

## 잔나비겉상버섯 수용성물질의 항바이러스효과

임교환, 어성국, 김영소, 이종길, 한성순\*

충북대학교 약학대학

### Antiviral Activity of Water Soluble Substance from *Elfvigia applanata*

Kyo-Hwan Rym, Seong-Kug Eo, Young-So Kim,  
Chong-Kil Lee and Seong-Sun Han\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** - In order to find less toxic antiviral agents from basidiomycetes, EA, the water soluble substance, was prepared from the carpophores of *Elfvigia applanata* (Pers.) Karst. EA was examined for antiviral activity against five strains of pathogenic viruses such as encephalomyocarditis virus (EMCV), vesicular stomatitis virus (VSV) Indiana and New Jersey strains, influenza A virus (Flu A), and varicella zoster virus (VZV) *in vitro*. Antiviral activity was evaluated by plaque reduction assay. Among five strains of viruses tested, EA exhibited the most potent antiviral activity against VSV Indiana strain with 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) of 0.104 mg/ml in Vero cells, and its selectivity index (SI) was 36.5. EA was also examined for the virucidal activity, antiviral activity in preincubation on VSV Indiana strain in order to examine possible mode of antiviral activity. Preincubation of Vero cells with EA did not confer protection against VSV, however, prolonged exposure of cells to EA inhibited the replication of virus dose-dependently. In virucidal activity, the titer of infectious virus did not decrease significantly.

**Key words** - *Elfvigia applanata*: plaque reduction assay: antiviral activity: selectivity index (SI).

잔나비겉상 *Elfvigia applanata*(Pers.) Karst 은 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로, *Ganoderma applanatum*으로도 불리운다. 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 분포되어 있으며, 항암목적의 민간요법에 이용되고 있다.<sup>1,2)</sup>

잔나비겉상의 성분 및 약리작용에 관한 연구로는 Nishitoba 등<sup>3)</sup>이 ganoderic acid, furanogano-

deric acid 및 ganoderic acid 유도체인 methyl ganoderic acid A, P, ganoderenic acid F,G, H,I 등을 분리, 보고하였고, Protiva 등<sup>4)</sup>은 friedelin과 alnusenone, ergosta-7,22-dien-3-one, ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, fried oolean-5-en-3-one, ergosterol 및 palmitic acid를 분리하여 보고하였다. 다당체성분에 관한 연구로 Mizuno 등<sup>5,6)</sup>은 다당체를 추출하여 sarcoma 180에 대한 억제시험을 실시한 결과 100%의 억제율을 나타내

\*교신저자 : Fax 0431-268-2732

있음을, Usui 등<sup>7)</sup>은 열수추출물로부터 항암활성이 있는 두종의  $\beta$ -D-glucan을 분리하여 (1 $\rightarrow$ 3)-linked- $\beta$ -D-glucopyranose의 3번째 잔기의 O-6에서 가지가 치환된 다당체임을 보고하였고, Misaki 등<sup>8)</sup>은 배양균사체로부터  $\beta$ -glucan인 ganoderan을 분리하여 혈당강하, 정혈작용 및 항암효과 등이 있음을 보고하였다. 또한 Nakashima 등<sup>9)</sup>은 다당체를 복강 또는 경구투여시 단백질항원에 대하여 비특이적 amplifier T 세포의 활성화에 의한 지연형 과민반응을 유도한다고 보고한 바 있다. Kondo 등<sup>10)</sup>은 germanium 화합물과 다당체의 흡수효과를, 한 등<sup>11)</sup>은 germanium을 비롯한 7종의 무기성분을 검색하였다. Kandefer 등<sup>12)</sup>은 잔나비겉상에서 분리된 RNA가 *in vivo*에서 비장으로부터 interferon(IFN)의 특성을 갖는 물질을 유도함으로써 섬유아세포에서 vaccinia virus의 plaque 수를 감소시켰음을 보고하였다. Nerud 등<sup>13)</sup>은 응유효소를 생성한다고 보고한 바 있고 이외에 coenzyme Q9,<sup>14)</sup> steroid,<sup>4,15)</sup> 형광성분,<sup>16)</sup> free sugar, free sugar alcohol 및 유기산 등<sup>17)</sup>이 보고된 바 있다. 또한 김 등<sup>18,19)</sup>은 자실체로부터 분리된 단백다당체 중 DEAE-ion exchange column으로 분리한 FDP가 B 세포의 증식을 촉진하며, 열수추출물은 항균효과 및 수종 항생제와의 병용시 병용효과가 있음을 보고하였다.

바이러스는 숙주세포의 대사과정에 의존하여 증식하는 편성 세포내 기생체이므로 항바이러스제는 감염된 세포 뿐 아니라 정상세포에도 독성을 나타낼 수 있기 때문에 다른 화학요법적 개발보다 많은 어려움이 있다. 현재 사용되고 있는 항바이러스제로는 iododeoxyuridine, acyclovir를 비롯한 바이러스의 핵산복제를 억제하는 nucleoside 유도체와 interferon(IFN) 등의 단백질성 항바이러스제가 대부분이나 이들은 여러가지의 부작용을 나타내며, 내성균주의 출현도 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>20)</sup>

김 등<sup>21)</sup>은 잔나비겉상 열수추출물의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과, 투여가능한 최대용량을 투여시 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았음을 보고한 바 있다. 따라서 독성 및 부작용이 없는 것으로 확인된 잔나비겉상으로부터 새로운 항바이러스성 물질을 검색하기 위한 시도로서, 자실

체의 수용성물질을 실험재료로하여 5종의 병원성 바이러스에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 측정하였다. 또한 항바이러스작용 양식을 구명하기위해 숙주세포 및 바이러스의 증식에 대한 시험으로 우선 전배양시험, 살바이러스시험 등을 실시하여 그 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 잔나비겉상 *Elfvigia applanata* (Pers.) Karst의 자실체를 청주시내에서 구입하여 서울산업대학 박완희 교수의 감정을 받아 사용하였으며, 표본은 충북대학교 약학대학 미생물학교실에 보관하였다. 재료를 일정시간 음건, 세절하고 800g을 증류수 3.5l로 90~100℃의 수욕상에서 8시간 추출한 후, 온시 여과, 농축, 동결건조하여 얻은 암갈색의 분말성 물질(이하 EA라 칭함)을 실험에 사용하였다.

**시약 및 기기** - Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM) 및 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), trypsin-EDTA는 Gibco BRL Co., crystal violet, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Co., interferon alpha(IFN alpha)는 Boehringer Mannheim Co. 제품을 사용하였다. 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 기기는 clean bench(Green Yanghaeng), EIA reader(Molecular Device), CO<sub>2</sub> incubator(Vision), inverted microscope(Nikon), plaque viewer(Belco), freeze-dryer(Edward), rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikai), autoclave(Hanyang), centrifuge(Hanil), membrane filter(Nalgene), PH meter(Fisher) 등을 사용하였다.

**세포 및 바이러스** - 숙주세포로는 Vero 세포(Kidney, African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL81, HEL299 세포(Lung, embryonic, Human diploid) ATCC CCL137, MRC-5 세포(Lung, Human diploid) ATCC CCL171을, virus는 encephalomyo-

carditis virus(EMCV, EMC strain) ATCC VR-129B, vesicular stomatitis virus(VSV, Indiana strain) ATCC VR-158, vesicular stomatitis virus(VSV, New Jersey strain) ATCC VR-159, Influenza A virus(Flu A, A/Equine/2/Miami/1/63(H3N8) strain) ATCC VR-317, varicella zoster virus(VZV, Oka strain) ATCC VR-795를 사용하였다.

**세포 및 바이러스배양**-Vero 세포는 10% heat inactivated(56°C, 30 min) fetal bovine serum (FBS), penicillin G, streptomycin 및 amphotericin B를 첨가한 EMEM으로 배양하고, HEL299 세포와 MRC-5 세포는 IMDM 또는 DMEM으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 사용하였다. 시험 바이러스는 VZV를 제외하고 모두 Vero 세포를 숙주세포로 사용하였다. MOI (multiplicity of infection)가 0.01 pfu/cell의 바이러스액을 Vero 세포에서 배양하고 배양액으로부터 취하여, 바이러스의 역가를 plaque reduction assay<sup>22,23)</sup>로 측정된 후 -70°C 이하에서 보관하였다. VZV는 세포친화성 바이러스를 HEL299 세포에서 1시간 배양한 후, 새로운 DMEM을 넣어 특유의 병변현상이 나타날 때까지 2~3일마다 배지를 바꾸어 주면서 배양하였다. 세포병변이 70% 이상 되면 trypsin-EDTA 용액으로 세포친화성 바이러스를 떼어내어 원심분리하고 바이러스 침전물을 10% dimethylsulfoxide(DMSO)를 함유한 FBS로 재현탁한 후 -70°C 이하에서 보관하였다.

**세포독성시험**-숙주세포에 대한 세포독성은 MTT reduction assay<sup>24)</sup>에 따라 시험하였다. 세포부유액(3.5×10<sup>4</sup> cells/well)을 96 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양하여 세포 단층을 얻은 후, 배지를 제거하고 2% FBS를 함유한 유지용 배지(maintenance medium; MM) 또는 10% heat inactivated FBS를 함유한 성장용 배지(growth medium; GM)로 최고농도 20 mg/ml의 시료용액을 6단계로 배수희석하여 100 μl씩 분주하고 48시간 배양하였다. 세포의 병변도를 확인한 후 0.5% MTT 용액을 50 μl씩 가하고 2시간 더 배양하였다. 과량의 MTT를 제거하고 culture plate를 건조한 후 DMSO로 세포내에 형성된 formazan crystal을 용해하였다. EIA reader로 570 nm에서

흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 흡광도가 50% 감소되는 EA의 농도인 50% cytotoxicity concentration(CC<sub>50</sub>)의 값을 계산하였다.

**항바이러스시험**-EA의 5종의 바이러스에 대한 항바이러스효과는 plaque reduction assay<sup>22,23)</sup>에 따라 시험하였다. 세포부유액(1×10<sup>6</sup> cells/well)을 6 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 세포단층을 얻었다. 세포단층을 PBS로 세척하고 약 150 pfu/well의 바이러스용액을 접종하고 세포에 흡착되도록 1시간 배양한 다음, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mg/ml의 EA와 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque 수를 세었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제하는 EA의 농도인 50% effective concentration(EC<sub>50</sub>), EC<sub>70</sub> 및 EC<sub>90</sub>를 구하여 selectivity index(SI)로 항바이러스효과를 판정하였다. VZV는 숙주세포로 MRC-5 세포를 사용하고, agar overlay medium 대신에 10% heat inactivated FBS를 함유한 DMEM으로 plaque이 형성될 때까지 3~4일마다 배지를 바꾸어 주었다.

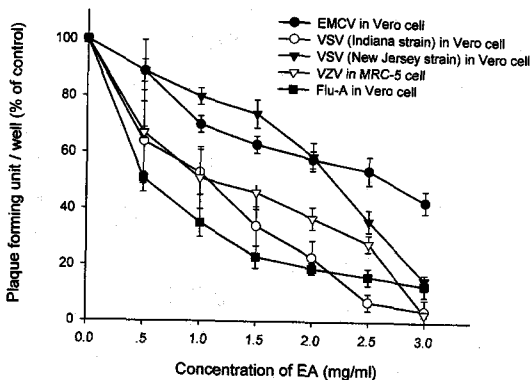
**전배양시험**-EA의 항바이러스작용 양식을 구명하기 위하여 EA와 Vero 세포와의 전배양시험을 Katz 등<sup>25)</sup>의 방법에 따라 시험하였다. Vero 세포(1×10<sup>6</sup> cells/well)를 6 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 세포단층을 얻었다. EA와 Vero 세포를 함께 전배양하기 위하여 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml EA를 함유한 EMEM을 well에 넣고 각 군당 1, 2 및 24시간 배양하였다. 일정시간이 지나면 PBS로 대조군 및 시료를 함유한 배지를 완전히 제거하였다. 약 150 pfu/well의 VSV(Indiana strain) 용액을 접종하고 세포에 흡착되도록 1시간 배양하였다. 1% agar를 함유한 EMEM을 가하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시킨 후 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque 수를 세었다. 이때 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml EA와 최종농도 1% agar를 함유한 EMEM을 바이러스를 접종한 숙주세포에 넣고 전배양방법과 동시에 시행함으로써 prolonged exposed group

(PE)으로 하여 전배양의 결과와 함께 표시하였다.

**살바이러스시험** - 살바이러스시험은 Barnard 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 시험하였다. 시험바이러스로 VSV(Indiana strain)의 원액( $10^9$  pfu/ml 이상)을 0.2, 1.0 및 2.0 mg/ml EA와 동량의 비율로 혼합하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 1, 2 및 4시간씩 배양하였다. 일정시간 배양 후 각 혼합액에 남아있는 감염성 바이러스의 양은 EA가 바이러스의 성장에 영향을 주지 않을 500~5,000 pfu/ml까지 혼합액을 배지로 희석하여 EA의 농도를 최소화한 다음 이미 6 well plate에 형성된 Vero 세포단층에 well당 200  $\mu$ l씩 접종하고 배양하여 형성되는 plaque 수로 측정하였다.

## 결 과

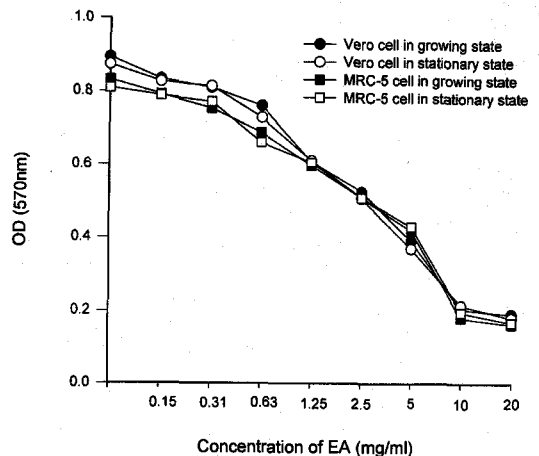
**항바이러스효과** - RNA 바이러스로 encephalomyocarditis virus(EMCV, EMC strain), vesicular stomatitis virus(VSV, Indiana strain), vesicular stomatitis virus(VSV, New Jersey strain) influenza A virus(Flu A), DNA 바이러스로 varicella zoster virus(VZV) 등 5종에 대한 EA의 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 시험한 결과, EA는 Fig. 1에서와 같이 5종의 바이러스에 대하여 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였다. 바이러스 중 VSV(Indiana strain)에



**Fig. 1.** Inhibitory effect of EA on the plaque formation of five strains of viruses in Vero and MRC-5 cells. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group without EA. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations.

대한 EC<sub>50</sub>는 0.104 mg/ml로써 plaque형성 억제 효과가 가장 강하였고, VZV에 대한 EC<sub>50</sub>는 0.464 mg/ml로 비교적 강한 효과를 보였다. 숙주세포로 사용한 Vero 세포와 MRC-5 세포의 증식에 미치는 EA의 영향은 Fig. 2와 같다. Vero 세포에 대해 3.5 mg/ml, MRC-5 세포에 대해서는 5.5 mg/ml에서 CC<sub>50</sub>를 나타내었고, growing state의 숙주세포에 대한 세포독성과 stationary state의 숙주세포에 대한 세포독성은 유의성있는 차이를 보이지 않았다. CC<sub>50</sub>와 EC<sub>50</sub>로부터 계산된 selectivity index(SI)는 Table I에서 표시된 바와 같이 VSV(Indiana strain)에 대한 SI가 36.5로써 가장 우수하였고, DNA 바이러스인 VZV에 대한 SI는 12.7로써 비교적 우수한 항바이러스효과를 나타내었다. 그외의 RNA 바이러스에 대한 SI는 1~2를 나타내어 낮은 효과를 보였다.

**전배양시 항바이러스효과** - Vero 세포를 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml의 EA를 함유한 EMEM에서 1, 2 및 24시간 전배양하고 배지를 제거한 후 세포단층을 PBS로 세척하여 남아있는 EA를 완전히 제거한 다음, Vero 세포에서 형성되는 VSV의 plaque 수를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 가장 왼쪽의 그룹에는 각 농도의 EA와 Vero 세포를 전배양 후 계속하여 agar overlay medium에 일정농도의 EA를 포함시켜 배양시의, 즉 prolonged exposed group



**Fig. 2.** Inhibitory effect of EA on the growth of Vero and MRC-5 cells by MTT reduction assay. All growing state cells were incubated at 37°C in MM and all stationary state cells were incubated at 37°C in GM.

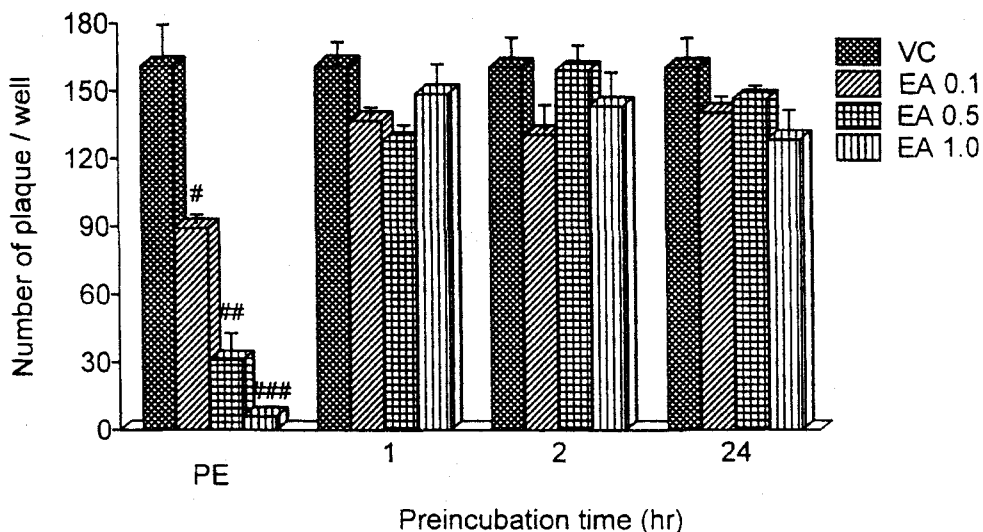
**Table I.** Antiviral activity of EA by plaque reduction assay

Virus strain	Host cell	State of host cell	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg/ml)	EC <sup>b</sup> (mg/ml)			SI <sup>c</sup>
				EC <sub>50</sub>	EC <sub>70</sub>	EC <sub>90</sub>	
Encephalomyocarditis virus (EMC strain)	Vero	Stationary	3.250	2.123	2.972	3.821	1.5
		Growing	3.792				1.8
Vesicular stomatitis virus (Indiana strain)	Vero	Stationary	3.250	0.104	0.300	0.869	31.3
		Growing	3.792				36.5
Vesicular stomatitis virus (New Jersey strain)	Vero	Stationary	3.250	2.095	2.933	3.771	1.7
		Growing	3.792				1.8
Influenza A virus (A/equine/2/Miami/1/63(H3N8) strain)	Vero	Stationary	3.250	1.499	2.099	2.699	2.2
		Growing	3.792				2.5
Varicella zoster virus (Oka strain)	MRC-5	Stationary	5.262	0.464	1.274	3.499	11.3
		Growing	5.874				12.7

<sup>a</sup>50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

<sup>b</sup>Effective concentration (EC) is the concentration of EA required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%.

<sup>c</sup>Selectivity Index (SI) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

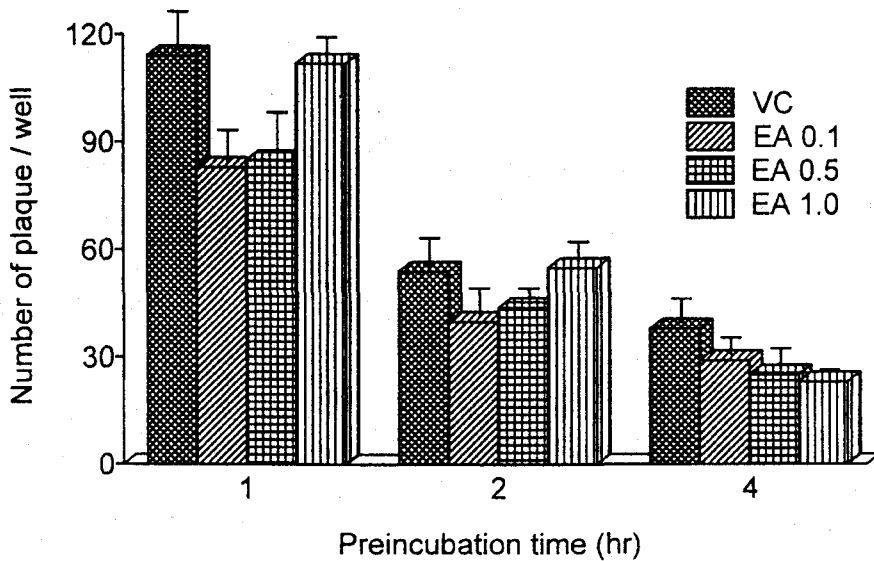


**Fig. 3.** Inhibitory effect of EA on the plaque formation of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) requires prolonged exposure (PE) to culture of Vero cells throughout. Extreme left sections in graph represents prolonged exposure to culture throughout, and the others were preincubated with EA (0.1, 0.5 and 1.0 mg/ml) to Vero cell for 1, 2 and 24 hr respectively, and washed with PBS immediately prior to inoculation with virus. The sharp indicates that the value is significantly different from the virus control (VC) group (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001).

(PE)의 plaque 수를 나타내었다. EA를 Vero 세포와 전배양한 후 제거하였을 때 형성되는 plaque 수는 EA의 농도에 비례하여 유의성있게 감소하지 않았으나, PE group의 plaque 수는 배지 중의 EA의 농도가 증가함에 따라 용량의존적으로 감소하였다.

**살바이러스효과** - VSV의 원액 (10<sup>9</sup> pfu/ml 이상)

을 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml의 EA와 혼합하여, 1, 2 및 4시간 배양한 후 남아있는 감염성 바이러스의 양을 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 바이러스의 양은 대조군이 150 pfu/ml 정도로 될 때까지 혼합액을 희석하여 잔량의 EA를 최소화하고 Vero 세포에서 형성된 plaque 수를 측정하여 나타내었다. 바이러



**Fig. 4.** Virucidal effect of EA to vesicular stomatitis virus (Indiana strain). Virus suspension was preincubated with EA (0.1, 0.5 and 1.0 mg/ml) prior to inoculation for the indicated time, and the virus titer in suspension was expressed as plaque number formed in Vero cell.

스의 양은 배양시간에 비례하여 감소하였으나, 배지에 포함된 EA의 농도에 비례하여서는 유의성있게 감소하지 않았다.

## 고 찰

잔나비겉상 *Elfvigia applanata* 자실체의 수용성물질 EA를 실험재료로 하여 RNA 바이러스인 encephalomyocarditis virus(EMCV, EMC strain), vesicular stomatitis virus(VSV, Indiana strain), vesicular stomatitis virus(VSV, New Jersey strain), influenza A virus(Flu A) 와 DNA 바이러스인 varicella zoster virus(VZV) 등 5종의 바이러스에 대한 항바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 실험한 결과 EA는 바이러스의 증식을 용량의존적으로 억제하였다. 이는 EA가 바이러스의 증식을 억제하는 물질임을 보여주는 결과로써, EA에는 항암물질,<sup>5,6)</sup> 면역조절물질<sup>9,18)</sup> 및 각종 무기물질<sup>10,11)</sup> 등 많은 생리활성물질을 포함하고 있는 것으로 보고된 바, 다당체는 sarcoma 180에 대한 항암효과를 나타내고 단백질 항원에 대한 지연형 과민반응을 촉진하며, 핵산은 IFN양 물질을 유도함으로써 vaccinia virus의 증식을 억제하는 것으로 확인되었다.<sup>9,12)</sup> 또한 단백질

당체는 B 세포의 항체생성능을 증가시키는 것으로 보고되었으며<sup>18)</sup> 이러한 단백질단백체를 비롯한 핵산, 뉴클레오사이드 유사물질 및 기타 생리활성을 나타내는 물질이 바이러스의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

EA는 5종의 바이러스 중 VSV(Indiana strain)에 대하여 SI가 36.5로 가장 우수하였고, DNA 바이러스인 VZV에 대한 SI는 12.7로 비교적 우수한 효과를 나타내었다. 그러나 VSV(Indiana strain)와는 달리 같은 종의 바이러스인 VSV(New Jersey strain)는 SI가 1.8로 낮은 효과를 보였는데, 이는 일반적으로 같은 바이러스의 strain사이에는 유전자서열에 있어서 상당한 동일성을 가지나 VSV의 matrix 단백질의 아미노산 서열은 58.6%, non-structural(NS) 단백질은 34.6%의 동일성을 나타내는 것으로 확인되었으며,<sup>27,28)</sup> 즉 항바이러스효과의 차이는 VSV의 유전자서열이 다른 바이러스와는 달리 strain 간에 현격한 차이를 나타내고 있는 데 기인하는 것으로 생각된다. 시험바이러스 중 가장 높은  $EC_{50}$ (2.123 mg/ml)를 나타낸 것은 EMCV로서 5종의 바이러스 중 유일하게 외피막(envelope)을 갖지 않는 바이러스<sup>29)</sup>로 EA의 항바이러스효과는 외피막과 관련된 것으로 사료된다. 또한 EA는 stationary state의 숙주세포와 growing state의

숙주세포에 대한 독성에 있어서 유의성있는 차이를 나타내지 않았으며 이는 EA가 세포의 핵산 합성이나 단백질 합성에 영향을 미치지 않음을 의미하며 따라서 EA는 바이러스의 증식과정 중 핵산이나 단백질 합성을 억제함으로써 항바이러스효과를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다.

지금까지 보고된 담자균류로부터 분리된 항바이러스성 물질의 작용양식은 바이러스가 숙주세포에 흡착하는 과정을 억제하거나 단백질 합성을 차단함으로써 항바이러스활성을 나타내는 것으로 알려져 왔다. *Lentinus edodes* 자실체의 추출물은 바이러스의 흡착을 억제하고 면역반응을 증강시킴으로써,<sup>30)</sup> *Lentinus edodes* KSLE007의 배양추출물인 KS-2는 IFN 유도작용을 통하여 항바이러스활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다.<sup>31)</sup> 또한 Shannon 등<sup>32)</sup>은 대부분의 polysaccharides는 고분자화합물이므로 숙주세포막을 통과하지 못하기 때문에 바이러스가 숙주세포에 흡착하는 과정을 억제함으로써 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 이와 같은 연구보고를 토대로 하여 EA의 항바이러스작용양식을 구명하고자 숙주세포에 대한 영향과 바이러스에 대한 직접적인 영향을 실험하였다. Vero 세포를 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml의 EA와 1, 2, 24시간 전 배양한 후, 세포단층에 존재하는 EA를 완전히 제거하고 형성되는 plaque 수를 측정시 EA의 농도에 비례하여 plaque 수가 감소하지 않았으나 배양시간에 비례하여 남아있는 바이러스의 양은 감소하였고, 계속하여 EA를 숙주세포에 노출시켰을때는 (PE group), EA의 농도증가에 따라 용량의존적으로 plaque 수가 감소하였다. 이러한 결과는 EA가 전배양시간 동안 숙주세포에 영향을 주어 세포를 항바이러스 상태로 전환하거나 *Lentinus edodes* KSLE007의 배양추출물과 같이 항바이러스성 물질을 유도함으로써 항바이러스효과를 나타내지 않음을 의미하며, 배양시간이 길수록 남아있는 바이러스의 양이 감소한 것은 바이러스 자체의 불활성화에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 VSV의 원액( $10^9$  pfu/ml 이상)을 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml EA와 혼합하여 1, 2, 4시간 배양한 후 남아있는 바이러스의 양을 측정하였을 때 배양시간이 경과함에 따라 바이러스의 양은 감소하였으나, EA의 농도에 비례하여서는 유의성있게 감소하지 않은 것으로 보아 EA는 배

지내에 있는 VSV에 물리화학적 변성을 일으켜 바이러스의 감염성을 제거함으로써 항바이러스효과를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다. 즉, EA는 전배양시 숙주세포에 영향을 주거나, 바이러스에 직접 작용하여 물리화학적 변성을 일으켜 바이러스의 감염성을 제거함으로써 항바이러스효과를 나타내지 않지만, 전배양시의 PE group의 결과에서 알 수 있듯이 바이러스가 숙주세포에 흡착됨으로써 시작되는 일련의 증식단계 중 어느 한 단계를 억제함으로써 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 명확한 작용양식을 구명하기 위하여 바이러스의 각 증식과정에 대한 EA의 영향 및 EA의 정제에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

잔나비결상 자실체의 수용성물질 EA의 항바이러스시험 결과를 종합하여 보면 EA에는 항바이러스성 물질이 포함되어 있으며 이 물질은 바이러스의 증식을 억제하는 다당체 또는 단백당체<sup>18)</sup>인 것으로 사료되며, EA는 급성독성시험<sup>21)</sup>에서 투여가능한 최대 용량을 투여하였을 때 치사율이나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변현상을 보이지 않았으므로 안전성있는 물질로서 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 새로운 항바이러스제로 개발될 수 있음을 시사한다.

## 결 론

1. EA는 5종의 시험 바이러스에 대하여 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며, VSV(Indiana strain)에 대한  $EC_{50}$ 는 0.104 mg/ml, SI는 36.5로써 가장 우수하였고, VZV에 대한  $EC_{50}$ 는 0.464 mg/ml, SI는 12.7로써 비교적 우수한 항바이러스효과를 나타내었다.

2. EA와 Vero 세포의 전배양시험 결과, 바이러스의 증식은 억제되지 않았으나, PE group은 EA의 농도증가에 따라 용량의존적으로 plaque 수가 감소하였다. 살바이러스시험에 있어서는 바이러스의 양이 EA의 농도에 비례하여 유의성있게 감소되지 않았다.

## 인용문헌

1. Park, W. H. (1991) Colored fungi of Korea. 374. Kyohak Publishing Co., Seoul.

2. Kim, S. S. and Kim Y. S. (1990) Korean mushrooms. 300-301. Yupoong Publishing Co., Seoul.
3. Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S. (1988) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* 28(1): 193-197.
4. Protiva, J., Skorkovska, H., Urban, J. and Vystřcil, A. (1980) Triterpenes LXIII. Triterpenes and steroids from *Ganoderma applanatum*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45(10): 2710-2713.
5. Mizuno, T., Hayashi, K., Arakawa, M., Shinkai, K., Shimizu M. and Tanaka, M. (1981) Host-mediated antitumor polysaccharides III. Fractionation, chemical structure, and antitumor activity of water-soluble homoglucons isolated from kofukisarno koshikske, the fruit body of *Ganoderma applanatum*. *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku* (31): 49-64.
6. Mizuno, T., Hayashi, K., Iwasaki, Y., Shitano, A. Arakawa, M., Shinkai, K., Shimizu, M. and Tanaka, M. (1981) Host-mediated antitumor polysaccharides IV. Fractionation, structural study and antitumor activity of heterogalactans isolated from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* and *Fomitopsis pinicola*. *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku* (31): 65-82.
7. Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. (1983) Isolation and characterization of antitumor active  $\beta$ -D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* 115(1): 273-280.
8. Misaki, A., Sone, Y., Yoshida, M. and Takeuchi K. (1985) Manufacture of a new  $\beta$ -glucan. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 60, 188, 402.
9. Nakashima, S., Umeda, Y. and Kanada, T. (1979) Effect of polysaccharides from *Ganoderma applanatum* on immune responses I. Enhancing effect on the induction of delayed hypersensitivity in mice. *Microbiol. Immunol.* 23(6): 501-513.
10. Kondo, A. and Kondo, K. (1987) Moxa cautery compositions containing germanium. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 62, 209, 022.
11. Han, S. S. and Baik, S. R. (1988) Studies on inorganic constituents and antimicrobial activity of *Elfvigia applanata* (P<sub>er</sub>) K<sub>ARST</sub> in Korea. *Chungbuk J. Pharm. Sci.* 3: 44-50.
12. Kandefer, S. M., Kaweckı, Z. and Guz, M. (1979) Fungal nucleic acids as interferon inducers. *Acta Microbiol. Pol.* 28(4): 277-291.
13. Nerud, F., Misurcova, Z. and Musilek, V. (1989) Production of milk-clotting enzymes by Basidiomycetes. *Folia Microbiol. (Proque)* 34(4): 310-315.
14. Yamada, Y., Hsu, C. S., Iguchi, K. and Suzuki, M. (1973) Chemical constituents of fungi II. Coenzyme Q<sub>9</sub> from *Ganoderma applanatum*. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* (23): 290-292.
15. Ripperger, H. and Budzikiewicz, H. (1975) Steroids from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* 14(10): 2297-2298.
16. Yamada, Y., Hsu, C. and Suzuki, M. (1974) Chemical constituents of fungi III. Fluorescent constituent from *Ganoderma applanatum*. *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* 24: 427-429.
17. Yoshida, H., Sugahara, T. and Hayashi, J. (1986) Free sugars, free sugar alcohols and organic acids of wild mushrooms. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 33(6): 426-433.
18. Kim, Y. S., Ryu, K. H., Mo, Y. K., Lee, C. K. and Han, S. S. (1994) Effect of the Antitumor Component, F-D-P, Isolated from *Elfvigia applanata* on the Immune Response. *Kor. J. Pharmacogn.* 25(4): 348-355.
19. Kim, Y. S., Rym, K. H., Lee, C. K. and Han, S. S. (1994) Antimicrobial activity of *Elfvigia applanata* extract alone and in combination with some antibiotics. *Yakhak Hoeji* 38(6): 742-748.
20. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. and Gilman, A. G. (1991) The pharmacological basis of therapeutics (9th eds.). 1191-1223. McGraw-Hill, New York.
21. Kim, Y. S., Kang, J. K., Lee, C. K. and Han, S. S. (1994) Effect of *Elfvigia applanata* extract on the acute toxicity in mice. *Yakhak Hoeji* 38(6): 756-762.
22. Langford, M. P. and Weight, D.A. (1981) Virus plaque-reduction assay for interferon: microplaque and regular macroplaque reduction assays. *In* methods in enzymology (Sidney Pestka, eds.). vol. 78, 339-346. Academic Press, New York.
23. Hondo, R., Shibuta, H. and Matumoto, M. (1976) An improved plaque-assay for Varicella virus. *Arch. Virology* 51: 355-359.
24. Scubiero, D. A., Shoemaker, R. H. and Paull,



- K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.
25. Katz, D. H., Marcelletti, J. F., Khalil, M. H. and Pope, L. E. (1991) Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10825-10829.
26. Barnard, D. L., Smee, D. F., Huffman, J. H., Meyerson, L. R. and Sidwell, R. W. (1993) Antiherpes virus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy* 39: 203-211.
27. Gill, D. S. and Banerjee, A. K. (1985) Vesicular stomatitis virus NS proteins: Structural similarity without extensive sequence homology. *J. Virol.* 55: 60-66.
28. Gill, D. S. and Banerjee, A. K. (1986) Complete nucleotide sequence of the matrix protein mRNA of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). *Virology* 150: 308-312.
29. White, D. O. and Fenner, F. J. (1994) Medical virology (4th ed.). 382-406. Academic Press Inc., California.
30. Chihara, G., Maeda, Y., Hamura, T., Sasaki, T. and Fukuoka, F. (1969) Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Nature* 222: 687.
31. Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Isida, N. (1978) Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* 32: 1079.
32. Shannon, W. M. (1984) Mechanism of action and pharmacology: chemical agents. In Glasso, G. J., Merigan, T. C. and Buchanon, R. A. (ed.), Antiviral agents and viral diseases of man, 55-121. Raven Press. New York.

(1999년 1월 10일 접수)