

## 마우스 간염바이러스(MHV-2)에 의해 유발된 전격성 바이러스간염에 대한 비페닐메틸디카르복실레이트/아만타딘제제의 간보호 및 잠재적 항바이러스효과

주성수\* · 진혁준 · 원태준 · 장수길 · 황광우 · 이도익#

중앙대학교 약학대학, \*충북대학교 동물의학연구소

(Received March 28, 2007; Revised May 7, 2007)

### Hepatoprotective and a Potential Antiviral Effect of Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate/ Amantadine for an Acute Viral Hepatitis Induced by MHV-2 in ICR Mice

Seong-Soo Joo\*, Hyouk-Jun Chin, Tae-Joon Won, Su-Kil Jang, Kwang-Woo Hwang and Do-Ik Lee#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

\*Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

**Abstract** – The mouse hepatitis virus (MHV-2) induces broad collapses, focal necrosis and cytolysis of hepatocytes, and leads to death after three to five days of intraperitoneal injection in mice. The present study investigated whether the combinatorial treatment of dimethyl dicarboxylate/amantadine (2 : 1) showed hepatoprotective and/or antiviral properties in MHV-2 infected ICR mice. In the study, we found that dimethyl dicarboxylate/amantadine group (VDDBA) increased the survival rate (30.8%) when compared to positive control, VL (7.7%) and that VDDBA lengthened the survival time (4.2 d) after MHV-2 infection. In addition, ALT and AST were well regulated when treated with VDDBA ( $p < 0.01$ ). Finally, we concluded that those results were probably from the inhibition of viral replication and at least antiproliferative effect on MHV-2.

**Keywords** □ MHV-2, dimethyl dicarboxylate, amantadine, HBV, ICR mouse, lamivudine

B형 간염 바이러스 감염은 인간에 있어 간암, 간 경화 및 간 질환의 주요 원인이다. 임상적으로 B형 간염 바이러스(HBV) 보균자로서 30대 후반에 간 조직 생검에 의해 중등도 이상의 만성 활동성 간염으로 진단된 후 간염이 회복되지 않고 계속 진행된다면 약 5~10년 사이에 간경변증으로 진행되고 10~20년 사이에 간암으로 발전될 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 특히 우리나라를 포함한 아시아국가에 만연하는 B형 간염의 적극적 치료가 절실한 형편이며, 우리나라의 경우 HBV에 의한 만성간염 및 간 세포암의 상관관계가 매우 높아 이들 질환으로 인한 사망률은 간과할 수 없는 주요 사인이다.<sup>2)</sup> 더욱이 신생아의 경우 HBV에 감염된 상태에서 90% 정도가 만성간염으로 발병(성인의 경우 5~10%) 되는 것으로 알려져 있고,<sup>3)</sup> 우리나라 성인의 약 5%가 HBV에 감염되어 있음을 고려할 때 B형 간염 바이러스 감염의 치료

는 매우 중요한 연구대상이다.<sup>4)</sup>

만성B형 간염에 대한 치료법으로 승인된 약제로서 인터페론을 비롯한 nucleoside 및 nucleotide analogues 등의 항바이러스제제가 사용되고 있다. 특히 알파-인터페론제제는 투여기간이 길며, 심한 독감증세 및 약제로 인한 독성 발생이 뚜렷이 관찰될 뿐 아니라 바이러스의 seronegative ratio도 20% 안팎의 낮은 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 근래에 소개된 nucleoside analogue제제가 기존의 인터페론제제에 비해 안전하고 효과적인 치료법으로 많은 바이러스 감염환자에게 희망을 주고 있으나, 이 제제 또한 장기투여 시 돌연변이체(YMDD; tyrosine-methionine-aspartate-aspartate)에 한계 및 약물투여종료 시 리마운드현상에 대한 문제점을 드러내고 있다.<sup>6,7)</sup>

본 연구에서는 이와 같은 기존 약제의 단점을 보완할 수 있는 천연물 유래 성분인 biphenyl dimethyl decarboxylate(DDB)와 향인플루엔자 효과가 있는 것으로 알려진 amantadine의 anti-HBV효과를 *in vivo*에서 연구하고자 하였다. *Schizandrae fructus*로부터 단리된 성분인 DDB는 cytochrome P-450 2B, amino-

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-820-5608  
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

pyrine demethylase 등의 해독물질을 증가시켜 해독기능 촉진, 간장보호 및 간치료작용을 가지며,<sup>8)</sup> 또한 amantadine은 human influenza A감염의 예방 및 치료제로서 효과적인 것으로 알려져 있다. 특히, amantadine의 항바이러스 효과에 대해서는 확실히 규명되어 있지 않지만 바이러스의 uncoating을 저해하여 바이러스의 복제를 방지하는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10)</sup> DDB·amantadine 복합투여에 대한 HBV cell line model(HepG2 2.2.15) 연구에서 DDB가 interferon- $\alpha$  유사효과를 가지며, amantadine 동시 투여 시 anti-HBV효과가 상승됨을 보고하였다.<sup>11)</sup> 이는 DDB·amantadine의 interferon- $\alpha$  유사효과에 의해 RNA 복제가 억제되고 있음을 시사하는 것이다. 따라서 이 두 성분의 작용기전과 예측되는 효과가 상치하지는 않으나, HBV cell line model에 대해 두 제제가 상호보완적으로 작용하여 B형 간염 바이러스의 복제를 억제하고 간 세포보호를 하는 것으로 생각된다. 이와 같은 *in vitro* 결과로부터 본 연구에서는 마우스간염바이러스(MHV-2)에 의해 유발된 바이러스성 간염을 model로 한 *in vivo* 실험을 통해 임상적 적용의 가능성을 관찰하고자 하였다.

### 실험방법 및 재료

#### 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 생후 6 주령의 수컷 SPF ICR 마우스(샘타코바이오키리아)를 구입하여 SPF room에서 약 2주간의 적응기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 적응기간을 끝낸 마우스는 무작위 배정법에 의해 다음과 같이 6군(각 군당 13마리)으로 나누었다. 바이러스 무치치 정상군(NVC), 바이러스 처치 증류수투여군(VDW), 바이러스 처치 lamivudine군(VL, 100 mg/kg), 바이러스 처치 DDB군(VDDDB, 40 mg/kg), 바이러스 처치 amantadine군(VA, 20 mg/kg), 바이러스 처치 DDB·amantadine군(VDDBA, 40 mg/kg+20 mg/kg). 각 군의 용량은 랫드를 이용한 급 만성 독성 실험 및 일반 약리실험에서 나타난 최적의 농도를 적용하였고(data not shown), 본 실험에 사용된 약물은 우리제약에서 제공받아 사용하였다.

#### 바이러스 감염 및 약물투여

본 실험에 사용된 마우스간염바이러스(Mouse hepatitis virus-2 strain, MHV-2)는 감염 시 전격성 바이러스 감염을 유발하는 주이다. 따라서 바이러스 무치치군을 제외한 모든 실험군에 MHV-2주를 마우스 당  $1 \times 10^3$  PFU/0.2 ml의 농도로 복강에 접종하고 처치 1일 후부터 각군의 약물을 10일간 경구투여 하였다. 바이러스 접종 2~3일 쯤 미정맥으로부터 혈액을 채취하였고 각 개체의 사망 시까지 생존여부를 관찰하였다. 최종 관찰 종료는 약물 투여 10일 쯤 수행하였다.

#### 바이러스 역가측정

바이러스 역가는 채취한 마우스 혈액을 원심분리 한 후 각 혈장을 SR-CDF1-DBT(DBT)세포에 접종하여 plaque assay법으로 측정하였다. 즉 세포배양용 플라스크에서 배양된 DBT 세포가 단층을 형성할 때 배양액을 제거하고 0.2% EDTA-PBS를 넣어 세포를 분리 및 부유시킨 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 과정으로부터 회수된 세포에 MEM 배지를 가하고 24 well plate에 well 당 0.5 ml이 되도록 분주하여 2일간 배양 하였다. 배양된 세포의 단층 형성이 관찰되면 배양액을 제거하고 MEM 배지로 10 단계로 희석한 바이러스를 0.2 ml씩 단계별로 세포에 증충하여 1.5~2시간 흡착시켰다. 증충한 배지를 제거하고 1% fetal calf serum(Gibco, USA), 1% agar를 함유한 MEM 배지(Cellgro, USA)로 1차 overlay하여 6~8시간 동안 2차 배양 후 형성된 plaque 수를 세어 바이러스 역가를 측정하였다.<sup>12,13)</sup>

#### 혈액화학적 검사

채취된 혈액으로부터 분리된 혈청을 자동분석기(Integra 400, Roche, Germany)에 적용하여 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(Aspartate aminotransferase)를 측정하였다.

#### 간세포 배양 및 바이러스 감염

마우스 간세포 배양은 two-step 관류방법에 의해 수행되었다.<sup>14)</sup> 이와 같은 primary culture 방법에 따라 준비된 배양 간세포는 35 mm culture dish에 각 well당  $7.5 \times 10^5$  cell/2 ml 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 2일간 배양하였다. 세포의 관찰을 위해 culture dish 바닥에 collagen type III(Sigma, USA)가 코팅된 coverglass를 넣어 간세포가 부착되도록 하였다. 배양 24 시간 후 충분히 배양된 간세포로부터 배지를 제거하고 세포당 0.01 m.o.i의 바이러스를 가한 후 1시간 흡착시킨 다음 배지로 2~3차례 세척하여 비 흡착된 바이러스를 완전히 제거하고, 5% FBS-William's medium E(Gibco, USA) 배지를 추가하여 3시간 더 배양하였다.

#### 바이러스항원의 측정

배양한 culture dish에 위치해 있는 collagen type III-coated coverglass를 회수하여 배지로 세척한 다음 공기 중에 신속히 건조시키고 이어서 -20°C 아세톤용액에 넣어 고정하였다. 세포 고정 후 PBS용액으로 세척하고 anti-MHV-2 rabbit serum(1:20)으로 60분 동안 처리하였다. 이를 다시 PBS용액으로 세척한 후 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-rabbit goat IgG(1:20) 용액으로 처리하고 PBS용액으로 잔존하는 용액을 완전히 제거하였다. 바이러스항원은 coverglass에 glycerol-PBS용액(9:1)을 처리한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

실험결과

생존율 개선효과

바이러스 접종 후 VDW 및 VDDB 투여군 마우스에서 투여기간 중 전 개체가 사망하였으나 VL군에서는 7.7%, VA군에서 15.4%의 생존율이 관찰되었고 VDDBA군에서 30.8%의 생존율을 나타내어 타 약물투여군에 비해 생존율이 현저하게 개선되었다(Fig. 1A). 또한 바이러스 접종 후 투여기간 중 사망한 개체의

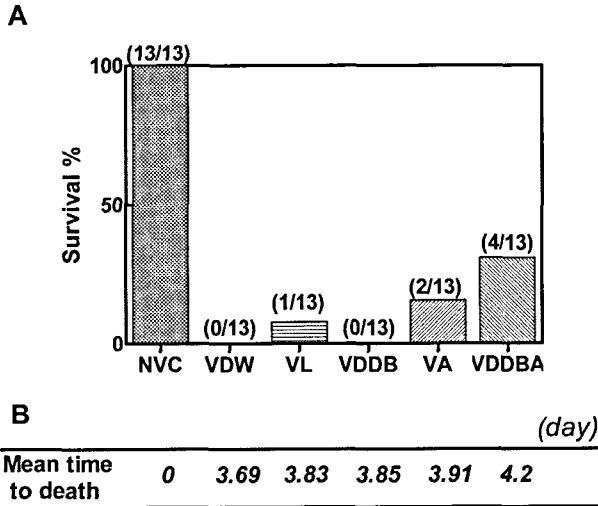


Fig. 1 - Survival rates and times of male ICR mice orally administered with distilled water, lamivudine, DDB, amantadine, or DDB+amantadine after injection of mouse hepatitis virus with  $1 \times 10^3$  PFU. (A) The number of surviving/number of total mice was counted on day 10 after viral infection for the analysis of an acute death by MHV-2 in the presence or absence of the study drugs. (B) Mean time-to-death, the sum of values of which multiplied dead day of mice by No. of dead mice/the sum of No. of dead mice, was analyzed on day 10. NVC, non-viral control; VDW, viral DW; VL, viral lamivudine; VDDB, viral DDB; VA, viral amantadine; VDDBA, viral DDB+amantadine.

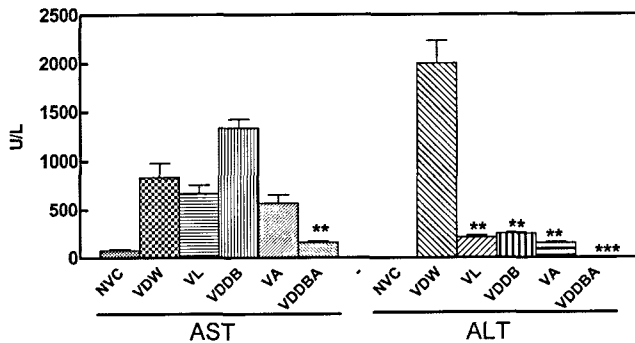


Fig. 2 - Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum of male ICR mice on day 3 after injection of MHV-2 (n=5). \*\*, \*\*\*significantly different from MHV-2 group (p<0.01, p<0.001, respectively).

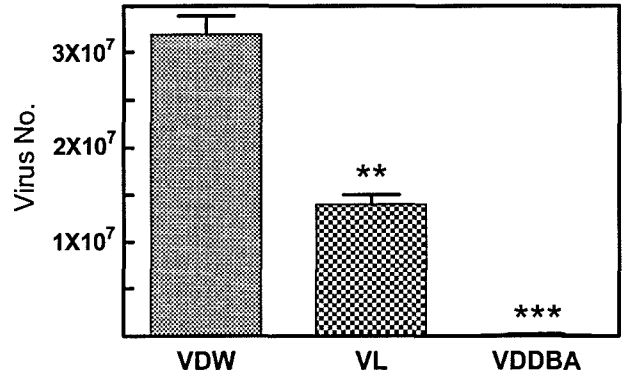


Fig. 3 - MHV-2 virus titers (PFU/0.2 ml) in blood of ICR mice on day 3. Results include the mean±S.D. of experiments performed in triplicate. \*\*, \*\*\* p<0.01, 0.001 vs. VDW.

Group	Time after infection (h)			Distribution of viral antigen
	12	24	48	
VDW	+	++	++++	Diffuse massive
VL	±	+	++	Focal
VDDB	+	+	+++	Diffuse massive
VA	±	+	++	Focal
VDDBA	-	±	+	Spotty

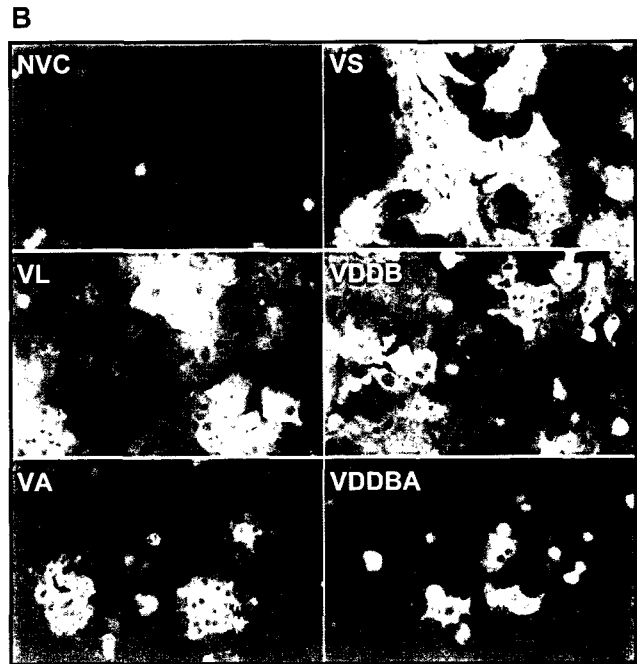


Fig. 4 - Staining reactions of immunofluorescence for viral antigens in cultured hepatocytes treated with saline (VS), lamivudine (VL, 20 µg/ml), DDB (VDDB, 10 µg/ml), amantadine (VA, 5 µg/ml) and DDB+amantadine (VDDBA, 10+5 µg/ml) after infection with MHV-2 (m.o.i.=0.01). (A) The distribution of viral antigen in primary culture was scored at 12, 24, 48 h. (B) Immunofluorescent captures in cultured hepatocytes infected with MHV-2 (24 h).

평균사망일수는 타 약물투여군에 비해 VDDBA군이 4.2일로 보다 길게 나타났다(Fig. 1B).

**ALT 및 AST 개선효과**

채취된 혈액으로부터 간기능 지표인자인 ALT 및 AST 수치를 분석하였다. 바이러스 처치 후 무처치군인 VDW군에서 ALT 및 AST 수치가 급격히 증가하여 3일째 각각 20182±3818, 3507±820 U/l이 관찰되었다(Fig. 2). ALT 수치는 VDW군에 대하여 VL, VDDB, VA, VDDBA군에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 특히 VDDBA군에서 현격한 ALT 상승억제 효과가 있었다.

**바이러스증식 억제효과**

바이러스 접종 후 3일째 마우스 혈액내의 바이러스 역가는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 즉 바이러스 접종 후 3일째 혈중 바이러스 농도는 VDW군 3×10<sup>7</sup>, VL군 1.3×10<sup>7</sup>, VDDB군 3.1×10<sup>7</sup>, VA군 7.6×10<sup>6</sup> 및 VDDBA군에서 1.7×10<sup>5</sup> PFU/blood 0.2 ml로 나타나 VDDBA군에서 타 약물군에 비해 바이러스증식이 억제 되는 것으로 나타났다. 간세포의 primary culture에 바이러스 감염 24시간 후 각 군에 나타나는 바이러스 항원의 분포를 관찰하였다(Fig. 4A). 즉, VDW군에서 간세포 전체에서 고농도의 바이러스 항원이 관찰영역 전체에 걸쳐 고르게(diffuse massive) 관찰되었으며, VL 및 VA군에서는 일부분에서 초점상(focal)으로 관찰되었다. 반면, VDDBA군에서는 배양간세포의 단세포에 분산상(spotty)으로 미약한 농도의 바이러스 항원이 발견되어 바이러스에 대한 DDB·amantadine의 항 바이러스효과가 기대되었다(Fig. 4B).

**결 론**

본 연구에서 사용된 MHV는 corona virus군에 속하는 RNA virus로서 감수성마우스에 접종 시 사람과 극히 유사한 급성치사성 간염을 유발시킴으로써 병변의 발현이 매우 급격히 일어나 4~7일내에 체중의 급격한 감소와 함께 폐사된다고 알려져 있으며, 특히 MHV-2주는 간 친화성이 가장 높은 대표적인 바이러스로서 감수성마우스에 감염 시 거의 100%의 폐사율을 나타낸다고 보고되고 있다.<sup>15)</sup> 따라서 MHV-2주를 접종하여 전격성바이러스 감염이 유도된 동물모델로부터 앞서 수행한 *in vitro* 실험결과<sup>11,16)</sup> DDB·amantadine의 항바이러스효과를 입증하고자 하였다. *In vitro*의 실험에서 DDB가 직접적인 항바이러스효과를 나타내지는 않으나 인터페론유사 신호전달과정을 통해 항바이러스 활성을 가지는 PKR(protein kinase R), OAS(oligoadenylate synthase) 및 MxA protein을 발현시킴으로써 HBV의 전사 및 발현을 억제하는 것을 예측하였으며, 이러한 항바이러스 효과는 amantadine이 병용될 때 보다 높은 시너지효과가 예상되었다. 따

라서, 마우스간염바이러스인 MHV-2주를 접종한 마우스를 모델로 한 본 연구는 *in vitro* 실험에서와 같이 DDB와 amantadine 병용처치가 anti-HV 항바이러스효과를 유도한다는 결과를 얻고자 하였다. 결과에서와 같이 MHV-2를 접종한 후 감염마우스의 폐사율이 DDB·amantadine병용처치군인 VDDBA군에서 타 군에 비해 낮게 나타났으며(4/13), 바이러스 접종 후 마우스의 평균 폐사기간도 바이러스 무처치군(VDW)에 비해 VDDBA군이 보다 긴(4.2일) 것으로 나타났다. 이는 약물에 의한 효과로 판단할 수 있으며 두 약물이 바이러스감염에 대해 긍정적인 작용을 하고 있는 것으로 사료되었다. 간기능 지표인자인 AST, ALT 수치에서도 무처치군인 VDW군에 비해 VDDBA군이 가장 낮은 결과를 나타내었다. 특히 VDDBA군에서 극히 소량의 ALT가 관찰되어 간세포특이적인 효과가 예상되었고 AST 상승억제 효과가 나타나 두 약물 복합처치 시 우수한 AST 개선효과가 기대되었다. MHV-2에 의한 전격성바이러스 감염에 의한 간세포 보호효과와 더불어 접종된 바이러스의 혈 중 바이러스 농도측정 결과 DDB군이 VDW군과 양성대조군인 VL군에 비해 매우 낮은 수치의 바이러스가 검출되어 바이러스의 증식을 효과적으로 억제하는 것으로 생각되었다.<sup>17)</sup> 이와 같은 결과는 배양간세포에 MHV-2 처치 후 관찰된 바이러스 항원의 분포에서 DDB·amantadine 병용처치가 마우스간염바이러스에 대해 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있다. 상기 연구의 결과를 토대로 단일제 성분으로 각각 사용되고 있는 DDB와 amantadine을 병용투여 시 간염바이러스의 증식억제 및 세포보호효과가 예상되며, 이는 일차적으로 기존의 간염치료제로 사용되고 있는 인터페론이나 뉴클레오사이드계 약물의 부작용(심한독감증세, 리바운드, 내성발현 등)이 배제된 제제로 개발할 수 있음을 제시하는 결과이다. 본 연구에 앞서 수행한 *in vitro* 실험에서 DDB에 의한 인터페론유사효과가 예상되었고, amantadine 병용처치 시 항 바이러스 상승효과가 예측되어,<sup>14)</sup> 작용기전 및 효과적 측면에서 DDB+amantadine 복합제의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

**참고문헌**

- 1) Lok, A. S. : Chronic hepatitis B. *Engl. J. Med.* **346**, 1682 (2002).
- 2) Park, J. W. : Hepatocellular carcinoma in Korea: introduction and overview. *Korean J. Gastroenterol.* **45**, 217 (2005).
- 3) Chisari, F. V., Ferrari, C. and Mondelli, M. U. : Hepatitis B virus structure and biology. *Microb. Pathog.* **6**, 311 (1989).
- 4) Kim, S. M., Lee, K. S., Park, C. J., Lee, J. Y., Kim, K. H., Park, J. Y., Lee, J. H., Kim, H. Y., Yoo, J. Y. and Jang, M. K. : Prevalence of occult HBV infection among subjects with normal serum ALT levels in Korea. *J. Infection* **54**, 185 (2007).
- 5) Wong, D. K., Cheung, A. M., O'Rourke, K., Naylor, C. D., Detsky, A. S. and Heathcote, J. : Effect of alpha-interferon

- treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **119**, 312 (1993).
- 6) Liaw, Y. F., Leung, N. M., Chang, T. T., Guan, R., Tai, D. I., Ng, K. Y., Chien, R. N., Dent, J., Roman, L., Edmunson, S. and Lai, C. L. : Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia hepatitis lamivudine study group. *Gastroenterology* **119**, 172 (2000).
  - 7) Clercq, D. E. : Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **30**, 115 (2004).
  - 8) Kang, K. W., Kim, Y. G., Kim, C. W. and Kim, S. G. : The anti-fibrogenic effect of a pharmaceutical composition of [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] (oltipraz) and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB). *Arch. Pharm. Res.* **25**, 655 (2002).
  - 9) Pinto, L. H. and Lamb, R. A. : The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* **7**, 8997 (2006).
  - 10) Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. and Lamb, R. A. : Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol.* **67**, 585 (1993)
  - 11) Joo, S. S., Won, T. J., Kim, M. J., Hwang, K. W. and Lee, D. I. : Interferon signal transduction of biphenyl dimethyl dicarboxylate/amantadine and anti-HBV activity in HepG2 2.2.15. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 405 (2006).
  - 12) Sun, N. and Perlman, S. : Spread of a neurotropic coronavirus to spinal cord white matter via neurons and astrocytes. *J. Virol.* **69**, 633 (1995).
  - 13) Abe, S., Ota, Y., Koike, S., Kurata, T., Horie, H., Nomura, T., Hashizume, S. and Nomoto, A. : Neurovirulence test for oral live poliovaccines using poliovirus-sensitive transgenic mice. *Virology* **206**, 1075 (1995).
  - 14) Seglen, P. O. : Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29 (1976).
  - 15) Matsuyama, S., Henmi, S., Ichihara, N., Sone, S., Kikuchi, T., Ariga, T. and Taguchi, F. : Protective effects of murine recombinant interferon- $\beta$  administered by intravenous, intramuscular or subcutaneous route on mouse hepatitis virus infection. *Antivir. Res.* **47**, 131 (2000)
  - 16) Joo, S. S. and Lee, D. I. : The potential anti-HBV effect of amantadine in combination with ursodeoxycholic acid and biphenyl dimethyl dicarboxylate in HepG2 2.2.15. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 451 (2005).
  - 17) Fuchizaki, U., Kaneko, S., Nakamoto, Y., Sugiyama, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M. and Kobayashi, K. : Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus. *J. Med. Virol.* **69**, 188 (2003).