

천연 Hesperetin의 항헤피스바이러스작용과 Acyclovir 및 Vidarabine과의 병용효과

이지현, 어성국, 김영소, 이종길, 한성순*

충북대학교 약학대학

Antiherpetic Activities of Natural Hesperetin Alone and in Combinations with Acyclovir and Vidarabine

Ji-Hyun Lee, Seong-Kug Eo, Young-So Kim, Chong-Kil Lee and Seong-Sun Han*

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

Abstract—To search for less toxic antiherpetic agents, the inhibitory effects of natural hesperetin 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*. Hesperetin inhibited plaque formations of HSV-1 and HSV-2 in a dose dependent manner. It also exhibited more potent antiherpetic activity on HSV-2 with selectivity index (SI) of 9.8 than on HSV-1 with SI of 8.4. The combined antiherpetic effects of hesperetin 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 hesperetin with acyclovir on HSV-1 and HSV-2 showed synergistic effects with CI values of 0.29~0.73 for 50%, 70%, 90% effective levels and those with vidarabine showed partially synergistic or additive effects with CI values of 0.83~1.33.

Key words—Hesperetin; 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), varicella zoster virus(VZV), cytomegalovirus(CMV), Epstein-Barr virus(EBV) 등이 알려져 있으며 이중 대표적인 HSV-1과 HSV-2는 형태학적으로 동일하고 대략 50%의 DNA 유사성을 지니고 있지만 생물학적, 생화학적, 유전적, 임상적인 면에서 차이점을 나타낸

다.¹⁾ 즉 HSV-1은 얼굴을 비롯한 상체부위 감염에 연관이 있고, HSV-2는 생식기를 비롯한 하체부위에 수포성, 괴양성 병변을 일으킨다. 초기 감염후에 HSV-2는 중추신경계와 다른 기관으로 확산되며 신경절 내에 있던 잠재성 바이러스가 재활성화함으로써 재발된다.^{2,3)}

현재 임상적으로 사용되고 있는 항헤피스바이러스제로는 acyclovir(ACV), vidarabine(ara-A), ganciclovir(DHPG), idoxuridine(IDU) 등의 nu-

*교신저자 : Fax 0431-268-2732

cleoside 유도체와 phosphonoacetic acid, phosphonoformic acid(foscarnet, PFA) 등의 pyrophosphate 유도체가 있다. Nucleoside 유도체들은 세포내에서 cellular kinase 또는 virus kinase에 의해 인산화 형태로 전환되어 활성화되며, pyrophosphate 유도체들은 nucleoside 유도체와는 달리 활성화를 필요로 하지 않고 직접적으로 viral DNA polymerase를 억제함으로써 항바이러스효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 이중 acyclovir는 바이러스 감염세포에서만 활성화되는 최초의 항바이러스제이며 바이러스 고유의 핵산 복제효소를 선택적으로 억제하므로 부작용이 적고 효과가 우수하여 널리 사용되고 있다.⁵⁾ 전신투여제로 쓰이는 vidarabine, foscarnet 등은 간기능저하, 생식세포, 신장, 간에 대한 독성이 보고되었고, acyclovir의 경우에도 신기능저하 환자에게 축적되어 신장폐색이나 acyclovir 결정이 생성되는 것으로 보고되었으며,⁶⁾ 최근에는 acyclovir와 같은 항바이러스제에 대한 내성바이러스의 출현에 대한 보고가 증가하고 있다.⁷⁾

또한 최근 바이러스질환의 치료에 병용투여법이 중요시되고 있는 바, 병용투여로 상승 또는 상가효과를 얻을 수 있고, 독성을 감소시키며 내성균주의 출현을 억제할 수 있다.⁸⁾ 항바이러스제의 병용효과에 관한 연구는 Shinazi 등⁹⁾이 herpes simplex viruses에 대해 acyclovir와 vidarabine 및 5-monophosphate vidarabine과의 병용효과를, Musci 등¹⁰⁾은 herpes simplex virus type 1과 pseudorabies virus에 대한 quercetin과 5-ethyl-2'-dioxypyridine의 병용효과를, Veckenstedt 등¹¹⁾은 mouse의 mengo virus 감염에 대한 quercetin과 murine alpha 및 beta interferon의 병용효과를 각각 보고하였다.

Hesperetin(3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone)은 지방산화저지작용,¹²⁾ UV 조사에 대한 DNA손상 보호작용¹³⁾ 등의 생리활성을 가지는 flavonoid로서 hesperidin(hesperetin-7-O- β -rutinoside)의 비당체이다.

천연에 널리 분포되어 있고 다양한 생리활성을 갖고 있는 flavonoid 중 아직 항바이러스제에 관한 연구보고를 찾아볼 수 없는 hesperetin을 한국산 감귤의 과피로부터 추출, 단리하여 herpes

simplex virus type 1과 type 2에 대한 항바이러스효과를 측정하고, 임상적으로 널리 이용되고 있는 nucleoside계 항바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험을 실시하고 병용효과를 평가하여 그 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 기기-Hesperetin은 한국산 감귤 *Citrus unshiu*의 과피에서 분리하여 실험에 사용하였다. Eagle's minimum essential medium (EMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin, penicillin G, streptomycin, amphotericin B는 Gibco BRL Co., 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), crystal violet, 9-[(2-hydroxyethoxy) methyl] guanine (acyclovir), adenine 9- β -D-arabinofuranoside(vidarabine)는 Sigma Co. 제품을 사용하였다. 기기는 clean bench(Green Yang-haeng), EIA reader(Molecular Device), CO₂ incubator(Vision), inverted microscope(Nikon), plaque viewer(Bellco), freeze dryer(Edward), autoclave(Hanyang), centrifuge(Hanil), membrane filter(Nalgene), pH meter(Fisher)를 사용하였다.

세포 및 바이러스-숙주세포는 Vero 세포(Kidney, African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL81을, 시험바이러스는 herpes simplex virus type 1(F strain) ATCC VR-733과 herpes simplex virus type 2(G strain) ATCC VR-734를 사용하였다. Vero 세포는 10% heat inactivated(56°C, 30 min) FBS, penicillin G, streptomycin 및 amphotericin B가 함유된 EMEM으로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였고 HSV-1과 HSV-2는 MOI(multiplicity of infection)가 0.01 pfu/cell의 바이러스액을 Vero 세포에서 배양한 후 바이러스의 역가를 plaque reduction assay¹⁴⁾로 측정하여 -70°C 이하에서 보관하여 사용하였다.

세포독성시험-숙주세포에 대한 세포독성은 MTT reduction assay¹⁵⁾에 따라 시험하였다.

Vero 세포(3.5×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO₂, 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 측정하여 50% cytotoxic concentration(CC₅₀)의 값을 계산하였다.

항바이러스시험 - 항허피스바이러스효과는 plaque reduction assay¹⁴⁾에 따라 시험하였다. Vero 세포(5×10^5 cells/well)를 24 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 세포단층을 얻었다. 세포단층을 PBS로 세척하고 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종하고 세포에 흡착되도록 1시간 배양한 다음, 1, 10, 20, 30 및 40 µg/ml로 조제한 hesperetin과 1% agar를 함유한 EMEM을 가한 후 plaque이 형성될 때까지 배양하였다. Plaque이 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque 수를 세었다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제시키는 hesperetin의 농도인 50% effective concentration(EC₅₀), EC₇₀ 및 EC₉₀를 구하고 selectivity index(SI)로 항허피스바이러스 효과를 판정하였다.

병용시험 - 병용시험은 Tahedjian 등¹⁶⁾의 방법에 따라 시험하였다. Vero 세포(5×10^5 cells/well)를

24 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후, 배지를 제거하고 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종, 바이러스를 세포에 흡착시킨 후 더 배양하였다. Hesperetin은 1~40 µg/ml, acyclovir는 0.05~2.00 µg/ml, vidarabine은 0.25~10.00 µg/ml의 농도범위내에서 hesperetin과 acyclovir는 20:1, hesperetin과 vidarabine은 4:1의 농도비율이 되도록 혼합조제한 후, plaque이 형성될 때까지 5% CO₂, 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.

시험결과와 분석 및 판정 - 시험결과는 Chou와 Talalay 등¹⁷⁾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, 상승효과 및 길항효과로 판정하였다. CI value가 1보다 작으면 상승효과, 1이면 상승효과, 그리고 1보다 크면 길항효과로 판정한다.

결 과

항바이러스효과 - Hesperetin의 HSV-1과 HSV-2에 대한 항허피스바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 측정하여 CC₅₀와 EC₅₀로부터 얻은 selectivity index(SI)는 Table I과 같다. Hesperetin의 Vero 세포에 대한 CC₅₀은 217.2 µg/

Table I. Antitherpetic activity of hesperetin by plaque reduction assay

Samples	Viruses	CC ₅₀ ^a	EC ^b (µg/ml)			SI ^c
			EC ₅₀	EC ₇₀	EC ₉₀	
Hesperetin	HSV-1	217.2	26.0	38.4	50.9	8.4
	HSV-2	217.2	22.2	29.5	36.9	9.8
Control (Acyclovir)	HSV-1	913.7	1.7	2.4	3.1	537.5
	HSV-2	913.7	0.5	0.9	1.3	1827.4
Control (Vidarabine)	HSV-1	117.6	6.2	8.6	11.0	19.0
	HSV-2	117.6	5.5	8.6	11.6	21.4

^a50% cytotoxic concentration (CC₅₀) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

^bEffective concentration (EC) is the concentration of hesperetin required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%.

^cSelectivity Index (SI) = CC₅₀/EC₅₀.

ml로써 비교적 세포독성이 적었고, HSV-1 및 HSV-2에 대하여 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였으며 HSV-1의 SI는 8.4를, HSV-2의 SI는 9.8을 나타냄으로써 HSV-2에 대해 좀 더 우수한 항허피스바이러스효과를 나타내었다.

병용효과

HSV-1의 hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine-Hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-1의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 1과 같다. Hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine의 병용효과는 용량의존적으로 상승하였으며, hesperetin과 acyclovir의 병용이 vidarabine과의 병용보다 더 강한 항바이러스 효과를 보였다. 단독처리시 hesperetin은 30 µg/ml의 농도에서 77%, acyclovir는 1.50 µg/ml의 농도에서 58%의 plaque 형성억제효과를 보였으나 이 두 물질을 병용시 plaque 형성 억제율은 98%로 상승되었다. 7.5 µg/ml의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율은 88%로 vidarabine 단독처리시의 66% 보다 상승하였다. Fig. 1에 나타난 결과를 median-effect equation으로 바꾸어 log [concentration]에 대해 $\log[(f(a))^{-1}-1]^{-1}$ 의 값을 계산한 결과 median-effect plot으로부터 결정된 parameter를 Table II에 나타내었다. HSV-1에 hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때 f(a)에 따른 CI value는 Fig. 2와 같다. Hesperetin과 acyclovir 병용시 CI value는 f(a)가 0.50에서 0.90사이인 유효농도 범위내에서 0.31~

0.73의 값을 나타냈고, vidarabine과의 병용시 CI value는 유효농도 범위내에서 0.92~1.33을 나타냈

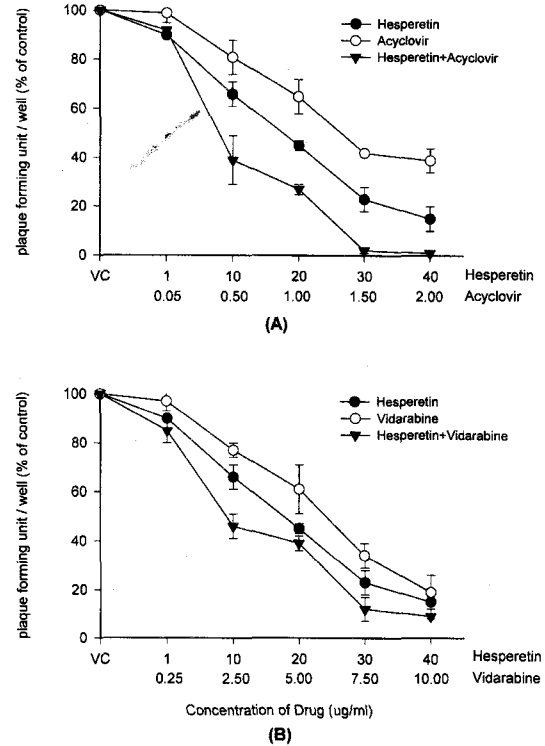


Fig. 1. Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 1 in Vero cells by hesperetin, acyclovir (A) and vidarabine (B) alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean ± S.D. of quadruplicate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

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

Materials	Parameters ^a			CI at f(a) of: ^b		
	<i>m</i>	EC ₅₀ (µg/ml)	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
Hesperetin	1.01	11.26	0.92			
Acyclovir	1.39	1.39	0.99			
Vidarabine	1.25	4.82	0.94			
Hesperetin/Acyclovir (20 : 1)	1.79	5.41	0.86	0.64(0.73)	0.48(0.53)	0.31(0.33)
Hesperetin/Vidarabine (4 : 1)	1.03	8.21	0.91	0.92(1.12)	0.97(1.19)	1.06(1.33)

^a*m* is the slope, EC₅₀ is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

^bCI(1, synergism: CI=1, additive effect: CI>1, antagonism: CI<1). 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.

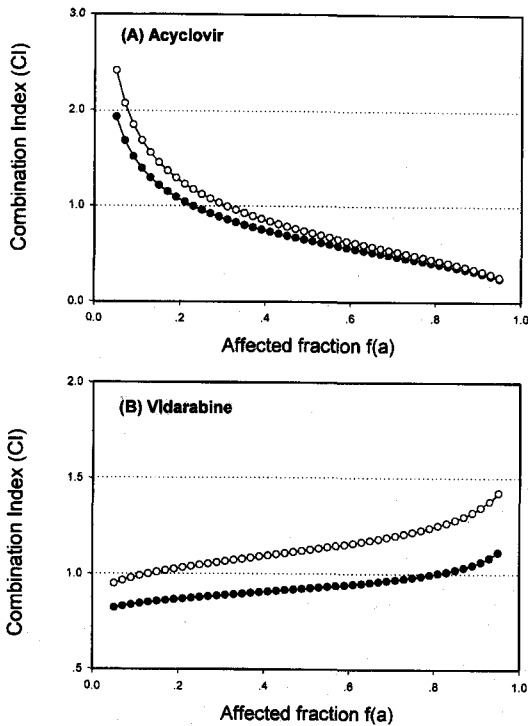


Fig. 2. CI values for combinations of hesperetin with acyclovir (A) and vidarabine (B) on herpes simplex virus type 1 corresponding to affected fraction $f(a)$ ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated under both mutually exclusive (●) and mutually nonexclusive (○) assumptions.

다. 즉, hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용은 HSV-1에 대해 부분적으로 상승 또는 상가작용을 나타내었으며 acyclovir와의 병용이 vidarabine과의 병용보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

HSV-2의 hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine - Hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-2의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 3과 같다. Hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine의 병용효과는 용량의존적으로 상승하였으며, HSV-1에 대해서와 마찬가지로 hesperetin과 acyclovir의 병용이 vidarabine보다 HSV-2에 대해 더 강한 항바이러스 효과를 보였다. 단독처리시 hesperetin은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 9%, acyclovir는 0.50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 63%의 plaque형성 억제효과를 보였으나, 이 두 물

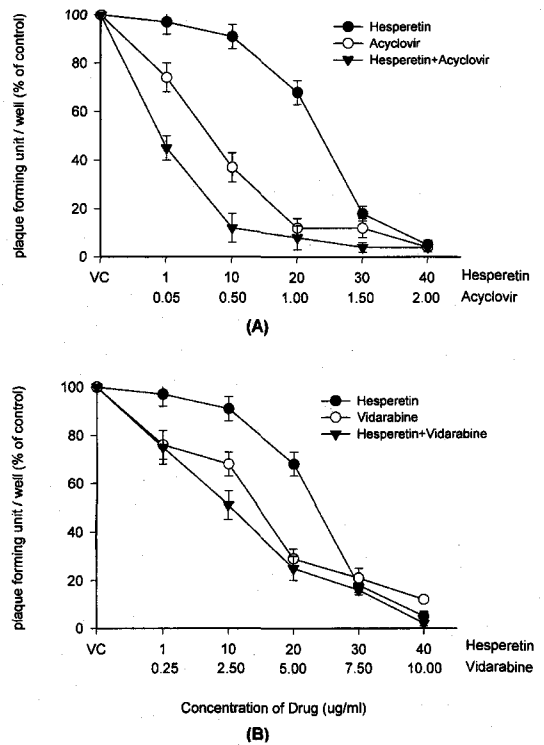


Fig. 3. Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 2 in Vero cells by hesperetin, acyclovir (A) and vidarabine (B) alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean \pm S.D. of quadruplicate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

질을 병용처리시 plaque형성 억제율은 88%로 상승되었다. 그러나 2.50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율은 49%에 불과했다. Fig. 3에 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 III에 나타내었다. HSV-2에 hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때 $f(a)$ 에 따른 CI value는 Fig. 4와 같다. Hesperetin과 acyclovir 병용시 CI value는 $f(a)$ 가 0.50에서 0.90사이인 유효농도 범위내에서 0.29~0.70의 값을 나타냈고, vidarabine과의 병용시 CI value는 유효농도 범위내에서 0.83~1.10을 나타냈다. 즉, Hesperetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용은 HSV-2에 대해 부분적으로 상승 또는 상가작용을 나타내었으며 acyclovir와의

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

Materials	Parameters ^a			CI at f(a) of: ^b		
	<i>m</i>	EC ₅₀ (μg/ml)	<i>r</i>	0.50	0.70	0.90
Hesperetin	1.55	15.58	0.75			
Acyclovir	1.05	0.17	0.91			
Vidarabine	0.81	1.68	0.77			
Hesperetin/Acyclovir (20 : 1)	0.82	0.86	0.98	0.29(0.31)	0.39(0.41)	0.62(0.70)
Hesperetin/Vidarabine (4 : 1)	1.09	5.42	0.73	0.92(1.10)	0.84(1.02)	0.83(0.99)

^a*m* is the slope, EC₅₀ is the median effective concentration, and *r* is the correlation coefficient as determined from the median-effect plot.

^bCI<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.

고 찰

한국산 감귤 *Citrus unshiu*의 과피로부터 추출, 단리한 hesperetin의 항허피스바이러스효과를 plaque reduction assay에 따라 측정한 결과 hesperetin은 HSV-1과 HSV-2의 증식을 용량의 존적으로 억제하였고, 바이러스를 Vero 세포에 흡착시킨 후 시료를 처리하였을 때 바이러스의 증식이 억제되는 것으로 보아 허피스바이러스의 세포내에서의 복제를 억제하는 것으로 사료된다. Hesperetin은 HSV-1과 HSV-2에 대해 SI가 각각 8.4와 9.8로 HSV-2에 대해서 조금 더 우수한 항바이러스효과를 나타냈다. 이러한 결과는 동종 바이러스의 strain 간의 유전자서열이 다른데서 오는 감수성의 차이에서 기인하는 것으로 사료된다.¹⁾ Flavonoid는 천연에 널리 분포하고 있으며, 그중 일부는 이미 임상치료에 응용되고 있다.^{12,18)} 그러나 아직 flavonoid의 항바이러스작용 기전은 밝혀지지 않고 있으며 다만 확실한 것은 본 연구결과에서도 볼 수 있듯이 hesperetin을 비롯한 몇몇 flavonoid가 세포내에서 바이러스의 복제를 억제할 수 있다는 것이다.

최근 몇 년간 여러 항허피스바이러스제가 개발, 임상적으로 사용되면서 허피스바이러스질환의 치료에 획기적인 발전이 있었으나, 현재 면역기능이 저하된 환자를 중심으로 약제내성 허피스바이러스 출현과 부작용이 크게 우려되고 있다. 따라서 서로 다른 항바이러스 작용기전을 갖는 약제를 동시투여하는 병용투여법에 관한 많은 관심이 집중되고 있다.

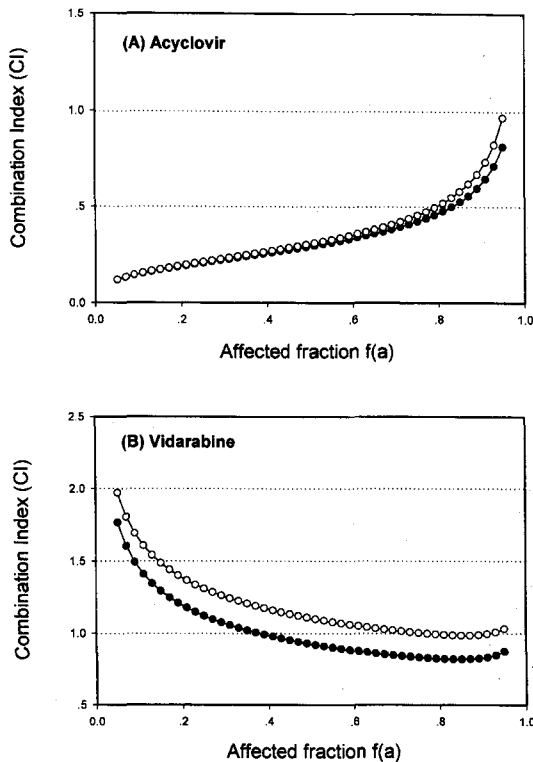


Fig. 4. CI values for combinations of hesperetin with acyclovir (A) and vidarabine (B) on herpes simplex virus type 2 corresponding to affected fraction f(a) ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated under both mutually exclusive (●) and mutually nonexclusive (○) assumptions.

병용이 vidarabine과의 병용보다 더 우수한 병용 효과를 나타내었다.

약물의 병용투여는 세균이나 바이러스감염증 치료시 생체에 대한 약물의 독성을 약화시키고, 내성균주의 발현을 억제하거나 지연시킬 수 있으며, 단독투여시 보다 상승효과를 얻을 수 있으므로 최근 acquired immune deficiency syndrome(AIDS) 등의 치료에 있어서 활발한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 실시한 hesperetin과 nucleoside계 항히피스 바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험은 약물을 단독으로 투여했을 때 보다 HSV-1과 HSV-2의 증식을 더욱 강하게 억제하였다. 이는 세포내에서 바이러스의 DNA polymerase를 억제함으로써 항바이러스작용을 나타내는 acyclovir 및 vidarabine과 hesperetin의 작용기전이 서로 상이함을 보여주는 결과이다.^{4,5)} 단독투여시 acyclovir는 vidarabine 보다 HSV-2에 대해 더 강한 항바이러스 효과를 나타냈고, vidarabine은 acyclovir 보다 HSV-1에 대해 더 강한 효과를 나타냈으나 병용투여한 결과, HSV-1과 HSV-2 모두에 대해서 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 보인 것은 acyclovir 및 vidarabine과 2종의 히피스 바이러스 사이에는 감수성에 차이가 있음을 시사하며, 기존 항히피스바이러스제와 flavonoid를 병용시 서로 다른 특이활성 및 작용기전에 따라 그 병용효과가 항바이러스제의 종류에 따라 서로 다르게 나타날 수 있음을 보여주었다.

Acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 plaque 형성 억제효과를 상승, 상가, 길항효과를 판정하는 CI values로 표현했을 때, HSV-1 및 HSV-2에 대해 hesperetin과 acyclovir의 병용은 유효농도 범위인 $f(a)$ 0.50에서 0.90사이에서 모두 1보다 작은 값을 보였고, vidarabine과의 병용은 1에 가깝거나 1보다 큰 값을 나타냈다. 그러므로 HSV-1과 HSV-2에 대한 hesperetin과 acyclovir의 병용은 상승효과를 나타내며 부분적으로 상가효과를 나타내는 vidarabine과의 병용보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 hesperetin은 새로운 개념의 항히피스바이러스 활성을 가진 유용한 물질로 생각되며, 활성을 떨어뜨리지 않으면서 독성, 부작용이 있는 항히피스바이러스제의 용량을 의미있게 감량시킬 수 있는 병용투여제로서 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1. Hesperetin의 HSV-1 및 HSV-2의 Vero 세포 내에서의 증식에 대한 억제효과를 시험한 결과 용량의존적으로 plaque형성을 억제하였으며, HSV-1에 대한 SI는 8.4이고 HSV-2에 대한 SI는 9.8로 HSV-2에 대해 좀 더 우수한 항히피스바이러스효과를 나타내었다.

2. Hesperetin과 nucleoside계 항히피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험 결과, acyclovir와의 병용시 HSV-1과 HSV-2에 대한 CI value는 유효농도 범위 내에서 0.29~0.73이고, vidarabine과의 병용시 CI value는 0.83~1.33을 나타내었으므로 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 나타내었다.

인용문헌

- Mindel, A. (1989) The bloomsbury series in clinical science: Herpes simplex virus, 1-4. Great Britain, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Lapucci, A., Macchina, M. and Parkin, A. (1993) Antiherpes virus agents: A review. *II Farmaco*. 48(7): 871-895.
- 김승곤, 김충환, 박기호, 이규식, 정경석 (1994) 임상바이러스학(Clinical Virology), 109-118. 도서출판 고려의학, 서울.
- Markham, A. and Faulds, D. (1994) Ganciclovir, An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 48(3): 455-484.
- Chatis, P. A. and Crumpacker, C. S. (1992) Resistance to herpesviruses to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1589-1595.
- Richman, D. D., Fischl, M. A. and Grieco, M. H. (1987) The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *N. Engl. Med.* 317: 192-197.
- Coen, D. M. (1986) General aspects of virus drug resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(Suppl. B): 1-10.
- Schinazi, R. F. (1991) Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential. In Chou, T. C. and Rideout, D. C. (ed.), *Molecular mechanisms of chemotherapeutic synergism, potentiation and anta-*

- gonism, 110-181. Academic Press, Orlando, FL.
9. Schinazi, R. F., Peters, J., Williams, C. C., Chance, D. and Nahmias, A. J. (1982) Effect of combinations of acyclovir with vidarabine or its 5'-monophosphate on herpes simplex viruses in cell culture and in mice. *Anti-microb. Agents Chemother.* 22(3): 499-507.
 10. Musci, I. (1984) Combined antiviral effects of flavonoids and 5-ethyl-2'-deoxyuridine on the multiplication of herpesviruses. *Acta virol.* 28: 395-400.
 11. Veckenstedt, A., Guttner, J. and Beladi, I. (1987) Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral Res.* 7: 169-178.
 12. Willaman, J. J. (1955) Some biological effects of the flavonoids. *J. Am. Pharm. Asso.* 44(7): 404-408.
 13. Kootstra, A. (1994) Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* 26(2): 771-774.
 14. Langford, M. P. and Weight, D. A. (1981) Virus plaque-reduction assay for Interferon: Microplaque and regular macroplaque reduction assays. *In* Sidney Pegstka(ed.), *Methods in enzymology*, 78: 339-346. Academic Press, New York.
 15. 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. (1988) 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: 4827-4833.
 16. Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Lorcamini, S. and Birch, C. (1992) Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type I *in vitro* by interferon alpha and coumermycin A1. *Antiviral Chem. Chemother.* 3(3): 183-188.
 17. Chou, T. C. and Talalay, P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55.
 18. Elliott M. J. R. and Critman, K. (1993) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The flavonoids*, 636-638. Chapman & Hall, London.

(1999년 1월 10일 접수)