

## Antiviral Activity of Glycyrrhetic Acid on MA-104 Cell Infection of the K-21 Korea Human Rotavirus Isolate

Jeong-Min Lee and Chong-Kee Lee<sup>†</sup>

Department of Immunology, School of Medicine Catholic University of Daegu Daegu 705-718, Korea

The mutability and frequency of genetic reassortment characteristic of rotavirus and resultant antigenic changes make the rotavirus formidable challenges for control efforts such as the vaccine development. An alternative approach to overcome these difficulties in development of the rotavirus vaccine is to develop effective inhibitors of the virus infection. As an effort to achieve this, effects of glycyrrhetic acid (GA), which is an active component of glycyrrhizin, on MA-104 cell infection were examined by employing the human rotavirus isolated from Korea, K-21. The data obtained showed that MA-104 cell infection of the K-21 rotavirus was greatly influenced by the presence of both 18 $\alpha$ -GA and 18 $\beta$ -GA. Both types of GA have inhibited more than 60% of the rotaviral infection at the concentration of 7.68 mM. This inhibition effect became much more evident at the higher concentrations of GA. However, the type of GA did not make much differences on the inhibition effect of the drug. Although GA has to be used in high concentrations to exhibit anti-viral activity and to be virostatic, a long history of safe and high dose usage of licorice in clinical settings in the Far East makes the GA as an attractive inhibitor of the rotaviral infection.

**Key Words:** Rotaviral infection, Inhibitor, Glycyrrhetic acid

### 서 론

로타바이러스 (Rotavirus, RV)는 영유아 급성 설사증의 가장 흔한 원인체이며, 경제적으로 중요한 어린 가축 및 각종 조류에서도 심한 설사를 유발한다 (Flewett and Woode, 1978). 심한 구토와 설사, 발열을 동반하고 탈수를 일으키는 등 그 증상이 콜레라와도 비슷하여 '가성콜레라' 라고도 한다 (Kim et al., 1990). 위생상태가 불결하고 인구밀집도가 높은 개발도상국이나 후진국에서 빈번하게 발생하나, 위생상태가 좋은 선진국에서도 입원의 중요한 원인이 되고 있으며 (Miller and McCann, 2000), 해마다 전 세계적으로 약 500~600만 명의 유아 사망을 초래하고 있다 (Kapikian et al., 2001).

Australia의 Bishop이 1973년 전자현미경 검사로 처음 발견한 RV (Bishop et al., 1973)는 reoviridae family (과)에 속하는 이중 나선형의 RNA 바이러스이다 (Kapikian et al., 1976; Berkley et al., 1999). 11개의 유전자 segment를 포함하는 핵은 이중 capsid로 둘러 싸여있으며 바이러스 입자의 크기는 70

nm이다 (Estes et al., 1983). 두 외각 (outer capsid) 단백질 VP4와 VP7은 RV 감염 시 중화 항체가 작용하는 대상으로 방어면역에 중요한 역할을 하는 반면, 내각 (inner capsid)을 이루는 VP6는 외각 구조단백질과는 달리 바이러스의 중화에는 관여하지 않는다 (Estes and Cohen, 1989; Estes, 1996; Lynch et al., 2000).

RV 감염의 효율적 예방과 억제는 위생청결과 함께 효과적인 백신 개발을 필요로 한다 (Mayoga et al., 1996; Bresee et al., 1999). 그러나 다양한 혈청형이 존재하고, 서로 교차면역이 일어나지 않는다는 점 등은 RV의 효율적 백신 개발을 더욱 어렵게 하고 있는 실정이다 (Estes et al., 1983; Kapikian and Chanock, 1990; Conner et al., 1994; Desselberger and McCrae, 1994). 1998년 미국 FDA (Food and Drug Administration)에 의해 처음으로 승인받은 Tetravalent rhesus-based rotavirus vaccine (RRV-TV)이 개발되어 예방접종이 시행된 바 있으나 장중첩증 (intussusception)이 발생하는 등의 부작용으로 현재는 사용하고 있지 않다 (CDC 1999; Lynch et al., 2000). 그 외 동물에서 얻은 생백신으로 WC3 균주로부터 bovine rotavirus 백신이 개발되었으나 69%의 효과성만을 나타내었다 (Clark et al., 1996). 그러므로 능동면역을 위한 효율적 백신 개발을 위해서는 subgroup과 다양한 혈청형의 존재, 상호교차면역반응의 모호성 등의 과제를 극복할 수 있는 새로운 방법의 백신 개발 노력이 필요하다. 따라서 RV 감염을 억제할 수 있는

\*는 문 집 수: 2006년 5월 3일

수정제접수: 2006년 7월 3일

<sup>†</sup>교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실

Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477

e-mail: leeck@cu.ac.kr

감염 저해물질을 개발하는 것 또한 매우 중요한 과제라 하겠다. 이러한 노력의 일환으로 부작용을 일으키지 않고 면역계에 손상을 주지 않는 식품을 이용한 바이러스 감염저해 연구가 활발히 진행되고 있다. 모유의 lactoferrin, mucin (Yolken et al., 1992), 키틴·키토산 (Park et al., 2002), 녹차추출물 (Ebina et al., 1991), 난황의 sialyloligosaccharides (Koketsu et al., 1993; Koketsu et al., 1995), 난백의 ovomucoids와 ovalbumin (Yolken et al., 1987) 등의 식품 성분 등을 이용한 노력들이 좋은 예라 하겠다.

Triterpenoid saponin 계열 성분인 glycyrrhetic acid (GA)는 glucuronic acid와 함께 한약재 감초의 주성분인 glycyrrhizin을 구성한다 (Hayashi, 1990; Musser et al., 1995). Glycyrrhizin은 항염증 작용, 항 알레르기작용, 진통과 해열작용, interferon 유기작용 등 다양한 생리 활성작용 (Finney and Somers, 1958; Kumagai et al., 1967; Azimov et al., 1988; Kee, 1993; Van Rossum et al., 1998) 이외에도 *Listeria monocytogenes* 항균작용 (Shin et al., 1994) 및 몇 종의 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 가지는 것으로 나타났다 (Pompei et al., 1979; Tani et al., 1986; Hattori et al., 1989; Mori et al., 1990; Lee and Moon, 1992; Hasegawa et al., 1994). 그러므로 본 연구에서는 GA가 국내에서 분리된 사람 로타바이러스의 MA-104 세포 감염에 어떠한 영향을 미치는지를 연구하여 궁극적으로 효율적인 로타바이러스 감염 저해물질 개발에 이바지하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. Glycyrrhetic acid (GA)

GA는 18 $\alpha$ -GA (Sigma, G8503)와 18 $\beta$ -GA (Sigma, G8628) 두 종류를 TNC (10 mM Tris base, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 용액에 적절한 농도로 녹여 0.45  $\mu$ m filter로 여과한 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 세포배양 배지

멸균 증류수 10 l에 22 g의 sodium bicarbonate와 M199 배지를 함께 용해하여 0.22  $\mu$ m pore-size filter (Millex-HV, Millipore)로 여과시킨 다음 멸균된 병에 500 ml씩 분주 후 냉장보관하면서 사용하였다. RV를 증식시키기 위한 숙주 세포로 사용된 MA-104 세포는 조직배양용 T-flask에서 5% CO<sub>2</sub>를 유지하며 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였고, 단층이 형성되면 Trypsin-EDTA (Sigma, USA) 처리 후, 7% fetal bovine serum (FBS: Hyclone Laboratories, Utah)과 1% L-glutamin penicillin/streptomycin (L-GPS: Irvine scientific, Santa Anna, CA)이 첨가된 M199를 첨가하여 세포의 계대배양에 사용하였다.

### 3. RV 분리 및 배양

본 실험에 사용된 바이러스는 사람 로타바이러스 (HRV) 국내 분리주인 K-21 (Cha et al., 1999)이었다. 간단히 요약하면 M199를 이용한 설사 변 현탁액을 초음파 처리하고 2,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액만을 뽑아 0.45  $\mu$ m filter로 여과시킨 것을 trypsin으로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 활성화시켰다. 그 후, 단층이 형성된 MA-104 세포를 무혈청 M199로 세척 후 바이러스로 감염시켜 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 흡착시켰다. 현미경으로 cytopathic effect (CPE)를 관찰하여 RV 감염을 확인하였으며 CPE가 완전히 일어난 것은 -80 $^{\circ}$ C에서 3번의 동결과 해동을 반복하여 vial에 담아 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 사용하였다. RV의 증식 및 배양은 주로 Kaljot 등 (1988)의 방법을 이용하였다.

### 4. 바이러스 역가 분석

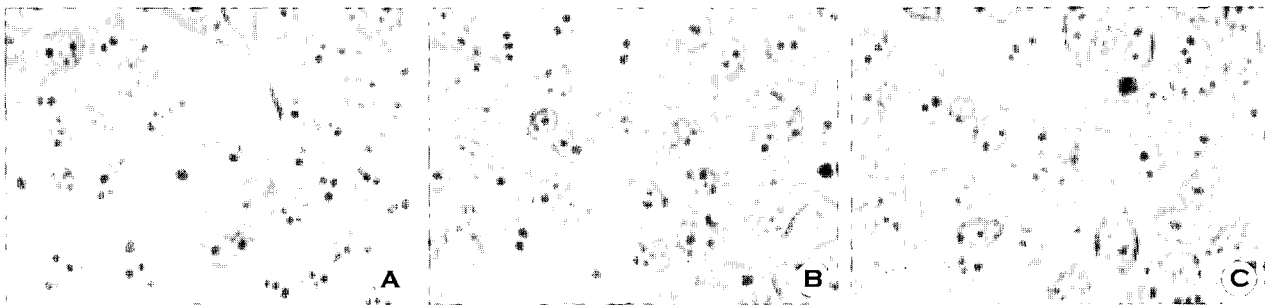
로타바이러스의 역가 분석은 기존의 방법 (Kaljot et al., 1988; Ruggeri and Greenberg, 1991)에 따라 6-well plate를 이용한 plaque assay로 수행하였다. 바이러스 ml당 trypsin 5  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 활성화시킨 후 활성화된 바이러스를 무혈청 M199로 10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>까지 희석하였고 MA-104 세포의 단층이 형성된 6-well plate는 무혈청 M199로 2번 세척 후 각 well에 희석한 바이러스 액을 0.5 ml씩 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 이때 1.4% agarose (Seakem ME agarose; FMC Corp, Philadelphia)와 2 $\times$ M199를 42 $^{\circ}$ C water bath에 넣어 두었다. 바이러스를 흡착시킨 후에 water bath에 넣어 두었던 1.4% agarose와 2 $\times$ M199를 1:1로 섞어 trypsin (0.5  $\mu$ l/ml)을 첨가하여 혼합하였고, agarose가 첨가된 배지온도가 37 $^{\circ}$ C로 낮아졌을 때 각 well에 남아 있는 바이러스를 제거한 후 well마다 agarose가 첨가된 배지를 4 ml씩 중층하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 42 $^{\circ}$ C 배양기에서 3~4일간 배양하였다. 배양 후 neutral red (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y)와 무혈청 M199를 1:20으로 희석한 다음 각 well에 1 ml씩 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 7시간 동안 염색하였으며 light box 위에서 plaque를 관찰하였다.

### 5. GA가 RV의 MA-104 세포 감염에 미치는 영향 분석

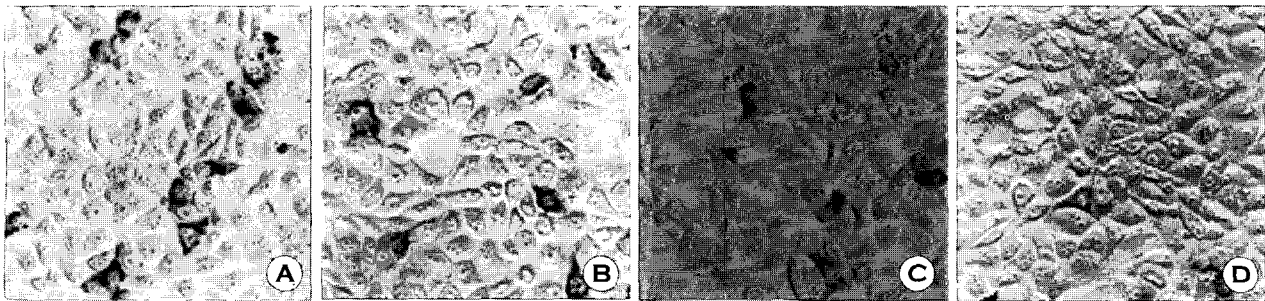
Kaljot 등 (1998)의 방법을 응용하여 96-well plate에 MA-104 세포를 배양하였고, 바이러스는 0.25  $\mu$ l/ml의 trypsin을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분 동안 활성화시켰으며 0.25  $\mu$ l/ml의 trypsin이 첨가된 M199에 활성화된 바이러스를 10,000 배 희석하여 다시 30분 동안 활성화시켜 사용하였다. 96-well plate에서 MA-104 세포의 단층이 형성된 세포는 무혈청 M199로 2번 세척한 후 계단 희석한 18 $\alpha$ -GA (Sigma, G8503)

또는 18β-GA 50 μl와 바이러스 100 μl를 혼합하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 하루 밤 배양하였다. 그 후 바이러스를 제거한

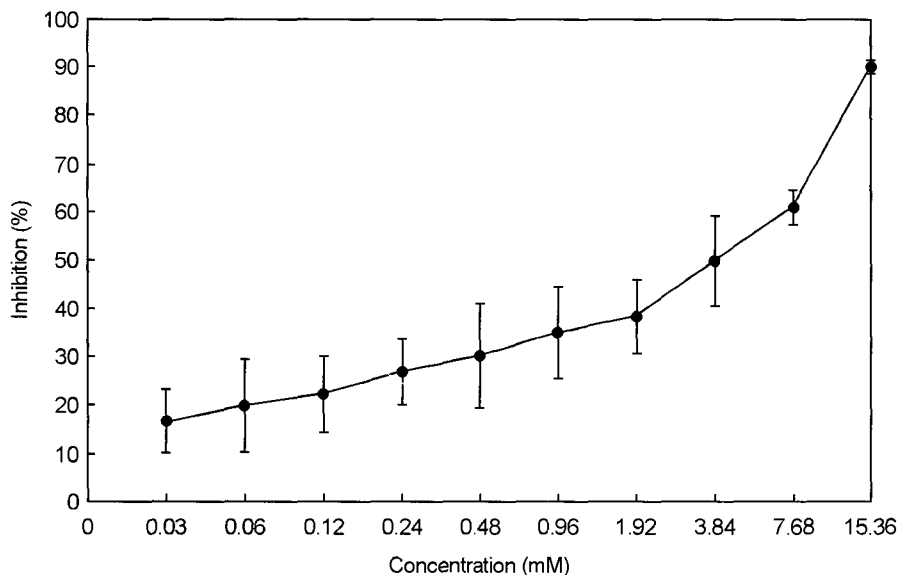
다음 TNC (10 mM Trizma base, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.4)로 2번 세척하였고 10% formalin을 각 well에 60 μl



**Fig. 1.** AEC staining microscopy of uninfected MA-104 cells in the presence of 18α-GA or 18β-GA. (A) uninfected MA-104 cells in the absence of 18α-GA and 18β-GA (B) uninfected MA-104 cells in the presence of 15.36 mM 18α-GA (C) uninfected MA-104 cells in the presence of 15.36 mM 18β-GA.



**Fig. 2.** AEC staining microscopy of the MA-104 cells infected with HRV K-21 in the presence of 18α-GA. (A) Virus control in the absence of 18α-GA (B) HRV K-21 infected cells, treated with 0.48 mM 18α-GA (C) HRV K-21 infected cells, treated with 7.68 mM 18α-GA (D) HRV K-21 infected cells, treated with 15.36 mM 18α-GA.



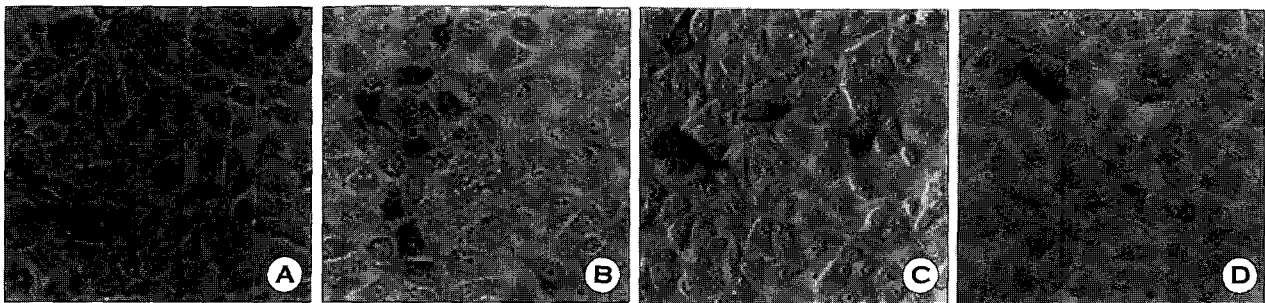
**Fig. 3.** Effect of 18α-GA on MA-104 Cell Infection of HRV K-21. MA-104 cells were cultured as described before (Kaljot et al., 1998) and infected with the HRV K-21 in the presence or absence of appropriate amounts of the diluted 18α-GA. Inhibition effect of the GA was measured as described in the "Materials and Methods".

씩 넣어 상온에서 30분 동안 세포를 고정하였다. 그 후, 다시 TNC로 2번 세척하여 1% triton을 각 well에 60  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 4분간 정치 후 TNC로 2번 세척한 다음 1차 항체 (1B2)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 15,000배 희석하여 각 well에 125  $\mu$ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 배양시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하여 2차 항체 affinity purified antibody peroxidase HRP Goat anti-mouse (IgG)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 4,000배가 되도록 희석하여 75  $\mu$ l씩 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 배양시켰다. AEC staining은 N, N-dimethylformamide (Sigma, No. D-4254) ml당 4 mg의 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma, No. A-5754)이 첨가된 것과 0.05 M-sodium acetate buffer (pH 5.2), hydrogen peroxide (300 : 700 : 1)를 혼합하여 각 well에 60  $\mu$ l씩 첨가하

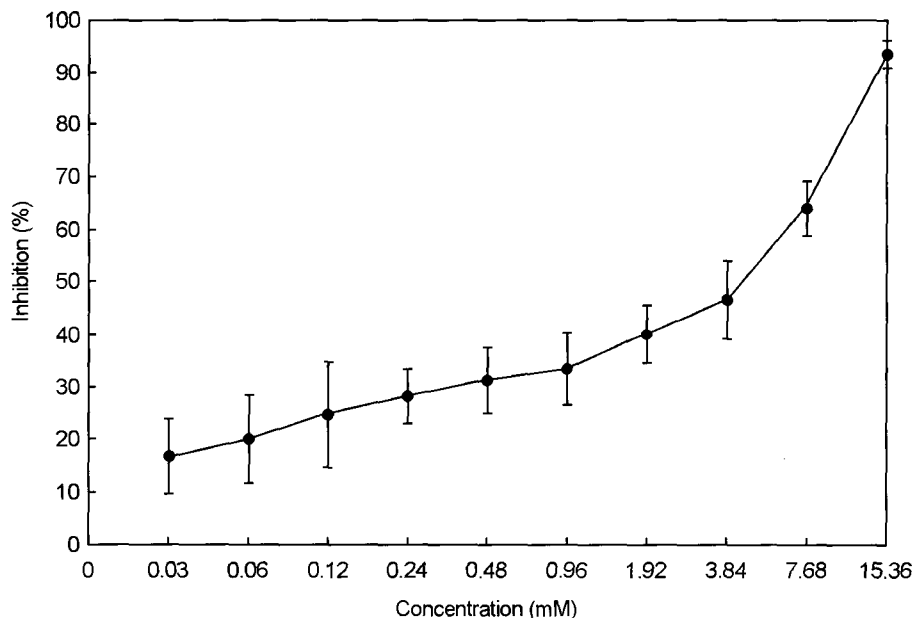
였고 상온에서 10분간 염색시킨 후 TNC로 2번 세척하여 염색을 중지시키고 현미경 상에서 사진 촬영하였다.

## 결과 및 고찰

표준 사람 로타바이러스 WA, KU, YO 등과 같은 RV A군에 속하는 K-21 (Cha et al., 1999) 바이러스의 감염 역가는 계대배양 된 RV를  $10^{-8}$ 까지 희석하여 0.7% agarose 배지에 3~4일간 배양한 후 0.7% agarose 배지로 중층 시켜 neutral red staining에 의해 원형 탈색된 부분의 plaque forming unit (PFU) 수를 관찰하여 산출하였고 역가는  $1.0 \times 10^7$  PFU/ml이었다. HRV K-21의 MA-104 세포 감염에 GA가 미치는 영향을 조사하기 위해서 적절한 농도로 희석시킨  $18\alpha$ -GA 또는



**Fig. 4.** AEC staining microscopy of the MA-104 cells infected with HRV K-21 in the presence of  $18\beta$ -GA. (A) Virus control in the absence of  $18\beta$ -GA (B) HRV K-21 infected cells, treated with 0.48 mM  $18\beta$ -GA (C) HRV K-21 infected cells, treated with 7.68 mM  $18\beta$ -GA (D) HRV K-21 infected cells, treated with 15.36 mM  $18\beta$ -GA.



**Fig. 5.** Effect of  $18\beta$ -GA on MA-104 Cell Infection of HRV K-21. MA-104 cells were cultured as described before (Kaljot et al., 1998) and infected with the HRV K-21 in the presence or absence of appropriate amounts of the diluted  $18\beta$ -GA. Inhibition effect of the GA was measured as described in the Materials and Methods.

**Table 1.** Effect of glycyrrhetic Acid on MA-104 cell infection of the HRV K-21

GA & virus	Glycyrrhetic acid concentration (mM)									
	0.03	0.06	0.12	0.24	0.48	0.96	1.92	3.84	7.68	15.36
A + K-21	16.42 <sup>1)</sup> ±6.76 <sup>2)</sup>	19.91 ±9.76	22.06 ±8.06	26.64 ±7.12	30.07 ±10.71	34.84 ±9.62	37.94 ±7.73	49.49 ±9.64	60.89 ±3.59	89.99 ±1.27
B + K-21	16.77 ±7.09	19.98 ±8.38	24.51 ±10.36	28.00 ±5.58	31.14 ±6.53	33.30 ±7.14	39.88 ±5.62	46.41 ±7.56	63.94 ±5.22	93.28 ±2.51

A: 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid  
B: 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid

<sup>1)</sup> Mean  
<sup>2)</sup> Standard Deviation

18 $\beta$ -GA를 바이러스와 혼합한 후 MA-104 세포에 첨가 배양시켰다. 그 후 현미경 상에서 AEC 염색법으로 특이하게 염색된 세포만을 계산하여 GA가 첨가되지 않은 대조 감염 세포군과 비교하여 K-21 바이러스의 세포 감염 효과를 관찰하였다 (Fig. 2 and Fig. 4). Fig. 1은 감염시키지 않은 MA-104 세포에 본 실험에 사용된 18 $\alpha$ -GA와 18 $\beta$ -GA 최고 농도인 15.36 mM을 각각 첨가하여 배양시킨 후 AEC 염색법으로 염색시켜 혹 있을지도 모를 GA의 cytopathic effects를 현미경 상에서 살펴보았다. 비교적 높은 농도임에도 GA 처리에 따른 MA-104 세포의 형태학적인 변화는 현미경 상에서 관찰되지 않았으며 또한 MA-104 세포배양에도 영향을 미치지 않았다. Fig. 3은 18 $\alpha$ -GA의 첨가에 따른 HRV K-21의 MA-104 세포 감염에 미치는 저해율을 도표화한 것으로 농도 0.48 mM, 7.68 mM, 15.36 mM일 때 각각 30.07±10.71%, 60.89±3.59%, 89.99±1.27%이었다. Fig. 5는 계단 희석 (0~15.36 mM) 시킨 18 $\beta$ -GA를 18 $\alpha$ -GA와 같은 농도로 첨가 시켰을 때 얻어진 저해율로서 각각 31.14±6.53%, 63.94±5.22%, 93.28±2.51%의 감염 억제 효과가 관찰되었다. 이상의 결과에서 나타난 바와 같이 18 $\alpha$ -GA와 18 $\beta$ -GA는 모두 의미 있는 MA-104 세포 감염 억제 효과를 보여 주었으며, GA 농도 약 15.4 mM에서는 90% 이상의 억제율을 나타내었다. 또한 GA 농도 증가에 따른 저해율 증가 현상은 18 $\alpha$ -GA와 18 $\beta$ -GA 모두에서 관찰되었다 (Table 1). 그러나 GA 타입에 따른 차이는 18 $\beta$ -형 GA가 18 $\alpha$ -형 GA 보다 약 1~3% 높은 저해율 차이만을 나타내어 GA 종류에 따른 현저한 억제 효과 차이는 관찰되지 않았다.

Cholesterol과 같은 sterol은 eukaryotic plasma membrane에 있어 매우 중요한 기능을 담당하는데 생리적 set point에 가까운 plasma membrane cholesterol 수준에 있어서의 작은 변화들은 큰 생물학적 반응을 불러낼 수도 있다 (Lange et al., 2004; Kliewer, 2005). 따라서 cholesterol과 매우 유사한 분자 구조를 가지고 있는 glycyrrhizin은 membrane의 유동성을 낮춤으로써 바이러스의 세포 감염을 억제할 수 있다 (Harada, 2005). Pompei 등 (1979)은 glycyrrhizin 8 mM을 사용하여 herpes simplex virus (HSV), vaccinia, Newcastle disease, vesicular stomatitis 등의 envelope을 가진 DNA 또는 RNA 바이러스

들의 성장이 완전히 억제될 수 있음을 보여주었다. 특히 이 농도에서 HSV 바이러스 입자의 불활성화도 함께 보고되었다. 본 실험에서는 HRV K-21의 MA-104 세포 감염의 90% 이상 억제 효과를 위해서는 약 15.4 mM의 GA를 필요로 하였다. 이처럼 K-21 RV가 envelope을 가진 바이러스 보다 더욱 높은 농도의 GA를 필요로 하는 이유 중 하나는 RV에는 envelope이 없기 때문일 것이다. 바이러스의 envelope은 주로 lipidprotein으로 구성되어 있는데 HSV 또는 HIV와 같이 envelope을 가진 바이러스들은 glycyrrhizin이 세포의 plasma membrane 유동성뿐만 아니라 바이러스 envelope의 유동성에도 영향을 줄 수가 있어 envelope을 가진 바이러스가 세포 침입 시 형성되는 cell-to-cell fusion을 효과적으로 억제할 수 있기 때문이다 (Harada, 2005). 이처럼 GA 또는 glycyrrhizin과 같은 약제들이 항바이러스 효과를 나타내거나 바이러스의 발육 또는 증식 억제제 (virostatic)로 사용되기 위해서는 비교적 높은 농도를 필요로 한다는 점은 단점이 될 수도 있다. 그러나 이미 한국, 중국, 일본 등에서 감초가 한약재로서 오랜 세월을 통해 장기 복용되어 왔고, 높은 사용량에도 불구하고 부작용이 거의 없이 안전하게 사용되어 오고 있다는 사실은 GA 안정성에 대한 가장 훌륭한 예가 될 수 있으며 다른 바이러스 억제제들이 지니기 어려운 큰 장점이라 할 수 있다.

#### 감사의 글

본 연구의 재료 및 방법에 도움을 주신 차광중 박사님과 고 유체현 교수님께 감사드리며 다시 한번 고인의 명복을 빕니다.

#### REFERENCES

- Azimov MM, Zakirov UB, Radzhapova ShD. Pharmacological study of the anti - inflammatory agent glyderinine. Farmakol Toksikol. 1988. 51: 90-93.
- Berkley SF, Carbon CJ, Clumeck N, et al. Infectious Diseases (Armstrong, D., Cohen, J. Eds.) 1999. Infectious Diseases. Mosby. London.

- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973. 2: 1281-1283.
- Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch J. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation, and implementation in developing countries. *Vaccine* 1999. 17: 2207-2222.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999. 48: 1007.
- Cha KJ, Yu DY, Lee CK, Yu JH. Effect of bovine and human lactoferrin on MA 104 cell infected with human rotavirus. *J Korean Soc Virol*. 1999. 29: 87-97.
- Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Krah D, Shaw AR, Eiden JJ, Pichichero M, Treanor JJ. The development of a multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis*. 1996. 174: S73-80.
- Conner ME, Matson DO, Estes ME. Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994. 185: 285-337.
- Desselberger U, McCrae MA. The rotavirus genome. *Curr Microbiol Immunol*. 1994. 185: 31-66.
- Ebina T, Tsukada K. Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiol Immunol*. 1991. 35: 583-588.
- Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotavirus; A review. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1983. 105: 123-184.
- Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989. 53: 410-449.
- Estes MK. Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis*. 1996. 174: S37-46.
- Finney RS, Somers GF. The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *J Pharm Pharmacol*. 1958. 10: 613-620.
- Flewett TH, Woode GN. The Rotavirus, *Arch Microbiol*. 1978. 57: 1-23.
- Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem J*. 2005. 392: 191-199.
- Hasegawa H, Matsumiya S, Uchiyama M, Kurokawa T, Inouye Y, Kasai R, Ishibashi S, Yamasaki K. Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to in vitro cytotoxic and antiviral activities. *Planta Med*. 1994. 60: 240-243.
- Hattori T, Ikematsu S, Koito A, Matsushita S, Maeda Y, Hada M, Fujimaki M, Takatsuki K. Preliminary evidence for inhibitory effect of glycyrrhizin on HIV replication in patients with AIDS. *Antiviral Res*. 1989. 11: 255-261.
- Hayashi H, Skai T, Fukuri H, Tabata M. Formation of soyasaponins in licorice cell suspension cultures. 1990. pp3127-3129. *Phytochemistry*.
- Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg BH. Infectious rotavirus enter cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol*. 1988. 62: 1136-1144.
- Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses: *Virology* 2, 2nd. 1990. pp1656-1404. Raven press.
- Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrott RH. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with 'winter' gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med*. 1976. 294: 965-972.
- Kapikian AZ, Yasutaka H, Chanock RM. Rotaviruses *Fields virology*. 4th ed. In: (Knipe DM et al. Eds). 2001. pp1787-1833. Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Kee CH. The pharmacology of chinese herbs. 1993. p275, CRC Press, Inc.
- Kim KH, Yang JM, Joo SI, Cho YG, Glass RI, Cho YJ. Importance of rotavirus and adenovirus type 41 and 41 acute gastroenteritis in Korea Children. *J Clin Microbiol*. 1990. 28: 2279-2284.
- Kitaoka S, Konno T, De Clercq E. Comparative efficacy of broad-spectrum antiviral agents as inhibitors of rotavirus replication in vitro. *Antiviral Res*. 1986. 6: 57-65.
- Kliwer S. Cholesterol detoxification by the nuclear pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102: 2675-2676.
- Koketsu M, Juneja LR, J Kim M, Ohta M, Matsuura F, Yamamoto T. Sialyloligosaccharides of egg yolk fraction. *J Food Sci*. 1993. 58: 743-747.
- Koketsu M, Nitoda T, Juneja LR, Kim M, Kashimura N, Yamamoto T. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J Agric Food Chem*. 1995. 43: 858-861.
- Kumagai A, Nanaboshi M, Asanuma Y, Yagura T, Nishino K. Effects of glycyrrhizin on thymolytic and immunosuppressive action of cortisone. *Endocrinol Jpn*. 1967. 14: 39-42.
- Lange Y, Ye J, Steck TL. How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101: 11664-11667.
- Lee TK, Moon JJ. Anti-HIV-1 viral activity of glycyrrhizin. *J Dong Guk Oriental Med*. 1992. 1: 209-236.
- Linhares RE, Wigg MD, Lagrota MH, Nozawa CM. The in vitro

- antiviral activity of isoprinosine on simian rotavirus (SA-11). *Braz J Med Biol Res.* 1989. 22: 1095-1103.
- Lynch M, Joseph S, Bresee, Jon R, Gentsch and Roger I. Glass. Rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis.* 2000. 13: 495-502.
- Miller MA, McCann. L. Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. *Health Econ.* 2000. 9: 19-35.
- Mori K, Sakai H, Suzuki S. Effects of glycyrrhizin in hemophiliac patients with HIV-1 infection. *Tohoku J Exp Med.* 1990. 162: 183-193.
- Musser JH, Anderson MB, Fugedi P. Glycomimetics: an approach to discovering leads for therapeutics. *Pharmaceutical news.* 1995. 5: 11-17.
- Park BS, Kim JH, Yu DH, Yu JH. Effects of heat treatment of chito-oligosaccharide and water-soluble chitosan on the changes in oligosaccharide content and anti-rotaviral activity. *J Anim Sci & Technol. (Kor).* 2002. 44: 809-816.
- Paul PS, Lyoo YS, Woode GN, Zheng SL, Greenberg HB, Matsui S, Schwartz KJ, Hill HT. Isolation of bovine rotavirus with a super-short RNA electrophoretic pattern from a calf with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1988. 26: 2139-2143.
- Perez OM, Morales W, Paniagua M, Strannegård Ö. Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 1996. 55: 17-21.
- Pompei R, Flore O, Marcialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 1979. 281: 689-690.
- Ruggeri FM, Greenberg HB. Antibodies to the trypsin cleavage peptide Vp8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol.* 1991. 65: 2211-2219.
- Shin DH, Han JS, Kim MS. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Glandulifera* Regel et Zucc on *Listeria monocytogenes*. *Korean J Food Sci Technol.* 1994. 26: 627-632.
- Smee DF, Sidwell RW, Clark SM, Barnett BB, Splendlove RS. Inhibition of rotaviruses by selected antiviral substances: mechanisms of antiviral inhibition and in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982. 21: 66-73.
- Song JU, Park BS, Yu DH, Shin WS, Cha GJ, Yu JH. Effects of GA on a Korean bovine rotavirus infection. The 24th annual meeting of the Korean Society For Food Science of Animal Resources. 1999. p89.
- Tani T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S. Histochemistry VIII. Distribution of starch and isoflavones in *Puerariae Radix*. *Shoyakugaku Zasshi.* 1986. 40: 247-251.
- Van Rossum TGJ, Vulto AG, De Man RA, Brouwer JT, Schalm SW. Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998. 12: 199-205.
- Yamamoto H, Ichimura M, Ishikawa N, Tanaka T, Linuma M, Mizuno M. Localization of prenylated flavonoids *Insophora flavescens* var. *angustifolia* plants. 1992. 47C. 535-539. *Z. Naturforsch.*
- Yolken RH, Willoughby R, Wee SB, Miskuff R, Vonderfecht SR. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J Clin Invest.* 1987. 79: 148-154.
- Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J Clin Invest.* 1992. 90: 1984-1991.