



Cornus officinalis extracts and fractions exhibit multi-targeting antiviral activity against influenza A virus *in vitro*

Yewon Kim¹ · Ju Won Kim¹ · Sanghyun Lee² · Yo Han Jang¹

산수유 추출물 및 유기용매 분획물의 독감바이러스에 대한 다중 표적 기작 항바이러스 활성

김예원¹ · 김주원¹ · 이상현² · 장요한¹

Received: 14 July 2025 / Accepted: 11 August 2025 / Published Online: 18 August 2025
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2025

Abstract Influenza virus infection remains a significant public health threat, causing epidemics and pandemics. The rise of drug-resistant strains and adverse effects linked to current antiviral treatments underscore the need for the development of novel antiviral agents. In this study, we explored the antiviral potential of extracts and organic solvent fractions derived from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. (CO) against influenza A viruses *in vitro*. The noncytotoxic concentration range of the CO extracts and fractions was measured by *in vitro* cytotoxicity assay. CO extracts demonstrated strong virucidal activity against influenza A virus at noncytotoxic concentrations. The extracts inhibited influenza viral entry and release steps by targeting viral surface hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. This multi-target antiviral action was

further confirmed by time-of-addition experiments and cytopathic effect reduction assay. Organic solvent fractions of the CO water extract also displayed significant virucidal effects and NA inhibition against influenza A virus. Of the four solvent fractions, ethyl acetate and butanol fractions exhibited the most potent virucidal activity. While none of the fractions demonstrated HA inhibition, all showed substantial NA inhibition, with chloroform and butanol fractions displaying strong activity, yielding IC₅₀ values of 1.5 µg/mL and 5.4 µg/mL, respectively. The findings demonstrate that CO extracts and organic solvent fractions exhibit multi-target antiviral effects against influenza A viruses. These results suggest that CO offers promising avenues for the development of novel antiviral therapeutics against influenza A infections.

Yewon Kim and Ju Won Kim are authors equally contributed to the article.

Yo Han Jang (✉)
E-mail: yjh0323@gknu.ac.kr

Sanghyun Lee (✉)
E-mail: slee@cau.ac.kr

¹Vaccine Biotechnology Major, Gyeongbuk National University, Andong 36729, Republic of Korea

²Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Keywords Antiviral agents · *Cornus officinalis* · Influenza virus · Natural compounds · Virucidal activity

서론

독감바이러스는 Orthomyxoviridae과(科)에 속하는 호흡기 바이러스이며, 7-8개의 분절된 음성 단일가닥 RNA 유전체를 보유하고 있다. 독감바이러스는 내부 단백질인 nucleoprotein 및 matrix 단백질의 항원형에 따라 4가지 항원형(A형, B형, C형, D형)으로 분류된다. 이 중에서 A형과 B형 독감바이러스는 계절성 독감 유행을 유발하며, C형과 D형은 인체 감염과의 연관성이 낮은 것으로 알려져 있다. 특히, A형 독감바이러스는 표면단백질 HA

및 NA의 아형에 따라 높은 수준의 항원다양성을 나타낸다. 현재까지 18종의 HA 아형과 11종의 NA 아형이 발견되었으며, 이들의 조합은 A형 독감바이러스의 유전적 다양성을 더욱 증가시키는 원인이 된다[1]. 또한, A형 독감바이러스의 RNA 유전체는 ‘antigenic drift’ 및 ‘antigenic shift’로 알려진 유전적 돌연변이와 유전자재조합이 빈번하게 발생하여 유전적 변이성을 높인다[2,3]. 독감바이러스의 높은 유전적 변이성은 백신의 효능을 불확실하게 만들 뿐만 아니라, 새로운 변종에 의한 팬데믹 발생 가능성을 증가시킨다. 매년 계절형 독감으로 인해 전 세계 약 55백만 명의 중증 질환 및 30-50만 명의 사망이 보고되고 있다[4]. 뿐만 아니라, 1918년 H1N1, 1957년 H2N2, 1968년 H3N2, 1977년 H1N1, 2009년 H1N1 등 다양한 A형 독감바이러스가 팬데믹을 유발한 바 있다[5]. 이처럼 백신의 효과가 제한적이고 예측이 어려운 상황에서, 효과적인 새로운 항바이러스제 개발의 필요성이 지속적으로 제기되고 있다[6].

독감바이러스 감염 치료를 위해 사용되는 주요 항바이러스제는 M2 ion channel 억제제, NA 억제제, RNA 중합효소 억제제의 세 가지 계열로 분류된다. M2 ion channel 억제제인 amantadine과 rimantadine은 바이러스 입자 내부로의 양성자 유입을 차단하며[7], NA 억제제인 oseltamivir와 zanamivir는 바이러스의 세포 방출을 저해한다[8]. RNA 중합효소 억제제인 favipiravir, pimodivir, baloxavir marboxil은 바이러스 중합효소 복합체를 표적으로 하여 복제를 억제한다[9]. 그러나 이들 약물에 대한 내성 바이러스의 출현과 부작용 발생 가능성은 치료에 있어 중요한 제한 요소로 작용하고 있으며, 이에 따라 새로운 기전의 항바이러스제 개발이 시급한 과제로 부각되고 있다[10,11]. 식물 유래 천연물은 항산화, 항암, 항염증, 항바이러스 등 다양한 생리 활성을 보이는 것으로 알려져 있다[12,13]. 다양한 바이러스에 대해 식물 유래 천연물의 항바이러스 활성이 보고되면서[14], 새로운 항바이러스제 개발을 위한 유망 자원으로 주목받고 있다[15-19]. 본 연구팀의 최근 연구 결과에서 다양한 식물 유래 천연물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성이 검증되었다[16,20-24]. 어성초, 비수리, 마가목, 험프 유래 추출물 및 유기용매 분획물이 바이러스 사멸활성, HA 억제, NA 억제 등 다중 기작을 통해 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타냈다. 또한, 식물 유래 천연물인 7,8-dihydroxyflavone과 daphnetin이 바이러스 사멸활성과 NA 억제활성을 통해 독감바이러스 증식 억제 효과를 갖음을 보고하였다.

산수유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)는 한방 및 민간요법에서 오랜 기간 사용되어 온 약용 식물로, 항당뇨, 항염증, 항산화, 항세포자멸사 등의 다양한 생리활성을 보유한 것으로 보고되어 있다[25]. 그러나, 산수유의 항바이러스 효과에 대한 연구는 아직 제한적이며, 일부 연구에서 산수유 유래 탄닌 성분이 C형 간염바이러스의 NS2 seine protease를 억제하거나[26], 콕사키바이러스에 대해 항바이러스 활성을 나타낸다고 보고되었다[27]. 그러나, 산수유 유래 추출물 또는 유기용매 분획물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성에 대한 연구는 현재까지 보고된 바 없다. 본 연구에서는 산수유 추출물 및 유기용매 분획물이 독감바이러스에 대해 가지는 항바이러스 활성을 *in vitro*에서 평가하고 그 작용 기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 산수유 추출물 및 유기용매 분획물의 바이러스 사멸활성과 독감바이러스 표면단백질 HA 및

NA에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구 결과는 산수유 유래 천연물이 독감바이러스 감염 예방 및 치료를 위한 항바이러스 치료제 후보물질로 활용될 수 있는 가능성을 제시한다.

재료 및 방법

동물세포주 및 독감바이러스

Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포주는 American Type Culture Collection에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA)이 포함된 Minimum Essential Medium (Gibco, Waltham, MA, USA)에서 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 2종의 독감바이러스 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1) 및 mouse-adapted A/aquatic bird/Korea/w81/05 (A/MA81, H5N2)는 MDCK 세포에서 증식시켰다. 독감바이러스는 MDCK 세포에 0.01 multiplicity of infection (MOI)가 되도록 감염시킨 후 2-3일간 배양하여 세포병변효과가 나타난 후 상등액을 원심분리하여 불순물을 제거한 후 -80 °C에 보관하였다.

산수유 추출물 및 유기용매 분획물 제조

국산 산수유 열매(500 g)를 2023년 Omniherb (의성, 대한민국)로부터 구입하였다. 열수추출물은 건조된 원료를 증류수 1 L로 100 °C에서 추출한 후 동결건조하여 얻었으며, 에탄올추출물은 건조된 원료를 1 L의 에탄올로 3회 반복하여 환류 추출한 후 감압농축하여 얻었다. 최종 수득량은 열수추출물 30.2 g, 에탄올추출물 65.1 g이었다. 열수추출물 7 g을 이용하여 극성 차이에 따른 유기용매 분획을 진행하였으며, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, 물층 잔류물의 분획물을 얻었다. 각 분획물의 최종 수득량은 각각 1, 175.3, 100.2, 595.5, 6,100 mg이었다. *n*-hexane 분획물은 양이 부족하여 연구에 사용되지 않았다. 열수추출물, 에탄올추출물, 유기용매 분획물은 모두 DMSO에 용해하여 분석에 사용하였다.

산수유 추출물 및 유기용매 분획물의 세포독성 측정

산수유 추출물 및 분획물의 세포독성은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 분석하였다. MDCK 세포를 96-well plate에 10⁴ cells/well로 접종하여 24시간 배양한 후 추출물 및 분획물을 1/2배씩 연속 희석하여 처리하고 37 °C에서 24시간 배양하였다. 이후 각 well에 CCK-8 시약 10 µL를 첨가하여 1시간 반응시켰고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음 식을 이용하여 계산하였다: 세포 생존율 = (OD_{sample} - OD_{blank}) / (OD_{vehicle} - OD_{blank}) × 100 %. 세포 생존율이 80% 이상인 농도 범위에서 항바이러스 활성을 평가하였다.

독감바이러스 플락어세이

독감바이러스의 역가는 플락어세이를 통해 측정된 plaque-forming units (PFU)으로 표현하였다. MDCK 세포를 12-well plates에 접종하여 100% confluent 상태가 되도록 배양한 후 DPBS로 세척하였다. 1/10배씩 연속 희석된 바이러스 시료를 세

포에 추가한 후 실온에서 45분간 흡착시킨 후 DPBS로 세척하였다. 이후 1% low-melting agarose (Lonza, Rockland, ME, USA)와 2.5% trypsin (Gibco)을 포함한 overlay 배지를 3 mL씩 각 well에 첨가하였다. 배지가 고형화된 후, 37 °C에서 2-3일 동안 배양하여 플라크가 형성되면 4% formaldehyde로 고정하고 crystal violet로 염색하여 플라크를 관찰하였다.

Time-of-addition assay

산수유 추출물 및 분획물의 독감바이러스 감염 단계별 항바이러스 효과를 평가하기 위해 기존 연구에서 사용한 실험법[16]에 근거하여 time-of-addition assay를 수행하였으며 추출물 및 분획물의 처리 시점에 따라 세 가지 조건으로 수행하였다. 1) 바이러스 전처리(pre-treatment to virus). 추출물 및 분획물이 감염 이전에 바이러스에 사멸활성을 갖는지 확인하기 위해 1/2배씩 연속 희석된 추출물 및 분획물을 독감바이러스(100 PFU, 0.01 MOI)와 혼합하여 37 °C에서 30분간 처리하였다. 이 혼합물을 96-well plates에 배양된 MDCK 세포에 접종하여 45분간 흡착시켰다. 흡착 후 접종액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 뒤 신선한 배양액을 첨가하여 배양을 지속하였다. 2) 동시 처리(co-treatment to cells). 추출물 및 분획물이 독감바이러스의 세포 침투 단계에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 1/2배씩 연속 희석된 추출물 및 분획물을 100 PFU의 독감바이러스를 혼합한 후 즉시 MDCK 세포에 접종하였다. 접종 후 상온에서 45분간 흡착시킨 다음 접종액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 신선한 배양액을 첨가하였다. 3) 감염 후 처리(post-treatment to cells). 독감바이러스가 세포에 침투한 이후 추출물 및 분획물의 항바이러스 활성을 평가하기 위해 MDCK 세포에 100 PFU의 독감바이러스를 접종하고 상온에서 45분간 흡착시켰다. PBS로 세척하여 미흡착 바이러스를 제거한 추출물 및 분획물을 포함한 배양액을 첨가하여 배양하였다. 모든 조건에서 감염 48시간 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였으며, 항바이러스 효과는 시료 처리군과 DMSO 처리 대조군 간의 세포 생존율 차이에 따른 세포병변효과 억제율로 평가하였다.

산수유 추출물의 적혈구 응집반응 억제 활성 분석

산수유 추출물에 의한 독감바이러스 적혈구 응집반응 억제 활성을 분석하기 위해 hemagglutination inhibition (HI) assay를 수행하였다. 독감바이러스의 hemagglutination units (HAU)를 측정하기 위해 V-bottom 96-well plates에서 독감바이러스를 1/2배씩 연속 희석한 후, 1% 닭 적혈구(cRBC, Innovative Research, Court Novi, MI, USA)와 혼합하여 4 °C에서 1시간 반응시켜 측정하였다. HI assay를 수행하기 위해 추출물 및 분획물을 1/2배씩 연속 희석하여 4 HAU의 독감바이러스와 37 °C에서 30분간 반응시킨 후, 1% cRBCs를 첨가하여 4 °C에서 1시간 반응시켰다. 적혈구 응집 억제가 관찰된 최저 농도를 추출물 및 분획물의 HI 농도로 정의하였다.

산수유 추출물 및 유기용매 분획물의 독감바이러스 NA 억제 활성 분석

독감바이러스의 NA 효소 활성은 lectin 기반 효소면역측정법

(lectin-based enzyme-linked NA assay)을 이용하여 평가하였다. 96-well plates에 50 µg/mL fetuin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 µL를 분주한 후 4 °C에서 16시간 동안 코팅시켰다. 독감바이러스를 1/2배씩 연속 희석하여 fetuin으로 코팅된 well에 첨가하고 37 °C에서 1시간 동안 반응시켜 NA에 의한 sialic acid 절단이 일어나도록 하였다. 반응 후 well을 세척하고 desialylated 잔기를 인식하기 위해 lectin (Sigma-Aldrich) 100 µL를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세척한 후 TMB (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 100 µL를 각 well에 첨가하여 색 반응을 유도하였고, 5분 후 2 N H₂SO₄ 50 µL를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NA inhibition (NI) assay를 위해 산수유 추출물 및 분획물을 1/2배씩 연속 희석한 후 흡광도(OD₄₅₀) = 1에 해당하는 NA 활성을 가진 독감바이러스와 혼합하였다. 이 혼합물을 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 위와 동일한 방법으로 fetuin 코팅된 well에 적용하여 NA 활성을 평가하였다.

통계 분석

모든 실험은 최소 3회 반복하여 수행하였으며 결과는 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 두 그룹 간의 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 유의수준은 *****p* < 0.0001; ****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05로 표시하였다. 비선형회귀분석(non-linear regression analysis)은 GraphPad Prism 9.0 프로그램을 사용하였다.

결 과

산수유 추출물의 세포독성 및 독감바이러스 사멸활성

산수유 열매의 열수추출물(COW) 및 에탄올추출물(COE)의 세포독성을 평가하기 위해 각 추출물을 1/2배씩 연속 희석하여 MDCK 세포에 처리한 후 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 CCK-8 분석을 통해 세포생존율을 측정하였다. DMSO를 처리한 대조군과 비교했을 때, COW, COE 모두 63-2,000 µg/mL 농도 범위에서 80% 이상의 세포생존율을 보여 유의미한 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1A, B). 이후 추출물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성 분석은 세포독성이 나타나지 않은 비세포독성 농도에서 수행되었다. 산수유 추출물의 독감바이러스 사멸활성을 평가하기 위해 A/MA81 (H5N2) 바이러스 10⁴ PFU에 각 추출물을 처리한 후 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 플라크 세이를 통해 잔존 바이러스의 역가를 측정하였다. DMSO 처리군에서는 바이러스 역가 감소가 거의 관찰되지 않은 반면, COW는 78.1 µg/mL 농도에서 바이러스를 완전히 사멸시켜 감염성 바이러스가 검출되지 않았다(Fig. 1C). COW 39.1 µg/mL 및 19.5 µg/mL 농도에서도 각각 DMSO 처리군 대비 10.3 및 15.2%의 바이러스 역가가 검출되어 강력한 바이러스 사멸활성이 나타났다(Fig. 1C). COE는 1,000 µg/mL 농도에서 완전한 바이러스 사멸활성을 보였으며, 500 및 250 µg/mL 농도에서 DMSO 처리군 대비 각각 0.3 및 34.2%의 바이러스 역가가 검출되어 우수한 수

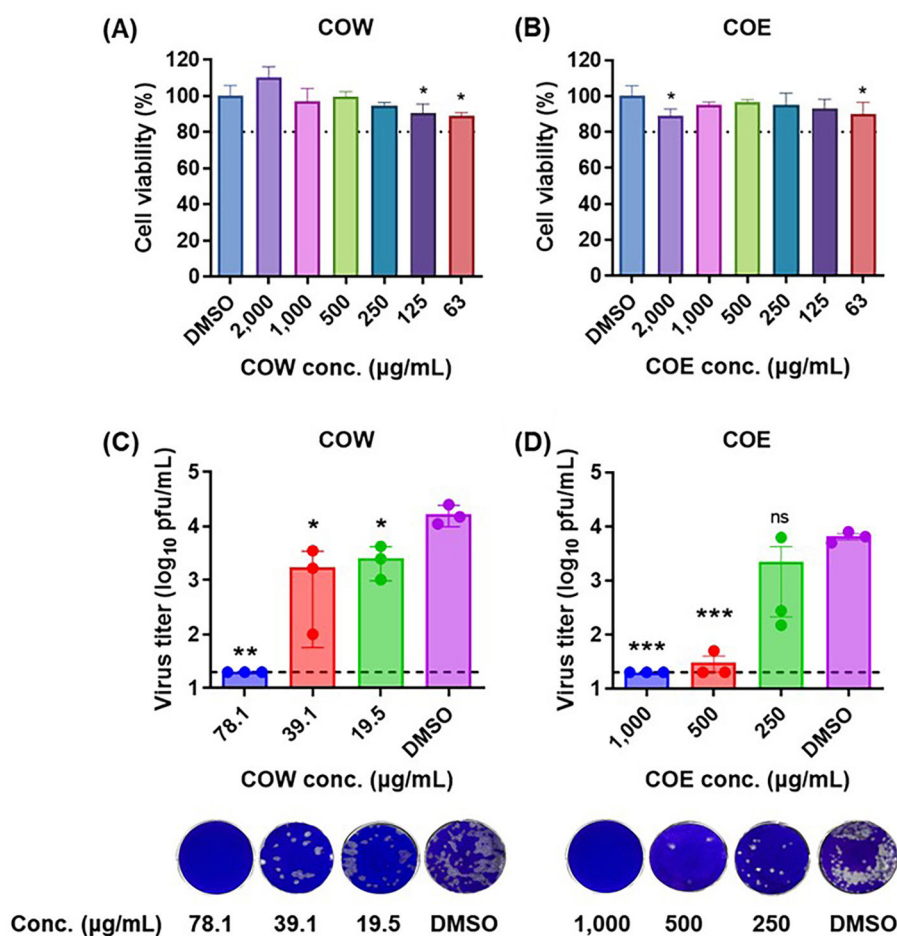


Fig. 1 *In vitro* cytotoxicity and virucidal activity of CO extracts. (A and B) *In vitro* cytotoxicity of CO extracts. Two-fold serial dilutions of the extracts were added to MDCK cells and incubated for 24 h at 37 °C, and cell viability was assessed using the CCK-8 assay. The cell viability after treatment with COW (A) and COE (B) ($n=3$). (C and D) Virucidal activity of CO extracts. Two-fold serial dilutions of the extracts were treated to 10^4 PFU of A/MA81 (H5N2) virus and incubated for 30 min at 37 °C for viral inactivation. The residual viral titers were determined using plaque assays on MDCK cells. The viral titers after treatment with COW (C) and COE (D). Representative images of plaque assays at a 10^{-1} dilution are shown. The dashed line indicates the detection limit, 1.301

준의 바이러스 사멸활성을 나타냈다(Fig. 1D). 이 결과는 산수유 추출물을 독감바이러스에 처리하였을 때 바이러스의 감염성을 제거하는 사멸활성을 갖는다는 것을 시사하며, COW이 COE보다 바이러스 사멸활성이 더 강력하다는 점을 제시한다.

산수유 추출물의 독감바이러스 HA 억제 활성

독감바이러스의 표면단백질 HA는 독감바이러스의 세포 침투 단계에 필수적인 역할을 수행한다. 산수유 추출물이 HA의 기능에 미치는 영향을 분석하기 위해 독감바이러스에 각 추출물을 30 분 혹은 2시간 동안 처리한 후 HI assay를 통해 적혈구 응집반응 억제활성(HI 활성)을 분석하였다. COW를 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 30분 동안 처리했을 때 250-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 HI 활성을 나타냈다(Fig. 2A). COE를 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 30분 동안 처리했을 때 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 HI 활성을 나타냈다(Fig. 2A). 추출물 처리 시간을 30분에서 2시간으로 증가했을

때 COW는 125 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서, COE는 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 HI활성을 나타내어 추출물 처리시간에 따른 억제 활성의 증가가 확인되었다(Fig. 2B). A/PR8 (H1N1) 바이러스에 각 추출물을 처리했을 때, COW는 125-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 HI 활성을 나타낸 반면(Fig. 2C), COE는 62.5-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 A/PR8 (H1N1) 바이러스에 대해 HI 활성을 나타내지 않았다(Fig. 2C). 추출물 처리시간을 2시간으로 증가하였을 때 COW는 A/PR8 (H1N1) 바이러스에 대해 125-2,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 HI 활성을 나타내어 30분 처리와 유사한 수준의 억제활성을 나타냈으나, COE는 A/PR8 (H1N1) 바이러스에 대해 처리시간에 관계없이 HI 활성을 나타내지 못하였다(Fig. 2D). 이 결과를 요약하면, COW는 A/MA81 (H5N2)와 A/PR8 (H1N1) 두 바이러스에 대해 HA의 수용체 결합을 억제하는 HI 활성을 나타낸 반면, COE는 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 대해서만 HI 활성을 나타냈다.

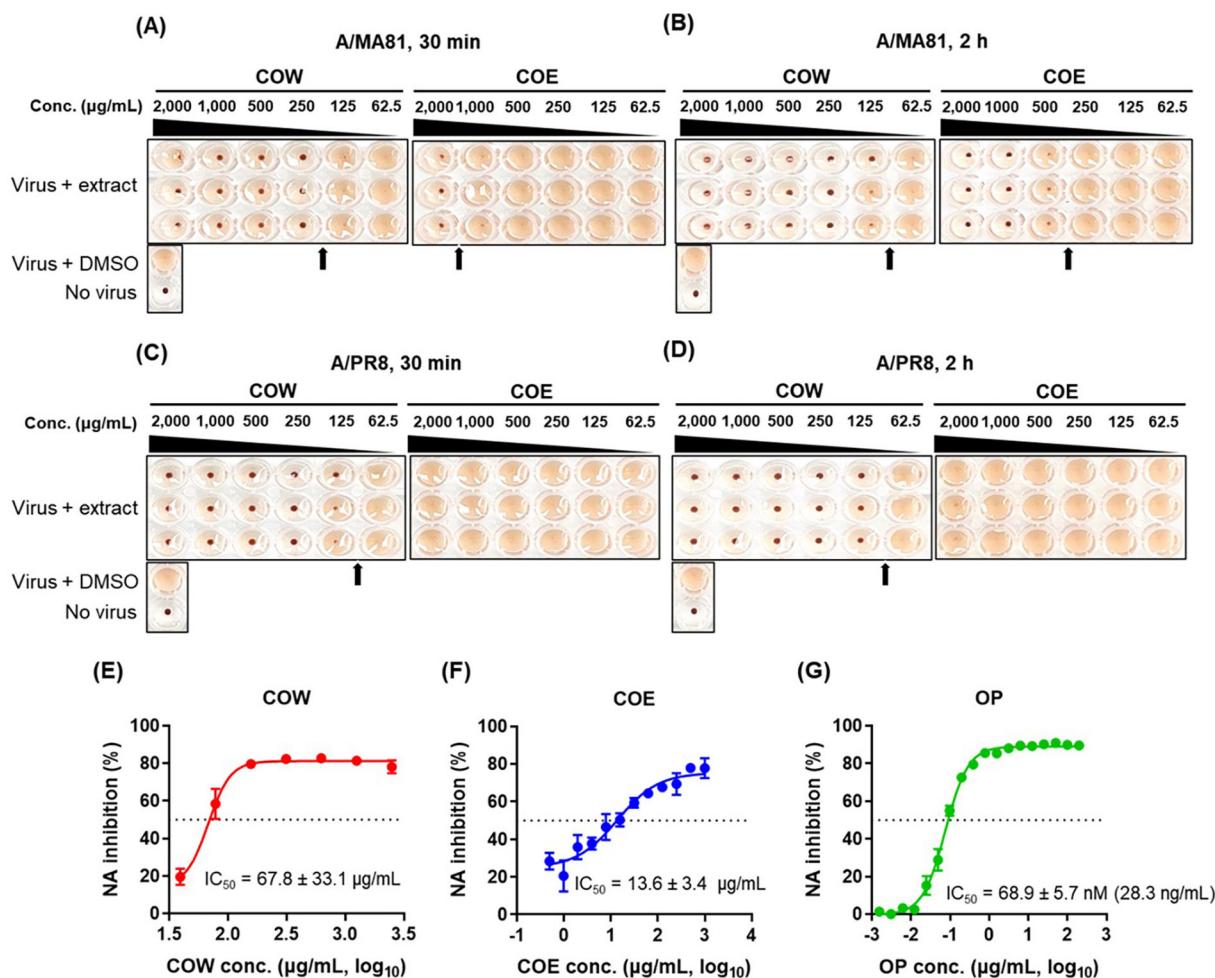


Fig. 2 Inhibitory effects of CO extracts on influenza virus HA and NA proteins (A-D) HI activity of the extracts. Four hemagglutination units of influenza A virus (25 µL) was incubated with two-fold serial dilutions of the extracts (25 µL) for 30 min or 2 h at 37 °C. After incubation, 1% cRBCs (50 µL) were added to the mixture and incubated at 4 °C for 1 h to allow hemagglutination. HI assay results performed in triplicate against A/MA81 (H5N2) (A and B) and A/PR8 (H1N1) virus (C and D). (E-G) NI activity of the extracts and OP. A predetermined titer of A/MA81 (H5N2) virus (120 µL) was incubated with two-fold serial dilutions of the extracts or OP (120 µL) at 37 °C for 30 min. The mixtures were then transferred to 96-well immunoplates pre-coated with fetuin and further incubated at 37 °C for 1 h. Following incubation, the wells were aspirated, and 100 µL of lectin was added, followed by incubation at room temperature for 1 h. After removing unbound lectin, 100 µL of TMB substrate was added to each well. The reaction was stopped after 5 min by adding 50 µL of 2 N H₂SO₄, and absorbance was measured at 450 nm. NA inhibition by COW (E), COE (F), and OP (G) ($n=3$). Nonlinear regression analysis was performed using GraphPad Prism9.0 software

산수유 추출물의 독감바이러스 NA 억제 활성

독감바이러스의 표면단백질 NA는 독감바이러스의 세포 방출 단계에 필수적인 역할을 수행한다. 산수유 추출물이 독감바이러스 NA의 기능에 미치는 영향을 평가하고자 NI assay를 수행하였다. COW는 비세포독성 농도범위에서 19.5-82.8%의 A/MA81 (H5N2) 바이러스 NA 억제활성을 나타냈으며 IC₅₀값은 67.8 µg/mL로 확인되었다(Fig. 2E). COE는 비세포독성 농도범위에서 20.6-77.9%의 NA 억제 활성을 나타냈으며 IC₅₀값은 13.6 µg/mL로 확인되었다(Fig. 2F). NI 활성은 COE가 COW에 비해 낮은 IC₅₀값을 보여 더 우수한 NA 억제 활성을 보였다. 잘 알려진 NA inhibitor인 oseltamivir phosphate (OP)를 양성대조군으로 사용하여 NI 활성을 측정할 결과, OP의 IC₅₀ 값은 68.9 nM (28.3 ng/

mL) 였다(Fig. 2G). IC₅₀ 값을 기준으로 했을 때, COW와 COE의 NA 억제 활성이 OP에 비해 약했지만, 이 결과는 COW와 COE 모두 NA 억제 활성을 지닌 성분을 포함하고 있음을 시사한다. COW는 A/H5N2 및 A/H1N1 두 아형의 독감바이러스에 대해 HA의 수용체 결합과 NA의 sialidase 효소 활성을 모두 억제하였다. 반면, COE는 A/H5N2 바이러스의 HA 기능만을 억제하였으며, 두 아형의 바이러스에 대해 NA 활성을 공통적으로 억제하였다. 이는 COE가 독감바이러스의 아형에 따라 상이한 HA 억제 활성을 보일 수 있음을 나타낸다.

산수유 추출물의 항바이러스 활성 감염단계 규명

산수유 추출물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성이 적

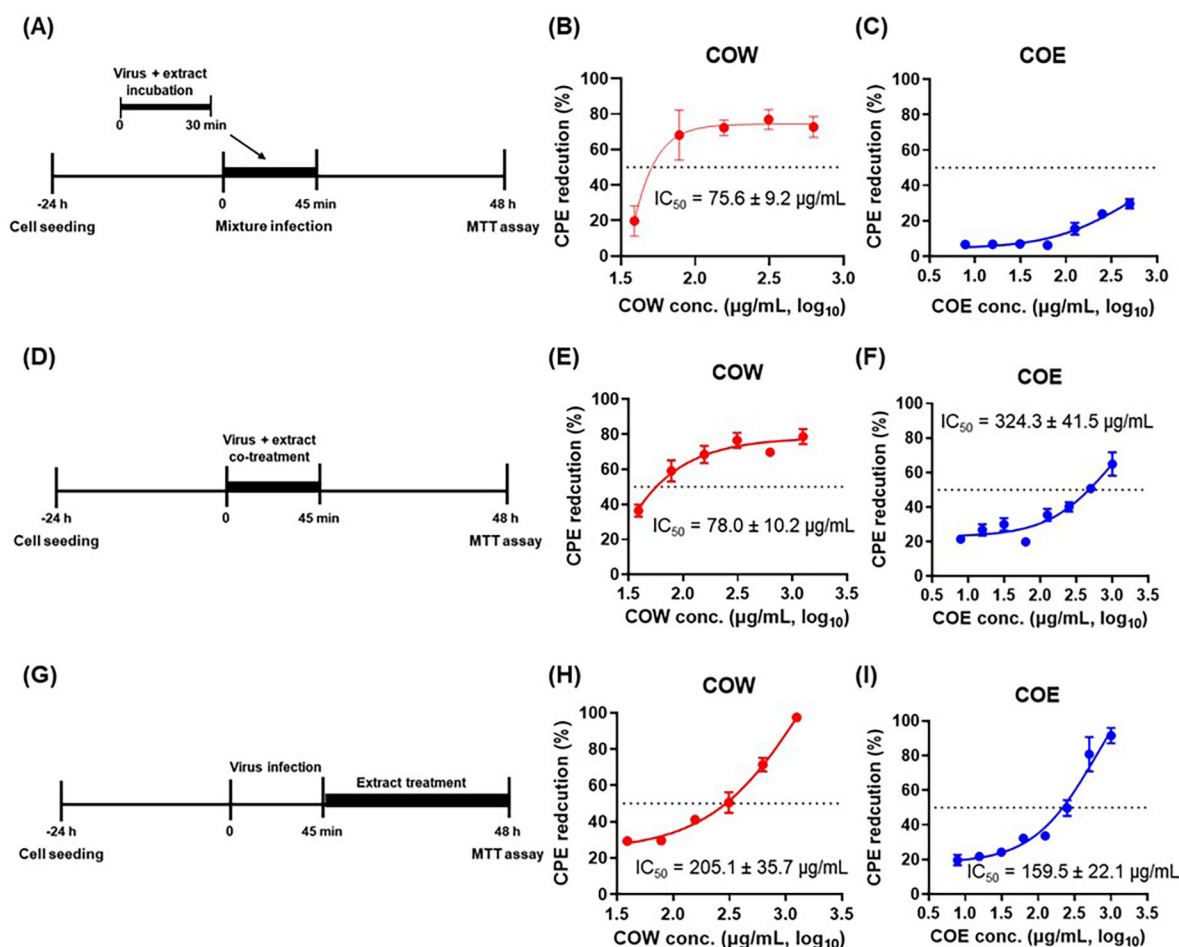


Fig. 3 Time-of-addition experiments. (A-C) Pre-treatment to virus. Two-fold serial dilutions of the extracts were treated to 0.01 MOI of A/MA81 (H5N2) virus at 37 °C for 30 min. The mixtures were then added to MDCK cells for viral infection. After 48 h, cell viability was assessed to determine CPE reduction (A). CPE reduction by pre-treatment of COW (B) and COE (C) ($n=3$). (D-F) Co-treatment to cells. Two-fold serial dilutions of the extracts and 0.01 MOI of A/MA81 (H5N2) virus were added to MDCK cells for viral infection. After 48 h, cell viability was measured to evaluate CPE reduction (D). CPE reduction by treatment of COW (E) and COE (F) ($n=3$). (G-I) Post-treatment to cells. MDCK cells were infected with 0.01 MOI of A/MA81 (H5N2) virus, followed by treatment with two-fold serial dilutions of the extracts. After 48 h, cell viability was measured to assess CPE reduction. CPE reduction by treatment of COW (H) and COE (I) ($n=3$)

용되는 바이러스 감염 단계를 규명하기 위해 추출물을 바이러스 혹은 세포에 처리하는 시기를 달리한 후 바이러스 감염에 의한 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 측정하였다. 추출물의 독감바이러스 사멸활성을 확인하기 위해 1/2배씩 연속 희석된 각 추출물을 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 37 °C에서 30분간 처리한 후 MDCK 세포에 감염시킨 후 CPE를 측정하였다(Fig. 3A). COW는 39.1-625 μg/mL에서 19.7-76.9%의 CPE 감소를 유도하는 우수한 바이러스 사멸활성을 나타냈다(Fig. 3B). 반면, COE는 7.8-500 μg/mL에서 6.2-29.5%의 CPE 감소를 유도하여 COW에 비해 낮은 바이러스 사멸활성을 나타냈다(Fig. 3C). 다음으로, 산수유 추출물이 독감바이러스의 세포 침입 단계를 억제하는지를 분석하기 위해 바이러스와 추출물을 동시에 MDCK 세포에 처리하였다(Fig. 3D). COW는 39.1-1,250 μg/mL 농도에서 36.4-78.6%의 CPE 감소를 보였고(Fig. 3E), COE는 7.8-

1,000 μg/mL 농도에서 19.9-64.9%의 억제 효과를 나타냈다(Fig. 3F). 이러한 결과는 COW와 COE 두 추출물 모두 독감바이러스의 세포 침투 단계를 억제함을 보여준다. 산수유 추출물이 바이러스 감염의 전체 단계(세포침입, 세포 내 증식, 세포 방출)에서 항바이러스 활성을 나타내는 지 확인하기 위해 MDCK 세포에 독감바이러스 감염 후 각 추출물을 처리한 후 CPE를 관찰하였다(Fig. 3G). COW는 39.1-1,250 μg/mL에서 29.4-97.4%의 CPE 억제를 유도하였으며(Fig. 3H), COE는 7.8-1,000 μg/mL에서 19.7-91.5%의 CPE 억제 효과를 나타냈다(Fig. 3I). 이 결과는 각 추출물을 바이러스가 감염된 세포에 처리했을 때 바이러스 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다. 종합하면, COW, COE는 독감바이러스에 대한 직접적인 사멸활성 뿐만 아니라 바이러스의 세포 침입 단계를 포함한 바이러스 세포 내 복제 전체 과정에서 항바이러스 활성을 나타냄을 시사한다.

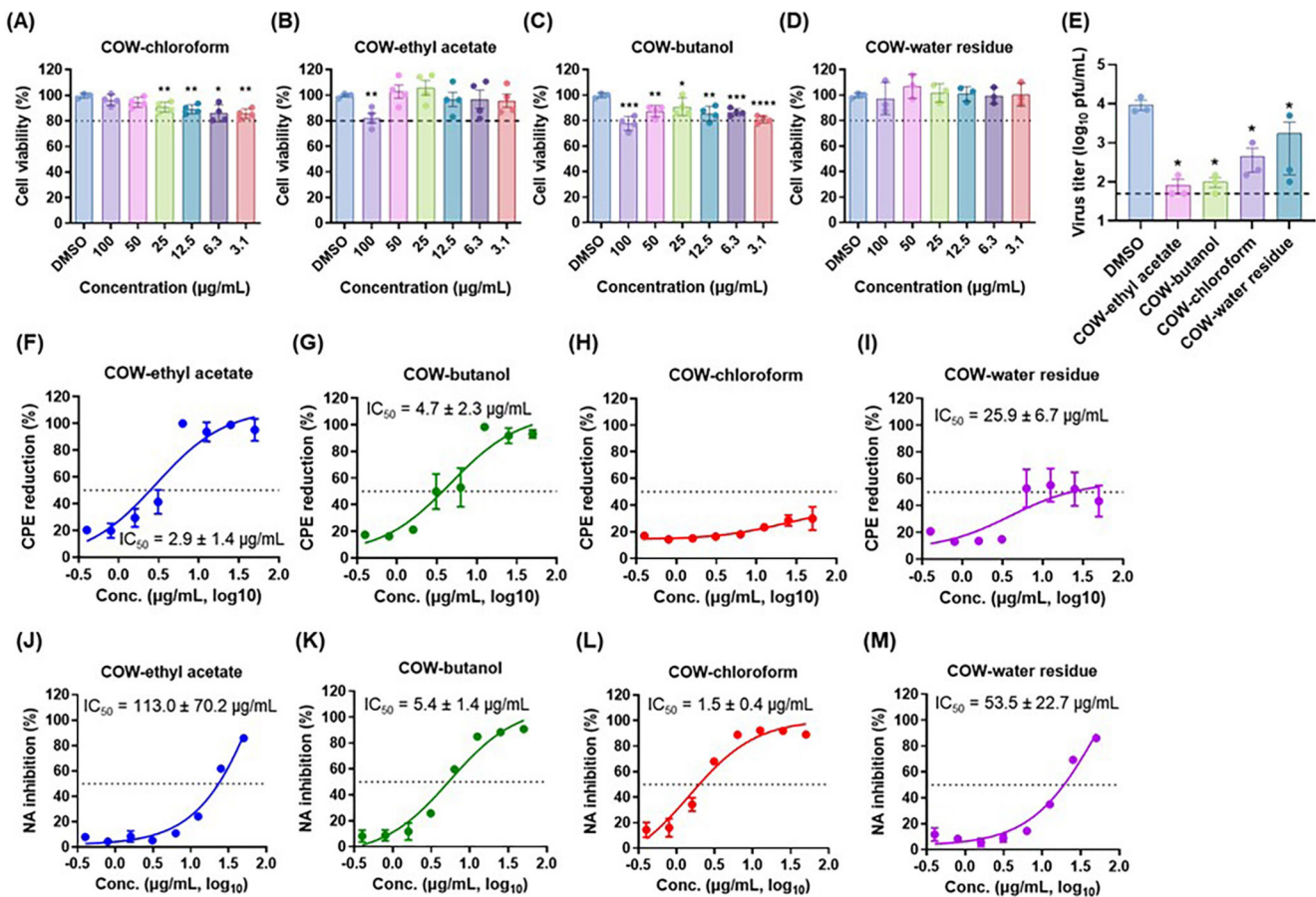


Fig. 4 *In vitro* cytotoxicity and antiviral activity of the organic solvent fractions derived from COW. (A–D) *In vitro* cytotoxicity of the fractions. The cell viability following treatment with chloroform (A), ethyl acetate (B), butanol (C), and water residue fractions (D) ($n=3$). (E) Virucidal activity of the fractions. 50 µg/mL of each fraction was treated to 10^4 PFU of A/MA81 (H5N2) virus for 30 min at 37 °C for viral inactivation. The mixtures were then added to MDCK cells for plaque assay to measure the residual viral titers. A dashed line represents the detection limit, 1.301. (F–I) CPE reduction assay of pre-treatment of fractions to A/MA81 (H5N2) virus. CPE reduction by pre-treatment of ethyl acetate (F), butanol (G), chloroform (H), and water residue (I) ($n=3$). (J–M) NI activity of the fractions against A/MA81 (H5N2) virus. NI activity of ethyl acetate (J), butanol (K), chloroform (L), and water residue (M) ($n=3$).

산수유 열수추출물 유래 유기용매 분획물의 항바이러스 활성

위 결과들을 통해 독감바이러스 사멸활성, HI 활성, CPE 억제 활성 등 전반적으로 COW가 COE에 비해 우수한 항바이러스 활성을 나타냄을 알 수 있다. COW의 항바이러스 활성을 갖는 성분을 더욱 상세하게 규명하기 위해 COW로부터 3종의 유기용매 분획물(chloroform, ethyl acetate, butanol 분획물)과 물층 잔류물(water residue)을 제작하였다. 각 분획물의 세포독성은 3.1–100 µg/mL 농도 범위에서 24시간 동안 MDCK 세포에 처리한 후 CCK-8 분석을 통해 평가하였다. Chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물, 물층 잔류물은 분석된 농도 범위에서 세포생존율이 80% 이상으로 유지되어 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 4A, B, D). Butanol 분획물은 100 µg/mL에서 77.7%의 세포 생존율을 나타내어 약한 수준의 세포독성을 나타냈으나 50 µg/mL 이하의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 4C). 각 분획물의 독감바이러스 사멸활성을 측정하기 위해 50 µg/mL의 농도로 A/MA81 (H5N2) 바이러스(10^4 PFU)에 처리하여 37 °C에

서 30분간 반응시킨 후 플락어세이를 통해 잔존 바이러스 역가를 측정하였다. DMSO 처리군에서는 9.5×10^3 PFU/mL의 바이러스 역가가 유지되어 사멸활성을 보이지 않았으나, 네 가지 분획물은 모두 유의한 수준의 바이러스 사멸활성을 나타냈다. Ethyl acetate 분획물, butanol 분획물, chloroform 분획물, 물층 잔류물을 독감바이러스에 처리하였을 때 DMSO 처리군 대비 각각 0.9, 1.1, 4.7, 18.6%의 바이러스 역가를 유도하여 강력한 바이러스 사멸활성을 나타냈다(Fig. 4E). 이 결과는 COW로부터 제작된 ethyl acetate 분획물, butanol 분획물, chloroform 분획물, 물층 잔류물이 비세포독성 농도에서 독감바이러스에 대한 사멸활성을 갖고 있음을 시사한다. 분획물의 바이러스 사멸활성을 추가적으로 검증하기 위해 각 분획물을 독감바이러스에 처리 후 CPE 감소 분석을 수행하였다. 각 분획물을 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 37 °C에서 30분간 처리한 후 MDCK 세포에 감염시켜 CPE를 관찰하였다. Ethyl acetate 분획물은 0.4–50 µg/mL 농도에서 20.2–100%의 CPE 감소를 유도하였으며 IC_{50} 값은 2.9 µg/mL이

었다(Fig. 4F). Butanol 분획물은 동일한 농도에서 16.3-98.3%의 CPE 감소를 유도하였고 IC_{50} 값은 4.7 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Fig. 4G). Chloroform 분획물은 최고 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 30%의 CPE 감소 활성을 나타내어 가장 약한 활성을 보였다(Fig. 4H). 물층 잔류물은 0.4-50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 13.0-55.3% 수준의 CPE 감소를 보였으며 IC_{50} 값은 25.9 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Fig. 4I). 이 결과는 산수유 열수추출물 유래 ethyl acetate 분획물, butanol 분획물 및 물층 잔류물이 독감바이러스 사멸활성을 지니고 있음을 시사한다. 분획물이 독감바이러스의 세포 침투 단계를 억제하는지 확인하기 위해 HI assay 및 바이러스와 분획물 동시 처리 후 CPE 감소 분석을 수행하였으나 모든 분획물에서 HI 활성 또는 CPE 감소 효과가 나타나지 않았다(자료 미제시). 분획물의 독감바이러스 NI 활성을 평가하기 위해 각 분획물을 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 처리하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 NI assay를 수행하였다. Ethyl acetate 분획물은 0.4-50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 4.5-85.9%의 NI 활성을 나타냈으며 IC_{50} 값은 113.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Fig. 4J). Butanol 분획물은 같은 농도 범위에서 8.1-90.7%의 NI 활성을 나타냈고 IC_{50} 값은 5.4 $\mu\text{g/mL}$ 였다(Fig. 4K). Chloroform 분획물은 같은 농도 범위에서 14.4-92.2%의 NI 활성을 나타냈으며 IC_{50} 값은 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 강력한 활성을 보였다(Fig. 4L). 물층 잔류물은 같은 농도 범위에서 5.5-86.1%의 NI 활성을 보였으며 IC_{50} 값은 53.5 $\mu\text{g/mL}$ 였다(Fig. 4M). 이 결과를 요약하면, chloroform 및 butanol 분획물이 강력한 NI 활성을 지니며 물층 잔류물과 ethyl acetate 분획물이 그 뒤를 이었다.

고찰

본 연구에서는 산수유 추출물 및 유기용매 분획물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성을 분석하였다. 지금까지 다양한 식물 유래 천연물의 항바이러스 활성에 대한 연구가 보고되어 왔으나 산수유 추출물 및 유기용매 분획물이 독감바이러스에 대해 항바이러스 활성을 보인다는 연구는 매우 제한적이다. 본 연구는 산수유 추출물 및 분획물이 독감바이러스에 대해 항바이러스 활성을 나타낸다는 점을 처음으로 제시한 연구이다. 본 연구에서는 산수유 추출물이 독감바이러스에 대해 바이러스 사멸활성, HI 활성, NI 활성을 갖음을 감염성 바이러스를 이용한 bioassay 및 감염세포의 CPE 감소 분석을 통해 확인하였다. 또한 산수유 열수추출물 유래 유기용매 분획물의 바이러스 사멸활성과 NI 활성을 분석하였다.

화합물의 바이러스 사멸활성은 다양한 기작에 의해 발현될 수 있다. 가장 일반적으로, 화합물이 바이러스 표면단백질의 숙주 세포 수용체 결합을 억제하여 바이러스의 감염성을 저해함으로써 나타날 수 있다. Epigallocatechin gallate는 단순포진 바이러스-1 (HSV-1) 및 C형 간염바이러스(HCV)의 표면단백질과의 공유결합을 통해 바이러스 사멸활성을 나타냈다[28-31]. 본 연구에서 COW, COE를 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 30분 처리하였을 때 독감바이러스의 감염성을 제거하는 사멸활성을 나타낼 뿐 아니라(Fig. 1C, D) 독감바이러스 HA 단백질의 수용체 결합을 억제하는 HI 활성을 나타냈다(Fig. 2A, B). 이 결과는 산수유

추출물에 존재하는 천연물이 독감바이러스 HA의 수용체 결합을 억제하여 바이러스 사멸활성을 나타낼 수 있음을 시사한다. 그러나, 산수유 추출물의 HI 활성 외에 다른 기작에 의한 바이러스 사멸활성을 배제할 수는 없다. 산수유 추출물을 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 30분 처리하였을 때 HI 활성을 나타내는 추출물의 농도(COW: 250 $\mu\text{g/mL}$, COE: 2,000 $\mu\text{g/mL}$)는 완벽한 바이러스 사멸활성을 갖는 농도(COW: 78.1 $\mu\text{g/mL}$, COE: 1,000 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 높은 농도에 해당한다. 이 결과는 산수유 추출물의 바이러스 사멸활성에 HI 활성 외에 다른 기작이 추가적으로 관여할 수 있음을 시사한다. 또한, 일부 천연물은 바이러스 표면단백질에 직접 작용하지 않더라도 바이러스 사멸활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. *Aster pseudoglehnii*에서 유래한 chlorophyll 유도체인 ethyl pheophorbides a 및 b는 HI 활성을 나타내지 않고 바이러스 막을 손상시켜 감염성을 억제하는 것으로 보고된 바 있다[32]. 산수유 추출물의 바이러스 사멸활성의 작용 기작을 명확히 이해하기 위해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다.

독감바이러스의 아형에 따라 활성의 차이가 존재하지만, COW와 COE는 A/H5N2 독감바이러스의 세포 침투와 방출 과정에 필수적인 기능을 담당하는 HA 및 NA의 기능을 모두 억제하는 활성을 나타냈다. 독감바이러스 HA는 바이러스의 숙주세포 부착(attachment), 침투(entry) 및 막 융합(membrane fusion)에 중요한 역할을 하기 때문에 HA 억제제는 바이러스 감염 초기 단계를 차단하는 효과적인 항바이러스 후보물질로 고려된다[33,34]. 본 연구에서 확인된 COW, COE의 HI 활성은 독감바이러스 HA매개 세포 부착을 억제하는 능력이 있음을 제시하지만, 추가 연구를 통해 COW 및 COE의 바이러스 세포 침투 및 막융합 단계 억제 여부를 확인할 필요가 있다. 독감바이러스 NA는 sialidase 효소 활성을 통해 바이러스의 세포 방출을 촉진한다. Oseltamivir와 zanamivir 등 NA 억제제는 독감바이러스 감염을 치료하는 항바이러스제로서 가장 널리 사용되고 있는 약물이다. 본 연구에서 COW, COE의 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 대한 NI 활성이 확인되었는데 IC_{50} 값(COW: 67.8 $\mu\text{g/mL}$, COE: 13.6 $\mu\text{g/mL}$)을 통해 COE의 NI 활성이 COW보다 더 우수함을 알 수 있다. 본 연구팀의 기존 연구에서 헵트 줄기 유래 에탄올추출물이 독감바이러스에 대해 강력한 항바이러스 활성을 나타냈으며, 이 추출물의 A/MA81 (H5N2) 바이러스에 대한 NI 활성의 IC_{50} 값이 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 본 연구의 COE와 유사한 수준의 NA 억제 활성을 나타냈다 [24]. 비록 COW 및 COE의 NA 억제 활성이 OP (IC_{50} =28.3 ng/mL)에 비해 낮지만, 이 결과는 COW 및 COE에 존재하는 화합물이 독감바이러스 HA 또는 NA를 표적으로 하는 새로운 항바이러스 후보 물질이 될 수 있음을 제시한다.

COW로부터 분획된 유기용매 분획물과 물층 잔류물은 플라크 어세이 및 CPE 억제 분석에서 독감바이러스 사멸활성을 나타냈으나(Fig. 4), HI 활성과 바이러스 세포 침투 억제 활성은 없는 것으로 나타났다(자료 미제시). 이 결과는 분획물의 독감바이러스 사멸활성이 HI 활성과는 독립적인 기전을 통해 작용함을 의미하며, 사멸활성의 기작 규명을 위한 추가 연구가 필요하다. NI assay에서 chloroform 및 butanol 분획물은 COW (IC_{50} =67.8 $\mu\text{g/mL}$)보다 강력한 NI 활성을 나타냈으며 각각 1.5 $\mu\text{g/mL}$, 5.4 $\mu\text{g/mL}$ 의 더 낮은 IC_{50} 값을 나타냈다(Fig. 4K, L). 그러나, 분획

물들의 우수한 NI 활성에도 불구하고 바이러스가 감염된 세포에 처리하였을 때 CPE 억제 효과로 이어지지 않았다(자료 미제시). COW와 분획물들 간의 항바이러스 활성이 상이한 이유는 여러 가지 요인으로 설명될 수 있다. COW에서 관찰된 HI 활성은 다양한 극성의 천연물들이 상호작용하여 나타나는 복합적 효과인데 분획물 제작 과정에서 각 천연물은 용매의 극성에 따라 분리되면서 이러한 시너지 효과가 희석될 수 있다. 반면, chloroform 및 butanol 분획물에서 특정 극성을 가진 성분들이 농축되어 NI 활성을 강화한 것으로 보인다. 또한, 바이러스가 감염된 세포에 분획물을 처리하였을 때는 항바이러스 활성이 관찰되지 않았다는 점에서 분획물과 바이러스와의 사전 접촉이 항바이러스 활성을 발현하는 데 필수적인 것으로 판단된다. 추후 각 추출물 및 분획물 내에 포함된 물질을 세부 분석하여 단일 물질 수준에서 항바이러스 활성 분석을 통해 항바이러스 활성의 분자 수준의 기작 규명이 필요하다.

본 연구는 산수유 추출물 및 유기용매 분획물이 독감바이러스에 대해 항바이러스 활성을 나타냄을 최초로 보고하였다. COW, COE는 독감바이러스에 대한 사멸활성, HI 활성, NI 활성을 포함한 다양한 기작으로 항바이러스 효과를 보였으며, COW 유래 유기용매 분획물은 바이러스 사멸활성과 NI 활성을 나타냈다. 본 연구에는 몇 가지 제한점이 존재하며 향후 연구를 통해 다음과 같은 점을 보완할 필요가 있다. 첫째, 산수유 추출물 및 분획물의 항바이러스 활성은 다양한 생리활성 물질들의 복합적인 시너지 효과에 기인할 가능성이 높다. 둘째, 본 연구는 독감바이러스 표면단백질에 대한 억제 효과에 초점을 맞추었으며 세포 내에서의 작용 기전은 규명하지 못하였다. 향후 연구에서 바이러스 감염 세포 내에서의 작용 기전 및 바이러스 또는 숙주 단백질의 새로운 표적을 밝히는 것이 필요하다. 셋째, 본 연구에서 확인된 항바이러스 활성을 실제 임상적으로 적용하기 위해서는 동물실험을 통해 그 효과를 검증해야 한다. 결론적으로 본 연구 결과는 산수유 유래 천연물이 독감바이러스의 표면단백질 HA 및 NA를 표적으로 하는 새로운 항바이러스 후보물질로서 개발될 가능성을 제시한다.

초 록

독감바이러스 감염은 전 세계적으로 계절성 유행과 팬데믹을 유발하는 중대한 공중보건 위협으로 작용하고 있다. 현재 사용 중인 항바이러스제의 내성 문제와 부작용은 새로운 항바이러스제 개발의 필요성을 강조하고 있다. 본 연구에서는 산수유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 열매로부터 제작된 추출물 및 유기용매 분획물의 독감바이러스에 대한 항바이러스 활성을 *in vitro*에서 분석하였다. *In vitro* 세포독성 분석을 통해 산수유 열수추출물 및 에탄올추출물의 세포독성을 측정하였으며, 각 추출물은 비세포독성 농도에서 독감바이러스의 감염력을 제거하는 강력한 바이러스 사멸활성을 나타냈다. 또한 각 추출물은 독감바이러스의 표면단백질인 HA와 NA의 주요 기능을 억제하고 독감바이러스의 세포 침투 및 방출 단계를 효과적으로 억제하였다. 이와 같은 산수유 추출물의 다중 표적 기작 항바이러스 효과는 time-of-

addition assay 및 cytopathic effect 억제 분석을 통해 재확인되었다. 산수유 열수추출물로부터 제작된 유기용매 분획물들은 독감 바이러스에 대해 바이러스 사멸활성과 NA 억제 활성을 보였다. 네 가지 유기용매 분획물 중에서 chloroform 분획물을 제외한 나머지 분획물들은 우수한 바이러스 사멸활성을 나타냈다. NA 억제 활성은 chloroform 분획물, butanol 분획물, 물층 잔류물, ethyl acetate 분획물 순으로 높았다. 본 연구 결과는 산수유 유래 추출물 및 유기용매 분획물이 독감바이러스에 대해 다중 표적 기작의 항바이러스 활성을 가짐을 시사한다. 또한, 산수유 유래 천연물을 이용한 독감바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 의약품 및 건강기능식품의 개발 가능성을 제시한다.

Keywords 독감바이러스 · 바이러스 사멸활성 · 산수유 · 천연물 · 항바이러스제

감사의 글 이 연구는 2025년도 국립경국대학교 안동형일자리사업단 (2025-0127)과 2025년도 경상북도 지역혁신중심 대학지원체계(RISE) K-U시티 인제양성 및 혁신기술 개발사업의 지원을 받아 수행된 결과입니다(2025-0073-01).

References

- Wu CY, Lin CW, Tsai TI, Lee CD, Chuang HY, Chen JB, Tsai MH, Chen BR, Lo PW, Liu CP, Shivatare VS, Wong CH (2017) Influenza A surface glycosylation and vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 280–285. doi: 10.1073/pnas.1617174114
- Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP (1983) Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 48: 52–60. doi: 10.1128/jvi.48.1.52-60.1983
- Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC (1982) Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296: 115–121. doi: 10.1038/296115a0
- Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, García-Sastre A (2018) Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4: 3. doi: 10.1038/s41572-018-0002-y
- Harrington WN, Kakkos CM, Webby RJ (2021) The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Exp Mol Med* 53: 737–749. doi: 10.1038/s12276-021-00603-0
- Rajaram S, Wojcik R, Moore C, Ortiz de Lejarazu R, de Lusignan S, Montomoli E, Rossi A, Pérez-Rubio A, Trilla A, Baldo V, Jandhyala R, Kassianos G (2020) The impact of candidate influenza virus and egg-based manufacture on vaccine effectiveness: Literature review and expert consensus. *Vaccine* 38: 6047–6056. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.06.021
- Kumar G, Saktharam KA (2024) Tackling influenza A virus by M2 ion channel blockers: Latest progress and limitations. *Eur J Med Chem* 267: 116172. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116172
- Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG (2000) Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 355: 827–835. doi: 10.1016/s0140-6736(99)11433-8
- Hayden FG, Shindo N (2019) Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Curr Opin Infect Dis* 32: 176–186. doi: 10.1097/qco.0000000000000532
- Lampejo T (2020) Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39: 1201–1208. doi: 10.1007/s10096-020-03840-9
- Coughlan L, Neuzil KM (2024) Outpacing antiviral resistance: new treatments for influenza virus infection. *Lancet Infect Dis* 24: 447–449. doi: 10.1016/s1473-3099(23)00820-4

12. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran CT (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 20: 200–216. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z
13. Zhang MM, Qiao Y, Ang EL, Zhao H (2017) Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era. *Expert Opin Drug Discov* 12: 475–487. doi: 10.1080/17460441.2017.1303478
14. Atampugbire G, Adomako EEA, Quaye O (2024) Medicinal plants as effective antiviral agents and their potential benefits. *Nat Prod Commun* 19: 1934578X241282923. doi: 10.1177/1934578x241282923
15. Fujikane A, Fujikane R, Hyuga S, Sechi Y, Hiyoshi T, Sakamoto A, Nishi A, Odaguchi H, Hiromatsu K, Goda Y, Ishino Y, Nabeshima S (2024) Antiviral effect of alkaloids-free Ephedra herb extract on respiratory syncytial virus infection. *Front Pharmacol* 15: 1410470. doi: 10.3389/fphar.2024.1410470
16. Kim Y, Lee S, Kim C, Yoon SW, Jeon S, Kweon MN, Seong BL, Seo SU, Jang YH (2024) Antiviral activity of the water extract and ethanol extract of *Sorbus commixta* against influenza A virus in vitro. *Heliyon* 10: e39049. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e39049
17. Pires ECF, da Silva FP, Schallenberg K, Hermann BS, Mallmann L, Moura WS, Ascêncio SD, Barbosa RDS, Soares IM, Fleck JD, de Oliveira EE, Smaghe G, Ribeiro BM, Aguiar RWS (2024) Antiviral potential of *Chiococca alba* (L.) Hitchc. plant extracts against Chikungunya and Mayaro viruses. *Int J Mol Sci* 25: 11397. doi: 10.3390/ijms252111397
18. Giugliano R, Ferraro V, Chianese A, Della Marca R, Zannella C, Galdiero F, Fasciana TMA, Giammanco A, Salerno A, Cannillo J, Rotondo NP, Lentini G, Cavalluzzi MM, De Filippis A, Galdiero M (2024) Antiviral properties of *Moringa oleifera* leaf extracts against respiratory viruses. *Viruses* 16: 1199. doi: 10.3390/v16081199
19. Hegazy A, Mostafa I, Elshaier Y, Mahmoud SH, Abo Shama NM, Shehata M, Yahya G, Nasr NF, El-Halawany AM, Ali MA, Ali MA, Mraheil MA, El-Shazly AM, Mostafa A (2022) Robust antiviral activity of *Santonica* flower extract (*Artemisia cina*) against avian and human influenza A viruses: In vitro and chemoinformatic studies. *ACS Omega* 7: 41212–41223. doi: 10.1021/acsomega.2c04867
20. Kim S, Kim J, Jang Y (2024) Antiviral activity of organic solvent fractions of *Houttuynia cordata* and *Lespedeza cuneata* against influenza A virus. *J Appl Biol Chem* 67: 215–223. doi: 10.3839/jabc.2024.030
21. Kim S, Kim JW, Lee S, Jang YH (2025) 7,8-dihydroxyflavone and daphnetin have virucidal and neuraminidase inhibition activities against influenza A virus in vitro. *Appl Biol Chem* 68: 21. doi: 10.1186/s13765-025-00998-8
22. Cho S, Lee S, Kim S, Cheong Y, Kim Y, Kim JW, Kim SJ, Seo S, Seo D, Lim J, Jeon S, Jang YH (2022) Preparation of an inactivated influenza vaccine using the ethanol extracts of medical herbs. *J Life Sci* 32: 919–928. doi: 10.5352/JLS.2022.32.12.919
23. Kim S, Kim Y, Kim JW, Hwang Y, Kim SH, Jang YH (2022) Antiviral activity of plant-derived natural products against influenza viruses. *J Life Sci* 32: 375–390. doi: 10.5352/JLS.2022.32.5.375
24. Kim Y, Kim J, Kim K, Cho K, Kwon Y, Jang YH (2025) Cannabis sativa L. (hemp) stem and root extracts manifest antiviral activity against influenza virus through multiple mechanisms in vitro. *J Appl Biol Chem* 68: 334–344. doi: 10.3839/jabc.2025.043
25. Gao X, Liu Y, An Z, Ni J (2021) Active components and pharmacological effects of *Cornus officinalis*: Literature review. *Front Pharmacol* 12: 633447. doi: 10.3389/fphar.2021.633447
26. Yue W, Zhengquan L, Lirong C, Xiaojie X (2006) Antiviral compounds and one new iridoid glycoside from *Cornus officinalis*. *Prog Nat Sci* 16: 142–146. doi: 10.1080/10020070612331343205
27. Song JH, Park K, Shim A, Kwon BE, Ahn JH, Choi YJ, Kim JK, Yeo SG, Yoon K, Ko HJ (2015) Complete sequence analysis and antiviral screening of medicinal plants for human coxsackievirus a16 isolated in Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 6: 52–58. doi: 10.1016/j.phrp.2014.12.004
28. Hsu S (2015) Compounds derived from epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a novel approach to the prevention of viral infections. *Inflamm Allergy Drug Targets* 14: 13–18. doi: 10.2174/1871528114666151022150122
29. de Oliveira A, Adams SD, Lee LH, Murray SR, Hsu SD, Hammond JR, Dickinson D, Chen P, Chu TC (2013) Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. *Food Chem Toxicol* 52: 207–215. doi: 10.1016/j.ft.2012.11.006
30. Calland N, Sahuc ME, Belouzard S, Pène V, Bonnafous P, Meslam AA, Deloison G, Descamps V, Sahpaz S, Wychowski C, Lambert O, Brodin P, Duverlie G, Meuleman P, Rosenberg AR, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K (2015) Polyphenols inhibit hepatitis C virus entry by a new mechanism of action. *J Virol* 89: 10053–10063. doi: 10.1128/jvi.01473-15
31. Lee YH, Jang YH, Byun YH, Cheong Y, Kim P, Lee YJ, Lee YJ, Sung JM, Son A, Lee HM, Lee J, Yang SW, Song JM, Seong BL (2017) Green tea catechin-inactivated viral vaccine platform. *Front Microbiol* 8: 2469. doi: 10.3389/fmicb.2017.02469
32. Park S, Kim JY, Kwon HC, Jang DS, Song YJ (2022) Antiviral activities of ethyl pheophorbides a and b isolated from *Aster pseudoglehnii* against influenza viruses. *Molecules* 28: 41. doi: 10.3390/molecules28010041
33. Kitamura S, Lin TH, Lee CD, Takamura A, Kadam RU, Zhang D, Zhu X, Dada L, Nagai E, Yu W, Yao Y, Sharpless KB, Wilson IA, Wolan DW (2024) Ultrapotent influenza hemagglutinin fusion inhibitors developed through SuFEx-enabled high-throughput medicinal chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 121: e2310677121. doi: 10.1073/pnas.2310677121
34. Chiang HJ, Peng HH, Weng KF, Hsiung KC, Liang CY, Kuo SL, Ojcius DM, Young JD, Shih SR (2024) Mineralo-organic particles inhibit influenza A virus infection by targeting viral hemagglutinin activity. *Nanomedicine* 19: 2375–2390. doi: 10.1080/17435889.2024.2403326