

잔나비겉상 수용성 물질의 Vesicular Stomatitis Virus (Indiana Serotype)에 대한 항바이러스작용과 Interferon과의 병용효과

김영소, 어성국, 한성순*

충북대학교 약학대학

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

Young-So Kim, Seong-Kug Eo and Seong-Sun Han*

College of Pharmacy, 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 [Indiana serotype, VSV(IND)] was examined in Vero cells using plaque reduction assay *in vitro*. And the combined antiviral effects of EA with interferon (IFN) alpha or gamma were examined on the multiplication of VSV(IND). EA caused a concentration-dependent reduction in the plaque formation of VSV(IND) with 50% effective concentration (EC₅₀) of 104.02 µg/ml. The results of combination assay were evaluated by the combination index (CI) that was analysed by the multiple drug effect analysis. All cases of the combinations of EA with IFN alpha or IFN gamma showed potent synergism with CI values of 0.38~0.52 for 50~90% effective levels.

Key words - Combination index (CI); *Elfvvingia applanata*; plaque reduction assay; vesicular stomatitis virus [Indiana serotype, VSV(IND)].

잔나비겉상 *Elfvvingia applanata* (Pers.) Karst은 구멍장이버섯과 (Polyporaceae)에 속하는 버섯으로, 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 분포되어 있으며 항암목적의 민간요법에 사용되어 왔다.¹⁾ 잔나비겉상의 약리작용에 관한 연구로는 주로 다당체의 항암효과,²⁾ 면역조절효과³⁾와 고미성분⁴⁾에 대한 보고가 있었고, 항바이러스작용에 대한 연구는 잔나비겉상에서 분리한 핵산이 interferon (IFN)양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 plaque을 감소시켰음이 보고된 바 있다.⁵⁾ 한편 김 등⁶⁾은 잔나비겉상 열수추출물의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과, 투여가능한 최

대용량을 투여시 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았음을 보고한 바 있다.

Vesicular stomatitis virus (VSV)는 rhabdovirus에 속하는 바이러스로 사람에게는 유행성 감기와 유사한 증상을 일으키며 가축에게는 입술, 얼굴, 유두 등에 감염되어 수포성 조직상해를 일으킨다. VSV의 감염경로나 면역체계에 대해 확실히 알려져 있지 않으므로 치료에 어려움이 있으며 불활성화 백신, 약독화 생균백신 등이 개발되어 있으나 효과가 미약하여 사용되지 않고 있는 실정이다.⁷⁾

현재 사용중인 항바이러스제로는 iododeoxyuridine (IDU), acyclovir (ACV), azidothymidine (AZT)을 비롯한 nucleoside 유도체와 interferon (IFN) 등의

*교신저자 : Fax 0431-268-2732

단백질성 항바이러스제가 대부분이나 이들은 여러 가지의 부작용을 나타내며, 내성균주의 출현도 증가하고 있는 것으로 보고되어 있다.⁹⁾ 따라서 새로운 항바이러스제의 개발과 더불어 작용기전이 다른 항바이러스제와의 병용투여방법에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다.⁹⁾

이상의 연구보고를 토대로, 안전성이 확인된 잔나비겉상 자실체의 수용성 물질의 VSV (IND)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 (*Elfvigia applanata*)의 자실체를 청주시내에서 구입하여 서울산업대학 박완희 교수의 감정을 받아 사용하였으며, 표품은 충북대학교 약학대학 미생물학 교실에 보관하였다. 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 시료로 사용하였다.

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

세포 및 바이러스 - 숙주세포는 Vero 세포 (African green monkey kidney cell, ATCC CCL 81)를, 바이러스로는 vesicular stomatitis virus [Indiana serotype, VSV(IND)] ATCC VR-158을 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 assay¹⁰⁾에 따라 시험하였다. EIA reader로 570 nm에

서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 흡광도가 50% 감소되는 EA의 농도인 50% cytotoxic concentration (CC₅₀)의 값을 계산하였다.

항바이러스시험 - EA의 항바이러스효과는 plaque reduction assay^{11,12)}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, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml의 EA와 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 배양하였다. Interferon은 Tachedjian 등¹³⁾의 방법에 따라 세포단층을 얻은 후 5, 25, 50, 100, 150, 200 IU/ml로 조제된 IFN alpha 또는 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 등¹³⁾의 방법으로 실시하였다. Vero 세포 (1×10^6 cells/well)를 6 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후 0.5, 5, 25, 40, 50 IU/ml로 조제된 IFN alpha 또는 IFN gamma를 처리하고 다시 1시간 배양한 후 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종한 다음 바이러스가 세포에 흡착되도록 1시간 더 배양하였다. EA는 0.01~1.0 mg/ml의 농도범위내에서 EA와 IFN을 1:50의 농도비율로 조제하여 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 Talalay¹⁴⁾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

통계처리 - 실험결과 평균치의 실험오차를 계산하였고, 대조군과의 차이를 Student's *t*-test를 사용하여 검정하였으며, $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이

있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

항바이러스효과 - 잔나비결상 (*Elfvigia applanata*)의 수용성불질(EA)을 시료로 하여 Vero 세포에서 VSV(IND)에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 시험하여 얻은 결과는 Table I과 같다. EA는 농도의존적으로 VSV(IND)의 plaque 형성을 억제하였고, 숙주세포로 사용한 Vero 세포에 대한 독성은 3,792.57 mg/ml의 CC_{50} 를 나타내었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제시키는 EA의 농도인 50% effective concentration (EC_{50}), EC_{70} , 및 EC_{90} 는 각각 104.02, 300.31 및 869.19 μ g/ml을 나타내었다. EC_{50} 와 CC_{50} 로부터 계산한 selectivity index (SI; CC_{50}/EC_{50})는 36.46으로써 VSV(IND)에 대해 우수한 항바이러스효과를 보였다. 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma의 VSV(IND)에 대한 항바이러스효과는 IFN alpha의 EC_{50} 가 19.74 IU/ml로서 61.94 IU/ml를 나타낸 IFN gamma보다 더 우수한 것으로 나타났다.

병용효과 - EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 Vero 세포에서 VSV(IND)의 항바이러스효과는 각각 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 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 parameter는 Table II에 나타내었다. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma를 단독처리시와 병용처리시에 m(slope)

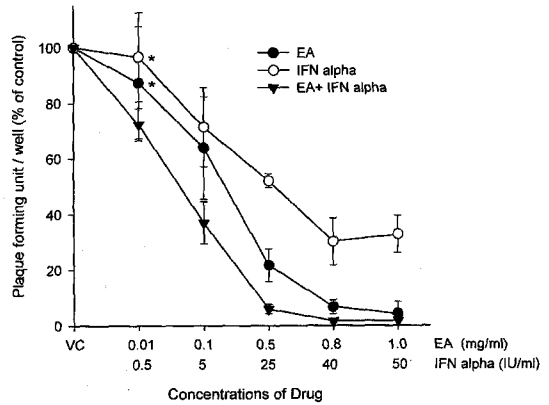


Fig. 1. Inhibitory effects of plaque formation of VSV (IND) in Vero cells by EA, IFN alpha and their combination at a fixed ratio of 1:50. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean \pm S.D. of quadruplicate determinations. *Not significantly different from VC; $p > 0.05$ (Student's t-test).

value가 서로 유사한 값을 보였으므로 이들은 상호 배타적인 약물 (mutually exclusive drug)임을 알 수 있었다. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 f(a)에 따른 CI value는 Fig. 3과 같다. EA와 IFN alpha와의 병용시 CI value는 f(a)가 0.50에서 0.90 사이인 유효농도 범위내에서 0.38~0.45의 값을 나타내어 상승효과를 보였고, IFN gamma와의 병용시에도 0.43~0.52를 나타내어 상승효과를 나타내었다. 즉 단독처리시 IFN alpha와 IFN gamma의 EC_{50} 는 각각 19.74, 61.94 IU/ml이었고,

Table I. Antiviral effects of EA^a, IFN alpha and IFN gamma on VSV(IND)^b by plaque reduction assay

Antiviral substances	CC_{50} ^c	EC ^d			SI ^e
		EC_{50}	EC_{70}	EC_{90}	
EA (μ g/ml)	3,792.57	104.02	300.31	869.19	36.46
IFN alpha (IU/ml)		19.74	51.73	239.92	
IFN gamma (IU/ml)		61.94	183.64	1,035.43	

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

^bVesicular stomatitis virus (Indiana serotype)

^c50% cytotoxic concentration (CC_{50}) 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%.

^eSelectivity index (SI) = CC_{50}/EC_{50}

The values represent the means of the quadruplicate experiments.

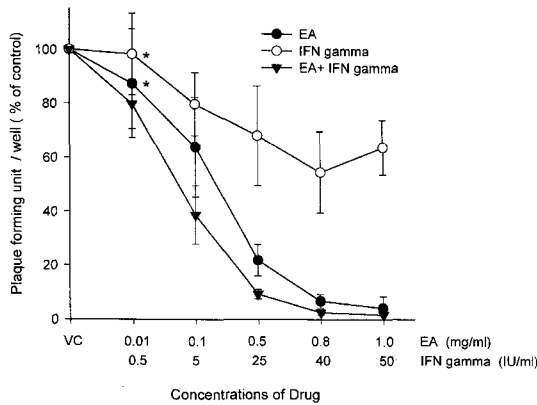


Fig. 2. Inhibitory effects of plaque formation of VSV (IND) in Vero cells by EA, IFN gamma and their combination at a fixed ratio of 1:50. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean \pm S.D. of quadruplicate determinations. *Not significantly different from VC; $p > 0.05$ (Student's *t*-test).

EA와의 병용시 EC_{50} 는 1.65, 2.15 IU/ml로 낮아졌으며, 병용시 모든 유효농도 범위내에서 매우 우수한 상승효과를 나타내었다.

잔나비걸상 (*Elfvigia applanata*)의 수용성물질 (EA)의 Vero 세포에서 VSV(IND)에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 측정 한 결과, EA는 농도의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며, EC_{50} 는 104.02 μ g/ml, SI가 36.46으로써 우수

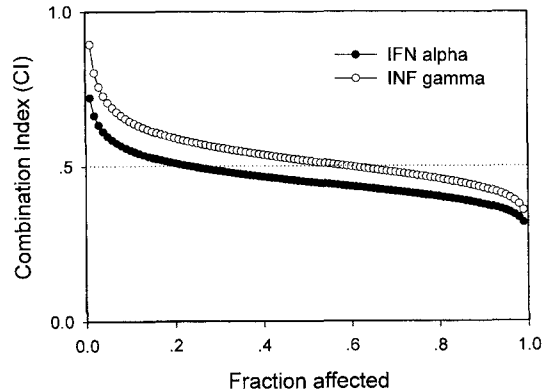


Fig. 3. CI values for combinations of EA with IFN alpha or IFN gamma on VSV (IND) corresponding to fraction affected ranging from 0.00 to 1.00. CI values were determined under mutually exclusive assumptions.

한 항바이러스효과를 보였다. 이는 EA가 바이러스의 증식을 억제하는 물질임을 보여주는 결과로써, EA에는 항암물질,^{2,15)} 면역조절물질^{2,3)} 등 여러 생리활성물질을 포함하고 있는 것으로 보고된 바, 다당체는 sarcoma 180에 대한 항암효과를 나타내고 단백질성 항원에 대한 지연형 과민반응을 촉진하며, 핵산은 IFN양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 증식을 억제하는 것으로 확인되었다.⁵⁾ 따라서 이러한 다당체를 비롯한 핵산, 뉴클레오사이드 유사물질이 바이러스의 증식을 억제하는 것으로 사료된다. 또한 Shannon 등¹⁶⁾에 의하면 EA는 바이러스가 숙주세포

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

Antivira substances	Parameters ^c			CI at f(a) of: ^d		
	<i>m</i>	EC_{50}	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
EA (μ g/ml)	1.07	89.70	0.93			
IFN alpha (IU/ml)	0.88	19.74	0.98			
IFN gamma (IU/ml)	0.78	61.94	0.94			
EA/IFN alpha (1: 50)	1.13	32.90/1.65	0.95	0.45	0.42	0.38
EA/IFN gamma (1: 50)	1.16	43.01/2.15	0.96	0.52	0.48	0.43

^a Water soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvigia applanata*

^b Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype)

^c *m* is the slope, EC_{50} is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

^d $CI < 1$, synergism; $CI = 1$, additive effect; $CI > 1$, antagonism. *f*(*a*) is a component of the median-effect equation referring the fraction of the system affected (e.g., 0.5 means the CI at a 50% reduction of activity). CI values were determined under mutually exclusive assumptions.

The values represent the means of the quadruplicate experiments.

에 흡착하는 과정을 억제함으로써 항바이러스활성을 나타내는 것으로 생각된다.

단백질성 항바이러스제인 IFN은 세포표면에 존재하는 특정 수용체와 결합함으로써 세포로부터 항바이러스성 물질의 분비를 유도하여 항바이러스활성을 나타내며¹⁷⁾ VSV에도 감수성을 나타낸다.¹⁸⁾ 그러나 장기간의 IFN 투여는 간독성, 과내성 등의 각종 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 IFN의 치료요법의 효능을 높이고 독성 및 부작용을 감소시키고자 VSV(IND)에 대하여 EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험을 실시하여 f(a)가 0.50, 0.70, 0.90인 모든 유효농도 범위에서 0.38~0.52의 CI value를 나타내어 강력한 상승효과를 나타내었다. 따라서 EA는 그 작용기전의 구명과정제에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이나 급성독성시험에서 투여가능한 최대용량을 투여하였을 때 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변현상을 보이지 않았으므로⁶⁾ 안전성 있는 물질로서, IFN의 투여에 따른 부작용을 감약시켜 줄 뿐만 아니라 IFN의 치료효과를 높여 줄 수 있는 새로운 항바이러스제 및 병용투여제로 개발될 수 있음을 시사한다.

결 론

잔나비겉상 (*Elfvigia applanata*) 자실체의 수용성물질(EA)의 vesicular stomatitis virus [Indiana serotype, VSV(IND)]에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 실험한 결과 EA는 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였고 EC₅₀는 104.02 µg/ml, SI는 36.46으로써 우수한 항바이러스효과를 나타내었다. 또한 EA는 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험 결과 f(a)가 0.50에서 0.90인 유효농도범위에서 IFN alpha는 combination index(CI)가 0.38~0.45를, IFN gamma는 0.43~0.52를 나타내었으므로 모두 상승효과를 얻었다.

인용문헌

- Park, W. H. (1991) Colored fungi of Korea, 374. Kyohak Publishing Co., Seoul.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. (1983) Isolation and characterization of antitumor active β-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* 115(1): 273-280.
- 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.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S. (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* 28(1): 193-197.
- Kandefer-Szerszen, 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.
- Nichol, S. T. (1994) Vesicular stomatitis viruses. In Webster, R. G and Granoff A. (eds.), Encyclopedia of virology III, 1547-1555. Academic Press. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo and Toronto.
- Coen, D. M. (1986) General aspects of virus resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(Suppl. B): 1-10.
- Schinazi, R. F. (1991) Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential. In Chou, T. C and Rideout, D. C. (eds.), Molecular mechanism of chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism, 110-181. 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: 4827-4833.
- Langford, M. P and Weight, D. A. (1981) Virus plaque-reduction assay for Interferon; Microplaque and regular microplaque reduction assay. In Pegstka, S. (ed.), Method in enzymology 78: 339-346. Academic Press, New York.

12. Hondo, R., Shibuta, H. and Matsumoto, M. (1976) An improved plaque-assay for varicella virus. *Arch. Virol.* 51: 355-359.
13. Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Locardini, 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.
14. Chou, T. C. and Talalay, P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships; The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55.
15. Mizuno, T., Hayashi, K., Iwasaki, Y., Shitano, A., Arakawa, M., Shinkai, K., Shimizu, M. and Tanaka, M. (1981) Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. IV. Fractionation, structural investigation and antitumor activity of heterogalactans isolated from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* and *Fomitopsis pinicola*. *Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ.* 31: 65-82.
16. Shannon, W. M. (1984) Mechanism of action and pharmacology: chemical agents. In Glasso, G. J., Merigan, T. C. and Buchanon, R. A. (eds.), *Antiviral agents and viral diseases of man*, 55-121. Raven Press, New York.
17. 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.
18. Belkowski, L. S. and Sen, G. C. (1987) Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J. Virol.* 61(3): 653-660.

(1999년 4월 27일 접수)