

## 연교 추출물 Pinoresinol와 Tamiflu의 병용효과로부터 Influenza Virus 감염에 의한 세포사멸 억제효과

김상태 · 김장수<sup>1</sup> · 최영웅<sup>2</sup> · 김영균<sup>2\*</sup>

이화여자대학교 생명약학부, <sup>1</sup>고려대학교 구로병원 진단임상의학과, <sup>2</sup>국민대학교 임산생명공학과

### The Combined Anti-apoptotic Effect from Tamiflu and Pinoresinol of *Forsythia fructus* Extract Against Influenza Virus Infection

Sang-Tae Kim, Jangsoo Kim<sup>1</sup>, Younguung Choe<sup>2</sup> and Young Kyoon Kim<sup>2\*</sup>

Ehwa Woman's University, Seoul 120-750, Korea

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Korea University Guro Hospital, Seoul 152-703, Korea

<sup>2</sup>Department of Forest Products & Biotechnology, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

**Abstract** – The fruit body of *Forsythiae Fructus* (Oleaceae), a common Korean medical herb, is widely used in the treatment of cold and inflammation. In order to elucidate the action mechanism and the active principles from the plant against anti-influenza virus, the influenza virus hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) gene RT-PCR and Viral Screening & Identification (VSI) assay were conducted, and the activity against viral replication was also investigated. Consequently, one active constituent, namely pinoresinol showed the *in vitro* antiviral principle using a cytopathic effect (CPE) reduction method, indicating pinoresinol possessed anti-influenza viral activity. Furthermore, combination of pinoresinol and Tamiflu exhibited higher activities than Tamiflu alone against influenza virus (H3N2) infection. The results suggested that combination of pinoresinol with Tamiflu could be a better candidate for an ant-H3N2 viral agent in the treatment of the influenza.

**Key words** – *Forsythiae Fructus*, Oleaceae, influenza virus, Tamiflu, Pinoresinol

Influenza A viruses (IAV)는 산발적이고 계절성 전파능력이 높은 중요한 인간병원체이다. 현재 IAV에 사용되는 항바이러스 제제로 고위험성 심각한 증세에 치료하는 타미플루와 아다만탄이 주로 사용된다. 하지만 이런 항바이러스제는 항체나 HA유전자의 회피기전으로 인해 바이러스가 이들 약물에 의해 제대로 약효를 발휘하지 못하는데, 이런 사실은 이미 알려진 신종플루의 치료제로 사용되어진 M2 ion channel blockers (e.g., amantadine, rimantadine)와 neuraminidase inhibitors (NI, e.g., oseltamivir, zanamivir)에서 M2 이온채널 단백질이 아만탄딘에 결합하면 H3N2의 복제가 억제되지만 M2 유전자 (S31N)에 약물내성이 관여함을 보고하였다.<sup>1-9)</sup> 또한, oseltamivir나 peramivir 같은 NI 약물들은 neuraminidase 치환장기인 119, 292, 그리고 294위 치에서 변이가 강하게 존재하는데 이런 문제로 예를 들면,

2005-2006년도의 계절 독감에서는 H3N2의 아만탄딘의 저항성이 거의 90%이상 가짐을 보고하였다<sup>9)</sup>. 따라서 이런 이유로 기존 Tamiflu나 아만탄딘에 대한 약효에 우려를 대신하고자 인류는 새로운 항바이러스 치료제를 개발하고자 노력하고 있지만 아직 진척이 더디고 있다.

연교 (*Forsythiae Fructus*)는 몰푸레나무과 (Oleaceae)에 속하는 개나리속 (*Forsythia*)식물의 개나리 열매로서 한방에서는 해열, 소염, 이노 및 해독 효과가 있는것 중의 하나이다.

연교의 화학성분으로는 phillyrin(forsythin), phillygenin, (+)-pinoresinol, (+)-pinoresinol- $\beta$ -d-glycosides 등의 lignan를 주로 함유하고 있다. 이외에 oleanolic acid, betulic acid, ursolic acid, rutin, forsythoside A, C, D 등을 함유되어 있는데, 과실에는 phillyrin 0.16%와 oleanolic acid 2.28%정도 함유되며, 연교심에는 forsythoside가 7.46%나 함유되어 있다고 보고되어 있다. 정유 성분은 주로  $\alpha$ ,  $\beta$ -pinene, terpinen-4-ol 등의 terpenoids 화합물로 구성되어 있으며, 과피 중에는 미량의  $\beta$ -cymene, terpinen-4-ol이 들어 있다.<sup>10-12)</sup>

\*교신저자(E-mail): ykkim@kookmin.ac.kr  
(Tel): +82-2-910-4825

연교의 약리작용은 소염 작용, 해열 작용, 간기능보호 작용 및 혈관확장 작용이 알려져 있고 관련 연구로는 주로 미백이나 알리지 완화작용 그리고 항균효과에 대한 연구로 보고되었는데 배등이 연교 추출물의 항균활성 검색을,<sup>13)</sup> 이등은 연교 추출물의 미백 효과에서,<sup>14)</sup> 배등은 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 배등과 연교 추출물의 상승 효과를,<sup>15)</sup> 김등은 연교 추출물의 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제 효과를,<sup>16)</sup> 이등은 연교 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계와 지질과산화에 미치는 영향을<sup>17)</sup> 보고하였지만 항바이러스제를 개발한 보고는 전무하다.

따라서 본 연구자는 천연물에서 기존 Tamiflu의 내성문제점을 극복하고 연교의 함유성분과 병용효과를 알아보기 위해 항바이러스제제로서 연교의 메탄올 추출물중 에칠아세이트분획물이 신종플루의 대체 연구용으로 약독화 되어진 H3N2균주에 대하여 높은 세포독성 억제효과를 나타냄을 관찰하고 세포독성 억제성분을 분리하여 화학구조를 동정하였으며 H3N2가 잘 감염되는 균주폐암세포와 밍크폐세포의 혼합세포주에 대한 세포사멸 억제효과를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 실험에 사용된 연교는 2010년 10월 서울 경동시장 믿음당한약방에서 구입하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - Tamiflu는 Hoffmann-La Roche, Ltd에서 구입하였다. Column chromatography용 silica gel 60 (Merck, 70~230 mesh ASTM), precoated silica gel 60 GF254 T.L.C. plate (Merck, 20 × 20 cm), dimethyl sulfoxide, penicillin G 10만 unit/g, DMEM medium, 기타시약 및 용매는 특급 및 일급을 사용하였고, 공업용일 경우 증류하여 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Varian UNIT-INOVA 300 MHz NMR spectrometer를 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로서 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였다. LC-MS는 Micromass ZQ detector (Waters, Milford Massachgretts, USA)를, GC-Mass spectrum은 JEOL JMS-DX-303 spectrometer를 사용하였다.

**바이러스 증식억제물질의 분리** - 연교 1.5 kg을 메탄올을 10 L로 환류시키면서 12시간씩 4회 추출하여 여과한 후 추출액을 감압 추출하여 320 g (21%)의 메탄올 추출물을 얻었다. 이 메탄올 추출물에 물 2리터를 가하여 용해시키고 물불용층을 여취하고 여액을 대해 *n*-hexane (76 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (38 g), EtOAc (11 g)와 수층 (195 g)의 순으로 용매분획하였다. 여기서 가장 우수한 EtOAc 분획을 column chromatography 하여 TLC로 확인하여 4개의 분획으로 나누고, 이들중 fr. 3에서 normal phase silica gel column chromatography

(CH<sub>3</sub>Cl/MeOH, gradient) system과 Reversed phase (C18) column chromatography (MeOH/Water) system을 이용하여 분리한 후, 메탄올로 재결정하여 순수한 pinoselinol (85 mg)을 얻었다.

**Pinoselinol** - 무색분말상 결정; UV spectrum (nm),  $\gamma_{\max}$ (EtOH): 281; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 3.03 (2H, m, H-1, 5), 3.74 (2H, dd, *J* = 8.3, 3.3 Hz, H-4a, 8a), 3.76 (6H, s, OMe-3',3"), 4.12 (2H, dd, *J* = 8.5, 7.0 Hz, H-4e, 8e), 4.62 (2H, m, H-2, 6), 6.72 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5', 5"), 6.75 (2H, dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H-6', 6"), 6.89 (2H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2', 2"); <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 54.1 (C-1, 5), 56.3 (OMe × 2), 71.9 (C-4, 8), 86.3 (C-2, 6), 111.0 (C-2', 2"), 116.0 (C-5', 5"), 119.7 (C-6', 6"), 133.5 (C-1', 1"), 146.9 (C-4', 4"), 148.7 (C-3', 3"). ESI mass spectrum, [M+H]<sup>+</sup>m/z; 359, GC-MS, 358 [M<sup>+</sup>]

**세포배양 및 공초점 형광현미경 관찰** - Inactivated influenza A/x31(H3N2)을 1 M.O.I.(multiplicity of infection)의 PFU/cell로 감염시켜 바이러스 감염에 의한 증식억제효과를 보기 위해 2 nM Tamiflu, 5  $\mu$ M pinoselinol, 그리고 2 nM 타미플루와 5  $\mu$ M pinoselinol을 처리후 바이러스의 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA) 유전자의 변이를 확인하기 위해 바이러스를 증폭하도록 DHI D3 DFA (Diagnostic Hybrids, Inc., Athens, OH, USA)의 R-Mix ReadyCell(Mink Lung/A549 세포주)을 미리 녹여 배양한 후 바이러스 100  $\mu$ l를 분주하여 35°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 16시간동안 배양하였다. 분주시킨 슬라이드 글라스위에 커버글라스를 놓고 PBS로 세척하고 아세톤으로 고정후 위상차현미경으로 관찰하고 respiratory virus fluorescent antibody pool (Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit, Chemicon, Temecula, CA, USA)에 준하여 virus-specific monoclonal antibody으로 표지후 이를 Respiratory virus DFA screening reagent의 DFA monoclonal antibody으로 one-step process staining방법을 수행하여 influenza virus H3N2항체에 대한 LSM510 META 공초점 형광현미경하에서 판별하였다.

**합성 Oligo 제작** - 본 연구에서는 H3N2의 표준 주형 DNA의 설계 및 Primer의 설계를 위하여 GenBank database (National Center of Biotechnology Information, NCBI)에 밝혀져 있는 influenza A virus subtype H3N2중의 HA 염기서열을 참고하였다.

이 염기서열들을 표본으로 하여 비교 정렬분석을 행하였으며 (CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments, <http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>), 여기서 도출된 가장 보존적인 염기서열 부분을 취합하여 인공적 염기서열을 설계하였다. 이 염기서열은 H3N2의 HA가 NA유전자와 가장

**Table I.** Primer list used for this study

Name	sequence(5'→3')	mer	products
IV HAF	aatgccccaa atatgtgaaat	21	133 bp
IV HAR	tgccatcctccctctataaa	21	
IV NAF	atcaaaagcagggtcaagatg	21	200 bp
IV NAR	gtcgaccagtagatacaaggg	20	

유사하였기에, 그 중 가장 보존정도가 높은 염기서열 부위 133 bp와 200 bp를 선택하여 본 연구를 위한 IV의 표준 염기서열로 결정하였으며, 이는 유전자 인공합성의 방법으로 제작하였다. 이 서열을 재료로 합성용 oligonucleotide primer 쌍을 설계하였다. 이들 oligonucleotide는 (주)제노텍에서 제작을 의뢰하였으며 (Genotech, Korea), 공급된 oligonucleotide는 인공합성 유전자제작으로 사용되었다. 검색용 primer의 염기서열은 Table I에 나타내었다.

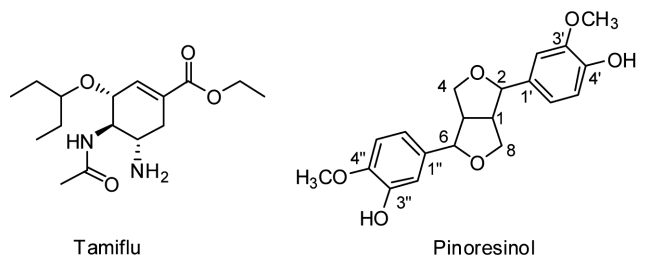
**HA와 NA 유전자의 합성, RT-PCR 및 염기서열분석** – HA와 NA 합성용 nucleotide를 사용하여, PCR (Mini-Opticon Bio-Rad, USA)을 이용, 133 bp의 hemagglutinin 표준유전자를 합성하였다. 세포내의 바이러스 HA검출을 증폭하기 위해 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 이용하여 증폭후 RNASOL을 통해 total RNA를 분리하여 HA primer으로 cDNA를 합성하고 Mini-Opticon (Bio-Rad, USA)으로 94°C에서 2분간 predenaturation 후, denaturation 94°C, 60초, annealing 60°C, 60초, extension 74°C, 60초를 45 cycles 동안 수행하였으며, 74°C에서 5분간 final extension을 수행하였다. 한편 동일방법으로 RT-PCR을 수행하여 PCR 산물을 Perkin-Elmer Applied Biosystems model 373의 DNA sequencer으로 염기서열을 합성하고 이를 Lasergene sequence analysis software package (DNASTAR)으로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

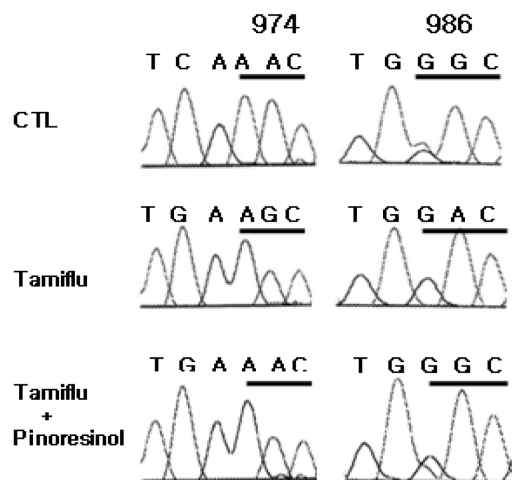
**바이러스 세포사멸 억제물질의 구조분석** – MeOH로 재결정하여 얻은 pinoresinol은 무색의 분말상 고체이었고 mp는 174~175°C이었다. Folin-Ciocalteu에 양성이었으며 UV 스펙트럼에서 281 nm의 흡수대를 나타내었으며 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼을 보면 3.03 ppm과 6.82 ppm 사이에 나타나는 chemical shifts 패턴과 3.81 ppm의 signal이 singlet로 나타내며, <sup>13</sup>C-NMR(50MHz)에서는 21개의 signal이 관찰되었다. 따라서 이상의 기기분석결과 및 문헌과의 비교로 이 compound는 Fig. 1에서처럼 (+)-pinoresinol로 확인 동정하였다.

**바이러스의 HA 내성유전자의 분석** – Tamiflu의 내성에 대한 세포사멸 억제를 조사한 결과로는, 세계적으로 신종플루의 Tamiflu의 내성에 대한 변이유전자가 계속 보고되고 있는 현실이다. Tamiflu나 그의 유도체에 대한 사용이 빈번하면서 바이러스 역시 그에 적응이 되어 새로운 감염경로를 취할 유전자변이를 통한 전략을 수립한 것으로 사료된다. 따라서, 바이러스의 유전자중에서 내성 이 보고된 영역인 M2, HA 및 NA영역의 변이중 HA영역의 변이를 알아보기 위한 분석한 결과, Fig. 2에서처럼 HA의 974염기의 AAC(ASN)과 986염기의 GGC(GLY)가 Tamiflu 처리시 HA의 974염기의 AGC(SER)과 986염기의 GAC(ASP)으로 변이가 된 반면 Tamiflu와 pinoresinol을 병용처리시 HA의 974염기의 AAC(ASN)과 986염기의 GGC(GLY)가 그대로 발현되어 있는 것으로 보아 내성을 일으키지 않기 때문에 Tamiflu의 내성을 pinoresinol에 의해 억제되면서 세포사멸에 대한 억제효과를 나타 내었다.

지난 10년간 동아시아를 대상으로한 조류독감과 신종플루의 위험성은 가히 인류를 크게 위협하고 있을 정도로 신속하고 폭발적인 전파능력을 지녀 각국의 보건당국이 긴장을 늦추지 않고 있는 현실에서 백신의 보급물량과 속도에 대해 어려움이 있지만 신종플루의 치료제인 Tamiflu도 역시 내성문제가 계속 보고되고 있는 현실이다. 따라서, Tamiflu



**Fig. 1.** Structures of Tamiflu and pinoresinol.



**Fig. 2.** Emergence of drug-resistant variants during Tamiflu and pinoresinol treatment of HA region sequence analysis.

**Table II.** Rescue of sequence analysis of NA mutants

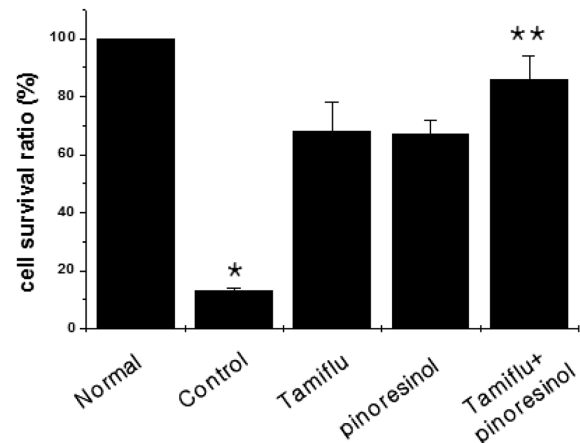
Position AA (codon)	drug			
	-	Tamiflu	pinoresinol	Tamiflu+Pi
E119(GAA)	GAA(E)	GTA(V)	GGA(G)	GAA(E)
R152(AGA)	AGA(R)	AAA(K)	AGA(R)	AGA(R)
H274(CAT)	CAT(H)	TAT(Y)	CAT(H)	CAT(H)
R292(AGA)	AAA(K)	AAA(K)	AGA(R)	AGA(R)/GAA(E)

AA, amino acid, ( ), abbreviation of a.a

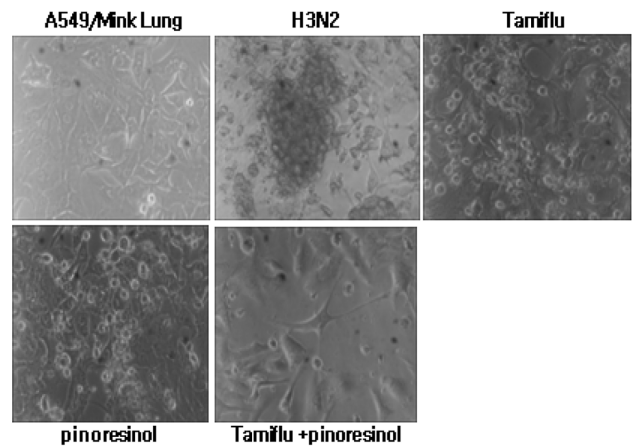
내성에 대한 문제점을 파악하기 위해 바이러스의 유전자 HA와 NA영역의 변이 정도를 분석한 결과는 Table II에서 처럼 NA영역에서도 E119(GAA), R152(AGA), H274(CAT), R292(AGA)영역이 Tamiflu에 의해 GTA(VAL), AAA(PHE), TAT(TYR), AAA(PHE)이었으나 Tamiflu와 pinoresinol과 병용효과에서는 E119(GAA), R152(AGA), H274(CAT), R292(AGA)이 원래 NA영역과 동일하여 아마도 Tamiflu에 의해 유발된 내성을 pinoresinol에 의해 억제되므로 Rajesh의 보고와 유사하게 이들 약물의 항바이러스 병용효과로 인해 숙주세포의 세포사멸이 억제되어 졌다고 사료된다.<sup>18)</sup>

**세포사멸의 억제효능** - Tamiflu의 내성에 대한 새로운 방법으로 Tamiflu와 병용효과로 감염에 대한 세포사멸의 정도를 억제할수 있는 천연물 기원 바이러스 세포사멸 억제능력을 평가하기 위하여 Fig. 3에서처럼 Tamiflu와 pinoresinol에 대한 세포독성을 R-Mix ReadyCell (A549/Mink Lung 세포주)을 이용하여 조사하였다. 즉 정상군에 비해 바이러스에 감염시킨 경우 세포 생존율이 약 12±1%였고 Tamiflu를 처리시 약 67±11%이고 pinoresinol처리시에는 약 66±3%인 반면에 Tamiflu와 pinoresinol를 동시에 처리시 약 84±6% 정도로 유의성 있었는데 이는 Tamiflu의 내성에 대한 pinoresinol의 병용처리로 인해 시너지효과를 나타냄으로 Tamiflu의 내성에 대해 억제효과를 지니고 있음이 사료된다.

**A549/Mink lung세포주의 형태학적 변화** - Tamiflu의 내성에 대한 새로운 방법으로 Tamiflu와 병용효과로 감염에 대한 Tamiflu와 pinoresinol에 대한 세포독성을 R-Mix ReadyCell (Mink Lung/A549 세포주)을 이용하여 조사하였다. 즉 바이러스의 감염으로 인해 세포사멸의 정도를 억제할 수 있는 천연물 유래 약물과 Tamiflu와의 병용효과가 있는지 알아 보기 위해 항세포사 억제력을 분석한 결과 Fig. 4에서처럼 정상군은 전형적인 세포모양을 나타내고 있으며 바이러스에 감염시킨 경우 세포사가 현저히 증가하여 플라그가 형성된 형태학적 변화가 보였고 2 nM Tamiflu를 처리한 경우 세포사멸이 다소 억제된 것을 관찰할 수 있었고 마찬가지로 5 µM pinoresinol처리한 경우도 세포사멸이 억제된 것을 관찰할 수 있었으며 특히 2 nM Tamiflu와 5 µM pinoresinol의 병용처리에서는 세포사멸이 가장 많이 억제됨



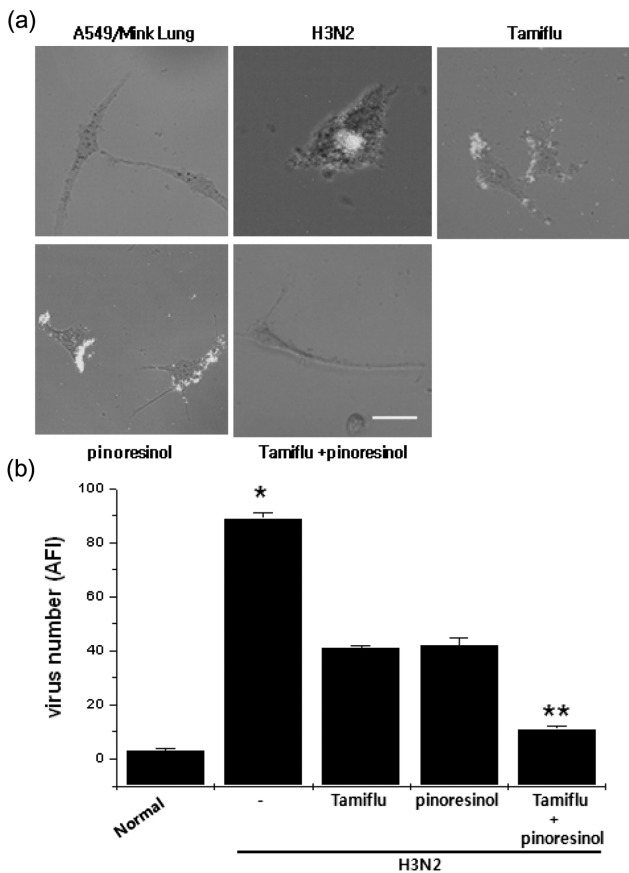
**Fig. 3.** Effect of Combination of Tamiflu and pinoresinol inhibits cell death of H3N2-infected A549/MinkLung cells for 16 h. For the evaluation of in vitro cell survival activity by MTT assay, A549/MinkLung cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were seeded into 96-multiplate. Cell survival ratio is expressed as a percentage of the controls (no viral preincubation). Each compound was dissolved PBS. For three different experiments performed in triplicates. \* $p < 0.05$  indicates statistically significant difference of cell viability of virus-infected cell with respect to normal; \*\* $p < 0.001$  indicates statistically significant difference of cell viability of the Tamiflu and pinoresinol treatment.



**Fig. 4.** Treatment of Tamiflu and pinoresinol can rescue H3N2-induced cell death. A549/MinkLung cells were treated with 2 nM Tamiflu or 5 µM pinoresinol alone, and combination of 2n M Tamiflu and 5 µM pinoresinol the treatments, and further incubated for 16 h and viability of cells was determined by using inverted microscopy as described under "Experimental Procedures".

을 관찰할 수 있었다. 따라서 이런 양상은 pinoresinol 병용 처리로 인해 Tamiflu의 내성에 대한 유전자변이를 차단하여 바이러스의 증식을 억제하는 시너지 효과를 나타내는데 기인하는 것으로 사료된다.

**바이러스 증식억제에 대한 형광현미경 분석** - Tamiflu와 병용처리로 인한 바이러스 증식에 미치는 영향을 세포내,



**Fig. 5.** Cellular localization of inactivated-influenza virus H3N2. (a) Fixed permeabilized in A549/MinkLung cells that had been infected with H3N2 for 16 h were stained with anti-HA mouse serum, followed by virus-specific monoclonal antibody of Respiratory virus DFA screening reagent with DFA monoclonal antibody and viewed by LSM 510META confocal microscopy. In the middle of the cell is almost shown with H3N2 virus particles (green). (b) Viral arbitrary intensity of ROI. For three different experiments performed in triplicates. \* $p < 0.05$  indicates statistically significant difference of cell viability of virus-infected cell with respect to normal; \*\* $p < 0.001$  indicates statistically significant difference of cell viability of the Tamiflu and pinoresinol treatment. Original magnification, 100 $\times$ . Pictures are representative of two independent experiments. bar size: 10  $\mu$ m

외막에 존재하는지를 관찰하기 위해 상기 세포주를 이용하여 그 효과를 조사하였다. Fig. 5에서처럼 정상균은 정상적으로 잘 자라는 반면, 바이러스를 감염시킨 세포주에서는 공초점현미경하에서 H3N2의 HA특이적 항체를 표지하여 본 바 녹색형광이 주로 세포핵 주변부에 존재하는데 이는 바이러스가 복제과정에 핵막에 존재하는 숙주의 증식 전사 인자를 이용하기 위한 것이다.

따라서 이 영역에 대부분이 존재하는 것과 일부가 세포막을 용해하는 과정으로 인해 세포사멸이 유도되는 것처럼 둥근모양의 형태를 보였으며 Tamiflu를 처리한 경우 주로 세

포막주변에 녹색형광이 존재하는 것으로 보아 증식과정에 일부 완전한 비리온이 형성되지 않아서 세포외부로 용해되지 못한 상태로 관찰되어지고 마찬가지로 pinoresinol을 처리한 경우도 Tamiflu를 처리한 경우와 유사한 결과로 세포막주변부에 녹색형광이 관찰되어졌으나 2 nM Tamiflu와 5  $\mu$ M pinoresinol의 병용효과에 의한 경우에는 거의 세포에서는 바이러스의 흔적이 관찰되지 않을 정도로 녹색형광이 관찰되지 않아 이런 결과로 추측한다면 Tamiflu와 pinoresinol의 병용작용에 의해 바이러스의 증식시 E119(GAA)변이가 일으키지 못하게 억제하여 Tamiflu의 약리작용을 상승시켜 바이러스 titer이 감소하였거나 바이러스의 복제과정에 일부 외피단백질의 생성을 억제하여 세포막으로 용해하는 경로가 차단되어 바이러스의 수적 감소가 유도되므로 세포형태가 온전히 정상과 유사한 형태를 보임을 사료되는데 여기서 두 약물의 병용효과로 인해 Tamiflu의 내성을 어느정도 pinoresinol이 관여하므로 정상적인 바이러스의 복제를 억제함에 기인한다라고 사료된다. 그러므로 기존 Tamiflu와 그의 유도체에서 발생하는 내성문제를 해결하는데는 본 연구 결과처럼 새로운 치료제를 개발하거나 천연물에서 유래한 항바이러스 치료성분과 병용하므로 이를 인플루엔자의 증식을 제어하는 전략을 전개하는 방법도 신종플루의 치료방법 해결책이라 사료된다.

## 사 사

본 연구는 산림과학기술개발사업 (과제번호:S120808L1101104)의 연구비지원과 국민대학교 학술연구비지원 (2010)에 의하여 연구되었음.

## 인용문헌

- Bright, R. A., Medina, M. J. and Xu, X. (2005) Incidence of adamantane resistance among influenza A (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. **366**: 1175-1181.
- Rahman, M., Bright, R.A. and Kieke, B. A. (2008) Adamantane-resistant influenza infection during the 2004-05 season. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 173-176.
- Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. and Klimov, A. I. (2006) Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* **295**: 891-894.
- Deyde, V. M., Xu, X. and Bright, R. A. (2007) Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis.* **196**: 249-257.
- Duval, X., van der Werf, S., Blanchon, T., Mosnier, A., Bouscambert-Duchamp, M., Tibi, A., Enouf, V., Charlois-Ou, C.,

- Vincent, C., Androletti, L., Tubach, F., Lina, B., Mentr, F. and Leport, C. (2010) Efficacy of oseltamivir-zanamivir combination compared to each monotherapy for seasonal influenza: a randomized placebo-controlled trial. *PLoS Med.* **2**: in press.
6. Duwe, S. C., Wedde, M., Birkner, P. and Schweiger, B. (2010) Genotypic and phenotypic resistance of pandemic A/H1N1 influenza viruses circulating in Germany. *Antiviral Res.* in press.
7. Carr, S., Ilyushina, N. A., Franks, J., Adderson, E. E., Caniza, M., Govorkova, E. A. and Webster, R. G. (2010) Oseltamivir-resistant Influenza A and B Viruses Pre- and Postantiviral Therapy in Children and Young Adults With Cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J.* in press.
8. Barrero, P. R., Viegas, M., Valinotto, L. E. and Mistchenko, A. S. (2011) Genetic and phylogenetic analyses of influenza A H1N1pdm virus in Buenos Aires, *Argentina J. Virol.* **85**: 1058-1066.
9. Ruiz-Carrascoso, G., Casas, I., Pozo, F., Gonzalez-Vincent, M. and Prez-Brea P. (2010) Prolonged shedding of amantadine- and oseltamivir-resistant influenza A(H3N2) virus with dual mutations in an immunocompromised infant. *Antivir. Ther.* **15**: 1059-1063.
10. Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H. and Akisada, T. (1982) Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus." VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspensa*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 4548-4553.
11. 이준성, 민병선, 배기환 (1996) L1210 및 HL60 Cell에 대한 연교의 세포독성 성분. *약학회지* **40**: 462-467.
12. 배지현, 김홍연, 장지연 (2005) 연교 추출물의 항균활성 검색 및 일부 식중독균의 증식에 미치는 영향. *한국식품조리과학회* **21**: 319-325.
13. 이정노, 박재희, 김상우, 유영경, 이강태, 이진국 (2007) 천연항생소재인 연교 추출물의 미백 효과에 관한 연구. *대한화장품학회* **33**: 79-86.
14. 배지현, 손국희, 이은주 (2005) 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 패장과 연교 추출물의 상승 효과. *한국미생물생명공학회* **32**: 130-135.
15. 김성윤, 박용기 (2008) 연교 추출물의 Microglia에서 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성 억제효과. *대한분초학회지* **23**: 93-102.
16. 이정민, 최상원, 조성희, 이순재 (2003) 연교 (*Forsythia viridissima* Lindl.) 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계와 지질과산화에 미치는 영향. *한국영양학회* **36**: 990-996.
17. 서상희, 이정민, 이향림, 이순재, 최상원, 조성희, 최영선 (2005) 연교 (*Forsythia viridissima* L.) 추출물 및 연교 Lignan의 혈청 지질 상태 개선 효과. *한국영양학회* **38**: 254-254.
18. Rajesh, A., Chawla, R., Marwah, R., Arora, P., Sharma, R. K., Kaushik, V., Goel, R., Kaur, A., Silambarasan, M., Tripathi, R. P. and Bhardwaj, J. R., (2011) Potential of Complementary and Alternative Medicine in Preventive Management of Novel H1N1 Flu (Swine Flu) Pandemic: Thwarting Potential Disasters in the Bud. *Evid Based Complement Alternat. Med.* in press
- (2011. 1. 14 접수; 2011. 2. 15 심사; 2011. 2. 18 게재확정)