< 단 보 >

촉규근 추출물에 의한 항인플루엔자 효능

김면수¹ · 차투랑가 기라마게² · 김홍익¹ · 이종수² · 김철중^{2,*}

¹주비타바이오, ²충남대학교 수의과대학

(접수: 2018년 5월 28일, 수정: 2018년 7월 23일, 게재승인: 2018년 7월 27일)

Anti-influenza properties of herbal extract of *Althaea rosea* in mice

Myun Soo Kim¹, Kiramage Chathuranga², Hongik Kim¹, Jong-Soo Lee², Chul-Joong Kim^{2,*}

¹R&D Division, VITABIO Inc., Daejeon 34025, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

(Received: May 28, 2018; Revised: July 23, 2018; Accepted: July 27, 2018)

Abstract: *Althaea rosea* has been used in traditional Chinese medicine to treat numerous diseases, but no studies have investigated its anti-influenza properties to date. In this study, we investigated the anti-influenza effects of *Althaea rosea*. BALB/c mice orally pretreated with *Althaea rosea* (200 µL, 0.1 mg/mL concentration in phosphate-buffered saline) and followed by infection of influenza A virus nasally showed higher survivability and lower lung virus titer against divergent subtypes of influenza A virus infection. We also found that oral administration of *Althaea rosea* elicited antiviral innate immune responses in serum, bronchoalveolar lavage fluid, small intestinal fluid, and the lungs. Taken together, these findings suggest that aqueous extracts of *Althaea rosea* are a potential candidate for use as an anti-influenza drug.

Keywords: *Althaea rosea*, antiviral agents, influenza A virus, interferon inducers, medicinal plant

인플루엔자 바이러스는 *Orthomyxoviridae*에 속하는 단일가닥 RNA 바이러스로 계절성으로 전파능력이 높은 중요한 병원체이며, 미국의 경우 연간 약 30~50억 달러의 막대한 사회경제학적 손실을 유발하는 것으로 추정되고 있다 [1]. 현재 인플루엔자 바이러스에 사용되는 항바이러스 제제는 hemagglutinin(HA)유전자의 회피기전 등으로 인해 제대로 효능을 발휘하지 못한다는 보고가 있으며 [4, 5, 14], 이러한 이유로 더욱 안전하고 새로운 항바이러스 치료제를 개발하고자 많은 시도가 이루어지고 있다. 특히, 아시아, 유럽, 미국의 여러 연구자는 전통 약용식물로부터 항바이러스 활성 물질을 탐구하여 항바이러스 제제를 개발하려는 데 관심이 고조되어 있다. 전통 약용식물은 오랜 세월 동안 인체 감염성 질환의 치료에 효율적으로 사용되어 왔으며, 임상적으로 안전성이 확보된 소재라는 높은 장점이 있다 [10].

촉규근은 아욱과(Malvaceae)에 속하는 초본식물 접시꽃(*Althaea rosea* Cavani)의 뿌리로 중국이 원산지이며 우리나라 각처에 널리 분포하고 있다. 촉규근은 면역증강 효과 [2]

가 있다는 보고가 있으며, 접시꽃 지상부에는 human immunodeficiency virus(HIV)에 대한 항바이러스 효능 [3] 및 면역증강 효능 [7] 등이 있다고 알려졌으나, 촉규근 추출물에 관한 항바이러스 연구는 확인된 바가 없다. 따라서, 이 연구에서는 지금까지 연구되지 않은 촉규근의 항인플루엔자 바이러스 효능을 *in vivo*에서 다양한 혈청형(H1N1, H3N2, H5N2)의 인플루엔자 바이러스로 검증하였다.

이 연구의 재료인 촉규근은 제천 한방시장(Korea)에서 구매한 뒤 품질 검증과정을 거쳐 사용하였다. 촉규근 추출물은 촉규근을 10배수의 증류수와 혼합한 뒤 소형약탕기(NPM-1310S; NUC Electronics, Korea)를 이용해 105°C에서 150 분 동안 가열하여 추출하였다. 촉규근 추출물은 7,000 × g, 15분간 원심분리하여 부유물을 제거하고 Minisart 0.22 µm 필터(Sartorius Lab Instruments, Germany)에 통과시킨 다음 동결건조 후 실험에 사용하였다. 실험용 BALB/c 마우스는 5주령 암컷(Samtako, Korea)을 처리군당 5마리씩 사용하였다. 촉규근 추출물은 0.1 mg/mL의 농도로 phosphate-buffered

*Corresponding author

Tel: +82-42-821-6783, Fax: +82-42-825-8903

E-mail: cjkim@cnu.ac.kr

saline(PBS)에 현탁하여 마우스 두당 200 μ L씩 격일로 3회 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 PBS를 투여하였다. 축규근 추출물의 마지막 투여 24시간 후 마우스를 avertin (2,2,2-Tribromoethanol; Sigma-Aldrich, USA)을 이용해 마취한 다음, 반수치사량(lethal dose 50%, LD₅₀)의 5배에 해당하는 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34(H1N1), A/Philippines/2/08(H3N2), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005(H5N2)를 각각 30 μ L에 희석하여 비강으로 투여하였다. 바이러스 접종 후 13일 동안 마우스의 체중을 확인하였으며, 인도적인 동물실험을 위해 25% 이상 체중 손실이 확인된 마우스는 안락사 후 바이러스에 의한 폐사로 간주하였다.

마우스의 폐에서 증식한 바이러스의 양은 세포반수감염용량(tissue culture infective dose 50%, TCID₅₀)을 측정하여 확인하였다. 위와 같은 방법으로 축규근 추출물과 PBS를 투여한 마우스를 LD₅₀의 5배에 해당하는 인플루엔자바이러스(H1N1)에 감염시킨 후, 감염 3일 후, 5일 후에 마우스의 폐를 무균적으로 분리하고 분리된 폐 샘플은 조직파쇄기(TissueLyser; Qiagen, Germany)에서 파쇄한 다음, 13,000 × g, 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. TCID₅₀의 측정은 MDCK 세포주를 이용하여 수행하였다. 축규근 추출물의 면역증강 효능을 확인하기 위한 마우스 실험 역시 위의 실험과 같이 처리한 후, 혈청, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 소장세척액(small intestinal fluid, SIF)을 수거하고 바이러스의 주요 방어 요소인 사이토카인 interferon beta(IFN- β) [13]와 interleukin-6(IL-6), 면역글로불린(immunoglobulin A, IgA) [11]을 확인하였으며, 감염 5일 후 각 그룹당 5마리의 폐 조직을 수거하여 IFN- β 생성에 관여하는 유전자들의 발현을 확인하였다. 폐 조직은 위의 실험과 같은 방법으로 처리하였으며, 혈청은 안와체혈로 채취한 혈액을 20,000 × g, 10분간 원심분리하여 수거하였고, BALF와 SIF는 Hank's Balanced Salt Solution(Sigma-Aldrich)을 이용하여 내부를 세척하고 수거하여 실험에 사용하였다 [9, 15]. IgA, IL-6, IFN- β 의 변화는 ELISA Kit

(murine IgA, IL-6, and IFN- β ; R&D Systems, USA)를 이용하여 확인하였으며 IFN- β 및 인터페론 관련 유전자는 primer set(Table 1)를 이용하여 quantitative real-time polymerase chain reaction 방법으로 확인하였다.

축규근 추출물의 인플루엔자 바이러스 효능 실험 결과, 바이러스 감염 9일 후 PBS 투여군의 모든 마우스에서 심각한 체중저하가 확인된 반면 축규근 추출물 투여군에서는 7일까지 체중감소가 확인되었으나, 8일 후부터 회복되는 양상이 관찰되었다. 이와 같은 실험결과는 모든 혈청형의 인플루엔자 바이러스에서 비슷하게 확인되었다. 결과적으로, 축규근 추출물 투여군은 H1N1, H3N2 및 H5N2의 모든 감염에 대해서 80% 생존율을 나타냈지만 PBS 투여군에서는 H1N1, H5N2 감염에 대해서 7일 후, H3N2 감염에 대해서는 9일 후에 모든 마우스가 25% 이상 체중이 감소하여 실험동물 윤리지침에 따라 안락사하고 폐사한 것으로 처리하였다(Fig. 1A and B).

상기의 실험결과로 축규근 추출물이 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 방어능력을 증강시키는 천연약제임을 확인하였다. 더 나아가 인플루엔자 감염에 대한 PBS 처리군과 축규근 추출물 처리군의 생존율 차이가 바이러스의 생체 내 증식의 차이로부터 초래하였음을 증명하기 위해 상기의 실험과 같은 방법으로 마우스에 각각 PBS와 축규근 추출물을 투여한 다음, H1N1 인플루엔자 바이러스를 감염시키고 각 투여군 마우스의 폐를 바이러스 감염 3일 후, 5일 후에 적출하여 바이러스의 증식 정도를 TCID₅₀ 측정을 통해 확인하였다. 그 결과, PBS 처리군의 바이러스 증식은 3일째와 5일째에서 각각 4.08 log TCID₅₀/mL, 5.08 log TCID₅₀/mL로 나타났으며 축규근 추출물 처리군은 각각 3.08 log TCID₅₀/mL, 3.79 log TCID₅₀/mL로 나타났다(Fig. 1C). 이는 축규근 추출물 처리군의 높은 생존율이 생체 내 바이러스 증식을 억제함으로써 나타난다는 것을 증명하는 결과이다. 또한, 추가적인 실험으로 이러한 축규근 추출물에 의한 바이러스 증식의 억제가 생체 내의 면역반응 유도의 차이

Table 1. Mouse primer sets used to confirm mRNA expression

Genes	Primers	
	Forward	Reverse
<i>IFN-β</i>	5'-TCCAAGAAAGGACGAACATTCG-3'	5'-TGCGGACATCTCCCACGTCAA-3'
<i>ISG-15</i>	5'-CAATGGCCTGGGACCTAAA-3'	5'-CTTCTTCAGTCTGACACCGTCAT-3'
<i>PKR</i>	5'-GCCAGATGCACGGAGTAGCC-3'	5'-GAAAACCTTGCCAAATCCACC-3'
<i>Mx1</i>	5'-ACAAGCACAGGAAACCGTATCAG-3'	5'-AGGCAGTTTGACCATCTTAGTG-3'
<i>OAS</i>	5'-GAGGCGGTTGGCTGAAGAGG-3'	5'-GAGGAAGGCTGGCTGTGATTGG-3'
<i>GBP1</i>	5'-AAAAACTTCGGGGACAGCTT-3'	5'-CTGAGTCACCTCATAAGCCAAA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TGACCACAGTCCATGCCATC-3'	5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3'

IFN- β , interferon beta; ISG-15, interferon-stimulated gene 15; PKR, protein kinase R; Mx1, MX dynamin like GTPase 1; OAS, oligoadenylate synthetase; GBP1, interferon-induced guanylate-binding protein 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Fig. 1. Protective effects of *Althaea rosea* against lethal infection with divergent influenza A subtypes. Five-week-old female BALB/c mice were orally administered with 0.1 mg/mL *Althaea rosea* in a total volume of 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS) at every other days before infection with 5 MLD₅₀ H5N2, H1N1 and H3N2 Influenza A subtypes. Control groups were orally administered with 200 μ L of PBS. Percentage variation of body weight (A) and survival (B) after challenge were recorded until 13 dpi. (C) Viral titers in lung tissues of the H1N1 infected mice were measured by total cell infection dose 50% (TCID₅₀) at 3 and 5 dpi. (* $p < 0.05$ indicates a significant difference between groups compared by Student's *t*-test).

의한 결과임을 확인하기 위하여 같은 방법으로 마우스에 PBS와 측규근 추출물을 투여한 다음, 마우스의 혈액, BALF, SIF를 수거하여 면역지표들의 변화를 확인하였다. 실험 결과, 측규근 추출물로 처리한 마우스의 혈청, BALF, SIF에서 IgA, IL-6, 인터페론 등의 증가가 확인되었으며 대조군보다 인터페론 관련 유전자의 발현이 높게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 측규근 추출물이 체내의 인터페론 및 점막 면역 등을 증강시켜 인플루엔자 바이러스의 체내 증식을 억제함으로써 감염을 예방할 수 있다는 것을 나타낸다. 모든 동물실험은 충남대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다(동물실험 승인번호: CNU-00815).

전통 약용식물에는 다양한 화학적 성분들이 있으며, 이들의 항바이러스 효능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 또한, 세계적으로 천연물질을 선호하는 인구가 증가하고 약용 식물에서 분리한 활성성분의 이용이 급증하면서 전통 약용 식물로부터 유래한 천연제제는 현대 약품의 약 40%를 차지

하게 되었다 [8].

측규근 역시 전통적으로 다양한 질병의 치료 목적으로 사용되어 왔으며, 이 연구에서 측규근의 투여가 체내 선천면역과 관련한 인자들의 활성을 유도하여 바이러스에 저항성을 높여준다는 사실을 확인하였다. 측규근은 다양한 종류의 인플루엔자 바이러스(H1N1, H3N2, H5N2)를 감염시킨 마우스의 생존율을 높여주는 것을 확인하였고(Fig. 1A and B), 마우스 폐에서의 바이러스를 비교하였을 때 측규근 투여군이 대조군에 비해 낮은 바이러스의 증식을 나타냄을 확인함으로써 측규근의 바이러스 증식 억제효능을 확인하였다(Fig. 1C). 최종적으로 측규근 추출물이 인터페론 및 인터페론 관련 유전자의 발현을 증가시키는 결과를 확인함으로써 측규근 추출물이 체내 선천면역의 증강을 통한 예방 목적의 항바이러스제로 사용될 수 있음을 확인하였다(Fig. 2). 하지만, 전통 약용식물에는 다양한 구성성분이 있으며 측규근 추출물의 경우에도 플라보노이드, 다당류, 식물성 정유성분 등의 구성성분을 포함하고 있다 [6, 12]. 따라서, 이 연구에서 증

명된 축규근 추출물의 선천면역 증강에 의한 항바이러스 효능 역시 축규근 추출물의 구성성분에 대해서 증명되어야 한다. 향후 연구에서는 축규근의 성분분석을 위한 high performance liquid chromatography 분석이 선행되어야 하며, 항바이러스 효능을 발휘하는 단일 추출물질이 확인되어야 할

것이다. 또한, 이러한 사실을 기반으로 *in vitro* 실험을 통한 분자세포학적 기전에 관한 연구가 수행된다면 광범위한 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 보유한 항바이러스 제제의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

Fig. 2. Induction of immune state by *Althaea rosea* in BALB/c mice. Five-week-old female BALB/c mice were orally administered with 0.1 mg/mL *Althaea rosea* in a total volume of 200 μ L PBS at every other days before the collection of samples. Control groups were orally administered with 200 μ L of PBS. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and small intestinal fluid (SIF) were collected and analyzed for the presence of secreted murine (A) Immunoglobulin A (IgA), (B) interleukin-6 (IL-6), (C) interferon beta (IFN- β). The test was performed in duplicate for IgA and IFN- β and triplicate for IL-6. (D) mRNA expression in lung tissue was confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using specific primers (ISG-15, PKR, Mx1, OAS, and GBP1). The data shows representative means $\pm$ SD of five mice measured over time (* p < 0.05 indicates a significant difference between groups compared by Student's *t*-test).

Fig. 2. Continued.

감사의 글

이 연구에 사용한 마우스 실험용 인플루엔자 바이러스는 충북대학교 의과대학 최영기 교수님으로부터 분양을 받아 수행되었습니다. 그리고 이 연구는 충남대학교의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Aballéa S, Chancellor J, Martin M, Wutzler P, Carrat F, Gasparini R, Toniolo-Neto J, Drummond M, Weinstein M. The cost-effectiveness of influenza vaccination for people aged 50 to 64 years: an international model. *Value Health* 2007, **10**, 98-116.
2. Abdel-Salam NA, Ghazy NM, Sallam SM, Radwan MM, Wanas AS, ElSohly MA, El-Demellawy MA, Abdel-Rahman NM, Piacente S, Shenouda ML. Flavonoids of *Alcea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. *Nat Prod Res* 2018, **32**, 702-706.
3. Asres K, Bucar F, Kartnig T, Witvrouw M, Pannecouque C, De Clercq E. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. *Phytother Res* 2001, **15**, 62-69.
4. Carr S, Ilyushina NA, Franks J, Adderson EE, Caniza M, Govorkova EA, Webster RG. Oseltamivir-resistant influenza A and B viruses pre- and postantiviral therapy in children and young adults with cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2011, **30**, 284-288.
5. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, Klimov AI. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 2007, **196**, 249-257.
6. Dudek M, Matławska I, Szkudlarek M. Phenolic acids in the flowers of *Althaea rosea* var. *nigra*. *Acta Pol Pharm* 2006, **63**, 207-211.
7. Kim YS, Kim EK, Nawarathna WPAS, Dong X, Shin WB, Park JS, Moon SH, Park PJ. Immune-stimulatory effects of

- Althaea rosea* flower extracts through the MAPK signaling pathway in RAW264.7 cells. *Molecules* 2017, **22**, 679.
8. **Koehn FE, Carter GT.** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**, 206-220.
 9. **Lefrançois L, Lycke N.** Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr Protoc Immunol* 2001, **17**, 3.19.1-3.19.16.
 10. **Lin LT, Hsu WC, Lin CC.** Antiviral natural products and herbal medicines. *J Tradit Complement Med* 2014, **4**, 24-35.
 11. **Mantis NJ, Rol N, Corthésy B.** Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 2011, **4**, 603-611.
 12. **Muhetaer T, Resalat Y, Chu G, Yin X, Munira A.** [Determination of rutin, quercetin and kaempferol in *Althaea rosea* (L.) Gavan for Uyghur medicine by high performance liquid chromatography]. *Se Pu* 2015, **33**, 1269-1273. Chinese.
 13. **Price GE, Gaszewska-Mastarlarz A, Moskopid D.** The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice. *J Virol* 2000, **74**, 3996-4003.
 14. **Rahman M, Bright RA, Kieke BA, Donahue JG, Greenlee RT, Vandermause M, Balish A, Foust A, Cox NJ, Klimov AI, Shay DK, Belongia EA.** Adamantane-resistant influenza infection during the 2004-05 season. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**, 173-176.
 15. **Viana ME, Coates NH, Gavett SH, Selgrade MK, Vesper SJ, Ward MDW.** An extract of *Stachybotrys chartarum* causes allergic asthma-like responses in a BALB/c mouse model. *Toxicol Sci* 2002, **70**, 98-109.