

정향, 마황, 계피의 간염 B형 바이러스 증식 억제 효과

강석연 · 김태균 · 박민수 · 한형미 · 정기경 · 강주혜 · 문애리¹ · 김승희*
식품의약품안전청, ¹ 덕성여자대학교 약학대학

Inhibitory Effects of *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the Replication of HBV in HepG2 2.2.15 Cells

Seog Youn KANG, Tae Gyun KIM, Min Su PARK, Hyung Mee HAN, Ki Kyung JUNG, Ju Hye KANG, Aree MOON¹ and Seung Hee KIM*

Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Korea

¹College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received April 16, 1999; accepted June 29, 1999)

Abstract – This study was undertaken to test for anti-Hepatitis B virus (HBV) activity of the aqueous extracts prepared from *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica*, *Cinnamomum cassia*. Aqueous extracts were assayed for the inhibition of HBV replication by measurement of HBV DNA and surface antigen (HBsAg) levels in the extracellular medium of HepG2 2.2.15 cells. All extracts decreased the levels of extracellular HBV virion DNA at concentrations ranging from 128 to 256 µg/ml and inhibited the production of HBsAg dose-dependently. Our findings suggest that these three herbal medicinal plants may have potential to develop as specific anti-HBV drugs in the future.

Keywords □ Anti-hepatitis B virus (HBV) activity, HepG2 2.2.15, *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica*, *Cinnamomum cassia*.

만성적인 간염 B형 바이러스(hepatitis B virus: HBV)의 감염은 세계적으로 심각한 질환이다. 미국에서만 매년 20만명 정도가 감염되며 우리나라를 포함한 극동지역과 아프리카에서는 전 인구의 최소한 10%가 보균자이고 그 중 많은 숫자가 간암(Hepatocellular carcinoma, HCC)으로 진행된다(Tiollas 등, 1985). HBV에 감염된 어른의 경우 약 5~10%만이 간염으로 발전되거나 신생아의 경우 HBV에 감염된 상태에서는 90%가 발병된다(Chisari 등, 1989). HBV의 구조에 관하여는 많이 알려져 있지만 바이러스 감염에 의한 간세포 손상 및 malignant transformation의 병리학적 기전에 관하여는 그리 많이 알려져 있지 않다. 그 이유는 간염 B형 바이러스의 제한된 host range와 *in vitro*에서의 cell culture system이 발달되지 못해 실험적 접근이 어려웠기 때문이다(Chisari 등, 1987). 1990년대 초반 Korba 등은 HBV 유전자를 인간의 간암 세포주 HepG2에 도입(stable transfection)하여 HBV가 증식되는 HepG2 2.2.15 세포주를 개발하고, 이를 이용한 세포배양

항HBV 약효검색 시스템을 개발하여 보고한 바 있다(Korba와 Milman, 1991; Korba와 Gerin, 1992). HepG2 2.2.15 세포주는 짧은 시간에 많은 시료를 검색할 수 있어 유용하며(Jansen, 1993), 동일한 목적으로 일본에서 개발된 HB 611 세포주보다 배양이 용이하고 바이러스의 수율이 높아 세포배양판 시스템에 적용할 수 있다(Kruining, 1995).

생약재의 항HBV 효과에 대한 연구 보고는 *Phyllanthus* 속 식물인 진주초가 *in vivo*와 *in vitro*에서 강한 항HBV 효과가 있으며(Venkateswaren 등, 1987) 임상에서 유의한 항HBV 효과를 나타냈다고 보고되면서(Wang 등, 1995) 제품화를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 최근 105종의 한국산 생약재들을 대상으로 간염환자의 혈청에서 분리한 HBV DNA polymerase의 복제억제도와 표면항원의 결합능을 *in vitro*에서 검색한 결과, 15종의 생약재 추출물이 항HBV 효과가 있음이 보고되었다(Chung 등, 1995). 본 연구에서는 HepG2 2.2.15 배양세포를 사용한 약효검색 시스템을 이용하여 HBV DNA polymerase 활성 억제실험에서 효과를 보인 정향, 마황과 한방에서 간염치료

*To whom correspondence should be addressed.

목적으로 사용되고 있는 계피(Hsu 등, 1986)의 수침추출물의 HBV 증식 억제 효과를 측정하여 유의성 있는 항HBV 활성이 확인되어 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

생약재 구입 및 추출

실험에 사용된 정향, 마황, 계피는 서울, 경동시장 소재 명인당에서 구입하여 경희대학교 본초학교실에서 감정을 받은 뒤 식품의약품안전청 생약표본 저장고에 보관하여 사용하였으며 현재 증거표본 및 수침엑스(KFDABP-97-011~013)가 동장소에 저장되어 있다. 세절된 건조생약 1kg을 사용하여 100g씩 나누어 전자약탕기에 넣고 물 1L를 가하여 100°C에서 2~3시간동안 1회만 추출하여 각 추출액을 합한 후 감압농축 시킨 다음 동결건조시켜 건조분말로 만든 후 시험물질로 사용하였다. 각각의 수득율은 16.7%, 16.4%, 6.5%이었다. 생약재 수침엑스는 각각 51.2 mg/ml의 농도로 물에 20분간 녹이고 이를 15°C, 10,000×g에서 30분간 원심분리 한 후 가용성분인 상층액을 수용성 membrane filter에 여과멸균하여 시료로 사용하였다.

세포주 확보 및 배양

실험에 사용한 HepG2 2.2.15 세포주는 개발자인 미국의 Georgetown 대학 의과대학 Korba 교수로부터 분양받았다. 세포는 도착 즉시 해동하여 5 mM HEPES, 5% fetal bovine serum(FBS), 330 mg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4~5년의 계대를 거쳐 증식된 세포는 액체질소통에 보관하였으며, 이들을 해동하여 항HBV 효능 검색에 사용하였다.

HBV 유전자 탐침

"adr" 아형의 HBV 유전자가 클로닝된 pHBV315를 이화여자대학교 약학대학 김길현 교수로부터 분양받았으며 이 plasmid를 제한 효소 BamH I으로 절단하고 3.2 kb의 HBV 유전자를 Qiagen(Hilden, Germany)의 gel extraction kit를 사용하여 분리한 후 Southern blot 분석 실험에 탐침(probe)으로 사용하였다.

세포독성 측정

생약 수침엑스의 세포독성은 HepG2 2.2.15 세포에 시료를 세포배양액에 섞어 처치하여 24시간동안 배양한 후 시료의 세포독성에 의해 세포배양액으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 LDH cytotoxicity kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다(Shrivastava 등, 1992).

추출물의 처치

HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 시료들의 항HBV 효능 검색은 세포주를 공여한 Korba 박사의 방법(Korba와

Gerin, 1992)을 기본으로 변형하여 실시하였다.

HepG2 2.2.15 세포주를 증식시킨 후 농도를 2×10^5 cells/ml로 조정하여 24 well 세포배양판에 1 ml/well 씩 분주하였다. 이를 CO₂ 배양기에서 세포가 충분히 자랄 때까지 배양하고, 세포가 confluent한 상태가 된 다음 항HBV 효능 검색에 사용하였다. 생약재 추출물 시료를 4가지 농도로 희석하여 24 well 세포배양판에 20 µl/well 씩 분주한 후 37°C로 예열한 세포배양액(2% FBS)을 2 ml씩 첨가하여 각 시료가 100배씩 희석되어 최종 처치농도가 64, 128, 256, 512 µg/ml가 되도록 하여 처치하였다. 또한 양성 대조 약물인 dideoxycytidine(ddC, Sigma)은 최종농도가 10 µM이 되도록 처치하였다. 각 시료가 포함된 세포배양액 2 ml를 매일 교환하면서 세포에 8일간 처치하였다. 세포의 분주와 생약재 추출물 시료의 처치는 2배수(duplicate)로 3회 실시하였다.

Southern blot 분석

시료의 세포의 virion DNA의 방출 저해능을 검색하기 위한 Southern blot 분석은 김 등의 방법(Kim 등, 1998)에 따라, 세포에 시료를 처리한 날로부터 8일째가 되는 날에 세포배양액을 수거한 후, PEG 용액을 처리하여 virion을 침전시키고 Proteinase K가 첨가된 lysis 용액을 처리하여 세포의 HBV DNA를 분리하였다. 이를 전기영동한 후 HBV DNA를 HybondTM-N⁺ nylon membrane filter (Amersham, U.K.)로 옮기고 ECL directTM labeling and detection kit(Amersham)를 사용한 Southern blot 방법으로 HBV DNA를 검출하였다.

HBs 항원의 측정

세포에 시료를 처리한 후 8일째 세포배양액을 수거하여 radioimmunoassay kit를 이용하여 HBs 항원(Abbott, U.S.A.)의 양을 측정하였다. 수거된 세포배양액을 HBs 항체가 표지된 bead를 넣고 실온에서 20시간 반응시킨 후 bead를 증류수로 세척하고 [¹²⁵I] 표지된 HBs 항체용액을 넣어 45°C에서 3시간 반응시켰다. 이 bead를 다시 세척한 후 gamma counter (PACKARD, U.S.A)로 반응정도를 cpm으로 측정한 후 대조군 항원의 양과 비교하여 항원생성 저해능을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 Kruskal-Wallis one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 각 군간의 차이를 비교할 경우에는 Bonferroni's modified *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 혹은 $p < 0.01$ 수준에서 유의성을 검색하였다.

실험결과 및 고찰

세포독성

항바이러스 효과를 검색할 시료의 용량을 결정하기 위하

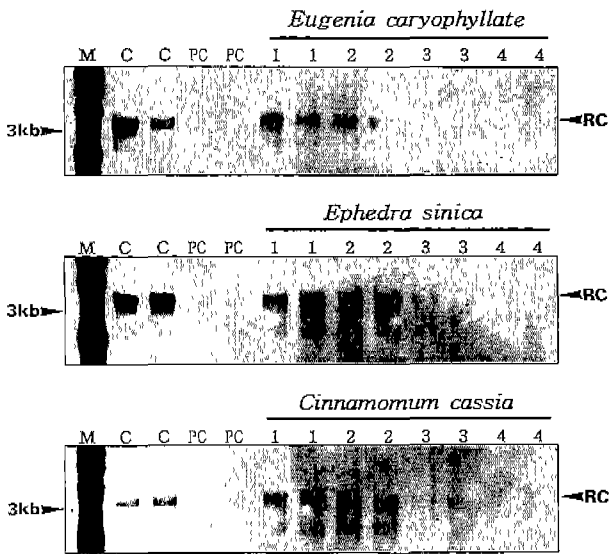


Fig. 1. Effects of water extracts of 3 medicinal plants on HBV replication in HepG2 2.2.15 cells. The cells were treated with 64 (lane 1), 128 (lane 2), 256 (lane 3), 512 µg/ml (lane 4) of water extracts and 10 µM dideoxycytidine (lane PC) as a positive control for 8 days. Samples were loaded in duplicate. HBV DNA in culture was extracted and analyzed by Southern blot hybridization with 3.2 kb DNA probe of HBV genome. Lane C, not treated with test sample; M, size marker(λ /Hind III); RC, relaxed circular HBV DNA.

여 시료처리 후 세포로부터 배양액내로 유리된 LDH 활성도를 측정하여 세포독성을 계산하였다. 세포주에 1% Triton X-100을 처리한 것을 LDH 최대 생성량으로 기준하였을 때 시료의 최대농도 (512 µg/ml) 처리로 인해 나타나는 세포독성은 정향 9.3%, 마황 4.2%, 계피 4.7%로 나타났다. 양성 대조물질로 사용된 dideoxycytidine(ddC)을 10 µM로 처리하였을 때 세포독성은 4.4% 이었으며 ddC의 CC₅₀(50% cytotoxic concentration) 값이 168 µM인 것과 비교하였을 때 3종 생약재 추출물의 세포독성은 크지 않은 것으로 나타났다.

세포의 HBV virion의 증식 억제

3종의 생약재 수침엑스가 HepG2 2.2.15 세포에서 HBV의 증식을 억제하여 세포외로 virion의 방출을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 시료를 배양세포에 처리한 후 배양액을 수거하여 HBV DNA를 정량하였다(Fig. 1). 시료의 처리시간은 세포가 confluent하게 된 후 HBV DNA 배출이 급격히 증가되어 일정한 양의 바이러스가 지속적으로 검출되는 8일간으로 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 정향, 마황, 계피의 수침엑스는 농도 의존적으로 HBV 증식을 억제하였다.

정향(*E. caryophyllate*) 수침엑스는 128 µg/ml의 농도에서 현저하게 HBV의 증식을 억제하였고, 256 µg/ml 이상의 농도에서는 바이러스 증식을 완전히 억제하여 DNA band가 관찰되지 않았으며, 양성대조물인 10 µM의 ddC보다 우수한 효과를 보였다. HepG2 2.2.15 세포에서 ddC의 HBV 증식 억제효과는 EC₉₀(90% effective concentration)가 6 µM로 보고되었으며(Korba 1992), 본 실험에 사용한 ddC의 농도 10 µM은 HBV의 증식을 완전히 억제한 상태를 나타내고 있다(Fig. 1, lane PC). 마황(*E. sinica*) 수침엑스는 128 µg/ml에서 바이러스의 증식을 현저하게 억제하였으며, 256 µg/ml 이상의 농도에서는 바이러스의 증식을 완전히 억제하여 세포배양액으로 유리되는 relaxed circular (RC) HBV DNA가 거의 관찰되지 않았다. 계피(*C. cassia*) 수침엑스는 정향과 유사한 바이러스 증식 억제 효과를 나타내었다. Fig. 1에서 검출된 HBV DNA band의 양을 densitometer 및 Bio-Profil image analysis program (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 측정하였을 때 정향, 마황, 계피 수침엑스의 HBV DNA 증식 억제에 대한 EC₅₀는 126 µg/ml 이하로 측정되었다.

Chung 등(1995)의 보고에서는 정향, 마황 수침엑스가 B형 간염바이러스의 표면항원 (HBsAg)에 결합능이 있는 것으로 나타났다. 이는 본 실험 중 HBV 증식 억제 효과를 측정할 때 배양액 내의 virion을 polyethylene glycol (PEG) 침전법으로 수거하는 단계에서 시료가 HBsAg과 결

Table I. Inhibition of HBsAg production by water extracts of medicinal plants in HepG2 2.2.15 cells

Botanical name(Chinese)	Concentration of plants extracts (µg/ml)			
	64	128	256	512
	% inhibition of HBsAg production ^a			
<i>Eugenia caryophyllate</i> (丁香)	20.5 ± 2.6*	28.6 ± 2.0*	77.3 ± 1.6*	81.4 ± 1.7*
<i>Ephedra sinica</i> (麻黄)	28.4 ± 2.0*	39.1 ± 1.7*	52.4 ± 2.3*	88.5 ± 1.8*
<i>Cinnamomum cassia</i> (桂皮)	12.9 ± 2.7*	18.4 ± 2.7*	51.8 ± 1.4*	82.4 ± 2.4*
dideoxycytidine (ddC, 10 µM)	14.4 ± 4.1*			

Values are means ± S.E. for 4 separate experiments.

^aThe inhibition of HBsAg production was analysed by radioimmunoassay (RIA) and inhibition percentage was calculated using the following equation, I(%)=[1-(T-B)/(N-B)]×100 (I: inhibition of HBsAg production, T: cpm of treated group, N: cpm of non-treated group, B: background cpm). *: Significantly different from control (p<0.01)

합하여 HBV 침전을 방해할 가능성이 있으므로 이를 검증하기 위해 시료를 처치하지 않은 대조군의 배양액과 생약재 시료를 섞어 37°C에서 2시간동안 방치한 후 전술한 방법으로 바이러스를 분리하여 virion DNA의 양을 살펴본 결과, 이들 시료는 전 농도에서 HBV DNA band의 양에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며(data not shown), 따라서 시료가 HBs 항원과 결합할지라도 HBV 증식 억제효과 측정실험에는 영향을 주지 않을 것으로 사료되었다.

HBV 항원의 생성 억제

시료 처치 후 세포배양액 내의 HBV 항원의 양을 측정 한 결과를 Table I에 표기하였다. 정향, 마황, 계피 수침엑스는 전 농도에서 농도의존적으로 HBV 항원 생성을 억제하였다. 정향 수침엑스는 64~128 µg/ml에서 HBV의 표면 항원 생성 억제도가 30% 이하였으나 256 µg/ml상에서는 80%에 가까운 억제효과를 나타내었다. 마황 수침엑스는 농도의존적으로 HBs 항원의 생성을 억제하였으며 고농도인 512 µg/ml에서는 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 계피 수침엑스는 저농도인 64~128 µg/ml에서는 다른 생약재에 비해 항원생성을 가장 미약하게 억제하였으나 고농도인 512 µg/ml에서는 다른 생약재와 마찬가지로 82.4%의 항원 생성 억제효과를 나타내었다. 양성대조약물인 ddC는 14.4%의 낮은 HBs 항원생성 억제도를 나타내었고 이는 Kruining 등(1995)의 보고와 일치하였다. 이 같은 결과는 ddC가 세포질에서 HBV genome의 복제는 저해하나, HBV 전사체(mRNA)로부터 생성된 HBs 항원이 endoplasmic reticulum의 세포막에서 HBV 유전자 없이 항원끼리 self assembly 되어 filament 및 sphere 형태로 골지체를 거쳐 세포외로 배출되기 때문에(Harrison 등, 1997) HBV 항원 생성의 억제효과는 미약한 것처럼 나타나는 것으로 사료된다.

정향(*Eugenia caryophyllate* Thunb.)은 정향나무의 꽃봉오리로서(정 등, 1998) 이미 retrovirus의 역전사 효소에 대한 억제능이 보고되어 있다(Suthienkul 등, 1993). 이 보고에 의하면 정향 수침엑스는 moloney murine leukemia virus (MMLV)의 reverse transcriptase의 활성을 100% 저해한다고 보고되었으며, 이와 더불어 본 실험의 결과로 항HBV 작용이 밝혀지게 되었다. 마황(*Ephedra sinica* Stapf.)은 다년생 초본으로서 마황의 정유는 *in vitro* 실험에서 Influenza virus에 대하여 억제작용이 있고, A형·PR₈형의 Influenza virus에 감염된 마우스에 피히주사를 하면 치료작용이 있는 것으로 보고되고 있으며(정 등, 1998), 본 연구결과에 의해 항HBV 작용이 새롭게 밝혀졌다. 계피(*Cinnamomum cassia* Presl.)는 녹나무과에 속하는 유계나무의 수피를 말린 것으로 항균작용(Tanaka 등, 1989)과 사구체신염에 치료효과가 보고되었으며(Nagai 등, 1982),

계피 또한 항HBV 작용이 새로이 밝혀지게 되었다.

이러한 결과들로 정향, 마황, 계피의 수침엑스 내에는 HBV의 증식을 억제하는 활성 성분이 존재할 것으로 사료되며 각 생약재의 항HBV 활성 성분의 분리 및 동물 실험에 대한 연구를 계획 중이다.

감사의 말씀

이 논문은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 지정과제연구비(HMP-98-P-0036)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Chisari, F. V., Ferrai, V. C. and Mondelli, M. U. (1989). Hepatitis B virus structure and biology. *Microb. Pathog.* **6**, 311-325.
- Chisari, F. V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1987). Structure and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 6909-6913.
- Chung, T. H., Kim, J. C., Kim, M. K., Choi, S. C., Kim, S. L., Chung, J. M., Lee, I. S., Kim, S. H., Hahn, K. S. and Lee, I. P. (1995). Investigation of Korean plant extracts for potential phytotherapeutic agents against B-virus hepatitis. *Phytotherapy Research* **9**, 429-434.
- Harrison, T. J. and Zuckerman, A. J. (1997). The molecular medicine of viral hepatitis, in replication of hepatitis B virus (M. Kann and W. H. Gerlich, Ed.), pp. 63-88. John Wiley & Sons, London, U.K.
- Hsu, H., Chen, Y., Shen, S., Hsu, C., Chen, C. and Chang, H. (1986). *Oriental Materia Medica*, pp. 48-49. Oriental Healing Arts Institute, Taiwan.
- Jansen, R. W., Johnson, L. C. and Averett, D. R. (1993). High-capacity *in vitro* assessment of anti-hepatitis B virus compound selectivity by a virion-specific polymerase chain reaction assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 441-447.
- Kim, C. Y., Kim, J., Kim, T. G., Kim, S. H. and Huh, H. (1998). Inhibition of HBV replication by the extract of *Phyllanthus ussuriensis*. *J. Appl. Pharmacol.* **6**, 139-144.
- Korba, B. E. and Milman, G. (1991). A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* **15**, 217-228.
- Korba, B. E. and Gerin, J. L. (1992). Use of a standardized cell culture assay to assess activity of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* **19**, 55-70.
- Kruining, J., Heijntink, R. A. and Schalm, S. W. (1995). Antiviral agents in hepatitis B virus transfected cell lines: inhibitory and cytotoxic effect related to time of treatment. *J. Hepatology* **22** 263-267.
- Nagai, H., Shimazawa, T., Takizawa, T., Koda, A., Yagi, A.

- and Nishioka, I. (1982). Immunopharmacological studies of the aqueous extract of *Cinnamomum cassia* (CCAq). II. Effect of CCAq on experimental glomerulonephritis. *Jpn. J. Pharmacol.* **32**(5), 823-831.
- Shrivastava, R., Delomenie, C., Chevalier, A., John, G., Ekwall, B., Walum, E. and Massingham, R. (1992). Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vitro* cytotoxicity of 48 chemicals. *Cell Biol. Toxicol.* **8**, 157-170.
- Suthienkul, O., Miyazaki, O., Chulasiri, M., Kositanont, U. and Oishi, K. (1993). Retroviral reverse transcriptase inhibitory activity in Thai herbs and spices: screening with Moloney murine leukemia viral enzyme. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **24**(4), 751-755.
- Tanaka, S., Yoon, Y. H., Fukui, H., Tabata, M., Akira, T., Okano, K., Iwai, M., Lga, Y. and Yokoyama, K. (1989). Antiulcerogenic compounds isolated from Chinese cinnamon. *Planta Med.* **55**(3), 245-248.
- Tiollas, P., Pourcel, C. and Dejean, A. (1985). The hepatitis B virus. *Nature* **317**, 487-495.
- Vengaterwaren, P. S., Millman, I. and Blumberg, B. S. (1987). Effects of an extract from *Phyllanthus nururi* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: *In vitro* and *in vivo* studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 274-278.
- Wang, M., Cheng, H., Li, Y., Meng, L., Zhag, G. and Mai, K. (1995). Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: Observations with three preparations from different geographic sites. *J. Lab. Clin. Med.* **126**, 350-352.
- 정보섭, 신민교 (1998) 도해향약대사전(식물편), pp. 116, 453, 737, 영림사, 서울.