

잔나비겉상 수용성물질의 Vesicular Stomatitis Virus(New Jersey Serotype)에 대한 항바이러스작용과 Interferon과의 병용효과

임교환 · 어성국 · 김영소 · 임재윤¹ · 한성순*

충북대학교 약학대학, ¹자연과학대학

Antiviral Effect of Water Soluble Substance from *Elfvvingia applanata* Alone and in Combinations with Interferons Against Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Serotype)

Kyo-Hwan Rym, Seong-Kug Eo, Young-So Kim, Jai-Yun Lim¹ and Seong-Sun Han*

College of Pharmacy, ¹College of Natural Science,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT: In order to find less toxic antiviral agents from Basidiomycetes, EA, the water soluble substance, was prepared from the carpophores of *Elfvvingia applanata* (Pers.) Karst. Antiviral activity of EA against vesicular stomatitis virus [New Jersey serotype, VSV(NJ)] was examined in Vero cells using plaque reduction assay *in vitro*. And the combined antiviral effects of EA with interferon (IFN) alpha and gamma were examined on the multiplication of VSV(NJ). EA caused a concentration-dependent reduction in the plaque formation of VSV(NJ) with 50% effective concentration (EC₅₀) of 2.10 mg/ml. The results of combination assay were evaluated by the combination index (CI) that was analysed by the multiple drug effect analysis. The combination of EA with IFN alpha showed more potent effect with CI values of 0.87~1.59 for 50%, 70% and 90% effective levels than that with INF gamma with CI values of 1.05~2.03.

KEYWORDS: Combination index (CI), *Elfvvingia applanata*, Plaque reduction assay, Vesicular stomatitis virus [New Jersey serotype, VSV(NJ)]

잔나비겉상 *Elfvvingia applanata* (Pers.) Karst은 구멍장이 버섯과(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로, 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 분포되어 있으며 항암목적의 민간요법에 사용되어 왔다(Park, 1991). 잔나비겉상의 약리작용에 관한 연구로는 주로 다당체의 항암효과(Mizuno 등, 1981; Usui 등, 1983), 면역조절효과(Nakashima 등, 1979)와 고미성분에 대한 보고(Nishitoba 등, 1988)가 있었고, 항바이러스작용에 대한 연구는 잔나비겉상에서 분리한 핵산이 interferon(IFN) 양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 plaque를 감소시켰음이 보고된 바 있다(Kandfer 등, 1979). 한편 김 등(1994)은 잔나비겉상 열수추출물의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과, 투여가능한 최대용량을 투여시 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았음을 보고한 바 있다.

Vesicular stomatitis virus[New Jersey serotype, VSV(NJ)]는 rhabdovirus에 속하는 바이러스로 사람에게는 유행성감기와 유사한 증상을 일으키며 가축에게는 입술, 얼굴, 유두 등에 수포성 조직상해를 일으킨다. VSV(NJ)의 감염경로나 면역체계에 대해 확실히 알려져 있지 않으므로 치료에 어려움이 있으며 불활성화 백신, 약독화 생균백신 등이 개발

되어 있으나 효과가 미약하여 사용되지 않고 있는 실정이다(Nichol, 1994).

현재 사용중인 항바이러스제로는 iododeoxyuridine(IDU), acyclovir(ACV), azidothymidine(AZT)을 비롯한 nucleoside 유도체와 interferon(IFN) 등의 단백질성 항바이러스제가 대부분이나 이들은 여러 가지의 부작용을 나타내며, 내성균주의 출현도 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다(Coen, 1986). 따라서 새로운 항바이러스제의 개발과 더불어 작용기전이 다른 항바이러스제와의 병용투여방법에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다(Schinazi, 1991).

이상의 연구보고를 토대로, 안전성이 확인된 잔나비겉상 자실체의 수용성 물질의 vesicular stomatitis virus[New Jersey serotype, VSV(NJ)]에 대한 항바이러스 효과를 측정하고, 단백질성 항바이러스제인 interferon alpha(IFN alpha) 및 interferon gamma(IFN gamma)와의 병용시험을 실시하여 그 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

잔나비겉상 *Elfvvingia applanata*의 자실체를 청주시내에

*Corresponding author <E-mail: sshan@cbucc.chungbuk.ac.kr>

서 구입하여 서울산업대학 박완희 교수의 감정을 받아 사용하였다. 일정시간 음건, 세절한 자실체 800 g을 증류수 3.5 l로 90~100°C의 수욕상에서 8시간 추출한 후, 온시 여과, 농축, 동결건조하여 얻은 암갈색의 분말성 물질(이하 EA라 칭함)을 실험에 사용하였다.

시약

Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin, penicillin G, streptomycin, amphotericin B는 Gibco BRL Co., 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), crystal violet는 Sigma Co. 제품을 사용하였다. 사용된 interferon (IFN)은 recombinant human alpha interferon(IFN alpha; Boehringer Mannheim Co.)와 recombinant human gamma interferon(IFN gamma; Genzym)이며 모두 미국 국립보건원에서 공급되는 국제표준품으로 보정하여 사용하였다.

세포 및 바이러스

숙주세포는 Vero 세포(Kidney, African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL 81을, 바이러스로는 vesicular stomatitis virus[New Jersey serotype, VSV(NJ)] ATCC VR-159를 사용하였다.

세포독성시험

세포독성은 Vero 세포(3.5×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 최고농도 20 mg/ml의 EA를 6단계로 배수희석하여 100 μ l씩 분주하고 48시간 배양하여 MTT reduction assay(Scubiero 등, 1988)에 따라 시험하였다. EIA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 50% cytotoxicity concentration(CC₅₀)를 구하였다.

항바이러스시험

EA의 항바이러스효과는 plaque reduction assay(Langford와 Weight, 1981; Hondo 등, 1976)에 따라 시험하였다. 세포부유액(1×10^6 cells/well)을 6 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 세포단층을 얻었다. 세포단층을 PBS로 세척하고 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종하고 세포에 흡착되도록 더 배양한 다음, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mg/ml의 EA와 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 배양하였다. IFN은 Tachedjian 등(1992)의 방법에 따라 세포단층을 얻은 후 5, 25, 50, 100, 150, 200 IU/ml로 조제된 IFN alpha와 IFN gamma를 처리하고 다시 1시간 배양한 후 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종한 후 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque 수를 세었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제하는 EA의 농도인 50% effective concentration(EC₅₀), EC₇₀ 및

EC₉₀를 구하였다.

병용시험

병용시험은 Tachedjian 등(1992)의 방법으로 실시하였다. Vero 세포(1×10^6 cells/well)를 6 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후 5, 25, 50, 75, 100 IU/ml로 조제된 IFN alpha와 IFN gamma를 처리하고 다시 1시간 배양한 후 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종한 다음 바이러스가 세포에 흡착되도록 1시간 더 배양하였다. EA는 0.1~2.0 mg/ml의 농도범위내에서 EA와 IFN을 1 : 50의 농도비율로 조제하여 plaque이 형성될 때까지 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 제거하고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시키고 0.1% crystal violet 용액으로 염색한 후 plaque 수를 세었다.

시험결과의 분석

시험결과의 분석 및 판정은 Chou와 Talalay(1984)의 multiple drug effect analysis에 따라 분석하였다. 결과는 대조군과 비교하여 증식의 억제가 일어나는 정도인 fraction affected f(a)에 따라 combination index(CI)로 상승, 상가 및 길항효과로 판정하였다.

결과 및 고찰

항바이러스효과

잔나비겉살 *Elfvigia applanata*의 수용성물질 EA를 시료로 하여 Vero 세포에서 VSV(NJ)에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 시험한 결과는 Table 1과 같다. EA의 Vero 세포에 대한 CC₅₀는 3.79 mg/ml이었고 농도의존적으로 plaque 형성을 억제하였다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제시키는 EA의 농도인 50% effective concentration(EC₅₀), EC₇₀, 및 EC₉₀는 2.10, 2.93, 및 3.77 mg/ml를 나타내었다. 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma의 항바이러스효과는 IFN alpha의 EC₅₀가 104.64 IU/ml로서 138.89

Table 1. Antiviral activities of EA^a, IFN alpha and IFN gamma on VSV(NJ)^b by plaque reduction assay

Antiviral substances	CC ₅₀ ^c	EC ^d		
		EC ₅₀	EC ₇₀	EC ₉₀
EA (mg/ml)	3.79	2.10	2.93	3.77
IFN alpha (IU/ml)		104.64	153.77	202.90
IFN gamma (IU/ml)		138.89	216.95	295.02

^aWater soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvigia applanata*.

^bVesicular stomatitis virus (New Jersey serotype).

^c50% cytotoxic concentration (CC₅₀) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

^dEffective concentration (EC) is the concentration of drug required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%.

IU/ml를 나타낸 IFN gamma 보다 더 우수한 것으로 나타났다.

병용효과

EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 Vero 세포에서 VSV(NJ)의 plaque형성에 대한 영향은 각각 Figs. 1, 2와 같다. Figs. 1, 2에 나타난 결과를 median-effect equation으로 바꾸어 $\log[\text{concentration}]$ 에 대해 $\log[f(a)^{-1}-1]^{-1}$ 의 값을 계산한 결과 median-effect plot으로부터 결정된 parameter를 Table 2에 나타내었다. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma를 병용처리시에 median-effect plot이 서로 평행하지 않으므로 병용효과의 배타성이 성립될 수 없었다. 따라서 CI values는 상호배타적가정(mutually exclusive assumptions)과 상호비배타적가정(mutually nonexclusive assumptions)으로 계산되었다. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 f(a)에 따른 CI values는 Fig. 3과 같다. EA와 IFN alpha와의 병용시 CI values는 f(a)가 0.50에서 0.90 사이인 유효농도 범위

내에서 f(a)의 값이 커짐에 따라 상가작용 내지는 길항작용을 나타내었으며 IFN gamma와의 병용시는 길항작용을 나타내었다.

잔나비겉상 *Elfvigia applanata*의 수용성물질 EA의 Vero 세포에서 VSV(NJ)에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 측정된 결과, EA는 농도의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며, EC₅₀는 2.10 mg/ml를 나타내었다. 이는 EA가 바이러스의 증식을 억제하는 물질임을 보여주는 결과로써, EA에는 항암물질(Mizuno 등, 1981; Usui, 1983), 면역조절물질(Nakashima 등, 1979) 등 여러 생리활성물질을 포함하고 있는 것으로 보고된 바, 다당체는 sarcoma 180에 대한 항암효과를 나타내고 단백질항원에 대한 지연형 과민반응을 촉진하며, 핵산은 IFN양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 증식을 억제하는 것으로 확인되었다(Kandefer 등, 1979). 따라서 이러한 다당체를 비롯한 핵산, 뉴클레오사이드 유사물질 및 기타 생리활성을 나타내는 물질이 바이러스의 증식을 억제하는 것으로 사료된다. 또한 Shannon 등(1984)에 의하면 EA는 바이러스가 숙주세

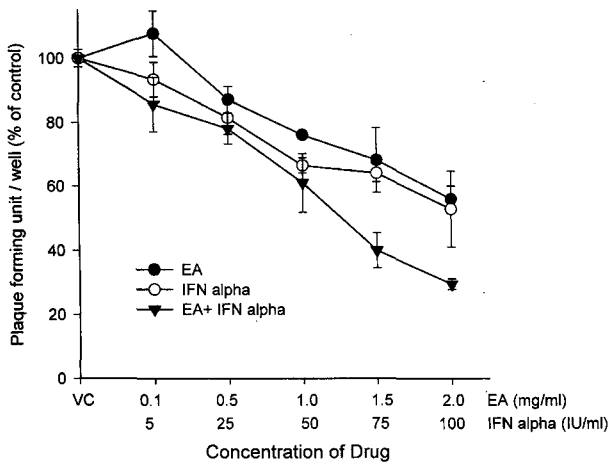


Fig. 1. Inhibitory effect of plaque formation of VSV(NJ) in Vero cells by EA, IFN alpha and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate determinations.

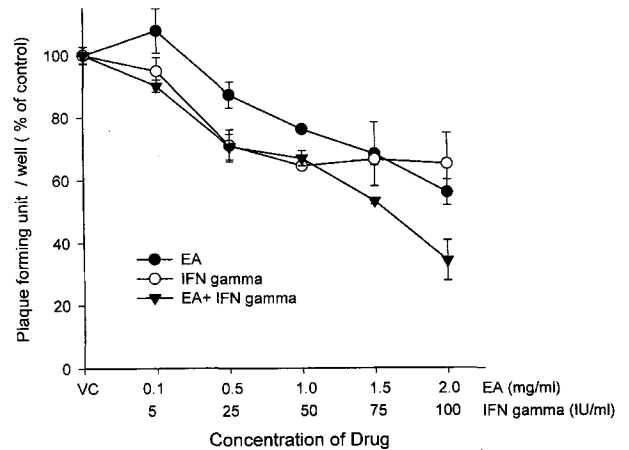


Fig. 2. Inhibitory effect of plaque formation of VSV(NJ) in Vero cells by EA, IFN gamma and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate determinations.

Table 2. Median effective concentrations and CI values of combinations of EA^a with IFN alpha and IFN gamma on the plaque formation of VSV(NJ)^b in Vero cells

Antiviral substances	Parameters ^c			CI at f(a) of: ^d		
	<i>m</i>	EC ₅₀	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
EA (mg/ml)	1.17	2.67	0.99			
IFN alpha (IU/ml)	0.83	130.88	0.99			
IFN gamma (IU/ml)	0.79	149.55	0.87			
EA/IFN alpha (1 : 50)	0.86	1.16/57.84	0.86	0.87(1.07)	0.98(1.23)	1.23(1.59)
EA/IFN gamma (1 : 50)	0.84	1.49/74.40	0.93	1.05(1.33)	1.19(1.54)	1.53(2.03)

^aWater soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvigia applanata*.

^bVesicular stomatitis virus (New Jersey serotype).

^c*m* is the slope, EC₅₀ is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

^dCI < 1, synergism; CI = 1, additive effect; CI > 1, antagonism. f(a) is a component of the median-effect equation referring to the fraction of the system affected.

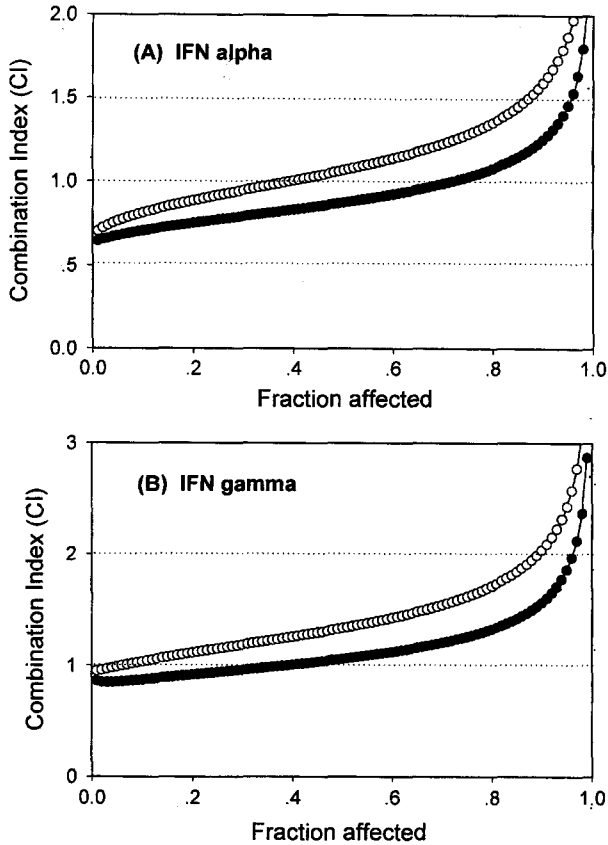


Fig. 3. CI values for combinations of EA with IFN alpha and IFN gamma on VSV(NJ) corresponding to fraction affected $f(a)$ ranging from 0.00 to 1.00. CI values were calculated under both mutually exclusive assumptions (●) and mutually nonexclusive assumptions (○).

포에 흡착하는 과정을 억제함으로써 항바이러스활성을 나타내는 것으로 사료된다.

단백질성 항바이러스제인 IFN은 세포표면에 존재하는 특정 수용체와 결합함으로써 세포로부터 항바이러스성 물질의 분비를 유도함으로써 항바이러스활성을 나타내며, 항암, 면역조절효과, 호르몬의 상호작용조절 등의 작용도가 진다(Baron 등, 1987). 그러나 장기간의 IFN 투여는 간독성, 과내성 등의 각종 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다(Tachedjian 등, 1992). 따라서 이러한 IFN의 치료요법의 효능을 높이고 독성 및 부작용을 감소시키고자 VSV(NJ)에 대하여 EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험을 실시하여 IFN alpha와의 병용시 $f(a)$ 가 0.50 내지 0.70인 유효농도 범위에서 상가효과가 관찰되었다. 따라서 잔나비결상의 수용성 물질 EA는 그 작용기전의 구멍과 정제에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이나, 급성독성시험(김 등, 1994)에서 투여가능한 최대용량을 투여하였을 때 치사어나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았으므로 안전성있는 물질로서 IFN alpha의 투여에 따른 부작용을 감약시켜 줄 뿐만 아니라 치료효과를 높여 줄 수 있는 항바이러스제로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

잔나비결상 *Elfvigia applanata* 자실체의 수용성물질 EA의 vesicular stomatitis virus[New Jersey serotype, VSV (NJ)]에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 실험한 결과 EA는 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며 EC_{50} 는 2.10 mg/ml이었다. 단백질성 항바이러스제인 interferon(IFN)과 EA와의 병용시험 결과 $f(a)$ 가 0.50에서 0.90인 유효농도범위에서 IFN alpha와 병용시 $f(a)$ 의 값이 커짐에 따라 상가작용 내지는 길항작용을 나타내었으며, IFN gamma와의 병용시에는 길항작용을 나타내었다. 따라서 IFN alpha와의 병용시 $f(a)$ 가 0.50 내지 0.70의 유효농도 범위에서 상가효과가 있다.

참고문헌

- Baron, S., Dianzani, F., Stanton, G. J. and Fleischmann, W. R., Jr. 1987. The interferon system; A current review to 1987. University of Texas Press. Austin, Texas.
- Chou, T.-C. and Talalay, P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationship; The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitor. *Adv. Enzyme Regul.* **22**: 27-55.
- Coen, E. M. 1986. General aspects of virus resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**(Suppl. B): 1-10.
- Hondo, R., Shibuta, H. and Matumoto, M. 1976. An improved plaque-assay for varicella virus. *Arch. Virology* **51**: 355-359.
- Kandefer, S. M., Kawecki, Z. and Guz, M. 1979. Fungal nucleic acids as interferon inducers. *Acta Microbiol. Pol.* **28**(4): 277-291.
- Kim, Y. S., Kang, J. K., Lee, C. K. and Han, S. S. 1994. Effect of *Elfvigia applanata* extract on the acute toxicity in mice. *Yakhak Hoeji* **38**(6): 756-762.
- Langford, M. P. and Weight, D. A. 1981. Virus plaque-reduction assay for Interferon; Microplaque and regular microplaque reduction assay. **78**: Pp 339-346. In: Pegstka, S. Ed. *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York.
- Mizuno, T., Hayashi, K., Iwasaki, Y., Shitano, A., Arakawa, M., Shinkai, K., Shimizu, M. and Tanaka, M. 1981. Host-mediated antitumor polysaccharides IV. Fractionation, structural study and antitumor activity of heterogalactans isolated from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* and *Fomitopsis pinicola*. *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku.* **31**: 65-82.
- Nakashima, S., Umeda, Y. and Kanada, T. 1979. Effect of polysaccharides from *Ganoderma applanatum* on immune responses I. Enhancing effect on the induction of delayed hypersensitivity in mice. *Microbiol. Immunol.* **23**(6): 501-513.
- Nichol, S. T. 1994. Vesicular stomatitis virus. Pp 1547-1555. In: Webster, R. G and Granoff A. *Encyclopedia of Virology III*. Academic Press. London, San Diego, N. Y., Boston,

- Sydney, Tokyo and Toronto.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S. 1988. Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* **28**(1): 193-197.
- Park, W. H. 1991. Colored Fungi of Korea, Pp 374. Kyohak Publishing Co., Seoul.
- Schinazi, R. F. 1991. Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential. Pp 110-181. *In*: Chou, T.-C. and Rideout, D. C. Eds. Molecular Mechanism of Chemotherapeutic Synergism, Potentiation and Antagonism, Academic Press, Orlando, FL.
- Scubiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**: 4827.
- Shannon, W. M. 1984. Mechanism of action and pharmacology: chemical agents. Pp 55-121. *In*: Glasso, G. J., Merigan, T. C. and Buchanon, R. A. Eds. Antiviral Agents and Viral Diseases of Man, Raven Press. New York.
- Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Locarnini, S. and Birch, C. 1992. Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type I in vitro by interferon alpha and coumermycin A1. *Antiviral Chem. Chemother.* **3**(3): 183-188.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. 1983. Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **115**(1): 273-280.