응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology 6, 139-144(1998)

여우주머니(*Phyllanthus ussuriensis*) 추출물의 B형 간염바이러스 증식 억제

김철영 · 김정민[1] · 김태균[2] · 김승희[2] · 허 훈*
서울대학교 약학대학, [1]LG Biotech, [2]식품의약품안전청

Inhibition of HBV Replication by the Extract of *Phyllanthus ussuriensis*

Chul Young Kim, Jeong-Min Kim[1], Tae Gyun Kim[2], Seung Hee Kim[2] and Hoon Huh*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[1]LG Biotech Research Institute, Taejon 305-380, Korea
[2]Korea Food and Drug Administration, Seoul 120-704, Korea

(Received December 14, 1997; accepted June 1, 1998)

Abstract – *Phyllanthus ussuriensis* which belongs to Euphorbiaccae has been used as a component of Korean traditional remedy against hepatitis and jaundice. Aqueous methanolic extract of *P. ussuriensis* was tested for antiviral activity of hepatitis B virus (HBV) in HepG2 2.2.15 cells which were derived through transfection of cloned HBV DNA into HepG2 human hepatoblastoma cells. *P. ussuriensis* extract decreased the levels of extracellular HBV virion DNA and inhibited HBV replication at concentrations ranging from 50 to 500 μg/ml. Partitioning of water suspension of the extract revealed that the activity mainly resides in the EtOAc fraction. Consecutive purification of the EtOAc fraction by silica-gel column chromatography resulted in the two active anti-HBV fractions. Southern blot analysis shows that the action mechanisms or active site of the two fractions seems to be different in terms of their inhibition of HBV replication steps.

Keywords□ *Phyllanthus ussuriensis*, Euphorbiaceae, anti-hepatitis B virus (HBV) activity, HepG2 2.2.15

간장질환은 바이러스, 약물의 오남용에 의한 독성 등 다양한 원인에 의하여 간염의 형태로 발병하고 완전히 치유되지 않은 경우에 만성 간염으로 이행하여 결국에는 간경변이나 간암으로 진행되어 죽음에 이르게 되는 심각한 질환이다. 또한 간장 질환은 우리 나라 40대 남성의 사망원인의 20%를 차지하여 가장 높은 사망률을 나타내는 등 70년대 후반부터 계속 늘어나는 추세이며 1993년에는 인구 10만명당 980명의 이환율을 나타낼 정도로 전국민의 건강을 위협하고 있다. 특히 사회적으로 중요한 위치를 차지하는 중장년 층에 발병하여 개인의 사회적 노동력을 무력화시키는 동시에 많은 치료비 지출이 부수되므로 사회 · 경제적으로 막대한 손실을 유발하기 때문에 새로운 간장질환 치료제 개발의 필요성과 중요성이 더욱 커지고 있다. 간장질환의 증가는 세계적인 추세이나 그 치료제로는 B형 간염 백신이 개발되어 있을 뿐 뚜렷한 개발품이 없는 실정이다. 더구나 다수의 시판품도 그 치료 목적이 간세포 보호제에 그치는 등 한계를 보이고 있다.

간세포 보호 및 치료제의 개발 동향을 보면 *Sylium marianum*과 *Schizandra chinensis* 등에서 추출한 추출물 혹은 추출성분의 유도체등이 간장질환 치료제로 시판되고 있으며 *Curcuma aromatica, Scutellaria baicalensis, Artemisia capillaris, Epimedium koreanum* 및 *Lycium chinense* 등의 성분이 간장 보호제로 보고되고 있는 등 다수의 생약재로부터 다양한 성분이 분리되어 그 개발 가능성을 크게 하고 있다. 이상 열거한 식물 유래의 성분들은 주로 간장질환의 예방이 주된 치료 목적이며 간세포로부터 각종 효소의 유리를 억제 내지는 차단하는 효과를 가진 성분이어서 바이러스의 증식이나 복제를 차단하여 궁극적으로 바이러스를 환자의 신체에서 제거하는 약리 작용을 나타내는 것은 아니었다.

*P. amarus*를 비롯한 *Phyllanthus* 속의 1년생 초본들은 인도, 파라과이, 동남아시아를 포함한 열대 지역에서 전통적인 의약 혹은 의약품의 원료로서 널리 쓰였고 그 효과가 보고되어 왔다(Unander 등, 1990; 1991). 최근에 이 속 식물인

* To whom correspondence should be addressed.

일년생 초본 *P. amarus* Schum & Thonn가 hepatitis B와, 관련 동물 virus에 대해 *in vivo* 혹은 *in vitro*에서 강한 효과가 있다는 사실이 보고되면서(Venkateswaren 등, 1987) 이 식물에 대한 흥미가 고조되고 연구에 박차를 가하게 되었다. *P. amarus*는 또한 retrovirus의 reverse transcriptase에 대해 *in vitro* activity가 있다고 보고 되었으며 그 활성성분은 polyphenolic compounds의 일종인 repandusinic acid로 동정 보고 되었다(Ogata 등, 1992). *P. amarus*는 또 혈관 축소작용으로 고혈압을 일으키는 물질로 알려진 angiotensin II를 생성하는데 관여하는 angiotensin converting enzyme을 저해하는 몇 가지 phenolic compound를 함유하고 있는 것으로 밝혀졌으며(Ueno 등, 1988) 당뇨병 환자에게서 흔히 안압상승에 관여하는 것으로 알려진 aldose reductase 저해작용이 있는 몇 가지 화합물도 분리되었다(Shimizu 등, 1989). 이러한 다양한 생리활성은 이 식물이 함유하고 있는 것으로 알려진 alkaloids, lignans(Somanabandhu 등, 1993; Singh 등, 1989), triterpenes(Tanaka 등, 1993) 중 주로 lignan류를 위시한 phenolic compound에 의한 것으로 여겨지고 있다. 이런 다양한 *P. amarus*의 생리활성 가운데 가장 많은 관심을 끌고 있으며 널리 연구된 것이 이 식물의 추출액의 hepatitis B virus를 포함한 동물 virus에 대한 저지활성이다.

1987년 Venkateswaran 등이 *P. amarus*(그 당시는 *P. niruri*로 불리워짐)의 수침 추출물이 인간의 hepatitis B 및 Woodchuck hepatitis virus의 DNA polymerase를 저해하는 활성이 있다는 것을 밝힌 이래로(Venkateswaran 등, 1987) *in vivo*에서도 이 추출물의 효과가 확인되었다(Thyagarajan 등, 1988). 그러나 이러한 *in vivo* activity는 더 깊이 연구되어야 할 과제로 남아 있지만 현재까지의 *in vitro*실험 결과는 이 식물이 급 · 만성 hepatitis B의 치료효과를 가진 화합물을 함유하고 있음을 강력히 시사하고 있다. 더구나 이 식물이 retrovirus의 reverse transcriptase 저해작용을 가진 물질을 함유하고 있다는 사실은 현재 그 치료에 큰 어려움을 겪고 있는 후천성 면역 결핍증(AIDS) 치료제 개발에 한 가능성을 제시하고 있다고 보이며 따라서 간염이나 AIDS 등 virus성 질환의 치료제 개발 대상으로서 이 식물은 높이 평가될 수 있다고 여겨진다. 한편 *P. amarus*와 동 속의 유사한 종에서도 *in vitro* activity는 널리 보고되어 있으므로 이 속 식물에 대한 anti-hepatotoxic activity 및 antiviral activity screening은 꼭 필요한 것으로 여겨진다.

우리 나라에는 *Phyllanthus* 속 식물이 2종 존재하는데 그 중 여우주머니(*P. ussuriensis* Rupr et Maxim)는 일년생 초본식물로서 우리 나라 각처의 풀밭이나 밭둑에서 흔히 자라므로 쉽게 관찰할 수 있다(이창복, 1985). 여우구슬(*P. urinaria* L.)은 여우주머니와 유사한 토양에서 자라며 1년생 초본으로 전국 각지에 분포하는 것으로 알려져 있다. 이들 2종의 초본식물들은 주위에 널리 분포하나 식물 화학적 성분연구나 약리학적인 연구가 되어있지 않아 자원식물로는 주목받지 못하고 있는 실정이다. 따라서 우리는 이들 2종 국산 *Phyllanthus* 속 식물로부터 B 형 간염 바이러스에 대한 활성을 가진 화합물을 추출 분리하기 위한 실험을 통하여, *n*-hexane 추출물이 galactosamine에 의한 독성을 유발한 일차 배양세포(Kiso 등, 1983)에 대해 GPT 유리 억제 작용이 있음을 확인하였다(문 등, 1995). 또한 이 *n*-hexane 추출물을 포함한 유기용매추출물의 B 형 간염 바이러스에 대한 작용을 확인하기 위해 B 형 간염 바이러스의 숙주세포인 HepG 2.2.15세포를 이용하여 바이러스의 DNA복제 억제 작용을 확인하였으며 일부 추출물에서 유의한 활성이 확인되어 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시료식물의 채취 및 추출

실험에 사용된 여우주머니(*P. ussuriensis*, Euphorbiaceae)는 서울대학교 한 대석 명예교수의 감정을 받아 광릉수목원, 서울대학교 관악교정 등지에서 8월 중순에 채취하여 뿌리를 제거한 후 음건하여 사용하고 이를 80% MeOH로 3시간 동안 3회 초음파 추출하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이를 물에 현탁시켜서 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH로 연속적으로 분획하여 활성 측정에 사용하였다. 활성검색을 실시하여 가장 활성이 좋았던 EtOAc분획을 이동상 $CHCl_3$: MeOH : H_2O로 실리카겔 컬럼 크로마토그라피를 실시하여 다시 8개의 소분획으로 나누었다. 이에 대하여 활성을 검색하였다(Fig. 1).

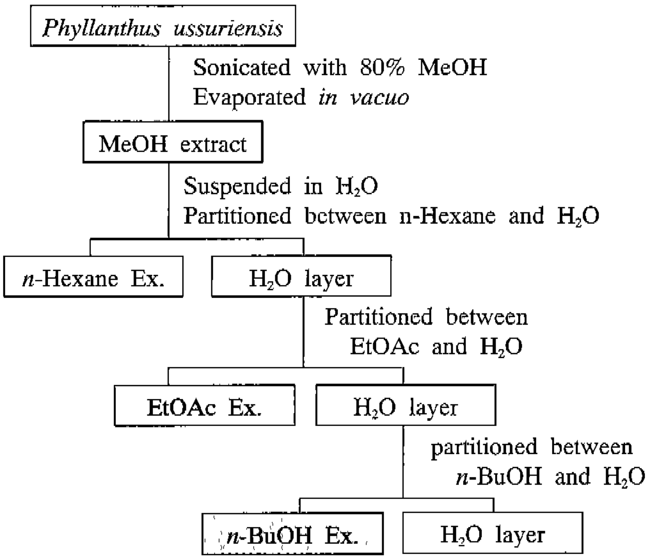

Fig. 1. Extraction and fractionation scheme of *P. ussuriensis*.

세포주 확보 및 배양

실험에 사용한 세포주는 HepG2 2.2.15이며 이는 인간의 간암세포주 HepG2에 HBV 게놈을 도입(stable transfection)하여 in vitro에서 HBV가 복제, 증식되며 이를 이용한 항바이러스 약효 검색 시스템이 개발되었다. 세포주는 개발자인 미국의 Georgetown대학 의과대학 Korba교수로부터 분양받았으며, 도착 즉시 해동하여 5 mM HEPES, 5% fetal bovine serum(FBS), 330 mg/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였으며 증식된 세포는 trypsin 용액을 처리하여 계대하였다. 몇 번의 증식과 계대를 거친 세포는 냉동배지(10% DMSO, 90% FBS)에 부유시킨 후 냉동용 vial에 담아서 액체질소통에 보관하였으며 이들을 항 HBV 바이러스 효능 검색실험에 사용하였다.

HBV 유전자 탐침

"adr" 아형의 HBV 유전자가 pBR322 vector에 cloning된 pHBV315를 이화여자대학교 약학대학 김길현 교수로부터 분양받아 *E. coli* DH5α에 $CaCl_2$ 방법(Sambrook 등, 1989)으로 transformation하여 plasmid를 증폭하고 Qiagen(Hilden, Germany)의 plasmid purification kit를 이용하여 분리하였다. 이를 제한 효소 *BamH* I으로 절단하고 agarose gel에 전기영동한 후 3.2 kb의 HBV 유전자를 Qiagen의 gel extraction kit를 사용하여 분리하여 Southern bolt 분석 실험에 탐침(probe)으로 사용하였다.

추출물의 처치

세포주는 해동 후 75 cm^2 flask 배양기에서 증식, 계대하여 양을 충분히 확보한 후 배양기 바닥에서 세포를 분리하였다. 세포배양액으로 세포농도를 1.77×10^5 cells/ml로 조정한 다음 24 well 세포배양판에 1 ml/well 씩 분주하였다. 이를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 세포가 충분히 자랄때까지 이틀 간격으로 배지를 갈아주고 세포가 confluent한 상태가 된 다음 항-HBV 효능 검색에 사용하였다. 항 HBV 효능검색에 사용할 시료의 농도는 세포배양액내 LDH의 생성정도를 측정하여 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 시험하였다. 시료 검액들은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 4가지 농도로 녹여서 48 well 세포배양판에 10 μl/well 씩 분주한 후 37℃로 예열한 세포배양액(2% FBS)을 1 ml씩 첨가하여 각 검액이 100배씩 희석되어 최종 처치 농도가 5, 50, 250, 500 μg/ml인 배양액을 처치 바로 전에 준비하였다. 또한 양성 대조 약물인 dideoxycytidine(ddC, Sigma Chemical Co., U.S.A.)은 최종 처치농도가 10 μM이 되도록 배양액으로 희석하여 처치하였다. 각 검액이 포함된 세포배양액 1 ml을 세포에 이틀 간격으로 8일간 처리하였다. 세포의 분주와 시료 검액의 처치는 2배수(duplicate)로 2회 실시하였다.

세포외 virion의 수집

시료의 세포외 virion DNA의 방출 저해능을 검색하기 위해 세포에 검액을 처리한 날로부터 8일째가 되는 날에 세포배양액을 수거하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 800 μl를 새 tube에 옮기고, 200 μl의 5× PEG 용액[50% polyethyleneglycol(PEG) 8000(w/v), 0.6 M NaCl, 4℃]을 각 tube에 첨가하여 vortex로 잘 섞어 준 후 얼음에 2시간 동안 두었다. 이를 4℃, 14,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후, 상등액을 흡입펌프를 사용하여 제거하고 tube를 잠시 세워 놓아 잔여 PEG 용액을 바닥에 모은 후 침전물이 떨어지지 않게 조심스럽게 완전히 제거하였다. 이후 각 tube에 30 μl의 1×lysis 용액[50 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EDTA, 1% lauryl sulfate(SDS), 1 mg/ml Proteinase K]을 첨가하여 침전물을 녹이고, 42℃ heating block에 2시간 동안 배양하여 세포외 HBV DNA를 분리하였다. 이를 6 μl의 6×DNA loading 완충용액(Sambrook 등, 1989)을 첨가하여 섞은 다음 간단히 원심분리하여 이후 실험에 사용하였다.

Southern blot 분석

세포배양액으로부터 수집된 HBV DNA 용액은 0.8% agarose gel에서 15 μl/lane을 loading하여 bromophenol blue 염색액이 gel 길이의 4/5까지 이동할 때까지 전기영동하였다. 전기영동후 gel은 표면이 잠기는 양의 denaturation 용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 담구어 30분간 교반기에서 흔들어 준 후, 증류수로 gel을 헹구고 같은 양의 neutralization 용액(0.5 M Tris-HCl, 1.5M NaCl)에 담구어 20분간 흔들어 주었다. 이후 capillary transfer 방법(Sambrook 등, 1989)을 이용하여 gel 속의 DNA를 Hybond™-N+ nylon membrane filter(Amersham사, Buckinghamshire, U.K.)로 옮겼다. 이 membrane filter는 5×SSC(20×SSC=0.3M sodiun citrate, 3M NaCl, pH 7.0)로 간단히 헹군후 공기중에서 말리고 ultraviolet crosslinker를 사용하여 700 mJ/cm^2로 UV를 조사하여 DNA를 membrane filter에 고정시켰다.

Membrane filter 상의 HBV DNA 검출은 ECL direct™ labeling and detection system(Amersham)을 사용하여 검출하였다. 탐침 HBV DNA에 직접적으로 horseradish peroxidase(HRP) 효소를 표지시켜 membrane filter 상의 HBV 유전자들과 hybridization 시킨후, HRP 효소반응에 의해 생성되는 빛을 Amersham사의 Hyperfilm ECL film에 감광시켜 세포외로 방출된 HBV의 양을 검출하였다.

결과 및 고찰

인도와 태국 등지에서 민간약으로 간염이나 황달 등에 사용되어 왔던 *P. amarus*(혹은 *niruri*)는 *in vitro*에서 hepadnavirus의 viral DNA polymerase저해 효과가 확인되었으며(Unander 등, 1990) 이런 작용이 아마도 민간에서 이 식물을 널리 사용하는 배경이 된 것으로 여겨진다. 한편

*Phyllanthus*속 식물은 전세계적으로 140여종이 서식하는 것으로 알려져 있으며 *P. amarus* 이외에도 9종의 식물이 간장질환 치료에 사용되고 있으며 그것은 *P. amarus*와 마찬가지로 virus의 DNA polymerase저해 작용에 기인한 것으로 보인다. 우리나라에는 *P. urinaria*와 *P. ussuriensis*의 2종류의 *Phyllanthus* 속 식물이 보고되어 있다. *P. urinaria* 는 진주초라 불리며 민간에서 황달이나 간염치료에 사용되었다고 하며 최근 중국의 임상연구 결과에 의하면(Wang 등, 1995) 이 식물의 extract을 투여한 개체의 경우 혈청 중 HBV e-antigen이 소실되며 HBV e-antibody가 나타나는 결과를 보여주고 있다. 이처럼 동속 식물들이 HBV에 대한 유의한 효과를 나타낼 뿐 아니라 우리 나라의 민간약에서도 자주 쓰이고 있음에도 불구하고 *P. ussuriensis*에 대해서는 어떤 종류의 연구도 수행된 바가 없었다.

_P. ussuriensis_의 추출, 분획

여우주머니는 그 높이가 30 cm정도에 불과한 대단히 작은 초본류 식물로서 전 식물의 건조 중량이 수 g에도 미치지 못하였으므로 완전히 성장하여 그 과실이 달리는 8월 중순 이후에 채취하여 사용하였다. 초음파 추출한 MeOH extract를 물에 현탁시킨 후 그 극성에 따라 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH로 분획하여 각각을 HBV DNA 복제에 미치는 효과를 검색하였을 때 EtOAc 분획에서 가장 억제효과가 높았으며 *n*-BuOH 분획에서 부분적으로 활성이 확인되었다. 가장 효과가 높았던 EtOAc분획을 silica-gel column chromatography하여 8개의 소분획으로 나누고 그 각각을 배양세포중에 처리하여 배양액중으로 유리되는 virus의 DNA를 분리하여 Southern blot으로 분석하였다.

***P. ussuriensis* 추출물의 HBV 복제 억제**

그동안 HBV에 대한 많은 연구에도 불구하고 HBV의 narrow host range 즉 -사람과 챔팬지, woodchuck 등의 간에서만 증식할 수 있는 특성으로 인하여 woodchuck에 바이러스를 감염시킨 질환 동물 모델이 바이러스성 간염 치료제 효력검색에 활용되었으며(Gerin, 1991; Popper, 1986), 이는 많은 비용이 들기 때문에 일차 약효 검색법으로는 적합하지 못하다. 미국의 Georgetown 대학의 Korba 등은 손쉽고 경제적인 *in vitro* 약효검색 시스템을 확립하고자 수년동안 연구한 결과, HBV 유전자를 인간의 간암 세포주 HepG2에 도입(stable transfection)하여 간염을 유발하는 HBV가 증식, 생산되는 HepG2 2.2.15 cell line을 개발하고, 이 배양세포에서 HBV의 증식(replication)을 측정함으로써 시험물질에 대한 항바이러스 약효를 검색할 수 있는 세포배양 약효검색 시스템을 개발하여 보고한 바 있다(Korba와 Milman, 1991; Korba와 Gerin, 1992). Jansen 등은 항 HBV 효력 검색에 있어서 HepG2 2.2.15 세포주의 유용성에 대해 보고하였다(Jansen 등, 1993). 본 연구에서는 HepG2 2.2.15 배양세포를 이용한 신뢰성 있고 재현성 있는 약효검색 시스템을 이용하여 *P. ussuriensis*의 여러 분획들이 HBV 증식 억제 효과를 살펴보았다.

Fig. 2의 결과는 8종의 소분획중에서 PUE-2와 PUE-7이 농도의존적으로 전체 처치농도에서 HBV 증식 억제작용을 가지고 있음을 보여주고 있으며, PUE-4, PUE-6의 경우에도 고농도인 500 μg/ml에서 HBV의 증식 억제효과를 보였다. PUE-2는 5 μg/ml의 농도에서는 크게 효과를 발현하지 못하지만 50 μg/ml이상의 농도에서는 세포 배양액으로 유

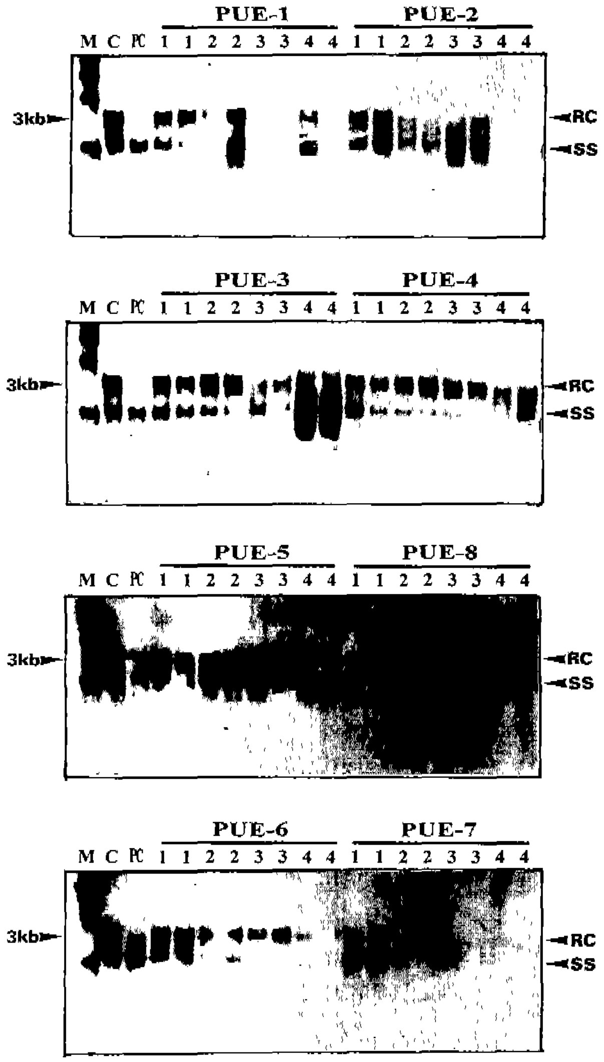

Fig. 2. Effects of the extracts of *P. ussuriensis* on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with the extracts at 5 μg/ml (lane 1), 50 μg/ml (lane 2), 250 μg/ml (lane 3), 500 μg/ml (lane 4) concentrations and 10 μM dideoxycytidine(lane PC) as a positive control. Samples were loaded in duplicate. Culture media were harvested at 8th day after treatments. Virions were precipitated with PEG. Viral DNA were extracted from PEG precipitates and analyzed on Southern blot analysis (ECL direct). Lane C, not treated with test sample; M, size marker (λ/Hind III); RC, relaxed circular HBV DNA; SS, single-stranded HBV DNA.

리되는 relaxed circular HBV DNA의 양을 현저히 감소시킴을 알 수 있다. 또한 PUE-7의 경우는 5 μg/ml의 농도에서부터 현저히 relaxed circular HBV DNA의 양을 감소시켰고, 그보다 높은 단계의 농도인 50 μg/ml의 경우는 양성대조물인 10 μM의 ddC와 유사한 효과를 보였을 뿐만 아니라 single-strand HBV DNA는 거의 찾아볼 수가 없게 저지시킴을 알 수가 있었다. HepG2 2.2.15 배양세포에서 ddC의 HBV 증식 억제효과는 EC_{90}가 6 μM로 보고되었으며(Korba와 Gerin, 1992), 본 실험에 사용한 ddC의 농도 10 μM은 HBV의 증식을 완전히 억제한 상태를 나타내고 있다(Fig. 2, lane PC). 유의할 만한 사실은 PUE-2의 경우는 배양액으로 유리되는 relaxed circular HBV DNA의 감소가 현저한데 반하여 PUE-7의 경우는 relaxed circular HBV DNA뿐 아니라 single-stranded HBV DNA까지도 현저히 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이것은 silica gel column chromatography에서 먼저 elution 되는 PUE-2가 PUE-7보다 현저히 non-polar한 화합물을 함유하고 있음을 감안할 때 작용기전이 완전히 다른 2종 이상의 서로 다른 화합물이 각각 viral DNA의 복제를 억제하는 효과를 나타낸다고 추정할 수 있다. *P. amarus*는 HBV의 DNA polymerase를 *in vitro* 및 *in vivo*에서 저지함이 밝혀졌으며(Wang, 1995), HIV의 reverse transcriptase에 대해서도 그 성분인 repandusinie A가 유의성있는 저지 활성을 나타냄이 확인되었다. 한편 *P. niruri*중의 niruriside는 HIV의 복제를 위해 필수적으로 viral RNA와 viral 단백질인 REV와의 결합을 저지하는 효과를 가지고 있다고 알려졌다(Qian-Cutrone 등, 1996). 위의 예에서 보는 것처럼 동일 식물의 성분이 바이러스의 복제에 관여하는 2가지 이상의 기전으로 작용할 수도 있으므로 우리는 여우주머니 추출물중 2가지 이상의 성분이 HBV의 증식에 서로 다른 기전으로 작용하리라고 추정하였으며 분리된 성분을 이용한 기전 연구를 통하여 이와 같은 우리의 가설의 진위를 확인하기 위해 각각의 분획으로부터 활성성분을 분리하는 연구가 진행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구(과제번호 941-0700-034-2) 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사하는 바이다.

참고문헌

Gerin, J. L. (1991). Antiviral agents for hepatitis B. *Hepatology* **14**, 198.

Jansen, R. W., Johnson, L. C. and Averett, D. R. (1993). High-capacity *in vitro* assessment of anti-hepatitis B virus compound selectivity by a virion-specific polymerase chain reaction assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 441-447.

Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. (1983). Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride-induces cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Plant. Med.* **49**, 222-225.

Korba, B. E. and Gerin, J. L. (1992). Use of a standardized cell culture assay to assess activity of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* **19**, 55-70.

Korba, B. E. and Milman, G. (1991). A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* **15**, 217-228.

Ogata, T., Higuchi, H., Mochida, S., Matsumoto, H., Kato, A., Endo, T., Kaji, A. and Kaji, H. (1992). HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri. AIDS Res. Human Retrovir.* **8**, 1937-1944.

Popper, H., Roth, L., Purcell, R. H., Tennant, B. C. and Cerin, J. L. (1986). Hepato-carcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 866-870.

Qian-Cutrone, J., Huang, S., Trimble, J., Li, H., Lin, P., Alam, M., Klohr, S. E. and Kadow, K. (1996). Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri. J. Nat. Prod.* **59**, 196-199.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, New York.

Shimazu, M., Horie, S., Terashima, S., Ueno, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizakd, M. and Morita, N. (1989). Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan Crude Drug "Para'parai mi", *Phyllanthus niruri. Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2531-2532.

Singh, B., Agrawal, P. K. and Thakur, R. S. (1989). A new lignan and a new neolignan from *phyllanthus niruri. J. Nat. Prod.* **52**, 48-51.

Somanabandhu, A. (1993). ^{1}H- and ^{13}C-NMR assignments of phyllanthin and hypophyllanthin: lignans that enchance cytotoxic responses with cultured multidrug-resistant cells. *J. Nat. Prod.* **56**, 233-239.

Tanaka, R., Masuda, K. and Matsuaga, S. (1993). Lup-20(29)-en-3b, 15a-diol and ocotillol-II from the stem bark of *Phyllanthus flexuosus. Phytochem.* **32**, 472-474.

Thyagarajan, S. P., Jayaram, S., Valliammi, T., Madanagopalan, N., Pal, V. G. and Jayaraman, K. (1990). *Phyllanthhus amarus* and hepatitis B. *Lancet* **336**, 949-950.

Thyagarajan, S. P., Subramanian, S., Thirunalasundari, T., Venkateswaran, P. S. and Blumberg, B. S. (1988). Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet* ii: 764-766.

Ueno, H., Horie, S., Nishi, Y., Shogawa, H., Kawasaki, M., Suzuki, S., Hayashi, T., Arisawa, M., Shimizu, M., Yoshizaki, M. and Morita, N. (1988). Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from "Paraparai Mi", *Phyllanthus niruri. J. Nat. Prod.* **51**, 357-359.

Unander, D. W. (1991a). Callus induction in *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and re-

verse transcriptase by callus extracts. *Plant Cell Report* **10**, 461-466.

Unander, D. W. and Blumberg, B. S. (1991b). In vitro activity of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) species against the DNA polymerase of hepatitis viruses: Effects of growing environment and inter and intra-specific differences. *Econ. Botany* **45**, 225-242.

Unander, D. W., Venkaterwaran, P. S., Millman, I., Bryan, H. H. and Blumberg, B. S. (1990). *Phyllanthus amarus*: a possible source of new antiviral compounds. In: Advances in New Crops. Janick, J. and Simon, J. E. (ed. Timber Press, Portland, Oregon, pp. 518-521.

Unander, D. W., Webster, G. L. and Blumberg, B. S. (1991c). A survery of ethnobotanical uses and biological assay results in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) II. The subgenus *Phyllanthus*. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 97-133.

Vengaterwaran, P. S., Millman, I. and Blumberg, B. S. (1987). Effects of an extract from *Phyllanthus nururi* on hepatitis B and woodchuk hepatitis viruses: *In vitro* and *in vivo* studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 274-278.

Wang, M. (1995). Herbs of the genus phyllanthus in the treatment of chronic hepatitis B: observation with three preparations from different geographic sites. *J. Lab. Clin. Med.* **126**, 350-352.

이창복. (1989). 대한식물도감 향문사, 서울 p. 509.

문영심, 임운섭, 이미경, 김영중, 허 훈. (1995). 여우주머니의 배양세포 중의 간세포 보호활성, 서울대학교 약학대학 약학논문집, **20**, 21-31.