

자생식물 열수추출액의 항바이러스 효능 검색

민상기[†]·박은희·박연경·권순목·김남호·정영아·진성현·유평중
역학조사과

Antiviral Activity Screening of Aqueous Extracts from Indigenous Plants

Sang-Kee Min[†], Eun-Hee Park, Yon-Koung Park, Sun-Mok Kwon
Nam-Ho Kim, Yeong-A Jeong, Sung-Hyun Jin and Pyung-Jong Yoo

Epidemiology Division

Abstract

The aqueous extracts of one hundred twenty-five indigenous plants in Busan were tested for antiviral activities against influenza virus A (INFA) and echovirus serotype 30 (ECV30) by means of the cytopathic effect (CPE) reduction assay in MDCK and vero cell, respectively. In parallel, the cytotoxicity was assayed by cell attachment test. Seven of the 125 plants showed potent activities at the non-cytotoxic concentrations. The results revealed that the extracts of *Robinia pseudoacacia* (flower) showed antiviral activity against two tested viruses albeit with unequal efficacy. Whereas the extracts of *Zea mays* (corn silk), *Hibiscus syriacus* (plant gall), and *Rumex crispus* (aerial part) exhibited antiviral activity against INFA. In addition, ECV30 was inhibited by the extracts of *Persicaria tinctoria* (aerial part), *Rhododendron schlippenbachii* (plant gall). From this study, these plants could be used as the candidate materials for antiviral drug with *in vivo* further research.

Key words : antiviral activity, indigenous plant, aqueous extract, cytotoxicity

서 론

최근 식물자원이 가진 다양한 생리활성물질 중 새로운 항바이러스 소재를 탐색하기 위한 연구가 각국의 민속약용식물을 중심으로 꾸준히 진행되고 있다. 현재까지 알려진 식물유래 항바이러스 효능보유 물질은 flavonoids, terpenoids, lignans, sulphides, polyphenolics, coumarins, saponins, alkaloids, polyines, thiophenes, proteins, peptides 및 향신료, 허브차의 정유 성분(essential oil) 등 다양한 phytochemicals이 지속적으로 보고되고 있다¹⁾. 식물은 화학물질 합성공장이라 불릴 만큼 광범위한 물질을 생산하고 특히 생명체 자기방어기작 등과 관련한 2차 대사산물은 천연 항바이러스 소재의 연구대상으로 무궁한 잠재력이 있다고 사료된다. 오늘날 지구상 현화식물 250,000종 중 약 20% 정도가 각 지역의 민속 약용식물로 연구되어지고, 우리나라의 경우에도 약 4,500여종의 고등식물이 존재하고 있다고 추정되나²⁾ 대한약전 수재 한약재 및 주요 민속식물에 한정하여 항바이러스 소재 연구가 주로 진행되고 있다.

천연물 중에서 항바이러스 효능을 탐색하는 *in vitro* 검색계

(screening system)로는 감수성 세포를 이용한 세포병변효과(cytopathic effect, CPE) 억제시험, 바이러스 만성감염 세포시험, 다핵거대세포 형성저해법, influenza virus, mumps virus와 같이 혈구응집능이 있는 바이러스의 경우 혈구응집억제(HI) 시험법, serum pharmacological assay³⁾, RIA를 이용한 항원량 검출법, 새로운 분자 마커를 이용한 southern blotting, PCR 등이 있다. 본 연구에서는 식물 유래의 혼합 또는 단일 추출물로부터 항바이러스 및 살바이러스(viruscidal) 후보군 검증 시험에 성공적으로 응용되는 cell-based assay을 검색 실험계로 사용하였다⁴⁾.

한편, influenza virus는 바이러스 자체의 잦은 항원성 변이 때문에 영구 백신 개발이 어려우며, 개발된 항바이러스 약제도 증상약화 및 바이러스의 전파기간 단축 등에는 효과가 있으나 부작용, 재감염 및 내성획득의 문제점을 안고 있다. 실제로, M2 protein 억제제로 개발된 amantadine, rimantadine은 내성 바이러스 출현을 증가로 사용 제한을 권고받으며⁵⁾, neuraminidase 억제제인 oseltamivir, zanamivir에 대하여도 내성주 발생이 보고 되었다. 또한 현재 항바이러스 치료제로 개발 사용 중인

[†]Corresponding author. E-mail : girin@korea.kr

Tel : +82-51-757-6936, Fax : +82-51-753-1424

acyclovir (anti-herpes simplex virus), zidovudine (anti-human immunodeficiency virus), ribavirin (anti-respiratory syncytial virus) 등에 대한 내성도 보고⁶⁾되고 있다. 또한 수족구병 및 무균성 수막염의 원인바이러스인 엔테로바이러스는 예방백신이 전무하고 효과적인 치료제가 개발되지 않아 대중요법으로 치료하고 있으며, 미국 등 선진국에서 사용되는 pleconaril도 부작용의 우려가 높아 생명을 위협하는 임상증상에 한정하여 사용하고 있다⁷⁾. 이렇듯 새로운 항바이러스제 개발의 필요성은 계속 요구되고 있다.

본 실험에서는 산야주변에서 흔히 보는 우리나라 민속약용 식물, 식용가능 야생 잡초류 및 나무의 벌레혹 등 기존 검색대상으로부터 간과되기 쉬운 소위 틈새식물을 대상으로 influenza virus (an enveloped single negative-stranded RNA virus), 엔테로바이러스 혈청형 중 일종인 echovirus (a non-enveloped single positive-stranded RNA virus)에 대하여 항바이러스 효능 검색시험을 실시하였다. 이로서 이들 바이러스에 대한 기존 치료제 병용 및 내성 바이러스 출현에 대응하는 신물질 개발의 기초 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 식물은 부산지역 야산 특히 금련산 및 생황주변에 흔히 자생하는 야생 잡초류, 수목류 및 민간약초류 등 총 125종을 채집하였다. 시료 식물의 채취 부위별로는 꽃 43건, 지상부 20건, 성숙과 10건, 미성숙과 15건, 잎 14건, 씨 2건, 전초 5건, 경엽 17건, 뿌리 1건, 수피 1건, 열매껍질 1건, 벌레혹(충영) 6건, 기타(옥수수 수염) 1건 등 총 135건을 실험에 사용하였다. 식물분류는 한국식물도감⁸⁾, 한국의 자원식물⁹⁾을 참고하였고, 약용근거는 임상본초학¹⁰⁾과 약용식물도감¹¹⁾을 참고하였다.

식품공전에 의한 시료식물의 식품원료별 분류는 식품의약품안전청 식품원재료 데이터베이스(<http://fse.foodnara.go.kr>)를 참조하였다. 즉, 통상적인 식품원료로 사용가능한 식품의 주원료 식물을 A군(비름 등 40종), 부원료로서 제한적으로 사용할 수 있는 식물을 B군(사방오리나무 등 9종), 식품에 사용할 수 없는 원료식물을 C군(단풍나무 등 10종) 및 그 외 상기 분류에 해당하지 않는 식물을 D군(개다래 등 66종)으로 구분하였다. 식물 부위별 식용가능 구분이 명확치 않는 시료는 통념상 원식물의 식용가능 여부에 따라 분류하였다.

시료의 조제

생체로 채집된 식물은 물로 세척 후 세절하여 건조기에서 3일 이상 건조하여 시료 중 수분을 충분히 제거하고 증류수 50 mL 당 약 5 g의 시료를 넣고 끓는물에서 20분간 우려낸 다음 Whatman[®] No.4 여과지를 사용하여 1차 여과 후 pore size 0.45 μ m syringe용 멸균 필터를 통과시켜 무균적으로 조제하였다. 조제된 시료는 실험에 사용될 때까지 4°C 냉장 보관하였다.

세포 및 바이러스 배양

공시 바이러스는 influenza virus A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus (2008/09년 절기 WHO 권장 백신 strain)와 *Enterovirus* sp. 중 우리나라에서 매년 유행율이 높은¹²⁾ echovirus serotype 30 (ECV30)을 선정하였다. Influenza virus A (INFA)는 질병관리본부로부터, ECV30은 고려대학교 병원성바이러스은행(<http://www.kbpv.co.kr>)으로부터 각각 분양 받았으며, 각 virus의 배양을 위한 감수성 세포는 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)세포와 vero cell (African green monkey kidney cell line)을 각각 질병관리본부로부터 분양받아 사용하였다.

MDCK 세포의 유지 배양용 배지는 10% FBS (GIBCO BRL, USA)와 penicillin/streptomycin/nystatine을 각각 1% 포함하는 minimum essential medium (MEM; GIBCO BRL, USA)을 사용하였고, INFA 접종용 배지는 vitamin solution, D-glucose, trypsin을 함유한 serum-free MEM을 사용하였다. Vero cell은 5% FBS와 penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 유지 계대하였고, ECV30 접종용 배지는 2% FBS(+) DMEM을 사용하였다.

세포독성 시험

추출물에 대한 숙주세포의 세포독성은 세포 부착성 시험(cell attachment test)으로 측정하였다. 즉, 배양용 배지에 적당 농도의 세포(MDCK; 3.6×10^4 cells/100 μ L, vero cell; 4.3×10^4 cells/100 μ L)를 부유시켜 96 well plate의 각 well에 접종한 후, 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 배양하여 70-80% 단층(monolayer)을 형성시킨 다음, PBS로 1회 세척하고 배양액 100 μ L와 2, 4, 8배까지 단계 희석한 추출물 100 μ L씩을 접종하였다. 2일간 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 현미경 관찰하여 세포가 부착 증식하여 독성을 일으키지 않는 최대 희석배수를 MNTD (maximum non toxic dose)으로 정하였다. 각 추출물에 대한 항바이러스 효능시험은 MNTD 농도와 잔여독성을 감안하여 한 단계 이후 희석배수 농도에서 각각 실시하였다.

항바이러스 효능검색 시험

접종용 바이러스는 75cm² tissue culture flask (Corning, USA)에서 배양하여 CPE가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 freezing-thawing을 2번 반복한 후, 1,500 \times g에서 5분 원심분리 하였다. Cell debris는 제거하고 바이러스를 함유하고 있는 상등액을 cryogenic vial (Nalgene, USA)에 소분 후 -80°C에 보관 사용하였다. 접종용 바이러스의 감염역가는 Reed-Muench method¹³⁾를 이용하여 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)를 산정하였으며, 그 결과 influenzavirus는 3.16×10^2 /mL, echovirus는 3.66×10^7 /mL로 나타났다.

추출물에 대한 항바이러스 효능 시험은 세포독성 시험 때와 같은 조건으로 숙주세포를 배양한 후 배양용 배지를 버리고,

MNTD 농도와 한 단계 이후 희석배수 농도로 추출물이 함유된 접종용 배양액 각 100 μ L, TCID50의 10배량의 바이러스 100 μ L를 접종하였다. 2일간 배양 후 세포독성 시험 때와 반대로 추출물의 CPE 억제효과를 현미경 관찰하였다. 96 well plate에 샘플 당 정상세포, virus만 접종한 세포, MNTD 농도의 추출물만 첨가한 세포를 각각 2 well씩 대조구로 두어 추출물에 의한 CPE 억제효과를 비교 관찰하여 판정 하였다. 항바이러스 효능을 보이는 추출물은 2번에 걸쳐 재현성 시험을 실시하였다.

결과 및 고찰

세포독성 시험

125종 식물로부터 134건의 채취부위별 열수추출 시료에 대한 세포독성 시험은 조제된 원시료로부터 8배까지 2배 단계 희석한 추출물을 첨가한 well과 추출물을 가하지 않은 well의 세포부착 정도를 비교하였다(Fig. 1). 각 식물의 열수추출물은 배양세포로 사용된 MDCK cell 및 vero cell에 대하여 서로 다른 세포 독성능을 나타내었다(Table 1). 추출물을 단계희석 접종한 후 세포가 정상세포 형태를 유지하는 최대 희석배수

(MNTD)가 원농도 이하일 때를 저독성의 세포독성을 보이는 추출물로 판정하였다. 그 결과 MDCK cell에 대하여 저독성을 보이는 식물은 비름(지상부), 캐모마일(지상부), 바나나(잎), 비파(성숙과), 옥수수수염, 접시꽃(꽃), 보리밥나무(성숙과), 무궁화꽃(충영), 황매화(꽃), 익모초(경엽), 고비(지상부), 계노등(꽃), 아카시아(꽃), 소루쟁이(전초), 산세베리아(잎), 까마중(성숙과), 부들(꽃) 등 17종이었다. 그 중 옥수수수염, 접시꽃(꽃), 고비(지상부), 아카시아(꽃)는 세포독성능을 나타내지 않았으며 오히려 증가된 세포성장을 관찰할 수 있었다. Vero cell에 대하여는 당귀(잎), 쇠뜨기(지상부), 캐모마일(지상부), 살구나무(성숙과), 무(지상부), 민들레(꽃), 어성초(지상부), 옥수수수염, 아왜나무(꽃), 개다래(미성숙과), 접시꽃(꽃), 두릅나무(꽃), 감나무(꽃), 뱀딸기(지상부), 보리밥나무(성숙과), 붉은서나물(꽃), 치자(꽃), 무궁화(충영), 황매화(꽃), 고비(지상부), 계노등(꽃), 쪽(지상부), 둥글레(꽃), 개구리갓(지상부), 철쭉(흰꽃), 철쭉(충영), 아카시아(꽃), 개갓냉이(지상부) 등 28종이었다. 그 중 옥수수수염, 접시꽃(꽃), 무궁화(충영)은 원농도에 서도 세포독성을 나타내지 않았다. 특히, 옥수수수염, 접시꽃(꽃) 추출물은 공시세포 모두에 세포독성을 보이지 않았다.

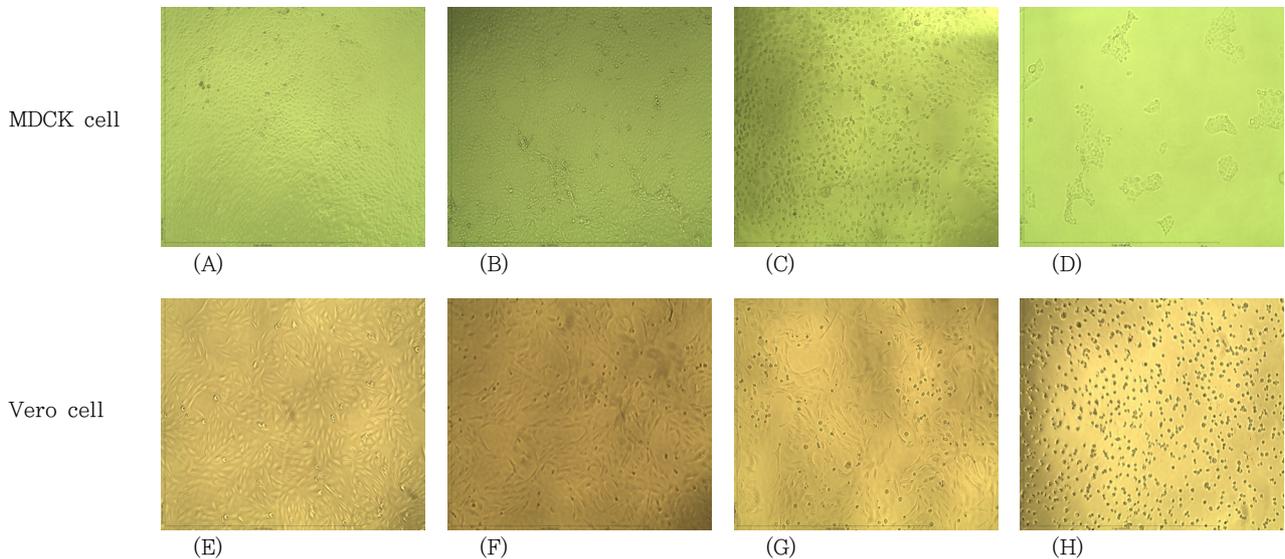


Fig. 1. Cells photographed through inverted microscope (after 72 hr incubation, $\times 400$).

- (A), (E); control cell untreated with aqueous extract and virus
- (B), (F); treated with maximum non-toxic dose (MNTD) of Robinia pseudoacacia aqueous extract
- (C), (G); inhibited CPE by Robinia pseudoacacia aqueous extract at MNTD concentration
- (D), (H); virus-induced cytopathic effect (CPE) infected with influenza virus and echovirus, respectively

Table 1. Cytotoxic effect of aqueous extracts of 125 plants against vero cell and MDCK cell

Group ^{a)}	Botanical name (Family)	Korean name	Part used ^{b)}	Cytotoxicity score ^{c)}	
				Vero cell	MDCK cell
A	<i>Amaranthus mangostanus</i> (Amaranthaceae)	비름	AP	+2	+1
	<i>Agastache rugosa</i> (Labiatae)	배초향	AP	+4	+4
	<i>Angelicae gigantis</i> (Umbelliferae)	당귀	LF	+1	+4
	<i>Atremisia asiatica</i> (Compositae)	쑥	AP	+8	+4
	<i>Aster scaber</i> (Compositae)	참취	FL	+8	+4
	<i>Brassica juncea</i> (Cruciferae)	갓	LF	+4	+8
	<i>Coix lacryma-jobi</i> (Gramineae)	율무	UF	+4	+2
	<i>Corylus sieboldiana</i> (Butulaceae)	참깨압나무	UF	+8	+4
	<i>Cedrela sinensis</i> (Meliaceae)	참죽나무	SB	+8	+4
	<i>Chrysanthemum boeale</i> (Compositae)	산국	FL	+4	+8
	<i>Capsicum annuum</i> (Solanaceae)	고추	UF	+4	+4
	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Labiatae)	향유	AP	+4	+8
	<i>Equisetum arvense</i> (Equisetaceae)	쇠뜨기	AP	+1	+4
	<i>Erigeron annuus</i> (Compositae)	개망초	FL	+4	+2
	<i>Erigeron canadensis</i> (Compositae)	망초	FL	+8	+8
	<i>Glechoma hederacea</i> (Labiatae)	긴병꽃풀	WP	+2	+4
	<i>Gnaphalium affine</i> (Compositae)	떡쑥	WP	+4	+4
	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Saxifragaceae)	수국	LF	+8	+4
	<i>Ixeris dentata</i> (Compositae)	쑤바귀	WP	+4	+4
	<i>Lycium chinensis</i> Miller (Solanaceae)	구기자	LS	+2	+4
	<i>Matricaria chamomilla</i> (Compositae)	캐모마일	AP	+1	+1
	<i>Mentha sacharinensis</i> (Labiatae)	박하	LS	+8	+8
	<i>Morus alba</i> (Moraceae)	뽕나무	RF	+4	+2
	<i>Musa paradisiaca</i> (Musaceae)	바나나	LF	+2	+1
	<i>Oenothera stricta</i> Ledebour (Onagraceae)	달맞이꽃	FL	+8	+8
	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>japonica</i> (Labiatae)	들깨	LS	+4	+8
	<i>Perilla frutescens</i> (Labiatae)	차조기	LS	+2	+4
	<i>Persicaria hydropiper</i> (Polygonaceae)	역귀	LS	+4	+8
	<i>Petasites japonicus</i> (Compositae)	머위	AP	+8	+8
	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	도라지	LS	+8	+8
	<i>Plantago asiatica</i> (Plantaginaceae)	질경이	AP	+4	+4
	<i>Portulaca oleracea</i> (Portulacaceae)	쇠비름	AP	+8	+4
	<i>Prunus armeniaca</i> (Rosaceae)	살구	RF	+1	+4
	<i>Raphanus sativus</i> (Cruciferae)	무	AP	+1	+4
<i>Rhododendron mucronulatum</i> (Ericaceae)	진달래	FL	+8	+8	
<i>Rumex acetosa</i> (Polygonaceae)	수영	FL	+8	+8	
<i>Quercus aliena</i> (Fagaceae)	갈참나무	RF	+4	+4	
<i>Quercus acutissima</i> (Fagaceae)	상수리나무	FL	+8	+8	
<i>Taraxacum mongolicum</i> (Compositae)	민들레	FL	+1	+4	
<i>Yucca gloriosa</i> (Agacaceae)	유카	FL	+8	+4	

Table 1. Continued

Group ^{a)}	Botanical name (Family)	Korean name	Part used ^{b)}	Cytotoxicity score ^{c)}		
				Vero cell	MDCK cell	
B	<i>Alnus firma</i> (Betulaceae)	사방오리나무	FL	+8	+8	
			UF	+8	+8	
	<i>Cornus officinalis</i> (Cornaceae)	산수유	UF	+8	+8	
	<i>Eriobotrya japonica</i> (Rosaceae)	비파나무	RF	+4	+1	
			LS	+4	+8	
	<i>Ginkgo biloba</i> (Gingkoaceae)	은행나무	LF	+4	+8	
	<i>Houttuynia cordata</i> (Piperaceae)	어성초	AP	+1	+4	
	<i>Lonice japonica</i> (Caprifoliaceae)	인동초	FL	+2	+8	
			LS	+2	+4	
	<i>Nelumbo nucifera</i> (Nymphaeaceae)	연	LF	+4	+4	
	<i>Pueraria thunbergiana</i> (Leguminosae)	췌	FL	+4	+4	
<i>Zea mays</i> (Gramineae)	옥수수수염	corn silk	+1	+1		
C	<i>Astilbe chnensis</i> (Saxifragaceae)	노루오줌	FL	+2	+4	
	<i>Castanea crenata</i> (Fagaceae)	밤껍질	FB	+8	+4	
	<i>Clematis apiifolia</i> (Cercidiphyllaceae)	사위질빵	FL	+4	+8	
	<i>Forsythia koreana</i> (Oleaceae)	개나리꽃	FL	+4	+8	
	<i>Glehnia littoralis</i> (Umbelliferae)	갯방풍	FL	+4	+4	
	<i>Rhus tricocarpa</i> (Anacardiaceae)	개웃나무	LF	+2	+8	
	<i>Smilax china</i> (Liliaceae)	청미래덩굴	UF	+4	+4	
			RT	+8	+2	
	<i>Symphytum officinale</i> (Boraginaceae)	캄프리	LS	+2	+4	
	<i>Viburnum awabuki</i> (Caprifoliaceae)	아왜나무	FL	+1	+4	
	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (Rutaceae)	초피나무	UF	+8	+8	
	D	<i>Acer palmatum</i> (Aceraceae)	단풍나무	UF	+8	+8
		<i>Actinidia polygama</i> (Actinidiaceae)	개다래	UF	+1	+4
		<i>Aloe barbadensis</i> (Liliaceae)	알로에	LF	+2	+4
<i>Althaea rosea</i> Cavanilles (Malvaceae)		접시꽃	FL	+1	+1	
<i>Amorpha fruticosa</i> (Leguminosae)		족제비싸리	FL	+4	+4	
<i>Aralia cordata</i> (Araliaceae)		독활	LF	+4	+2	
<i>Aralia elata</i> (Araliaceae)		두릅나무	FL	+1	+2	
<i>Aster koraiensis</i> (Compositae)		벌개미취	FL	+8	+8	
<i>Bidens bipinnata</i> (Compositae)		귀침초	LS	+2	+2	
<i>Breea segeta</i> (Compositae)		조뱅이	FL	+8	+8	
<i>Broussonetia kazinoki</i> (Moraceae)		닥나무	LS	+4	+4	
<i>Caragana sinica</i> (Leguminosae)		골담초	FL	+4	+4	
<i>Camellia japonica</i> (Theaceae)		동백나무	UF	+8	+8	
<i>Corydalis speciosa</i> (Papaveraceae)		산괴불주머니	LS	+2	+2	
<i>Diospyros kaki</i> (Ebenaceae)		감나무	LF	+2	+8	
			FL	+1	+4	
<i>Duchesnea chrysantha</i> (Rosaceae)		뱀딸기	AP	+1	+2	
<i>Elaeagnus macrophylla</i> (Elaeagnaceae)		보리밥나무	RF	+1	+1	
<i>Erechtites hieracifolia</i> (Compositae)		붉은서나물	FL	+1	+4	
<i>Euphorbia supina</i> (Euphorbiaceae)		애기땅빈대	WP	+8	+4	
<i>Firmiana simplex</i> (Sterculiaceae)		벽오동	UF	+8	+8	
<i>Gardenia jasmonoides</i> (Rubiaceae)		치자	FL	+1	+4	
<i>Geranium thunbergii</i> (Geraniaceae)		이질풀	AP	+8	+8	
<i>Hibiscus syriacus</i> (Malvaceae)	무궁화	PG	+1	+1		
<i>Hydrocotyle ramiflora</i> (Umbelliferae)	피젓이풀	WP	+4	+4		
<i>Ilex cornuta</i> (Aquifoliaceae)	호랑가시나무	RF	+4	+4		
<i>Impatiens balsamina</i> (Balsaminaceae)	봉선화	FL	+8	+8		

Table 1. Continued

Group ^{a)}	Botanical name (Family)	Korean name	Part used ^{b)}	Cytotoxicity score ^{c)}	
				Vero cell	MDCK cell
	<i>Kerria japonica</i> (Rosaceae)	황매화	FL	+1	+1
	<i>Leonurus sibiricus</i> (Labiatae)	익모초	LS	+4	+1
	<i>Lindera obtusiloba</i> (Lauraceae)	생강나무	LS	+2	+4
	<i>Lysimachia barystachys</i> (Primulaceae)	까치수염	AP	+8	+8
	<i>Machilus thunbergii</i> (Lauraceae)	후박나무	UF	+4	+8
	<i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)	대산목	FL	+8	+8
	<i>Magnolia kobus</i> (Magnoliaceae)	목련	UF	+2	+8
	<i>Mallotus japonicus</i> (Euphorbiaceae)	예덕나무	LF	+8	+8
	<i>Mirabilis jalapa</i> (Nyctaginaceae)	분꽃	RF	+4	+4
	<i>Osmunda japonica</i> (Osmundaceae)	고비	AP	+1	+1
	<i>Paederia scandens</i> (Rubiaceae)	계노등	FL	+1	+1
	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> (Vitaceae)	답쟁이덩굴	LS	+8	+8
	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> (Valerianaceae)	마타리	FL	+2	+4
	<i>Paulownia coreana</i> (Scrophulariaceae)	오동나무	UF	+4	+4
	<i>Persicaria thunbergii</i> (Polygonaceae)	고마리	FL	+4	+4
	<i>Persicaria tinctoria</i> (Polygonaceae)	쪽	AP	+1	+4
	<i>Polygonatum humile</i> (Liliaceae)	둥글레	FL	+1	+2
	<i>Populus maximowiczii</i> (Salicaceae)	황철	LS	+8	+8
	<i>Prunus persica</i> (Rosaceae)	복숭아	LF	+4	+2
			PG	+4	+2
	<i>Prunus serrulata</i> (Rosaceae)	벚나무	RF	+2	+4
			PG	+8	+8
D	<i>Quercus aliena</i> (Fagaceae)	갈참나무	FL	+4	+4
	<i>Ranunculus ternatus</i> (Ranunculaceae)	개구리갯	AP	+1	+4
	<i>Rhododendron schlippenbachii</i> (Ericaceae)	철쭉	PG	+1	+8
			FL	+1	+2
	<i>Robinia pseudoacacia</i> (Leguminosae)	아카시아	FL	+1	+1
	<i>Rorippa indica</i> (Labiatae)	개갯냉이	AP	+1	+4
	<i>Rosa multiflora</i> (Rosaceae)	찔레나무	UF	+8	+8
	<i>Rosa rugosa</i> (Rosaceae)	해당화	SD	+8	+8
	<i>Rumex crispus</i> (Polygonaceae)	소루쟁이	AP	+4	+1
	<i>Rudbeckia bicolor</i> (Compositae)	루드베키아	FL	+2	+2
	<i>Salvia plebeia</i> (Labiatae)	곰보배추	AP	+8	+8
	<i>Sansevieria</i> (Liliaceae)	산세베리아	LF	+4	+1
	<i>Solanum nigrum</i> (Solanaceae)	까마중	RF	+4	+1
	<i>Styrax japonica</i> (Styracaceae)	때죽나무	PG	+8	+8
	<i>Trachycarpus fortunei</i> (Palm)	당종려	FL	+8	+4
	<i>Trifolium repens</i> (Leguminosae)	토끼풀	FL	+2	+4
	<i>Typha latifolia</i> Linne (Typhaceae)	부들	FL	+4	+1
	<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	포도	SD	+2	+8
	<i>Youngia denticulata</i> (Compositae)	고들빼기	FL	+4	+4
	<i>Youngia japonica</i> (Compositae)	뽕리뱅이	AP	+4	+8
	<i>Zelkova serrata</i> Makino (Ulmaceae)	느티나무	PG	+8	+8
			LF	+8	+8

^{a)} A; can be used as raw materials in foodstuff B; can be used in limited dosage, C; prohibited in food processing by KFDA, D; not cited in Food Code

^{b)} AP; aerial part, FL; flower, RF; ripened fruit, UF; unripened fruit, LF; leaf, SD; seed, WP; whole plant, LS; leaf+stem, RT; root, SB; stem bark, FB; fruit bark, PG; plant gall

^{c)} score; 2-fold dilution factor for the extract showing (-) cytotoxicity at the maximum non-toxic dose (MNTD)

Table 2. Result of antiviral activities of aqueous extracts by cytopathic effect inhibition assays

Plants (part used)	Dilution factor ^{a)}	Antiviral activity	
		Influenzavirus A	Echovirus 30
<i>Zea mays</i> (corn silk)	1	+++ ^{b)}	-
	2	+	-
<i>Hibiscus syriacus</i> (plant gall)	1	+++	-
	2	+	-
<i>Robinia pseudoacacia</i> (flower)	1	+++	+
	2	+	+++
<i>Rumex crispus</i> (aerial part)	2	+++	-
	4	+	-
<i>Persicaria tinctoria</i> (aerial part)	2	-	+++
	4	-	+
<i>Rhododendron schlippenbachii</i> (plant gall)	2	-	+++
	4	-	+

a) The number of 2-fold dilutions beyond the maximum non-toxic dose (MNTD) in which the detected antiviral activity was observed

b) Results are expressed as inhibition of virus-induced CPE at MNTD for the extract: (-) no inhibition, (+) partial inhibition, (+++) complete inhibition. Results were confirmed in at least two duplicate experiments.

항바이러스 효능 검색

추출물에 대한 anti-influenza virus 및 anti-echovirus 항바이러스 효능보유 검색시험은 낮은 세포독성을 나타내는 시료에 대하여 MNTD 농도와 한 단계 이후 희석배수 농도에서 실시하여, 바이러스 감염으로부터 유도되는 CPE 억제정도로서 판정하였다(Table 2). MDCK 세포에서 낮은 독성을 나타내는 17종의 추출물 중 influenza virus A에 대하여 항바이러스 효능을 나타내는 추출물은 옥수수수염, 무궁화(충영), 아카시아(꽃), 소루쟁이(지상부)이었다. 세포무독성을 나타내는 추출물의 희석배수 즉, 소루쟁이 추출물은 2배 희석농도, 나머지 3종은 원농도에서 각각 항인플루엔자 효능을 나타내었다. 한편, Vero 세포에 낮은 독성을 나타내는 28종의 추출물 중 echovirus 30에 대하여 항바이러스 효능을 나타내는 추출물은 쪽(지상부), 철쪽(충영), 아카시아(꽃) 등 3종이었다. 이중 아카시아는 원액에서, 나머지 2종은 2배 희석농도에서 항바이러스 효능을 나타내었다.

특히 밀원식물로서 유용한 아카시아 꽃은 공시바이러스 2종 모두에 항바이러스 효능을 나타내었고, 또한 무궁화와 철쪽의 벌레혹은 각각 원액 및 2배 희석농도에서 세포무독성 및 항바이러스효능을 보였다.

결 론

최근 천연물중의 항바이러스 효능 검색 연구는 다수 보고되고 있다. 우리나라의 경우, Park 등¹⁴⁾은 유자, 모과, 생강의 열수추출물에서 A형 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과가 있다

고 보고하였고, Rym 등¹⁵⁾은 잔나비겉상버섯 수용성 물질이 vesicular stomatitis virus (VSV)에 대한 항바이러스 효과가 있다고 보고하였으며, Lee 등¹⁶⁾은 낙엽진흙버섯 자실체 유래 열수추출물과 에탄올 침전물로부터 coxsackievirus B3에 대한 항바이러스 효능을 보고하였다. 또한 Kwon 등¹⁷⁾은 전통 약용 식물 중 초피나무, 구지뽕나무, 누리장나무, 고삼의 열수추출물에서 돼지위장염바이러스(TGEV)와 초피나무, 조각자나무, 마황의 열수추출물이 돼지유행성 설사바이러스(PEDV)에 대하여 효과적인 항바이러스능을 나타낸다고 보고하였다. 또한, herpes simplex virus (HSV)에 대한 항바이러스 효능 탐색결과, Yoon 등¹⁸⁾은 ascorbic acid, Kim 등¹⁹⁾은 측백나무의 종자(백자인, *Thujae orientalis* Semen) 추출물, Kang 등²⁰⁾은 계지와 호장근의 열수 및 메탄올 추출물, Lee 등²¹⁾은 수종의 flavonoid 화합물이 HSV에 대한 항바이러스 효과가 있다고 보고하였다. 또한 Kim 등²²⁾은 녹차(*Camellia sinensis*), 홍화씨(*Carthamus tinctorius*) 추출물에서 feline calicivirus (FCV)에 대한 항바이러스 효능을 보고하였으며, Lee 등²³⁾은 알로에(*Aloe arborescens*) 추출물이 HSV-1, measles virus, hantaan virus, VSV에 대하여 항바이러스 효과가 있다고 보고하였다.

한편, 외국의 경우에서도 국가별 민속약용 식물을 중심으로 항바이러스 소재 검색 연구가 진행되고 있다. 콜롬비아의 민속 식물 *Rosa nutkana*, *Amelanchier alnifolia*, *Potentilla arguta* (Rosaceae, 장미과)는 coronavirus 및 respiratory syncytial virus (RSV)에 각각 세포병변효과를 저해한다고 보고²⁴⁾ 하였으며, 에티오피아 약용식물 *Acokanthera schimperi* (Apocynaceae, 협죽도과)은 Coxsackievirus B3 (CVB3)에, *Euclea schimperi*

(Ebenaceae, 감나무과)는 influenzavirus A에, *Inula confertiflora* (Asteraceae, 국화과)는 HSV-1에 각각 세포배양을 통한 CPE 억제능이 있다는 보고⁶⁾ 하였으며, 브라질의 자생식물 *Artocarpus integrifolia* (Moraceae, 뽕나무과) 외 12종의 약용식물로부터 anti-rotavirus activity 효능이 보고²⁵⁾ 되었다. 또한 르완다 약용식물 *Maranga kilimandscharia* (Euphobiaceae, 대극과)에서 anti-measles activity가 보고²⁶⁾ 되었으며, 베네수엘라 열대 우림 지역 자생식물 *Guatteria cardoniana* (Annonaceae)의 메탄올 추출물로부터 neurotropic sindbis virus (NSV)에 저해효과가 있다고 보고²⁷⁾ 되었으며, 브라질 남부지역에 자생하는 *Hypericum* spp. (몰레나물과)에서 lentiviruses에 대한 항바이러스 활성 보고²⁸⁾, 아르헨티나의 약용식물 *Polygonum punctatum* (Polygonaceae, 마디풀과), *Lithraea molleoides* (Anacardiaceae, 옷나무과)에서 respiratory syncytial virus (RSV)에 대한 항바이러스 효능 보고²⁹⁾, 호주 원주민의 약용식물 *Pterocaulon sphacelatum* (Asteraceae, 국화과)와 *Dianella longifolia* (Liliaceae, 백합과)의 anti-poliovirus activity 보고³⁰⁾, *Euphorbia australis* (Euphorbiaceae, 대극과)와 *Scaevola spinescens* (Goodeniaceae)의 human cytomegalovirus (HCMV)에 대한 항바이러스 효능 보고, 이탈리아의 Herpes zoster의 치료 민속약용식물로 알려진 *Patiaria diffusa* (Urticaceae, 쐬기풀과), *Urtica dioica* (Urticaceae), *Sambucus niger* (Caprifoliaceae, 인동과)의 feline immunodeficiency virus (FIV)에 대한 항바이러스 효과 보고³¹⁾, 서부 아프리카의 자생식물 *Guiera senegalensis* (Combretaceae)의 충영(벌레혹)으로부터 fowlpox virus에 대한 항바이러스 효능이 있다고 보고³²⁾ 하였다. 또한 중국의 민속약용식물 *Trollius chinensis* Bunge (Ranunculaceae, 미나리아재비과)의 꽃으로부터 추출된 flavonoids와 유기산(orientin, vitexin 등)은 parainfluenza type 3 virus와 coxsackie B3 virus에 항바이러스 효능이 있다는 보고³³⁾, 고삼(*Sophora flavescens*, Fabaceae), 황금(*Scutellaria baicalensis*, Lamiaceae)은 RSV에 대하여 항바이러스 효능 있다는 보고³⁴⁾, 일본 및 우리나라에 자생하는 야생잡초 뿌리뱅이(*Youngia japonica*, Asteraceae, 국화과)의 HEp-2 cell에서 RSV에 대한 항바이러스 효능 보고^{35,36)} 및 중국 및 우리나라 산야에 흔히 자라는 꿀풀(*Prunella vulgaris*, Labiatae)로부터 추출된 polysaccharide는 vero cell에서 HSV antigen 발현을 낮춘다는 보고³⁷⁾가 있다. 특히, 성병 및 피부병변을 유발하는 human simplex virus (HSV-1, -2)에 대한 항바이러스능 보유식물 검색시험은 많이 보고되었다. Thailand^{38,39)} 민속식물 *Dunbaria bella* (Fabaceae, 콩과)와 *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae, 쥐꼬리망초과), sub-Saharan Africa⁴⁰⁾ 지역의 민속약용식물 *Carissa edulis* (Apocynaceae, 협죽도과), 콜롬비아⁴¹⁾ 민속식물 *Polygonum punctatum* (Polygonaceae, 마디풀과)와 *Ampelozizyphus amaronicus* (Rhamnaceae, 갈매나무과), India⁴²⁾ 민속식물 *Annona muricata* (Annonaceae, 포포나무과)의 수피와 *Petunia nyctaginitiflora* (Solanaceae, 가지과)의 지상부, 불가리아⁴³⁾ 약용식물 *Geranium sanguineum* (Geraniaceae, 쥐손이풀과)의 열수 추출액 등에서 그 효능이 보고되었다.

또한 천연물 중에서도 버섯류에 대한 항바이러스 물질 검색 연구보고는 표고버섯(*Lentinus edodes*) 유래 lentinan⁴⁴⁾과 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 PSK[45]의 HIV 증식억제 효과, 잔나비겉상버섯(*Elfvigia applanata*) 열수 추출물의 VSV에 대한 항바이러스 활성¹⁵⁾, 영지버섯(*Ganoderma* spp.) 유래 당단백의 HSV에 대한 항바이러스 활성⁴⁶⁾, 메꽃버섯(*Microphorus affinis*) 유래 지질성 물질의 neuraminidase 활성저해⁴⁷⁾, 동충하초(*Cordyceps militaris*) 유래 codycepin의 HIV-1 역전사 효소 활성억제⁴⁸⁾ 등 버섯류에 대한 항바이러스 활성에 대한 연구 등 문헌이 검색되었다.

그러나 이렇듯 많은 항바이러스 효능 검색 연구보고에도 불구하고 치료제로서 상품화에 성공한 예는 많지 않다. 이는 *in vitro* cell culture system을 이용한 항바이러스 효능검색 시험이 숙주세포의 다양성 등 세포배양 환경요인이 실험실마다 차이가 있다는 단점과, *in vivo* 임상 실험계에서 세포내 절대기생체인 바이러스의 유전적 변이, 표적 숙주세포와의 안전성 평가 등 요인으로 인하여 결과 차이가 있기 때문이라 사료된다. 이는 *in vivo* 에서 항바이러스 효과를 나타내는 유효성분도 추출물의 농도, 추출방법 등 요인으로 인하여 *in vitro* cell culture system에서 검출이 안 될 수 있다고 보고⁴⁹⁾에서 찾아볼 수 있다. 그럼에도 불구하고 많은 나라에서 자국의 민속 약용식물을 이용한 항바이러스 효능물질 검색시험이 우선적으로 집중되는 이유는 비싼 화학치료제보다 복용이 용이한 열수추출(decotion) 등의 방법을 통한 저렴하고 효과적인 대체요법으로 적용될 수 있고 향후 신약개발의 후보물질로서 연구대상이 되기 때문이라 사료된다. 2009년 전세계에 대유행한 pandemic influenzavirus A(H1N1)의 치료제로 사용된 oseltamivir (Tamiflu[®])가 대회향(Chinese star anise)으로부터 추출된 유효성분으로 상품화에 성공한 사례이다.

한편, 충영(벌레혹, galls)는 식물의 줄기나 잎 등에 진딧물 등 곤충이나 균류의 기생에 의한 자극으로 생기는 비정상적 비대성 혹(hypertrophic) 조직으로, 탄닌이 다량 함유되어 있으며 한방에서는 붉나무의 오배자가 수렴제 등 약용으로 사용된다. 본 연구에서는 느티나무, 때죽나무, 철쭉, 뽕나무, 복숭아나무, 무궁화의 충영을 채취하여 항바이러스 효능을 검증한 결과, 무궁화와 철쭉의 충영에서 influenza virus와 echovirus에 대한 항바이러스 효능을 각각 나타내어 다양한 식물의 충영을 추후 더 조사할 가치가 있다고 사료된다.

요 약

부산지역 인근의 자생식물 125종의 열수추출물로부터 바이러스유도 세포병변효과 억제시험법을 이용하여 인플루엔자바이러스와 에코바이러스에 대한 항바이러스 효능을 검색하였다. 그 결과, 7종의 식물이 세포무독성 농도에서 항바이러스 효과가 나타났다. 옥수수수염, 무궁화(충영), 아카시아(꽃), 소루쟁이(지상부)의 열수추출물은 인플루엔자바이러스에 대하여, 쪽(지

상부), 철쭉(층영), 아카시아(꽃)의 열수추출물은 에코바이러스에 대하여 각각 항바이러스 효능을 나타내었다.

참고문헌

1. Biological research information center. <http://bric.postech.ac.kr/webzine>.
2. Min, S. K., Y. K. Park, J. H. Park, J. S. Jin, and K. W. Kim., Screening of antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants. *Journal of Life Science* 14, pp.951~962(2004).
3. Kurokawa, M., H. Ohyama, T. Hozumi, T. Namba, M. Nakano, and K. Shiraki., Assay for antiviral activity of herbal extracts using their absorbed sera. *Chem. pharm. Bull.* 44, pp.1270~1272(1996).
4. Paul Cos, A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, and Louis Maes., Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology* 106, pp.290~302(2006).
5. Kim, K. A., J. Y. Lee, W. K. Kim, Y. Kim, Y. K. Park, and C. Kang., Amantadine and zanamivir resistance of Influenza A/H3N2 viruses isolated in Korea, 2002/03~2003/04. *Journal of Bacteriology and Virology.* 38, pp.127~137(2008).
6. Mariam, T. G., R. Neubert, P. C. Schmidt, P. Wutzler, and M. Schmidtke., Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 104, pp.182~187(2006).
7. 질병관리본부. 감염병실험실진단 질환별시험법 II. pp. 650~651(2005)
8. Lee, Young-No. *Flora of Korea*. 4th ed. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea(2002).
9. 김태정. *한국의 자원식물*. 서울대학교출판부(1996).
10. Shin, M. K. *Clinical Phytology*. Namsandang, Seoul, Korea(1998).
11. Park, J. H. and Lee, J. G., *Encyclopedia of Medicinal Plant*. Shinilsangsa, Seoul, Korea(1998).
12. Min, S. K., Report of enterovirus laboratory surveillance in Busan. The annual report of Busan metropolitan city institute of health and environment. 18~2, pp.10~14(2008).
13. Hierholzer, J. C. and R. A. Killington., Virus isolation and quantitation. In: *Virology Methods Manual*, In Mahy, B. W. J. and H. O. Kangro (eds.), Academy Press, San Diego, pp.35~37(1996).
14. Park, K. J. and H. H. Lee., In vitro antiviral activity of aqueous extracts from Korean medicinal plants against influenza virus type A. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, pp.924~929(2005).
15. Rym, K. H., S. K. Eo, Y. S. Kim, C. K. Lee, and S. S. Han., Antiviral activity of water soluble substance from *Elfvngia applanata*. *Kor. J. Pharmacogn.* 30, pp.25~33(1999).
16. Lee, S. M., S. M. Kim, Y. H. Lee, W. J. Kim, Y. S. Na, H. G. Kim, J. H. Nam, H. D. Shin, D. H. Kwon, and Y. I. Park., Antiviral activity of hot water extract and its ethanol precipitate of *Phellinus pini* fruiting body. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37, pp.33~41(2009).
17. Kwon, D. H., M. B. Kim, D. Y. Toon, Y. H. Lee, J. W. Kim, H. G. Lee, I. S. Choi, J. S. Lim, and Y. K. Choe., Screening of plant resources of antiviral activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11, pp.24~30(2003).
18. Yoon, J. C., J. J. Cho, S. M. Yoo, and Y. M. Ha., Antiviral activity of ascorbic acid against herpes simplex virus. *J. Korean Soc. Microbiol.* 35, pp.1~8(2000).
19. Kim, H. K., E. J. Kang, B. J. Kang, K. J. Park, and B. S. Ko., Isolation of anti-herpes simplex virus type 1 component from *Thujae orientalis* semen. *Kor. J. Pharmacogn.* 29, pp.277~282(1998).
20. Kang, B. J., K. S. Yang, M. H. Kim, and K. J. Park., Screening of antiviral activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against herpes simplex virus type-1. *J. Korean. Soc. Virology* 27, pp.227~237(1997).
21. Lee, J. H., Y. S. Kim, C. K. Lee, H. K. Lee, and S. S. Han., Antiviral activity of some flavonoids on herpes simplex viruses. *Kor. J. Pharmacogn.* 30, pp.34~39(1999).
22. Kim, K. L., Y. M. Kim, E. W. Lee, D. S. Lee, and M. S. Lee., Screening of antiviral activity from natural plants against feline calicivirus. *Journal of Life Science* 19, pp.928~933(2009).
23. Lee, P. W., Y. C. Kim, D. H. Chung., Antiviral action of aloe extracts. *J. of Kor. Soc. of Virology* 22, pp.207~215(1992).
24. McCutcheon, A. R., T. E. Roberts, E. Gibbons, S. M. Ellis, L. A. Babiuk, R. E. W. Hancock, and G. H. N. Towers., Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 49, pp.101~110(1995).
25. Goncalves, J. L. S., R. C. Lopes, D. B. Oliveira, S. S. Costa, M. M. F. S. Miranda, M.T. V. Romanos, N. S. O. Santos, and M. D. Wigg., In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil a

- against diarrhea, *Journal of Ethnopharmacology* 99, pp.403~407(2005).
26. Cos, P., N. Hermans, T. D. Bruyne, S. Apers, J. B. Sindambiwe, D. V. Berghe, L. Pieters, and A. J. Vlietinck., Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities, *Journal of Ethnopharmacology* 79, pp.155~163(2002).
27. Paredes, A., M. Hasegawa, F. Prieto, J. Mendez, M. Rodriguez, and M. R. ortega., Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions, *Journal of Ethnopharmacology* 78, pp.129~132(2001).
28. Schmitt, A. C., A. P. Ravazzolo, and G. L. Poster., Investigation of some *Hypeicum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity, *Journal of Ethnopharmacology* 77, pp.239~245(2001).
29. Kott, V., L. Barbini, M. Cruanes, J. D. Munoz, E. Vivot, J. Cruanes, V. Martino, G. ferraro, L. Cavallaro, and R. Campos., Antiviral activity in Argentine medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 64, pp.79~84(1999).
30. Semple, S. J., G. D. Reynolds, M. C. O'Leary, and R. L. P. Flower., Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity, *Journal of Ethnopharmacology* 60, pp.163~172(1998).
31. Tochikura, T. S., H. Nakashima, Y. Kaneko, N. Kobayashi, and N. Yamamoto., Suppression of human immunodeficiency virus replication by 3'-azido-3'-deoxythymidine in various human haematopoietic cell line; Augmentation of the effect by lentinan, *J. Cancer. Res.* 8, pp.583~589(1987).
32. Lamien, C. E., A. Meda, J. Mans, M. Romito, O. G. Nacoulma, and G. J. Viljoen., Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis*, *Journal of Ethnopharmacology* 66, pp.249~253(2005).
33. Li, Y. L., S. C. Ma, T. T. yang, S. M. Ye, and P. P. H. But., Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge, *Journal of Ethnopharmacology* 79, pp.365~368(2002).
34. Ma, S. C., J. Du, P. P. H. But, X. L. Deng, Y. W. Zhang, V. E. C. Ooi, H. X. Xu, H. S. Lee, and S. F. Lee., Antiviral chinese medicinalherbs against respiratory syncytial virus, *Journal of Ethnopharmacology* 79, pp.205~211(2002).
35. Ooi, L. S. M., H. Wang, C.W. Luk, and V. E. Ooi., Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC, *Journal of Ethnopharmacology* 94, pp.117~122(2004).
36. Ooi, L. S. M., H. Wang, Z. He, and V. E. C. Ooi., Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica*(L.) DC, *Journal of Ethnopharmacology* 106, pp.187~191(2006).
37. Chiu, L. C. M., W. Zhu, and V. E. C. Ooi., A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in vero cells, *Journal of Ethnopharmacology* 93, pp.63~68(2004).
38. Pannarat, A., W. Aree, W. Prapon, and K. F. Bastow., Anti-herpes virus activity of *Dunbaria bella* Prain, *Journal of Ethnopharmacology* 105, pp.64~68(2006).
39. Yoosook, C., Y. Panpisutchai, S. Chaichana, T. Santisuk, and V. Reutrakul., Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*, *Journal of Ethnopharmacology* 67, pp.179~187(1999).
40. Tolo, F. M., G. M. Rukunga, F. W. Muli, E. N. M. Njagi, W. Njue, K. Kumon, G. M. Mungai, C. N. Muthaura, J. M. Mili, L. K. Keter, E. Oishi, and M. W. Kofi-Tsekpo., Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus, *Journal of Ethnopharmacology* 104, pp.92~99(2006).
41. Lopez, A., J. B. Hudson, and G. H. N. Towers., Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 77, pp.189~196(2001).
42. Padma, P., N. P. Pramod, S. P. Thyagarajan, and R. L. Khosa., Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on herpes simplex virus, *Journal of Ethnopharmacology* 61, pp.81~83(1998).
43. Serkedjieva, J., and S. Ivancheva., Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L, *Journal of Ethnopharmacology* 64, pp.59~68(1999).
44. Uncini Manganelli, R. E., L. Zacaaro, and P. E. To mei., Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M, et K. and *Sambucus niger* L, *Journal of Ethnopharmacology* 98, pp.323~327(2005).
45. Tochikura, T. S., H. Nakashima, K. Hirose, and N. Yamamoto., A biological response modifier, PSK, inhibits human immunodeficiency virus infection in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, pp.726~733(1987).
46. Oh, K. W., C. K. Lee, Y. S. Kim, S. K. Eo, and S. S. Han., Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine, *Journal of Ethnopharmacology* 72, pp.221~227(2000).

47. Kim, K. B., S. I. Kim, and K. S. Song., Neuraminidase inhibitors from mushroom *Microphorus affinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, pp.778~782(2003).
48. Muller, W. E. G., B. E. Weiler, R. Charubala, W. Piferederer, L. Lserman, R. W. Sobol, J. Suhadolnik, and H. C. Schroder., Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibitor human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochem.* 30, pp.2027~2033(1990).
49. Vlietinck, A. J., and Vanden Berghe, D., Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs?. *Journal of Ethnopharmacology* 32, pp.141~153 (1991).