

## 천연 나린게닌의 항허피스바이러스작용과 아시클로버 및 비다라빈과의 병용효과

이지현 · 김영소 · 이종길 · 이혁구\* · 한성순<sup>#</sup>

충북대학교 약학대학, \*진일제약(주) 중앙연구소

(Received December 10, 1998)

### Antiherpetic Activities of Natural Naringenin Alone and in Combinations with Acyclovir and Vidarabine

Ji-Hyun Lee, Young-So Kim, Chong-Kil Lee,  
Hyuk-Koo Lee\* and Seong-Sun Han<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*Central Research Institute, Kuhnil Pharmaceutical Co., LTD., Chunan 330-810, Korea

**Abstract**—To search for less toxic antiherpetic agents, the inhibitory effects of natural naringenin on the plaque formation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in Vero cells were examined by the plaque reduction assay *in vitro*. Naringenin inhibited plaque formations of HSV-1 and HSV-2 in a dose dependent manner. It also exhibited more potent antiherpetic activity on HSV-1 with selectivity index (SI) of 19.1 than on HSV-2 with SI of 5.7. The combined antiherpetic effects of naringenin with nucleoside antiherpetic agents, acyclovir and vidarabine, were examined on the multiplication of these two strains of herpesviruses in Vero cells by the combination assay. The results of combination assay were evaluated by the combination index (CI) that was calculated by the multiple drug effect analysis. The combinations of naringenin with acyclovir on HSV-1 and HSV-2 showed more potent synergism with CI values of 0.28~0.81 for 50%, 70%, 90% effective levels than those with vidarabine with CI values of 0.86-3.28.

**Keywords** □ Naringenin, herpes simplex virus, plaque reduction assay, antiherpetic activity, selectivity index (SI), combination index (CI), multiple drug effect analysis.

Herpesvirus는 herpes simplex virus type 1(HSV-1)과 type 2(HSV-2)가 대표적 바이러스로 형태학적으로는 동일하고 약 50%의 DNA 유사성을 가지고 있지만 생물학적, 생화학적, 유전적, 임상적인 면에서 차이점을 나타내며<sup>1)</sup> HSV-1은 상체부위에, HSV-2는 생식기를 비롯한 하체부위에 수포성, 괴양성 병변을 일으킨다.<sup>2)</sup> 최근 HSV-2는 human immunodeficiency virus(HIV)의 전파에 관여하는 공동인자로서 억제해야할 중요 바이러스감염증 중의 하나로 보고된 바 있다.<sup>3)</sup>

현재 임상적으로 사용되고 있는 항허피스바이러스제

로는 acyclovir(ACV), vidarabine(ara-A), ganciclovir(DHPG), idoxuridine(IDU) 등의 nucleoside 유도체와 phosphonoacetic acid, phosphonoformic acid (foscarnet, PFA) 등의 pyrophosphate 유도체가 있다. 이중 acyclovir는 바이러스 감염세포에서만 활성화 되는 최초의 항바이러스제이며 바이러스 고유의 핵산 복제효소를 선택적으로 억제하므로 부작용이 적고 효과가 우수하여 널리 사용되고 있으나,<sup>4)</sup> 신기능저하 환자에게는 축적되어 신장폐색이나 acyclovir 결정이 생성되며, 최근에는 내성바이러스의 출현이 보고되었다.<sup>5)</sup> 또한 전신투여제로 쓰이는 vidarabine, foscarnet 등은 간기능저하, 생식세포, 신장, 간에 대한 독성이 보고되었다.<sup>6)</sup>

또한 최근 바이러스질환의 치료에 병용투여법이 중

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0431-261-2817 (팩스) 0431-268-2732

요시되고 있는 바, 병용투여 로 상승 또는 상가효과를 얻을 수 있고, 독성을 감소시키며 내성균주의 출현을 억제할 수 있다.<sup>7)</sup> 항바이러스제의 병용효과에 관한 연구는 Shinazi 등<sup>8)</sup>이 herpes simplex viruses에 대해 acyclovir와 vidarabine 및 5-monophosphate vidarabine과의 병용효과를, Musci 등<sup>9)</sup>은 herpes simplex virus type 1과 pseudorabies virus에 대한 quercetin과 5-ethyl-2'-dioxyuridine의 병용효과를, Veckenstedt 등<sup>10)</sup>은 mouse의 mengo virus 감염에 대한 quercetin과 murine alpha 및 beta interferon의 병용효과를 각각 보고하였다.

Naringenin(5,7,4'-trihydroxyflavanone)은 citrus속 식물의 미숙과피에 많이 함유되어 있는 flavonoid의 일종으로 naringin(naringenin-7-o- $\beta$ -neohesperidoside)의 비당체이며, 혈압강화작용, 지방산화저지작용,<sup>11)</sup> UV 조사에 의한 DNA손상 보호작용,<sup>12)</sup> 항 estrogen 작용<sup>13)</sup> 등의 생리활성을 갖고 있다.

Flavonoids의 항바이러스효과에 관한 연구로, Cutting 등<sup>14)</sup>은 quercetin, quercitrin과 rutin 등이 mouse의 rabies virus 감염에 대하여, quercitrin은 mouse의 ectromelia virus, vaccinia virus 및 rabies virus 감염에 대하여 각각 예방효과를 갖는다고 보고하였고, Beladi 등<sup>15)</sup>은 quercetin, morin, luteolin 및 fisetin 등이 pseudorabies virus에 대하여, Spedding 등<sup>16)</sup>은 quercetin, scutellarein을 비롯한 6종의 flavonoids가 reverse transcriptase(RT)의 활성을 억제함으로써 avian myeloblastosis virus(AMV), maloney murine leukemia virus(MMLV)와 rous-associated virus-2(RAV-2)의 활성을 용량의존적으로 억제한다고 보고하였다. Barnard 등<sup>17,18)</sup>은 Euphorbiaceae 식물로부터 분리한 분자량 2,100 dalton의 천연 flavonoid polymer인 SP-303이 herpes simplex virus type 1 및 type 2에 대해 세포내로 침입하는 것을 억제하며, respiratory syncytial virus(RSV)에 대해서도 항바이러스효과를 나타낸다고 보고하였고, Sidwell 등<sup>19)</sup>은 SP-303이 mouse의 influenza A virus에 대한 억제효과가 있음을 보고하였다.

Naringenin은 naringin이 생체내에서 가수분해되어 활성을 나타내는 대사물질로서,<sup>20)</sup> naringin의 안전성은 Wilson 등<sup>21)</sup>에 의해 1%의 naringin을 함유한 사료를 200일간 경구투여시 성장 및 장기중량에 영향이 없음을 보고되었고, 한 등<sup>22)</sup>은 naringin의 급성독성시

험 결과, LD<sub>50</sub> 측정, 혈액생화학적 검사 및 병리조직학적 검사에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 없었음을 보고한 바 있다.

이상의 연구보고를 종합한 결과, 천연에 널리 분포되어 있고 다양한 생리활성을 갖고 있으며 독성이나 부작용이 없는 물질로서 아직 항허피스바이러스 작용에 관한 연구보고를 찾아볼 수 없는 naringenin을 한국산 감귤의 과피로부터 추출, 단리하여 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 항허피스바이러스 효과를 측정하고, 임상적으로 널리 이용되고 있는 nucleoside계 항허피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험을 실시하고 병용효과를 평가하여 그 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

## 실험방법

**재료, 시약 및 기기** - Naringenin은 한국산 감귤 Citrus unshiu의 과피에서 분리하여 실험에 사용하였다. Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin, penicillin G, streptomycin, amphotericin B는 Gibco BRL사(Gaithersburg, MD, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), crystal violet, 9-[(2-hydroxyethoxy) methyl]guanine(acyclovir), adenine 9- $\beta$ -D-arabinofuranoside(vidarabine)는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 clean bench(Green Yanghaeng, Seoul, Korea), EIA reader(Molecular Device, Menlo Park, CA, U.S.A.), CO<sub>2</sub> incubator(Vision Scientific Inc., Bucheon, Korea), inverted microscope(Nikon, Tokyo, Japan), plaque viewer(Bellico, Vineland, NJ, U.S.A.), freeze dryer(Edward Co., Wilmington, MA, U.S.A.), autoclave(Hanyang Engineering Co., Bucheon, Korea), centrifuge(Hanil Scientific Inc., Incheon, Korea), membrane filter(Nalgene Co., Rochester, NY, U.S.A.), pH meter(Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, U.S.A.) 등을 사용하였다.

**세포 및 바이러스** - 숙주세포로는 Vero 세포(Kidney, African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL81을, 시험바이러스로 herpes simplex virus type 1(F strain) ATCC VR-733과 herpes

simplex virus type 2(G strain) ATCC VR-734를 American Type Culture Collection(Rockville, U.S. A)으로부터 분양받아 사용하였다. Vero 세포는 10% heat inactivated(56°C, 30 min) FBS, penicillin G, streptomycin 및 amphotericin B가 함유된 EMEM으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 사용하였고 HSV-1과 HSV-2는 MOI(multiplicity of infection)가 0.01 pfu(plaque forming unit)/cell이 되도록 한 바이러스액을 Vero 세포에 감염시켜 배양한 후 배양액으로부터 취하여, 바이러스의 역가를 plaque reduction assay<sup>23)</sup>로 측정하여 사용할 때까지 -70°C이하에서 보관하였다.

**세포독성시험** - 숙주세포에 대한 세포독성은 MTT reduction assay<sup>24)</sup>에 따라 시험하였다. Vero 세포(3.5 × 10<sup>4</sup>/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 최고농도 500 µg/ml의 시료용액을 6단계로 배수희석하여 100 µl씩 분주하고 48시간 배양하였다. 세포의 병변도를 확인한 후 0.5% MTT 용액을 50 µl씩 가하고 2시간 더 배양하였다. 과량의 MTT를 제거하고 culture plate를 건조한 다음 DMSO로 세포내에 형성된 formazan crystal을 용해하였다. EIA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 흡광도가 50% 감소되는 naringenin의 농도인 50% cytotoxic concentration(CC<sub>50</sub>)의 값을 계산하였다.

**항 바이러스시험** - 항허피스바이러스효과는 plaque reduction assay<sup>23)</sup>에 따라 시험하였다. Vero 세포(5 × 10<sup>5</sup>/well)를 24 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하여 세포단층을 얻었다. 세포단층을 PBS로 세척하고 약 150 pfu/well이 되도록 희석한 바이러스용액을 접종한 다음, 바이러스를 세포에 흡착시킨 후 1시간 동안 배양하고 1, 10, 20, 30 및 40 µg/ml로 조절된 naringenin을 분주한 다음, plaque이 형성될 때까지 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque수를 세었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90% 까지 억제하는 naringenin의 농도인 50% effective concentration(EC<sub>50</sub>), EC<sub>70</sub> 및 EC<sub>90</sub>를 구하여 selectivity index(SI)로 항바이러스효과를 판정하였다.

**병용시험** - 병용시험은 Tahedjian 등<sup>25)</sup>의 방법에

따라 시험하였다. Vero 세포(5 × 10<sup>5</sup>/well)를 24 well plate에 분주하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후, 배지를 제거하고 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종, 바이러스를 세포에 흡착시킨 후 더 배양하였다. Naringenin은 1~40 µg/ml, acyclovir는 0.05~2.00 µg/ml, vidarabine은 0.25~10.00 µg/ml의 농도범위내에서 naringenin과 acyclovir는 20:1, naringenin과 vidarabine은 4:1의 농도 비율이 되도록 혼합조제한 후, plaque이 형성될 때까지 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 제거하고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시키고 0.1% crystal violet 용액으로 염색한 후 형성된 plaque 수를 세었다.

**시험결과의 분석 및 판정** - 시험결과는 Chou와 Talalay 등<sup>26)</sup>의 mutiple drugs effect analysis에 따라 분석, 판정하였다. 결과는 대조군과 비교하여 증식의 억제가 일어나는 정도인 affected fraction(f(a))에 따라 combination index(CI)로 상승효과, 상가효과 및 길항효과로 판정하였다. CI value가 1보다 작으면 상승효과, 1이면 상가효과, 그리고 1보다 크면 길항효과로 판정하였다.

## 실험결과

**항바이러스 효과** - Naringenin의 HSV-1과 HSV-2에 대한 항허피스바이러스 효과를 plaque reduction assay에 따라 측정하여 CC<sub>50</sub>와 EC<sub>50</sub>로부터 얻은 selectivity index(SI)는 Table I과 같다. Naringenin의 Vero 세포에 대한 CC<sub>50</sub>은 145.3 µg/ml로서 세포독성이 비교적 적었고, HSV-1 및 HSV-2에 대하여 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며 HSV-1의 SI

**Table I**—Antiherpetic activity of naringenin by plaque reduction assay

Viruses	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	EC <sup>b</sup> (µg/ml)			SI <sup>c</sup>
		EC <sub>50</sub>	EC <sub>70</sub>	EC <sub>90</sub>	
HSV-1	145.3	7.6	22.8	38.1	19.1
HSV-2	145.3	25.5	36.7	46.9	5.7

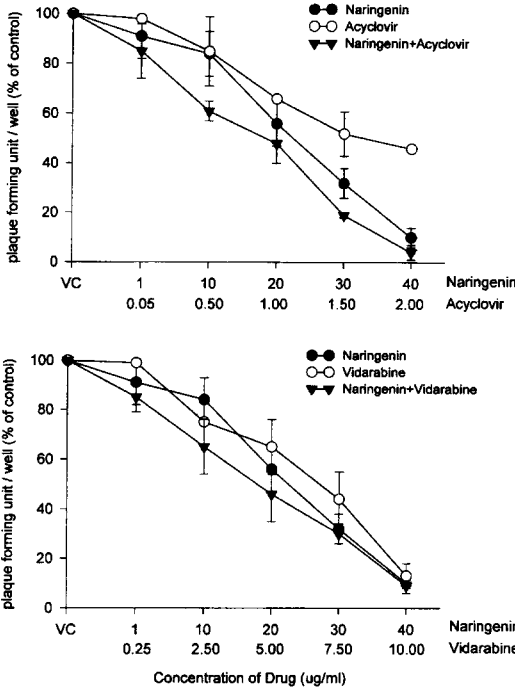
<sup>a</sup>50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

<sup>b</sup>Effective concentration (EC) is the concentration of naringenin required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%.

<sup>c</sup>Selective Index (SI) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

는 19.1으로써, 5.7의 SI를 나타내는 HSV-2 보다 우수한 항허피스바이러스 효과를 나타내었다.

**병용효과**  
**HSV-1의 naringenin과 acyclovir 및 vidarabine -**



**Fig. 1**— Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 1 in Vero cells by naringenin, acyclovir and vidarabine alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations.

Naringenin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-1의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 1과 같다. Naringenin과 acyclovir 및 vidarabine의 병용효과는 용량의존적으로 상승하였으며, naringenin과 acyclovir의 병용이 vidarabine과의 병용보다 더 강한 항바이러스 효과를 보였다. 단독처리시 naringenin은 30  $\mu$ g/ml의 농도에서 68%, acyclovir는 1.50  $\mu$ g/ml의 농도에서 48%의 plaque 형성 억제효과를 보였으나 이 두 물질을 병용시 plaque 형성 억제율은 81%로 상승되었다. 그러나 7.50  $\mu$ g/ml의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율이 70%에 그쳐 naringenin 단독처리시와 비교하여 유의성 있게 상승되지 않았다. Fig. 1에 나타난 결과를 median-effect equation으로 바꾸어  $\log(\text{concentration})$ 에 대해  $\log[(f(a))^{-1}-1]^{-1}$ 의 값을 계산한 결과 median-effect plot으로부터 결정된 parameter를 Table II에 나타내었다. HSV-1에 naringenin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때  $f(a)$ 에 따른 CI value는 Fig. 2와 같다. Naringenin과 acyclovir 병용시 CI value는  $f(a)$  전 범위에서 1보다 작은 0.63~0.89의 값을 나타내었고, vidarabine과의 병용시 CI value는 0.25보다 작은  $f(a)$ 에서만 1보다 작은 값을 나타내었다. Naringenin과 acyclovir의 병용은 상승효과를 나타내었으며, vidarabine 보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

**HSV-2의 naringenin과 acyclovir 및 vidarabine -**

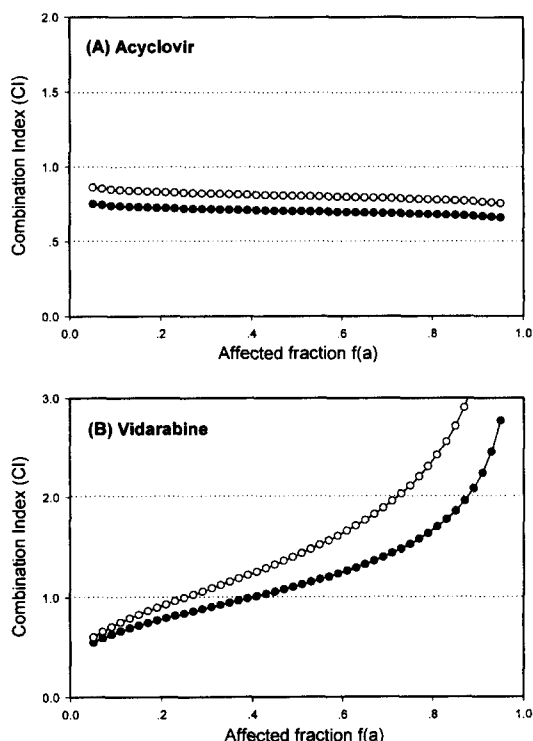
Naringenin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-2의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 3과 같다. Naringenin과 acyclovir 및 vidarabine의 병용효과는 용량의존적으로 상승하였으며, naringenin과 acyclovir의 병용이 vidarabine 보다 더

**Table II**— Median effective concentrations and CI values of combinations of naringenin with acyclovir and vidarabine on the plaque formation of herpes simplex virus type 1 in Vero cells

Materials	Parameters <sup>a</sup>			CI at $f(a)$ of <sup>b</sup>		
	<i>m</i>	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
Naringenin	1.06	15.12	0.73			
Acyclovir	1.11	1.82	0.98			
Vidarabine	1.57	5.06	0.94			
Naringenin/Acyclovir (20:1)	1.10	7.89	0.74	0.70(0.81)	0.69(0.79)	0.67(0.77)
Naringenin/Vidarabine (4:1)	0.92	12.07	0.80	1.12(1.42)	1.42(1.92)	2.16(3.28)

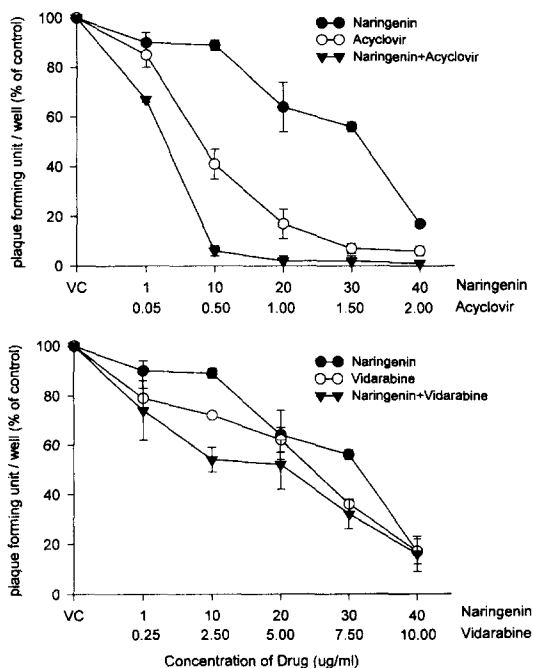
<sup>a</sup> *m* is the slope, EC<sub>50</sub> is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

<sup>b</sup> CI < 1, synergism; CI = 1, additive effect; CI > 1, antagonism.  $f(a)$  is a component of the median-effect equation referring to the fraction of the system affected (e.g., 0.5 means the CI at a 50% reduction of activity). CI values were determined under both mutually exclusive and mutually nonexclusive (numbers in parentheses) assumptions.



**Fig. 2** — CI values for combinations of naringenin with acyclovir and vidarabine on herpes simplex virus type 1 corresponding to affected fraction *f* (a) ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated under both mutually exclusive (●) and mutually nonexclusive (○) assumptions.

강한 항바이러스효과를 나타내었다. 단독처리시 naringenin은 10 µg/ml의 농도에서 11%, acyclovir는 0.50 µg/ml의 농도에서 59%의 plaque 형성 억제효과를 보였으나 이 두 물질을 병용처리시 plaque 형



**Fig. 3** — Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 2 in Vero cells by naringenin, acyclovir and vidarabine alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate determinations.

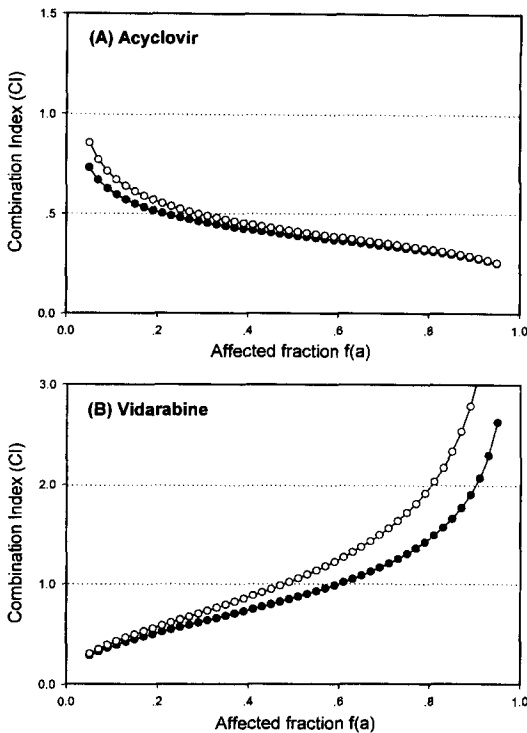
성 억제율은 94%로 상승되어 매우 우수한 병용효과를 보였다. 그러나 2.50 µg/ml의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율은 46%에 불과했다. Fig. 3에 나타난 결과를 median-effect equation으로 바꾸어  $\log[\text{concentration}]$ 에 대해  $\log\{(f(a))^{-1}-1\}^{-1}$ 의 값을 계산한

**Table III** — Median effective concentrations and CI values of combinations of naringenin with acyclovir and vidarabine on the plaque formation of herpes simplex virus type 2 in Vero cells

Materials	Parameters <sup>a</sup>			CI at <i>f</i> (a) of: <sup>b</sup>		
	<i>m</i>	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
Naringenin	0.84	23.26	0.74			
Acyclovir	1.23	0.24	0.96			
Vidarabine	0.79	3.95	0.76			
Naringenin/Acyclovir (20:1)	1.42	1.64	0.98	0.39(0.41)	0.34(0.35)	0.28(0.29)
Naringenin/Vidarabine (4:1)	0.62	10.10	0.82	0.86(1.04)	1.18(1.52)	1.98(2.94)

<sup>a</sup> *m* is the slope, EC<sub>50</sub> is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

<sup>b</sup> CI < 1, synergism; CI = 1, additive effect; CI > 1, antagonism. *f*(a) is a component of the median-effect equation referring to the fraction of the system affected (e.g., 0.5 means the CI at a 50% reduction of activity). CI values were determined under both mutually exclusive and mutually nonexclusive (numbers in parentheses) assumptions.



**Fig. 4** — CI values for combinations of naringenin with acyclovir and vidarabine on herpes simplex virus type 2 corresponding to affected fraction  $f(a)$  ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated under both mutually exclusive (●) and mutually nonexclusive (○) assumptions.

결과 median-effect plot으로부터 결정된 parameter는 Table III과 같다. HSV-2의 증식에 대하여 naringenin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때  $f(a)$ 에 따른 CI value는 Fig. 4와 같다. Naringenin과 acyclovir 병용시 CI value는 0.03보다 큰 모든  $f(a)$ 에서 0.20~0.91의 값을 나타내었고, vidarabine과의 병용시 CI value는 0.48보다 작은  $f(a)$ 에서만 1보다 작은 값을 나타내었다. Naringenin과 acyclovir의 병용은 상승효과를 나타내며, vidarabine보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

## 고 찰

한국산 감귤 *Citrus unshiu*의 과피로부터 추출, 단리한 naringenin의 항허피스바이러스 효과를 plaque reduction assay에 따라 측정된 결과 naringenin은 HSV-1과 HSV-2의 증식을 용량의존적으로 억제하였

고, 바이러스를 Vero 세포에 흡착시킨 후 시료를 처리하였을때 바이러스의 증식이 억제되는 것으로 보아 허피스바이러스의 세포내에서 복제를 억제하는 것으로 사료된다. Naringenin은 HSV-1에 대해 SI가 19.1로 우수한 항허피스바이러스 효과를 나타내었으나 HSV-2에 대해서는 SI가 5.7로 상대적으로 낮은 효과를 나타내었다. 이는 naringenin의 HSV-1 및 HSV-2에 대한 항바이러스효과가 서로 다를 수 있음을 보여주었으며, 이러한 결과는 동종 바이러스의 strain 간의 유전자서열이 다른데서 오는 감수성의 차이에서 기인하는 것으로 사료된다. Flavonoids는 천연에 널리 분포되어 있으며, 그중 일부는 이미 임상치료에 응용되고 있다.<sup>11)</sup> 또한 각종 flavonoids의 항바이러스 작용기전에 관한 연구에 의하면, Mucsi와 Pragai<sup>27)</sup>는 flavonoids가 세포내 cAMP의 양을 증가시킴으로써 항바이러스효과를 나타낸다고 하였고, Ishitsuka 등<sup>28)</sup>은 picornavirus의 uncoating에 필요한 효소를 저해함으로써 항바이러스효과를 나타낸다고 하였으며, Superti 등<sup>29)</sup>은 4,6-dichloroflavan, isoflavan 및 isoflavene 유도체가 바이러스가 증식하는 동안 바이러스항원의 합성을 억제함으로써 hepatitis A 바이러스감염의 억제효과가 있음을 보고한 바 있다. 한편 Cutting 등<sup>14)</sup>은 benzpyrone nucleus가 항바이러스효과를 나타내는데 있어서 필수적이라고 보고하였다. 그러나 flavonoids의 항바이러스작용기전은 아직 밝혀지지 않았으나 다만 확실한 것은 본 연구결과에서도 볼수 있듯이 naringenin을 비롯한 몇몇 flavonoids가 세포내에서 바이러스의 복제를 억제할수 있다는 것이다.

최근 몇종의 항허피스바이러스제가 개발, 임상적으로 사용되면서 허피스바이러스질환의 치료에 획기적인 발전이 있었으나, 현재 면역기능이 저하된 환자를 중심으로 억제내성 허피스바이러스 출현과 부작용이 크게 우려되고 있다. 따라서 서로 다른 항바이러스 작용기전을 갖는 약제를 동시투여하는 병용투여법에 관한 많은 관심이 집중되고 있다. 약물의 병용투여는 세균이나 바이러스감염증 치료시 생체에 대한 약물의 독성을 약화시키고, 내성균주의 발현을 억제하거나 지연시킬 수 있으며, 단독투여시보다 상승효과를 얻을 수 있으므로 최근 acquired immune deficiency syndrome(AIDS) 등의 치료에 있어서 활발한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 실시한 naringenin과 nucleoside계 항허피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시

험은 약물을 단독으로 투여했을 때 보다 HSV-1과 HSV-2의 증식을 더욱 강하게 억제하였다. 이는 세포 내에서 바이러스의 DNA polymerase를 억제함으로써 항바이러스작용을 나타내는 acyclovir 및 vidarabine과 naringenin의 작용기전이 서로 상이함을 보여주는 결과이다. 단독투여시 acyclovir는 HSV-1보다 HSV-2에 대해 더 강한 항바이러스 효과를 나타냈고, vidarabine은 HSV-1에 대해 더 강한 항바이러스 효과를 나타냈으나 병용투여한 결과, HSV-1과 HSV-2 모두에 대해서 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 보인 것은 acyclovir 및 vidarabine과 2종의 허피스바이러스 사이에는 감수성에 차이가 있음을 시사하며, 기존 항허피스바이러스제와 flavonoids를 병용시 서로 다른 특이활성 및 작용기전에 따라 그 병용효과가 항바이러스제의 종류에 따라 서로 다르게 나타날 수 있음을 보여주었다.

Acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 상승, 상가, 길항효과를 판정하는 CI values로 나타내었을 때, naringenin과 acyclovir의 병용은 HSV-1 및 HSV-2에 대해 CI values가  $f(a)$  대부분의 영역에서 1.0보다 작았고, vidarabine과의 병용은 HSV-1 및 HSV-2에 대해 acyclovir와의 병용시보다 더 많은  $f(a)$ 에서 1보다 큰 CI values를 나타내었다. 그러므로 HSV-1과 HSV-2에 대한 naringenin과 acyclovir의 병용은 vidarabine과의 병용시보다 더 우수한 상승효과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 naringenin은 새로운 개념의 항허피스바이러스 활성을 가진 생리활성 물질로 생각되며, 활성을 떨어뜨리지 않으면서 독성, 부작용이 있는 항허피스바이러스제의 용량을 의미있게 감량시킬 수 있는 병용투여제로서 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

1. Naringenin의 HSV-1 및 HSV-2의 Vero 세포 내에서의 증식에 대한 억제효과를 시험한 결과 용량의존적으로 plaque형성을 억제하였으며, HSV-1에 대한 SI는 19.1이고 HSV-2에 대한 SI는 5.7이므로 HSV-1에 대해 더 우수한 항허피스바이러스 효과를 나타내었다.

2. Naringenin과 nucleoside계 항허피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험 결과, acyclovir와의 병용시 HSV-1과 HSV-2에 대한 CI

value는 유효농도 범위 내에서 0.28~0.81이고, vidarabine과의 병용시 CI value는 0.86~3.28을 나타내었으므로 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 나타내었다.

## 감사의 말씀

이 연구는 충북대학교 지방대학특성화사업 산학협력 연구지원사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Mindel, A. : *The bloomsbury series in clinical science: Herpes simplex virus*, Great Britain, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 1 (1989).
- 2) Lapucci, A., Macchina, M. and Parkin, A. : Antihherpes virus agents: A review. *Il Farmaco*, **48**(7), 871 (1993).
- 3) Hook, E. W. III., Cannon, R. O. and Nahmias, A. J. : Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J. Infec. Dis.*, **165**, 251 (1992).
- 4) Chatis, P. A. and Crumpacker, C. S. : Resistance to herpesviruses to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 1589 (1992).
- 5) Richman, D. D., Fischl, M. A. and Grieco, M. H. : The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *N. Engl. Med.*, **317**, 192 (1987).
- 6) Coen, D. M. : General aspects of virus drug resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.*, **18**(Suppl. B), 1 (1986).
- 7) Schinazi, R. F. : *Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential*. In: T-C. Chou and D. C. Rideout(Eds), *Molecular mechanisms of chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism*, Academic Press, Orlando, FL., pp. 110 (1991).
- 8) Schinazi, R. F., Peters, J., Williams, C. C., Chance, D. and Nahmias, A. J. : Effect of combinations of acyclovir with vidarabine or its 5'

- monophosphate on herpes simplex viruses in cell culture and in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**(3), 499 (1982).
- 9) Musci, I. : Combined antiviral effects of flavonoids and 5-ethyl-2'-deoxyuridine on the multiplication of herpesviruses. *Acta virol.*, **28**, 395 (1984).
  - 10) Veckenstedt, A., Guttner, J. and Beladi, I. : Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral Res.*, **7**, 169 (1987).
  - 11) Willaman, J. J. : Some biological effects of the flavonoids. *J. Ame. Pharm. Asso.*, **44**(7), 404 (1955).
  - 12) Kootstra A. : Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.*, **26**(2), 771 (1994).
  - 13) Ruh M. F., Zacharewski T., Connor K., Howell J., Chen I. and Safe S. : Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochem. Pharmacol.*, **50**(9), 1485 (1995).
  - 14) Cutting, W. C., Dreisbach, R. H. and Neff, B. J. : Antiviral Chemotherapy. III. Flavones and related compounds. *Stanford med. Bull.*, **7**, 137 (1949).
  - 15) Beladi, I., Pusztai, R., Mucsi, I., Bakay, M. and Gabor, M. : Activity of some flavonoids against viruses. *Annals New York Academy Sciences*, **284**, 358 (1997).
  - 16) Gary, S., Anil, R. and Elliott, M., Jr. : Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Research*, **12**, 99 (1989).
  - 17) Barnard, D. L., Smee, D. F., Huffman, J. H., Meyerson, L. R. and Sidwell, R. W. : Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy*, **39**, 203 (1993).
  - 18) Barnard, D. L., Huffman, J. H., Meyerson, L. R. and Sidwell, R. W. : Mode of Inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid, SP-303. *Chemotherapy*, **39**, 212 (1993).
  - 19) Sidwell, R. W., Huffman, J. H., Moscon, B. J. and Warren, R. P. : Influenza virus-inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol-administered SP-303, a plant flavonoid. *Chemotherapy*, **40**, 42 (1994).
  - 20) George, N. P., Harry, W. and von Loesecke, J. *Am. Chem. Soc.*, **61**, 175 (1939).
  - 21) Wilson, R. H. and D. Floyed, *Food Research*, **5**, 89 (1940).
  - 22) Han, S. S. and You, I. J., Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. *Kor. J. Mycol.*, **16**, 1-8 (1988).
  - 23) Langford, M. P. and Weight, D. A. : Virus plaque-reduction assay for Interferon: Microplaque and regular macroplaque reduction assays. *Methods in Enzymology* (Sidney Pestka, eds.), Academic Press, New York, **78**, pp. 339 (1981).
  - 24) Scubiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. : Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 4827 (1988).
  - 25) Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Lorcarnini, S. and Birch, C. : Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type I *in vitro* by interferon alpha and coumermycin A1. *Antiviral Chem. Chemother.*, **3**(3), 183 (1992).
  - 26) Chou, T. C. and Talalay, P. : Quantitative analysis of dose-effect relationships: The Combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27 (1984).
  - 27) Mucsi, I. and Pragai, B. M. : Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia*, **41**, 930 (1985).
  - 28) Ishitsuka, H., Ohsawa, C., Ohiwa, T., Umeda, I. and Sahara, Y. : Antipicornavirus Flavone Ro 09-0179. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 611 (1982).
  - 29) Superti, F., Seganti, L., Orsi, N., Divizia, M., Gabrieli, R., Pana, A. and Stein, M. L. : Effect of isoflavans and isoflavones on the infection of Frp/3 cells by hepatitis A virus. *Antiviral Res.*, **11**(5-6), 247 (1989).