus vaccines. *In Vaccines: new approaches to immunological problems.* 255-288. Butterworth-Heinemann Press, Boston.
9. Smith, E. M., Esters, M. K., Graham, D. Y. and Gerba, C.P. (1979) A plaque assay for the simian rotavirus SA11, *J. Gen. Virol.*, 3: 513-519.
10. Birch, C. J., Rodgers, S. M., Marshall, J. A. and Gust, I. D. (1983) Replication of human rotavirus in cell culture, *J. Med. Virol.*, 11: 241-250.

(1998년 3월 30일 접수)