생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
30(3) : 238 ~ 243(1999)

수종 생약재의 간염 B형 바이러스 증식 억제 활성 검색

김태균, 한형미, 강석연, 정기경, 김승희*
국립독성연구소 생화학약리과

Screening of Some Plant Extracts for Inhibitory Activities on Hepatitis B Virus Replication

Tae Gyun Kim, Hyung Mee Han, Seog Youn Kang,
Ki Kyung Jung and Seung Hee Kim*
Division of Biochemical Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704, Korea

Abstract – This study was undertaken to test for anti-hepatitis B virus (HBV) activity of the aqueous extracts prepared from 9 medicinal plants of Korea (*Cornus officinalis, Caesalpinia sappan, Rubus coreanus, Lycium chinense, Artemisia capillaris, Isatis tinctoria, Phyllanthus urinaria, Lysimachia christinae, Lonicera japonica*). Aqueous extracts were tested for cytotoxicity and assayed for inhibition of HBV replication by measurement of HBV DNA and surface antigen (HBsAg) levels in the extracellular medium of HepG2 2.2.15 cells. The extracts from *Rubus coreanus, Artemisia capillaris, Phyllanthus urinaria* decreased the levels of extracellular HBV virion DNA at concentrations ranging from 128 to 256 μg/ml and inhibited the production of HBsAg dose-dependently without showing cytotoxicity. Our findings suggest that these three hebal medicinal plants may have potential to develop as specific anti-HBV drugs in the future.

Key words – Hepatitis B virus (HBV); HepG2 2.2.15 cell; replication; medicinal plants.

간염 B형 바이러스(hepatitis B virus : HBV)에 의해 유발되는 B형 간염은 전세계적으로 약 5%의 인구인 3억명 이상이 만성적으로 감염되어 있고 특히, 우리나라와 중국을 비롯한 동남아 지역에 만연되어 있는 무척 심각한 질병이다.[1,2] 현재까지 B형 간염에 대한 약물처방으로 면역조절물질인 interferon-alpha (INF-α)가 있으나, 이것은 약효가 뛰어나지 못함이 보고된 바 있으며,[3,4] 핵산 유도체인 항바이러스성 치료제들[5]은 약물의 비특이적인 체내 분포 및 작용으로 인해 신경독성, 간독성, 신부전 등의 심각한 부작용이 보고된 바 있다.[4] B형 간염에 대한 효과적인 치료제 개발이 지연되는 이유는 간염 B형 바이러스의 host range가 제한되어 있고 *in vitro*에서의 cell culture system이 발달되지 못해 실험적 접근이 어려웠으며 이로 인한 선도물질(lead compounds)의 부재 때문이었다.[1,6] 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.[7,8] 이 HepG2 2.2.15 세포주는 짧은 시간에 많은 시료를 검색할 수 있어 유용하며 동일한 목적으로 개발된 HB 611 세포주보다 세포배양이 용이하고 바이러스 수율이 높아 실험의 재현성이 높은 것으로 보고되었다.[9,10]

본 연구에서는 간염환자의 혈청에서 분리한 HBV DNA polymerase의 억제활성을 나타낸 산수유, 소목, 도생근과[11] 한방에서 전통적으로 간염치료 목적으로

*교신저자 : Fax 02-380-1811

사용되어온 생약재인 판남근, 금전초, 금은화, 구기자, 인진호, 빈랑[12] 및 진주초[13,14]를 사용하여 HepG2 2.2.15 배양세포를 이용한 재현성 있는 약효검색 시스템에서 HBV 증식 억제 효과를 측정한 결과, 일부 생약재에서 유의한 항HBV 활성이 확인되어 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

생약재구입 및 추출 – 본 실험에 사용된 10종의 생약재는 경동시장의 건재 한약방에서 1997년 7월에 구입하여 경희대학교 본초학교실에서 감정을 받은 뒤 식품의약품안전청 생약표본 저장고에 보관하여 사용하였으며 현재 증거표본 및 수침엑스 (KFD-ABP-97-001~010)가 동장소에 저장되어 있다. 수침엑스의 조제는 세절된 건조생약 1 kg을 사용하여 100 g씩 나누어 전자약탕기에 넣고 물 1liter를 가하여 100 °C에서 2~3시간동안 1회만 추출하여 각 추출액을 합한 후 감압농축시킨 다음 동결건조시켜 건조분말로 만든 후 시험물질로 사용하였으며 각 생약재의 수득율은 산수유 33.7%, 소목 4.0%, 도생근 8.9%, 구기자 24.4%, 인진호 10.5%, 판남근 2.5%, 진주초 10.8%, 금은화 18.8%, 금전초 6.3%, 빈랑 10.3% 이었다. 생약재 수침엑스는 각각 51.2 mg/ml의 농도로 물에 30분간 녹이고 이를 10,000×g에서 10분간 원심분리 한 후 가용성분인 상층액을 필터에 여과멸균하여 시료로 사용하였다.

세포주 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 μg/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에 넣어 37 °C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 4~5번의 계대를 거쳐 증식된 세포는 액체질소통에 보관하였으며, 이들을 해동하여 항바이러스 효능 검색에 사용하였다.

HBV 유전자 탐침 – "adr" 아형의 HBV 유전자가 클로닝된 pHBV315[15]를 이화여자대학교 약학대학 김길현 교수로부터 분양받았으며 이 plasmid를 제한효소 *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 수침엑스 시료의 세포독성은 HepG2 2.2.15 세포에 수침엑스를 세포배양액에 섞어 처치하여 24시간동안 배양한 후 시료의 세포독성에 의해 세포배양액으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 LDH cytotoxicity kit (Boehr in ger Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다.[16]

Virion HBV 증식 억제 측정 – HepG2 2.2.15 세포를 이용한 시료들의 항HBV 효능 검색은 세포주를 공여한 Korba 박사의 방법[8]을 기본으로 약간 변형하여 실시하였다.

추출물의 처치 - HepG2 2.2.15 세포를 24 well 세포배양판에 2×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 세포가 confluent 할 때까지 배양한 다음 항HBV 효능 검색에 사용하였다. 시료의 처치는 37 °C로 예열한 세포배양액 (2% FBS) 2 ml에 4가지 농도의 시료를 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 세포배양액 2 ml를 매일 교환하면서 세포에 8일간 처치하였다. 세포의 분주와 생약재 시료의 처치는 2배수(duplicate)로 3회 반복 시험하였다.

세포외 virion의 수집 – 세포에 시료를 처리한 날로부터 8일째가 되는 날에 세포배양액을 수거하여 3,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 800 ml에 200 μl의 PEG 용액 (50% polyethyleneglycol (PEG) 8000 (w/v), 0.6 M NaCl)을 첨가하여 잘 섞어 준 후 얼음에 2시간 동안 방치하였다. 이를 4 °C, 19,000×g에서 30분간 원심분리한 후, 상등액을 흡입펌프를 사용하여 제거하고 튜브를 잠시 세워 놓아 잔여 PEG 용액을 바닥에 모은 후 침전물이 떨어지지 않게 조심스럽게 완전히 제거하였다. 이후 각 튜브에 30 μl의 용해액 (50 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EDTA, 1% Lauryl sulfate (SDS), 1 μg/ml Proteinase K)을 첨가하여 침전물을 녹이고, 42 °C에 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^2로 자외선을 조사하여 DNA를 고정시키고, ECL direct™ labeling and detection system (Amersham)을 사용하여 HBV DNA를 검출하였다.

HBs 항원 및 HBe 항원의 측정 – 세포에 시료를

처치한 후 8일째 세포배양액을 수거하여 radioimunoassay 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 반응시킨 후 bead를 증류수로 세척하고 [^{125}I] 표지된 HBs 혹은 HBe 항체용액을 넣어 45 ℃에서 3시간 반응시켰다. 이 bead를 다시 세척한 후 gamma counter (Packard, U.S.A)에서 반응정도를 cpm으로 나타낸 후 대조군 항원의 양과 비교하여 항원생성 저해능을 측정하였다.

통계처리 – 실험결과는 Kruskal-Wallis one way analysis of variance (ANOVA)를 사용하여 통계처리 하였고, 각 군간의 차이를 비교할 경우에는 Bonferroni's modified *t*-test를 사용하여 $p<0.05$ 혹은 $p<0.01$ 수준에서 유의성을 검색하였다.

결과 및 고찰

세포독성 – 항바이러스 효과를 검색할 시료의 용량을 결정하기 위하여 시료처치 후 세포로부터 배양액 내로 유리된 LDH 활성도를 측정하여 세포독성을 측정하였다. 세포주에 1% Triton X-100을 처치한 것을 LDH 최대 생성량으로 기준하였을 때 시료의 최대 농도 (512 μg/ml) 처치로 인해 나타나는 세포독성은 산수유 3.4%, 소목 7.7%, 도생근 16.6%, 구기자 3.7%, 인진호 3.4%, 판남근 4.7%, 진주초 0.1%, 금은화 0.2%, 금전초 0.9%, 빈랑 97.9%로 나타났다. 양성대조물질로 사용된 dideoxycytidine (ddC)를 10 μM로 처치하였을 때 세포독성은 4.4% 이였으며 ddC의 CC_{50} (50% cytotoxic concentration)이 168 μM인것과 비교하였을 때 빈랑을 제외한 9종 생약재 추출물의 세포독성은 크지 않은 것으로 나타났다. 한편, 빈랑 수침엑스는 세포독성이 97.9% 로 측정되었으며 HepG2 2.2.15 세포주에 빈랑 수침엑스를 처치하였을 때 가장 낮은 처치농도인 64 μg/ml에서도 세포가 모두 용해 및 부유되어 항HBV 효능을 측정할 수가 없었으므로 HBV 증식억제도 실험에서 제외시켰다. 세포독성을 측정하는데 있어서 Korba 박사 등은 neutral red dye 흡수 억제도로 측정하였으나,[8] 이 방법과 MTT assay 법은 생약재 수침엑스가 가지고 있는 고유한 적색, 갈색의 색깔이 세포에 흡착되어 본 실험의 세포독성 측정에 적절하지 않다고 사료되었다.

HBV virion의 증식 억제 – 생약재 수침엑스가 HepG2 2.2.15 세포에서 HBV의 증식을 억제하여 세포외로 virion의 방출을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 시료를 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 나타난 바와 같이 9종의 생약재 수침엑스 중 도생근, 인진호, 진주초가 농도 의존적으로 HBV 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

도생근 수침엑스는 128 μg/ml의 농도에서 현저하게 HBV의 증식을 억제하였고, 256 μg/ml이상의 농도에서는 바이러스 증식을 완전히 억제하여 DNA band가 관찰되지 않았으며 양성대조물인 10 μM의 ddC 보다 우수한 효과를 보였다 (Fig. 1, panel C). HepG2 2.2.15 세포에서 ddC의 HBV 증식 억제효과는 EC_{90} (90% effective concentration)가 6 μM로 보고되었으며,[8] 본 실험에 사용한 ddC의 농도 10 μM은 HBV의 증식을 완전히 억제한 상태를 나타내고 있다 (Fig. 1, lane PC). 인진호 수침엑스는 가장 낮은 처치농도인 64 μg/ml에서 HBV의 증식을 현저하게 억제하였으며, 128 μg/ml이상의 농도에서는 바이러스 증식을 완전히 억제하여 DNA band가 관찰되지 않았다 (Fig. 1, E). 진주초 수침엑스는 농도 의존적으로 HBV의 증식을 억제하여 256 μg/ml에서는 바이러스의 증식을 현저하게 억제하였고, 512 μg/ml에서는 세포배양액으로 유리되는 relaxed circular (RC) HBV DNA가 거의 관찰되지 않았으며 양성대조물질인 10 μM ddC 만큼이나 우수한 HBV 증식 억제효과를 나타내었다 (Fig. 1, G). Fig. 1에서 검출된 HBV DNA band의 양을 densitometer 및 Bio-Profil ima ge analysis program (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 측정하였을 때 도생근 수침엑스의 HBV DNA 증식 억제에 대한 EC_{50} (50% effective concentration)는 128 μg/ml 이하로 측정되었으며, 인진호는 EC_{50}가 64 μg/ml이하로, 진주초는 EC_{50}가 256 μg/ml 이하로 측정되었다. 그러나, 산수유, 소목, 구기자, 판남근, 금은환, 금전초의 6종 생약재 수침엑스는 모두 전 처치농도에서 HBV 증식억제 효과가 관찰되지 않았다.

HBV 항원의 생성 억제 – 생약재 수침엑스를 처치 후 세포배양액 내의 HBV 항원의 양을 측정한 결과를 Table I에 표기하였다. 세포외 배양액에서 HBV DNA를 측정하여 바이러스의 증식 억제정도를 살펴본 결과와 일치하게 9종의 생약재 중 도생근, 인진호,

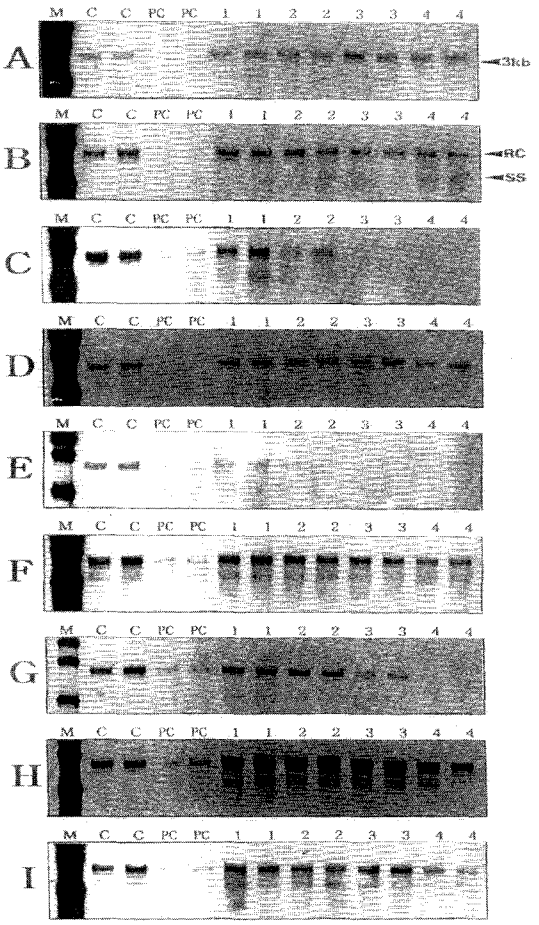

Fig. 1. Effects of various plants extracts on HBV replication in HepG2 2.2.15 cells.
The test samples for water extracts of 9 medicinal plants are *C. officinalis*(山茱萸: panel A), *C. sappan*(蘇木: B), *R. coreanus* (倒生根: C), *L. chinense* (枸杞子: D), *A. capillaris* (茵蔯蒿: E), *I. tinctoria* (板藍根: F), *P. urinaria* (珍珠草: G), *L. christinae* (金錢草: H) and *L. japonica* (金銀花: I). The HepG2 2.2.15 cells were treated with 64 (lane 1), 128 (lane 2), 256 (lane 3), 512 μg/ml (lane 4) of the water 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(λ/Hind III); RC, relaxed circular HBV DNA; SS, single-strand HBV DNA.

진진주초의 수침엑스가 농도의존적으로 HBV 항원 생성을 억제하였다. 도생근은 전 처치농도에서 HBV의 표면항원 생성 억제도가 가장 높았으며, 256 μg/ml에서는 유의하게 95% 이상의 억제효과를 나타내었다. 인진호 역시 농도의존적으로 HBs 항원의 생성을 억제하였으며 고농도인 512 μg/ml에서는 유의하게 65% 이상의 항원생성 억제효과를 나타내었다. 진주초는 도생근과 인진호에 비해 항원생성을 미약하게 억제하였으며 512 μg/ml에서는 유의하게 40% 이상의 억제효과를 나타내었다. 양성대조약물인 ddC는 14.4%의 낮은 HBs 항원생성 억제도를 나타내었고 이는 Kruining 등[10]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 filament 및 sphere 형태로 골지체를 거쳐 세포외로 배출되기 때문에[17] HBV 항원 생성의 억제효과는 미약한 것처럼 나타나는 것으로 사료된다. HBV virion 증식 억제도 실험에서는 인진호가 항HBV 효능이 가장 우수하였으나, HBs 항원생성 억제도는 도생근이 가장 우수한 효능을 나타내었으며, 이는 인진호와 도생근이 HBV의 증식과정 중에서 각각 상이한 단계에서 증식을 억제한 결과라고 판단된다.

산수유, 소목, 구기자, 판남근, 금은화, 금전초의 6종 생약재 수침엑스는 모두 전 처치농도에서 HBs 항원의 생성억제 효과가 관찰되지 않았으며, 이는 HBV virion DNA의 증식 억제도를 측정한 결과와 일치하였다. 산수유와 소목의 수침엑스는 간염환자의 혈청에서 분리한 HBV DNA polymerase의 복제억제도를 *in vitro*에서 측정하였을 때 340 μg/ml에서 각각 28%, 33%씩 polymerase의 활성을 억제하는 것으로 보고되었으나,[11] 본 실험결과에서는 항HBV 효능이 없는 것으로 나타났다. 금은화는 고농도 처치군에서 HBs 항원생성 억제도가 음의 값을 나타내었으며, 이는 HepG2 2.2.15 세포주에서 항원 생성을 억제하기 보다는 조금 증가시켰다는 것을 의미하며 역시 항HBV 작용이 전혀 없는 것으로 나타났다.

도생근 (*Rubus coreanus* Miq.)은 복분자 딸기·산딸기의 뿌리를 말린 것이며,[18] 본 실험결과에 의해 항HBV 작용이 새롭게 밝혀지게 되었다. 인진호는 사철쑥 (*Artemisia capillaris* Thunb.)의 지상부분을 말린 것으로[18] 담즙분비 촉진작용,[19] 항간독소 작용[20]이 있는 것으로 보고되었으며, 도생근과 함께 본 실험결과에 의해 항HBV 작용이 새로이 밝혀지게 되었다. 진주초 (*Phyllanthus urinaria* L.)는 여우구슬이라는

Table I. Inhibition of HBsAg production by water extracts of medicinal plants in HepG2 2.2.15 cells

Botanical name(Chinese)	Concentration of the plant extracts (μg/ml)			
	64	128	256	512
	% inhibition of HBsAg production [a]			
Cornus officinalis (山茱萸)	4.3 ± 1.2	5.9 ± 3.4	3.3 ± 2.8	0.3 ± 3.4
Caesalpinia sappan (蘇木)	3.6 ± 1.9	6.3 ± 1.3	16.2 ± 3.2	13.2 ± 2.4
Rubus coreanus (倒生根)	28.7 ± 1.5*	44.9 ± 1.9*	81.9 ± 2.8*	96.8 ± 0.3*
Lycium chinense (枸杞子)	6.1 ± 1.3	3.1 ± 1.4	12.8 ± 5.9	5.1 ± 1.5
Artemisia capillaris (茵蔯蒿)	15.3 ± 1.5	16.6 ± 3.0*	27.8 ± 1.2*	66.4 ± 3.5*
Isatis tinctoria (板藍根)	6.8 ± 2.1	2.5 ± 4.6	6.3 ± 0.8	0.1 ± 5.1
Phyllanthus urinaria (珍珠草)	4.8 ± 1.5	16.1 ± 1.7	31.4 ± 0.9*	40.7 ± 0.9*
Lysimachia christinae (金錢草)	4.4 ± 1.3	4.7 ± 0.9	7.8 ± 4.2	6.8 ± 1.0
Lonicera japonica (金銀花)	4.1 ± 0.7	6.6 ± 0.3	-6.4 ± 2.5	-3.8 ± 4.5
dideoxycytidine (ddC, 10 μM)	14.4 ± 4.1*			

Values are mean ± SE for 4 separate experiments.
[a] : The inhibition of HBsAg production was calculated using the following equation, I(%) = [1-(T-B)/(N-B)]×100 (I: inhibition of HBsAg production, T: cpm of treated group, N: cpm of non-treated group, B: background cpm).
* : Significantly different from control ($p<0.01$)

일년생 초본의 전초 또는 뿌리가 붙은 전초를 가르키며,[18] 생약재 중 항HBV에 관한 효능이 가장 많이 밝혀진 약재이다. 진주초 수침엑스는 *in vitro*에서 HBV와 woodchuck hepatitis virus (WHV)에서 분리된 DNA polymerase의 복제활성을 억제하고, WHV에 감염된 woodchuck을 이용한 동물실험에서 유의한 항바이러스 효능이 보고되었다.[13]

이러한 결과들로 도생근, 인진호, 진주초의 수침엑스 내에는 HBV의 증식을 억제하는 활성 성분이 존재할 것으로 사료되며 각 생약재의 항HBV 활성 성분의 분리 및 동물 실험에 대한 연구를 계획 중이다.

결 론

HBV가 도입된 HepG2 2.2.15 배양세포에서 산수유 (*C. officinalis*), 소목 (*C. sappan*), 도생근 (*R. coreanus*), 구기자 (*L. chinense*), 인진호 (*A. capillaris*), 판남근 (*I. tinctoria*), 진주초 (*P. urinaria*), 금전초 (*L. christinae*), 금은화 (*L. japonica*)의 수침엑스를 처치하여 HBV 증식에 미치는 영향을 세포배양액에서 HBV virion 생성 및 항원의 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 9종의 생약재중 도생근, 인진호, 진주초는 HepG2 2.2.15 세포주에서 세포배양액 내 HBV의 증식을 억제하여 농도 의존적으로 virion의 방출을 저해하는 효과를 나타내었으며 그 중 인진호가 가장 우수한 항HBV 효과를 나타내었다.

2. 도생근, 인진호, 진주초는 전체 처치농도에서 농도의존적으로 HepG2 2.2.15 세포의 HBs 항원 생성 억제작용을 나타내었으며 도생근, 인진호, 진주초의 순서로 억제작용을 나타내었다.

따라서 도생근, 인진호, 진주초의 생약재 수침엑스에는 HBV의 증식을 억제하는 활성 성분이 존재할 것으로 생각되며 본 실험결과가 항HBV 치료제 개발에 활용될 수 있으리라 사료된다.

사 사

이 논문은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 지정과제연구비 (HMP-98-P-0036)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Locarnini, S. A., Civitico, G. M. and Newbold, J. E. (1996) Hepatitis B: New approaches for antiviral chemotherapy. *Antiviral Chemistry Chemotherapy* 7(2): 53-64.
2. Tiollas, P., Pourcel, C. and Dejean, A. (1985) The hepatitis B virus. *Nature* 317: 487-495.

3. Lok, A. (1994) Treatment of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.* 1: 105-124.
4. Rensen, P. C., de Vrueh, R. L. and van Berkel, T. J. (1996) Targeting hepatitis B therapy to the liver. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 31(2): 131-155.
5. Colledge, D., Locarnini, S. and Shaw, T. (1997) Synergistic inhibition of hepadnaviral replication by lamivudine in combination with penciclovir *in vitro*. *Hepatology* 26(1): 216-225.
6. Chisari, F. V., Filippi, P., Buras, J., Mc- Lachlan, A., Popper, H., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1987) Structure and pathological efforts of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 6909-6913.
7. Korba, B. E. and Milman, G. (1991) A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* 15: 217-228.
8. Korba, B. E. and Gerin, J. L. (1992) Use of a standardized cell culture assay to assess activity of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* 19: 55-70.
9. Jansen, R. W., Johnson, L. C. and Averett, D. R. (1993) 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.
10. Kruining, J., Heijtink, R. A. and Schalm, S. W. (1995) Antiviral agents in hepatitis B virus transfected cell lines: inhibitory and cytotoxic effect related to time of treatment. *J. of Hepatology* 22: 263-267.
11. 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. (1995) Investigation of Korean plant extracts for potential phytotherapeutic agents against B-virus hepatitis. *Phytotherapy Res.* 9: 429-434.
12. 王俗生 (1983) 中藥藥理與應用. 614-618, 695-703, 703-709, 741-744, 757-766, 1208-1213. 人民衛生出版社, 北京.
13. Vengaterwaren, P. S., Millman, I. and Blumberg, B. S. (1987) Effects of an extract from *Phyllanthus nururi* on hepatitis B and woodchuk hepatitis viruses: *In vitro* and *in vivo* studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 274-278.
14. Wang, M., Cheng, H., Li, Y., Meng, L., Zhag, G. and Mai, K. (1995) 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.
15. Kim, Y. and Kang, H. S. (1984) Cloning and expression of hepatitis B virus surface antigen gene. *Kor. Biochem. J.* 17: 70-79.
16. Shrivastava, R., Delomenie, C., Chevalier, A., John, G., Ekwall, B., Walum, E. and Massingham, R. (1992) Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vitro* cytotoxicity of 48 chemicals. *Cell Biol. Toxicol.* 8(2): 157-170.
17. Harrison, T. J. and Zuckerman, A. J. (1997) The molecular medicine of viral hepatitis. *In* Kann, M. and Gerlich, W. H. (eds.), Replication of hepatitis B virus, 63-88. John Wiley & Sons, London.
18. 정보섭, 신민교(1998) 도해향약대사전(식물편), 653, 767, 1016. 영림사, 서울.
19. Okuno, I., Uchida, K., Kadowaki, M. and Akahori, A. (1981) Choleretic effect of *Artemisia capillaris* extract in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 31 (5): 835-838.
20. Kiso, Y., Ogasawara, S., Hirota, K., Watanabe, N., Oshima, Y., Konno, C. and Hikino, H. (1984) Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. *Planta Med.* 1: 81-85.

(1999년 6월 4일 접수)