

한약 탕제분획의 항 *Herpes simplex virus* 활성에 관한 연구

강 봉주* · 고 병섭* · 양 기상* · 박 갑주*

Study on The Anti-*HSV (Herpes Simplex Virus)* Activity of Korean Traditional Prescriptions (Herb complexes)

Bong-joon Kang, Byung-seob Ko, Ki-sang Yang and Kap-joon Park

Department of Basic research, Korea Institute of Oriental Medicine

Herpes simplex viruses(HSV) are one of the most common infectious virus of man. Though chemotherapies and antibiotics against HSV have been developed in many countries, but anti-HSV agents were not satisfactory to mankind by their toxic reaction and side effects. In order to search for anti-HSV agents from Korean traditional prescriptions, we extended the number of specimens. Both methanol extract and boiling water extract of the Korean traditional prescriptions were screened to detect anti-HSV activities by MTT assay.

Korean traditional prescriptions showing anti-HSV activities as methanol extracts were Paekyöpsan, Chesüpwilyüngtang, Yongdamsagantang, and prescription 11. Four methanol extracts showing anti-HSV activities were fractionated by hexane and their efficacies were tested. Hexane fractionations of Paekyöpsan, Chesüpwilyüngtang, and prescription 11 showed in anti-HSV activities in tissue culture and their selectivity indexes (SI) were 19.50, 3.32 and 42.90, respectively. Methanol fractionation of Paekyöpsan showed anti-HSV activities and its SI was 1.40. Especially Paekyöpsan showed anti-HSV activities both hexane and methanol fractionation.

【Key words】 Herpes simplex virus, selectivity index, MTT assay

I. 서 론

Herpes simplex virus(이하 HSV)는 전세계에 퍼져 있으며 사람에게만 자연 감염한다. 직접적인 접촉으로 전파되지만 1형은 대부분이 구강분비물에 의하여 전파되고 2형은 대부분이 생식기분비물에 의하여 전파된다. 사람 HSV는 감기, 비노생식기 감염, 구순, 각막염, 뇌염(성인), 신생아 감염, 자궁경부암, AIDS의 2차 기회감염등의 원인이

* 한국한의학연구소 기초연구부

되고 있다^{1),2)}. virus보유율은 건강성인의 0.65~15% (HSV 1형 및 2형)이지만 항체보유율은 연령이나 환경 등에 따라서 차이가 많고 사회경제적 여건이 나쁜 성인은 80~100%이고 좋은 환경에서 생활하는 사람은 30~50%이다(미국). 1979년에 국내에서 실시된 한 조사에 의하면 한국인(일류 종합병원환자)에서는 5세미만이 약 40%, 20세가 넘으면 약 80%가 양성이었다. 계절별 또는 성별인 차이는 없지만 연령별인 항체양성은 HSV-1은 소아기에 급격히 증가하고 사회경제적 여건이 나쁜 집단에서는 20세까지는 거의 전부가 양성이고 HSV-2항체는 성별과 비슷하며 14~29세에 증가한다. 직업으로는 1형은 치과 의사, 호흡보조기구 취급자, 레슬링선수 등이 잘 감염되고 HSV-2는 매춘부나 동성애자에게 많다. 재발은 항체가 있어도 생기며 입술이나 입둘레에 병소가 생기는 환자는 전인구의 20~40%에 달한다. 재발의 유인으로는 태양광선, 발열, 국소외상, 월경, 정신적 충격 등이 열거되고 있지만 이유는 불분명하다³⁾.

이와 같은 임상적인 중요성을 가지는 바이러스감염증에 대한 의학적인 대처 방법으로 숙주에는 영향을 주지 않고 바이러스의 증식을 선택적으로 억제시키는 항바이러스제 개발이 요구되고 있다. 이것은 세균감염을 치료할 수 있는 항생제의 개발과 같은 측면의 시도라 할 수 있다. 그러나 지금까지의 항바이러스제 개발 성과는 세균에 대한 항생제의 개발과 비교해 볼 때 매우 미흡한 실정이다. 따라서 현재까지 개발된 항바이러스제로는 바이러스가 감염된 세포에서 바이러스의 핵산 복제가 빨리 진행된다는 점을 이용하여 이를 억제시키는 nucleoside analogue가 주종을 이루고 있다. Iododeoxyuridine이나 trifluothymidine등이 이와 같은 nucleoside analogue인데 이들이 가지는 핵산복제 억제능은 정상적인 숙주세포에도 나타나므로 이러한 약물은 국소적으로만 사용되고 있다^{4),5)}.

현재 항 Herpes simplex virus(HSV) 물질로 특히 주목을 받고 있는 것은 nucleoside analogue 계열이 많이 연구되어, 그중 Acyclovir와 Vidarabin이 FDA의 승인을 얻어 치료제로 사용되고 있다^{6),7),8)}. 현재 사용되고 있는 항 HSV 제제의 문제점은 불완전한 치료효과와 장기간 투여에 따른 부작용, 그리고 여러 종류의 약재내성 바이러스가 나타나는 점이다⁹⁾⁻¹⁴⁾. 또한 이와같은 nucleoside analogue는 그 기전상의 특징 때문에 잠복감염된 바이러스에는 효과가 없다. 따라서 이러한 문제들을 해결하기 위해서 HSV 치료제의 개발에 집중적인 연구가 요구된다.

천연물(주로 식물)에서 생합성 할 수 있는 물질은 인위적으로 실험실내에서 합성할 수 있는 물질과 비교 할 수 없을 정도로 다양하다. 실제로 morphine, strychnine, emetine, quinine, nicotine, cardiac glycosides, vinca alkanoids등 의약학 분야의 발전에 지대한 공헌을 한 물질들이 천연물로부터 추출한 물질들이었다. 국내에서도 천연물의 약리적인 효능에 대해서 다양한 연구가 진행되었으나 항바이러스 활성에 대한 보고는 아직까지 없었다.

이에 본 연구에서는 전통적인 생약, 한약재제에서 항바이러스성물질을 screening하여 1차년도에 항바이러스 활성을 갖는 몇 가지 추출물을 얻을 수 있었다. 이에 2차년도에는 이들 추출물중 methanol추출물에 대해 극성별로 분획을 나누어 항바이러스 활성 실험을 실시했다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 바이러스

본 연구에 사용된 바이러스는 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양 받은 *Herpes simplex virus type 1 strain F*(American type culture collection, ATCC VR-733, Rockville, MD)사용했다.

1-2. 숙주세포와 세포배양액

본 실험에 사용된 *H. simplex* 1형에 대한 숙주세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)를 사용하였고, Vero 세포의 배양액은 Eagle's minimum essential medium(MEM)에 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, AY, USA), 0.22 % sodium bicarbonate(Sigma, St Louis, MO, USA)와 50 µg/ml의 gentamicin(Gibco)을 첨가하여 사용하였고 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위하여서는 5 % FBS가 함유된 배지를 사용하였다.

1-3 한약제 시료

생약은 동의보감 및 중의외과, 한방외과, 중의임증을 기초로 하여 한약 도매시장에서 구입하였다. 시료는 원전의 처방대로 조제하여 탕제를 만들어 methanol로 추출한 후, 탕제에 500ml의 80% methanol를 가하여 60°C 수조에서 18시간 이상 침적하여 추출하였고, 각 시료에서 추출된 methanol 용액은 여과하여 evaporator로 농축하고 filter (pore size 0.2 µm)로 여과하여 lyophilization 하여 활성이 나타난 시료에 대하여 극성, 비극성에 따른 분획을 나누어 실험했다.

Table 1. Korean prescriptions tested for anti-HSV activity.

Number of specimen	Name
CM3	Paekyöpsan
CM4	Chesüpwilyüngtang
CM6	Yongdamsagantang
CM11	prescription 11

2. 실험방법

2-1. 세포배양

Vero 세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(25 cm²)에 0.2 % sodium bicarbonate, 10 % fetal bovine serum과 gentamicin(50 µg/ml)을 첨가한 MEM을 넣어 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 세포단층(monolayer)이 될 때까지 배양하였다. Vero 세포를 계대 배양 하기 위해서는 조직배양용 플라스크(75 cm²)에 배양한 세포를 phosphate-buffered

saline (PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크(75 cm²)에 1 : 3 으로 분주하여 10 % MEM을 첨가하여 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에 배양하였다.

2-2. *H. simplex* 1형 바이러스의 감염 및 증식

H. simplex 1형 바이러스의 stock을 얻기 위해 액체질소에 보관중인 *H. simplex* 1형 바이러스 strain F를 37 °C 수조에 녹여 완전히 자란 단층 Vero 세포가 든 25 cm² 플라스크에 0.01~0.1 M.O.I(multiplication of infection) 되도록 감염시킨 후 37°C에서 1 시간 동안 흡착시키고 2% 유지배지로 갈아준 다음, 7~8일 후 -70°C에 얼린 뒤 37°C에 녹여 초음파로 파쇄함으로써 바이러스를 얻었다. 이렇게 얻은 바이러스 stock을 1 또는 2 ml씩 나누어 -70 °C에 보관하고 바이러스가 필요할 때마다 37°C에서 녹여 사용하였다.

H. simplex 1형 바이러스의 증식을 위해서는 세포단층을 이룬 조직배양용 플라스크(75 cm²)에 0.1~0.01 M.O.I 되게 바이러스를 감염하여 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 한 시간동안 흡착시켜 2% MEM 배지를 첨가한 후 3~5일 동안 37°C, 5 % CO₂ 항온기에서 배양하면서 세포변성을 도립 현미경으로 관찰하고 바이러스의 증식에 의해 세포가 완전히 플라스크로부터 박리 되어 나온 것을 확인하였다.

2-3. *H. simplex* 1형 바이러스의 plaque assay 및 titer 결정

Plaque assay방법은 vero 세포를 60 x 15 mm 세포 배양용 dish에 2 x 10⁵ cell/ml되게 분주하여 세포가 confluent가 될 때까지 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 완전히 PBS를 제거하였다. 바이러스원액은 PBS로 10배씩 계단희석하여 각각 100 μl씩 세포가 배양된 dish에 감염시켜 37 °C 5 % CO₂ 항온기에서 한 시간동안 흡착시켰다. 흡착되지 않은 바이러스를 제거한 후 5 % agarose와 5 % MEM을 1 : 4 비율로 섞은 배지를 각 dish 당 5 ml 씩 분주하여 완전히 굳힌 후 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 4일간 배양하면서 현미경하에서 계속 관찰한다. 4일 후 5 % formaldehyde 용액으로 세포를 고정한 후, crystal violet (2.6 %)로 5분 동안 염색시킨 후 나타난 플라크 수를 계산하여 바이러스 titer를 결정하였다.

2-4. Vero 세포에 대한 시료의 세포독성 결정

시료에 의한 세포독성은 시료별로 5배 계단희석하여(원액, 5⁻¹, 5⁻², 5⁻³ ………) well 당 2.0 × 10³개의 vero 세포가 배양되어 있는 96 well plate에 각각 첨가한 다음 37 °C, 5 % CO₂ 보습 인큐베이터에서 3 일간 배양하고 MTT assay로 50 % cytotoxic dose(CD₅₀)를 산출하였다.

2-5. HSV 감염과 약제의 활성 평가

Vero 세포를 2.0×10³ cells/well로 조절하고 여기에 0.1 M.O.I의 HSV를 첨가한 후 각 시료를 농도별로 5배 계단희석하였다. 이것을 96 well plate에 0.1 ml씩 분주하여 5 % CO₂가 유지된 37 °C 보습 인큐베이터에서 3일간 배양하였다. 시료의 항 HSV 활성은 MTT assay로 평가하였고, control drug으로는 Acyclovir (Acycloguanosin, Sigma)를 사용하였다.

2-6. MTT 검색법(Tetrazolium-based colorimetric assay)

MTT검색법은 생존 세포내의 효소작용에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-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 실험조작의 자동화가 가능하고 실험 결과의 재현성과 객관성도 우수하여 대량검색이나 1차검색에 적합하다^{14),15),16),17)}.

2-6-1. 단일세포 부유액(single cell suspension)의 준비

부유성 세포인 경우에는 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻는다. 부착성 세포인 경우에는 trypsin을 3분간 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 배양용 배지용액(culture media, MEM에 10 % FBS첨가)로 중화시킨 후 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻는다. 이 부유액을 hemocytometer로 세포밀도(number of cells/ml)를 측정한다.

2-6-2. 예비실험(적정 접종세포수의 결정)

본 실험에 앞서 각 세포주마다 MTT assay에 사용할 각 well의 적정 접종세포수(optimal seeding density)를 결정한다. 이 세포수는 약물 처리하지 않은 대조군에서 세포접종 당시와 4일후 MTT 실험종료시에도 세포가 활발히 증식하면서 OD540가 충분히 높은값을 나타낼 수 있는 최적의 접종(seeding)세포수로 대개 number of cells/well로 나타낸다. 이 세포수를 결정하기 위해 한 well당 $1 \sim 100 \times 10^3$ 개의 범위에서 몇 가지 세포밀도로 96 well plate에 접종하고 약제나 검체 대신 PBS만을 가해주어 4일간 배양한 후 아래에 기술된 MTT assay의 과정을 동일하게 시행해 준다. 실험종료시 흡광도(test wavelength 540nm, reference wavelength 690nm)를 측정하여 가장 적당한 세포밀도를 결정한 후 실험에 이용한다.

2-6-3. 세포 접종, 검체 투여 및 배양

예비실험에서 결정된 적정 수의 세포를 100 μ l의 배지에 부유시켜 96 well plate의 각 well에 동일하게 접종한다. 한약추출물이나 분획의 용액을 HSV를 포함하고 있는 2 % FBS 배지에 섞어 5배 계단희석하여 25 μ l씩 well에 첨가한다. 투여가 끝난 plate는 37 °C, 5 % CO₂ 하에서 4일간 배양한다.

2-6-4. 생존 세포수의 측정

4일간 배양한 후, 현미경으로 관찰하여 각 well에서의 세포상태를 관찰하여 체크하고, plate의 각 well에 0.1 mg(50 μ l of 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37 °C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 한다. 배양 종료시 각 well에 배지를 제거하고 100 μ l의 solubilization solution(DMSO)을 첨가하여 기형성된 질은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인 후에 ELISA plate reader(Molecular devices)로 흡광도(test wavelength 540 nm, reference wavelength 690 nm)를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 생존세포수를 의미한다.

시료의 항HSV활성평가는 HSV에 감염된 세포군 및 비감염 대조 세포군의 흡광도를 기준으로 억제 정도를 측정 한 후 결정하였다.

2-6-5. 결과 분석

시험군에서 각 well로부터 한 컬럼의 평균 OD 540값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율을 산출한다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. ED₅₀과 CD₅₀, SI 값을 항바이러스효과의 지표로 사용한다.

2-7. 분획실험에 의한 항 HSV 활성평가

Methanol을 사용하여 crude하게 추출한 물질에 대하여 항 HSV활성을 검색한 결과 효능이 나타난 후보물질에 대해 활성성분을 추적하기 위하여 용매의 극성에 따른 용해도 차이를 이용한 분획을 실시하였다. Methanol에 의한 crude extract를 소량의 methanol에 녹인 후 separation funnel을 이용하여 methanol 2배 부피의 hexane을 넣어서 hexane층과 methanol층으로 나누고, hexane층을 포화식염수로 세척 후 무수 MgSO₄로 건조하여, 여과 후 농축하였다. Methanol층은 농축 후 감압건조하였고 methanol층과 hexane층의 용매를 완전히 제거하기 위해 데시케이터에서 3일정도 감압 건조하여 시료로 항 HSV assay를 실시하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 시료가 투여된 Vero 세포의 관찰

Vero 세포에 대한 시료의 효과를 관찰하기 위하여 시료를 농도별로 Vero 세포(2.0×10^3 cells/well)에 첨가한 후 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양하여, 날짜별로 현미경으로 관찰하였다. 바이러스에 감염 후 72시간이 지난 뒤에 바이러스에 감염되지 않은 세포는 well 바닥에 정상세포와 같이 fibroblast(섬유아세포)상태로 자랐고, 약제가 투여되지 않고 바이러스에 감염된 세포는 모두 CPE (cytopathic effect)를 나타내어 동그란 세포형태를 이루어 더 이상 정상적인 세포기능(증식)을 할 수 없는 상태가 되었다. 그러나 시료를 투여한 세포군에서 효과가 있는 농도영역에서 세포형태는 일부 세포가 CPE를 나타내고 있지만 정상세포와 같은 fibroblast상태를 이루고 있는 것으로 보아 투여된 시료가 항바이러스 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다(Figure 1).

2. 시료의 Vero 세포에 대한 세포독성 시험

시료의 Vero 세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 시료를 농도별로 Vero 세포(2.0×10^3 cells/well)에 첨가한 후 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 3일간 배양 후, MTT assay로 살아 있는 세포에 의한 formazan 생성율을 측정하여 시료의 세포독성 시험결과를 비교하였다.

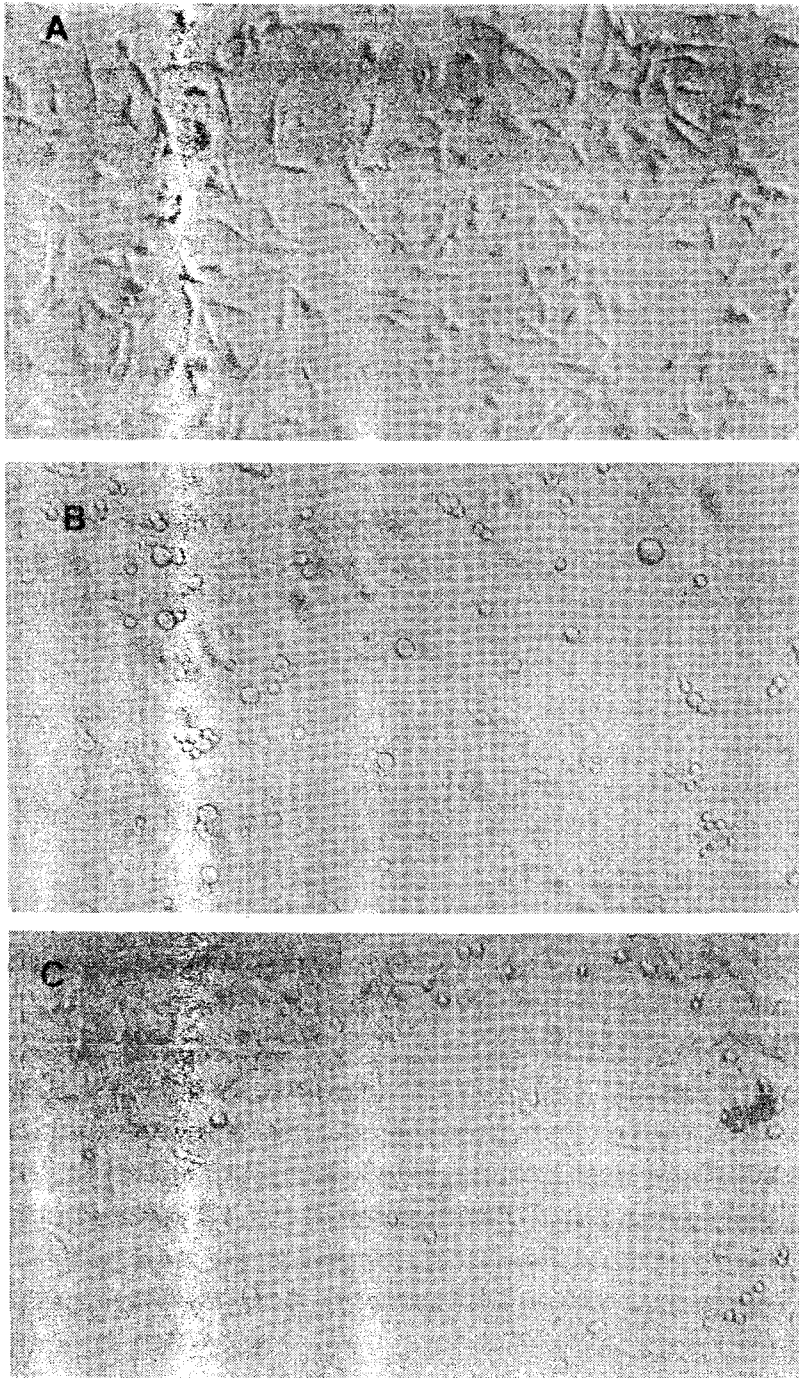


Figure 1. Korean traditional prescription (Paekyöpsan) treated culture of Vero cells infected with HSV. A: normal Vero cell culture, B: the cells infected with HSV, C: Paekyöpsan treated culture of Vero cells infected with HSV.

Table 2에 나타낸 바와 같이 시료의 투여 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 hexane층의 CM3번이 가장 독성이 강했고 CM4번이 가장 독성이 낮았다. 낮은 농도(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 hexane층의 시료들이 모두 시료가 투여되지 않은 control보다 작게는 1.25배, 크게는 1.52배 세포들이 증가됨을 볼 수 있었다. 이 결과 투여된 시료가 적정농도(10~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 세포를 활성화시키는 것으로 추정해 볼 수 있다. 그러나 methanol층의 CM3시료는 세포활성이 보이지 않았고, positive control인 acyclovir에서도 세포활성 증가가 나타나지 않았다.

Table 2. Viability test of Vero cells on Korean traditional prescriptions by MTT assay

No. of specimens	viability(%)			
	50	10	1	0.1
Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
methanol fractionation				
CM3	63.3	95.5	97.8	94.1
Hexane fractionation				
CM3	23.9	69.0	119.1	125.0
CM4	84.5	132.8	155.8	137.7
CM11	78.3	92.1	137.6	152.4
(control)				
acyclovir	63.4	79.6	90.4	87.1

3. 시료의 항 HSV 활성

각 시료의 항 HSV활성을 MTT assay로 검색하였다. 검색시료는 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 1차년도 실험에서 활성이 나타난 시료에 대하여 hexane을 용매로 하여 극성, 비극성으로 분획을 나누어 실험에 사용했다. 각 시료의 항 HSV 활성검색을 한 결과, Table 3에서 보는바와 같이 CM3, CM4, CM11의 hexane층에서 활성을 나타내었고, 특히 CM3는 methanol층에서도 작지만 활성을 보였다. CM6에서는 crude methanol 추출상태에서는 항 HSV 활성을 보였지만 극성과 비극성으로 분획되면서 활성이 사라졌다. 이것은 활성물질이 양쪽으로 나누어지면서 활성이 떨어졌다고 사료된다. CM3, CM4, CM11에서 활성이 42.9에서 140으로 acyclovir의 21,058이상보다 낮지만 단일 물질이 아니고 여러 가지 물질의 혼합물이기 때문에 보다 특이적으로 HSV에 대해 억제 작용을 하는 물질을 분리 할 수 있을 것으로 기대된다. methanol분획과 hexane분획의 세포독성 및 항 HSV활성 그래프를 Figure 2 - 6 에 나타내었다.

Table 3. Inhibitory effects of Korean traditional prescriptions against HSV type 1

No. of specimens	anti- HSV-1 activity		
	ED ₅₀ (μg/ml)	CD ₅₀ (μg/ml)	SI
methanol fractionation			
CM3	49.797	70.195	1.40
Hexane fractionation			
CM3	6.373	124.335	19.50
CM4	23.004	76.479	3.32
CM11	0.467	20.036	42.90
(control) acyclovir	> 0.00419	88.237	< 21,058

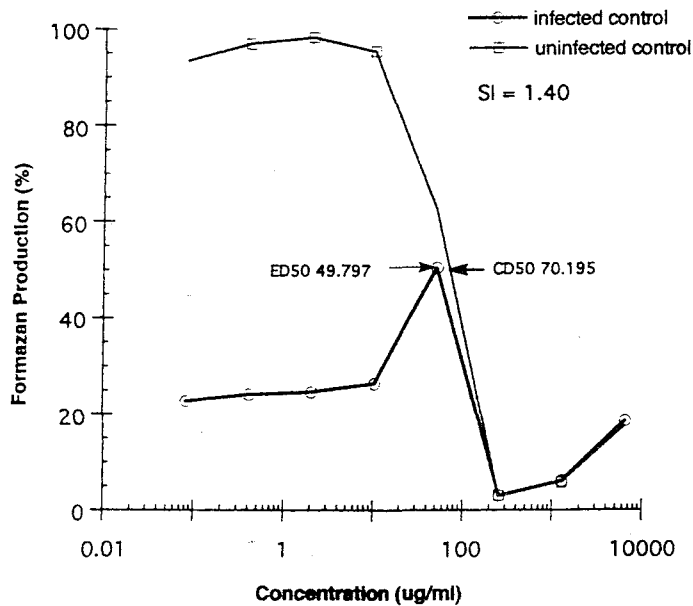


Figure 2. Quantitation of MTT formazan production in methanol fractionation of Paekyöpsan treated culture of Vero cells. ED₅₀ means 50% effective dose of formazan formation, CD₅₀ means 50% cytotoxic dose in Vero cells and SI means selectivity index. Symbols: control infected with *Herpes simplex virus* (○); control uninfected with *Herpes simplex virus* (□).

$$SI(\text{selectivity index}) = \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in Vero cells}(CD_{50})}{50\% \text{ Effective dose of formazan formation}(ED_{50})}$$

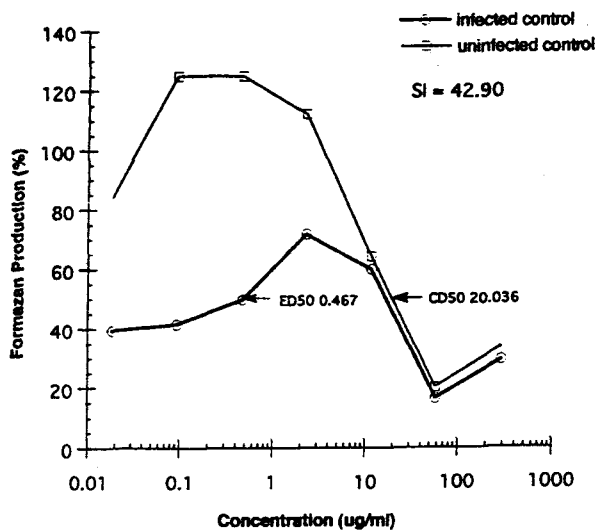


Figure 3. Quantitation of MTT formazan production in hexane fractionation of Paekyöpsan treated culture of Vero cells. ED₅₀ means 50% effective dose of formazan formation, CD₅₀ means 50% cytotoxic dose in Vero cells and SI means selectivity index. Symbols: control infected with *Herpes simplex* virus (○); control uninfected with *Herpes simplex* virus (□).

$$SI(\text{selectivity index}) = \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in Vero cells}(CD_{50})}{50\% \text{ Effective dose of formazan formation}(ED_{50})}$$

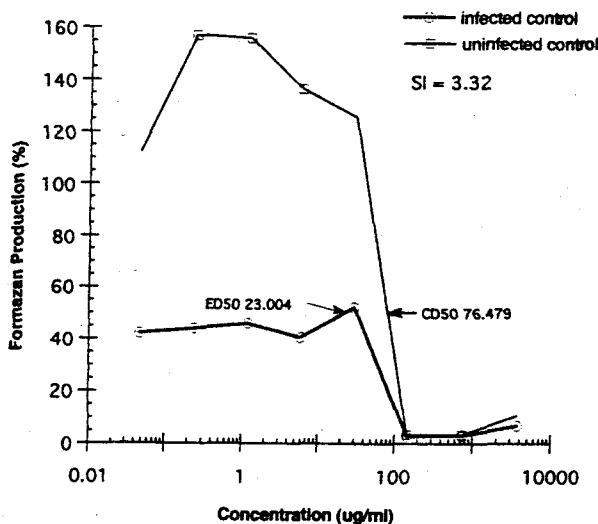


Figure 4. Quantitation of MTT formazan production in hexane fractionation of Chesüpwilyüngtang treated culture of Vero cells. ED₅₀ means 50% effective dose of formazan formation, CD₅₀ means 50% cytotoxic dose in Vero cells and SI means selectivity index. Symbols: control infected with *Herpes simplex* virus(○); control uninfected with *Herpes simplex* virus(□).

$$SI(\text{selectivity index}) = \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in Vero cells}(CD_{50})}{50\% \text{ Effective dose of formazan formation}(ED_{50})}$$

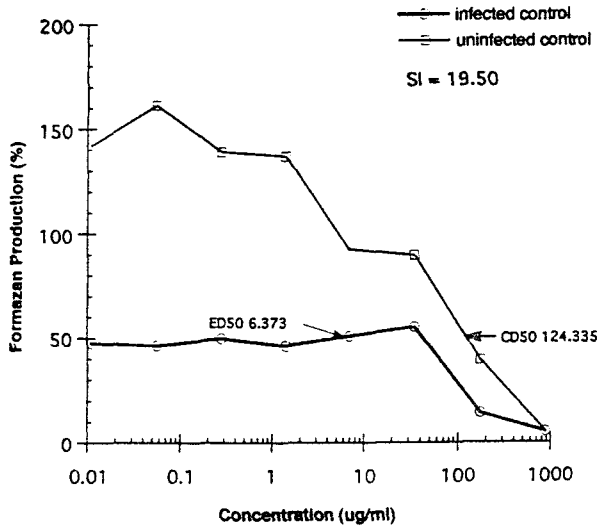


Figure 5. Quantitation of MTT formazan production in hexane fractionation of prescription 11 treated culture of Vero cells. ED₅₀ means 50% effective dose of formazan formation, CD₅₀ means 50% cytotoxic dose in Vero cells and SI means selectivity index. Symbols: control infected with *Herpes simplex* virus (○); control uninfected with *Herpes simplex* virus (□).

$$SI(\text{selectivity index}) = \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in Vero cells}(CD_{50})}{50\% \text{ Effective dose of formazan formation}(ED_{50})}$$

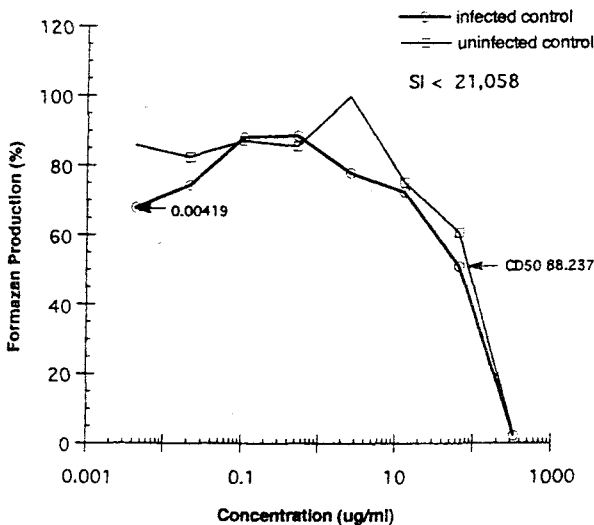


Figure 6. Quantitation of MTT formazan production in acyclovir treated culture of Vero cells. ED₅₀ means 50% effective dose of formazan formation, CD₅₀ means 50% cytotoxic dose in Vero cells and SI means selectivity index. Symbols: control infected with *Herpes simplex* virus (○); control uninfected with *Herpes simplex* virus (□).

$$SI(\text{selectivity index}) = \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in Vero cells}(CD_{50})}{50\% \text{ Effective dose of formazan formation}(ED_{50})}$$

참고문헌

1. Hill, T. J. 1985. Herpes simplex virus latency. In: *The Herpesviruses*, Vol. 3, B. Roizman, pp. 175-240. *New York : Plenum Press*.
2. Nelson, J. A., Ghazal, P., and Wiley, C. A. 1990. Role of opportunistic viral infections in AIDS. *ADIS* 4:1-10.
3. 정희영, 전종휘. 『감염질환』. 서울:수문사, 1987: 580-588.
4. Kaufman H. E., Martola E. L., Dohlman C. I. 1962. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUD) intreatment of herpes simplex virus keratitis. *Arch. Opthamol.* 68:235-239.
5. Coster D. J., Jones B. R., McGill J.J. 1979. Treatment of amoeboid herpetic ulcer swith adenine arabinose or trifluorothymidine. *Br. J. Opthamol.* 63:418-421.
6. Prusoff, W. H., Lin, T-S., and Zucker, M. 1986. Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Reseach* 6:311-328.
7. De Clercq, E. 1990. New acquisition in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52:69-99.
8. Dorsky, D. I., and Crumpacker, C. S. 1987. Drugs five years later: acyclovir. *Ann. Intern. Med.* 107:859-874.
9. Douglas, J. M., Critchlow, C., and Bennedetti, J. 1984. A double-blind study of oral acyclovior for suppression of genital herpes simplex virus infection. *New England Journal of Medicin* 52: 154- 163.
10. Straus, S. E., Rakiff, H. E., and Seidlin, M. 1984. Suppression of frequently recurring genital herpes: a placebo-controlled, double bind trial of oral acyclovir. *New England Journal of Medicin* 310:1545.
11. Chatis, P. A. and Crumpacker, C. S. 1992. Minireview: Resistance of herpesvirus es to antiviral drugs. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 36:1589-1595.
12. McLaren, C., Chen, M. S., Ghazzouli, I., Saral, R., and Burn, W. H. 1985. Drug registance patterns of herpes simplex virus isolates from patients treated with acyclovir. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 28:740-744.
13. Wade, J. C., McLaren, C., and Meyers, J. D. 1983. Frequency and significance of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolated from marrow transplant patients receiving multiple courses of treatment with acyclovir. *The Journal of Infectious Diseases* 148:1077-1082.
14. Kriebel, B. F., Rudy, D. W., Glick, M. R., and Clayman, M. D. 1993. Case Report: Acyclovir neurotoxicity and nephrotoxicity-The role for hemodialysis. *The American Journal of The Medical Sciences* 305:36-39.

15. Sudo, K., Konno, K., Yokota, T., and Shigeta S. 1994. A sensitive assay system screening antiviral compound against herpes simplex virus type 1 and type 2. *J. of virol. Method* 49:169-178.
16. Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., et al. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HSV compounds. *J. of virol. Methods* 20:309-321.
17. Bergamini, A., Perno, C. F., Capozzi, M., Mannella, E., et al. 1992. A tetrazolium-based colorimetric assay for quantification of HIV-1-induced cytopathogenicity in monocyte-macrophages exposed to macrophage colony-stimulating factor. *J. of virol. methods* 40:275-286.