

## 잔나비겉상버섯 수용성물질의 항인플루엔자바이러스 작용과 인터페론과의 병용효과

정선식 · 어성국 · 김영소 · 한성순\*

충북대학교 약학대학  
(Received May 27, 1999)

### Anti-influenza Virus Activity of Water Soluble Substance from *Elfvngia applanata* Alone and in Combinations with Interferons

Sun-Sik Jeong, Seong-kug Eo, Young-So Kim and Seong-Sun Han\*  
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** — EA, the water soluble substance, was prepared from the carpophores of *Elfvngia applanata* (Pers.) Karst. Anti-influenza A virus (anti -Flu A) 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 Flu A. EA showed a concentration-dependent reduction in the plaque formation of Flu A with 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) of 1.50 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 on Flu A showed more potent synergism with CI values of 0.50~0.52 of 50%, 70%, 90% effective levels than that with IFN gamma with CI values of 0.82~0.99.

**Key words** □ Combination index (CI), *Elfvngia applanata*, influenza A virus (Flu A), plaque reduction assay.

Influenza virus(Flu)는 Orthomyxovirus과에 속하는 바이러스로 ribonucleoprotein(RNP)항원에 의해 A, B, C형으로 분류되며, 유행성질환은 A, B형에 의해 발생한다. 보통 1~2일의 잠복기 이후에 발열하여 오한, 두통, 근육통을 수반하며 예후는 대개 양호하나 유아, 노인, 임부와 기타 기초질환이 있는 사람에게는 주의할 요하는 바이러스이다.<sup>1)</sup>

Flu에 대한 예방과 치료법으로 백신과 항바이러스제가 있다. 백신은 A, B형 Flu의 예방에 효과적이기는 하나 예방효과가 불완전하고, 새로운 Flu에 대해서는 무효하며 새로운 백신을 개발하는데 상당한 시간이 소요된다는 단점이 있다. 또한 amantadine이나 rimantadine과 같은 항인플루엔자바이러스제는 Flu B에는

감수성이 없고 내성균주의 출현과 부작용 때문에 제한적으로 사용되고 있다.<sup>2)</sup> 따라서 부작용이 적으며 새로이 출현한 Flu에도 감수성이 있는 항바이러스제의 개발이 요구되고 있고 실정이다.

최근 항인플루엔자바이러스 활성을 갖는 물질을 천연물에서 검색하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있는데 Ahmad 등<sup>3)</sup>은 *Opuntia streptacantha*의 추출물이, Hayashi 등<sup>4)</sup>은 *Houttuynia cordata*의 추출물이, Turan 등<sup>5)</sup>은 *Sanicula europaea*의 추출물이, Zakay-Rones 등<sup>6)</sup>은 *Sambucus nigra*의 추출물이 Flu에 대해 우수한 항바이러스활성을 갖는다고 보고하였다.

본 연구에서 사용한 잔나비겉상 *Elfvngia applanata*은 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로, 우리나라를 비롯하여 세계적으로 분포되어 있으며 항암목적의 민간요법에 사용되어 왔다.<sup>7)</sup> 약리작용에 관한 연구로는 주로 다당체의 항암효과,<sup>8)</sup> 면역조절효

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0431-261-2817 (팩스) 0431-268-2732

과와 고미성분<sup>9)</sup>에 대한 보고가 있었고, 항바이러스작용에 대한 연구는 잔나비겉상에서 분리한 핵산이 interferon(IFN)양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 plaque를 감소시켰음이 보고된 바 있다.<sup>10)</sup> 한편 김 등<sup>11)</sup>은 잔나비겉상 열수추출물의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과, 투여가능한 최대용량에서 치사어나 혈액 생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았음을 보고한 바 있다.

현재 사용중인 항바이러스제들은 숙주세포에 독성을 나타내거나, 사용 중에 내성균주의 출현이 빈번하게 일어나고 있다. 따라서 새로운 항바이러스제의 개발과 더불어 작용기전이 다른 항바이러스제와의 병용투여법에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>12)</sup> Flu A에 대한 항바이러스제의 병용효과에 대한 연구로는 IFN alpha와 rimantadine hydrochloride 및 ribavirin과의 상승효과,<sup>13)</sup> *Geranium sanguineum*의 polyphenolic complex와 rimantadine과의 상승효과<sup>14)</sup>등이 보고되어 있다.

이상의 연구보고를 토대로, 안전성이 확인된 잔나비겉상 자실체의 수용성 물질의 Flu A에 대한 항바이러스 효과를 측정하고, 단백질성 항바이러스제인 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험을 실시하여 그 효과를 평가하였다.

## 재료 및 방법

**재료 및 시약** - 잔나비겉상 *Elfvigia applanata*의 자실체를 청주시내에서 구입하였고 음건, 세정한 자실체 800 g을 증류수 3.5 l로 90~100°C의 수욕상에서 8시간 추출한 후, 온시 여과, 농축, 동결건조하여 얻은 암갈색의 분말성 물질(EA)을 시료로 사용하였다. IFN은 recombinant human alpha interferon(IFN alpha; Boehringer Mannheim Co.)와 recombinant human gamma interferon(IFN gamma; Genzyme)를 모두 미국국립보건원에서 공급되는 국제표준품으로 보장하여 사용하였다.

**세포 및 바이러스** - 숙주세포는 Vero 세포(African green monkey kidney cell, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL81을, 바이러스로는 influenza A(A/Equine/2/Miami/1/63(H3N8) strain) ATCC VR-317을 사용하였다.

**세포독성시험** - 세포독성은 Vero 세포( $3.5 \times 10^4$

cells/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 최고 농도 20 mg/ml의 EA를 6단계로 배수희석하여 100 μl씩 분주하고 48시간 배양하여 MTT reduction assay<sup>15)</sup>에 따라 시험하였다. EIA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>)을 구하였다.

**항바이러스시험** - EA의 항바이러스효과는 plaque reduction assay<sup>16)</sup>에 따라 시험하였다. 세포부유액( $1 \times 10^6$  cells/well)을 6 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 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/ml의 EA와 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 배양하였다. IFN은 Tachedjian 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 세포단층을 얻은 후 5, 25, 50, 75, 100 IU/ml로 조제된 IFN alpha와 10, 50, 100, 150, 200 IU/ml로 조제된 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<sub>50</sub>), EC<sub>70</sub> 및 EC<sub>90</sub>를 구하였다.

**병용시험** - 병용시험은 Tachedjian 등<sup>17)</sup>의 방법으로 실시하였다. Vero 세포 ( $1 \times 10^6$  cells/well)를 6 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후 5, 25, 50, 75, 100 IU/ml로 조제된 IFN alpha와 10, 50, 100, 150, 200 IU/ml로 조제된 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 농도범위 내에서 EA와 IFN alpha는 1:50, EA와 IFN gamma는 1:100의 농도비율이 되도록 조제하여 well에 가하고, 5% CO<sub>2</sub>, 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<sup>18)</sup>의 multiple drug effect analysis에 따라 분석하였다. 결과는 대조군과 비교하여 증식의 억제율이 일어나는 정도인 affected fraction(f(a))에 따라 combination index(CI)로 상승, 상가 및 길항효과로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

**항바이러스효과** - 잔나비겉상 *Elfvigia applanata*의 수용성 물질 EA를 시료로 하여 Vero 세포에서 Flu A에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 시험하여 얻은 결과는 Table I과 같다. EA는 농도의존적으로 Flu A의 plaque 형성을 억제하였고, 숙주세포로 사용한 Vero 세포에 대한 독성은 3.79 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 1.50, 2.10, 2.70 mg/ml을 나타내었다. IFN alpha 및 IFN gamma의 Flu A에 대한 항바이러스효과는 IFN alpha의  $EC_{50}$ 가 206.65 IU/ml, IFN gamma는 304.28 IU/ml를 나타내었다.

**병용효과** - EA와의 병용시험에서 사용한 항바이러스제인 IFN은 바이러스 감염에 대한 반응으로 세포가 분비하는 항바이러스성 단백질로서 다양한 종류의 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 나타낸다. Recombinant human alpha interferon은 Flu의 초기 전사과정이나 세포질에서의 바이러스 증식과정을 저해하여 Flu A, B에 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>13,19)</sup>

IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시 Vero 세포에서 Flu A에 대한 항바이러스효과는 각각 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1, 2에 나타난 결과를 median-effect

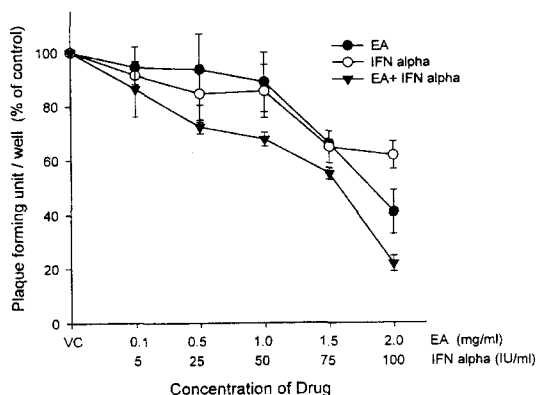
**Table I** - Anti-influenza A virus activities of EA<sup>a</sup>, IFN alpha and IFN gamma by plaque reduction assay

Antiviral substances	$CC_{50}$ <sup>b</sup>	$EC$ <sup>c</sup>		
		$EC_{50}$	$EC_{70}$	$EC_{90}$
EA (mg/ml)	3.79	1.50	2.10	2.70
IFN alpha (IU/ml)		206.65	616.90	1841.43
IFN gamma (IU/ml)		304.28	1247.62	5118.41

<sup>a</sup> Water soluble substance isolated from the carophores of *Elfvigia applanata*

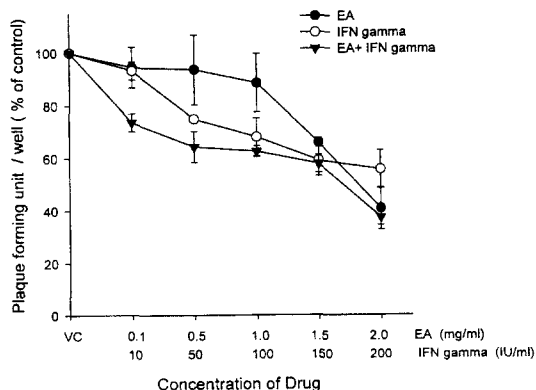
<sup>b</sup> 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

<sup>c</sup> Effective concentration (EC) is the concentration of drug required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%.



**Fig. 1** - Inhibitory effect of plaque formation of influenza A 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  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations.

equation으로 바꾸어  $\log[\text{concentration}]$ 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 gamma를 단독처리시와 병용처리시에 m(slope) value가 서로 유사한 값을 보였으므로 이들은 상호배타적 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 사이의 유효농도 범위내에서 0.50



**Fig. 2** - Inhibitory effect of plaque formation of influenza A 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  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations.

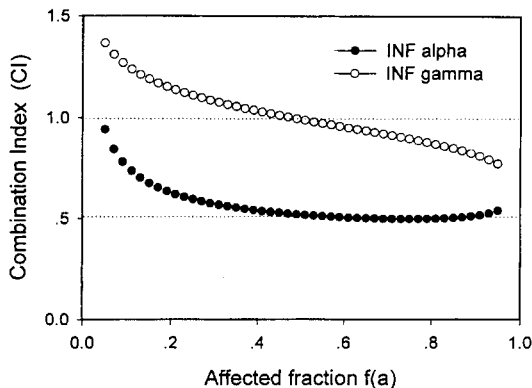
**Table II** – Median effective concentrations and CI values of combinations of EA<sup>a)</sup> with IFN alpha and IFN gamma on the plaque formation of influenza A virus in Vero cells

Antiviral substances	Parameters <sup>b)</sup>			CI at f(a) of <sup>c)</sup>		
	m	EC <sub>50</sub>	r	0.50	0.70	0.90
EA (mg/ml)	0.94	3.64	0.66			
IFN alpha (IU/ml)	0.60	339.84	0.76			
IFN gamma (IU/ml)	0.80	240.82	0.99			
EA/IFN alpha (1:50)	0.84	1.23/ 61.58	0.75	0.52	0.50	0.51
EA/IFN gamma (1:100)	0.93	1.44/144.00	0.93	0.99	0.92	0.82

<sup>a)</sup> Water soluble substance isolated from the carpophores of *Elfvigina applanata*

<sup>b)</sup> m is the slope, EC<sub>50</sub> is the median effective concentration, and r is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

<sup>c)</sup> 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 exclusive assumptions.



**Fig. 3** – CI values for combinations of EA with IFN alpha and IFN gamma on influenza A virus corresponding to affected fraction f(a) ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated by multiple drug effect analysis as assumption of mutually exclusive case.

~0.52의 값을 나타내었으므로 상승효과를 보였으며, IFN gamma와의 병용시에는 0.82~0.99를 나타내었으므로 상승 또는 상가작용을 나타내었다.

EA의 항바이러스시험 및 병용시험 결과를 종합하여 보면 EA는 안전성이 확인된 항바이러스성 물질로서, 정제와 작용기전의 구명에 관한 연구를 더욱 진행하여 IFN의 투여에 따른 부작용을 감약시키고, IFN의 치료효과를 높여 줄 수 있는 새로운 항바이러스제 및 병용투여제로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

1. 잔나비결상 *Elfvigina applanata* 자실체의 수용성 물질 EA의 Flu A에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 실험한 결과 EA는 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였고 EC<sub>50</sub>는 1.50 mg/ml를 나타내었다.

2. EA와 IFN alpha 및 IFN gamma와의 병용시험 결과 단독처리와 병용처리에 m(slope) value가 서로 유사한 값을 보였으므로 이들은 상호배타적 약물이며, f(a)가 0.50에서 0.90의 유효농도범위에서 IFN alpha는 combination index(CI)가 0.50~0.52을, IFN gamma는 0.82~0.99를 나타내었으므로 IFN alpha와의 병용시 더 우수한 상승효과를 얻었다.

## 문 헌

- Murphy, B. G and Webster, R. G. : Influenza viruses. In Virology. Field, B. N. (ed.), Raven Press, New York, p. 1179 (1985).
- Schilling, M., Povinelli, L., Krause, P., Gravenstein, M., Ambrozaitis, A., Jones, H. H., Drinka, P., Shult, P., Powers, D. and Gravenstein, S. : Efficacy of zanamivir for chemoprophylaxis of nursing home influenza outbreaks. *Vaccine*. **16**(18), 1771 (1998).
- Ahmad, A., Davies, J., Randall, S. and Skinner, G. R. : Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res.* **30**(2-3), 75 (1996).
- Hayashi, K., Kamiya, M. and Hayashi, T. : Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta. Med.* **61**(3), 237 (1995).
- Turan, K., Nagata, K. and Kuru, A. : Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. leaves extract on influenza-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**(1), 22 (1996).
- Zakay-Rones, Z., Varsano, N., Zlotnik, M., Manor, O., Regev, L., Schlesinger, M. and Mumcuoglu, M. : Inhibition of several strains of influenza virus *in vitro* and reduction of symptoms by an elderberry extract (*Sambucus nigra* L.) during an outbreak of influenza B virus Panama. *J. Altern. Complement med.* **1**(4), 361 (1995).
- Park, W. H. : Colored fungi of Korea, Kyohak

- Publishing Co., Seoul, p. 374 (1991).
- 8) Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M.: Isolation and characterization of antitumor active  $\beta$ -D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **115**(1), 273 (1983).
  - 9) Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S.: Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*. **28**(1), 193 (1988).
  - 10) Kandefer, S. M., Kawecki, Z. and Guz, M.: Fungal nucleic acids as interferon inducers. *Acta. Microbiol. Pol.* **28**(4), 277 (1979).
  - 11) Kim, Y. S., Kang, J. K., Lee, C. K. and Han, S. S.: Effect of *Elfvigia applanata* extract on the acute toxicity in mice. *Yakhak Hoeji* **38**(6), 756 (1994).
  - 12) Schinazi, R. F.: Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential. In Molecular mechanisms of chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism. Chou, T. C. and Rideout, D. C. (eds.), Academic Press, Orlando, FL., 110 (1991).
  - 13) Hayden, F. G., Schlepushkin, A. N. and Pushkar-skaya, N. L.: Combined interferon-alpha 2, rimantadine hydrochloride, and ribavirin inhibition of influenza virus replication *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(1), 53 (1984).
  - 14) Gegova, G., Manolova, N., Serkedzhieva, Iu., Maksimova, V., Uzunov, S., Dzeguze, D. and Indulen, M.: Combined effect of selected antiviral substances of natural and synthetic origin. II. Anti-influenza activity of a combination of a polyphenolic complex isolated from *Geranium sanguineum* L. and rimantadine *in vivo*. *Acta. Microbiol. Bulg.* **30**, 37 (1993).
  - 15) Scubiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paul, 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).
  - 16) Langford, M. P. and Weight, D. A.: Virus plaque-reduction assay for Interferon; Microplaque and regular macroplaque reduction assay. In Method in Enzymology. Sidney, P. (ed.), Academic Press, New York, **78**, p. 339 (1981).
  - 17) 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).
  - 18) 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).
  - 19) Ransohoff, R. M., Maroney, P. A., Nayak, D. P., Chambers, T. M. and Nilsen, T. W.: Effect of human alpha A interferon on influenza virus replication in MDBK cells. *J. Virol.* **56**(3), 1049 (1985).