

바이러스성출혈성패혈증바이러스에 대한 식물 추출물의 항바이러스 효능 탐색

박지윤* · 김형준** · 최혜승** · 권세련*†

*선문대학교 수산생명의학과, **국립수산물과학원 병리연구과

Antiviral effects of various plant extracts against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)

Ji-Yoon Park*, Hyoun Jun Kim**, Hye-Sung Choi** and Se Ryun Kwon*†

*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

**Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Since viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) was first reported in European rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the 1930s, it has caused high prices in freshwater and saltwater fish around the world, causing enormous economic damage to the aquaculture industry. We have been seeking required countermeasures against viruses because of economic damage to the aquaculture industry. However, commercial vaccines have the limitations of being costly to use in farms and being effective to only one pathogen. The aquaculture industry these days is taking on new alternatives to vaccines, antibiotics and chemicals. In this study, the suitability of antiviral effects against VHSV was evaluated *in vitro* for various plant extracts to judge their effectiveness. *Atriplex gmelinii*, *Ixeris repens*, *Arctium lappa*, and *Sargassum coreanum* were tested to know the correlation between the amount of virus and the concentration of extract investigates if these extracts have antiviral effects. Virus and extracts at various concentrations were inoculated simultaneously as 1:1 ratio into EPC cell lines. There are no antiviral effects with *Atriplex gmelinii*, *Ixeris repens* and *Arctium lappa*. Extract of *Sargassum coreanum* only has the antiviral activity in a dose-dependent manner. These results show that extract of *Sargassum coreanum* can be used in aquaculture industry as an antiviral materials.

Key words: Viral Haemorrhagic Septicaemia virus (VHSV), antiviral activity, *Arctium lappa*, *Ixeris repens*, *Atriplex gmelinii*, *Sargassum coreanum*

서 론

바이러스성출혈성패혈증(viral haemorrhagic septicaemia, VHS)의 병원체인 VHSV는 *Rhabdoviridae*

과의 *Novirhabdovirus* 속의 외막을 가진 negative-sense RNA virus이다. VHSV는 1930년대 유럽의 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 처음 보고된 이래 전 세계적으로 담수어 및 해수어에서 높은 폐사를 일으키며, 양식 산업에 막대한 경제적 피해를 가져왔다(OIE, 2021; Kim and Kim, 2019).

VHS 예방을 위한 백신 및 치료제 개발 연구는

†Corresponding author: Se Ryun Kwon
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

지속적으로 이루어지고 있다. 최근 우리나라에서는 면역보조제를 첨가한 VHSV 포르말린 불활화 백신이 상용화 된 바 있으나(Han *et al.*, 2021) 전 세계적으로는 상용화된 효과적인 백신 및 치료제는 개발되지 않았다(OIE, 2021). 일반적으로 양식 어업인들은 폐사나 질병 의심 증상이 나타날 경우, 정밀 진단에 앞서 일반적으로 항생제 또는 일부 화학약품을 사용하여 증상 및 폐사를 경감시키려 한다. 하지만, 정확한 진단이 되지 않고 사용되는 약물은 항생제 내성, 잔류 약물로 인한 식품 안전 등에 중대한 문제를 야기할 수 있다. 또한, 우리나라에서 상용화된 백신의 경우는 대부분 주사용 백신으로 양식장에서 사용하기에는 인력 소요 등의 비용적 문제와 특정 병원체에서만 효과가 있다는 한계점이 있다. 이에 따라 최근 양식 산업에서는 병원체에 대한 예방 및 치료를 위해 백신, 항생제 등 화학물질에 대한 대체 물질 개발에 관심이 높아지고 있다. 그 중 양식 산업에서 질병 발생을 예방하기 위한 방법 중 하나는 천연물 유래의 항바이러스제를 사용하는 것이다(Reverter *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2021).

일부 식물 추출물은 alkaloids, terpenoids, tannins, glycosides, flavonoids, phenolics, steroids 등과 같은 다양한 유효 성분을 함유하고 있다. 이러한 유효 성분은 어류 및 새우 양식에서 스트레스 예방, 성장 촉진, 식욕 자극, 면역 자극 강화 등과 같은 활성을 나타낸다. 또한 식물 추출물은 천연물로서 합성 분자보다 생분해가 잘 일어나서 친환경적이라는 장점이 있으므로 백신, 항생제 등 화학 물질의 대안 중 하나로 기대될 수 있다(Reverter *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2021).

본 연구에서는 식물 기원의 항바이러스 활성제를 탐색하고자 해양생명자원 통합시스템(Marine Bio-Resource Information Systems, MBRIS)과 국립생물자원관에서 식물 추출물을 분양받아 VHSV에 대해 항바이러스 활성이 나타나는지를 조사하였다. 본 연구에서는 항바이러스 활성이나 항산화 효과를 가지며 VHSV에 대해 연구된 바 없는 식물 추출물인 가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii*), 갯씀바귀(*Ixeris repens*), 우엉(*Arctium lappa*) 및 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 선발하였고(Jeong *et al.*,

2016; Kim *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2010), 이러한 식물 추출물이 넙치에서 분리한 VHSV에 대한 항바이러스 효과 조사를 통해 천연물인 식물 추출물이 항바이러스제로 활용할 수 있는지를 평가하였다.

재료 및 방법

식물 추출물

가는갯능쟁이(code No. MABIK NP60200007), 큰잎모자반(code No. MBRB0082TC17706E1, 조선대학교 식물계통분류학 실험실 기탁물)은 MBRIS(해양생명자원 통합정보시스템)에서 분양받았다. 갯씀바귀(code No. NIBRGR0000604245), 우엉(code No. NIBRGR0000611796)은 국립생물자원관에서 분양 받았다. MBRIS에서 분양 받은 2종의 추출물은 7일 동안 70% ethanol로 추출한 뒤 농축 및 동결 건조하여 제조된 것이며, 국립생물자원관에서 분양 받은 추출물은 70% ethanol로 추출한 뒤 농축하여 제조된 것을 사용하였다. 특히 큰잎모자반 추출물의 경우, 부산광역시 기장군에서 채집한 큰잎모자반에서 염분과 이물질을 제거하고 전체 부위를 24-48시간 건조 후 분쇄하고, 분쇄된 추출물은 실온에서 70% ethanol로 7일간 추출한 뒤 농축 및 동결건조된 것을 사용하였다.

세포 및 바이러스 증식

Epithelioma Papulosum Cyprinid (EPC) 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)와 1% Antibiotic-Antimycotic agent (Anti-Anti, Gibco)가 첨가된 minimum essential medium (MEM, Gibco)를 사용하여 20°C에서 배양하였다. 바이러스는 VHSV KJ2008 분리주를 사용하여 2% FBS와 1% Anti-Anti가 포함된 EPC 세포에 100 µl 접종하여 15°C에서 배양하였다. 세포에서 cytopathic effect (CPE)가 70-80% 정도 관찰되었을 때 세포 배양액을 4°C에서 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리를 하였고, 상층액은 -80°C에 보관하여 분석에 사용하였다.

항바이러스 효과 분석

모든 추출물은 멸균 3차 증류수와 dimethyl sulf-

Table 1. Antiviral activity of plant extracts

Extracts	Concentration (μg/ml)	Virus dilution rate							Con
		-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
가는갯능쟁이 <i>Atriplex gmelinii</i>	0	++	++	++	++	++	++	—	—
	10	++	++	++	++	++	++	—	—
	50	++	++	++	++	++	++	—	—
	100	++	++	++	++	++	—	—	—
	150	++	++	++	++	++	++	—	—
	200	++	++	++	++	++	++	—	—
갯씀바귀 <i>Ixeris repens</i>	0	++	++	++	++	++	++	—	—
	10	++	++	++	++	++	++	—	—
	50	++	++	++	++	++	++	—	—
	100	++	++	++	++	++	++	—	—
	150	++	++	++	++	++	—	—	—
	200	++	++	++	++	++	++	—	—
우엉 <i>Arctium lappa</i>	0	++	++	++	++	++	++	—	—
	10	++	++	++	++	++	++	—	—
	50	++	++	++	++	++	—	—	—
	100	++	++	++	++	++	++	—	—
	150	++	++	++	++	++	—	—	—
	200	++	++	++	++	++	++	—	—
큰잎모자반 <i>Sargassum coreanum</i>	0	++	++	++	++	++	++	++	—
	10	++	++	++	++	++	++	—	—
	50	++	++	++	++	++	++	—	—
	100	++	++	++	++	++	++	—	—
	150	++	++	++	++	++	—	—	—
	200	++	++	++	—	—	—	—	—

+: CPE observed, -: CPE absent

oxide (DMSO)를 사용하여 2 mg/ml의 농도로 희석하였다. 희석된 추출물은 MEM으로 Table 1에 제시된 농도가 되도록 희석하였다. VHSV는 MEM으로 10배씩 단계 희석하였다.

EPC 세포를 2×10^6 cells/ml의 세포수로 조정 한 후 96-well plate에 100 μl씩 접종하였다. 다음날 식물 추출물의 항바이러스 활성을 알아보기 위해 10-단계 희석된 바이러스에 추출물을 각각 50 μl씩 혼합한 후 EPC 세포가 전배양된 well에 100 μl씩 접종하였다. 또한, 세포독성효과(cytotoxic effect, CTE)를 확인하기 위해 well 당 MEM 50 μl와 추출물 50 μl를 혼합한 뒤 100 μl씩 접종하였다. 모든 실험은 2반복의 data를 모두 표기하였다.

접종한 96-well plate는 15°C에서 7일 동안 배양

하면서 cytopathic effect (CPE)와 cytotoxic effect (CTE)를 관찰하였다.

결과 및 고찰

가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii*)는 명아주과 갯능쟁이 속의 염생식물로 가는명아주라고 불린다. 주로 조간대, 간척지, 해안사구 등에서 자라며, 한해살이풀로 한국, 중국, 일본, 러시아, 그리고 북아메리카 등에 분포한다. 예로부터 식용뿐만 아니라 약용 식물로 사용되었으며, 어린잎과 줄기는 사료로 이용되었다(Park *et al.*, 2019). 또한 가는갯능쟁이는 우수한 DPPH radical, peroxynitrite 및 세포 내 ROS 소거 효과가 보고되어 있다(Jeong *et al.*, 2016).

갯씀바귀(*Ixeris repens*)는 썸바귀의 일종으로 국화과에 속하며, 바닷가 모래저질에서 자라는 여러해살이풀이다. 주로 한국, 일본, 중국에 분포하며, aliphatics, triterpenoids, sesquiterpene lactone 등이 함유되어 있어 항염증, 항암, 면역 증강, 항산화 효과가 있다(Lee *et al.*, 2008). 우영(*Arctium lappa*)은 국화과에 속하며 중국에서 인기있는 식물 중 하나이다. 우영의 뿌리에는 caffeoylquinic acid 유도체가 함유되어 있어 간 보호, 항염증 및 자유 라디칼 소거 활성을 가지고 있다. 또한, 우영의 씨는 arctiin 및 arctigenin과 같은 lignans이 함유되어 있어 항증식, 세포 사멸 및 항종양 효과도 보고되어 있다(Ferracane *et al.*, 2010). 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)은 모자반과에 속하는 식용 갈조류로 우리나라 동해안과 남해안 및 제주도에 분포한다. 어린 줄기와 잎은 먹거나 말려서 사료로 사용하며, 큰잎모자반은 항암, 항염증, 항응고, 항고지혈, 항고혈압 등에 효과가 있다고 보고되어 있다(Park *et al.*, 2015).

본 연구는 가는갯능쟁이, 갯씀바귀, 우영 및 큰잎모자반을 이용하여 어류 바이러스인 VHSV에 대한 항바이러스 효과를 평가하였다. 바이러스 단계회색액에 각 농도별로 준비된 식물 추출물을 혼합한 후 세포에 접종하여 바이러스의 증식이 유도되는지 확인한 결과, 가는갯능쟁이, 갯씀바귀 및 우영에서는 모든 바이러스 단계회색 구간에서 추출물이 혼합되지 않는 대조구와 동일한 값을 나타내어 항바이러스 효과가 없는 것으로 판단되었다(Table 1). 본 연구에서 설정한 추출물의 농도 범위는 최소 10 µg/ml에서 최대 200 µg/ml이었는데, 가는갯능쟁이와 갯씀바귀의 경우 각각 150 및 100 µg/ml에서부터 세포독성효과(CTE)를 보여 200 µg/ml보다 높은 농도에서의 항바이러스 효과는 평가하지는 않았다. 한편 우영의 경우에는 200 µg/ml의 추출물 농도에서 항바이러스 효과 및 CTE가 나타나지 않았다(Table 2). 우영은 단순포진바이러스(Herpes Simplex Virus type 1, HSV-1)에 대해 400 µg/ml 농도에서 항바이러스 활성이 보고된 바 있었고(Dias *et al.*, 2017) 본 실험에 사용된 농도에서는 CTE가 나타나지 않았으므로 더 높은 농도로 VHSV에 대한 항바이러스 효과 실험을 해볼 필요

Table 2. Cytotoxic effect (CTE) of plant extracts on EPC cell line

Extract	Concentration (µg/ml)					
	0	10	50	100	150	200
가는갯능쟁이 <i>Atriplex gmelinii</i>	-	-	-	-	+	+
갯씀바귀 <i>Ixeris repens</i>	-	-	-	+	+	+
우영 <i>Arctium lappa</i>	-	-	-	-	-	-
큰잎모자반 <i>Sargassum coreanum</i>	-	-	-	-	-	+

+: CTE observed, -: CTE absent.

가 있겠다.

큰잎모자반의 경우 추출물이 첨가되지 않은 대조구에서는 10^{-7} 의 희석배수에서도 CPE가 나타난 반면 10, 50 및 100 µg/ml 농도에서는 10^{-7} 에서는 CPE가 나타나지 않았다. 150 및 200 µg/ml 농도에서는 각각 10^{-6} 및 10^{-5} 에서부터 CPE가 나타나지 않았고, 200 µg/ml 농도의 경우 10^{-4} 에서도 2반복 실험 중 한번은 CPE가 나타나지 않았다(Table 1). 이러한 결과를 통해 큰잎모자반 추출물의 경우 농도 의존적인 양상으로 항바이러스 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 VHSV 배양액의 감염 역가가 2×10^8 TCID₅₀/ml이므로 10^{-4} 희석배수에서 well에 접종된 바이러스 양은 대략적으로 1×10^3 TCID₅₀에 해당한다. 따라서 큰잎모자반 200 µg/ml 추출물은 1×10^3 TCID₅₀ 정도의 많은 양의 바이러스에 대해서도 항바이러스 활성을 가지는 것을 알 수 있었다. 큰잎모자반의 경우 200 µg/ml 농도에서 시험에 사용된 96-well plate의 가장자리에 위치한 세포에서 CTE가 약하게 관찰되었으나, 바이러스에 의해 나타나는 CPE와는 양상이 달라 바이러스 증식 여부를 구분하여 관찰하는데 문제가 되지 않았다.

큰잎모자반은 모자반과에 속하는 갈조류이며, 갈조류에는 후코이단이 많이 함유되어 있다. 후코이단은 fucose, sulfate groups, galactose, xylose, mannose, uronic acids를 포함하고 있는 황산화 다당류이며 항염증제, 항산화제, 항응고제, 항바이러스

스, 항혈전제, 면역 조절과 같은 광범위한 생리학 적 및 생물학적 활성을 가진다고 보고되었다(Sun *et al.*, 2020; Thuy *et al.*, 2015). 또한, 큰잎모자반의 주성분은 다당류(67.2%), 수분(4.3%), 회분(12.8%), 단백질(14.4%) 및 지질(1.3%) 같은 미량 성분이 함유되어 있다(Ko *et al.*, 2012). 따라서 본 실험에서 보인 항바이러스 활성은 큰잎모자반에 함유되어 있는 후코이단을 포함한 다당류로 인해 나타났을 가능성이 있다.

본 연구는 VHSV에 대한 다양한 식물 추출물(가는갯능쟁이, 갯씀바귀, 우영, 큰잎모자반)의 항바이러스 효능을 최초로 탐색하였으며, 그 중 큰잎모자반이 항바이러스제로 활용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 활성을 나타내는 추출물들의 정확한 항바이러스 메커니즘, 주요 활성 성분 및 항바이러스제로서의 실용화 가능성에 대한 추 후 연구가 필요하다.

감사의 글

이 연구는 2022년 국립수산물과학원 수산과학연구사업(R2022077, OIE 표준실험실 운영 및 관리)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Dias, M.M., Zuza, O., Riani, L.R., de Faria Pinto, P., Pinto, P.L.S., Silva, M.P., Moraes, Josué, de, Z. Ataíde, A.C., Silva, Fernanda, de Oliveira Silva, Alzira, B.C. and Da Silva Filho, A.A.: *In vitro* schistosomicidal and antiviral activities of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* and Herpes simplex virus-1, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94:489-498, 2017.
- Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V. and Ritieni, A.: Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2):399-404, 2010.
- Han, H.J., Kim, S.J., Kim, T.H., Kim, M.S., Cho, M.Y. and Choi, H.S.: Current Status and Future Directions of Fish Vaccines in Korea, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(4):369-376, 2021.
- Jeong, H.J., Kim, H.J., Ju, E.S., Kong, C.S. and Seo, Y.W.: Antioxidant Effect of the Halophyte *Atriplex gmelinii*, *Korea Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 31(4):200-207, 2016.
- Kim, J.S., Lee, Y.J., Kim, J.Y., Choi, J.W., You, S.J. and Kim Y.T.: Comparison of Antioxidant and Physiological Activities in Various Solvent Extracts of *Ixeris repens*, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(5):742-750, 2021.
- Kim, M.S. and Kim, K.H.: Genetically engineered viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) vaccines, *Fish & Shellfish Immunology*, 95:11-15, 2019.
- Kim, M.S., Lee, Y.S. and Sohn, H.Y.: Anti-thrombosis and anti-oxidative activity of the root of *Arctium lappa* L., *The Korean Society of Food Preservation*, 21(5):727-734, 2014.
- Ko, S.C., Kang, S.M., Ahn, Ginnae, Yang, H.P., Kim, K.N. and Jeon, Y.J.: Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from *Sargassum coreanum*, *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39(4): 494-499, 2010.
- Ko, S.C., Lee, S.H., Ahn, Ginnae, Kim, K.N., Cha, S.H., Kim, S.K., Jeon, B.T., Park, P.J., Lee, K.W. and Jeon, Y.J.: Effect of enzyme-assisted extract of *Sargassum coreanum* on induction of apoptosis in HL-60 tumor cells, *Journal of Applied Phycology*, 24:675-684, 2012.
- Lee, K.S., Kim, G.H., Kim, H.H., Kim, E.S., Park, H.M. and Oh, M.J.: Biological Activities on the Thermally Processed from Dried *Ixeris dentata* Root, *The Korean Society of Medicinal Crop Science*, 16(2):400-401, 2008.
- OIE.: Chapter 2.3.10. Infection with Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus in Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2021, https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.10_VHS.pdf
- Park, J.H., Bae, N.Y., Park, S.H., Kim, M.J., Kim, K.B. W.R., Choi, J.S. and Ahn, D.H.: Antioxidant Effect of *Sargassum coreanum* Root and Stem Extracts, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 30(4):155-160, 2015.
- Park, M.J., Kim, J.S., Kong, C.S. and Seo, Y.W.: Inhibition of MMP-2 and -9 by Crude Extracts and Their Solvent-partitioned Fractions from the Halophyte *Atriplex gmelinii*, *Ocean and Polar Research*, 41(2): 79-88, 2019.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P.: Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives, *Aquaculture*, 433:50-

- 61, 2014.
- Sun, Q.L., Li, Y., Ni, L.Q., Li, Y.X., Cui, Y.S., Jiang, S.L., Xie, E.Y., Du, J., Deng, F. and Dong, C.X.: Structural characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum henlowianum*, *Carbohydrate Polymers*, 229:115487, 2020.
- Sun, Z., Liu, Y., Wei, Z., Mai, H., Liu Q., Liu B., Zhong, Y., Zou, D., Zhang, W., Liu, X. and Ye, C.: The effects of dietary compound plant extracts on growth performance, liver and intestine health, and immune related genes expression in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀), *Fish & Shellfish Immunology*, 119:11-18, 2021.
- Thuy, T.T.T., Ly B.M., Van, T.T.T., Van Quang, N., Tu, H.C., Zheng, Y., Carole, S.D., Mi, B. and Ai, U.: Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species, *Carbohydrate Polymers*, 115:122-128, 2015.

Manuscript Received : May 18, 2022

Revised : May 30, 2022

Accepted : May 31, 2022