

천연 Quercetin의 항헤피스바이러스작용과 Nucleoside계 항헤피스바이러스제와의 병용효과

김영소, 한성순*

충북대학교 약학대학

Antiherpetic Activities of Natural Quercetin Alone and in Combinations with Nucleoside Antiherpetic Agents

Young-So Kim and Seong-Sun Han*

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

Abstract—In order to find less toxic antiherpetic agents, the effect of natural quercetin on the plaque formation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) was studied *in vitro* in cell culture monolayers employing the technique of viral plaque reduction assay. Quercetin caused a concentration-dependent reduction in the plaque formation of herpesviruses. It also exhibited more potent antiherpetic activity on HSV-1 with effective concentration (EC_{50}) of 18.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ than on HSV-2 with EC_{50} of 24.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The combined antiherpetic effects of quercetin 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 quercetin with acyclovir on HSV-1 and HSV-2 showed more potent synergism with CI values of 0.19~0.89 for 50%, 70%, 90% effective levels than those with vidarabine with CI values of 0.43~1.46.

Key words—Quercetin; herpes simplex virus; plaque reduction assay; combination index (CI).

Quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)은 단독 또는 배당체로 식물계에 널리 분포하는 flavonoid로서 모세혈관강화작용, 지방산화 저지작용, 항균작용, 효소활성화작용 등의 생리활성을 가지고 있다.¹⁾

Herpesvirus는 현재 herpes simplex virus type 1(HSV-1)과 type 2(HSV-2), varicella zoster virus(VZV), cytomegalovirus(CMV), Epstein-Barr virus(EBV), human herpes virus-

6(HHV-6), HHV-7 등이 알려져 있으며 다양한 질병을 유발하고 잠복감염력이 있는 것이 특징이며 HSV-1과 HSV-2가 대표적인 바이러스이다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 항헤피스바이러스제로는 acyclovir(ACV), penciclovir(PCV), ganciclovir(DHPG), idoxuridine(IDU), vidarabine(ara-A) 등의 nucleoside 유도체와 foscarnet 등의 pyrophosphate 유도체가 있다.

최근 AIDS를 중심으로 바이러스질환의 치료에 병용투여법이 중요시되고 있는 바, 병용투여로 상승

*교신저자 : Fax 0431-268-2732

또는 상가효과를 얻을 수 있고, 독성을 감소시키며 내성균주의 출현을 억제할 수 있음이 여러 연구 결과 밝혀졌다.²⁾

Quercetin의 항바이러스작용에 관한 연구로는 Cutting 등³⁾이 quercetin, quercitrin과 rutin이 mouse의 rabies virus 감염에 대하여 예방효과를 갖는다고 보고하였고, Beladi 등⁴⁾은 quercetin, morin, luteolin 및 fisetin 등이 pseudorabies virus에 대하여 항바이러스작용이 있다고 하였다. 또한 Ono 등⁵⁾은 quercetin, baicalein을 비롯한 4종의 flavonoid가 reverse transcriptase(RT)를 억제함으로써 human immunodeficiency virus(HIV)와 Rauscher murine leukemia virus(RLV)에 우수한 활성을 갖는다고 보고하였다.

Quercetin과 항바이러스제와의 병용효과에 관한 연구로 Musci 등⁶⁾은 herpes simplex virus type 1과 pseudorabies virus에 대한 quercetin과 5-ethyl-2'-deoxyuridine의 병용효과를, Veckenstedt 등⁷⁾은 mouse의 mengo virus 감염에 대한 quercetin과 murine alpha 및 beta interferon의 병용효과를 보고하였다.

이상의 연구보고를 토대로 우리나라에 풍부하게 분포되어 있는 괴화 *Sophora japonica*에서 quercetin을 분리하여 HSV-1, HSV-2에 대한 항히피스 바이러스 효과를 plaque reduction assay에 따라 측정하고 nucleoside계 항히피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 - Quercetin은 괴화 *Sophora japonica*에서 분리한 rutin을 가수분해하여 얻었고, dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 시료로 사용하였다. DMSO는 바이러스 증식에 전혀 영향이 없는 농도에서 사용하였고 대조시험을 병행하였다. 괴화는 청주시내에서 구입하여 충북대학교 약학대학 이경순 교수의 감정을 받아 사용하였으며, 표본은 충북대학교 약학대학 미생물학교실에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - 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., dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Tedia Co. 제품을 사용하였다. 흡광도 측정을 위하여 EIA reader(Molecular Device)를 사용하였고, 세포배양은 CO₂ incubator(Vision)를, 현미경은 inverted microscope(Nikon)를, plaque수 계산은 plaque viewer(Bellco)를 각각 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/cell이 되도록 조정된 바이러스액을 Vero 세포에서 배양한 후 바이러스의 역가를 plaque reduction assay⁸⁾로 측정하여 -70°C 이하에서 보관하여 사용하였다.

세포독성시험 - 숙주세포에 대한 독성은 Vero 세포(3.5×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 10% heat inactivated FBS를 함유한 EMEM으로 시료는 최고농도가 500 μg/ml, 양성대조물질인 acyclovir와 vidarabine은 1,000 μg/ml가 되도록 조제한 다음, 6단계로 배수희석하여 100 μl씩 분주하고 48시간 배양하여 MTT reduction assay⁹⁾ 따라 시험하였다. EIA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 50% cytotoxic concentration(CC₅₀)의 값을 계산하였다.

항바이러스시험 - 항히피스바이러스효과는 plaque reduction assay⁸⁾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 quercetin과 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 quercetin의 농도인 50% effective concentration (EC₅₀), EC₇₀ 및 EC₉₀를 구하고 selectivity index (SI)로 항히피스바이러스효과를 판정하였다.

병용시험 - 병용시험은 Tachedjian¹⁰⁾의 방법에 따라 시험하였다. Vero 세포(5×10⁵ cells/well)를 24 well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 세포단층을 형성시킨 후, 약 150 pfu/well로 희석한 바이러스용액을 접종, 바이러스를 세포에 흡착시킨 후 더 배양하였다. Quercetin은 1~40 µg/ml, acyclovir는 0.05~2.00 µg/ml, vidarabine은 0.25~10.00 µg/ml의 농도범위내에서 quercetin과 acyclovir는 20:1, quercetin과 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.

시험결과의 분석 - 시험결과는 Chou와 Talalay¹¹⁾의 multiple drug effect analysis에 따라 분석하

였다. 결과는 대조군과 비교하여 증식의 억제가 일어나는 정도인 affected fraction(f(a))에 따라 combination index (CI)로 상승, 상가 및 길항효과로 판정하였다.

결 과

항히피스바이러스 효과 - Quercetin의 HSV-1과 HSV-2에 대한 항히피스바이러스효과를 plaque reduction assay 및 MTT reduction assay에 따라 측정된 결과는 Table I과 같다. Quercetin의 Vero 세포에 대한 CC₅₀는 89.8 µg/ml이었으며, HSV-1과 HSV-2에 대해 용량의존적으로 plaque 형성을 억제하였다. Plaque 수를 대조군과 비교하여 바이러스의 증식을 50%, 70%, 90%까지 억제시키는 quercetin의 농도인 50% effective concentration (EC₅₀), EC₇₀ 및 EC₉₀는 HSV-1에 대하여 18.7 µg/ml, 26.6 µg/ml, 34.5 µg/ml를, HSV-2에 대하여 24.5 µg/ml, 38.7 µg/ml, 52.7 µg/ml를 각각 나타내었다. 즉 quercetin은 HSV-1에 대해 더 유효한 EC₅₀를 나타내었다. SI는 HSV-1에 대해 4.8, HSV-2에 대해 3.7을 나타냄으로써 HSV-1에 대해 더 우수한 항히피스바이러스 효과를 나타내었다.

병용효과

HSV-1의 quercetin과 acyclovir 및 vidarabine - Quercetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-1의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 1과 같다. 단독처리시 quercetin은 30 µg/ml의 농도에서 52%, acyclovir

Table I. Antiherpetic activities of quercetin by plaque reduction assay

Samples	Viruses	CC ₅₀ ^a	EC ^b (µg/ml)			SI ^c
			EC ₅₀	EC ₇₀	EC ₉₀	
Quercetin	HSV-1	89.8	18.7	26.6	34.5	4.8
	HSV-2	89.8	24.5	38.7	52.7	3.7
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
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 quercetin required to reduce plaque formation of virus by 50%, 70%, and 90%. ^cSelectivity index (SI) = CC₅₀/EC₅₀.

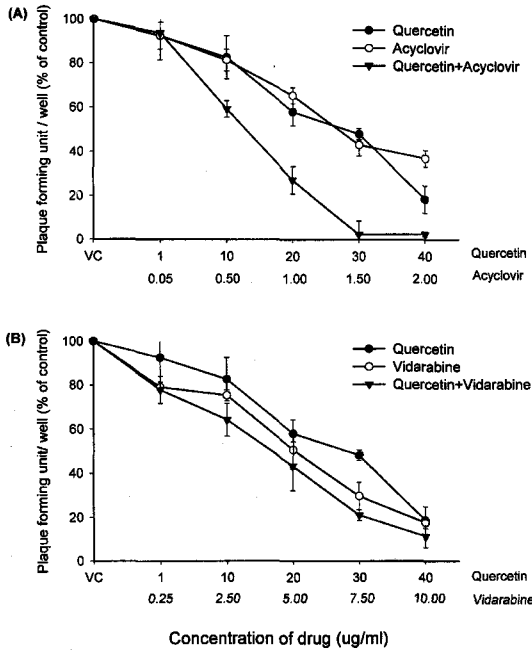


Fig. 1. Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 1 in Vero cells by quercetin and antiherpetic agents alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean \pm S.D. of quadruplicate determinations.

는 1.50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 57%의 plaque형성 억제효과를 보였으나 이 두 물질을 병용시 plaque형성 억제율은 97%로 상승되었다. 또한 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율은 80%로 vidarabine 단독처리시의 70% 보다 상승하였다.

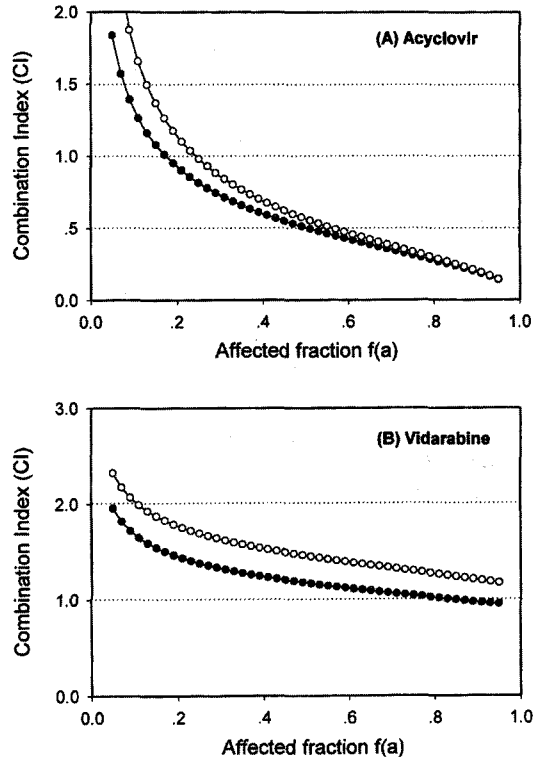


Fig. 2. CI values for combinations of quercetin with acyclovir and vidarabine on herpes simplex virus type 1 corresponding to affected fraction $f(a)$ ranging from 0.05 to 0.95. CI values were calculated under both mutually exclusive (\bullet) and mutually nonexclusive (\circ) assumptions.

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

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

Drugs	Parameters ^a			CI at $f(a)$ of : ^b		
	m	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	r	0.50	0.70	0.90
Quercetin	0.95	22.19	0.82			
Acyclovir	0.89	1.48	0.93			
Vidarabine	0.68	2.26	0.85			
Quercetin/Acyclovir (20:1)	1.55	6.71	0.88	0.50(0.57)	0.35(0.38)	0.19(0.20)
Quercetin/Vidarabine (4:1)	0.82	9.44	0.78	1.18(1.46)	1.07(1.33)	0.97(1.21)

^am 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.

plot으로부터 결정된 parameter를 Table II에 나타내었다. HSV-1에 quercetin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때 f(a)에 따른 CI value는 Fig. 2와 같다. Quercetin과 acyclovir 병용시 CI value는 f(a)가 0.50에서 0.90사이인 유효농도 범위내에서 0.19~0.57의 값을 나타냈고, vidarabine과의 병용시에는 0.97~1.46을 나타냈다. 즉 quercetin과 acyclovir와의 병용은 상승효과를 나타내었으며, vidarabine과의 병용보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

HSV-2의 quercetin과 acyclovir 및 vidarabine - Quercetin과 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시 Vero 세포에서 HSV-2의 plaque 형성에 대한 영향은 Fig. 3과 같다. 단독처리시 quercetin은 20 µg/ml의 농도에서 40%, acyclovir는 0.50 µg/ml의 농도에서 83%의 plaque형성 억제 효과를 보였으나, 이 두 물질을 병용처리시 plaque형성 억제율은 89%로 상승되었다. 또한 7.50 µg/ml의 농도에서 vidarabine의 병용시 억제율은 76%로 vidarabine 단독처리시의 61%보다 상승하였다. Fig. 3에 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 III에 나타내었다. HSV-2에 quercetin과 acyclovir 및 vidarabine을 병용하였을 때 f(a)에 따른 CI value는 quercetin과 acyclovir 병용시 f(a)가 0.50에서 0.90사이인 유효농도 범위내에서 0.61~0.89의 값을 나타냈고, vidarabine과의 병용시

CI value는 유효농도 범위내에서 0.43~1.42를 나타냈다. 즉, quercetin과 acyclovir와의 병용은 상승작용을, vidarabine과의 병용은 부분적인 상승 또는 상가작용을 나타내며 acyclovir와의 병용이 vidarabine과의 병용보다 더 우수한 병용효과를 나타내었다.

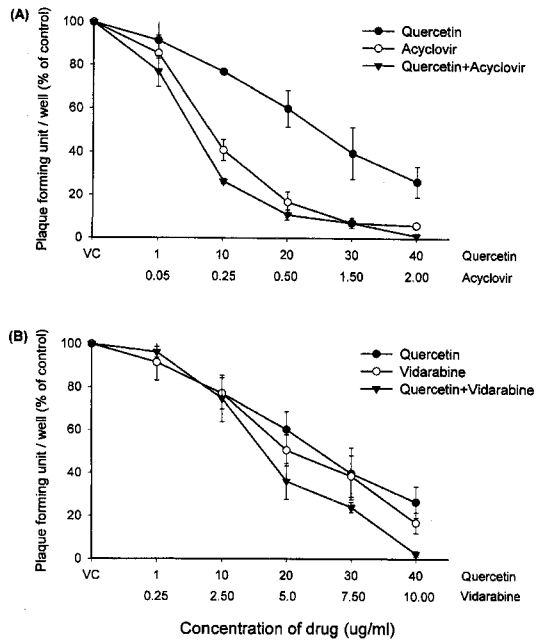


Fig. 3. Inhibitory effect of plaque formation of herpes simplex virus type 2 in Vero cells by quercetin and antiherpetic agents alone, and their combination at a fixed ratio. Results are expressed as percent with respect to virus control (VC) group. Each value is the mean±S.D. of quadruplicate determinations.

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

Drugs	Parameters ^a			CI at f(a) of : ^b		
	m	EC ₅₀ (µg/ml)	r	0.50	0.70	0.90
Quercetin	0.87	21.91	0.91			
Acyclovir	1.23	0.24	0.96			
Vidarabine	0.98	4.18	0.88			
Quercetin/Acyclovir (20:1)	1.35	3.28	0.88	0.79(0.89)	0.71(0.77)	0.61(0.65)
Quercetin/Vidarabine (4:1)	1.56	13.22	0.85	1.12(1.42)	0.77(0.92)	0.43(0.48)

^am 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.

고찰

괴화 *Sophora japonica*로부터 추출, 단리한 quercetin의 항허피스바이러스 효과를 plaque reduction assay에 따라 측정된 결과 HSV-1에 대한 EC₅₀는 18.7 µg/ml를, EC₇₀ 및 EC₉₀는 각각 26.6 µg/ml, 34.5 µg/ml를 나타내었고 HSV-2에 대한 EC₅₀는 24.5 µg/ml를, EC₇₀ 및 EC₉₀는 38.7 µg/ml 및 52.7 µg/ml를 나타내었으며 용량의존적으로 plaque형성을 억제하였다. MTT reduction assay에 의한 Vero cell에 대한 quercetin의 세포독성은 CC₅₀가 89.8 µg/ml이며, SI value(CC₅₀/EC₅₀)는 HSV-1에 대해서는 4.8이고 HSV-2에 대해서는 3.7을 나타내었으므로 HSV-1에 대해 더 우수한 항허피스바이러스 효과를 나타내었다. 이는 다른 기존의 항바이러스제 보다는 낮은 SI value를 나타낸 것으로 quercetin의 비교적 높은 세포독성에 기인한 것임을 알 수 있다. 일반적으로 flavonoid는 T lymphocyte를 비롯한 조조직배양된 동물세포에 대해서는 독성을 나타내지만 실제로 *in vivo*에서는 flavonoid가 간에서 대사되어 체내에 축적되지 않으며, rat를 대상으로 한 실험에서 LD₅₀는 2~10 g을 나타내며 독성이 미약하다고 보고된바 있으므로¹²⁾ 안전성에 있어서 크게 문제가 되지 않을 것으로 생각된다.

Quercetin의 항바이러스 작용기전에 관한 연구로, Musci와 Pragai¹³⁾는 quercetin이 cAMP phosphodiesterase를 억제하여 세포내 cAMP의 양을 증가시킴으로써 항바이러스효과를 나타낸다고 하였고, Kaul¹⁴⁾ 등은 quercetin이 바이러스와 비가역적으로 결합하여 바이러스의 감염력을 상실하게 하는 quercetin-virus complex를 생성하여 바이러스의 감염과 복제를 저지한다고 보고하였다. 그러나 quercetin의 확실한 항바이러스 작용기전은 아직 밝혀지지 않았으며 다만 본 연구결과에서도 볼 수 있듯이 quercetin과 같은 flavonoid가 세포내에서 바이러스의 증식을 억제할 수 있다는 것이다.

최근 몇 종의 항허피스바이러스제가 개발, 임상적으로 사용되면서 허피스바이러스질환의 치료에 획기적인 발전이 있었으나, 현재 면역기능이 저하된 환자에게 항바이러스에 내성인 HSV가 매우 빈번하게 관찰되고 있다. 따라서 항바이러스제의 부작용을

최소화하고 내성균주의 발현을 억제하며, 단독투여 시보다 상승효과를 얻기 위하여 서로 다른 항바이러스 작용기전을 갖는 약제를 동시투여하는 병용투여법에 관한 많은 관심이 집중되고 있다.

본 연구에서 실시한 quercetin과 nucleoside계 항허피스바이러스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험 결과, HSV-1에 대해서 acyclovir와 병용시 CI value가 0.19~0.89를, vidarabine과 병용시에는 0.42~1.46을 나타내었고, HSV-2에 대해서는 acyclovir와 병용시 0.61~0.89를, vidarabine과 병용시에는 0.43~1.42를 나타내어 약물 단독투여시보다 HSV-1과 HSV-2의 증식을 더 강하게 억제하였다. 즉 quercetin과 acyclovir의 병용은 HSV-1 및 HSV-2에 대해 CI values가 f(a) 대부분의 영역에서 1.0보다 작은 값을 나타내어 상승효과가 관찰되었으며, 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 quercetin과 acyclovir의 병용은 vidarabine과의 병용시보다 더 우수한 상승효과가 있다고 볼 수 있다. Acyclovir와 quercetin의 상승작용에 대해 Musci 등¹⁵⁾은 세포내에서 바이러스의 DNA polymerase를 억제하여 항바이러스작용을 나타내는 acyclovir와 quercetin의 작용기전이 서로 상이하기 때문에 상승작용이 나타난다고 하였다. 병용투여시, HSV-1과 HSV-2 모두에 대해서 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 보인 것은 acyclovir 및 vidarabine과 2종의 허피스바이러스 사이에는 감수성에 차이가 있고, 기존 항허피스바이러스제와 flavonoid를 병용시 서로 다른 특이활성 및 작용기전에 따라 그 병용효과가 다르게 나타날 수 있음을 보여준 것이다.

본 연구의 결과는 다른 항바이러스제간 병용시험 연구에 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

결론

1. Quercetin의 HSV-1 및 HSV-2의 Vero 세포 내에서의 증식에 대한 억제효과를 시험한 결과, HSV-1에 대한 EC₅₀는 18.7 µg/ml이고 SI는 4.8을, HSV-2에 대한 EC₅₀는 24.5 µg/ml이고 SI는 3.7

을 나타내었고 용량의존적으로 plaque형성을 억제 하였으며 HSV-1에 대해 더 우수한 효과를 보였다.

2. Quercetin과 nucleoside계 항히포스바이러 스제인 acyclovir 및 vidarabine과의 병용시험 결과, HSV-1에 대해서 acyclovir와 병용시 CI value가 0.19~0.57를, vidarabine과의 병용시에는 0.97~1.46을 나타내었고 HSV-2에 대해서는 acyclovir와 병용시 0.61~0.89를, vidarabine과 병용시에는 0.43~1.42를 나타내었으므로 acyclovir와의 병용이 더 우수한 상승효과를 나타내었다.

인용문헌

- Willaman, J. J. (1955) Some biological effects of the flavonoids. *J. Ame. Pharm. Asso.* 44(7): 404-408.
- Schinazi, R. F. (1991) Combined therapeutic modalities for viruses-rationale and clinical potential. In Chou, T. C. and Rideout, D. C. (eds.), Molecular mechanisms of chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism, 110-181. Academic Press, Orlando, FL.
- Cutting, W. C., Dreisbach, R. H. and Neff, B. J. (1949) Antiviral chemotherapy III. Flavones and related compounds. *Stanford Med. Bull.* 7: 137-138.
- Beladi, I., Puszati, R., Musci, I., Bakay, M. and Gabor, M. (1997) Activity of some flavonoids against viruses. *Annals New York Academy Sciences* 284: 358-364.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., and Barre-Sinoussi, F. (1990) Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* 190: 269-476.
- Musci, I. (1984) Combined antiviral effects of flavonoids and 5-ethyl-2'-deoxyuridine on the multiplication of herpesviruses. *Acta Virol.* 28: 395-400.
- 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.
- Langford, M. P. and Weight, D. A. (1981) Virus plaque-reduction assay for interferon: Microplaque and regular macroplaque reduction assays. In Pegstta, S. (ed.), *Methods in enzymology*, 78: 339-346. Academic Press, New York.
- Scubiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Terney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.
- Tachedjian, G., Tyssen, D., Jardine, D., Lorcarnini, S. and Birch, C. (1992) Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type *in vitro* by interferon alpha and coumestrol A1. *Antiviral Chem. Chemother.* 3(3): 183-188.
- 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.
- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-1148.
- Musci, I. and Pragai, B. M. (1985) Inhibition of virus multiplication and alternation of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 41: 930-931.
- Kaul, T. N., Middleton, E. Jr. and Ogra, P. L. (1985) Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology* 15: 71-79.
- Musci, I., Gyulai, Z. and Beladi, I. (1992) Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. *Acta Microbiology Hugarica* 39(2): 137-147.

(1999년 4월 6일 접수)