

HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 가자, 지유, 복분자, 대황의 B형 간염바이러스 증식 억제 효과[#]

김태균 · 박민수 · 한형미 · 강석연 · 정기경 · 류항목 · 김승희[#]

식품의약품안전청

(Received May 10, 1999)

Inhibitory Effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on Hepatitis B Virus Replication in HepG2 2.2.15 Cells

Tae Gyun Kim, Min Su Park, Hyung-Mee Han, Seog Youn Kang,
Ki Kyung Jung, Hang Mook Rheu and Seung Hee Kim[#]
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract — This study was undertaken to test for antiviral activity of the aqueous extracts prepared from 4 medicinal plants of Korea (*Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus*, *Rheum palmatum*). Aqueous extracts were assayed for the inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication by measurement of HBV DNA and surface antigen (HBsAg) levels in the extracellular medium of HepG2 2.2.15 cells. All extracts decreased the levels of extracellular HBV virion DNA at concentrations ranging from 64 to 128 µg/ml and inhibited the production of HBsAg dose-dependently. Among the 4 tested plants, *Terminalia chebula* exhibits the most prominent anti-HBV activities. Our findings suggest that these 4 medicinal plants may have potential to develop as specific anti-HBV drugs in the future.

Keywords □ Anti-hepatitis B virus, HepG2 2.2.15 cell, *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus*, *Rheum palmatum*.

B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 전 세계적으로 3억명 이상이 감염되어 있는 것으로 추산되고,¹⁾ 극동아시아, 동남아시아, 사하라사막 주변, 태평양군도 및 아마존유역 등에 흔하며, 특히 한국을 포함한 극동지역과 아프리카에서는 전 인구의 10% 이상이 보균자일 정도로 만연되어 있다.²⁾ B형 간염은 수혈자, 만성감염자와의 성교자, HBV에 감염된 산모의 출생아, 비경구적 상습 약물복용자, 혈액투석 환자, 간병인 등에게 주로 감염이 되고 있으며,³⁾ 감염 환자의 대다수는 3~4개월만에 회복되어 B형 간염 표면항원(HBsAg)이 음성으로 되지만, 많은 환자(20~40%)에서

만성화되어 간염, 간경화 및 간암으로 진행되는데,⁴⁾ 이 경우에는 정상인에 비해 100배나 높은 간암 발병률이 보고되고 있다.⁵⁾ 그 동안 B형 간염바이러스에 대한 많은 연구에도 불구하고 HBV의 narrow host range 즉, 사람, 챕팬지, woodchuck, 오리 등의 간에서만 증식할 수 있는 특성으로 인하여 바이러스를 감염시킨 소수 종의 질환 동물만이 바이러스성 간염 치료제 혁신검색에 활용되었으며 이는 많은 비용이 들기 때문에 일차 약효 검색법으로는 적합하지 못하다는 견해가 제기된 바 있다.^{6,7)} 1991년에 미국 Georgetown 대학의 Korba 박사 등은 HBV 유전자를 인간의 간암세포에 도입하여 HBV가 증식, 생산되는 특성을 가진 HepG2 2.2.15 세포주를 사용하여 항HBV 약효검색 시스템을 개발하여 보고하였다.^{8,9)} HepG2 2.2.15 세포주는 짧은

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-380-1812 (팩스) 02-380-1811

시간에 많은 시료를 검색할 수 있어 유용하며,¹⁰⁾ 동일한 목적으로 일본에서 개발된 HB 611 세포주보다 세포배양이 용이하고 바이러스 수율이 높아 실험의 재현성이 높은 것으로 보고되었다.¹¹⁾

가자(*Terminalia chebula*)는 사군자과 식물로써 성숙한 과실을 말린 것으로 항균, 강심, 진경작용 등을 나타낸이 보고되었으며,¹²⁾ 지유(*Sanguisorba officinalis*)는 장미과에 속한 다년생 초목인 수박풀(오이풀)의 뿌리를 말린 것으로 항균, 지혈, 구토억제 작용이 보고되었다.¹³⁾ 복분자(*Rubus coreanus*)는 장미과 식물인 복분자 딸기의 과실을 말린 것으로 콜레라균의 성장을 억제하는 작용이 있다고 보고되었으며, 대황(*Rheum palmatum*)은 미디풀과에 속하는 장엽대황의 뿌리를 말린 것으로 사하, 항균, 항종양, 진통, 이뇨작용 등이 보고되었다.^{14),15)} 최근 정 등^{14),15)}은 만성적으로 duck hepatitis B virus(DHBV)를 감염시킨 북경오리를 사용하여 가자, 지유, 복분자, 대황이 혈청 중 DHBV DNA량을 감소시킴과 DNA 중합효소 활성도를 억제함을 보고하였다. 본 연구에서는 이들 4종 생약재들이 인간 B형 간염 바이러스 증식에 미치는 영향을 HepG2 2.2.15 배양세포를 사용하여 측정함으로써 항바이러스 효과를 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

생약재 구입 및 추출

실험에 사용된 가자(*Terminalia chebula*), 지유(*Sanguisorba officinalis*), 복분자(*Rubus coreanus*), 대황(*Rheum palmatum*)은 서울, 경동시장 소재 명인당에서 구입하여 경희대학교 본초학교실에서 감정을 받은 뒤 사용하였다. 세절된 건조생약 1 kg을 사용하여 100 g씩 나누어 전자약탕기에 넣고 물 1 liter를 가하여 100°C에서 2~3시간동안 1회만 추출하여 각 추출액을 합한 후 감압농축시킨 다음 동결건조시켜 건조분말로 만든 후 시험물질로 사용하였다. 각각의 수득율은 37.8%, 9.1%, 14.6%, 29.9% 이었다. 생약재 수침액은 각각 51.2 mg/ml의 농도로 물에 30분간 녹이고 이를 10,000×g에서 10분간 원심분리 한 후 가용성분인 상층액을 필터에 여과льт하여 사용하였다.

세포주 확보 및 배양

실험에 사용한 HepG2 2.2.15 세포주는 미국의

Georgetown 의과대학 Korba 교수로부터 직접 분양받았다. 세포는 도착 즉시 해동하여 5 mM HEPES, 5% fetal bovine serum(FBS), 330 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4~5번의 계대를 거쳐 증식된 세포는 액체질소통에 보관하였으며, 이들을 해동하여 항바이러스 효능 검색에 사용하였다.

HBV 유전자 탐침 제조

“adr” 아형의 HBV 유전자가 클로닝된 pHBV315¹⁶⁾를 이화여자대학교 약학대학 김길현 교수로부터 분양받았으며 이 plasmid를 제한 효소 *BamH I*으로 절단하고 3.2 kb의 HBV 유전자를 Qiagen(Hilden, Germany)의 gel extraction kit를 사용하여 분리한 후 Southern blot 분석 실험에 탐침(probe)으로 사용하였다.

세포독성 측정

생약재 수침액의 세포독성은 HepG2 2.2.15 세포에 생약재 수침액을 세포배양액에 섞어 처치하여 24시간동안 배양한 후 시료의 세포독성에 의해 세포배양액으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 LDH cytotoxicity kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다.

Virion HBV 증식 억제 측정

HepG2 2.2.15 세포를 이용한 생약재들의 항HBV 효능 검색은 세포주를 공여한 Korba 박사의 방법⁹⁾을 기본으로 변형하여 실시하였다.

추출물의 처치 – HepG2 2.2.15 세포를 24 well 세포배양판에 2×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 세포가 confluent할 때까지 배양한 다음 항HBV 효능 검색에 사용하였다. 생약재 수침액의 처치는 37°C로 예열한 세포배양액(2% FBS) 2 ml에 4가지 농도의 생약재 수침액을 20 µl씩 첨가하여 최종 농도가 64, 128, 256, 512 µg/ml가 되도록 하였다. 또한 양성 대조 약물인 dideoxycytidine(ddC, Sigma)은 최종농도가 10 µM이 되도록 처치하였다. 각 시료가 포함된 세포 배양액 2 ml를 매일 교환하면서 세포에 8일간 처치하였다. 세포의 분주와 생약재 수침액의 처치는 2배수(duplicate)로 3회 반복 시험하였다.

세포외 virion의 수집 – 세포에 생약재 수침액을

처리한 날로부터 8일째가 되는 날에 세포배양액을 수거하여 $3,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 $800 \mu l$ 에 $200 \mu l$ 의 PEG 용액(50% polyethylene-glycol(PEG) 8000(w/v), 0.6 M NaCl)을 첨가하여 잘 섞어 준 후 얼음에 2시간 동안 방치하였다. 이를 $4^{\circ}C$, $19,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리한 후, 상등액을 흡입 펌프를 사용하여 제거하고 튜브를 잠시 세워 놓아 잔여 PEG 용액을 바닥에 모은 후 침전물이 떨어지지 않게 조심스럽게 완전히 제거하였다. 이후 각 튜브에 $30 \mu l$ 의 용해액(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% lauryl sulfate(SDS), 1 mg/ml Proteinase K)을 첨가하여 침전물을 녹이고, $42^{\circ}C$ 에 2시간 동안 배양하여 HBV DNA를 분리하였다.

Southern blot 분석 – 세포배양액으로부터 수집된 HBV DNA는 0.8% 한천 겔에 전기영동한 후 capillary transfer 방법을 이용하여 Hybond™-N⁺ 나일론 필터(Amersham, U.K.)로 옮겼다. 이 필터를 공기중에서 10분간 말린 후 자외선 crosslinker를 사용하여 70 mJ/cm^2 로 자외선을 조사하여 DNA를 고정시키고, ECL direct™ labeling and detection system (Amersham)을 사용하여 HBV DNA를 검출하였다.

HBs 항원 및 HBe 항원의 측정

세포에 생약재 수침액스를 처리한 후 8일째 세포배양액을 수거하여 radioimmunoassay kit를 이용하여 HBs 항원(Abbott, U.S.A.) 및 HBe 항원(Dainabot, Japan)의 양을 측정하였다. 수거된 세포배양액을 HBs 항체 혹은 HBe 항체가 표지된 bead를 넣고 실온에서 20시간 반응 시킨 후 bead를 중류수로 세척하고 [^{125}I] 표지된 HBs 혹은 HBe 항체용액을 넣어 $45^{\circ}C$ 에서 3시간 반응시켰다. 이 bead를 다시 세척한 후 gamma counter(Packard, U.S.A)에서 반응정도를 측정한 후 대조군 항원의 양과 비교하여 항원생성 저해능을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 Kruskal-Wallis one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계처리하였고 $p < 0.05-0.01$ 일 때 유의성이 있는 것으로 정의하였다.

결과 및 고찰

세포독성 – 항바이러스 효과를 검색할 시료의 용량

을 결정하기 위하여 시료처치 후 세포로부터 배양액내로 유리된 LDH 활성도를 측정하여 세포독성을 계산하였다. 세포주에 1% Triton X-100을 처리한 것을 LDH 최대 생성량으로 기준하였을 때 시료의 최대농도($512 \mu\text{g/ml}$) 처치로 인해 나타나는 세포독성은 6~15%였으며, 이는 양성 대조물질로 사용된 $10 \mu\text{M}$ dideoxycytidine(ddC)의 처치와 비교하여 독성이 크지 않은 것으로 나타났다. 세포독성을 측정하는데 있어서 Korba 박사 등은 neutral red dye 흡수 억제도로 측정하였으나⁹⁾ 이 방법과 MTT assay법은 생약재 수침액스가 가지고 있는 고유한 적색, 갈색의 색깔 때문에 본 실험의 세포독성 측정에 부적절하였다.

Virion HBV 증식 억제 – 4종의 ‘생약재 수침액스가 HepG2 2.2.15 세포에서 HBV의 증식을 억제하여 세포외로 virion의 방출을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 검액을 배양세포에 처리한 후 배양액을 수거하여 HBV DNA를 정량하였다(Fig. 1). 시료의 처치기간은 세포가 confluent하게 된 후 HBV DNA 배출이 급격히 증가되어 일정한 양의 바이러스가 지속적으로 검출되는 8일간으로 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 가자, 지유, 복분자, 대황 수침액스는 시험한 전 농도에서 농도의존적으로 HBV의 증식을 억제하였다(Fig. 1). 가자(*T. chebula*) 수침액스는 $64 \mu\text{g/ml}$ 에서 양성대조물질인 $10 \mu\text{M}$ ddC 보다 바이러스증식 억제효과가 우수하였으며 $256 \mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서는 바이러스의 증식을 현저하게 억제하여 세포배양액으로 유리되는 relaxed circular(RC) HBV DNA가 거의 관찰되지 않았다. 본 실험에서 사용된 ddC 처치농도 $10 \mu\text{M}$ 은 Korba 등⁹⁾에 의해 HepG2 2.2.15 세포에서 EC₉₀ (90% effective concentration: HBV의 증식을 90% 억제하는 약물 농도)가 $6 \mu\text{M}$ 로 보고됨을 참고로 하여 정하였으며, Fig. 1(lane PC)에서와 같이 $10 \mu\text{M}$ ddC는 HBV의 증식을 완전히 억제하여 배양액 내에서의 virion DNA band가 거의 관찰되지 않았다. 지유(*S. officinalis*)는 $128 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ddC 처치와 유사한 바이러스 증식 억제효과를 나타내었고, $256 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 바이러스 증식을 완전히 억제하여 DNA band가 거의 관찰되지 않았다. 복분자(*R. coreanus*)는 지유와 유사한 바이러스 증식 억제효과를 나타내었다. 대황(*R. palmatum*)은 $128 \mu\text{g/ml}$ 에서 바이러스 증식 억제효과가 ddC 처치 보다 더 현저함을 나타내었으나 $256 \mu\text{g/ml}$ 에서는 바이러스의 증식이 완

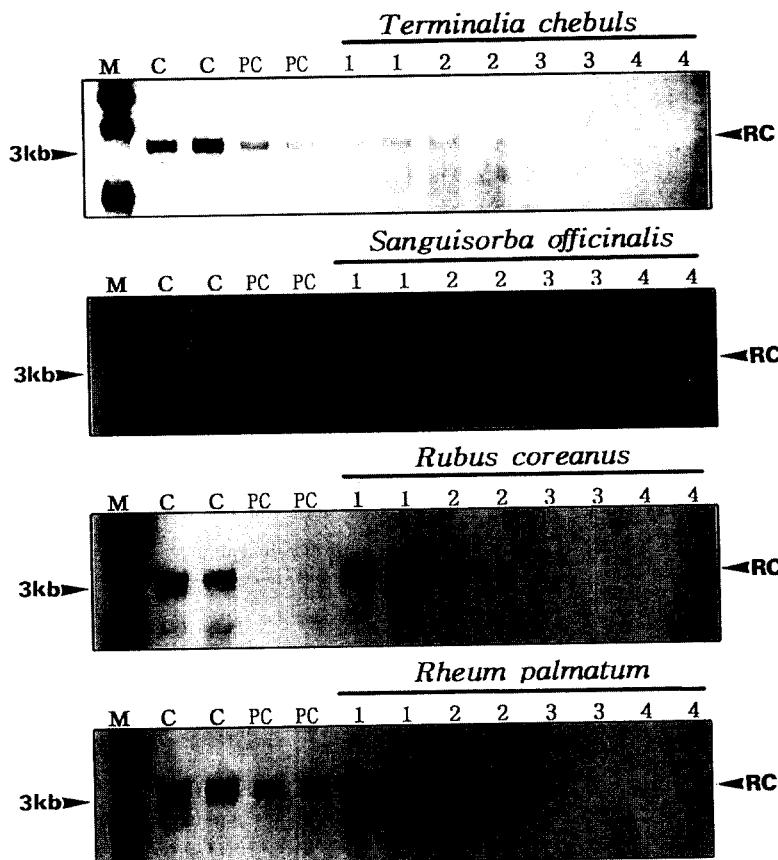


Fig. 1 – Effects of the aqueous extracts of 4 medicinal plants on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with 64 (lane 1), 128 (lane 2), 256 (lane 3), 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 4) of the aqueous extracts and 10 μM dideoxycytidine (lane PC) as a positive control for 8 days. Samples were loaded in duplicate. HBV DNA in culture media was harvested and analyzed by Southern blot hybridization. Lane C, not treated with test sample; M, size marker ($\lambda/\text{Hind III}$); RC, relaxed circular HBV DNA.

전히 억제되지 않아 DNA band가 관찰되었으며 최고 용량인 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 DNA band가 관찰되지 않았다. Fig. 1에서 검출된 HBV DNA band의 양을 densitometer 및 Bio-Profil image analysis program (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 측정하였을 때 가자 수침엑스의 HBV DNA 증식 억제에 대한 EC₅₀(50% effective concentration)가 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이었으며 지유, 복분자, 대황은 모두 EC₅₀가 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하인 것으로 나타났다. 정 등¹⁴⁾은 B형 간염환자의 혈청에서 분리한 HBV DNA polymerase의 저해 활성을 측정하였을 때 대황, 가자, 지유, 복분자의 순으로 억제 활성이 있다고 보고하였으나, 본 실험에서 2.2.15 세포주를 이용한 HBV virion의 증식 억제작용은 가자, 복분자, 지유, 대황의 순으로 나타났다. 이와

같은 상이한 순서는 효능검색 시스템이 다르기 때문인 것으로 사료되나 4가지 생약재 모두 현저한 항바이러스 효과를 나타내었다.

또한 정 등¹⁴⁾의 보고에서는 이들 4종 생약재 수침액 스가 B형 간염바이러스의 표면항원(HBsAg)에 결합능이 높은 것으로 나타났다. 이는 본 실험 중 HBV 증식 억제 효과를 측정할 때 배양액 내의 virion을 polyethylene glycol(PEG) 침전법으로 수거하는 단계에서 시료가 HBsAg과 결합하여 HBV 침전을 방해할 가능성이 있으므로 이를 검증하기 위해 시료를 처치하지 않은 대조군의 배양액과 생약재 시료를 섞어 37°C에서 2시간동안 둔 후 전술한 방법으로 바이러스를 분리하여 virion DNA의 양을 살펴본 결과, 이들 생약재 시료는 전 농도에서 HBV DNA band의 양에 아무런

Table I – Inhibition of HBsAg production by the aqueous extracts of medicinal plants in HepG2 2.2.15 cells

Botanical name(Chinese)	Concentration of the plant extracts ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	64	128	256	512
% inhibition of HBsAg production				
<i>Terminalia chebula</i> (诃子)	52.5 \pm 4.2*	90.6 \pm 1.2*	92.6 \pm 0.7*	95.8 \pm 0.9*
<i>Sanguisorba officinalis</i> (地榆)	5.5 \pm 0.5	33.1 \pm 1.4*	87.4 \pm 2.0*	96.4 \pm 0.6*
<i>Rubus coreanus</i> (覆盆子)	29.4 \pm 1.1*	68.4 \pm 3.3*	86.9 \pm 0.7*	95.9 \pm 0.7*
<i>Rheum palmatum</i> (大黃)	16.2 \pm 1.6	36.1 \pm 1.4*	61.5 \pm 0.9*	77.9 \pm 2.5*
dideoxycytidine (ddC, 10 μM)	14.4 \pm 4.1*			

The inhibition of HBsAg production was analysed by radioimmunoassay (RIA) and inhibition percentage was calculated using the following equation, $I(\%) = [1 - (T-B)/(N-B)] \times 100$ (I : inhibition of HBsAg production, T : cpm of treated group, N : cpm of non-treated group, B : background cpm). Values are mean \pm SE for 4 separate experiments.

*: Significantly different from control ($p < 0.01$)

영향을 주지 않는 것으로 나타났으며(data not shown), 따라서 시료가 HBs 항원과 결합할지라도 HBV 증식 억제효과 측정실험에는 영향을 주지 않을 것으로 사료되었다.

HBV 항원의 생성 억제 – 생약재 처치 후 세포배양액 내의 HBV 항원의 양을 측정한 결과를 Table I에 표기하였다. 가자, 지유, 복분자, 대황은 전 농도에서 농도의 존적으로 HBV 항원 생성을 억제하였다. 가자는 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 HBV의 표면항원 생성을 무처치군에 비해 52.5%로 억제하였으며 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 90.6%로 억제하였다. 가자는 다른 생약처치군에 비해 시험한 전 농도에서 가장 현저하게 억제효과를 나타냈으며 이는 생약재 처치 후 세포배양액 내로 방출되는 virion DNA의 증식 억제를 측정한 시험결과와 일치하였다. 저농도인 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 지유가 다른 생약에 비해 항원생성을 가장 미약하게 억제하였으나 다른 고농도에서는 대황이 가장 미약하게 억제하였다. 가자, 지유, 복분자는 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 85% 이상, 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 95% 이상의 항원생성 억제효과를 나타내었다. 양성대조약물인 ddC는 14.4%의 낮은 HBs 항원생성 억제도를 나타내었고 이는 Kruining 등¹¹⁾의 보고와 일치하였다. 이 같은 결과는 ddC가 세포질에서 HBV genome의 복제는 저해하나, HBV 전사체(mRNA)로부터 생성된 HBs 항원이 endoplasmic reticulum의 세포막에서 HBV 유전자 없이 항원끼리 self assembly 되어 fila-ment 및 sphere 형태로 골지체를 거쳐 세포외로 배출되기 때문에¹⁷⁾ HBV 항원 생성의 억제효과는 미약한 것처럼 나타나는 것으로 사료된다. HBe 항원의 양을 측정한 결과는 4종의 생약재 모두에서 치치 농도군과 대조군과의 변동이 심하여 HBe 항원의 생성 억제도를 측정할 수 없었다.

가자는 전통 한약처방에서 간염이나 황달의 치료에

사용되지는 않았다. 그러나, 최근 가자의 추출물이 제1형 hepes simplex virus(HSV)와 cytomegalovirus(CMV)에 대해 항바이러스 활성을 나타내며^{18,19)} 인간 immunodeficiency virus(HIV)의 역전사 효소의 활성을 억제한다고 보고되었다.²⁰⁾ 특히 DHBV를 감염시킨 북경오리에서 4종 생약재중 가장 우수한 항바이러스 효과를 나타내었으며,¹⁵⁾ 본 실험에서도 동일한 결과를 나타냈다. 지유, 복분자, 대황은 역시 전통적으로 간염이나 황달의 치료에 사용되지 않았으며, 정 등¹⁵⁾이 DHBV의 항바이러스 활성에 대한 보고와 본 실험에서 인간 HBV에 대한 증식억제 작용을 나타낸 결과로 이를 생약재들의 항바이러스 활성이 새롭게 밝혀지고 있다.

이러한 결과들로 4종의 생약재 수침액스 내에는 HBV의 증식을 억제하는 활성 성분이 존재할 것으로 사료되고 그 중 가자의 수침액스가 가장 현저한 억제효과를 나타냈으며 각 생약재의 항HBV 활성 성분의 분리 및 동물 실험에 대한 연구를 계획 중이다.

결 론

HBV가 도입된 HepG2 2.2.15 배양세포에서 가자(*T. chebula*), 지유(*S. officinalis*), 복분자(*R. coreanus*), 대황(*R. palmatum*)의 수침액스를 처치하여 HBV 증식에 미치는 영향을 세포배양액에서 HBV virion 생성 및 항원의 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가자, 지유, 복분자, 대황은 모두 HepG2 2.2.15 세포주에서 세포배양액 내 HBV의 증식을 억제하여 농도 의존적으로 virion의 방출을 저해하는 효과를 나타내었으며 그 중 가자는 4종 생약재 중 가장 우수한 항HBV 효과를 나타내었다.
2. 4종 생약재 모두는 전체 치치농도에서 농도의존

적으로 HepG2 2.2.15 세포의 HBs 항원 생성 억제작용을 나타내었으며 가자, 복분자, 대황, 자유의 순서로 현저한 억제작용을 나타내었다.

따라서 상기 4종의 생약재 수침엑스에는 HBV의 종식을 억제하는 활성 성분이 존재할 것으로 생각되며 본 실험결과가 항HBV 치료제 개발에 활용될 수 있으리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업 지정과제 연구비(HMP-98-P-0036) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Sudo, K., Konno, K., Shigeta, S. and Yokota, T. : Colorimetric assay system for screening antiviral compounds against hepatitis B virus. *Microbiol. Immunol.* **40**(2), 153 (1996).
- 2) Tiollas, P., Pourcel, C. and Dejean, A. : The hepatitis B virus. *Nature* **317**, 487 (1985).
- 3) Wright, T. L. and Lau, J. Y. N. : Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* **342**, 1340 (1993).
- 4) Yoffe, B. and Noonan, C. A. : Progress and perspectives in human hepatitis B virus research. *Prog. Med. Virol.* **40**, 107 (1993).
- 5) Robinson, W. S. : Molecular events in the pathogenesis of hepanavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu. Rev. Med.* **45**, 279 (1994).
- 6) Gerin, J. L. : Antiviral agents for hepatitis B. *Hepatology* **14**, 198 (1991).
- 7) Popper, H., Roth, L., Purcell, R. H., Tennant, B. C. and Cerin, J. L. : Hepato-carcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 866 (1986).
- 8) Korba, B. E. and Milman, G. : A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* **15**, 217 (1991).
- 9) Korba, B. E. and Gerin, J. L. : Use of a standardized cell culture assay to assess activity of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* **19**, 55 (1992).
- 10) Jansen, R. W., Johnson, L. C. and Averett, D. R. : 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 (1993).
- 11) Kruining, J., Heijtink, R. A. and Schalm, S. W. : Antiviral agents in hepatitis B virus transfected cell lines: inhibitory and cytotoxic effect related to time of treatment. *J. of Hepatology* **22**, 263 (1995).
- 12) 전통의학연구소편 : 본초약재도감, 성보사, 서울 (1994).
- 13) 정보섭, 신민교 : 도해향약대사전(식물편), 영림사, 서울 (1998).
- 14) Chung, T. H., Kim, J. C., Kim, M. K., Choi, S. C., Kim, S. L., Chung, J. M., Lee, I. S., Kim, S. H., Hahn, K. S. and Lee, I. P. : Investigation of Korean plant extracts for potential phytotherapeutic agents against B-virus hepatitis. *Phytotherapy Res.* **9**, 429 (1995).
- 15) Chung, T. H., Kim, J. C., Lee, C. Y., Moon, M. K., Choi, S. C., Lee, I. S., Kim, S. H., Hahn, K. S. and Lee, I. P. : Pothential antiviral effects of *Terminalis chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Reum palmatum* against duck hepatitis B virus (DHBV). *Phytotherapy Res.* **11**, 179 (1997).
- 16) Kim, Y. and Kang, H. S. : Cloning and expression of hepatitis B virus surface antigen gene. *Kor. Biochem. J.* **17**, 70 (1984).
- 17) Harrison, T. J. and Zuckerman, A. J. : *The Molecular Medicine of Viral Hepatitis*, John Wiley & Sons press, Royal Free Hospital School of Medicine, London, UK. p. 63 (1997).
- 18) Kurokawa, M., Nagasaka, K., Hirabayashi, T., Uyama, S., Sato, H., Kageyama, T., Kadota, S., Ohshima, H., Hozumi, T. and Namba, T. : Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.* **27**, 19 (1995).
- 19) Yukawa, T. A., Kurokawa, M., Sato, H., Yoshida, Y., Kageyama, S., Hasegawa, T., Namba, T., Imakita, M., Hozumi, T. and Shiraki, K. : Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. *Antiviral Res.* **32**, 63 (1996).
- 20) el-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Kusumoto, I. T., Kadota, S., Hattori, M. and Namba, T. : Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **43**, 641 (1995).