

유자의 항 Influenza 바이러스 A형 활성에 관한 연구

전원경,* 김호경, 고병섭

한국한의학연구원 검사사업팀

Study on the Anti-influenza Virus A type Activity of *Citrus junos*

Won Kyung Jeon,* Ho Kyoung Kim and Byoung Seob Ko

Quality Control and standardization of herbal medicine team,
Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract - To evaluate anti-influenza virus activity of 113 specimens of Korean traditional medicine both water and methanol extracts were examined using haemagglutination inhibition test. The water extract from *Citrus junos* was found to inhibit influenza virus A/Taiwan/1/86(H1N1). The survival rates of virus were determined by *in situ* cellular enzyme-linked immunosorbent assay. The water extract of *Citrus junos* was fractionated by chromatographic separating using Amberlite XAD-4, 40% MeOH and 60% MeOH layer had antiviral activity. The half inhibition concentration (IC₅₀) of 40% MeOH layer on survival of influenza virus was 361.5 µg/ml and IC₅₀ value of fr. 40-4 fractionated from 40% MeOH layer was 677.19 µg/ml. These results suggested that the fractions of *Citrus junos* have potent anti-influenza A virus activity.

Key words - *Citrus junos*, influenza virus A/Taiwan/1/86(H1N1), *in situ* cellular enzyme-linked immunosorbent assay

유자나무 (*Citrus junos*, Rutaceae)는 중국원산이며 일본에도 분포하고 우리 나라에는 과수용으로 들여와 제주도 및 남부지방에 재식하는 귀화식물이다. 유자의 약명은 유자, 산유자이며 식용, 관상용에 쓰이고 열매는 음료용, 식용 및 제과용으로 사용되며 한방과 민방에서 과피, 과실, 수피를 모세혈관강화, 고미건위, 지갈, 진통, 팽만, 소화, 활식, 실성, 교미, 교취, 화장, 유방통, 통유, 진해, 거담 등의 약재로 쓴다. 유자의 성분에는 hesperidin, narirutin, naringin, neohesperidin, lutein, synephrine 등이 있다.¹⁻³⁾ 국내에서는 유자에 대한 성분연구는 이루어지고 있으나 효능에 관한 연구가 거의 진행되지 않고 있는 실정이다.^{4,5)} 국외에서는 최근에 influenza virus에 의한 감기 치료제를 천연물에서 개발하려는 연구가 많이 시도되고 있다. Kadir 등⁶⁾은 *Sanicula europaea* 추출물이 influenza virus에 활성이 있다고 보고하였으며 Hiroshi 등⁷⁾은 *Pinus parviflora*에서 분리된 lignin 분획, Takayuki 등⁸⁾은 *Scutellaria baicalensis*에서 분리된 isoscutellarein이 influenza virus에 활성이 있다고 보고

하였다. 그리고 Gegova 등⁹⁾은 *Geranium sanguineum*에서 분리된 polyphenolic 복합체와 rimantadine을 병용한 것이 rimantadine 한가지만 사용한 것보다 influenza virus에 효과가 있다고 보고하였다. 생약에 대한 항인플루엔자 활성 연구는 최근 국외에서 활발히 이루어지고 있기는 하지만 아직까지 초기단계에 있는 실정이라고 할 수 있으며 또한 국내에서는 연구가 많이 이루어지고 있지 않아 향후 무한한 가능성이 있다고 할 수 있다. 본 실험은 현재까지 알려진 항 influenza virus 활성 검색법을 보완하기 위하여 최근에 개발된 *in situ* cellular ELISA 방법을 응용하여 사용하였다.¹⁰⁾ 기존의 항바이러스 검색법은 바이러스에 의해 세포가 감염됨으로써 세포병변을 보이는 세포 내에 존재하는 succinate dehydrogenase 또는 lactate dehydrogenase (LDH) 등의 효소가 증가하는 정도를 측정함으로써 시료에 대한 항바이러스 효과를 간접적으로 측정하는 방법이었다.¹¹⁻¹³⁾ 그러나 본 실험실에서 구축한 *in situ* cellular ELISA 검색법은 바이러스의 생존율을 측정함으로써 항바이러스 활성 효과를 직접적으로 검색하는 방법으로 기존의 방법과 비교해

*교신저자 : Fax 02-3442-0220

볼 때 보다 정확한 정량법이라 할 수 있다. 본 연구는 감기예방 및 치료의 목적으로 사용하고 있는 생약을 중심으로 항인플루엔자 바이러스 활성을 검색한 결과 유자가 가장 강한 활성을 나타내어 활성이 있는 분획을 실험하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험재료로 사용한 유자는 전남 고흥 유사시험장에서 채취한 후 절단하여 신선한 상태로 실험에 사용하였다.

감수성 세포와 배지 - 항바이러스 활성을 *in vitro* 에서 검색하기 위해 influenza virus에 대한 감수성 숙주세포인 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아 계대배양하여 사용하였다. MDCK 세포는 influenza virus에 의해 감염되어 세포병변을 일으키는 특징을 가지는 세포주로 배양용 배지는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco)에 2% fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 첨가하여 사용하였고, 배양조건은 37°C, 5% CO₂로 유지된 보습배양기에서 배양하였다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였고 3~4일에 한번씩 계대하여 m²당 2.0~3.0×10⁵개의 세포분포도로 유지하며 사용하였다.

바이러스 증식 및 보관 - 바이러스는 influenza virus A/Taiwan/1/86 (H1N1)형을 국립보건원 호흡기바이러스과에서 분양받아 사용하였다. 바이러스를 증식시키기 위하여 SPF 수정란 (specific pathogen free embryonated hen's egg)을 37°C 부란기에서 10일간 부화시킨 후 오염된 수정란과 무정란을 제외한 수정란을 사용하였다. 수정란의 장노액 (allantoic fluid)에 바이러스를 0.2 ml씩 접종시킨 후 파라핀 왁스로 접종입구를 막고, 37°C에서 2일간 증식시키고 4°C에서 18시간 동안 방치시킨 다음 수정란 한 개 당 10 ml의 장노액을 추출하였다. 바이러스가 증식된 장노액을 4°C, 8000 g에서 10분간 3회에 걸쳐 원심분리한 후 상층액을 membrane filter (0.45 μm)로 여과하여 사용하였다. 바이러스 농축액은 장노액 상태로 분주하여 -70°C deep freezer에 보관하였다가 필요시마다 꺼내어 37°C 항온수조에서 녹인 다음 실험에 사용하였다.

MDCK 세포에서 바이러스를 증식하기 위해 사용한 바이러스 배양용 배지는 DMEM에 2% fetal bovine serum, 비타민, trypsin을 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO₂ 보습배양기에서 배양하였다.

바이러스 역가 (TCID₅₀) 측정¹⁴⁾ - 수정란의 장노액에서 증식된 바이러스 역가를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였고 바이러스 역가는 TCID₅₀값으로 정하였다. 생존 세포의 미토콘드리아 내에 있는 succinate dehydrogenase 활성에 의해 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)가 환원되어 formazan 결정으로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하는 MTT 검색법을 응용하여 바이러스에 의한 세포병변 정도를 측정함으로써 바이러스 역가를 계산하는 방법으로 사용하였다.

바이러스 역가는 감염된 세포군과 비감염 대조 세포군의 흡광도를 기준으로 역가 정도를 측정하였는데 감염군에서 각 well로부터 한 킬립의 평균 OD 540 값을 구하여 대조군의 평균 OD 540값에 대한 백분율을 산출한다. 이 백분율은 대조군과 비교한 감염군의 세포생존율에 해당하는 값으로 TCID₅₀을 바이러스 역가의 지표로 사용하였으며 TCID₅₀값은 Reed-Muench 공식을 이용하여 계산하였다.

활성물질의 분획 - 유자나무의 열매, 유자 (柚子)를 신선한 상태로 실험재료에 사용하였다. 유자 (4 kg)를 열수로 2회 반복 추출한 후 저온에서 감압농축하여 추출물 (279.8 g)을 얻었다. 열수추출물을 물에 현탁시킨 후 MeOH을 증량시켜 극성을 변화시키면서 Amberlite XAD-4 gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH 및 100% MeOH 분획으로 나누어 항바이러스 활성을 측정하였다. 이들 분획 중에서 항바이러스 활성이 강하게 나타난 40% MeOH과 60% MeOH 분획을 Sephadex LH-20 gel을 이용한 column chromatography를 각각 실시하여 6개의 분획과 4개의 분획으로 나누었다.

세포배양, 바이러스 및 검체 접종¹⁰⁾ - 96 well plate를 0.5% gelatin으로 도포한 다음 하룻밤 냉장고에서 방치하고 DMEM으로 세척하였다. 여기에 MDCK 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 접종하고 마지막 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 세포가 접종된 plate는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 각 well에 접종된 세포의 성장 정도와 분포도를 현미경으로 관찰하였다. DMEM 배지를 이용하여 부착되지 않은 세포를 세척하여 제거한 다음 인플루엔자 바이러스액을 50 TCID₅₀농도로 감염용 배지에 희석하여 한 well당 100 μl씩 접종하고 blank와 세포가 접종된 마지막 칼럼에는 감염용 배지만을 가한

후 한시간 동안 바이러스가 세포에 흡착되도록 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 방치하였다. 상층액을 제거한 다음 2% FBS가 포함된 감염용 배지 90 µl씩 분주하고 시료는 농도별로 희석하여 10 µl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다.

세포 및 바이러스 고정¹⁰⁾ - 배양된 96 well plate는 현미경을 이용하여 시료에 의한 세포독성을 관찰한 다음 세포독성이 없는 시료에 대해서만 ELISA 실험을 하였는데 이는 정확한 바이러스 생존율을 측정하기 위해서였다. 배양된 96 well plate는 Phosphate buffered saline (PBS, Gibco)으로 1회 세척하고 세포와 바이러스를 고정하기 위해 에탄올과 아세톤을 동량으로 혼합한 고정액을 -20°C에 보관하여 준비하였다가 각 well에 100 µl 가하여 15분간 -20°C에서 방치하여 고정시켰다. 세포가 떨어지지 않도록 고정액을 제거한 다음 PBS로 1회 세척하여 남아있는 고정액을 완전히 제거하였다.

ELISA¹⁰⁾ - 1% dry milk (Difco) 용액 100 µl를 분주하여 30분간 37°C 배양기에서 배양한 다음 여기에 goat anti-influenza A virus polyclonal 항체(Chemicon)를 100 µl씩 첨가하여 한시간 동안 37°C 배양기에서 다시 배양하였다. 자동 96 well plate 세척기를 이용하여 세척액으로 4회 반복하여 세척하고 상층액을 완전히 제거한 후 goat anti-goat peroxidase가 접합된 항체 (Chemicon)를 100 µl씩 분주한 다음 30분간 37°C 배양기에서 배양한 후 위와 같은 방법으로 4회 세척하였다. 상층액을 충분히 제거하고 기질액인 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB, Chemicon)를 100 µl씩 분주한 다음 실온의 어두운 장소에서 30분간 반응시키고 1N sulfuric acid로 반응을 정지시켰다. ELISA 판독기 (Molecular Device, Emax)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였는데 흡광도의 값은 생존하는 바이러스의 양으로 항바이러스 활성 효과를 측정할 수 있다. 시료를 처리하지 않은 바이러스 생존군에서 세포 접종군의 흡광도 값을 제한 값으로 시료를 처리한 바이러스 생존군에서 순수세포접종군의 흡광도 값을 제한 값을 나누어 계산한 다음 백분율값을 산출하였는데 이는 바이러스 생존율에 해당하는 것으로 Sigma plot 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다. 50% 억제농도 (IC₅₀)는 바이러스 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였고 IC₅₀ 값을 항바이러스 효과의 지표로 사용하였다.

결과 및 고찰

바이러스 농도 결정 - 항바이러스 활성 측정을 위한 바이러스 농도를 결정하기 위하여 바이러스 증식액을 10배로 계단희석하여 MTT법으로 측정된 결과 희석농도에 따른 바이러스 역가의 표준곡선을 정한 다음 실험에 사용될 바이러스 농축액의 농도는 TCID₅₀값으로 정하였는데 Reed-Muench 공식을 이용하여 계산한 결과 바이러스 농축액의 역가는 5×10⁴ TCID₅₀으로 정해졌다.

바이러스 접종 적정농도 결정 - 5×10⁴ TCID₅₀값이 결정된 바이러스 배양농축액을 이용하여 항바이러스 활성을 측정하기 위해 바이러스 접종 적정농도를 *in situ* cellular ELISA 방법을 응용하여 측정된 결과 표준곡선은 Fig. 1과 같았고, 항바이러스 활성 측정을 위한 바이러스 접종 적정농도는 50 TCID₅₀으로 결정하였다.

항 influenza 바이러스 활성 효과 - 인플루엔자의 예방과 치료약으로 Amantadine(1-adamantanamine hydrochloride, Symmetrel), Rimantadine은 인플루엔자 A 바이러스에만 효과적이며 치료 기작은 세포에 인플루엔자바이러스의 부착을 방지하는 방법으로 작용하기 때문에 사람이 감염되기 전이나 직후에 투약을 시작해야 된다. 또한 인터페론 등 약물에 의한 치료는 시도되고 있으나 역시 백신과 마찬가지로 충분히 효능을 인정하기 어렵다. 인플루엔자 바이러스로부터 사람을 보호하기 위하여 투약해야할 적절한 시기를 잘 선택해야 하며 이것은 인플루엔자를 치료하고 질병을 가볍게 하는데 사용되고 있다.¹⁵⁾ 인플루엔

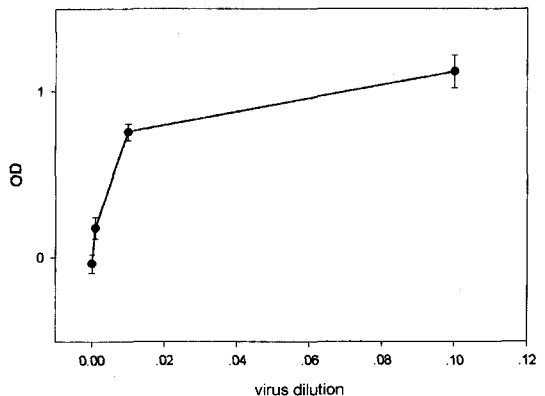


Fig. 1. Standard curve of influenza virus titers by *in situ* cellular ELISA. Each value is the mean ± SD of replicates.

자를 예방하고 치료하기 위해 인류는 오래 동안 노력 해왔는데 부작용이 최소화되고 사용상 안전성이 보장 되는 새로운 항인플루엔자바이러스제의 탐색 및 개발에 박차를 가하고 있으나 화학 합성제나 항생제가 가지고 있는 한계성으로 큰 효과를 보지 못하고 있는 실정으로 효능이 우수한 제품 개발이 절실히 요구되고 있다.¹⁶⁾

본 연구는 한방 및 민간요법으로 주로 이용되는 생약 113종에 대한 1차 항바이러스 활성 검색을 하여 유자에서 활성이 측정되었다. 유자에서 분리된 분획에 대한 2차 항바이러스 활성 검색은 *in situ* cellular ELISA방법을 응용하였는데 활성결과는 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 IC₅₀ 값으로 측정하였다. 유자에서 분리된 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 검색한 결과는 Table I과 같았고, 각 분획의 농도에 따른 바이러스 저해 효과는 Fig. 2로 나타내었다. 유자의 열수추출물을 Amberlite XAD-4 gel을 사용하여 column chromatography를 실시한 결과 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH 분획을 얻었다. 이 분획들 중에 80%, 100% MeOH 분획에서는 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고 40% MeOH과 60% MeOH 분획에서 각각 IC₅₀ 값이 361.5 µg/ml과 676.08 µg/ml로 활성이 나타났으나 나머지 분획에서는 활성을 보이지 않았다. 40% MeOH 분획에서 분리된 40-1, 40-2, 40-3, 40-4 분획 중에 40-1과 40-2 분획에서는 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한

Table I. Inhibitory effects of fractions from *Citrus junos* against Influenza A virus by *in situ* cellular ELISA

Fraction	IC ₅₀ ^a (µg/ml)
fr. H ₂ O	> 1,000
fr. 20% MeOH	> 1,000
fr. 40% MeOH	361.5
fr. 60% MeOH	676.08
fr. 80% MeOH	n.d.
fr. 100% MeOH	n.d.
fr. 40-1	n.d.
fr. 40-2	n.d.
fr. 40-3	>1,000
fr. 40-4	677.19
fr. 60-1	n.d.
fr. 60-2	987.0
fr. 60-3	962.6
fr. 60-4	>1,000
fr. 60-5	454.6
fr. 60-6	>1,000

^aIC₅₀: 50% inhibition of virus concentration, IC₅₀ values were calculated from sigma plot program.

n.d. = not determined

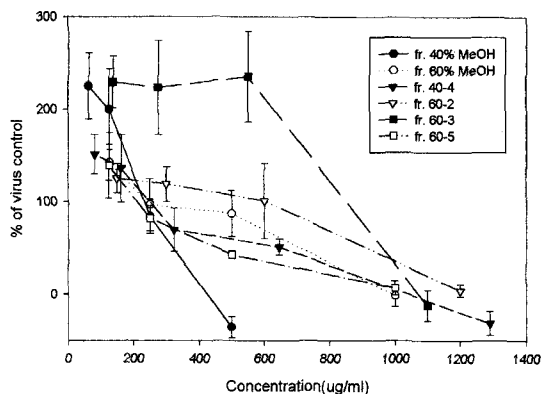


Fig. 2. Dose dependent effects of *Citrus junos* against influenza A virus by ELISA. 40%, 60% MeOH; fractionated by column chromatography using Amberlite XAD-4 from water extract of *Citrus junos*, fr. 40-4; fraction from 40% MeOH layer, fr. 60-2, 60-3, 60-5; Fractions from 60% MeOH layer. Each value is the mean±SD of three experiments.

직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고 40-4 분획의 IC₅₀ 값은 677.19 µg/ml 농도에서 활성이 측정되었다. 60% MeOH 분획에서 60-1, 60-2, 60-3, 60-4, 60-5, 60-6 등 6개의 분획을 얻어 항바이러스 활성을 측정한 결과 60-1 분획은 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고, 60-2와 60-3은 각각 IC₅₀ 값이 987 µg/ml과 962.6 µg/ml 농도에서 활성이 측정되었다. 본 실험 결과에 의해 유자에 대한 항바이러스 활성이 처음으로 측정되었고 40% MeOH 분획에서 항바이러스 활성이 가장 강하게 측정되어 바이러스의 증식을 억제하는 성분이 존재할 것으로 기대되었다. 열수엑스 뿐 만 아니라 여러 분획들에서 활성이 측정되어 감기걸렸을 때 민간요법으로 유자차를 비롯하여 유자를 사용하는 것이 선조들의 지혜가 뛰어나다는 것을 입증하고 유자를 차형태로 응용할 뿐만 아니라 보다 복용이 간편하고 쉽게 접할 수 있는 다른 형태의 제품개발이 요구된다. 현재 활성 분획으로부터 단일 물질 분리 및 동정에 대한 연구는 진행 중에 있으며 향후 동물실험과 항바이러스 작용 기작을 밝히는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 항바이러스물질을 천연물로부터 개발하

기 위해 113종의 생약을 대상으로 항인플루엔자 활성을 검색한 결과 *Citrus junos*가 활성이 높은 것으로 측정되었다. 최근 바이러스의 신속한 정량법으로 보고되는 *in situ* cellular ELISA 방법을 구축하여 *Citrus junos* 분획들에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과 40% MeOH 분획의 IC₅₀ 값이 361.5 µg/ml로 가장 효과적으로 측정됨으로써 추후 새로운 항바이러스 물질 개발의 가능성을 보여 주었다.

사 사

본 연구는 농림부의 지원으로 수행된 농림기술특정 연구사업 (296051-3)의 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 김태정 (1996) 한국의 자원식물 II. 271. 서울대학교 출판부.
- 이영노 (1996) 원색한국식물도감. 440. 교학사.
- 이창복 (1980) 대한식물도감. 504. 향문사.
- Jung, J. H. (1974) Studies on the Chemical Compositions of *Citrus junos* in Korea. *J. Korean Agriculture Chemical Society*. 17(1): 63-80.
- Lee, H. Y., Kim, Y. M., Shin, D. H. and Sun, B. K. (1987) Aroma Components in Korean Citron (*Citrus medica*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 19(4): 361-365.
- Kadir, T., Kyosuke, N. and Avni, K. (1996) Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. Leaves extract on influenza virus-infected cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 225: 22-26.
- Hiroshi, S., Minoru, T., Yutaka, K., Kyosuke, N., Akira, I., Masahiro, U. and Shoji, Y. (1992) Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus paraviflora* Sieb. et Zucc. *in vivo*. 6: 491-496.
- Takayuki, N., Yukiori, M., Tsuyoshi, T., Yujiro, S. and Haruki, Y. (1992) In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. *Antiviral Res.* 19: 207-217.
- Gegova, G., Manolova, N., Serkedjieva, J., Maximova, V., Uzunov, S., Dzeguze, D. and Indulen, M. (1993) 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 Microbiologica Bulgarica*. 30: 37-40.
- Andrzej, M., Marie, J. A. and James, R. B. (1999) Optimization of *in situ* cellular ELISA performed on influenza A virus-infected monolayers for screening of antiviral agents. *Journal of Virological Methods*. 77: 165-177.
- Hosoya, M., Matuyama, S., Baba, M., Suzuki, H. and Shigeta, S. (1992) Effects of proteinase inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1432-1436.
- Watanabe, W., Konno, K., Ijichi, H., Inoune, T., Yokota, T. and Shigeta, S. (1994) MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo and anti-paramyxoviral agents. *J. Virol. Methods*. 48: 257-265.
- Watanabe, W., Sudo, K., Asawa, S., Konno, K., Yokota, T. and Shigeta, S. (1995) Use of lactate dehydrogenase to evaluate the anti-viral activity against influenza A virus. *J. Virol. Methods*. 51: 185-192.
- Julia, S. and Alan, J. (1998) In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Research*. 37: 121-130.
- Douglas, R. G. (1990) Prophylaxis and treatment of influenza. *N. Engl. J. Med.* 322: 443-450.
- WHO. (1979) Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO offset publication No. 47. WHO Geneva.

(2000년 2월 9일 접수)