약학회지 제 43 권 제 4 호 464~468(1999)
Yakhak Hoeji Vol. 43, No. 4

Elfvingia applanata 수용성 물질의 항엔세파로미오카디티스 바이러스작용과 인터페론과의 병용효과

김준희 · 어성국 · 김영소 · 한성순#
충북대학교 약학대학
(Received May 17, 1999)

Anti-encephalomyocarditis Virus Activity of Water Soluble Substance from *Elfvingia applanata* Alone and in Combinations with Interferons

Jun-Hee Kim, Seong-Kug Eo, Young-So Kim 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 isolated from the carpophores of *Elfvingia applanata* (Pers.) Karst. Anti-encephalomyocarditis (EMC) virus activity of EA was examined in Vero cells by plaque reduction assay *in vitro*. And the combined antiviral effects of EA with interferon (IFN) alpha and gamma were examined on the multiplication of EMC virus. EA exhibited a concentration-dependent reduction in the plaque formation of EMC virus with 50% effective concentration (EC_{50}) of 2.12 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 potent synergism with CI values of 0.40~0.60 for 50%, 70% and 90% effective levels, but that with IFN gamma showed antagonism with CI values of 2.16~2.83.

Keywords □ Combination index (CI), *Elfvingia applanata*, plaque reduction assay, EMC virus.

Encephalomyocarditis(EMC) virus는 picornavirus 과에 속하는 바이러스로 주로 돼지에 감염되어 급성심근염을 유발하고 생식능력을 상실하게 하며 최근 사람에게 감염된 예가 보고되고 있으며 바이러스의 전파를 방지하기 위한 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.[1]

EMC virus에 대한 항바이러스제의 연구로는 Guillemard 등[2]이 trehalose 6,6'-dimycolate(TDM)가 macrophage를 활성화시켜 예방효과를 갖는다고 보고하였고, Galabov와 Dmitrieva[3]는 N-phenyl-N'-3-hydroxyphenylthiourea(PTU-23)가 바이러스 RNA 합성을 선택적으로 저해하여 바이러스 증식을 저해한다고 보고하였으며, Hunter 등[4]은 불활성화백신이 동물실험에서 우수한 예방효과를 나타내었다고 보고한 바 있다.

잔나비걸상 *Elfvingia applanata*(Pers.) Karst은 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로, 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 분포되어 있으며 항암목적의 민간요법에 사용되어 왔다. 약리작용에 관한 연구로는 주로 다당체의 항암효과,[5] 면역조절효과와 고미성분[6]에 대한 보고가 있었고, 항바이러스작용에 대한 연구는 핵산성분이 interferon(IFN)양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 plaque을 감소시켰다는 보고가 있다.[7] 또한 김 등[8]은 잔나비걸상 열수추출물의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과, 투여가능한 최대용량을 투여시 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변이 나타나지 않았음을 보고한 바 있다.

현재 사용중인 항바이러스제들은 숙주세포에 독성을 나타내거나, 사용 중에 내성균주의 출현이 빈번하게 나

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0431-268-2817 (팩스) 0431-268-2732

타나고 있으므로 새로운 항바이러스제의 개발과 더불어 작용기전이 다른 항바이러스제와의 병용투여에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. EMC virus의 병용효과에 대한 연구로는 Munoz 등[9]이 levamisole을 비롯한 4종의 물질과 IFN과의 상승효과를, Chany와 Cerutti[10]는 isoprinosine과 IFN과의 상승효과를 보고하였다.

이상의 연구보고를 종합하여, 안전성이 확인된 잔나비걸상 자실체의 수용성물질의 EMC virus에 대한 항바이러스효과를 측정하고, 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험을 실시하여 그 효과를 평가하였다.

실험방법

재료 및 시료 – 잔나비걸상 *Elfvingia applanata*의 자실체를 청주시내에서 구입하여 일정시간 음건, 세절한 자실체 800 g을 증류수 3.5 *l*로 90~100°C의 수욕상에서 8시간 추출한 후, 온시 여과, 농축, 동결건조하여 얻은 암갈색의 분말성 물질(EA)을 시료로 사용하였다.

세포 및 바이러스 – 숙주세포는 Vero 세포(Kidney, African Green Monkey, *Cerocopithecus aethiops*) ATCC CCL 81을, 바이러스로는 Encephalomyocarditis(EMC) virus ATCC VR-129B를 사용하였다.

세포독성시험 – 세포독성은 Vero 세포(3.5×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO_2, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 최고농도 20 mg/*ml*의 EA를 6 단계로 배수희석하여 100 μ*l*씩 분주하고 48시간 배양하여 MTT reduction assay[11]에 따라 시험하였다. EIA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 50% cytotoxic concentration (CC_{50})을 구하였다.

항바이러스시험 – EA의 항바이러스효과는 plaque reduction assay[12]에 따라 시험하였다. 세포부유액(1×10^6 cells/well)을 6 well plate에 분주하고 5% CO_2, 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 및 3.0 mg/*ml*의 EA와 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 배양하였다. IFN은 Tachedjian 등[14]의 방법에 따라 세포단층을 얻은 후 50, 100, 150, 200, 300 IU/*ml*로 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(EC_{50}), EC_{70} 및 EC_{90}를 구하였다.

병용시험 – 병용시험은 Tachedjian 등[13]의 방법으로 실시하였다. Vero 세포(1×10^6 cells/well)를 6 well plate에 분주하고 5% CO_2, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후 50, 100, 150, 200, 300 IU/*ml*의 IFN alpha와 IFN gamma를 처리하고 다시 1시간 배양한 후 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종한 다음 바이러스가 세포에 흡착되도록 1시간 더 배양하였다. EA는 0.5~3.0 mg/*ml*의 농도범위내에서 EA와 IFN을 1 : 100의 농도비율로 조제하여 5% CO_2, 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[14]의 multiple drug effect analysis에 따라 분석하였다. 결과는 대조군과 비교하여 증식의 억제가 일어나는 정도인 affected fraction(f(a))에 따라 combination index(CI)로 상승, 상가 및 길항효과로 판정하였다.

통계처리 – 모든 자료는 student's t-test로 유의성 검정을 수행하였으며 $p<0.01$수준에서 판정하였다.

결과 및 고찰

항바이러스효과 – 잔나비걸상 *Elfvingia applanata*의 수용성물질 EA를 시료로 하여 Vero 세포에서 EMC virus에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 평가하여 얻은 결과는 Table I과 같다. EA는 농도의존적으로 EMC virus의 plaque 형성을 억제하였고, 숙주세포로 사용한 Vero 세포에 대한 독성은 3.79 mg/*ml*의 CC_{50}를 나타내었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제시키는 EA의 농도인 50% effective

Table I – Antiviral effects of EA[a], IFN alpha and IFN gamma on EMC virus[b] by plaque reduction assay

Antiviral substances	CC_{50}[c]	EC[d]		
		EC_{50}	EC_{70}	EC_{90}
EA (mg/ml)	3.79	2.12	2.97	3.82
IFN alpha (IU/ml)		224.27	406.09	587.91
IFN gamma (IU/ml)		207.69	361.54	515.38

[a] Water soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvingia applanata*.
[b] Encephalomyocarditis (EMC) virus.
[c] 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.
[d] Effective concentration (EC) is the concentration of drug required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70% and 90%.

concentration(EC_{50}), EC_{70} 및 EC_{90}는 각각 2.12, 2.97 및 3.82 mg/ml를 나타내었다. 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma의 EMC virus에 대한 항바이러스효과는 IFN alpha의 EC_{50}가 224.27 IU/ml를, IFN gamma는 207.69 IU/ml를 나타내었다.

담자균류로부터 분리된 항바이러스성 물질의 작용양식은 바이러스가 숙주세포에 흡착하는 과정을 억제하거나 단백질합성을 차단함으로써 항바이러스활성을 나타낸다고 보고된 바가 있으며, *Lentinus edodes* 자실체의 추출물의 경우 바이러스의 흡착을 억제하고 면역반응을 증강시킨다고 보고되었다.[15,16] 또한 *Lentinus edodes* KSLE007의 배양추출물인 KS-2는 IFN 유도작용에 의하여 항바이러스활성을 나타낸다는 보고[17]를 기초로 하여 EA의 작용기전의 구명과 정제에 대하여서는 연구가 더 진행되어야 할 것이며, EA의 항바이러스성물질은 핵산 및 다당체 또는 단백다당체에 기인하지 않는가 사료된다.

병용효과 – EA와 병용시험에 사용한 항바이러스제인 IFN은 바이러스 감염에 대한 반응으로 세포가 분비하는 항바이러스효과를 가지고 있는 단백질로 다양한 종류의 바이러스에 대해 활성을 갖고 있으며 EMC virus에 대해서도 항바이러스활성을 나타낸다.[18] EMC virus에 대한 IFN의 작용기전은 Player와 Torrence는[19] IFN이 RNA degradation pathway인 2-5A system을 활성화하기 때문이라고 하였으며 제한된 효능과 용량제한적인 독성을 나타낸다.[20]

EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 Vero 세포에서 EMC virus의 항바이러스효과는 각각 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1, 2에 나타난 결과를 median-effect equation으로 바꾸어 log[concent-ration]에 대해 $\log[f(a)^{-1}-1]^{-1}$의 값을 계산한 결과 median-effect plot로부터 결정된 parameter는 Table II에 나타내었다. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma의 병용시험시 median-effect plot이 서로 평행하지 않으므로 병용효과의 베타성이 성립될 수 없었다.

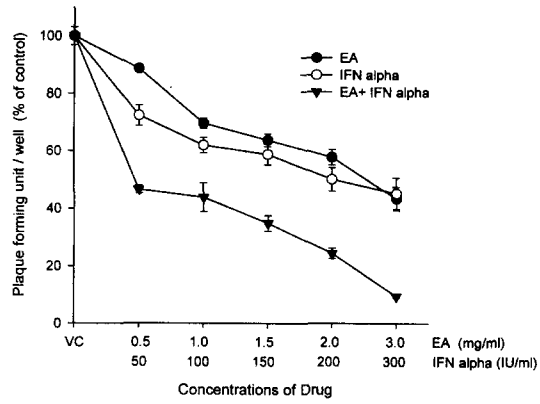

Fig. 1 – Inhibitory effect of plaque formation of EMC virus in Vero cells by EA, IFN alpha and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate determinations. All values are significantly different from VC ($p<0.01$).

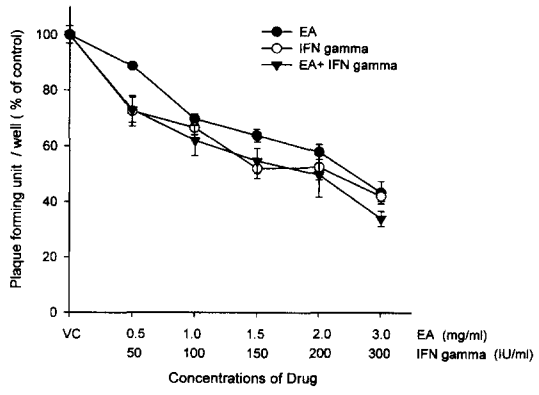

Fig. 2 – Inhibitory effect of plaque formation of EMC virus in Vero cells by EA, IFN gamma and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate determinations. All values are significantly different from VC ($p<0.01$).

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

Table II – Median effective concentrations and CI values of combinations of EA[a] with IFN alpha and IFN gamma on the plaque formation of EMC virus[b] in Vero cells

Antiviral substances	Parameters[c]			CI at f(a) of :[d]		
	m	EC_{50}	*r*	0.50	0.70	0.90
EA (μg/ml)	1.24	2.38	0.97			
IFN alpha (IU/ml)	0.65	222.79	0.98			
IFN gamma (IU/ml)	0.75	198.88	0.94			
EA/IFN alpha (1:100)	1.11	0.61/61.45	0.79	0.60	0.48	0.40
EA/IFN gamma (1:100)	0.88	1.69/169.24	0.96	2.16	2.34	2.83

[a] Water soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvingia applanata*

[b] Encephalomyocarditis (EMC) virus

[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 to the fraction of the system affected. CI values were determined under mutually nonexclusive assumptions.

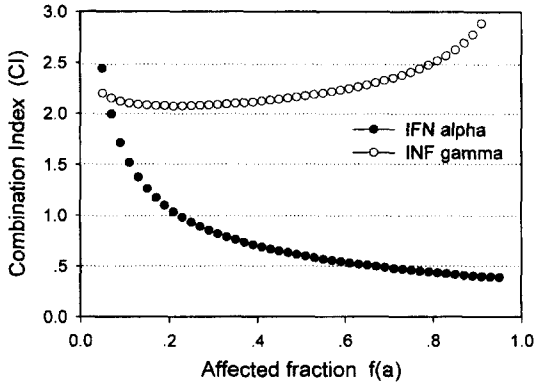

Fig. 3 – CI values for EA in combinations with IFN alpha and IFN gamma for affected fraction f(a) values ranging from 0.05~0.95. CI values were calculated by multiple drug effect analysis as assumption of mutually nonexclusive case.

사이의 유효농도 범위내에서 0.40~0.60의 값을 나타내었으 므로 상승효과를 보였으나 IFN gamma와의 병용시 에는 2.16~2.83을 나타내었으므로 길항효과를 나타내었다.

EA의 항바이러스시험 결과를 종합하여 보면 EA는 항바이러스성물질로서 작용기전의 구명과 정제에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이며 급성독성시험에서 안전성이 확인된 물질로서, 새로운 항바이러스제 및 IFN과의 병용투여제로 개발될 수 있음을 시사한다.

결 론

1. 잔나비걸상 *Elfvingia applananta* 자실체의 수용성물질 EA의 encephalomyocarditis(EMC) virus에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 실험한 결과, EA는 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였고, EC_{50}는 2.12 mg/ml를 나타내었다.

2. EA와 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험 결과 f(a)가 0.50에서 0.90인 유효농도범위에서 IFN alpha는 combination index(CI)가 0.40~0.60을, IFN gamma는 2.16~2.83을 나타내었으므로 IFN alpha와의 병용시 우수한 상승효과를 얻었다.

문 헌

1) Scraba, D. G.: Cardioviruses. In Encyclopedia of Virology I. Webster, R. G. and Granoff A. (eds), Academic Press Ltd., London, p. 205 (1994).

2) Guillemard, E., Geniteau-Legendre, M., Mabboux, B., Poilane, I., Kergot, R., Lemaire, G., Petit, J. F., Labarre, C. and Quero, A. M.: Antiviral action of trehalose dimycolate against EMC virus : role of macrophages and interferon alpha/beta. *Antiviral Res.* **22**(2-3), 201 (1993).

3) Galabov, A. S. and Dmitrieva, T. M.: Inhibitory effect of N-phenyl-N'-3-hydroxyphenylthiourea (PTU-23) on the reproduction of encephalomyocarditis virus in Krebs-II cells. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg [A].* **254**(3), 291 (1983).

4) Hunter, P., Swanepoel, S. P., Esterhuysen, J. J., Raath, J. P., Bengis, R. G. and van der Lugt, J. J.: The efficacy of an experimental oil-adjuvanted encephalomyocarditis vaccine in elephants, mice and pigs. *Vaccine* **16**(1), 55 (1998).

5) Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka., M., Shinkai. K. and Arakawa, M.: Isolation and characterization of antitumor active β-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum. Carbohydr. Res.* **115**(1), 273 (1983).

6) Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S.: Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum. Phytochemistry* **28**(1), 193 (1988).

7) Kandefer, S. M., Kawecki, Z. and Guz, M.: Fungal

nucleic acids as interferon inducers. *Acta. Microbiol. Pol.* **28**(4), 277 (1979).

8) Kim, Y. S., Kang, J. K., Lee, C. K and Han, S. S.: Effect of *Elfvingia applanata* extract on the acute toxicity in mice. *Yakhak Hoeji* **38**(6), 756 (1994).

9) Munoz, A., Garcia, R. A. and Perez-Aranda, A.: Potentiation by levamisole, methisoprinol, and adenine or adenosine of the inhibitory activity of human interferon against encephalomyocarditis virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**(1), 192 (1986).

10) Chany, C. and Cerutti, I.: Enhancement of antiviral protection against encephalomyocarditis virus by a combination of isoprinosine and interferon. *Arch. Virol.* **55**(3), 225 (1977).

11) 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.: 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 (1988) .

12) Langford, M. P. and Weight, D. A.: Virus plaque-reduction assay for Interferon; Microplaque and regular macroplaque reduction assay: In *Method in Enzymology.* Pegstka, S. (ed), Academic Press, New York, **78**, p. 339 (1981).

13) Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Locarnini, S. and Birch, C.: Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type I *in vitro* by interferon alpha and coumermycin A1. *Antiviral Chem. Chemother.* **3**(3), 183 (1992).

14) Chou, T. C. and Talalay, P.: Quantitative analysis of dose-effect relationships; The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27 (1984) .

15) Maeda, H.: Abstracts of Paper, Symposium on plant virus inhibitors of the Japan plant protection association, Tokyo, p. 9 (1981).

16) Chihara, G., Maeda, H., Hamura, T., Sasaki, T. and Fukuoka, F.: Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from. *Nature* **222**, 687 (1969).

17) Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Isida, N.: Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes. J. Antibiotics* **32**, 1079 (1978).

18) Sim, I. S. and Cerruti, R. L.: Recombinant interferons alpha and gamma: comparative antiviral activity and synergistic interaction in encephalomyocarditis virus infection of mice. *Antiviral Res.* **8**(4), 209 (1987).

19) Player, M. R. and Torrence, P. F.: The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.* **78**(2), 55 (1998).

20) Pouillart, P. R., Audibert, F. M., Chedid, L. A., Lefrancier, P. L. and Bahr, G. M.: Enhancement by muramyl peptides of the protective response of interferon-alpha/beta against encephalomyocarditis virus infection. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**(3), 183 (1996).