

발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해효과

서성숙, 정승기
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

Antiviral Effects of Fermented *Lonicerae Flos* on A Type Influenza Virus

Sung-sook Suhr, Sung-ki Jung

Division of Allergy, Immune & Respiratory System, Department of Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objective : *Lonicerae Flos* has detoxifying properties and been used as antipyretic, antibacterial and antitumor. Fermentation of herbal medicine is known to increase the absorption, enhance effectiveness, decrease herbal toxicity and reduce side-effects. This study was performed to measure the effects of fermented *Lonicerae Flos* on influenza A/WSN (H1N1) virus replication.

Material and Methods : *Lonicerae Flos* was fermented by *Lactobacillus casei* PMI. Fermented *Lonicerae Flos* was treated for 12 hours to MDCK (Mardin Darby canine kidney) cells, then cell-virulence was observed by MTT assay for 12 hours, 24 hours, and 36 hours after treatment. Following cases were conducted for 0, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of fermented *Lonicerae Flos* under the same time-frame; the fermented *Lonicerae Flos* was treated to MDCK cells before and after contamination by A-type influenza virus. The fermented *Lonicerae Flos* and the virus were mixed directly. The influence was observed by MTT assay and plaque assay.

Results : These findings suggest that the fermented *Lonicerae Flos* inhibited the virulence of influenza A virus in MDCK cells and suppressed the plaque forming colonies induced by influenza A virus. Furthermore, pretreatment with fermented *Lonicerae Flos* was more effective than post-treatment. The titer of influenza virus was reduced for all before and after influenza A virus inoculation.

Key words : Ferment, *Lonicerae Flos*, Influenza virus A

1. 서론

인플루엔자는 매년 주로 겨울철인 12월에서 4월 사이에 유행되며 일단 지역적인 유행이 시작되면 6내지 8주간 지속되며, 금세기의 반복적인 대유행인 1918년의 스페인 독감, 1957년 아시아독감, 1968

년의 홍콩독감 등으로 그 때마다 많은 사망자와 사회 및 경제활동에 큰 영향을 미쳤다¹. 현재의 세계적인 상황을 고려하여 보면 다시 새로운 변형에 의한 대유행으로 상당한 피해가 예측되며 그 원인은 인구의 고령화와, 본래 가지고 있는 만성질환자들의 증가, 대도시에 밀집해 있는 생활환경등을 이유로 들고 있다².

인플루엔자에 대한 예방과 치료법은 백신과 항바이러스제가 있으며, 백신은 A와 B형 인플루엔자에는 효과적이거나 예방효과가 불완전하며, 새로운

· 교신저자: 정승기 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: jskes@unitel.co.kr

형태에 대해서는 무효하며, 항인플루엔자 바이러스제는 내성균주의 출현과 부작용 때문에 제한적으로 사용되고 있다³. 따라서 부작용이 적으며 새로이 출현한 인플루엔자 바이러스에도 감수성이 있는 항바이러스제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

이러한 이유로 최근 항인플루엔자 바이러스 활성을 갖는 물질을 천연물에서 찾으려는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 마늘⁴, 유자⁵ 및 잔나미 결상버섯⁶ 등을 이용한 실험에서 항인플루엔자 바이러스 효과가 보고되었다.

최근 발효한약이 새로운 약재개발의 한 방법으로 관심이 모아지고 있는데, 발효는 한의학에서는 수처 법제개념의 하나로 신국, 반하국, 담두시 등이 전통적으로 이용되어 왔는데 반하국은 그 법제에 따라 약품의 독성감소나 기능 강화 등의 목적으로 쓰여 왔고, 담두시도 대두를 발효를 통해 새로운 기능과 소화 흡수를 용이하게 하였다⁷. 이러한 전통 발효 한약은 비 단순 미생물을 이용한 자연 발효였으나 최근에는 균주를 이용한 발효방식을 사용하는 홍국^{8,9}, 발효삼¹⁰, 천마¹¹, 발효웃¹² 등이 효능의 우수성으로 임상에서 활용되고 있다. 이러한 발효방법을 이용하여 항인플루엔자 바이러스 효능이 강화된 한약물이 개발된다면 한의학의 발전뿐만 아니라 국민의 건강에도 도움이 될 것으로 생각된다.

금은화는 除熱, 解毒, 養血, 涼血, 療風, 除痢의 효과^{13,14}가 있으며, 약리학¹⁵적으로는 Luteolin, Inositol, Inesite, Tannin, Saponin 등이 함유되어있고, 해독, 항균, 항 virus 작용에 의한 항 감염작용의 효과가 실험적으로 밝혀져 있다. 그리고 지금까지 연구된 금은화에 대한 논문을 살펴보면 한¹⁶은 금은화 약침의 항암 및 면역 반응에 대해, 배¹⁷는 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화의 항균효과에 대해, 정¹⁸은 금은화가 천식유발cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향에 대해, 호¹⁹는 금은화의 면역 강화 기능에 대해, 구²⁰는 금은화의 억균 작용에 대해, 주²¹는 금은화의 항산화 작용에 대한

연구들이 발표되었다. 발효 금은화에 대한 연구로는 신²²의 자연 발효 금은화를 이용한 금은화 전탕 숙성도에 따른 억균 효과에 따른 실험보고가 있었다.

그러나 淸熱 解毒 기능과 면역증강 효과, 항균 및 항산화 효능을 가진 금은화의 항바이러스 효과에 대한 연구가 없었으며, 발효를 통한 효능증진을 기대하며, 이에 저자는 Lactobacillus casei PMI를 이용하여 만든 발효금은화를 이용하여 독감의 원인인 인플루엔자 바이러스에 대해 예방하고 치료하는 효능을 세포차원에서 비교 연구한 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 금은화 발효액

(1) 재 료

① 균 주

본 연구에서 사용한 균주는 특허균주인 Lactobacillus casei PMI(KCCM 10766P)로 프리메드(주, 서울, 한국)로부터 분양 받아 사용하였다.

② 배지 및 배양

유산균의 성장배지는 Modified MRS broth를 사용하였고, 금은화 발효배지의 조성은 Sun-ten사(Sun ten Laboratories, Inc. Taiwan)의 금은화(Lonicera japonica Thunberg)건조엑스 10%(w/v), 2%(w/v) glucose, 2%(w/v) Yeast extract 등으로 구성되어 있다. 배양온도는 37°C에서 행하여졌으며, 초기 배양시 유산소 환경(DO 5%)에서 200rpm의 속도로 배양하였다.

(2) 방 법

① 종균배양

동결 건조하여 분말 상태로 보관중인 L. casei PMI(KCCM 10766P)을 유산균 성장 배지인 멸균된 modified MRS broth 10ml에 현탁하여 37°C shaking incubator(덕산, 한국, IS-S709)에서 150rpm의 속도로 12시간 진탕배양 한 후, modified MRS

agar에 배양된 *L. casei* PM1(KCCM 10766P)을 streaking 후 single colony isolation 하여 modified MRS broth 100ml에 재접종하여 37°C shaking incubator(덕산, 한국, IS-S709)에서 150rpm의 속도로 20시간 진탕 배양하였다.

② 금은화 발효배지 제조

금은화건조엑스과립(Sun ten : Laboratories, Inc. Taiwan) 200g, glucose(덕산, 한국) 40g, yeast extract 20g, peptone 40g(이상 BD, USA), ammonium citric acid 4g, tween80 2g, sodium acetic acid 10g, MgSO₄·7H₂O 23g, MnSO₄·2H₂O 104.8g(이상 덕산, 한국)을 1.8L 멸균수가 들어있는 5L erlenmeyer flask에 혼합하여 magnetic stirrer (Corning, USA)에서 30분간 혼합 후 3L fermentor jar (B.braun, Gemany)에 주입하여 pH sensor 및 DO sensor를 상부에 삽입하여 121°C, 1.5기압, 20분 간 autoclave 하였다. 멸균과정 후 fermentor jar를 조심스럽게 꺼내어 fermentor 본체와 결합 후 냉각수와 0.5vvm의 air 및 발효조 내 impeller를 100rpm으로 agitation하여 37°C까지 급랭하였다.

③ 금은화 발효 및 발효액 채균

준비된 1.8 L의 금은화발효배지에 *L. casei* PM1(KCCM 10766P)가 포함된 종균배양액 200ml을 발효조 접종관을 이용해 접종하고, 37°C 100rpm으로 impeller 속도를 유지하여 3M NaOH를 이용해 pH를 6.5정도로 보정하고 12~18시간동안 aeration 없이 배양한다. 배양중 pH 4.5를 나타내면 발효를 중지하고 발효액을 200ml의 멸균된 centrifuge bottle (Nalgene, USA)에 넣고 9000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 회수하여 0.22 μm pore size filter system (Corning, USA)을 사용하여 제균하고 실험 전까지 4°C 냉장보관하였다.

2) 세포 및 바이러스

본 실험에서 사용된 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 세포는 37°C, 0.5% 이산화탄소의 환경으로 배양되었으며 배양액은 MEM (Minimal essential Medium; Gibco)에 10%우태아혈청(Fetal Bovine

Serum; Gibco)과 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였다. 배양된 세포는 3일마다 계대배양을 수행하였다. 본 연구에 사용된 virus는 A형 influenza virus (WSN, H1N1)로 세포와 바이러스 모두 연세대학교 응용생화학연구실에서 분주 받았으며 virus의 감염과 증폭을 위해서는 MDCK 세포를 사용하였다.

2. 방법

1) 금은화 발효액의 세포 독성 실험

금은화 발효액이 세포에 미치는 영향 및 독성 여부를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. 96-microplate (Nunc)에 각 well 당 약 1×10^4 개의 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 세포 단층이 형성된 후, 서로 다른 농도의 금은화 발효액 (0 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml, 1000 μg/ml, 10000 μg/ml)이 첨가된 100 μl/well MEM (10% FBS)으로 12시간 동안 처리하였다(37°C, 5% CO₂). 12시간 처리 후 발효액이 첨가되지 않은 신선한 MEM으로 교환한 후 발효액 처리 시점을 기준으로 각 12, 24, 36시간에서의 세포생존력을 측정하였다. 측정 방법은 Quanti-MTT™ cell viability assay kit (Bioassay systems, USA)를 이용하여 생산자가 제시한 방법에 따랐으며, 570nm에서의 흡광도 측정에는 microplate spectrophotometer (Molecular device, USA)를 사용하였다.

2) 금은화 발효액 처리에 따른 세포생존력 및 바이러스 복제효율 측정

(1) 금은화 발효액 전처리 후 세포생존력 및 바이러스 복제효율 측정

① MTT assay

Influenza virus 감염 전 금은화 발효액의 세포 독성 및 생존력 향상 여부를 확인하기 위하여 96-well microplate (Nunc)에 각 well 당 약 1×10^4 개의 MDCK 세포단층을 형성하였으며, 서로 다른 농도의 금은화 발효액(0 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml, 1000 μg/ml)을 100 μl/well의 양으로 12시간 동안 처

리한 후(37°C, 5% CO₂), 혈청을 첨가하지 않은 MEM으로 세척하였다. 이후 influenza virus A/WSN을 0.1 m.o.i의 농도로 접종하고 흡착 시간은 60분간(매 15분마다 rocking) 수행하였다. 감염 후 12, 24, 36시간이 되었을 때 Cell Quanti-MTTTM cell viability assay kit (Bioassay systems)를 이용하여 세포 독성 실험에서와 동일한 과정으로 세포의 생존력을 분석하였다. 570nm에서의 흡광도 측정에는 microplate spectrophotometer (Molecular device)를 사용하였다.

② Plaque assay

a. 바이러스 감염 및 상층액의 수거

플라크 측정분석을 위한 시료를 수거하기 위해 24-well plate (Nunc)의 각 well 당 약 1×10^5 개의 MDCK 세포단층을 형성하였다. 바이러스 감염 전 12시간 동안, 금은화 발효액이 각 농도별(0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml)로 첨가된 MEM(1 ml/well)에서 배양하였다. 12시간 후, 무혈청 MEM으로 세포를 세척하고 influenza virus A/WSN을 0.1 m.o.i의 농도로 접종하였다. 바이러스 흡착시간은 60분 동안 수행하였다(매 15분마다 rocking). 바이러스 흡착완료 후 12시간, 24시간, 36시간째에 세포 배양액을 수거하고 1000rpm, 4°C의 조건에서 3분간 원심분리하여 부유물을 제거한 다음, 상층액은 -70°C에 보관하였다.

b. 플라크 측정법의 수행 및 결과 확인

플라크 계수를 위해 35 mm 세포배양접시에 MDCK 세포단층을 형성하고 시료의 각 희석 비율마다 계수의 유의성을 최적화하기 위해 3개의 배양 접시에서 3회 중복(triplication) 플라크 계수를 수행하였다. 십진 희석(10-fold dilution)한 바이러스 액상 시료의 접종 전, 차가운 인산완충용액(PBS)으로 세포를 한 차례 씻어내었다. 60분간의 바이러스 흡착시간 후(매 15분마다 rocking) 1% 아가로오스, 0.1% 트립신(10mg/ml), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 30% 무혈청 MEM의 혼합액으로 2~3일간 배양하였다(37°C, 5% CO₂). 배양이 끝난

후 3.7% 포르말데히드(formaldehyde, Sigma-Aldrich) 용액으로 2시간 동안 세포를 고정시킨 다음, 아가로오스를 떼어내고 0.1% crystal violet 용액으로 약 40분간 염색하였다. 플라크의 개수는 대조군 바이러스 감염세포와 비교하여 육안으로 확인하였다.

(2) 금은화 발효액 후처리 후 세포생존력 및 바이러스 복제율 측정

① MTT assay

96-microplate (Nunc)의 각 well 당 약 1×10^4 개의 MDCK 세포단층을 형성하였으며 무혈청 MEM으로 한차례 가볍게 세척한 후 influenza virus A/WSN (0.1 m.o.i)을 접종하였다. 60분간의 바이러스 흡착 직후부터 서로 다른 농도의 금은화 발효액(0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml)을 MEM과 혼합 조성하여 100 μ l/well의 양으로 공급, 12시간 동안 처리하였다. 그 다음 금은화 발효액이 포함된 배양액을 제거하고 발효액이 첨가되지 않은 신선한 MEM(10% FBS)를 다시 공급하였다. 이후 바이러스 접종완료 시점을 기준으로 12, 24, 36시간째에 Cell Quanti-MTTTM cell viability assay kit (Bioassay systems)를 이용하여 세포 독성 실험에서와 동일한 과정으로 세포의 생존력을 분석하였다. 570nm에서의 흡광도 측정에는 microplate spectrophotometer (Molecular device)를 사용하였다.

② Plaque assay

a. 바이러스 감염 및 상층액의 수거

플라크 측정분석을 위한 시료를 수거하기 위해 24-well plate (Nunc)에 각 well 당 약 1×10^5 개 MDCK 세포의 단층을 준비하였다. 바이러스 접종 전 인산완충용액으로 한차례 가볍게 세포를 씻어준 다음, influenza virus A/WSN을 0.1 m.o.i의 농도로 접종하였고 바이러스 흡착시간은 60분 동안 수행하였다(매 15분마다 rocking). 이후 금은화 발효액이 각 농도별(0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml)로 첨가된 MEM (1ml/well)으로 12시간 동안 처리한 다음 배양액을 제거하고 금은화 발효액

이 첨가되지 않은 신선한 MEM (10% FBS)으로 다시 공급하였다. 바이러스 흡착완료 시점을 기준으로 각 12시간, 24시간, 36시간째에 세포 배양액을 수거하였다. 배양액은 1000rpm, 4°C 의 조건에서 3분간 원심분리하여 부유물을 제거하고 상층액을 -70°C 에 보관하였다.

b. 플라크 측정법의 수행 및 결과 확인

플라크 계수를 위해 35 mm 세포배양접시에 MDCK 세포단층을 형성하고 시료의 각 희석 비율마다 계수의 유의성을 최적화하기 위해 3개의 배양 접시에서 3회 중복(triplication) 플라크 계수를 수행하였다. 심진 희석(10-fold dilution)한 바이러스 액상 시료의 접종 전, 차가운 인산완충용액(PBS)으로 세포를 한 차례 씻어내었다. 60분간의 바이러스 흡착 후(매 15분마다 rocking) 1% 아가로오스, 0.1% 트립신 (10mg/ml), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 30% 무혈청 MEM의 혼합액으로 2~3일간 배양하였다(37°C, 5% CO₂). 배양이 끝난 후 3.7% 포름알데히드(formaldehyde, Sigma-Aldrich) 용액으로 2시간 동안 세포를 고정시킨 다음, 아가로오스를 떼어내고 0.1% crystal violet 용액으로 약 40분간 염색하였다. 플라크의 개수는 대조군 바이러스 감염세포와 비교하여 육안으로 확인하였다.

3) 바이러스 감염력에 대한 금은화 발효액의 직접적 간섭효과 측정

① Influenza virus와 금은화 발효액의 혼합 및 배양

이 실험에 사용된 금은화 발효액이 숙주세포에 대한 영향이 아닌, 바이러스 입자의 흡착 등 바이러스 입자 자체의 감염력에 직접적인 간섭 또는 상승효과를 나타내는 지 확인하였다. 바이러스 원액(2.5×10⁵ pfu/ml)과 금은화 발효액(2000µg/ml)이 첨가된 MEM (10% FBS) 배양액을 각 500µl씩 1:1로 혼합하여 대조군[동량의 바이러스 원액 및 MEM (10% MEM)을 1:1로 혼합]과 함께 37°C 항온수조에서 12시간 동안 배양하였다. 금은화 발효액의 농도는 최종적으로 본 실험에 사용된 바이

러스 농도에 적정하게 조정된 수치이다. 실험군과 대조군의 각 용액은 무혈청 MEM을 사용하여 5단계에 걸쳐 연속 심진희석을 수행하였고 각 희석용액은 플라크 계수분석에 사용되었다.

② Plaque assay

35mm 세포배양접시(Nunc)에 형성된 MDCK 세포단층을 차가운 인산완충용액으로 한차례 가볍게 씻어준 후 위에서 심진희석된 바이러스 용액을 각 200µl 씩 접종하였다. 60분간의 바이러스 흡착 시간 후(매 15분, rocking) 1% 아가로오스, 0.1% 트립신(10mg/ml), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 30% 무혈청 MEM의 혼합액으로 2~3일간 배양하였다(37°C, 5% CO₂). 배양이 끝난 후 3.7% 포름알데히드(formaldehyde, Sigma-Aldrich)로 세포를 2시간 동안 고정시킨 다음, 아가로오스를 떼어내고 0.1% crystal violet 용액으로 약 40분간 염색하였다. 플라크의 개수는 대조군 바이러스 감염세포와 비교하여 육안으로 확인하였다.

III. 결 과

1. 금은화 발효액의 세포 독성 결과

금은화 발효액의 항바이러스 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하기에 앞서 본 실험에 사용하게 될 금은화 발효액이 세포에 미치는 영향 및 독성 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 금은화 발효액 10, 100, 1000, 10000µg/ml 농도에서는 시간의 변화에 의해서도 세포독성이 나타나지 않았고, 대조군과 비교한 결과 10, 100, 1000µg/ml 농도에서는 오히려 세포의 생존율 향상 효과를 가지는 것으로 나타났다. 특히 1000µg/ml 농도에서 지속적으로 가장 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 금은화 발효액 10000µg/ml 농도에서 세포 생존율이 24시간 이후부터는 약간 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 금은화 발효액처리 결과 10, 100, 1000µg/ml 농도에서는 세포 생존율 수치가 높게 나타나 이후에 수행할 금은화

발효액의 influenza virus 감염에 대한 효과 실험의 적용 농도는 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이라 판단되었다.

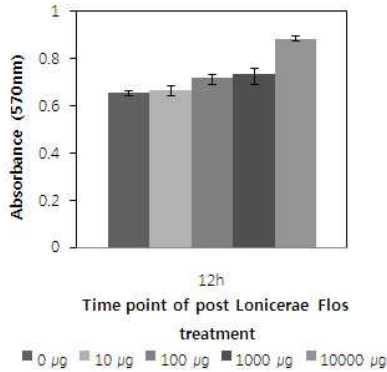


Fig. 1. MTT cell viability assay(12h)

Effects of the fermented *Lonicerae Flos* in MDCK cells at 12 hours. The cells were cultured with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration (0, 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density at 570 nm was measured with the microplate spectrophotometer (Molecular device).

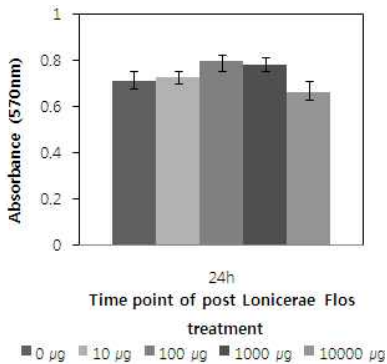


Fig. 2. MTT cell viability assay(24h)

Effects of the fermented *Lonicerae Flos* in MDCK cells at 24 hours. The cells were cultured with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration (0, 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density at 570 nm was measured with the microplate spectrophotometer (Molecular device).

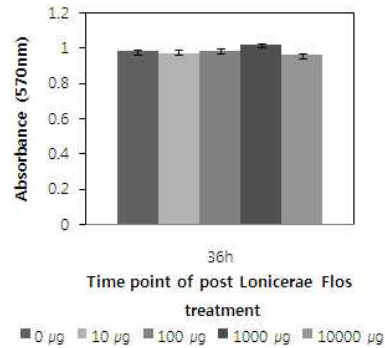


Fig. 3. MTT cell viability assay(36h)

Effects of the fermented *Lonicerae Flos* in MDCK cells at 36 hours. The cells were cultured with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration (0, 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density at 570 nm was measured with the microplate spectrophotometer (Molecular device).

2. 금은화 발효액 처리에 따른 세포생존력 및 바이러스 복제를 측정

1) 금은화 발효액 전처리 후 세포생존력 및 바이러스 복제를 결과

(1) MTT assay 결과

금은화 발효액의 바이러스 예방 효과의 가능성을 확인해 보기 위하여 바이러스 감염 전 12시간 동안 금은화 발효액을 각 농도별(0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 다음 이후 바이러스 감염에 대한 세포의 생존력 향상 여부를 MTT assay를 통해 확인하였다. 정상군과 대조군을 비교한 결과 대조군인 바이러스 단독 처리군의 세포생존을 수치가 약간 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 금은화발효액 전처리군인 실험군과 정상군을 비교해보았을 때, 실험군이 12시간에서는 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 모든 농도에서 오히려 세포 생존을 수치가 증가 하였으나, 24시간과 36시간에서는 정상군에 비해 약간 세포 생존을 수치가 감소하는 경향을 있다는 것을 확인할 수 있었다. 실험군과 대조군을 비교하였을 때는 실험군에서 12시간과 24시간 까지는 생존을 수치

가 증가하는 경향을 보였으며, 36시간 때는 1000 μ g/ml 농도에서만 생존율 수치가 증가하는 것을 볼 수 있었고 다른 농도에서는 차이를 보이지 않았다. 그리고 금은화 발효액의 농도별로 비교하였을 때는 대체로 농도가 증가함에 따라 세포 생존율 수치도 비례하여 증가하였다. 그러나 MTT assay 결과만으로는 금은화 발효액 처리에 따른 바이러스 억제에 의한 세포생존력의 향상을 판단하기에는 무리가 있다고 판단되었고 보다 정확한 바이러스 억제 효과를 확인하기 위해서 발효액의 영향으로 인해 감소된 바이러스의 수를 직접 측정할 수 있는 플라크 측정법을 수행하였다.

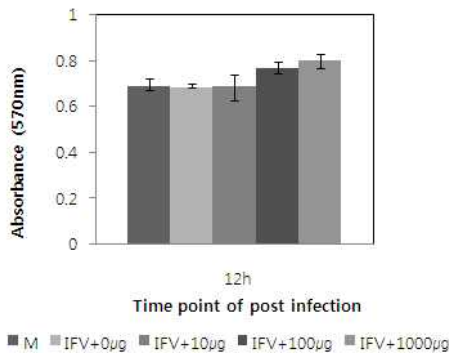


Fig. 4. MTT cell viability assay(12h)

Effects of pre-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 12 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were incubated with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours. The cells were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i and incubated for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570 nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

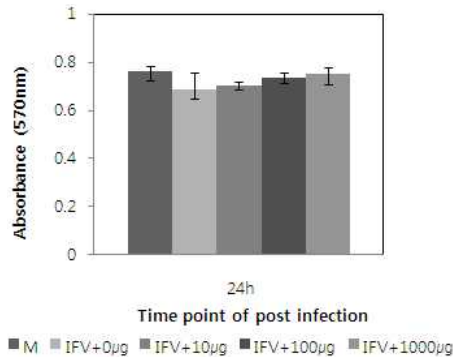


Fig. 5. MTT cell viability assay(24h)

Effects of pre-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 24 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were incubated with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours. The cells were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i and incubated for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570 nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

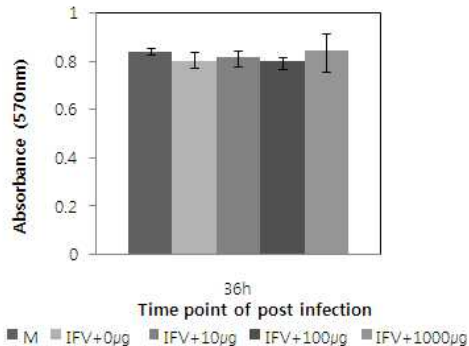


Fig. 6. MTT cell viability assay(36h)

Effects of pre-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 36 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were incubated with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours. The cells were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i and incubated for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570 nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

(2) Plaque assay 결과

금은화 발효액에 의한 바이러스 예방효과의 가능성을 확인하기 위해서 바이러스 감염 전 12시간 동안 금은화 발효액을 각 농도별로 처리한 다음 이후 바이러스 감염에 대한 세포의 저항성 및 바이러스 억제 효과를 플라크 측정법을 통해 확인하였다. 금은화 발효액 미처리군의 결과를 살펴보면 24시간 때 바이러스 titer가 8.2×10^3 pfu/ml 로 최대 수치가 나타났고, 오히려 36시간 때는 오히려 줄어드는 경향이 있으므로, 24시간 때가 바이러스의 생식의 최고치로 생각되며, 이 시점이 금은화 발효액의 항바이러스 효과를 판단하기 좋은 시기라 생각되었다. 바이러스 감염 후 12시간째 금은화 발효액 10, 100, 1000 μ g/ml 농도에서 모두 바이러스

titer 가 감소함을 보였으며, 24시간 때는 100 μ g/ml 농도에서는 6%의 바이러스 titer 감소율을, 1000 μ g/ml 농도에서는 27%의 바이러스 titer 감소율을 보였다. 36시간 때에는 10, 100, 1000 μ g/ml 모든 농도에서 바이러스 titer가 감소하였으며, 특히 100 μ g/ml 농도에서 가장 많은 46%의 감소율을 보였다. 따라서 본 실험 결과 바이러스 감염 전 발효액을 처리함으로써 바이러스 감염에 대한 세포의 저항능력이 향상되었음을 대조군에 비해 바이러스 수가 크게 감소된 것을 통해서 확인할 수 있었다. 또한 100-1000 μ g/ml 정도를 처리하였을 때 바이러스 억제 효과가 상대적으로 크게 나타나는 것으로 판단되었으며 특히 1000 μ g/ml의 농도가 가장 효과적으로 생각 되었다.

Table 1. Inhibitory Effects of Pre-treatment of the Fermented *Lonicerae Flos* on Influenza Virus Titer

| Concentration (μ g/ml) | 12 h | | 24h | | 36h | |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) |
| 0 | 6.2×10^2 | 0 | 8.2×10^3 | 0 | 7.0×10^3 | 0 |
| 10 | 1.6×10^2 | 74 | 9.6×10^3 | 0 | 7.6×10^3 | 19 |
| 100 | 3.8×10^2 | 39 | 7.7×10^3 | 6 | 3.8×10^3 | 46 |
| 1000 | 5.2×10^2 | 16 | 6.0×10^3 | 27 | 6.5×10^3 | 7 |

2) 금은화 발효액 후처리 후 세포생존력 및 바이러스 복제율 결과

(1) MTT assay 결과

금은화 발효액의 바이러스 치료 효과의 가능성을 확인해 보기 위하여 바이러스를 0.1 m.o.i로 감염시킨 후 12시간 동안 금은화 발효액을 각 농도별 (0, 10, 100, 1000 μ g/ml)로 처리한 다음 이후 금은화 처리에 따른 바이러스 감염에 대한 세포의 생존력 향상 여부를 MTT assay를 통해 확인하였다. 정상군과 대조군인 바이러스 단독 처리군을 비교한 12시간 때는 대조군의 세포 생존율이 높았으나 시간이 지남에 따라 대조군의 생존수치가 약간 감소하였다. 실험군인 금은화발효액 후처리군과 대조군을

비교해보았을 때, 12시간 때에 10 μ g/ml 농도에서는 오히려 세포 생존율이 약간 감소하였고, 24시간과 36시간에서는 대조군에 비교하였을 때에 세포생존율이 약간 감소하거나 비슷한 생존수치를 보여 대조군과 실험군 사이의 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 그리고 금은화 발효액의 농도별로 비교하였을 때는 12시간과 24시간 까지는 대체로 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 비례하여 증가하였으나, 36시간에는 비슷한 세포 생존수치를 보였다. 따라서 MTT assay 결과만으로는 금은화 발효액 처리에 따른 바이러스 억제에 의한 세포 생존력의 향상을 판단하기에는 무리가 있다고 판단되어 위의 실험과 마찬가지로 발효액으로 인해 감소된 바

이러스의 수를 직접 측정할 수 있는 플라크 측정법을 수행하여 확인하고자 하였다.

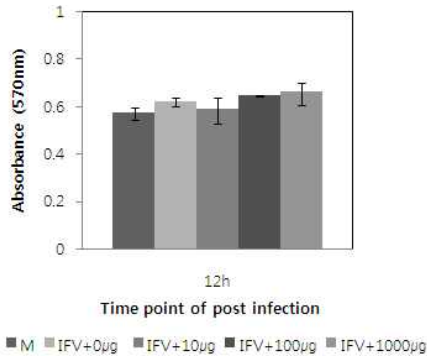


Fig. 7. MTT cell viability assay(12h)

Effects of post-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 12 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i. After 1 hours, the cells were incubated with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours and replaced new MEM medium for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

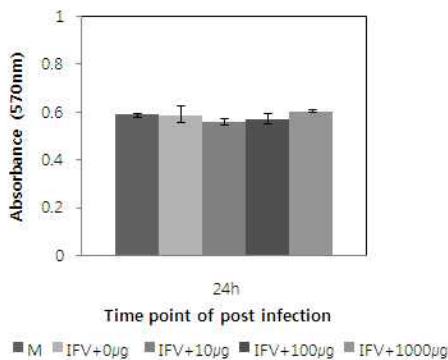


Fig. 8. MTT cell viability assay(24h)

Effects of post-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 24 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i. After 1 hours, the cells were incubated with MEM medium containing

each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours and replaced new MEM medium for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

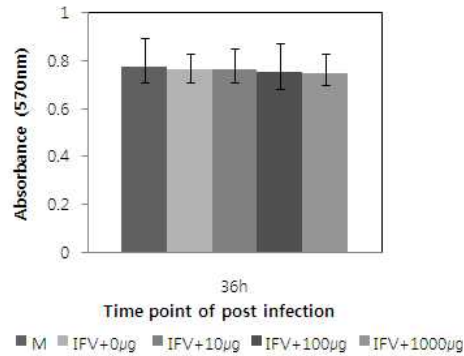


Fig. 9. MTT cell viability assay(36h)

Effects of post-treatment of the fermented *Lonicerae Flos* on influenza virus-infected MDCK cells at 36 hours. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well plates were infected with influenza A/WSN (H1N1) virus at 0.1 m.o.i. After 1 hours, the cells were incubated with MEM medium containing each *Lonicerae Flos* in various concentration for 12 hours and replaced new MEM medium for the indicated time. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density (570nm) was measured with the microplate spectrophotometer.

(2) Plaque assay

금은화 발효액에 의한 바이러스 치료효과의 가능성을 확인하기 위해서 바이러스 감염 후 12시간 동안 금은화 발효액을 각 농도별로 처리한 다음 이후 바이러스 감염에 대한 세포의 저항성 및 바이러스 억제 효과를 플라크 측정법을 통해 확인하였다. 금은화 발효액 미처리군의 결과를 살펴보면 24시간때 바이러스 titer가 1.1×10^4 pfu/ml 로 최대 수치가 나타났고, 오히려 36시간 때는 오히려 줄어드는 경향이 있으므로, 24시간 때가 바이러스의 생성의 최고치로 생각되며, 이 시점이 금은화 발효액의 항바이러스 효과를 판단하기 좋은 시기라 생각

되었다. 바이러스 감염 후 12시간째 금은화 발효액 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 바이러스 titer가 감소하였고, 24시간 때는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 25%의 바이러스 titer 감소율을, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 80%의 바이러스 titer 감소율을 보였다. 36시간 때에는 오히려 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 19%의 바이러스 titer 감소율을 보였다. 이러한 결과를 통하여 바이러스 복제를 효과적으로 억제할 수 있는 금은화 발효액 농도는 10~1000 $\mu\text{g/ml}$ 으로 판단되었고, 특히 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 가장 효과적으로 생각

되었다. 그러나 감염 전 발효액 처리 실험결과와 달리 금은화 발효액 처리에 따른 바이러스 수의 감소가 시간이 지남에 따라 지속적으로 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이 실험결과 의 정확성을 높이고 발효액의 치료 효과 가능성 여부를 보다 확실하게 판단하고자 바이러스 원액 과 금은화 발효액을 혼합하여 발효액이 바이러스 입자에 주는 직접적인 간섭효과를 혼합 전/후 변 화된 감염력 있는 바이러스 수의 차이로 확인하고 자 하였다.

Table 2. Inhibitory Effects of Post-treatment of the Fermented *Lonicerae Flos* on Influenza Virus Titer.

| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | 12h | | 24h | | 36h | |
|------------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) | Titer (pfu/ml) | Decrease Rate of Titer (%) |
| 0 | 5.6×10^2 | 0 | 1.1×10^4 | 0 | 6.4×10^3 | 0 |
| 10 | 3.9×10^2 | 30 | 8.2×10^3 | 25 | 5.2×10^3 | 19 |
| 100 | 2.1×10^2 | 62 | 1.3×10^4 | 0 | 1.6×10^4 | 0 |
| 1000 | 3.0×10^2 | 46 | 2.2×10^3 | 80 | 7.5×10^3 | 0 |

3. 바이러스 감염에 대한 금은화 발효액의 직접적 간섭효과 확인

금은화 발효액의 치료효과 가능성 여부를 보다 정확하게 판단하기 위해서 바이러스 원액과 금은화 발효액을 각각 1:1 동일비율로 혼합하여 감염력 있는 바이러스 입자에 대한 발효액의 직접적인 간섭 효과를 확인하고자 하였다. 바이러스 원액과 발효액의 혼합물은 12시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후 플라크 측정법을 수행하여 반응 전과 후의 변화된 감염력 있는 바이러스 역가의 차이를 확인하였다. 바이러스 단독 처리군과 바이러스와 10% MEM 동시 처리군을 비교한 결과 바이러스 titer의 수가 오히려 약 94% 감소하였고, 바이러스와 10% MEM 동시 배양한 군과 바이러스와 10% MEM 및 금은화 발효액을 동시에 배양한 군을 비교하면 바이러스와 10% MEM을 함께 배양한 군보다 바이러스 titer 수가 50% 감소하였다. 바이러

스 단독 처리군보다 바이러스와 10% MEM 동시 처리군에서 바이러스 titer 수가 약 94%가 감소한 것은 MEM에 포함된 10%의 serum에 의한 영향일 것으로 추정된다. 그러나 바이러스와 10% MEM 동시 처리군과 비교한 금은화 발효액에 의한 50%의 감소는 MEM(10% FBS)배지에 의한 바이러스 원액의 감소율(94%)과 금은화 발효액 처리에 의한 감소율(97%)과의 차이인 3% 범위 내에 속하므로 사실상 미비한 차이임을 알 수 있었다.

Table 3. Inhibitor Effects of *Lonicerae Flos* and MEM (10% FBS) on Influenza Virus Titer

| Material | Titer (pfu/ml) |
|--|-------------------|
| virus | 1.0×10^4 |
| virus +MEM* (10% FBS) | 6.2×10^2 |
| virus +MEM* (10% FBS) + <i>Lonicerae Flos</i> | 3.0×10^2 |

*Minimal Essential Media

IV. 고찰

최근 발효한약이 새로운 약재개발의 한 방법으로 관심이 모아지고 있다. 발효란 미생물이 자신이 가지고 있는 효소(enzyme)를 이용하여 유기물을 산화, 환원 또는 분해 합성 시키는 반응으로, 발효에 관여하는 미생물에는 세균, 효모, 곰팡이²³ 등이 있다. 이런 발효의 장점은 발효시 생산되는 알코올, 젖산, 아세트산이 영양소의 파괴를 막고, 아울러 부패를 막는 천연 방부제 역할을 한다. 또한 유산균이 내는 항균물질로 유해균을 죽이거나 증식을 억제함으로써 유익한 균이 우세한 장내 세균총의 균형을 유지하여 장염, 변비를 개선시킨다²⁴. 또한 면역기능을 강화 시켜주며 활성 산소를 몸 밖으로 배출해 암을 예방하며, 이 외에 발효과정을 통해 소화, 흡수가 용이해지며 원료 물질이 가지는 독소물질도 양이 줄거나 완전히 사라지는 장점이 있다²⁵.

이러한 발효는 한의학에서는 수치 법제개념의 하나로 신국, 반하국, 담두시 등이 전통적으로 이용되어 왔는데, 신국은 육신국과 홍국으로, 반하국은 해분반하국, 초황반하국, 향부자, 창출, 천궁 등과 같이 법제한 개울반하국, 우담과 법제한 우담반하국, 조각자와 법제한 조각반하국, 생강과 법제한 생강반하국, 마유와 법제한 마유반하국, 죽력과 법제한 죽력반하국등이 있고, 두시는 담두고와 함두시가 있다²⁶. 이 중 반하국을 예로 들면, 혼합된 약재에 따라 망초와 혼합된 초황 반하국을 중풍졸궤이나 상한하여 열광증을 보이는 것이 담탁에 기인하였을 때 사용하였고, 개울 반하국은 향부자, 창출, 천궁 등과 혼합 발효하여 울담을 치료하는데 사용하였으며, 우담 반하국은 우담즙에 반하를 혼합 발효하여 전간이나 풍담을 치료하였다. 이와 같이 발효를 통해 독성을 감소시키거나 약성을 강화시키고 새로운 약효를 얻을 수 있었다. 이런 비균주를 이용한 전통 발효 한약과 달리 최근에는 균주를 이용하여 발효과정을 거친 발효한약의 활발한 연구와 더불어 임상에서 활용되고 있는데, 국내

발효한약의 동향을 살펴보면 인삼을 열 가수 분해하여 홍삼 사포닌을 유도하고 다시 장내 미생물로 효소 가수분해하여 배당체 구조의 비활성 사포닌을 탈당체 구조의 활성 사포닌으로 전환시켜 장에서 쉽게 흡수되고 세포내에서 바로 이용할 수 있는 발효인삼¹⁰이나 황국균으로 발효하여 참 옷의 피부 알러지 유발물질인 urushiol을 불활성화 시켜 독성을 제거한 발효 건칠액¹²이나 홍국과 같이 발효과정을 거쳐 Mevinolin에서 Mevinolic acid의 새로운 물질을 생성하여 부작용 없이 혈중 콜레스테롤을 저하시키는데 사용되고 있다^{8,9}. 이외에도 청뇌작용으로 고혈압, 중풍 치매에 활용할 수 있는 발효 천마¹¹ 등이 있다.

중국의 발효현황을 살펴보면 董²⁷은 진균을 이용해 삼칠근을 발효하여 주요성분인 Gensenoside Rb1과 Rg1이 전변되어 새로운 성분 Rg3와 Rh1이 생산되어 신경 성장을 촉진하는 새로운 약효를 발견했고, 鄭²⁸은 오배자를 발효하여 gallic acid이 생성됨으로써 항균 항virus 항진균 항암 항알레르기 및 기관지 확장 등 새로운 약리작용을 발견하였다. 또한 王²⁹은 황기를 발효하여 약효가 현저한 증가를 보여 전통적인 추출물에 비해 정상 실험쥐의 비장 지수의 현저한 향상을 보였다.

Influenza virus는 A, B, C형으로 분류되며 유행성 질환은 A, B형에 의해 발생하는데, 1-2일의 잠복기 이후에 발열, 두통, 근육통 등의 전신증상과 인후통, 기침, 객담 등의 호흡기 증상을 보이면서 신속한 전파와 높은 이환율을 보인다. 이런 A형 독감 바이러스의 유행주들은 돼지, 말, 조류 등에 감염되어 심각한 호흡기도 감염증을 일으키는데, 독감 바이러스의 중간 전파가 유행성 독감의 원인이 되어 1918년 스페인 독감 같은 많은 사상자를 발생시키기도 했다. 그러나 vaccine에 의한 예방 외에 세포의 영향을 주지 않으면서, virus만 공격하는 유효한 화학요법제는 개발되지 않고 있다³⁰.

기존의 항바이러스 약제가 일부 독감 바이러스 종에 대해 효과를 보이지 않으며, 변종 바이러스가

생겨 약효를 나타내지 못하고 있는 가운데 천연물에 의한 항바이러스 약제 발견을 위해 국내외에서 활발한 연구가 진행되고 있다. 그 중 국외에서는 Turan K.³¹ 등은 *sanicula europaea* 추출물이 influenza virus에 활성이 있다고 보고하였으며, Sakagami H.³² 등은 *pinus parviflora*에서 분리된 lignin의 항바이러스 작용에 대해 보고하였고, Nagai T.³³ 등은 *sculellaria baicalensis*에서 분리된 isoscutellarein이 virus를 억제한다고 보고하였다.

국내에서는 박무현⁴ 등이 마늘이 influenza virus에 방어효과가 있다고 보고하였으며, 전원경⁵ 등이 유자에서 항바이러스 활성을 측정하여 유효한 결과를 얻었고, 정선식⁶ 등은 잔나비겉상버섯의 수용성 물질에서 항바이러스 효과를 얻는 실험을 보고하였다.

금은화는 인동과에 속한 낙엽활엽의 만목인 인동덩굴의 화관이다. 그 형태는 담황색 또는 황갈색을 띤 장두두상의 순형화인데 그 색이 백색인데 점차 심황색으로 변하기 때문에 금은화의 명칭이 생겼다. 性은 平無毒하고 味는 甘하다. 肺, 胃, 心, 脾 四經으로 歸經하여 清熱, 解毒 으로 쓰이는데, 그 主治는 除熱, 解毒, 養血, 涼血, 療風, 除痢, 久服則 補虛, 延年益壽한다. 약리학적으로는 luteolin, inositol, inosite, tannin, saponin 등이 함유되어 있는데, in vitro에서는 황색 포도구균, 용혈성 연쇄구균, 적리균, 장티푸스균, 뇌척수막염구균, 폐렴쌍구균 등에 억제작용이 있으며 ethyl alcohol 추출물 십만분의 일의 농도에서 결핵균을 억제할 수 있는 광 spectrum 항균약일뿐 아니라 in vitro 내에서 철수색백선균 등에 대한 억제 작용이 있다¹⁵.

지금까지 금은화에 대한 많은 연구 논문이 발표되었는데 한¹⁶은 금은화 약침의 항암 및 면역 반응에 대해, 배¹⁷는 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화의 항균효과에 대해, 정¹⁸은 금은화가 천식유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxids에 미치는 영향에 대해, 호¹⁹는 금은화의 면역 강화 기능에 대해, 구²⁰는 금은화의 억균작용에 대해, 주²¹는 금은

화의 항산화 작용에 대한 연구들이 발표되었다. 발효 금은화에 대한 연구로는 신²²의 자연 발효 금은화를 이용한 금은화 전탕 숙성도에 따른 억균 효과에 따른 실험보고가 있다.

본 연구에서는 소염 항균작용을 가진 대표적 약재 중의 하나인 금은화의 항균효능이 발효라는 과정을 통하여 좀 더 향상된 약효의 변화를 기대하면서 금은화를 *Lactobacillus casei* PMI을 이용하여 발효한 발효금은화가 발열, 두통, 인후통, 기침, 전신 지열통 등의 임상적 특징을 보이는 독감의 원인균인 influenza virus에 대한 예방 및 치료 효능을 세포 차원에서 관찰 하고자 하였다.

실험 연구에서는 금은화 발효액의 세포 독성 실험, influenza virus 감염 전, 후의 금은화 발효액 처리 후 세포생존력 및 바이러스 복제율 차이, influenza virus와 금은화 발효액의 혼합 및 배양에서의 항바이러스 작용 등을 연구 관찰 하였다.

우선 금은화 발효액의 세포 독성 결과를 보면, 금은화 발효액 10, 100, 1000, 10000 μ g/ml 농도에서는 시간의 변화에 의해서도 세포독성이 나타나지 않았다. 금은화 발효액 10, 100, 1000 μ g/ml 농도에서는 오히려 세포의 생존력 향상 효과를 가지는 것으로 나타났으나 금은화 발효액 10000 μ g/ml 농도의 경우에는 세포생존력이 24시간 이후부터는 약간 낮아진 것을 확인할 수 있어, 이후에 수행할 금은화 발효액의 influenza virus 감염에 대한 효과 실험의 적용 농도는 10, 100, 1000 μ g/ml이라 판단되었다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

다음으로 금은화의 influenza virus 감염에 대한 예방효과를 알아보기 위하여 금은화 발효액을 전처치한 후 MTT assay 방법으로 분석한 결과, 금은화발효액 전처치군은 12시간과 24시간 까지는 대조군에 비해 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였으며, 36시간 때는 1000 μ g/ml 농도에서만 세포 생존율이 증가하는 것을 볼 수 있었고 다른 농도에서는 대조군과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6).

MTT assay 결과만으로는 금은화 발효액 전처리에 따른 바이러스 억제에 의한 세포 생존력의 향상 및 바이러스 예방효과를 판단하기에는 무리가 있어 다시 plaque assay 법으로 분석한 결과, 바이러스 감염 후 12시간째 금은화 발효액 10, 100, 1000 μ g/ml 농도에서 모두 바이러스 titer 가 감소함을 보였으나 이 시기에는 virus의 복제가 충분히 이루어지지 않은 시간대 이므로 발효 금은화의 virus억제 효과를 인정하기는 어렵다. Virus복제가 최대치에 도달한 24시간 때는 100 μ g/ml 농도에서는 6%의 바이러스 titer 감소율을, 1000 μ g/ml 농도에서는 27%의 바이러스 titer 감소율을 보였다. 36시간 때에는 10, 100, 1000 μ g/ml 모든 농도에서 바이러스 titer가 감소하였으며, 특히 100 μ g/ml 농도에서 가장 많은 46%의 감소율을 보였다(Table 1).

이러한 결과를 통하여 바이러스 titer가 최대 수치로 나타난 24시간 째를 중심으로 분석한다면 바이러스 복제를 효과적으로 억제할 수 있는 금은화 발효액 농도는 100~1000 μ g/ml 으로 판단되었고, 특히 1000 μ g/ml 농도가 가장 효과적일 것으로 생각 되었다.

감염 후 금은화 발효액의 치료 효능을 알아보기 위하여 금은화 발효액을 바이러스 감염후 처치 한 후 MTT assay법으로 분석한 결과, 금은화발효액 후처리군과 대조군을 비교해보았을 때, 12시간에서는 10 μ g/ml 농도에서 오히려 세포 생존율이 약간 감소하였고, 24시간과 36시간에서 대조군과 비교하였을 때는 세포생존율이 약간 감소하거나 비슷한 생존수치를 보여 대조군과 실험군 사이의 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9).

따라서 MTT assay 결과만으로는 금은화 발효액 처리에 따른 바이러스 억제에 의한 세포 생존력의 향상과 치료효과를 판단하기에는 무리가 있다고 판단되어 위의 실험과 마찬가지로 발효액으로 인해 감소된 바이러스의 수를 직접 측정할 수 있는 plaque assay를 수행하여 확인하고자 하였다.

Plaque assay법으로 분석한 결과, 바이러스 감염

후 12시간째 금은화 발효액 10, 100, 1000 μ g/ml 농도에서 모두 바이러스 titer 가 감소함을 보였으나 이 시기에는 virus의 복제가 충분히 이루어지지 않은 시간대 이므로 발효 금은화의 virus억제 효과를 설명하기는 어렵다. virus복제가 최대치에 도달한 24 시간 때는 10 μ g/ml 농도에서는 25%의 바이러스 titer 감소율을, 1000 μ g/ml 농도에서는 80%의 바이러스 titer 감소율을 보였다. 36시간 때에는 오히려 10 μ g/ml의 농도에서만 19%의 바이러스 titer 감소율을 보였다(Table 2). 이러한 결과를 통하여 바이러스 titer가 최대 수치로 나타난 24시간 째를 중심으로 분석한다면 바이러스 복제를 효과적으로 억제할 수 있는 금은화 발효액 농도는 10~1000 μ g/ml 으로 판단되었고, 특히 1000 μ g/ml 의 농도가 가장 효과적으로 생각되었다. 그러나 감염 전 발효액 처리 실험결과와 달리 금은화 발효액 후처리에 따른 바이러스 수의 감소가 시간이 지남에 따라 지속적으로 나타나지 않았다.

이로써 예방효과와 관련된 감염 전 처리의 경우 금은화 발효액에 의한 세포 자체의 생리적 변화일 가능성이 높고, 치료효과와 관련된 감염 후 처리의 경우는 virus 흡착시간 1시간 후 바로 금은화 발효액을 처리하였기 때문에 1시간 내에 미처 세포 안으로 들어가지 못했던 virus와 복제시기(10-12시간 소요)를 거쳐 일정시간 후 세포 밖으로 나오는 virus가 금은화 발효액에 영향을 받은 것이라 추정 할 수 있다.

이 실험결과와 정확성을 높이고 발효액의 치료 효과 가능성 여부를 보다 확실하게 판단하기 위해서는 바이러스 원액과 금은화 발효액을 혼합하여 발효액이 바이러스 입자에 주는 직접적인 간섭효과를 혼합 전/후 변화된 감염력 있는 바이러스 수의 차이로 확인하는 것이 필요하다.

금은화 발효액이 인플루엔자 바이러스 입자에 직접적인 영향을 주어 바이러스의 감염력에 영향을 줄 수 있는가를 판단하기 위하여 인플루엔자 바이러스와 금은화 발효액의 혼합 및 배양 후

plaque assay한 결과, 바이러스 단독 처리군과 바이러스와 10% MEM 동시 처리군을 비교한 결과 바이러스 titer의 수가 오히려 약 94% 감소하였고, 바이러스와 10% MEM 배양한 군과 바이러스와 10% MEM 및 금은화 발효액을 동시에 배양한 군을 비교하면 10% MEM 만을 함께 배양한 군보다 바이러스 titer 수가 50% 감소하였다(Table 3). 바이러스 단독 처리군보다 바이러스와 10% MEM 동시 처리군에서 바이러스 titer 수가 약 94 % 가 감소한 것은 MEM에 포함된 10%의 serum에 의한 영향일 것으로 추정된다.

그러나 바이러스와 10% MEM 동시처리군과 비교한 금은화 발효액에 의한 50%의 감소는 MEM (10% FBS)배지에 의한 바이러스 원액의 감소율(94%)과 금은화 발효액 처리에 의한 감소율(97%)과의 차이인 3% 범위 내에 속하므로 사실상 미비한 차이임을 알 수 있었다.

이러한 실험 결과를 통해서 사용배지인 MEM (10% FBS)내에 포함된 단백질을 비롯한 여러 유기물질들이 바이러스 역가 감소에 크게 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었고, 금은화 발효액에 의해 역가 감소율이 보다 증가 될 수 있다는 것을 확인하였다.

결과적으로 본 실험에서 사용한 금은화 발효액 (10% FBS가 포함된 MEM 배지에 희석한)은 인플루엔자 바이러스 입자에 직접적인 물리-화학적 영향을 줄 수 있다는 것을 추정할 수 있었다. 즉 발효액과 virus 입자를 직접적으로 만나게 하여 virus의 침투 과정인 virus의 HA단백질과 sialic acid를 가진 세포 수용체와의 결합을 금은화 발효액이 방해하거나 virus의 HA단백질과 유사한 구조를 가짐으로써 세포 수용체에 붙는 가능성을 추정해 볼 수 있다³⁰.

본 실험은 금은화 발효액이 인플루엔자 바이러스에 대해 예방과 치료 차원에서 어떻게 반응하는가를 알기위해 전후 처리로 나누어 진행하였다. 이것은 세포 차원에서의 결과이고 인체에 있어서는

바이러스에 감염된 후 금은화를 투여하더라도 전처리 과정에서 보았듯이 건강한 세포에 인플루엔자 바이러스가 복제, 흡착되는 것을 금은화 발효액이 차단시키는 효과를 기대할 수 있다. 이는 인플루엔자 바이러스에 의한 독감에 금은화 발효액이 인플루엔자 바이러스 복제를 효과적으로 억제하여 더 이상 병증의 진행을 막는 예방적인 효과와 치료 효과를 기대할 수 있다고 생각한다.

차후 금은화 발효액이 바이러스 복제 과정의 부착단계, 복제단계, 단백질 발현단계, 방출단계 중 어느 단계에 작용하는 지에 대한 추가실험이 요구된다.

IV. 결론

소염 항균작용을 가진 대표적 약제 중의 하나인 금은화를 *Lactobacillus casei* PMI을 이용하여 발효한 발효 금은화가 독감의 원인균인 influenza virus에 대한 예방 및 치료 효능을 세포 차원에서 관찰 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 금은화 발효액을 농도별로 실시한 세포 독성검사에서 10, 100, 1000, 10000 μ g/ml 농도에서는 세포독성을 보이지 않았다.
2. Influenza virus 감염 전후 금은화 발효액을 투여한 결과 virus 복제를 억제 시키는 효과적인 농도와 시간은 1000 μ g/ml와 24시간 쯤이며, 전처리의 경우는 27%, 후처리의 경우는 80%의 감소율을 보였다.
3. Influenza virus와 금은화 발효액을 직접 혼합하여 실험한 결과 virus 복제 억제 효과가 있었다.

참고문헌

1. 손영모. 인플루엔자 바이러스. 대한의사협회지. 1998;41(3):281-9.

2. From the Centers for Disease Control and Prevention. Update : influenza activity-United States, 1996-97 season. JAMA. 1997;19:277(7):528.
3. Schilling M, Povinelli L, Krause P, Gravenstein M, Ambrozaitis A, Jones HH, et al. Efficacy of zanamivir for chemoprophylaxis of nursing home influenza outbreaks. Vaccine. 1998 Nov;16(18):1771-4.
4. 박무현, 永井勝次, 하상도, 김건희. 감기바이러스 감염에 대한 마늘의 효과. 한국식품영양과학지. 2000;29(1):128-33.
5. 전원경, 김호경, 고병섭. 유자의 항 Influenza 바이러스 A형 활성에 관한 연구. 생약학회지. 2000;31(1):82-6.
6. 정선식, 어성국, 김영소, 한성순. 잔나비결상버섯 수용성 물질의 항인플루엔자 바이러스 작용과 인터페론과의 병용효과. 약학회지. 1999;43(4):469-73.
7. 徐爾雅. 淡豆豉의 原料應使用黑大豆. 中藥材. 1994;17(4):44.
8. 강순아, 권순주, 최영숙, 임용호, 박동기. 홍국균 접종 쌀배아 섭취가 중등도 비만 초등학생의 체지방 및 혈중 지질의 개선에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2005;10(5):565-73.
9. 유대석, 김현희, 윤종국. 흰 쥐에 있어서 홍국첨가 식이가 혈청 지질 성분 및 간조직의 유해산소 대사 효소 활성에 미치는 영향. 한국식품영양학회지. 2003;32(2):244-49.
10. 박수진, 김동현, 백남수, 김성수. 유산균을 이용한 발효인삼 제조 및 품질특성. 고려인삼학회지. 2006;30(2):88-94.
11. 이부용, 이옥환, 김경임. 추출용매에 따른 천마농축액의 리올로지 특성. 한국식품과학회지. 2005;35(2):188-94.
12. 유근영, 서혜영, 한규재, 정양모, 김경수, 홍광준, 유상하. 발효에 의한 옷나무 수피의 휘발성 유기성분 변화. 한국식품저장유통학회지. 2007;14(3):308-14.
13. 李尙仁. 本草學. 서울: 의학사; 1975, p. 501-2.
14. 李龍城. 經藥分類典 서울: 정담; 2002, p. 22.
15. 김호철. 한약약리학. 과주: 집문당; 2008, p. 150-2.
16. 한재섭, 박희수. 금은화 약침의 항암 및 면역 반응에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2006;23(4):205-18.
17. 배지현, 김미순, 강은혜. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지. 2005;37(4):642-7.
18. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 금은화가喘息 유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):129-42.
19. 胡成穆, 姜, 輝, 劉洪峰, 李, 榮, 李, 俊. 金銀花總黃酮對免疫性肝損傷小鼠的影響. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal. 2008;12(4):295-6.
20. 苟占平, 万德光. 川産習用金銀花的抑菌作用研究. LISHIZHEN MEDICINE AND MATERIA MEDICA RESEARCH. 2008;19(3):724-5.
21. 朱振寶. 金은화不同 提取物的油脂抗酸化效果研究. Food and Fermentation Industries. 2008;34(2):69.
22. 신재용. 금은화 煎湯 熟成渡에 따른 抑菌作用에 관한 실험연구. 대한한의학회지. 1983;4(2):32-8.
23. 이삼빈의. 발효식품학. 서울: 도서출판 효일; 2004, p. 15-32.
24. Bill Mollison. The Permaculture Book of Ferment and Human Nutrition: Tyalgum, Australia. Tagari Publications. 1993:20.
25. Bengmark S. Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria. Nutrition. 1998;14(7-8):585-94.
26. 陳存仁主編. 中國 藥學 大辭典(上). 臺北: 旋風出版社印行; 1970, p. 315.
27. 董牧, 郭芳. 六味地黃丸醱酵液的抗腫和減毒作用. 現代中西醫結合雜誌. 2002;11(18):1753-4.
28. 鄭利華, 焦素珍 : 五倍子醱酵炮製簡介. 中國中

- 醫學雜誌. 1998;23(1):365-70.
29. 壓毅. 菌質中藥的新領域. 中藥新藥與臨床藥理. 1992;3(2):49.
 30. 바이러스학. 대한 바이러스 학회. 서울: 정문각; 2004, p. 67, 560.
 31. Turan K, Nagata K, Kuru A. Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. leaves extract on influenza virus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225(1):22-6.
 32. Sakagami H, Takeda M, Kawazoe Y, Nagata K, Ishihama A, Ueda M, et al. Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *In Vivo.* 1992 ;6(5):491-5.
 33. Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Suzuki Y, Yamada H. In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. *Antiviral Res.* 1992 Sep;19(3):207-17.