

수종 한약 처방 煎湯液의 헤피즈바이러스에 대한 효능 검색

임성우

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Screening for Various Herb Medicines Extracts HSV 1-2

Lim Seong Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : In order to find antiviral compounds against Herpes simplex virus type I (HSV-1) and II (HSV-2) from herb medicines, a convenient virus-induced cytopathic effect (CPE) inhibition assay was introduced.

Methods : Fourteen purchased herbal medicines, and their toxicity of infected cell and anti-viral activities were evaluated. Among them, the major part of herbal medicines showed cell stability compared with the contrast.

Results : Cytotoxic concentration (CC) of the H₂O extracts of Hyongbangaedoksan against HSV-1 and HSV-2 was 181.12. This is high level cytotoxic concentration compared with the contrast. Therefore, we assumed that the high level cytotoxic concentration of herbal medicine play a major role in improvement of antiviral activity at the first infective cell. But antiviral effect was unable to figure out for selective index(SI)=CC50/EC50. The other herbal medicines were unable to showed potent anti-HSV activity.

Conclusions : The antiviral activation using herbs in this thesis have unlimited objects, to select research object will help to show the direction of antiviral drug development that have less side effect and more excellent efficiency.

Key Word : Herb medicine, herpes simplex virus, cytopathic effect, screening

I. 緒 論

바이러스는 박테리아와 더불어 감염성 질환을 일으키는 중요한 원인으로 알려져 있고 바이러스로 인한 질병은 상기도감염, 설사, 뇌염, 면역결핍증, 포진등 다양하다^{1,2)}. 특히 herpes virus는 단순 포진형 바이러스로 발병위치에 따라 1형(구순형)과 2형(음부형)으로 나누고 재발을 잘하는 특징을 가지고 있으며 한의학에서 溫毒, 發瘡, 纏腰火丹, 蛇串瘡, 鰓帶瘡으로 표현된다^{3,4)}.

포진형 바이러스 질환은 인체에 침입한 바이러스가 면역기구에 선택적으로 감염되어 면역 안정성을 파괴시켜 구순

이나 음부에 나타나는 면역과민증으로^{5,6)}, 임상에서 補氣養陰, 益氣養血, 健脾養胃, 清熱解毒, 活血化癥, 發散海表등의 治法으로 邪氣를 억제하고 正氣를 부양하여 바이러스의 억제와 면역활성에 응용하였고^{7,8,9)}, 실험적으로 Descalzo AM & Coto C¹⁰⁾의 천련자잎의 추출물이 herpes virus의 일종인 pseudorabies의 증식을 억제한다는 보고와 Sakagami 등¹¹⁾의 pine cone의 향 herpes virus 효과에 대한 보고, Woo 등¹²⁾이 연구한 수종의 단미한약의 향 herpes virus 활성에 대한 검색, 강 등¹³⁾의 복합 한약 탕제분획의 향 herpes virus 활성에 대한 검색 등이 있다.

이에 저자는 향 herpes virus 효능 검색을 위하여 수종의 복합탕제 각 군별로 7가지씩 선정하여 1군은 清熱解毒除濕發表하는 처방군으로, 2군은 補氣補血滋陰하는 처방군으로 분류하여 각각의 煎湯液을 Herpes simplex virus I Herpes simplex virus II에 대하여 세포 독성과 항바이러스 활성을 검색하고, 수종의 단미 한약을 이용한 Woo 등¹²⁾의 향 herpes virus의 실험결과와 비교하여 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

약재는 시중건재상에서 구입하여 경

1군

처방	약물구성과 용량 (g)
完肺湯 ¹⁴⁾	金銀花 玄蔘 各20g, 蒲公英 12g, 天花粉 甘草 桔梗 各6g, 人蔘 黃芩 各4g.
內消沃雪湯 ¹⁴⁾	大黃酒蒸 8g, 當歸 白芍藥 甘草 黃芪 射干 連翹 白芷 貝母 陳皮 皂角刺 天花粉 穿山甲 金銀花 木香 乳香 沒藥 各4g.
加味龍膽瀉肝湯 ¹⁵⁾	大黃 20g, 金銀花 16g, 草龍膽 當歸 乾地黃 柴胡 澤瀉 木通 車前子 赤茯苓 各6g, 梔子 黃芩 甘草 各3g, 牡丹皮 玄胡索 各4g.
胡麻散 ¹⁴⁾	胡麻子 8g, 苦蔘 荊芥 何首烏 威靈仙炒 防風 石菖蒲 枳實 甘菊 蔓荊子 白蒺藜 甘草 各3g.
除濕胃苓湯 ¹⁴⁾	蒼朮炒 厚朴炒 陳皮 猪苓 澤瀉 赤茯苓 白朮炒 滑石 防風 梔子 木通 各4g, 肉桂 甘草 各2g 燈心草 6g.
除濕湯 ¹⁴⁾	蒼朮 厚朴 半夏 各6g, 藿香 陳皮 各4g, 甘草 各2g, 生薑 3片, 大棗 2個.
荊防敗毒散 ¹⁴⁾	荊芥 防風 羌活 獨活 前胡 柴胡 枳殼 桔梗 川芎 各4g, 赤茯苓 人蔘 各2g, 甘草 4g, 生薑 3片.

2군

처방	약물구성과 용량 (g)
人蔘養營湯 ¹⁶⁾	白芍藥 8g, 當歸 人蔘 白朮 黃芪 蜜炙 肉桂 甘草炙 各4g, 熟地黃 五味子 防風 各3g, 遠志 2g, 生薑 3片, 大棗 2個.
內托黃芪散 ¹⁴⁾	黃芪 6g, 當歸 白芍藥炒 川芎 白朮炒 陳皮 穿山甲 皂角刺 各4g, 檳榔 肉桂 各2g.
加味非膿湯 ¹⁴⁾	桔梗 12g, 甘草 6g, 杏仁 五味子 麥門冬 天門冬 當歸 各4g, 生薑 3片, 大棗 2個.
八珍湯 ¹⁶⁾	人蔘 白朮 白茯苓 甘草 熟地黃 白芍藥 川芎 當歸 各4g.
甘露飲 ¹⁷⁾	熟地黃 生地黃 各12g, 茵陳 天門冬 麥門冬 各8g, 黃芩 黃連 枳殼 石斛 枇杷葉 各6g, 甘草 4g.
蔘芪內托散 ¹⁴⁾	人蔘 黃芪炒 當歸酒洗 白朮炒 陳皮 甘草 升麻 生地黃酒洗 姜活 厚朴 各4g.
透膿散 ¹⁴⁾	黃芪 16g, 川芎 12g, 當歸 8g, 皂角刺 6g, 穿山甲 4g.

희대학교 본초학교실에서 정선하여 사용하였다.

1-1. 14개 처방의 구성약제와 1첩 분량은 다음과 같고 각 군은 주치별 특징으로 구분하였다.

2. 항바이러스(Herpes Simplex Virus type I, Herpes Simplex Virus type II) 효능 실험

2-1. 항 HSV type I, II 약효 검색
 약효 검색은 한국화학연구소 의약활성실에서 CPE/MTT assay법¹⁸⁾으로 실험하였다.

2-1-1. 세포 배양

Vero 세포(African green monkey kidney cell)의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(25cm)에 5% fetal bovine serum(FBS) 4μg/ml gentamycin을 첨가하여 37℃, 5%CO₂ 항온기에서 세포 단층이 분리될 때까지 주 2회 배양하였다. 감염주는 HSV-1, HSV-2에 감염된

vero cell의 배양 上澄液으로부터 얻었다. 上澄液의 virus 층은 MTTassay법으로 측정하였으며 virus주는 -70oC에서 부분 표본으로 저장하였다.

2-1-2. 항 Herpes simplex virus 약효검색

약효 검색은 virus-induced effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 96 well plate에 Vero 세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 virus를 각 well에 접종량이 100 CCID50(50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100μl 씩 접종하고 1시간 동안 37℃에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100μl씩 첨가하고 37℃ CO₂ 배양기에서 3일간 배양한 다음 MTT 검색법으로 50%의 세포를 살아 남도록 한 약물의 농도를 EC50 (50% effective concentration)으로 결정하였다. 약효 평가시 약물의

독성에 의한 영향을 알 수 있도록 virus 접종시 virus가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 넣은 다음(mock-infected) virus로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리되었다. 즉, 한 시간 동안 배양한 다음에 배지가 제거되었고 배양액에 희석된 약물이 duplicate로 첨가되었다. 3일간 배양한 다음 MTT 검색법으로 약물에 첨가된 각well의 살아남은 세포수를 약물에 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽게 한 약물의 농도를CC50(50% cytotoxic concentration)으로 결정하였다.

양성 대조 물질로는 HSV에 대한 항바이러스 효과가 인정된 ACV(acyclovir)와 ARA-C를 1mg/ml부터 10배 단계로 희석하여 사용하였다.

2-1-3. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT) assay 검색법

이 검색법은 살아남은 세포의

microchondrial dehydrogenase가 노란 색을 띤 MTT를 보라색을 지닌 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기 용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아 있는 세포와 죽은 세포 수를 상대적으로 비교하는 것이다. 배양이 끝난 Vero 세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3mg/ml로 희석된 MTT(Sigma)용액을 96-well plate의 well당 50µl씩 넣어 준 다음 37°C CO2 배양기에서 두 시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100µl씩 각 well에 넣어준 다음 교반기를 이용하여 fromazan 결정들이 완전히 녹도록 하였다.

Microplate reader(Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540nm와 690nm에서의 흡광도를 읽었다. A540과 A690의 흡광 편차에서 blank값을 뺀 다음 cell control과 virus control을 비교하였다.

즉 항 virus 효과는 $\frac{(AT)HSV-(Ac)HSV}{(Ac)mock-(Ac)HSV} \times 100(\%)$ 로서

세포독성은 $\frac{1-(AT)mock}{(Ac)mock} \times 100(\%)$ 로서

(AT)HSV : virus와 약물이 첨가된 well의 흡광도
 (AC)HSV : virus만 첨가된 well의 흡광도(virus control)
 (AC)mock : 배양액만이 첨가된 well의 흡광도(cell control)
 (AT)mock : 약물이 첨가된 well의 흡광도
 항 HSV값으로부터 EC50과 세포독성값으로부터 CC50을 구한 후 selectivity index(SI) (CC50/EC50)을 구하였다.

3. 시료의 조제

시료는 完肺湯, 內托沃雪湯, 加味龍膽瀉肝湯, 胡麻散, 除濕胃苓湯, 除濕湯, 荊防敗毒散, 人蔘養營湯, 內托黃芪散, 加味排膿湯, 八珍湯, 甘露飲, 蔘芪內托散, 透膿散 3첩 분량에 물을 각 약첩이 완전히 잠기게 1.5배정도 넣고 5시간 冷沈後 가열하여 얻어진 추출액 50cc를 freezing dry(동결 건조) 하여 고체 분말을 얻은 다음, 다시 5mg의 시료를 평취하여 10ml의 증류수에 녹인 다음 3배씩 희석하여 각각 500, 166.67, 55.56, 18.52, 6.17 µg/ml 농도의 시료 용액을 제조하였다.

III. 實驗成績

1. 1 처방군의 항 HSV type I, II 활성도 검색 결과

7개 1군 처방의 HSV- I, II에 대한 CC50 값은 각각 >500.00, 449.81, >500.00, >500.00, >500.00, >500.00, 181.81로 나타나 단위량(µg/ml)당 세포 독성은 대조 약물 ACV, Ara-c에 비하

여 낮게 나타났다. EC50 값은 각각 >500.00, 449.81, >500.00, >500.00, >500.00, >500.00, 181.81으로 나타났고 CC50 값이 대조약물에 비하여 높게 나타나 지속적인 항바이러스 효과의 유의성을 관찰할 수 없었으나 荊防敗毒散의 경우 CC50가 181.12로 대조 약물 ACV에 비해 단위량(µg/ml)당 세포독성이 커서 감염 초기의 항바이러스 효과가 있음을 알 수 있었다.(Table 1)

2. 2 처방군의 항 HSV type I, II 활성도 검색 결과

7개 2군 처방의 HSV- I, II에 대한 CC50 값은 八珍湯이 >300, 나머지 처방은 >500으로 나타나 대조 약물 ACV, Ara-C에 비해 단위량(µg/ml)당 세포 독성은 낮게 나타났다. EC50 값은 八珍湯이 >300, 나머지 처방이 >500으로 나타나 항바이러스 효과가 없었고 CC50 값이 대조 약물에 비하여 매우 높게 나타나 바이러스 감염 세포에 대한 유의성을 관찰할 수 없었다.(Table 2)

Table 1. Screening for extracts of group-1 herbal medicines against HSV- I, II

No	Herbal Medicine	Toxicity CC ₅₀ ^{a)}	Antiviral activity(EC ₅₀) ^{b)}		Selective index ^{c)}	
			HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
1	Wanvaetang	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
2	Naesooksultang	449.81	>449.81	>449.81	<1	<1
3	Yongdamsagantang plus daewhang	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
4	Homasan	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
5	Chesupwilyungtang	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
6	Chesuptang	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
7	Hyungbangpaedoksan	181.12	>181.12	>181.12	<1	<1
8	ACV	>250	0.77	1.27	>325	>197
9	Ara-C	9.96	0.48	0.88	20.75	11.32

a) 50% Cytotoxic Concentration (CC₅₀) is the concentration of the 50% cytotoxic effect
 b) 50% Effective Concentration (EC₅₀) is the concentration of the sample required to inhibit virus-induced CPE 50%
 c) Selective index(SI)=CC₅₀/EC₅₀

Table 2. Screening for extracts of group-2 herbal medicines against HSV- I, II

No	Herbal Medicine	Toxicity CC ₅₀ ^{a)}	Antiviral activity(EC ₅₀) ^{b)}		Selective index ^{c)}	
			HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
1	<i>Insamyangyoungtang</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
2	<i>Naetakwanggisan</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
3	<i>Gamibaenongtang</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
4	<i>Paljintang</i>	>300.00	>300.00	>300.00	ND	ND
5	<i>Ganroum</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
6	<i>Samginaetaksan</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
7	<i>Toonongsan</i>	>500.00	>500.00	>500.00	ND	ND
8	ACV	>10.00	0.2746	0.7823	>36.42	>12.78
9	Ara-C	3.841	>3.84	>3.84	>3.84	>3.84

a) 50% Cytotoxic Concentration (CC₅₀) is the concentration of the 50% cytotoxic effect
 b) 50% Effective Concentration (EC₅₀) is the concentration of the sample required to inhibit virus-induced CPE 50%
 c) Selective index(SI)=CC₅₀/EC₅₀

Table 3. The anti-herpetic activity(58) on various extracts

Plants	Parts used	Frac ^{a)}	Toxicity (CC ₅₀) ^{b)}	Antivira activity (EC ₅₀) ^{c)}		Selective index' (SI) ^{d)}	
				HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
Caragana sinica	root	M	>300	>300	>300	ND	NC
		D	188	>188	>188	<1	<1
		E	>300	37.2	>12.1	>8.06	>24.79
		B	>300	>300	>300	ND	ND
		H	>300	>300	>300	ND	ND
Osmunda japonica	aerial part	M	>300	86.97	230.6	>3.45	>1.25
		D	>300	249.2	>300	>1.2	ND
		E	153.5	74.18	72.73	2.07	2.11
		B	>300	>300	>300	ND	ND
		H	>300	>300	>300	ND	ND
Veratum patulum	whloe plant	M	>300	168	>300	>1.79	ND
		D	129	23.5	98.2	5.49	1.31
		E	113	76.4	90.8	1.48	1.24
		B	>300	>300	>300	ND	ND
		H	>300	>300	>300	ND	ND

a) M:MeOH ext, D:CH₂Cl₂ ext, E:EtOAc ext, B:BuOH ext, H:H₂O ext
 b) 50% Cytotoxic Concentration (CC₅₀) is the concentration of the 50% cytotoxic effect
 c) 50% Effective Concentration (EC₅₀) is the concentration of the sample required to inhibit virus-induced CEP 50%
 d) Selective index(SI)=CC₅₀/EC₅₀

3. 수종의 단미 한약의 항 바이러스 활성에 관한 검색

Woo 등¹²⁾이 보고한 유기 용매를 이용한 한약재 추출물의 HSV- I, II의 항 바이러스 효능 검색에서 金雀根(*Caragana sinica*)은 EtOAc 용매 추출

에서 selective index값이 각각 >8.06, >24.79로 높은 길항가를 나타냈고 貫衆(*Veratrum patulum*)은 CH₂Cl₂ 용매 추출에서 selective index값이 각각 >5.49, >1.31로 白藜蘆根(*Osmunda japonica*)는 MeOH 용매 추출에서

>3.45, >1.25로 나타나 일정 수준의 약 효를 나타내었다.(Table 3)

IV. 總括 및 考察

“바이러스”라는 말은 라틴어로 “毒”이란 의미를 함축과 초현미경적 미생물체인 살아 있는 분자를 말하며¹³⁾, 박테리아와 더불어 감염성 질환을 일으키는 중요한 원인으로 다양한 형태 및 구조, 숙주의 감수성, 전파 양식, 감염 이후의 면역학적 변화 등으로 두통, 오한, 발진, 기침 등이 外感 질병의 전염 과정과 비슷하며 病程이 매우 重하고 전염성도 강하다는 점에서 ‘疫毒’의 범주에 속한다¹⁴⁾. 이는 Adenovirus에 의한 상기도 감염과 rotavirus에 의한 설사, herpes virus로 인한 단순 포진과 같이 경미한 질환에서부터 japanese B encephalitis virus human immunodeficiency virus(HIV)에 의한 뇌염과 면역 결핍증 같은 중증 질환을 일으킨다¹⁵⁾.

바이러스로 인한 발병은 인체내로 침입한 바이러스가 인체의 면역 기구의 중심에 선택적으로 감염되어 그것을 파괴하므로써 세포내 안정성 파괴로 인한 과민증을 일으킨다^{16,20)}. 이는 한의학에서 溫病의 疫毒邪가 인체에 침입하여 먼저 上部에서 感하여 肺로 犯하고 衛에서 氣로 膺에서 血로 入하는 과정이 바이러스 질환의 감염증에 있어 급성 감염기가 존재하고 그 증상이 유행성 단핵구 증상인 HSV에 의한 皮膚 發赤, 癢疹, 濕疹, 疼痛과 유사하다고 본다⁷⁾.

바이러스의 질환의 치료는 백신(vaccine)의 개발이 일찍부터 연구되어 왔음을 알 수 있다.

천연두의 예방법이 일찍 중국의 공자 시대에 민간요법으로 실시되었고 Jenner에 의해 천연두 예방액이 개발되

어 많은 사람에게 접종하여 큰 효과를 보게 되었다. 이후 광견병 백신이 개발된 후 1913년 미국에서 원숭이를 이용하여 바이러스를 감염시켜 바이러스를 증식시킨 후 만든 백신이 인체에 접종되어 폴리오 바이러스에 큰 효과를 얻게 되고 경구 투여제의 개발도 있었다²⁰⁾. 최근에는 생체내 바이러스 증식을 억제하기 위한 효소 저해제의 개발이나 두종의 바이러스가 동시에 감염되었을 때 세포나 동물체내에서 하나의 바이러스에 의한 인터페론 생성의 유도도 다른 바이러스의 증식을 억제시키는 인터페론의 사용이 있다^{5,19)}.

그러나 이제까지의 항바이러스제 개발의 성과는 세균에 대한 항생제의 개발과 비교해 볼 때 매우 미흡한 실정이다. 이것은 바이러스의 증식 과정이 세균과는 달리 숙주 세포와 동일한 방식을 사용하기 때문에 치료제의 기초가 되는 선택적 독성(selective toxicity)을 갖기가 어렵기 때문이다²⁰⁾. 현재까지 개발된 항바이러스제는 바이러스가 감염된 세포에서 바이러스 핵산 복제가 빨리 진행된다는 점에서 이를 억제시키는 법이 주종을 이루고 있다. 그러나 이러한 방법은 정상적인 숙주 세포에서도 나타나므로 국소적으로만 사용되어지고 있고 그 외 전신 투여가 허용되는 약물도 간기능 저하나 생식 세포에 대한 독성이 따르기 때문에 실제로 임상에서 사용하고자 할 때는 위험이 따르고 있는 실정²¹⁻²³⁾이므로 부작용이 적고 효과가 우수한 바이러스 질환 치료제의 개발은 절실하다.

한약을 이용한 항바이러스제의 개발은 첫째, 單味 한약제를 통한 생합성 물질의 다양화와 둘째, 기존의 항바이러스제가 가지는 직접적인 약리작용에 대한 임상적 부작용을 줄이고 처방의 처방

운용을 다양한 한방 처방의 辨證 治療를 통하여 보완 발전시킬 수 있다고 본다.

HSV 감염증에 대한 효과는 Descalzo 등¹⁰⁾은 川楝子의 추출물이 herpe virus의 일종인 pseudorabies virus의 증식을 억제한다고 하였고 Sakagami 등¹¹⁾은 海松子의 추출물이 herpes virus에 대한 항바이러스 효과가 있음을 보고하였고, 예로부터 우리 선조들은 脣瘡이나 華背瘡와 같은 바이러스 감염증에 薏苡仁이라는 울무의 씨를 처방한 것²⁰⁾도 herpes 바이러스 감염증에 대한 치료 인식이 있는 것으로 보인다. 그 외에도 Chang²⁴⁾의 The phamalogical of Chinese herbs에서 黃柏, 金銀花, 蒲公英, 虎杖根, 魚腥草, 山豆根, 靑黛가 HSV에 대해 항바이러스 효과가 있는 것으로 보고되었다.

한약 처방의 항바이러스 효과에 대한 임상 응용은 白蛇纏瘡에 萬病解毒丹²⁵⁾ 火丹에 除濕胃茶湯²⁷⁾, 纏腰火丹에 龍膽瀉肝湯²⁶⁾을 처방하였는데 이는 그 증상 및 치법이 herpes virus 감염증에 사용된 것으로 사료된다.

한약 처방의 항바이러스 효과에 대한 실험적연구는 朴 등²⁷⁾이 보고한 한약 湯제를 이용한 항herpes simplex virus활성에 관한 연구에서 除濕胃茶湯, 龍膽瀉肝湯등이 유의성 있는 효과를 보인 것으로 보고되었다. 그 외에도 甘露消毒飲, 黃連解毒湯, 清營湯, 大黃牡丹皮湯등이 HSV에 직접 작용하는 것으로 밝혀졌고 人蔘養營湯, 八味地黃丸, 八珍湯, 歸脾湯등이 HSV감염에 대해 면역기능 향진에 영향을 미치는 것으로 알려졌다²⁸⁾.

이와 같이 한약의 실험 및 임상 연구를 통해 HSV의 치료는 바이러스를 직접 억제하는 방법과 면역 기능을 증강시키는 방법으로 나눌 수 있다. 이는 유기체의 抗病力을 조절하고 면역 효능을

높이며 그 안정성을 증강시키는 扶正과 면역 효능을 파괴하는 요소를 배제하는 祛邪의 兩面이 공존하는 한의학적 처방 특징으로 바이러스 감염증에 의한 과민증을 치료하고 면역 기능 저하로 인한 질병의 악화를 막는데 우수한 치료법으로 선택될 수 있다.

본 실험에서 선정된 14가지 한약 처방은 바이러스를 직접 억제할 가능성이 높은 清熱解毒除濕發表시키는 처방군과 면역기능증가 효과가 높은 補氣補血 滋陰시키는 처방군으로 분류하였고, 대조군으로 사용한 ACV(acyclovir)는 HSV의 핵산복제효소를 억제시키는 비교적 부작용이 적고 효과가 우수하여 널리 사용되고 있고²⁸⁾ ARA-C는 HSV로 인한 구순종창에 바이러스를 강하게 억제시키나 세포독성이 큰 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

본 실험에 사용된 바이러스는 Herpes simplex virus 1형과 2형으로 단순 포진형 바이러스로 발병 위치에 따라 1형(口脣形)과 2형(陰部形)으로 나누는데 비교적 경미한 바이러스 감염증으로 재발을 잘하는 특징을 가지고 있으며 살아 있는 세포의 배양을 하였는데 이는 바이러스는 세균과는 달리 보통 합성 배지에서 증식하지 못하고 반드시 생세포내에서만 증식하기 때문이다¹⁹⁾.

약효의 검색은 MTT assay법¹⁸⁾으로 herpes simplex virus I, Herpes simplex virus II를 사용하였다. MTT assay법은 생존 세포내 효소 작용에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)의 환원으로 형성되는 formazan crystal 양을 흡광도로 측정하여 이로부터 한약제에 의해 세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 방법으로, 96 well plate를 이용하면 실험 조작의 자동화가 가능

하고 실험결과와 재현성과 객관성도 우수하여 대량 검색이나 1차 검색에 적합하다²⁷⁾.

시료의 Vero 세포에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 시료를 농도별로 HSV의 Vero 세포에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 각각 6일간, 3일간 2회씩 배양한 후 MTT assay로 살아 있는 세포에 의한 formazan 생성물을 실험 종료시 흡광도로 측정하여 세포 독성의 시험 결과를 비교하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 생존 세포수를 의미한다. 실험을 통하여 HSV-I, II의 길항 작용에 유의성이 기대되는 14개의 처방을 세포병리학적인 길항 역가 분석(CPE inhibition assay)으로 비교적 짧은 기간에 살펴 볼 수 있었으며 세포병리학적인 길항 역가 분석(CPE inhibition assay)은 바이러스 배양에 따른 신속하고 정확한 방법으로 앞으로도 지속적인 연구 개발이 필요하다.

바이러스의 배양과 약물의 독성 및 효능의 검색은 일반 세균 실험과는 달리 실험의 외적 환경에 영향을 많이 받아 오차가 클 수 있으므로 실험의 시작과 끝 단계에서 같은 환경의 유지 및 실험자의 동일한 테크닉이 요구된다. 본 실험에서 사용된 대조 약물 ACV, Ara-C의 CC₅₀값과 EC₅₀값이 각 처방 군마다 틀게 나타난 것이 이 때문이다.

이상의 CPE(cytopathic effect) 길항 작용 검색의 결과로 HSV-I, II에 대해 14종의 한방 처방에 대해 cytotoxicity 및 antiviral activity를 비교적 짧은 시간내에 검색해 볼 수 있었다.

1군 처방의 辨證 治法은 주로 清熱解毒, 排膿消腫, 瀉下除濕, 發散解表 治法으로 바이러스의 억제 작용이 기대되는

처방이다. 1군 7개 처방의 HSV-I, II에 대한 항바이러스 활성 검색은 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 CC₅₀ 값은 完肺湯, 加味龍膽瀉肝湯, 胡麻散, 除濕胃茶湯, 除濕湯 모두 >500, 內托沃雪湯 449.81로 나타났으나 대조 약물 ACV, Ara-C에 비하여 지나치게 높아 감염 세포에 독성 및 약효에 대한 유의성을 확인하지 못하였으나, 荊防敗毒散은 181.12로 대조군 ACV에 비해 낮게 나타나 HSV 초감염에 대해 바이러스 증식억제의 유의성이 있을 것으로 사료된다.(Table 1)

3군 7개의 처방은 면역기능을 증강시켜 HSV의 증식을 억제하는 扶正固本, 扶正益陰, 補腎滋陰, 補氣養血, 滋腎養肝하는 처방의 처방으로 HSV-I, II에 대한 항바이러스 활성 검색에서는 CC₅₀ 값은 八珍湯이 >300, 나머지 처방은 >500으로 나타나 대조군에 비해 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 세포 독성은 낮게 나타났으나 그 수치가 대조 약물 ACV과 Ara-C의 >10.00, 3,841에 비하여 너무 크고 EC₅₀도 八珍湯이 >300, 나머지 처방이 >500으로 대조 약물에 비해 높아 효과가 없었다.(Table 2)

이에 비교하여 Woo 등¹²⁾이 보고한 수종의 한약재 추출물의 HSV-1,2의 항바이러스 효능 검색에서 金雀根(Caragana sinica)은 EtOAc 용매 추출에서 selective index값이 각각 >8.06, >24.79로 높은 길항가를 나타냈고, 貫衆(Veratrum patulum)은 CH₂Cl₂ 용매 추출에서 selective index값이 각각 >5.49, >1.31로 白藜蘆根(Osmunda japonica)은 MeOH용매 추출에서 >3.45, >1.25로 상당한 항바이러스 효과가 인정되었다.(Table 3)

金雀根은 補氣利尿, 活血通絡, 止痛하는 主治³⁰⁾로 바이러스 질환의 임상에는 잘 쓰이지 않고, 貫衆은 清熱解毒, 涼血

止血하여 濕熱癩疹 응용³⁰⁾하고 白藜蘆根은 惡瘡과 皮膚 瘙癢 癩疹을 치료³¹⁾하여 Herpes 감염증에 응용될 수 있는 것으로 보는데 이는 主治와 실제 실험에서의 약효가 다를 수 있음을 보여 준다. 또한 Woo 등¹²⁾의 실험에서 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH등 다양한 유기 용매를 이용한 한약의 추출이 바이러스에 대한 길항효과가 기대되는 한약의 주요 성분 분리에서 용매의 종류와 극성에 따라 추출되는 화합물 함유 정도의 차이가 커서 본 실험 방법에 의한 물煎湯의 경우와 큰 차이를 보인 것으로 보인다.

이상의 실험 결과 대부분의 처방은 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 세포 독성이 대조군에 비하여 낮은 것으로 나타나, 바이러스 질환에 응용될 수 있는 한약은 세포 독성에 대해 어느 정도 안정성을 가지는 것으로 보인다. 또한 荊防敗毒散의 경우 CC₅₀값이 대조 약물과 비슷하거나 낮게 나타나 HSV 감염 세포의 증식 억제에 유의성이 있다고 보는데, 다른 약이나 대조 약물에 비해 적은 양에서 감염된 세포가 사멸되었기 때문이다. 그러나 Vero 세포에서 일정 기간(6일간) 바이러스를 증식 억제하여 일정 수준의 약효가 인정되는 EC₅₀값은 대조 약물에 비하여 낮아서, 최초 감염 세포에 대한 일정 기간의 약효 유지가 안된 것이 보완되어야 할 문제였다.

향후 바이러스 감염 유기체의 항상성을 유지하고 면역 기능을 증가시킬 수 있는 한의학적 처방을 다양한 처방 선정에 응용하여, 바이러스 감염증 치료에 초기 과민증을 없애고 바이러스의 증식을 억제하기 위한 임상 연구가 세포면역학적 실험 연구로 발전되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

항바이러스 효과가 기대되는 完肺湯, 內托沃雪湯, 加味龍膽瀉肝湯, 胡麻散, 除濕胃苓湯, 除濕湯, 荊防敗毒散, 人蔘養營湯, 內托黃芪散, 加味排膿湯, 八珍湯, 甘露飲, 蔘芪內托散, 透膿散의 14개 처방에 대해 HSV-1,2 항바이러스 활성 검색 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 7개 1군 처방의 HSV- I, II에 대한 CC50 값은 각각 >500.00, 449.81, >500.00, >500.00, >500.00, >500.00, 181.81로 나타나 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 세포 독성은 대조 약물 ACV, Ara-c에 비하여 낮게 나타났다. EC₅₀ 값은 각각 >500.00, 449.81, >500.00, >500.00, >500.00, >500.00, 181.81으로 나타났고 CC50 값이 대조약물에 비하여 높게 나타나 지속적인 항바이러스 효과의 유의성을 관찰할 수 없었으나 荊防敗毒散의 경우 CC50가 181.12로 대조 약물 ACV에 비해 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 세포독성이 커서 감염 초기의 항바이러스 효과가 있음을 알 수 있었다.

2. 7개 2군 처방의 HSV- I, II에 대한 CC50 값은 八珍湯이 >300, 나머지 처방은 >500으로 나타나 대조 약물 ACV, Ara-C에 비해 단위량($\mu\text{g/ml}$)당 세포 독성은 낮게 나타났다. EC₅₀ 값은 八珍湯이 >300, 나머지 처방이 >500으로 나타나 항바이러스 효과가 없었고 CC50 값이 대조 약물에 비하여 매우 높게 나타나 바이러스 감염 세포에 대한 유의성을 관찰할 수 없었다.

VI. 參考文獻

- Coster DJ, Jones BR, McGill JJ: Treatment of amoeboid herpetic ulcers with adenine arabinoside or trifluorothymidine, Br. j. Ophthalmol.; 63, pp.418-421, 1979.
- Kaufman HE, Martola EL, Dohlman CI. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine(IDU) intreatment of herpes simplex keratitis.
- 김동희, 박경식, 김성훈: AIDS의 병리, 증상 및 치료에 대한 동서의학적 비교 고찰, 대전, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 4권 2호, p78, 81, pp.84-85, 1990.
- 홍익표, 김중호, 채병윤: 대상포진에 관한 동서의학적 비교, 서울, 대한한방의관과학회지, 3권 1호, p.73, 1990..
- 김승곤, 김충환, 박기호: 임상바이러스학, 서울, 고려의학, p.26, 1994.
- 황성철: 병원미생물학, 서울, 우일출판사, p.337, 1997.
- 김성훈: 동의병리학, 대전, 한림원, pp.128-129, 1994
- 唐小山 外: 抗艾滋病藥物的研究方法, 北京, 中西醫結合雜誌, 3卷, pp.173-176, 1990.
- 馬乃班: 中醫藥治療艾滋病的體會, 上海, 上海中醫雜誌, 7卷, p.18, 1993.
- Descalzo AM, Coto C: Inhibition of the pseudorabies virus by an antiviral agent isolated from the leaves of MeliaAzedarach, Rev. Argent Microbiol., 21, pp.131-140, 1989
- Sakami H, Kawazoe Y, Komatsu N, et al., Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of pine cone extracts:potential medicinalefficacy of natural and synthetic lignin-related materials. Anticancer Res. 11, p.881-8. 1991.
- Woo ER, Kim HJ, Lim YK, Park SK, Kim HS, Lee HS, Park HK: Anti-herpetic Activity of Various Plant Extracts, Seoul, Arch. Pharm. Res. Vol. 20, No. 1, pp.58-67, 1997
- 강봉주, 고병섭, 양기상, 박갑주: 한약 탕제분획의 항 Herpes simplex virus 활성에 관한 연구, 서울, 한국한의학연구소 논문집, 2권 1호, pp.417-429, 1996.
- 蔡炳允: 韓方外科, 서울, 高文社, p.317, 329, 332, 366, 391, 399, 400, 415, 422, 463. 1986.
- 洪南斗 編: 韓方製劑解說集, 서울, 慶熙醫學院 韓方病院, p.132, 1983.
- 黃度淵 原著: 對譯, 證脈 方藥合編, 서울, 남산당, p.156, 159, 1986
- 李 挺: 新校篇註醫學入門, 서울, 大成文化社, p. 639, 670 1996.
- 한국화학연구소: 신규의약품 스크리닝 기술 개발에 관한 연구, pp.139-171, 1992.
- 이연태: 의학미생물학, 서울, 현문사, p.129, pp.131-312, p.155, 158, 161, 1996.
- 차창룡: 전통약물로 부터의 항바이러스제 검색방법, 서울대학교 천연물과학연구소, pp.225-226, 1992.
- Furman PA, Barry DW: Spectrum of antiviral activity and mechanism of zidovudine. Am. J. Med.; 85, pp.176-181, 1988.
- Fyfe JA, Keller PM, Framen PA: Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new anti-viral compound 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanosine, J Biol. Chem; 53, pp.8721-8727, 1978.
- Kohn KW, Ericson LC, Ewig RA: Fractionation of DNA from mammalian cells, by alkaline elution, Biochemistry 15, p. 4627, 1976.
- K. Chang Huang: The pharmacology of Chinese Herbs, USA, University of Louisville, pp.287-304, 1993.
- 吳 廉: 醫宗金鑑, 서울, 대성문화사, p.173, 1983.
- 陳實次: 外科正宗 卷十, 서울, 醫聖堂, p.7, 1987.
- 박갑주, 강봉주, 신순식, 남봉현, 김남주: 한약 탕제를 이용한 항 Herpes virus 제제의 개발 연구, 서울, 한국 한의학연구소 논문집, 1권 1호, pp.477-494, 1995.
- Furman PA, Barry DW: Spectrum of antiviral activity and mechanism of zidovudine. Am. J. Med.; 85, pp.176-181, 1988.
- Cleaver JE: Conformation of DNA in alkaline sucrose; The submit hypothesis in mammalian cells, Biochem. Commun. p.59, p.92, 1974.
- 辛民教 編著: 臨床本草學, 서울, 永林社, p.175, p.836 1997.
- 江蘇新醫學院 篇: 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.2661, 1982.