

# 數種의 韓藥材가 B형 肝炎바이러스 增殖抑制에 미치는 效果

조 홍 건\* · 안 덕 균\* · 이 송 득\*\*

## ABSTRACT

### Effects of Several Herbal Medicines on the Replication of Hepatitis B Virus

Cho, Hong Kun\* · Ahn, Duk Kyun\* · Lee Song Deuk\*\*

\*Department of Herbal Medicine, School of Oriental Medicine, Graduate School of Kyung Hee Univ

\*\*Korea Food and Drug Administration

This study was performed to investigate an anti-HBV activities of the aqueous extracts from 10 Korean herbal medicines in the HepG2 2.2.15 cell culture system and the results were as follows :

1. The extracts of 6 plants (Herba Artemisiae Capillaris, Radix et Rhizoma Rhei, Cortex Cinnamomi, Fructus Chebulae, Fructus Rubi and Radix Rubi) decreased, significantly and dose-dependently, the levels of extracellular HBV virion in the concentrations (10, 100, 500 and 1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) tested.
2. However, others (Radix Isatidis, Lignum Sappan, Herba Lysimachiae and Fructus Lycii) did not show any effect either on the replication of HBV or on the levels of virion DNA in the culture media of HepG2 2.2.15 cell.

---

\* 경희대학교 한의과대학 본초학교실

\*\* 식품의약품 안전청

3. Among the 6 plants which showed the inhibitory potency on the production of extracellular HBV virion, Radix et Rhizoma Rhei, Cortex Cinnamomi, Fructus Chebulae, Fructus Rubi and Radix Rubi except Herba Artemisiae Capillaris also showed the inhibition of the replication of intracellular HBV DNA in the range of 100~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Considering the above results, it is thought that 6 plants(Herba Artemisiae Capillaris, Radix et Rhizoma Rhei, Cortex Cinnamomi, Fructus Chebulae, Fructus Rubi and Radix Rubi) possess the anti-HBV activities in the HepG2 2.2.15 cell culture system. We thus suggest that these plants possess a potential as a therapeutic agent for the chronic viral hepatitis. These results might be useful as a basic data for the development of the new preventive drugs for HBV diseases.

## I. 緒論

한의학에서는 肝炎이라는 病名이 사용되지는 않았지만 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷, 肝熱, 勞倦傷 등의 證<sup>1)</sup>이 이에 속하는 것으로 思料되며, 바이러스성 간염에 대해서는 黃疸에 관한 내용이 주로 適用되고 있다.<sup>2,3)</sup> 『黃帝內經』의 素問刺熱論<sup>4)</sup>에서는 “肝熱病은 먼저 小便이 黃色으로 변하며 腹痛, 多臥, 身熱 等症을 發한다”라고 하여 간염과 비슷한 증세를 찾아볼 수 있으며, 또 『東醫寶鑑』<sup>5)</sup>에서는 “傳染되는 黃疸은 瘟黃이라 하는데 많이 죽는다”라고 간질환의 감염상태를 설명하고 있다. 치료에 있어서도 張仲景의 『傷寒論』<sup>6)</sup>에서 이미 肝炎 즉, 黃疸을 茵陳蒿湯, 茵陳五苓散 등으로 치료한 기록이 전해지고 있다. 한의학에서는 지금과 같이 바이러스성 간염이라고 분류하지는 못했으나 외관상에 나타나는 병의 증상을 관찰해 간염을 파악하고 치료했던 것으로 생각된다.

肝炎(hepatitis)은 肝에서의 炎症을 수반하는 症狀을 말하며, 주로 바이러스에 감염되어 발병되나, *Entamoeba histolytica* 감염에 의한 아메바성肝炎(amoebic hepatitis), 기생충감염에 의한 내부기생충성간염(enzootic hepatitis), 신생아간염(neonatal hepatitis, 신생아황달) 및 약물에

의한 부작용 등에 의해서도 일어날 수 있으며, 그 續發症으로 慢性活動性肝炎(chronic active hepatitis)이 유발될 수도 있다. 감염유발 바이러스로는 HAV(A형), HBV(B형), HCV(C형), HDV(D형), HEV(E형) 및 HGV(G형) 등이 보고되어 있고, 이들 중에서 HBV만 DNA 바이러스이며 나머지는 모두 RNA 바이러스이다.<sup>61,62)</sup>

A형은 전세계적으로 분포한다. A型 肝炎(hepatitis A)의 증상은 前驅期에 발열, 전신권대 및 각종 위장증상(식욕감퇴, 구역, 복부불쾌감, 구토) 등을 보이며, 황달, 가려움, 암갈색 소변, 회백색 대변 등의 증후를 보인다. 황달증상은 대개 2 주일 이내에 절정에 달하지만 심하지는 않으며, 광범위한 肝괴사가 일어날 수도 있으나 대다수의 환자는 임상증세가 뚜렷하지 않거나 경미한 감기증세를 보인다. B형 간염은 전 세계에서 300만명 이상이 감염되어 있고<sup>62)</sup>, 극동아시아, 동남아시아, 사하라사막 주변, 태평양 군도 및 아마존유역 등에 흔하며, 특히 극동지역에서는 HBV에 의한 감염이 만연되어 있고, 한국을 포함한 극동지역과 아프리카에서는 전인구의 10% 이상이 保菌者이다.<sup>61)</sup> 세계보건기구(WHO)의 통계에 의하면 HBV는 9 번째의 사망원인이 되는 질환이며,<sup>63)</sup> 수혈자, 만성감염자와의 성교자, HBV에 감염된 산모의 출생아, 비

경구적 상습 약물복용자, 혈액투석 환자, 간병인 등이 주로 HBV에 감염되고 있다.<sup>64)</sup> B형 간염 바이러스는 肝조직세포를 숙주로 하는 크기가 45nm 정도인 DNA바이러스로,<sup>65)</sup> B형의 특유항원인 HBsAg(hepatitis B surface antigen) 및 HBcAg(hepatitis B core antigen)을 가지고 있고, 표면항원인 HBsAg의 유형에 따라 adw, ayw, adr 및 ayr 등 네가지의 亞型이 알려져 있으며, 한국을 포함한 극동아시아 지역에 가장 흔한 형은 adr형이다.<sup>66,67)</sup> B型 肝炎의 증후로는 前驅期에 발열, 전신쇠약, 식욕부진, 구역질 및 구토 등이 나타날 수 있고, 황달이 나타나면 이러한 증상은 감퇴되며, 두드러기, 혈관부종, 관절염이 유발될 수 있고 드물게는 사구체신염이 나타나기도 한다. 대다수의 환자는 3-4 개월만에 회복되어 HBs항원이 음성으로 되지만, 많은 환자(20~40%)에서 慢性化되어 肝硬化 및 肝癌으로 진행되는데,<sup>68)</sup> 이 경우에는 정상인에 비해 100배나 높은 肝癌 發病率이 보고되고 있다.<sup>69,70)</sup> D형은 동남아시아에 많이 분포하며, 흔히 B형과 동시 또는 중복하여 감염되나, D 및 E형은 한국에는 거의 없다.<sup>61,62)</sup>

현재까지 바이러스성 간염에 사용가능한 임상적 약물처방으로 면역조절물질인 interferon-alpha(INF- $\alpha$ )가 있으나, 이것은 가장 성공적인 연구에서조차 약효가 뛰어나지 못함이 보고된 바 있다.<sup>71,72)</sup> 최근 lamivu-dine과 penciclovir가 만성 B형 간염의 치료약물로서 임상 3상 실험에 들어가 있으며,<sup>73)</sup> 이들 항바이러스성 핵산 유도체들(analogues) 대부분은 약물의 비특이적인 체내 분포로 인해 神經筋毒性, 肝毒性, 신부전 등의 심각한 부작용이 발현되고 있다.<sup>72)</sup>

국내에서도 간염의 예방 및 치료를 위하여 HBV 백신(vaccine)이 시판되고 있으나, 高價의 약품가격 및 효용성에 대한 수요자의 인식부족으로 인하여 효율적인 예방접종이 이루어지지 않고 있다.<sup>74)</sup> 이에 따라 HBV의 복제를 효과적으로 억제하는 약물의 개발이 현재에도 활발히

진행되고 있다.

한편, B형 간염바이러스는 사람을 비롯 침팬지, woodchuck 등 한정된 동물의 肝에서만 증식할 수 있는 특성으로 인하여, woodchuck에 바이러스를 감염시킨 동물모델이 바이러스성 간염치료제의 효력을 검색하는데 활용되고 있으나, 이는 많은 비용이 들기 때문에 일차 약효 검색법으로는 적합하지 못하다는 견해가 제기된 바 있다.<sup>75,76)</sup> 이에 따라 미국 Georgetown대학의 Korba 등은 손쉽고 경제적인 *in vitro* 약효검색 시스템을 확립하고자 수 년동안 연구한 결과, HBV유전자를 인간의 간암세포주 HepG2에 도입하여 감염을 유발하는 HBV가 증식 및 생산되는 HepG2 2.2.15 세포주(cell line)를 개발하고, 이 배양세포에서 HBV의 증식(replication)을 측정함으로써 시험물질에 대한 약효를 검색할 수 있는 세포배양 약효검색 시스템을 개발하였으며,<sup>77,78)</sup> Jansen 등<sup>79)</sup>은 항HBV효력 검색에 있어서 HepG2 2.2.15 세포주의 유용성에 대하여 보고한 바 있다. 이에 따라 신뢰성있는 HepG2 2.2.15 배양세포를 이용한 약효검색시스템을 활용하는 HBV의 유전자증식에 대한 연구가 급진전 되리라고 思料된다.

현재까지 肝損傷 抑制效果가 보고된 처방으로는 胃苓湯,<sup>7)</sup> 茵陳蒿湯,<sup>8)</sup> 茵陳五苓散,<sup>7)</sup> 龍膽瀉肝湯,<sup>9)</sup> 加味茵陳五苓散,<sup>10)</sup> 柴胡清肝湯,<sup>11)</sup> 人蔘芍歸湯,<sup>12)</sup> 補肝湯,<sup>13)</sup> 瀉肝湯,<sup>13)</sup> 茵陳清肝湯,<sup>14)</sup> 防風通聖散,<sup>15)</sup> 清肝湯,<sup>16)</sup> 潰堅湯,<sup>17)</sup> 仙遺糧湯,<sup>18)</sup> 紫金錠,<sup>18)</sup> 甘豆湯,<sup>18)</sup> 柴苓湯,<sup>19)</sup> 加味柴陳湯,<sup>20)</sup> 逐水清肝湯,<sup>21)</sup> 平肝飲子,<sup>22)</sup> 生肝健脾湯,<sup>23)</sup> 對金飲子 및 對金飲子加玉蜀鬚,<sup>24)</sup> 生肝湯,<sup>25)</sup> 加減茵陳蒿湯,<sup>26)</sup> 清肝健脾湯,<sup>27)</sup> 補中益氣湯,<sup>28)</sup> 四物湯加味方,<sup>28)</sup> 清上補下丸,<sup>29)</sup> 梔子大黃湯 및 茵陳梔子湯,<sup>30)</sup> 赤楊生肝湯,<sup>31)</sup> 地榆生肝湯<sup>3)</sup> 등이 있으며, 肝損傷 抑制效果가 보고된 한약재로는 葛根,<sup>32)</sup> 大棗 및 五味子,<sup>32)</sup> 葛花,<sup>33)</sup> 丹蔘,<sup>34)</sup> 山棗仁,<sup>35)</sup> 三七根,<sup>36)</sup> 柴胡,<sup>37)</sup> 艾葉,<sup>38)</sup> 龍膽,<sup>39)</sup> 威靈仙,<sup>40)</sup> 人蔘,<sup>41,42,43)</sup> 茵陳,<sup>44)</sup> 薺苳,<sup>45)</sup> 黃芩<sup>46)</sup> 등이 있다. 그리고, 珍珠草

屬(genus *Phyllanthus*)은 臨床에서 유의한 항바이러스효과를 나타내었으며,<sup>80)</sup> 105 種의 한약재를 대상으로 간염바이러스의 유전자복제를 억제하는 정도와 표면항원의 결합능을 시험관에서 검색한 결과 15 種이 陽性的의 효과를 보인 바 있고,<sup>81)</sup> 地榆, 覆盆子, 大黃 등의 항바이러스효능도 報告된 바 있다.<sup>47)</sup>

上記한 方劑와 한약재들의 肝損傷 및 바이러스에 대한 효과를 고려할 때, 濕熱黃疸과 寒濕黃疸에 흔히 사용되는 板藍根, 茵陳蒿, 大黃, 金錢草, 肉桂, 枸杞子, 訶子, 蘇木, 覆盆子 및 倒生根 등은 간염치료제로서의 效能이 있을 것으로 사료된다. 이에 著者는 HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 *in vitro* system에서 上記한 한약재들이 B형 간염바이러스의 증식에 미치는 억제효과를 관찰하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

4.0%, 覆盆子 14.6%, 倒生根 8.9%)를 제조하여 실험재료로 사용하였다.

## 2. 實驗 材料의 吸光度 測定 및 HPLC 패턴 分析

한약재는 단일 성분이 아닌 다종다양한 성분을 함유하는 것이 특성인 점을 고려하여, 특정 조건에서 성분전체의 패턴을 비교하는 Total Pattern Recognition Method로 실시하는 것이 최근 천연물의 분석 동향이다. 이에 따라 최대 흡광과장에서의 패턴 분석을 실시하여 실험에 제공된 각 한약재 엑기스의 동질성을 확인하기 위해 각각의 수침엑기스를 메탄올에 녹여 파장 200~700 nm사이에서 파장을 변화시키면서 측정하였다. HPLC(High performance liquid chromatography) 패턴 분석을 실시하기 위해 동결건조엑기스 각각 100 mg을 정밀히 달아 66.7%의 메탄올에 녹여 최종용량이 15 ml가 되도록 조제한 후, 여과한 다음 1/10 배로 희석하여 시험액으로 사용하여 아래 조건으로 최대 흡광과장에서 측정하였다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 實驗 材料

실험에 사용한 재료는 시중 유통품인 板藍根(Radix Isatidis) 茵陳蒿(Herba Artemisiae Capillaris), 大黃(Radix et Rhizoma Rhei), 金錢草(Herba Lysimachiae), 肉桂(Cortex Cinnamomi), 枸杞子(Fructus Lycii), 訶子(Fructus Chebulae), 蘇木(Lignum Sappan), 覆盆子(Fructus Rubi) 및 倒生根(Radix Rubi)의 10종 韓藥材를 경동시장 명인당(서울 동대문구 제기동)에서 구입하여 경희대학교 본초학 교실의 감정을 받아 정선한 후 한약재 분량의 10배량에 해당하는 증류수(W/V)를 가하여 약탕기(대응약탕기, DWP-66000)에서 2시간동안 가열전탕하여, 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압, 농축한 다음, 동결건조시켜 한약재 건조엑기스(수율 : 板藍根 2.5%, 茵陳蒿 10.5%, 大黃 29.9%, 金錢草 6.3%, 肉桂6.5%, 枸杞子 24.4%, 訶子 37.8%, 蘇木

### - HPLC 실험조건 -

- Column :  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm, particle size 10  $\mu$ m)
- Mobile phase : acetonitrile/ acetic acid/ water혼합액(15/1/85)
- Detector : Waters 486 Tunable Absorbance Detector
- Flow rate : 2.0 ml/min,

### 3. 試藥 및 機器

#### 3-1. 試藥

- RPMI-1640 medium, fetal bovine serum

(FBS), trypsin-EDTA, penicillin, streptomycin, GENETICIN™(G-418): Gibco BRL社 (Grand Island, NY, U.S.A.)

- agarose: FMC社 (Rockland, U.S.A.)
- Hybond-N+ nylon membrane, proteinase K, ECL direct™ labelling detection Kit, Hyperfilm ECL: Amersham社 (Buckinghamshire, U.K.)
- plasmid purification kit, gel extraction kit: Qiagen社 (Hilden, Germany)
- dideoxycytidine(ddC): Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO, U.S.A.)
- T-75 flask, 24, 48-well culture plate: Nunc社 (Naperville, IL, U.S.A.)

### 3-2. 機器

- UV/Vis spectrophotometer : Cary® 1E, Varian Co. (Australia)
- Ultracentrifuge : Centrikon® T-2080, Kontron Co. (U.S.A.)
- Hybridization incubator : Robbins Scientific Co. (U.S.A.),
- Ultraviolet crosslinker : CL-1000® Model 2000, UVP Co. (U.S.A.)
- Rotary Evaporator : RE-51, Yamato Co. (Japan)
- ELISA reader : Molecular Devices Co. (U.S.A.)

## 4. 實驗 方法

### 4-1. 세포주(cell line)

실험에 사용한 세포주는 HepG2 2.2.15으로써, 미국 Georgetown대학 의과대학의 Korba 박사가 인간의 간암세포의 일종인 HepG2 세포에 간염유전자(HBV gene)를 도입하여 간염을 유발하는 HBV가 증식되도록 개발한 것을 분양받

아 사용하였다. 분양받은 세포주는 도착 즉시 37°C로 예열된 水槽에서 解凍하여 5 mM HEPES, 5% FBS(fetal bovine serum) 및 항생제(100 units/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin)가 포함된 RPMI-1640 세포 배양액(RP-5AB)과 혼합한 다음, 배양용기(T-75 flask, Nunc)에 넣어 온도를 37°C로 조정된 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, 5%)에서 배양하였다.

### 4-2. 세포의 계대배양 및 저장

指數的 증식상태를 지나 충분히 증식된 세포를 배양용 플라스크의 배지를 완전히 제거한 후 37°C로 예열된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS, Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>-free)으로 두 번 세척한 다음, 0.05% trypsin 용액 2 ml를 첨가하여 37°C 배양기에 5분간 둬으로써 세포들이 완전히 분리되게 하였다. 플라스크의 바닥에서 분리된 세포는 항생제를 넣지 않은 RPMI-1640 배지(RP-5) 5 ml를 플라스크에 넣어 피펫을 사용하여 조심스럽게 배지를 흡입 및 배출함으로써 완전하게 세포를 떼어내어 50 ml 용량의 튜브(cornical tube)로 옮겼다. 이 세포용액에 RP-5 배지 5 ml를 다시 첨가하여 잘 섞은 후 3개의 배양용기(T-75 flask)에 고르게 分株하여 계대배양을 실시하였다.

몇 번의 증식과 계대배양을 거친 세포들은 각 배양용기별로 전술한 방법으로 배양용기에서 분리하여 다음과 같은 방법으로 저장하였다. 세포용액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 상등액은 버리고 남은세포를 냉동보관용 배지(10% dimethylsulfoxide, 90 % heat inactivated FBS)에 부유시킨 후, 배지를 첨가하여 세포의 농도를 7.5×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정하였다. 이와 같이 준비된 세포는 냉동용 용기(vial)에 담아서 -20 °C에서 2시간 동안, 그리고 -70°C에서 4시간 동안 보관하여 완전히 동결시킨 후 액체질소통에 넣어서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 4-3. B형 간염바이러스 유전자 탐침(probe)의 준비

HBV 유전자중 "adr" 아형은 pBR322 vector에 cloning된 pHBV315를 이화여대 약학대학 김길현 교수로부터, 그리고 "adw" 아형은 pGAM에 cloning된 것을 고려대학교 생명공학원 안병윤 교수로부터 각각 분양받았다.<sup>82)</sup>

분양받은 유전자를 각각 *E. coli* DH5a에 CaCl<sub>2</sub> 방법<sup>83)</sup>으로 형질전환 (transformation)하여 plasmid를 증폭하였고, plasmid purification kit (Qiagen<sup>TM</sup>)를 사용하여 분리하였다. 분리된 plasmid를 제한효소 *Bam*H I으로 절단한 다음, 1% agarose gel에 전기영동하였으며, 전기영동된 gel에서 각각의 HBV 유전자를 gel extraction kit(Qiagen<sup>TM</sup>)를 사용하여 분리, 정제하여 Southern blot 분석 실험에 탐침으로 사용하였다. 2가지 아형의 유전자들을 각각 탐침 (probe)으로 합성한후 Southern blot 분석실험을 수행하여 탐침으로서의 효율성을 서로 비교하였다.

#### 4-4. 세포의 HBV virion의 측정

HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 한약재들의 항바이러스 효과 검사는 세포주를 공여한 Korba 박사의 방법<sup>77)</sup>을 기본으로 약간 변형하여 실시하였으며 그 구체적인 방법은 다음과 같았다.

##### 4-4-1. 검액의 조제

세포에 처리할 한약재 검액을 조제하기 위하여 한약재 건조엑기스를 200 mg/ml의 농도로 물에 녹여 20분간 방치한 다음, 이를 초원심분리기로 15 °C에서 30,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 가용성분인 상층액을 얻었다. 이 상층액을 미세여과지(pore size 0.22 μm, nylon syringe filter)에 투과시켜 시료로 준비한 다음, 멸균한 물로 희석시켜 2, 20, 100, 200 mg/ml의 4가지 농도로 준비하여 항간염바이러스효과 검사에 사용하였다.

##### 4-4-2. 검액의 처치

검액을 처리할 세포주는 전술한 방법으로 증식, 계대배양하여 양을 충분히 확보한 후 사용하였다. Flask 배양기의 바닥에서 분리한 세포를 RP-5A 배양액으로 희석하여 1.77×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 조정된 다음, 24 well 세포배양판에 1 ml/well 씩 분주한 후에, 온도가 37 °C로 조정된 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하면서 세포의 증식 정도를 位相差顯微鏡으로 수시로 관찰하였다. 세포가 충분히 자랄 때까지 이들 간격으로 배지를 갈아주고, 세포가 confluent한 상태가 되면 배지를 RP-5G 배양액 (RP-5 containing 330 μg/ml G-418)으로 바꾸어 4일 동안 더 배양한 다음 항-HBV 효능 검색에 사용하였다.

한약재 검액들은 4가지 농도 즉, 2, 20, 100, 200 mg/ml로 준비된 stock을 48 well 세포배양판(Costar<sup>®</sup>, U.S.A.)의 각 well에 순서대로 5 μl 씩 분주한 후 37°C로 예열한 RP-2A(2 % FBS)를 1 ml씩 첨가하였다(1/200 희석). 이렇게 각 검액을 희석시켜서 한약재의 최종 처치 농도가 10, 100, 500, 1,000 μg/ml로 조절된 배양액을 세포(HepG2 2.2.15 세포주) 처치 바로 전에 준비하였다. 또한 양성대조약물로는 dideoxycytidine을 2 mM의 농도로 준비한 다음, 배양액으로 최종처치농도를 10 μM이 되도록 희석하여 사용하였다. 각 검액이 포함된 세포배양액 1 ml를 세포에 이들 간격으로 10일간 처리하였다.

세포의 배양판 분주와 한약재 검액의 처리는 2 배數(duplicate)로 2 회 실시하였다.

##### 4-4-3. 세포의 virion의 수집

한약재에 의한 세포의 virion DNA(viral deoxyribonucleic acid)의 방출 저해능을 검색하기 위하여, 세포(HepG2 2.2.15 세포주)에 검액을 처리한 날로부터 8일째와 10일째가 되는 날에 세포배양액을 각 well에서 1ml 씩 수거하여 원심분리(5,000 rpm, 10 min) 하였다. 상등액

800  $\mu$ l를 새로운 튜브에 옮기고, 200  $\mu$ l의 5배액 PEG 용액 (50 % PEG 8000, 0.6 M NaCl, 4°C)을 각 튜브에 첨가하여 교반기로 잘 섞어 준 후, 얼음에 2시간 동안 두었다. 그 후 튜브를 다시 원심분리(14,000 rpm, 30 min at 4 °C)한 다음, 흡입펌프(suction pump)를 사용하여 상등액을 제거하고, 튜브를 잠시 방치하여 잔여 PEG 용액을 바닥에 모은 후 침전물이 떨어지지 않게 조심스럽게 완전히 제거하였다. 이후 각 튜브에 세포파괴용액 (1X lysis solution; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) 30  $\mu$ l씩을 첨가하여 침전물을 완전히 녹인 다음, 온도가 42°C로 예열된 배양기(heating block)에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 6  $\mu$ l의 DNA loading dye 용액(6 X solution)<sup>83)</sup>을 첨가하여 섞은 다음, 간단히 원심분리하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 4-4-4. Southern blot 분석

세포배양액으로부터 수집된 virion DNA를 agarose gel(0.8%)에 lane당 15  $\mu$ l씩 전기영동하였다. 전기영동은 평판전기영동기(Horizontal 10×14 agarose gel apparatus, GIBCO BRL Co.)를, 완충용액으로는 1 × TAE buffer<sup>83)</sup>를 사용하였으며, 전원을 100 Volt로 조절된 상태에서 염색액(bromophenol blue)이 gel 길이의 4/5 정도 이동할 때까지 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 표면이 잠길 정도로 denaturation 용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 담구어 교반기에서 30분간 흔들어 준 후, 증류수로 gel을 행구고 같은 양의 neutralization 용액(0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl)에 담구어 20 분간 흔들어서 주었다. 이후 gel 속의 DNA는 capillary transfer 방법<sup>83)</sup>을 이용하여 blotting용 여지(Hybond<sup>TM</sup>-N+ nylon membrane)로 옮겼다. HBV DNA가 옮겨진 membrane을 5× SSC(20 × SSC = 0.3M sodium citrate, 3M NaCl,

pH7.0)로 간단히 행군 후 공기중에 10분간 말리고 ultraviolet crosslinker를 사용하여 700 mJ/cm<sup>2</sup>로 UV를 照査하여 DNA를 고정시켰다.

세포배양액내의 HBV virion의 검출에는 ECL direct<sup>TM</sup> labelling and detection system (Amersham Co.)을 이용하였다. 탐침용 DNA에 효소(HRP, horse radish peroxidase)를 표지시켜 membrane상의 유전자들과 hybridization시킨 다음, 효소반응에 의하여 생성되는 빛을 film에 감광시킴으로써 목표 유전자의 양과 위치를 검출하는 Southern blot 분석법으로 전과정을 Amersham社의 지침(manual)에 따라 실시하였다.

#### 4-5. 세포내 HBV의 증식억제 측정

한약재들의 세포내 HBV 증식억제 효과를 알아보기 위해 전술한 세포의 HBV virion 量的 측정시와 동일한 방법으로 세포주에 한약재 검액을 처치한 후 세포를 용해하여 DNA를 추출한 다음, Southern blot 분석을 수행하였다. 세포를 6 well 세포배양판에 10<sup>6</sup> cells/well의 농도로 분주하고 confluent할 때까지 배양하였다. 이후 한약재 검액을 배양액에 2일 간격으로 8일간 처치하고 Kawanishi 등이 보고한 방법<sup>84)</sup>에 따라 세포에서 전체 DNA를 추출하였다. 세포의 용해는 각 well에 500 $\mu$ l의 cell lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM EDTA, 1 % SDS, 0.5 mg/ml proteinase K)를 넣어 37°C에서 하루 밤 동안 배양하였다. 세포 용해액은 모아 각각 튜브로 옮기고, RNase A를 0.1 mg/ml의 농도로 첨가하여 65°C에서 30분간 배양한 후 동일량의 phenol-chloroform (1:1)으로 추출한 다음, 2배 량의 ethanol을 넣어 DNA를 침전시켰다. 침전물은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA)로 녹여 UV 분광광도계로 정량하였다. 5  $\mu$ g의 DNA를 1.2% agarose gel에서 전기영동한 다음, 전술한 방법과 동일하게 blotting과

crosslinking을 실시하였고, ECL direct labelling and detection kit 를 사용하여 Southern blot 분석을 실시하였다.

### Ⅲ. 結果 및 考察

#### 1. 韓藥材에 대한 文獻的 考察

한의학에서는 肝炎이라는 病名이 사용되지는 않았지만 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 肝熱, 勞倦傷 등의 증상이 간염의 증후와 유사하다고 생각되며, 그 중에서도 黃疸증상이 바이러스성 간염에서 나타나는 증후들과 부합되는 바가 많기 때문에 바이러스성 간염에 대해서는 黃疸에 관한 내용이 주로 適用되고 있다.<sup>2,3)</sup> 그 주된 病因은 濕熱이며 이밖에도 寒濕, 癆熱, 蓄血 등을 列舉할 수 있다.<sup>3)</sup> 濕熱이란 서양의학적 개념에서 炎症 상태와 유사하며 이 濕熱을 제거한다는 것은 抗炎, 抗菌作用의 일환으로 볼 수 있다.<sup>48)</sup>

肝疾患과 관련된 最初의 記錄으로는 『黃帝內經』의 素問 刺熱論<sup>4)</sup>에는 “肝熱病은 먼저 小便이 黃色으로 變하며 腹痛, 多臥, 身熱 等證을 發한다”고 하였고, 平人氣象論<sup>4)</sup>에서는 “小便이 黃赤色으로 變하며, 顏色이 黃色으로 變하는 것은 黃疸病이다” 라 하였으며, 靈樞 論疾診尺論<sup>49)</sup>에서는 “身痛하고 色이 微黃하며 齒垢黃하고 爪甲上黃한 것은 黃疸이다”라 하여 肝炎의 症狀과 黃疸에 대한 病理學的 所見을 밝히고 있다. 그리고 張仲景<sup>6)</sup>이 언급한 “傷寒發黃” 및 黃疸을 茵陳蒿湯, 茵陳五苓散 등으로 치료한 기록, 巢<sup>50)</sup>의 “瘴氣候, 溫病變成黃候, 時期變成黃候, 傷寒變成黃候”, 李<sup>51)</sup>의 “時行疫癘가 黃疸을 일으키면 豫候가 극히 不良하여 死亡率이 높다”, 沈<sup>2)</sup>의 “天行疫癘가 있는데 黃疸이 나타나는 것을 瘟黃이라고 하는데 殺人이 가장 빠르다”, 『東醫寶鑑』<sup>5)</sup>의 “傳染되는 黃疸은 瘟黃이라 하는데 많이 죽는다” 등은 모두 傳染性肝炎을 示唆한다고 볼 수 있다.

현재까지 肝損傷에 대한 韓方藥物의 실험적인 연구가 진행되어 그동안 茵陳蒿湯, 茵陳五苓散, 加減胃苓湯, 生肝健脾湯, 清肝湯, 生肝湯 등 다양한 處方을 중심으로 生化學的, 組織學的 效能에 대한 檢證이 이루어져 왔는데 특히 生肝健脾湯, 生肝湯 등은 肝炎을 비롯한 각종 肝疾患患者에 대한 臨牀的 效能이 우수한 것으로 보고된 바 있다.<sup>23,25)</sup> 이들 方劑는 대개 茵陳을 主材로 하는 處方인데 茵陳은 清熱, 利濕, 退黃의 要藥으로 利膽作用과 保肝作用이 밝혀져 急·慢性 肝疾患과 膽道疾患 등에 茵陳을 主藥으로한 處方들이 많이 活用되고 있다. 이와 같이 臨牀 應用頻도가 높은 것과 또한 문헌상 기록되어 있는 效能 및 최근 실험적으로 藥理作用이 밝혀진 것을 통해 肝炎治療劑로 有意性이 있을 것으로 기대되는 板藍根을 포함한 10종의 韓藥材를 選定하였다.

본 연구에 사용된 韓藥材의 本草學的 特性 및 效能은 다음과 같다.

板藍根은 十字花科 植物인 대청(*Isatis tinctoria* L.)의 뿌리를 말린 것으로 苦寒하고 肝, 胃, 心經으로 들어간다<sup>52,53,54)</sup>. 효능을 보면, 『本草藥材圖鑑』<sup>52)</sup>에서는 喉痺, 大頭瘟疫, 丹毒, 癰腫 등을 治한다고 하였고, 『韓方醫藥大事典』<sup>53)</sup>에서는 小兒急驚風, 耳下腺炎, 丹毒, 大頭瘟病, 肺炎, 流行性結膜炎, 扁桃腺炎, 流行性感氣, 急性氣管支炎, 口內炎, 皮膚瘡癩 등을 治한다고 하였으며, 『本草綱目』<sup>54)</sup>에서는 熱毒痢, 黃疸, 喉痺, 丹毒, 時氣頭痛, 大熱口瘡, 心煩悶, 渴疾口乾 등을 治한다고 하였다. 또한 『中藥大辭典』<sup>55)</sup>에서는 清熱, 解毒, 涼血의 효능이 있어 治肝炎方으로 판남근 37.5g을 달여 복용하면 肝炎을 치료한다고 하였고, 『中草藥學』<sup>56)</sup>에서는 大頭瘟毒, 熱毒斑疹, 咽喉腫痛 등을 治하고 최근 들어 傳染性肝炎 치료에 많이 사용된다고 하였다. 그리고 抗菌, 抗바이러스, 解毒作用 등이 있으며 抗菌시험에서는 枯草菌, 황색포도상구균, 대장균, 티프스균, 赤痢菌, 腸炎菌 등에 대하여



모두 抑制作用이 있다<sup>57,58)</sup>는 보고가 있다.

茵陳蒿는 菊花科 식물인 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunb.)의 지상부분을 말린 것으로, 苦辛하고 涼하며 肝, 脾, 膀胱經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 淸熱, 利濕의 효능이 있어 濕熱黃疸, 小便不利, 風瘍瘡疥를 치료하고 주로 風濕寒熱邪氣, 熱結黃疸를 치료한다<sup>55,59)</sup>. 그리고 利膽, 解熱, 血壓降下, 利尿作用 등이 있으며 抗菌試驗에서 간염바이러스, 결핵균, 枯草菌, 티프스균, 인플루엔자 바이러스, 피부병의 病原性絲狀菌에 대해 강한 抑制작용이 있다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

大黃은 마디풀과에 속하는 掌葉大黃(*Rheum palmatum* L.)의 根 및 根莖을 말린 것으로, 苦하고 寒하며 胃, 大腸, 肝經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 攻積導滯, 瀉下涼血, 行瘀通經의 효능이 있어 寒熱便秘, 譫語發狂, 食積痞滿, 細菌性下痢의 初期症狀, 裏急後重, 瘀停經閉, 積聚, 時行熱疫, 急性腹膜炎, 吐血, 鼻出血, 肝炎, 膽囊炎, 膽石症, 水腫, 淋濁, 血尿, 火傷 등을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 瀉下, 抗菌, 抗腫瘍, 通經, 利尿作用 등이 있다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

金錢草는 報春花科 식물인 過路黃(*Lysimachia christinae* Hance)의 全草를 말린 것으로, 甘鹹하고 微寒하며 膀胱, 肝, 腎經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 淸熱, 利尿, 強壯, 鎮咳, 消腫의 효능이 있어 黃疸, 전립선염, 腎臟炎, 膀胱結石, 解毒, 肺膿瘍, 咳嗽, 吐血, 帶下, 류머티즘痛, 痙攣, 濕疹 등을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 利膽作用이 있고 비뇨기계의 結石에 사용하는 것은 煎湯을 마시면 소변이 酸性으로 되어 알칼리성 條件하에 있는 結石을 溶解하는 것으로 설명된다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

肉桂는 녹나무과에 속하는 肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl.)의 樹皮를 말린 것으로, 辛하고 溫하며 心, 肝, 脾, 腎經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 脾胃를 溫하게 하고 風寒을 散하고 血脈을 通하게 하고 虛勞를 補하며 明目의 효능이 있어 腹冷胸滿, 下痢腹痛, 嘔吐, 風濕痺痛, 痔出血 등을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 鎮痛, 強心, 健胃作用 등이 있다<sup>60)</sup>

는 보고가 있다.

枸杞子는 가지과 식물인 구기자나무(*Lycium chinense* Mill.)의 성숙한 果實을 말린 것으로, 甘하고 平하며 肝, 腎經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 滋補 肝腎, 益精明目の 효능이 있어 肝腎陰虧, 頭暈, 目眩, 目昏多疾, 虛勞咳嗽, 消渴, 遺精, 慢性肝炎 등을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 혈당 및 콜레스테롤의 降下作用이 있으며 血清과 肝中의 磷脂質을 增加시키는 작용도 한다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

訶子는 使君子科 식물인 訶子(*Terminalia chebula* Retz.)의 성숙한 果實을 말린 것으로, 苦酸하고 溫하며 肺, 胃, 大腸經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 斂肺, 澁腸, 下氣의 효능이 있어 久咳失音, 久瀉, 慢性下痢, 脫肛, 血便, 崩漏帶下, 遺精, 頻尿, 心腹虛痛, 眼澁痛 등을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 收斂, 抗菌, 強心, 鎮痙作用 등이 있다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

蘇木은 豆科식물인 蘇木(*Caesalpinia sappan* L.)의 心材를 말린 것으로, 甘鹹하고 平하며 心, 肝經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 行血, 破瘀, 消腫, 止痛의 효능이 있어 婦人의 血氣에 의한 心腹痛, 産後의 瘀血에 의한 脹痛喘息, 月經閉止, 痢疾, 破傷風, 打撲充血痛을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 心臟血管에 대한 작용, 中樞抑制작용, 抗菌작용이 있다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

覆盆子는 장미과식물인 복분자딸기(*Rubus coreanus* Miq.)의 果實을 말린 것으로, 甘酸하고 平하며 肝, 腎經으로 들어간다<sup>52,53)</sup>. 澁精, 縮尿, 助陽, 明目의 효능이 있어 陽痿, 遺精, 頻尿, 遺尿, 虛勞, 眼疾, 夜盲症을 치료한다<sup>55)</sup>. 그리고 콜레라균의 성장을 抑制하는 작용이 있다<sup>60)</sup>는 보고가 있다.

倒生根은 장미과식물인 복분자딸기(*Rubus coreanus* Miq.)의 뿌리를 말린 것으로, 鹹酸하고 平하며 無毒하다<sup>52,53)</sup>. 活血, 止血의 효능이 있어 勞傷吐血, 鼻出血, 月經不順, 打撲傷을 치료한다.<sup>55,60)</sup>

## 2. 한약재 엑기스의 HPLC 패턴 분석

각 한약재로부터 전탕, 여과, 감압농축, 동결 건조 등의 과정을 거쳐 준비된 추출엑기스들에 함유된 물질들의 종류를 개략적으로 파악하기 위하여, 각 시료들의 흡광스펙트럼을 검사하여 성분분석에 적당한 최대흡광파장을 선정한 후에 HPLC 패턴 분석을 실시하여 함유물질들을 분석하였다. 각 한약재 수침엑기스의 최대흡광파장과 흡광도는 板藍根 281nm, 0.168, 茵陳蒿 327nm, 0.521, 大黃 321nm, 1.131, 金錢草 273nm, 0.272, 肉桂 280nm, 0.786, 枸杞子 304nm, 0.034, 訶子 276nm, 1.914, 蘇木 283nm, 1.020, 覆盆子 263nm, 0.098, 倒生根 262nm, 1.370으로 나타났다. HPLC 패턴 분석은 한약재 엑기스를 0.67%(w/v)의 농도로 66.7% 메탄올에 녹인 다음 1/100로 희석하여 사용하였고, HPLC로 유출되는 물질은 上記한 각 한약재 특유의 최대흡광파장에서 분광광도계를 사용하여 확인하였다.

板藍根에서 추출한 엑기스를 HPLC한 결과는 그림 1과 같았다. 엑기스는 9개의 분획(fraction, peak)으로 분리되어 파장 281 nm의 자외선을 흡수하는 물질이 최소한 9종류 이상이 함유되어 있음을 시사하였다. 이 분획들은 8분 이내에 모두 유출되었고, 이들 중에서 板藍根엑기스에 많이 함유되어 있는 성분으로 판단되는 상대적으로 큰 6개의 분획(peak 1-6 in Fig. 1)이 5분 이내에 유출되었으며, 나머지 3개의 분획은 크기가 상대적으로 작았다. 본 실험에 사용한 HPLC용 column인 C<sub>18</sub>에는 친수성(hydrophilic moiety) 및 비극성(nonpolar moiety)인 물질은 column의 resin에 강하게 부착되어 느리게 유출된다는 점을 고려할 때, 板藍根 엑기스에는 비교적 소수성이 강한 극성의 물질들이 많이 함유되어 있다고 생각되었다(Fig. 1).

茵陳蒿에서 추출한 엑기스를 HPLC로 분석할 때, 유출액의 흡광치는 파장 327 nm에서 측정

하였다. 茵陳蒿엑기스는 10개의 유의한 peak를 보이며 분획되었으며, 그 중에서 9개의 peak는 10.1 분 이내에서 유출되었으나 마지막 peak에 함유된 물질은 18분이 지나서 유출되었다. 茵陳蒿엑기스도 역시 板藍根엑기스와 마찬가지로 큰 peak로(peak 1-5 in Fig. 2) 보이는 다량 함유 성분들은 5분 이내에 유출되어 극성이 강하며 소수성인 물질들이 친수성인 물질보다 상대적으로 많이 함유되어 있다고 사료되었다(Fig. 2).

大黃으로부터 추출된 엑기스는 유출액의 흡광치를 파장 321 nm에서 측정하면서 HPLC를 실시한 결과, 板藍根이나 茵陳蒿엑기스의 경우와는 매우 다른 양상으로 분리되었다. 약 10개의 분획으로 분리되는 되었으나, 7번 및 10번 분획(peak 7 and peak 10 in Fig.3)이 다른 분획들에 비하여 월등히 커서, 이 두 분획에 大黃 특유의 물질이 함유되어 있다고 생각되었다. 또한, 이 두 분획은 각각 약 9분 및 15분에 유출되는 점도 板藍根이나 茵陳蒿엑기스의 경우와 상이한 양상이었으며, 제일 큰 분획인 10번째 분획은 상당히 느리게 유출되는 점으로 미루어보아 물리화학적 성상이 비극성인 물질이 함유되어 있으리라 보여졌다(Fig. 3).

측정파장을 273nm로 조정한 조건으로 HPLC를 실시한 金錢草엑기스의 분리양상은 그림 4와 같았다. 분획의 크기는 peak 2, 7, 3 등의 순서였으며, 10개의 peak로 형성된 분획들이 모두 12분 이내에 유출되었다. 이러한 분리양상은 板藍根이나 茵陳蒿엑기스의 경우와 마찬가지로 金錢草엑기스에도 극성이 강하며 친수성이 약한 물질들이 그렇지 않은 물질보다 상대적으로 많이 함유되어 있다고 사료되었다(Fig. 4).

肉桂엑기스의 HPLC에 의한 분리는 유출물질의 측정시 흡광파장을 280 nm로 조정하여 실시하였다. 엑기스에 함유된 성분들은 모두 9개의 분획(peak)으로 분리되었으나, 9번째의 분획이 유난히 커서 다른 분획을 모두 합친 것의 2배를 상회하였다. 또한, 9번째 분획은 17분이 지나서

유출되어 분석된 전체 엑기스에서 분리된 성분들 중에서 가장 비극성 또는 친수성이 강한 성분이 함유되어 있다고 생각되었다(Fig. 5).

枸杞子엑기스의 HPLC에 의한 분리는 유출물질을 흡광파장을 304 nm로 조정하여 검정하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이, 4개의 분획으로 분리되었으며, 그 중에서 첫 번째 분획이 가장 크고 전체적으로 함유물질의 종류와 함량이 적다고 생각되었다. 각 분획들의 흡광치가 다른 시료들에 비하여 낮은 것은 엑기스 자체가 실험 흡광파장인 304 nm의 자외선을 적게 흡수하기 때문이며, 이로 인하여 분획의 수도 적다고 생각되었다(Fig. 6).

訶子엑기스는 분광광도계의 흡수파장을 276 nm로 조정하여 HPLC를 실시하였다. 엑기스는 5개의 분획으로 분리되었으며, 모든 분획이 12분 이내에 완전히 유출되었다. 2번째 분획이 가장 컸으며, 전체적인 분리양상이 枸杞子엑기스의 경우와 유사하였다. 빠르게 유출되는 분획들이 주류를 이루는 점으로 미루어 보아 訶子엑기스에도 枸杞子의 경우와 마찬가지로 소수성의 성분이 많이 함유되어 있다고 생각되었다(Fig. 7).

蘇木엑기스를 HPLC로 분획한 결과는 그림 8과 같았으며, 유출물질들은 흡수파장이 283 nm에서 검정하였다. 총 10개의 분획으로 분획되었으며, 2분에서 4분 사이에 유출되는 4, 5 및 6 번째의 분획에 함유된 물질이 상대적으로 많다고 생각되었다(Fig. 8).

覆盆子엑기스는 흡수파장을 263 nm로 조정된 상태로 HPLC를 실시하였다. 7개의 분획으로 분리되었으며, 이 중에서 함량이 많은 5번째까지의 분획이 3분 이내에 유출되어, 覆盆子엑기스에는 다른 엑기스들에 비하여 특히 소수성이 강한 성분들이 상대적으로 많이 함유되어 있음을 시사하였다(Fig. 9).

倒生根엑기스는 분광광도계의 흡수파장을 262 nm로 조정하여 HPLC로 분석하였다. 엑기스에

함유된 성분은 9개의 분획으로 분리되어 유출되었으며, 이 중에서 7번째 분획까지는 6분 이내에 유출되었고, 9번째 분획은 그 양상이 첨예한 peak모양이 아닌 끌리는 듯한 모양을 보였다(Fig. 10).

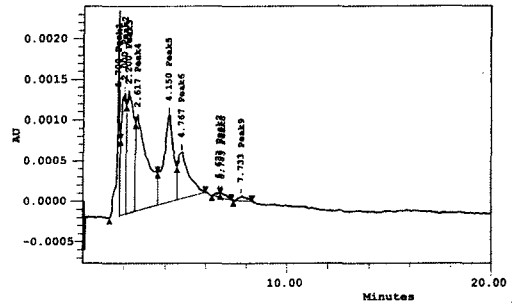


Figure 1. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Radix Isatidis. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water (15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 282 nm was examined.

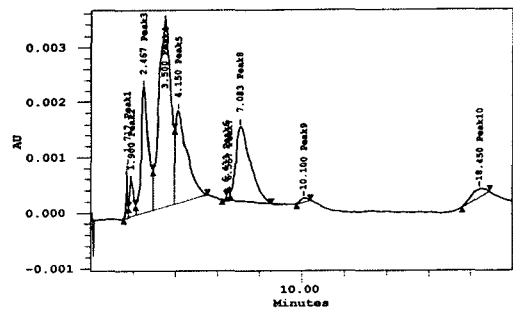


Figure 2. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Herba

Artemisiae Capillaris. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 327 nm was examined.

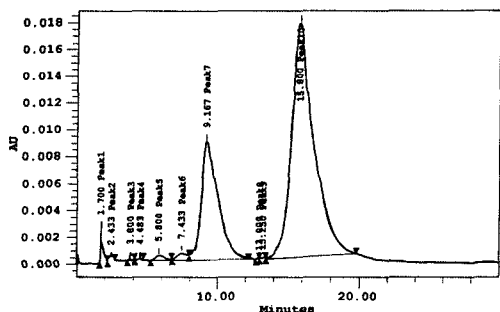


Figure 3. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Radix et Rhizoma Rhei. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 321 nm was examined.

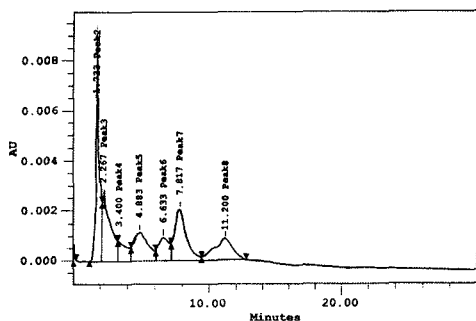


Figure 4. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the

decoctions prepared from Herba Lysimachiae. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 273 nm was examined.

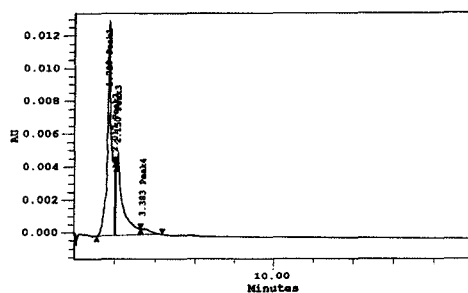


Figure 5. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Cortex Cinnamonmi.. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 280 nm was examined.

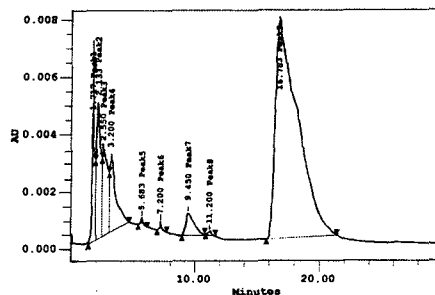


Figure 6. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the

decoctions prepared from Fructus Lycii. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 304 nm was examined.

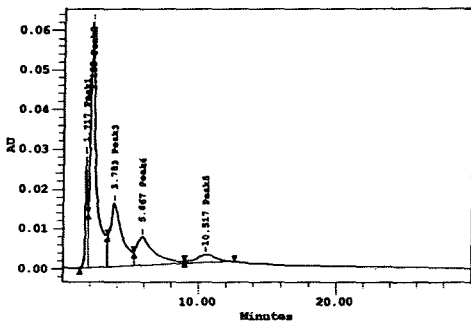


Figure 7. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Fructus Chebulae. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water (15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 276 nm was examined.

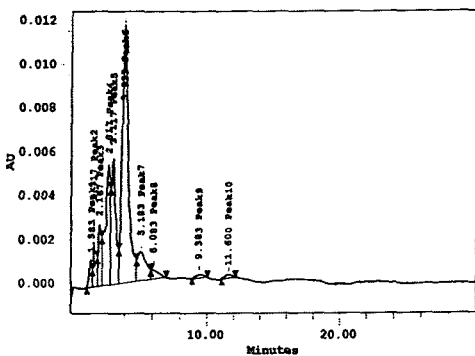


Figure 8. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Lignum Sappan. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water (15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 283 nm was examined.

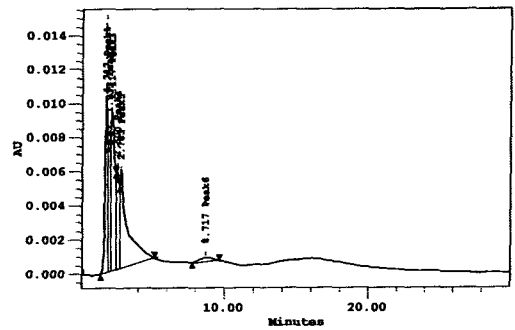


Figure 9. HPLC chromatogram on  $\mu$ Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Fructus Rubi. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 263 nm was examined.

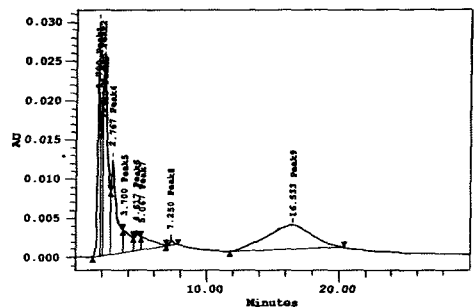


Figure 10. HPLC chromatogram on  $\mu$  Bondapak C18(3.9 mm x 30 cm) of the decoctions prepared from Radix Rubi. The column was eluted with acetonitrile/acetic acid/water(15/1/85) at a flow rate of 2.0 ml per min, and the absorbance at 262 nm was examined.

의 HBV "adr" 아형유전자(lane 2 in Fig. 11)가 확인되었으며, HBV "adw" 아형유전자도 전체 길이가 3.2 kb이지만 유전자내에 제한효소 *BamH* I 의 인식부위가 존재하기 때문에 2개의 단편(DNA fragment)으로 분리되는데 전기영동 결과, 上記한 바와 같이 준비한 시료에서도 1.8 및 1.4 kb의 "adw" 아형유전자(lane 4 in Fig. 11)가 확인되었다(Fig. 11).

### 3. HBV 유전자 확보 및 분리

### 4. HepG2 2.2.15 세포주에서 배출되는 HBV virion 량의 확인

B형 간염바이러스(HBV)의 유전자를 검정하기 위한 탐침(probe)으로는 "adr"과 "adw"의 2가지 HBV 유전자 亞形(subtype)을 사용하였다. "adr"아형은 plasmid vector인 pBR322에 "adr" 유전자가 도입되어 있는 pHBV315(7.56 kb)를, 그리고 "adw"아형은 또 다른 vector인 pGAM에 "adw"유전자가 도입된 plasmid(6.2 kb)를 각각 김길현교수(이화여자대학교) 및 안병윤교수(고려대학교)로부터 분양받아서 사용하였다. 분양받은 pHBV315과 pGAM-adw를 각각 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 形質轉換(transforma- tion)하여 배양한 다음, B형 간염바이러스의 유전자인 "adr"과 "adw"를 Qiagen<sup>TM</sup> plasmid purification kit를 이용하여 분리하였다. 한편, plasmid pHBV315과 pGAM-adw에서 분리한 간염바이러스 DNA에 제한효소인 *BamH* I을 처리한 다음, Qiagen<sup>TM</sup> gel extraction kit를 사용하여 탐침으로 사용할 간염바이러스의 DNA를 분리하였다.

준비된 adr, adw 등 2가지 아형의 B형 간염 바이러스 유전자들이 실제로 B형 간염바이러스 DNA(HBV DNA)와 이중나선구조 DNA(ds DNA, double stranded DNA)를 생성함으로써 B형 간염바이러스를 확인할 수 있는 탐침 (probe)으로서의 효능성이 있는지를 확인하기 위하여 Southern blot 법으로 분석실험을 한 결과, 준비된 "adr"아형유전자는 그림 12에서 보이는 것과 같은 HBV virion의 band가 선명하였으나, 준비된 "adw"아형유전자는 HBV virion의 band가 매우 희미하여 판독하기가 어려웠다. 이에 따라 이후의 실험에서는 준비된 "adr"아형 유전자를 探針으로 사용하여 B형 간염바이러스의 DNA를 확인하였다.

상기한 바와 같이 준비된 B형 간염바이러스의 유전자인 "adr"과 "adw"의 DNA를 전기영동을 이용하여 확인하였다. pHBV315로부터 분리한 supercoiled된 분자량 7.56 kb의 "adr" DNA(lane 1 in Fig. 11) 및 pGAM-adw로부터 분리한 supercoiled된 분자량 6.2 kb의 "adw" DNA (lane 3 in Fig. 11)가 확인되었다. 또한, 제한효소를 처리하여 분리한 DNA에서 3.2 kb

한약제가 B형 간염바이러스(HBV)의 증식을 억제하는 효능을 검색하기 위해서는 우선 한약제가 투여되지 않은 상태에서 바이러스가 증식되는 양상을 정립할 필요가 있다. HBV는 세포 독성(cytotoxicity)이 없기 때문에, 그 증식정도를 숙주세포내의 바이러스 유전자를 측정하거나 또는 숙주세포가 파괴되지 않은 상태에서 세포 밖으로 배출된 바이러스를 측정함으로써 검사할 수 있다. 본 실험에서는 HBV의 유전자가 도입된 세포주인 HepG2 2.2.15의 증식과정에서 HBV virion이 세포외로 배출되는 정도를 분석하였다. 細胞群이 본격적으로 증식하기 시작하

는 상태로(confluent growth stage) HepG2 2.2.15 세포주를 RPMI-1640(2%FBS)

된 배지에서 검정된 B형 간염바이러스 DNA가 적었으나, 6, 7일째에는 매우 많았으며, 8 일째 부터는 회수된 배지에서 비교적 일정한 량의 바이러스 DNA가 검정되었다(Fig. 12).

이러한 결과는 5일까지는 세포밖으로 배출되는 virion이 數的으로 상당한 변이가 있을 수 있으나, 그 이후부터 세포(HepG2 2.2.15)내에서 B형 간염바이러스가 왕성하게 증식되어 8일 이후에는 일정 수준의 B형 간염바이러스 virion이 세포밖으로 지속적으로 배출됨을 시사하였다. 또한, 이와 같은 증식양상은 "HBV의 증식이 세포주기에 의존적이며 분열이 끝난 휴지기상태의 肝細胞(hepatocyte)에서 HBV가 증식된다"는 보고<sup>85)</sup>와도 일치한다고 생각되었다. 이와 같은 결과 및 추론을 근거자료로 삼아, B형 간염바이러스의 증식에 미치는 효과를 검정하는 실험에서는 한약재를 이틀 간격으로 10일간 처리함으로써 효과검정이 보다 효율적으로 되도록 계획하였다.

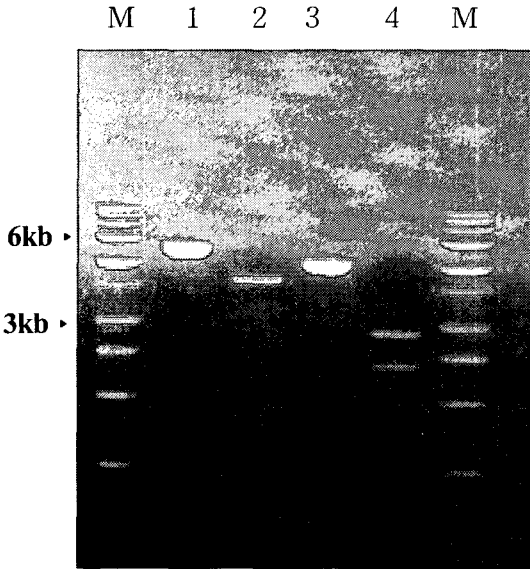


Figure 11. Electrophoretic patterns of HBV DNA (0.8 % agarose gel)

- 1 : supercoiled "adr" DNA (7.56 kb) purified from vector, pHBV315
- 2 : HBV "adr" DNA (3.2 kb) digested with *Bam*H I
- 3 : supercoiled "adw" DNA (6.2 kb) purified from pGAM-adw
- 4 : HBV "adw" DNA (1.8 kb & 1.4kb DNA) digested with *Bam*H I
- M : size marker

배양액에서 증식시킨 다음, 이어서 11일간 계속 배양하면서 매일 한번씩 배지를 수집하여 배지로 배출된 HBV virion의 량을 검정하였다. HBV virion DNA를 분리하여 전기영동을 한 다음, 준비된 탐침인 "adr"아형유전자를 사용하여 Southern blot 을 실시한 결과는 그림 12와 같았다. 배지를 수집하기 3일째에 바이러스 DNA가 거의 감지되지 않는 등 5일째까지 수집

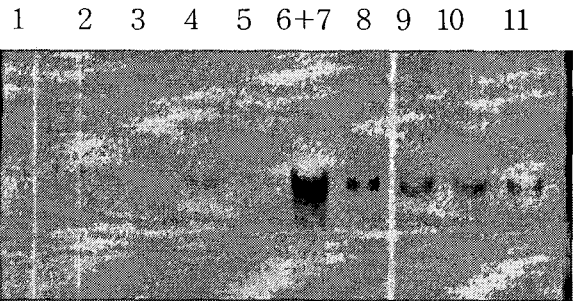


Figure 12. The growth of HBV virion in medium for HepG2 2.2.15 cells. After HepG2 2.2.15 cells was cultured confluent on RPMI-1640 medium at 37 °C, the medium was further harvested for 11 days. A part of medium was collected from the medium described above by

one day intervals. And the viral DNA was isolated from each collected medium, and then Southern blot analysis was performed using HBV "adr" subtype gene as a probe. The numbers represented each isolated viral DNA at a given day.

##### 5. 한약재가 세포밖으로 방출되는 HBV의 량에 미치는 효과

선정된 10 종류의 한약재가 細胞外로 배출되는 HBV virion의 량에 미치는 영향을 검정하기 위하여, 10, 100, 500, 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 한약재 엑기스를 HepG2 2.2.15 세포주를 배양중인 배양액에 각각 첨가하여 10일동안 배양하면서 한약재를 첨가하기 시작한 8일째와 10일째가 되는 날에 각각 세포배양액을 수거하였다. 수거된 배양액내의 HBV virion을 PEG로 침전시켜 DNA를 회수한 후에, proteinase K를 처리하여 HBV DNA를 분리하였다. 이와 같이 준비된 HBV DNA를 Southern blot 법으로 분석하여, 한약재 엑기스에 의해 B형 간염바이러스가 증식되어 세포밖으로 방출되는 virion의 량이 저하되는지를 검정하였다.

茵陳蒿엑기스가 투여된 배양액에서 회수된 HBV DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 13과 같았다.茵陳蒿엑기스가 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 투여된 경우(lane 1 and 2 in Fig. 13)에는 대조군(lane C in Fig. 13)에 비교하여 별다른 차이가 없었으나, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여된 경우에는(lane 3 in Fig. 13) 대조군에 비하여 HBV의 DNA(position "D" in Fig. 13)가 감소되었으며, 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로茵陳蒿엑기스가 투여된 경우에는(lane 4 in Fig. 13) HBV DNA가 현저히 감소되었다. 또한, 100, 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 투여된 경우에는 고분자 DNA band의 끌림현상(marker

"G" in Fig. 13)을 보였으며, 이 끌림현상은 투여된 엑기스의 농도가 높아질수록 완화되었다(Fig. 13).

이와 같은 결과는茵陳蒿엑기스가 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여할 경우에 HBV의 증식이 억제되어 숙주세포에서 배출되는 virion量이 줄어드는 것을 시사하였다. 그러나, 100 및 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 투여된 경우에 나타나는 고분자 DNA band의 끌림현상은 투여된 엑기스의 독성으로 인하여 HepG2 2.2.15 세포가 파괴됨으로서 HBV DNA뿐만 아니라 HepG2 2.2.15 세포주의 DNA도 함께 회수된 결과일 가능성도 배제할 수는 없다고 생각되었다. Ames test, 소핵시험(micronucleus) 및 염색체이상 실험(chromosomal aberration assay)을 통한 발암성 연구에 의하면,茵陳蒿는 농도의존적인 발암성 및 세포독성이 있다.<sup>86)</sup> 본 실험에서 100, 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 엑기스가 투여된 경우에 나타나는 고분자 DNA band의 끌림현상은茵陳蒿엑기스의 세포독성에 의하여 HepG2 2.2.15 세포가 용해되었을 가능성이 있다고 사료되었다.

板藍根엑기스가 투여된 배양액에서 회수된 HBV DNA도茵陳蒿엑기스와 동일한 방법으로 분석하였다. 그림 14에서 보는 바와 같이,板藍根엑기스가 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여되었을 때,茵陳蒿엑기스의 경우와 마찬가지로 숙주세포의 용해에 의한 band의 끌림이 관찰되었으나, 세포배양시에는 HepG2 2.2.15 세포주가 파열되어 부유되는 등의 독성을 직접적으로 관찰할 수 없었다.板藍根엑기스를 고농도로 처리한 경우에도 대조군(참조 lane C in Fig. 13)과 비교하여 HBV DNA(position D in Fig. 14)의 량이 별다른 차이를 보이지 않았으며, 이로 미루어 보아板藍根엑기스는 증식되어 세포밖으로 배출되는 HBV量에 특별한 영향을 미치는 않는다고 판단되었다(Fig. 14A).

板藍根은 『中藥大辭典』<sup>55)</sup>에서 간염의 치료약으로 사용된다고 기재되어 있는데, 上記한 본



실험의 결과로 볼 때, 板藍根이 肝조직에서 HBV의 증식에 직접적으로 미치는 영향보다는 전체적인 생체내의 면역기능을 향상시키거나 HBV의 표면항원이 발현되는 것을 억제하는 등의 간접적인 효과를 활용한 것으로 사료된다.

蘇木엑기스를 투여한 다음, 배양액을 회수하여 HBV DNA를 검정한 결과는 그림 14B와 같았다. 蘇木엑기스가 처리된 경우에도 板藍根엑기스의 경우와 마찬가지로 세포용해에 의한 고분자 DNA band의 끌림현상이 관찰되었다. 또 엑기스를 고농도로 처리한 경우(lane 3 and 4 in Fig. 14B)에도 대조군(참조 lane C in Fig. 13)과 비교하여 HBV DNA (position D in Fig. 14)의 양에서 별다른 차이를 보이지 않았다. 이로 미루어 보아, 蘇木엑기스 역시 HBV가 증식되어 세포밖으로 배출되는 양에 별다른 영향을 미치지 않는다고 판단되었다(Fig. 14B).

大黃엑기스가 투여된 배양액에서 회수된 HBV DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 15와 같았다. 엑기스를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여하여 배양한 다음 회수한 경우에는 (lane 1 in Fig. 15) 엑기스를 투여하지 않은 대조군(lane C in Fig. 15)과 HBV DNA band(position D in Fig. 15)의 강도가 비슷하였다. 그러나, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 大黃엑기스를 처리한 경우에는 HBV DNA band의 농도가 대조군에 비하여 50 % 이하로 감소되었으며(lane 2 in Fig. 15), 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우에는 HBV DNA band의 농도가 매우 약하였고(lane 3 in Fig. 15), 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우에는 HBV DNA band가 거의 검정되지 않았다(lane 4 in Fig. 15). 한편 大黃엑기스를 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우에 고분자 DNA band의 끌림현상(position "G" in Fig. 15)을 보였으나, 板藍根(lane 3 in Fig. 13) 및 茵陳蒿(lane 3 in Fig. 14A) 등의 경우와 비교하였을 때 그 정도는 미미하였다(Fig. 15).

이와 같이 투여된 엑기스의 농도가 증가함에

따라 배양액에서 회수되는 HBV DNA의 양이 현저히 줄어드는 결과로 미루어 보아, HBV가 증식되어 세포밖으로 배출되는 양은 大黃엑기스에 의하여 억제된다고 생각되었다.

肉桂엑기스를 투여한 배양액에서 회수된 HBV DNA를 분석한 결과는 그림 16과 같았다. 엑기스를 각각 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 배양액에서 수집한 배양액내의 HBV DNA의 양은 대조군과 비교하여 거의 차이가 없었으나(lane 1 and 2 in Fig. 16), 엑기스를 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 배양액에서 회수한 시료에서는 HBV DNA를 거의 검색할 수 없었고(lane 3 and 4), 고분자 DNA가 끌리는 현상도 없었다(Fig. 16).

이와 같은 결과는 증식되어 세포밖으로 배출되는 HBV의 양이 肉桂엑기스에 의하여 거의 전부 억제됨을 시사하였으며, 이러한 肉桂엑기스의 작용은 현재까지 보고된 바 없는 肉桂의 약리학적 효능이라고 생각되었다.

金錢草의 경우에는 배양액에서 분리된 DNA를 동일한 방법으로 분석한 결과, 엑기스를 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 경우에는 회수된 숙주세포의 용해로 인한 고분자 DNA의 끌림현상이 조금 보였으며, 10, 100, 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  등 여러 농도로 엑기스가 투여되었음에도 불구하고 배양액에서 분리되는 HBV DNA의 양은 거의 동일한 점으로 미루어 보아, 金錢草엑기스는 HBV의 증식에 거의 영향을 미치지 않는다고 생각되었다(Fig. 17A).

枸杞子엑기스가 투여된 경우에도 각각 10, 100, 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  등의 농도로 엑기스가 처리되었음에도 불구하고 배양액에서 분리되는 HBV DNA의 양은 거의 동일하여 枸杞子엑기스 역시 HBV 증식에는 별 영향을 미치지 않는다고 생각되었으며, 투여된 엑기스의 농도가 증가함에 따라 검정되는 고분자 DNA의 양도 증가하는 경향을 보였다(Fig. 17B).

訶子엑기스가 투여된 배양액에서 회수된

DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 18과 같았다. 투여된 訶子엑기스의 농도가 10, 100, 500 그리고 1,000  $\mu\text{g/ml}$  으로 증가함에 비례하여 검정된 HBV DNA band의 강도는 줄어드는 경향성을 보였으며(bands in position D), 엑기스 투여농도가 1,000  $\mu\text{g/ml}$  일 때는 HBV DNA가 전혀 검출되지 않았다. 이와 더불어, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 엑기스가 투여된 배지의 경우에는 세포용해로 인한 고분자 DNA band의 끌림 현상이 나타났고, 이러한 현상은 투여된 엑기스의 농도가 500 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가할수록 완화되는 경향을 보였다(Fig. 18).

이와 같이, 비록 배지에서 검출되는 HBV DNA의 양이 엑기스함량에 따라 경향성있게 감소하기는 하지만, 숙주세포가 기원이라고 보여지는 고분자 DNA의 끌림현상에서 보듯이 訶子엑기스가 숙주세포에 대한 세포독성이 있기 때문에, 訶子엑기스가 HBV의 증식을 억제하는지의 여부를 명확하게 판단하기는 어렵다고 생각되었다.

覆盆子엑기스가 투여된 배양액에서 회수된 HBV DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 19A와 같았다. 엑기스를 10  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처치한 배양액에서 수집한 배양액내의 HBV DNA의 양보다(lane 1) 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치한 시료에서 더 많은 양의 HBV DNA가 검출되었으나(lane 2), 엑기스를 500 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치한 배양액에서 회수한 시료에는 HBV DNA가 전혀 없었다(lane 3 and 4). 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 엑기스를 투여할 경우에는 고분자 DNA가 끌리는 현상이 보였으나, 세포배양 중에 세포부유 등 세포독성이라고 판정할만한 징후는 관찰되지 않았다(Fig. 19A).

이와 같이 覆盆子엑기스를 500  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도로 처리할 경우에는 HBV의 양이 현저하게 감소되는 결과는, 세포밖으로 배출되는 HBV의 증식과정이 엑기스의 영향으로 현저하게 억제됨을 시사하였다.

倒生根엑기스를 투여된 배양액에서 회수된 HBV DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 19A와 같았다. 倒生根엑기스도 覆盆子엑기스의 경우에서와 마찬가지로, 500 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 倒生根엑기스를 투여한 배양액에서 회수한 시료에는 HBV DNA가 전혀 없었으며(lane 3 and 4), 10  $\mu\text{g/ml}$  및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 엑기스를 투여한 배양액에서 각각 수집된 배양액내의 HBV DNA의 양이 거의 유사한 점에서는 覆盆子엑기스의 경우와 차이가 있었다(lane 1 and 2). 또한, 覆盆子엑기스의 경우와는 달리 倒生根엑기스의 농도가 서로 다르게 투여된 모든 전체 배양액에서 숙주세포의 유전자로 보이는 DNA band가 검출되었고(band at position G), 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치한 경우에는 고분자 DNA가 끌리는 현상이 보였으나(lane 2), 세포배양 중에 세포부유 등 세포독성이라고 판정할만한 징후가 관찰되지 않았다(Fig. 19B).

이와 같은 결과는 증식되어 세포밖으로 배출되는 HBV의 양이 倒生根엑기스에 의하여 현저하게 저하되며, 또한 倒生根엑기스는 약간의 세포독성이 있음을 시사하였다.

上記한 실험결과를 종합하면 실험에 사용된 10종의 한약재 중에서 茵陳蒿, 訶子, 大黃, 肉桂, 覆盆子, 倒生根이 100~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로써 HBV 유전자가 증식되어 세포밖으로 방출되는 HBV의 양을 저하시키는 효능이 있다고 판단되었으며, 특히 大黃, 覆盆子, 倒生根은 세포독성이 본 실험에 사용한 다른 韓藥材에 비하여 약하거나 거의 없어 바이러스성 감염에 대한 치료제로써의 가능성이 상당히 높다고 思料된다.

## 6. 한약재가 세포내 HBV DNA의 증식에 미치는 효과

上記한 바와 같이 茵陳蒿, 大黃, 肉桂, 訶子, 覆盆子, 倒生根의 6종 한약재는 세포밖으로 방출되는 HBV의 양을 감소시키는 효능이 있었다.

緒論에서 언급한 바와 같이, B형 간염바이러스 (HBV)는 숙주세포에서 신생된 virion이 숙주세포가 파괴되지 않은 상태에서 세포밖으로 배출될 수 있다. 이런 방식으로 virion이 배출되는 기전이 바이러스 자신의 능동적인 이동인지, 아니면 숙주세포의 정상적인 분비과정에 의한 것인지는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 그러므로, 한약재가 HBV증식과정에 영향을 미치는지를 명확히 하기 위해서는 숙주세포내에서 바이러스의 증식에 미치는 영향을 검정해야 한다고 생각된다. 이에 따라, 각 한약재 엑기스를 투여하여 배양한 HepG2 2.2.15 세포를 분리 및 용해(cytolysis)시킨 다음, total DNA(HepG2 2.2.15 DNA; HepG2 DNA and HBV DNA)를 분석하였다. 이 때, HepG2 2.2.15 세포의 유전자내로 도입된(integrated) HBV DNA는 세포수에 비례하여 나타나므로, episomal HBV DNA를 분석할 때는 도입된 HBV DNA(I in Fig. 20 and 21)를 内部對照(internal standard; I) DNA로 활용하였으며, 간염바이러스의 증식을 억제시키는 약물인 dideoxycytidine(ddC)를 증식억제 활성을 분석하는 양성대조물질로 사용하였다.

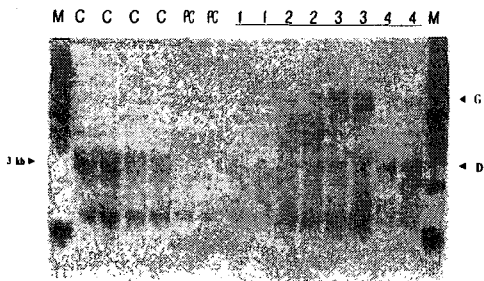


Figure 13. Effects of water extracts of Herba Artemisiae Capillaris on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant at 10  $\mu$ /ml(lane 2),/ml

(lane 4) concentrations and 10  $\mu$ M dideoxycytidine (lane PC). Culture media were harvested at 8th and 10th 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( $\lambda$ /Hind III), D, double-stranded linear HBV DNA

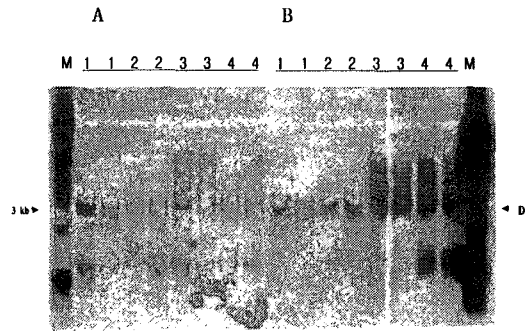


Figure 14. Effects of water extracts of Radix Isatidis (A) and Lignum Sappan (B) on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

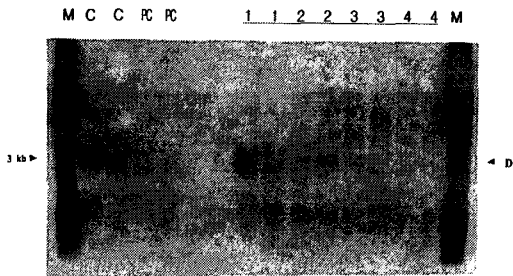


Figure 15. Effects of water extracts of Radix Rhizoma Rhei on anti-HBV \*\*\*\*\* activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

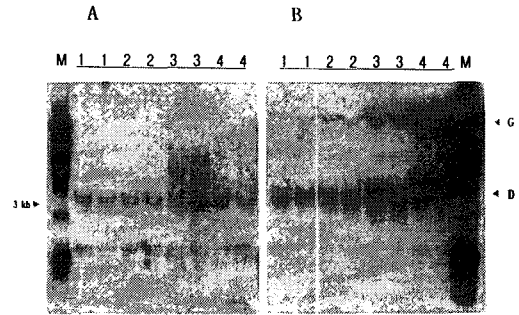


Figure 17. Effects of water extracts of Herba Lysimachiae (A) and Fructus Lycii (B) on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

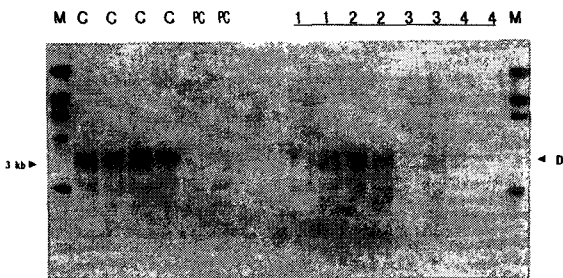


Figure 16. Effects of water extracts of Cortex Cinnamomi on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

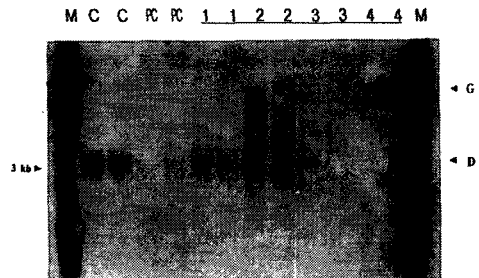


Figure 18. Effects of water extracts of Chebulae on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

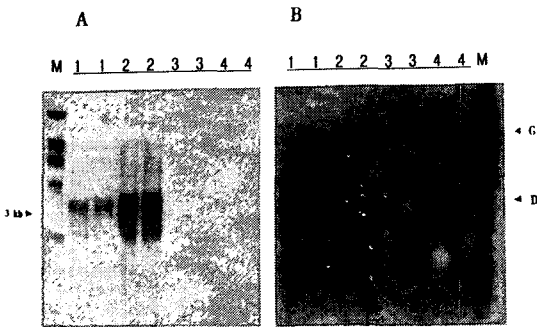


Figure 19. Effects of water extracts of Fructus Rubi (A) and Radix Rubi (B) on anti-HBV activities. The HepG2 2.2.15 cells were treated with water extract of the plant and Viral DNA in media were extracted as described in Figure 13.

그림 20 Control 에서 보는 바와 같이, 바이러스 증식억제 활성을 분석하기 위해 양성대조 물질로 사용한 dideoxycytidine(ddC; lane PC in photo)를 처치한 경우에는 약물이 처치되지 않은 대조군(lane C)과 비교하여 HBV의 유전자인 dsDNA(double stranded DNA; ds in photo)와 ssDNA (single stranded DNA; ss in photo)의 농도가 현저히 낮았으며, 이러한 양상을 기준으로 각 한약재의 효능을 검정하였다(Fig. 20 Control).

茵陳蒿, 大黃, 肉桂 및 訶子엑기스를 각각 투여한 배양액에서 분리된 HepG2 2.2.15 세포내 있는 DNA를 Southern blot 법으로 분석한 결과는 그림 20과 같았다.

茵陳蒿엑기스의 경우에는, 엑기스를 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치한 것(lane 1 in photo A)을 기준으로 볼 때, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치되었을 때에는 dsDNA와 ssDNA의 량에서 유의한 변화가 없었으나, 500 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처

치된 경우에는(lane 3 and 4 in photo A) HBV DNA의 량이 약간 감소되었다. 이러한 결과는茵陳蒿엑기스가 HBV의 증식을 억제하는 효능이 없거나 효능이 매우 낮음을 시사하였다(Fig. 20A).

大黃엑기스는 그림 20B에서 보는 바와 같이, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치되었을 때 HBV의 dsDNA와 ssDNA가 전혀 검출되지 않는 점으로(lane 4 in photo B) 미루어 보아 HBV에 대한 증식억제효과가茵陳蒿엑기스에 비하여 상당히 높다고 생각되었다. 다만, 10, 100 및 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처치되었을 때 HBV DNA가 100  $\mu\text{g/ml}$  처치군이 500  $\mu\text{g/ml}$  처치군(lane 3 in photo B)보다 HBV DNA가 적게 검출되는 점과 같이, 농도에 비례하여 효과가 나타나지는 않았다. 이러한 현상은 엑기스를 일정농도 이상으로 처치할 때 효과가 나타나기 때문이거나, 또는 세포의 증식과정에서 엑기스 성분의 영향을 받는 등의 변수가 작용하기 때문으로 생각되며, 이에 대해서는 보다 면밀한 연구가 필요하다고 사료된다(Fig. 20B).

肉桂엑기스가 처리된 경우에는 검출된 dsDNA와 ssDNA 등 HBV DNA의 량이 10, 100, 500 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 엑기스의 처치농도가 높아짐에 따라 감소되었다. 이러한 양상은肉桂엑기스가 HBV의 증식을 억제함을 확연하게 보여주는 유의성이 높은 결과라고 사료되었다(Fig. 20C).

訶子엑기스를 처치한 경우, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처치군에서는 거의 검출되지 않는 점은(lane 4 in photo D) 訶子엑기스가 HBV의 증식을 억제효과가 상당히 높음을 시사하였다. 한편, 100  $\mu\text{g/ml}$  처치군에서(lane 2 in photo D) 10  $\mu\text{g/ml}$  처치군보다 많은 량의 HBV DNA가 검출되었으나, 그 정도는 500  $\mu\text{g/ml}$  처치군에서 현저히 감소되었다(lane 3 in photo D). 이러한 현상은大黃엑기스의 경우(photo B in Fig. 20)에서와 마찬가지로, 訶子엑기스의 농도에 따른 효능의

가변성, 또는 세포의 증식에 엑기스 성분이 영향을 미치는 등의 요인 때문으로 생각되었다 (Fig. 20D).

覆盆子와 倒生根의 엑기스를 처치한 다음 HBV DNA의 증식에 미치는 효과를 본 결과는 그림 21과 같았다.

覆盆子엑기스를 처치한 다음 HBV DNA를 분석한 결과, 그림 21A에서 보는 바와 같이, 처치된 엑기스의 농도가 10(lane 1), 100(lane 2), 500 (lane 3) 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 4) 등 그 농도가 높아짐에 따라 검출되는 HBV DNA의 양은 줄어들었다. 이와 같이, 처치된 엑기스의 농도가 높아짐에 따라 바이러스의 DNA 양이 경향성 있게 감소됨은 覆盆子엑기스에 의하여 HBV의 증식이 억제되었음을 보여주는 결과라고 생각되었다(Fig. 21A).

倒生根엑기스를 처치한 경우에도 검출되는 HBV DNA의 변화양상이 覆盆子엑기스와 유사하였으나, 엑기스가 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 처리되었을 때에는 거의 유사한 양의 HBV DNA가 검출되었다. 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처치군에서는 그 양이 약간 줄어들었으나, 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처치군에서는 검출되는 HBV DNA의 양이 매우 적었다(lane 4 in photo B). 이러한 결과로 미루어 볼 때, 倒生根엑기스의 HBV 증식억제 효과는 유의성이 매우 높다고 생각되었다(Fig. 21B).

上記한 결과에서 본 바와 같이, 6 종류의 한약재 중에서 茵陳蒿를 제외한 大黃, 肉桂, 訶子, 覆盆子, 倒生根으로부터 추출된 엑기스를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도로 처치할 경우에는 세포주 내에서의 HBV 증식이 억제되는 것으로 사료되었다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때, 본 실험에 사용한 10종의 한약재 중에서 茵陳蒿, 訶子, 大黃, 肉桂, 覆盆子 및 倒生根의 6종 한약재는 HBV 유전자가 증식되어 세포밖으로 방출되는 HBV의 양을 저하시키는 효능이 있었고, 특히

大黃, 覆盆子, 倒生根은 B형 간염바이러스의 증식을 억제시켰으며 세포독성이 다른 韓藥材에 비하여 약하거나 거의 없었다. 이러한 점을 감안할 때, 이들 6종의 한약재는 바이러스성 간염에 대한 治療 및 豫防藥物로서의 활용가능성이 상당히 높다고 생각되었으며, 간염바이러스에 작용하는 유효성분 및 작용기전 등에 대한 보다 심도있는 연구가 이루어져야 한다고 思料된다.

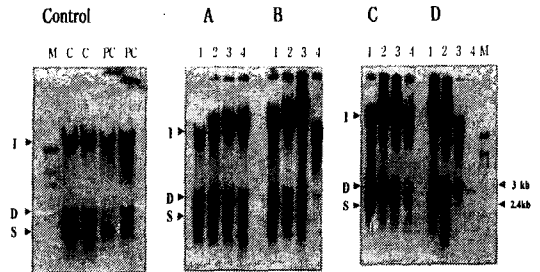


Figure 20. Southern blot analysis of total DNA extracted from HepG2 2.2.15 cells. The 2.2.15 cells were treated with water extracts of *Artemisia capillaris* Thunb.(A), *Rheum palmatum* L.(B), *Cinnamomum cassia* Presl.(C) and *Terminalia chebuls* Retz.(D) at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 1), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 2), 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 3), 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 4) concentrations and 10  $\mu\text{M}$  dideoxycytidine (lane PC) and were extracted total cellular DNA at 8th day after treatment. 5  $\mu\text{g}$  Total DNAs per lane were electrophoresed and analyzed on Southern blot analysis(ECL direct). I, integrated HBV DNA in the cellular genome; S, single-stranded DNA; D, double-stranded linear DNA; C,

not treated with test sample; M, size markers( $\lambda$ /Hind III),

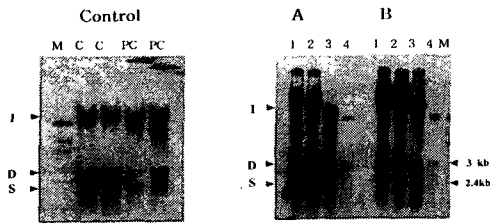


Figure 21. Southern blot analysis of total DNA extracted from HepG2 2.2.15 cells. The 2.2.15 cells were treated with water extracts of *Rubus coreanus* Miq.(A) and *Rubus coreanus* Miq.(B) at 10  $\mu$ g/ml(lane 1), 100  $\mu$ g/ml(lane 2), 500  $\mu$ g/ml(lane 3), 1,000  $\mu$ g/ml(lane 4) concentrations and 10  $\mu$ M dideoxycytidine (lane PC) and were extracted total cellular DNAs at 8th day after treatment. Total DNAs were electrophoresed and analyzed as described in Figure 13. I, integrated HBV DNA in the cellular genome; S, single-stranded DNA; D, double-stranded linear DNA; C, not treated with test sample; M, size markers( $\lambda$ /Hind III),

#### IV. 結 論

板藍根, 茵陳蒿, 大黃, 金錢草, 肉桂, 枸杞子, 訶子, 蘇木, 覆盆子, 倒生根의 10종 韓藥材가 HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 *in vitro* system에서 B형 간염 바이러스(HBV)의 增殖抑制에

미치는 影響에 대해 Southern blot 방법으로 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 茵陳蒿, 大黃, 肉桂, 訶子, 覆盆子와 倒生根은 HepG2 2.2.15 세포에서 검액의 농도(10, 100, 500, 1000 $\mu$ g/ml)에 비례하여 세포外 B형 간염 바이러스의 증식을 억제하는 효과가 나타났다.
2. 板藍根, 蘇木, 金錢草와 枸杞子是 높은 농도(500, 1000 $\mu$ g/ml)의 한약재 처치군에서도 세포外 B형 간염바이러스의 증식을 억제하는 효과가 나타나지 않았다.
3. 세포外 B형 간염바이러스의 증식억제 활성을 보이는 6가지 한약재 중에서, 茵陳蒿를 제외한 大黃, 肉桂, 訶子, 覆盆子, 倒生根의 한약재가 100~500  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포內 HBV DNA의 증식억제 활성이 나타났다.

上記한 結果로 보아 茵陳蒿, 大黃, 肉桂, 訶子, 覆盆子, 倒生根은 B형 간염바이러스의 증식을 억제하는 효과가 나타났으며, 또한 바이러스성 肝炎에 대한 治療 및 豫防藥物으로써 활용할 수 있을 것으로 思料된다.

#### 參 考 文 獻

1. 全國 韓醫科大學 肝系內科學 教授 : 肝系內科學, 서울, 동양의학연구원, p. 33, 232, 1989.
2. 張伯臾 : 中醫內科學, 북경, 인민위생출판사, pp. 391-393, 1988.
3. 고흥, 김영철, 이장훈, 우홍정, 김병운 : 지유생간당이 흰쥐의 간에 미치는 영향, 대한한 의학회지, 16(1):221, 1995.
4. 홍원식 : 精校黃帝內經素問, 서울, 동양의학 연구원, p. 66, 119, 1981.
5. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 511, 1976.
6. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 대성문화사, p.

- 225, 1984.
7. 郭燮 : 胃芩湯 및 茵陳五苓散이 Galactosamine에 의한 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1993.
  8. 小林미찌이 : 茵陳蒿湯의 效能研究, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1987.
  9. 文大煥 : 龍膽瀉肝湯 및 茵陳五苓散이 膽道結紮로 誘發된 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1994.
  10. 吳昇煥 : 加味茵陳五苓散이 家兔의 肝損傷에 미치는 效果, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1983.
  11. 金德鎬 : 柴胡清肝湯이 CCl<sub>4</sub> 中毒白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1980.
  12. 金明圭 : Thioacetamide에 의한 肝損傷에 人蔘芎歸湯이 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1983.
  13. 金蓮燮 : 飢餓 및 CCl<sub>4</sub> 中毒 肝損傷에 미치는 補肝湯, 瀉肝湯의 影響, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1990.
  14. 金珍珠 : 茵陳清肝湯이 MHV-2로 誘發된 mouse의 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1996.
  15. 孟貞均 : 防風通聖散이 CCl<sub>4</sub> 中毒白鼠의 血液像에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1985.
  16. 朴商伯 : 清肝湯이 CCl<sub>4</sub> 및 d-Galactosamine에 의하여 誘發된 實驗的 흰쥐 肝障害에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1986.
  17. 徐政周 : 家兔 肝損傷에 대한 潰堅湯 및 그 加味方의 效果에 關한 研究, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1984.
  18. 申正植 : 仙遺糧湯, 紫金錠, 甘豆湯이 HgCl<sub>2</sub> 中毒家兔의 腎 및 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1988.
  19. 安圭錫 : 柴苓湯이 Thioacetamide에 의한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1983.
  20. 王泰錫 : 加味柴陳湯의 白鼠 肝損傷에 대한 效果, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1989.
  21. 우홍정 : 逐水清肝湯 煎湯液이 肝損傷에 미치는 影響에 關한 研究, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1979.
  22. 柳錦龍 : Thioacetamide에 의한 白鼠 肝損傷에 미치는 平肝飲子의 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1984.
  23. 金병운 : 慢性肝炎 3,136例에 대한 臨床分析과 生肝健脾湯의 治療效果, 대한한의학회지, 14(1):216-223, 1993.
  24. 崔舜皓 : 對金飲子 및 對金飲子加玉蜀鬚가 白鼠의 알콜성 肝損傷에 미치는 影響, 慶山大 大學院, 博士學位論文, 1995.
  25. 李昌奎 : 生肝湯이 CCl<sub>4</sub> 및 d-galactosamine에 의하여 誘發된 實驗的 흰쥐 肝障害에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1986.
  26. 李建穆 : 加減茵陳蒿湯 水鍼液이 膽管結紮로 誘導된 肝損傷에 미치는 影響, 大田大 大學院, 博士學位論文, 1993.
  27. 任宰訓 : 清肝健脾湯의 茵陳增量이 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1980.
  28. 田炳薰 : 補中益氣湯 및 四物湯加味方이 白鼠 肝損傷의 回復에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1992.
  29. 鄭昇杞 : 清上補下丸이 O<sub>3</sub> 및 CCl<sub>4</sub>로 因한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1980.
  30. 車宗泰 : 梔子大黃湯과 茵陳梔子湯 Extract가 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 碩士學位論文, 1987.
  31. 洪美淑 : 赤楊生肝湯이 알콜성 肝損傷에 미치는 效果, 慶熙大 大學院, 博士學位論文, 1991.



32. 李潤璟 : 葛根, 大棗 및 五味子の 肝機能 保護 效果에 관한 研究, 嶺南大 大學院, 博士學位論文, 1994.
33. 文鍾鎭 : 葛花 抽出物이 白鼠의 急性 肝損傷에 미치는 影響, 又石大 大學院, 碩士學位論文, 1996.
34. 朴二圭 : 急性 肝損傷에 대한 丹蔘의 保護作用, 又石大 大學院, 碩士學位論文, 1996.
35. 李盛雨 : 酸棗仁이 CCl<sub>4</sub> 中毒白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 東國大 大學院, 碩士學位論文, 1987.
36. 朴昌國 : 三七根이 TAA 中毒白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶山大 大學院, 碩士學位論文, 1989.
37. 李在馥 : 柴胡四物湯이 CCl<sub>4</sub>로 誘發된 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 尙志大 大學院, 碩士學位論文, 1996.
38. 朴世英 : 약쑥이 사염화탄소에 의하여 유발된 흰쥐 간손상에 미치는 영향, 朝鮮大 大學院, 博士學位論文, 1994.
39. 韓相源 : 龍膽草 및 柴胡水鍼이 CCl<sub>4</sub>로 誘發된 흰쥐의 損傷肝에 미치는 影響, 慶山大 大學院, 博士學位論文, 1992.
40. 張世煥 : 威靈仙이 四鹽化炭素로 因한 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶山大 大學院, 碩士學位論文, 1985.
41. 朴賢洙 : 인삼 saponin이 고지질 식이성 간손상에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 漢陽大 大學院, 博士學位論文, 1984.
42. 徐華錫 : 고려인삼이 주정성 간손상에 미치는 영향에 관한 임상적 및 실험적 연구, 漢陽大 大學院, 博士學位論文, 1983.
43. 崔榮植 : 人蔘이 CCl<sub>4</sub> 中毒 흰쥐의 肝損傷에 미치는 影響에 관한 研究, 慶熙大 大學院, 碩士學位論文, 1988.
44. 金吉洙 : 사염화탄소에 의한 Rat의 간손상에 미치는 인진호 추출물의 영향, 慶北大 大學院, 博士學位論文, 1991.
45. 金漢燮 : 薺芫가 TAA 中毒白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶山大 大學院, 碩士學位論文, 1987.
46. 姜秉淇 : 黃芩煎湯液이 肝損傷에 對한 防禦 및 恢復에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 博士學位論文, 1986.
47. 金승호 외 : 천연물 이용 간염 치료제 개발에 관한 연구, 과학기술처, p. 8, 1993.
48. 謝竹藩 : 韓英中醫藥分類辭典, 중국, 신세계출판사, p.161, 1994.
49. 洪원식 : 精校黃帝內經靈木區, 서울, 동양의학연구원, p. 309, 1981.
50. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 북경, 인민위생출판사, p. 47, 56, 63, 64, 65, 1982.
51. 李挺 : 醫學入門, 서울, 한성사, pp. 284-285, 1981.
52. 전통의학연구소편 : 본초약재도감, 서울, 정보사, p. 20, 59, 76, 111, 180, 236, 310, 319, 415, 1994.
53. 陳存仁 : 한방의약대사전(I, II, III), 서울, 동도문화사, pp.142-143(I), 10-13(II), 80-83(III), 124-127(III), 144-147(III), 272-275(III), 356-359(III), 380-383(III), 1984.
54. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, p. 572, 1975.
55. 江蘇新醫學院편 : 中藥대사전, 상해, 상해과학기술출판사, p. 102, 1083, 1174, 1250, 1397, 1518, 1588, 1770, 2698, 2699, 1980.
56. 上海中醫學院編 : 中草藥學, 香港, 商務印書館, p. 131, 1977.
57. 中國醫學科學院 藥物研究所編 : 中藥志 제1권, 북경, 인민위생출판사, pp. 453-458, 1979.
58. 왕곡생 : 中藥藥理와 應用, 북경, 인민위생출판사, pp. 614-617, 1983.
59. 安德均, 李尙仁, 盧昇鉉, 辛民教, 李映鍾 : 本草學, 서울, 永林社, pp.328-329, 1991.
60. 鄭普燮, 辛民教 : 圖解鄉藥大事典(식물편),

- 서울, 永林社, pp. 327-329, 452-454, 579-580, 652-653, 667-667, 733-734, 826-827, 844-845, 1016-1017, 1990.
61. Tiollas, P., Pourcel, C. and Dejean, A. : The hepatitis B virus. *Nature*, 317:487-495, 1985.
  62. Sudo, K., Konno, K., Shigeta, S. and Yokota, T. : Colorimetric assay system for screening antiviral compounds against hepatitis B virus. *Microbiol. Immunol.* 40(2):153-159, 1996.
  63. Hoofnagle, J. H. : Chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*, 323: 337-339, 1990.
  64. Wright, T. L., Lau, J. Y. N. : Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet*, 342:1340-4, 1993.
  65. Chisari, F. V., Ferrai, V. C. and Mondelli, M. : Hepatitis B virus structure and biology. *Microb. Phthog.* 6:311-325, 1989a.
  66. Harrison, T. J. and Zuckerman, A. J. : The Molecular Medicine of Viral Hepatitis. Royal Free Hospital School of Medicine, London, UK, John Wiley & Sons press, 1997, pp63-66
  67. Bancroft, W. H., Mundon, F. K. and Russell, P. K. : Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* 109:842-848, 1972.
  68. Yoffe, B, Noonan, C. A. : Progress and perspectives in human hepatitis B virus research.. *Prog, Med. Virol.* 40:107-140, 1993.
  69. Robinson, W. S. : Molecular events in the pathogenesis of hepaanavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu. Rev. Med.*, 45:279-323, 1994.
  70. Beasley, R. P., Lin, C. C. Hwang, L. Y. : Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*, II:1129-1133, 1981.
  71. Lok, A. : Treatment of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.*, 1: 105-124, 1994.
  72. Rensen, P. C., de Vrueth, R. L. and van Berkel, T. J. : Targeting hepatitis B therapy to the liver. *Clinical pharmacokinetic considerations. Clin. Pharmacokinet.* 31(2): 131-155, 1996.
  73. Colledge, D., Locarnini, S. and Shaw, T. : Synergistic inhibition of hepadnaviral replication by lamivudine in combination with penciclovir in vitro. *Hepatology*, 26(1):216-225, 1997.
  74. Schaffner, W. Gardner, P. : Hepatitis B immunization strategies: expanding the target. *Ann. Intern. Med.*, 118:308-9, 1993.
  75. Gerin, J. L. : Antiviral agents for hepatitis B. *Hepatology.* 14:198, 1991.
  76. 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. U.S.A.* 84:866-870, 1986.
  77. 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 Research*, 19:55-70, 1992.
  78. Korba, B. E. and Milman, G. : A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication.. *Antiviral Research*, 15:217-228, 1991.
  79. 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.* 37:441-447, 1993.
  80. Wang, M., Cheng, H., Li, Y., Meng, L.,

- Zhag, G. and Mai, K. : Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: Observations with three preparations from different geographic sites. *J. Lab. Clin. Med.*, 126:350-352, 1995.
81. 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 Research*, 9:429-434, 1995.
82. Kim, Y. and Kang, H. S. : Cloning and expression of hepatitis B virus surface antigen gene. *Kor. Biochem. J.*, 17:70-79, 1984.
83. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning, A laboratory manual. Spring Harbor, New York, 1989.
84. Kawanishi, Y., Hayashi, N., Katayama, K., Ueda, K., Takehara, T., Miyoshi, E., Mita, E., Kasahara, A., Fusamoto, H. and Kamada, T. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  inhibit synergistically viral replication in hepatitis B virus-replicating cells. *Journal of Medical virology*, 47:272-277, 1995.
85. Ozer, A., Khaoustov, V. I., Mearns, M., Lewis, D. E., Genta, R. M., Darlington, G. J. and Yoffe, B. : Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology*, 110:1519-1528, 1996.
86. Yin, X., Liu, D., Wang, H. and Zhou, Y. : A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. *Mutation Research*, 260:73-82, 1991.