

# 한약 탕제를 이용한 항 Herpes virus 제제의 개발 연구

박 갑주·강 봉주·신 순식·남 봉현·김 남주

한국한의학연구소 기초연구부 기초이론연구실

= Abstract =

## Study on The Anti-HSV(Herpes Simplex Virus) Activity of Natural complex Products

Park Kap Joo, Kang Bong Joo,  
Shin Soon Shik, Nam Bong Hyun, Kim Nam Joo  
Department of preclinical medicine ,KIOM.

In order to search for anti-HSV agents from natural complex products, we extended the number of specimens. Both methanol extract and boiling water extract of the natural complex products were screened to detect anti-HSV activity by MTT assay.

Anti-HSV activities of thirteen natural complex products extracted by methanol and boiling water were screened. Three of 13 natural complex products extracted by methanol showed efficacy against HSV. Natural complex products showing anti-HSV activities as methanol extracts were No.3, 6, 11 and their SI were 323.809, 2811.041 and 708.20. As water boiling extracts, No.8 and No.11 have displayed SI of 16.45 and 60.39 respectively. Especially anti-HSV activities of natural complex products extracted by methanol No.6 was stronger than other ones.

【Key words】 anti-HSV activity, MTT assay

---

corresponding Author : N.J.Kim.

## I. 서론

사람 HSV는 감기, 비노생식기 감염, 구순, 각막염, 뇌염(성인), 신생아 감염, 자궁경부암, AIDS의 2차 기회감염 등의 원인이 되고 있어(Hill, 1985; Nelson등, 1990) 구미, 일본 등 선진국에서는 오래 전부터 상기 질병에 대한 치료연구와 더불어 새로운 항바이러스제 개발에 많은 투자를 하고 있다. 이러한 연구결과 지금까지 몇몇 화학요법제 및 항생물질들이 개발되었으나 많은 경우 아직도 독성이 많거나 효능이 만족할 만한 수준에 이르진 못하고 있어(Darby등, 1981; Shiraki등, 1990) 화학요법제나 항생제보다 정상세포에 대한 독성은 적으며 바이러스 감염세포에 대한 독성은 상대적으로 큰 천연 화합물의 탐색 및 개발에 선진국을 중심으로 활발하게 연구중에 있다. 특히 최근 분자생물학적인 재조합 백신제조 및 최신 분석 기기의 발달과 또한 컴퓨터 자동화 기술의 개발에 힘입어 선택적이고, 과학적인 스크리닝법이 정립되어 과거보다 독성이 적은 항바이러스제 개발이 용이해지고 있어 일부 항 바이러스 제제가 생산활용단계에 들어가 있다. 현재 항 Herpes simplex virus(HSV) 물질로 특히 주목을 받고 있는 것은 HSV 역전사효소 (reverse transcriptase) 억제제로 nucleoside analogue 계열이 많이 연구되어, 그중 Acyclovir와 Vidarabine이 FDA의 승인을 얻어 치료제로 사용되고 있다(Prusoff등, 1986; De Clercq, 1990). 현재 사용되고 있는 항 HSV 제제의 문제점은 불완전한 치료효과와 심한 부작용, 그리고 장기간의 단일제 치료 중에 약제내성 바이러스가 나타나는 점이다(Douglas등, 1984; Straus등, 1984). 따라서 이러한 문제들을 해결하기 위해서 HSV 치료제의 개발에 집중적인 연구가 요구된다.

선진국에서는 최근 수년 전부터 최신기법을 이용하여 자연계에 존재하는 동, 식물자원이나 생약제로부터 천연화합물의 개발 및 탐색에 새로운 개념을 토대로 한 새로운 개발 전략을 추진하고 있고 미국 국립 암연구소에서 항바이러스성 Screening 에 이용된 물질의 약 47%가 천연물에서 추출되고 있는 실정이다(최, 1991). 우리나라는 우수한 생약재를 많이 보유하고 있고, 생약제에 대한 고대로부터의 한방 및 민간요법을 통해 얻은 많은 지식을 축적하고 있으므로 이제부터 시작하면 크게 뒤지지 않을 뿐만 아니라 오히려 선진국을 능가할 수도 있는 것으로 사료되며 특히 우리 한의학계에는 다양한 바이러스성 질환에 대해 수 백년

간 전해오는 특수한 처방(비방)들이 많이 있으므로 이 처방들을 현대 과학의 집약적 기술을 도입하여 잘 규명한다면 새롭고 고부가가치가 있으며 인체에는 오히려 유익하며 바이러스만 집중적으로 저해하는 새로운 항바이러스제제를 개발할 수 있을 것으로 사료되며 신비적이고 개인적인 한방 치료의 일반화와 객관화에도 크게 기여할 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 우선 우리 한방에서 사용하는 HSV 치료 관련 복합제 및 단미제를 이용하여 항 HSV효과가 있는 물질을 Screening 하여 anti-HSV drug개발의 기초를 마련하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1-1. 바이러스

본 연구에 사용된 바이러스는 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 *Herpes simplex* virus type 1 strain F(American type culture collection, ATCC VR-733, Rockville, MD)사용했다.

#### 1-2. 숙주세포와 세포배양액

본 실험에 사용된 *H. simplex* 1형에 대한 숙주세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)와 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 BHK-21 세포주(Baby hamster kidney cell, ATCC CCL10)를 사용하였고, Vero와 BHK-21의 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(EMEM)에 10% fetal calf serum(FCS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.22% sodium bicarbonate(Sigma, St Louis, MO, USA)와 1 ml당 50 µg의 gentamicin(Gibco)을 첨가하여 사용하였고 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위하여서는 2% FCS가 함유된 배지를 사용하였다.

#### 1-3. 한약재 시료

생약은 『동의보감』 및 『중의외과』, 『한방외과』, 『중의임증』을 기초로 하여 한약 도매시장에서 구입하였다. 시료는 원전의 처방대로 조제하여 탕제를 만들었으며 MeOH로 추출하거나 또는 열수 추출하였는데 MeOH로 추출한 경우에는 먼

저 시료를 Cutting mill 이용하여 약 10 mesh의 크기로 세절한 후 탕제에 500ml의 80% MeOH를 가하여 60°C 수조에서 18시간 이상 침적하여 추출하였고, 각 시료에서 추출된 MeOH 용액은 여과하여 evaporator로 농축하고 filter(pore size 0.2  $\mu\text{m}$ )로 여과 하여 lyophilization 하였다(Folch등, 1957; 이시경등, 1985). 이것을 DMSO:H<sub>2</sub>O(1:1) 혼합액에 녹여 재 filter(pore size 0.2  $\mu\text{m}$ )하여 검액으로 사용하였다. 열수 추출한 경우에는 탕제당 DW 1,000ml을 넣어 2시간 30분 중탕하여 추출하였고 추출된 용액은 여과하여 evaporator로 농축하고 lyophilization 하여 검액으로 사용하였다. 각 검체의 이름을 MeOH 추출물 No.1, No.2, No.3, .....를 각각 M-1, M-2, M-3, ..... 로 명명하고 열수추출물 No.1, No.2, No.3, .....를 각각 W-1, W-2, W-3, ..... 으로 명명하였다.

## 2. 실험방법

### 2-1. 세포배양

Vero 세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(25 cm<sup>2</sup>)에 2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum과 gentamicin(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가한 MEM을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 세포단층(monolayer)이 될때까지 배양하였다. Vero 세포를 계대배양 하기 위해서는 조직배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 배양한 세포를 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 1:3으로 분주하여 10% MEM을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 배양하였다.

### 2-2. *H. simplex* 1형 바이러스의 감염 및 증식

*H. simplex* 1형 바이러스의 stock을 얻기 위해 액체질소에 보관중인 *H. simplex* 1형 바이러스 strain F를 37°C 수조에 녹여 완전히 자란 단층 Vero 세포가 든 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 0.01~0.1 M.O.I.(multiplication of infection)되도록 감염시킨 후 37°C에서 1시간 동안 흡착시키고 2% 유지배지로 갈아준다음, 7~8일 후 -70°C에 얼린 뒤 37°C에 녹여 초음파로 파쇄함으로써 바이러스를 얻었다. 이렇게 얻은 바이러스 stock을 1 또는 2 ml씩 나누어 -70°C에 보관하고 바이러스가 필요할 때마다 37°C에서 녹여 1분 정도 초음파 처리하여 사용하였다.

*H. simplex* 1형 바이러스의 증식을 위해서는 세포단층을 이룬 조직배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 0.1~0.01 M.O.I 되게 바이러스를 감염하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 한 시간동안 흡착시켜 2% MEM 배지를 첨가한 후 3~5일 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하면서 세포변성을 도립 현미경으로 관찰하고 바이러스의 증식에 의해 세포가 완전히 플라스크로 부터 박리되어 나온 것을 확인하였다.

### 2-3. *H. simplex* 1형 바이러스의 플라크 및 클론 분리

세포단층을 이룬 플라스크(25 cm<sup>2</sup>)에 바이러스를 0.01~0.1 M.O.I되게 감염시켜 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 한시간 동안 흡착시키고 2% MEM 배지 5 ml을 첨가한 후 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 72시간 동안 배양시킨 배양액을 8,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 플라크 분리에 사용하였다. 플라크 분리방법은 Vero 세포를 60 x 15 mm 세포 배양용 dish에 2 x 10<sup>6</sup> cell/ml되게 분주하여 세포가 confluent가 될 때까지 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 완전히 물기를 제거 하였다. 원심분리하여 얻은 바이러스 상층액은 얼음위에서 10배 희석하여 각각 100 µl씩 세포가 배양된 dish에 감염시켜 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 한 시간동안 흡착시켰다. 흡착되지 않은 바이러스를 PBS로 세척한 후 5% agarose와 2% MEM을 1:4 비율로 섞은 배지를 각 dish 당 5 ml씩 넣어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 3일 동안 배양하였다. 3일 후 0.01% neutral red가 첨가된 배지 3 ml을 부어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 4 시간 동안 염색시킨 후 나타난 플라크 수를 계산하여 바이러스 titer를 결정하였다.

### 2-4. *H. simplex* 바이러스의 분리

바이러스를 분리하기 위하여 Vero 세포에 0.01~0.1 M.O.I. 되게 바이러스를 감염시켜 3~5일이 지난 후에 배양액을 모은 후 3,500 x g에서 15분간 원심분리하여 *H. simplex* 1형과 2형 바이러스의 cell-associated virus(CAV)을 얻었다. 이어서 상층액을 다시 Sorvall-28 SW(Beckman) rotor에 100,000 x g로 2시간동안 원심분리하여 cell-released virus(CRV)를 분리하여 사용하였다.

## 2-5. Vero 세포에 대한 시료의 세포독성 결정

시료에 의한 세포독성은 시료를 농도별로 5배 계단희석하여(원액,  $5^{-1}$ ,  $5^{-2}$ ,  $5^{-3}$  ……) well당  $1.0 \times 10^3$ 개의 vero 세포가 배양되어 있는 96 well plate에 각각 첨가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 보습 인큐베이터에서 3일간 배양하고 MTT assay로 50% cytotoxic dose(CD<sub>50</sub>)를 산출하여 본 실험에 사용하였다.

## 2-6. HSV 감염과 약제의 활성 평가

Vero 세포를  $1.0 \times 10^3$  cells/well로 조절하고 여기에 1666PFU/ml의 HSV를 첨가한 후 각 시료를 농도별로 5배 계단희석하였다. 이것을 96well plate에 0.1ml씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지된 37°C 보습 인큐베이터에서 3일간 배양하였다. 시료의 항 HSV 활성은 MTT assay로 평가하였고, control drug으로는 Acycloguanosin (Sigma)을 사용하였다.

## 2-7. MTT 검색법(Tetrazolium-based colorimetric assay)

MTT검색법은 생존 세포의 효소 작용에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 이로부터 한약제에 의해 세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 방법으로, 96 well plate를 이용하면 실험조작의 자동화가 가능하고 실험 결과의 재현성과 객관성도 우수하여 대량검색이나 1차검색에 적합하다.

### 2-7-1. 단일세포 부유액(single cell suspension)의 준비

부유성 세포인 경우에는 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻는다. 부착성 세포인 경우에는 trypsin을 3분간 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 배양용 배지용액(culture media, MEM에 10% FBS첨가)로 중화시킨 후 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻는다. 이 부유액을 hemocytometer로 세포밀도(number of cells/ml)를 측정한다.

### 2-7-2. 예비실험(적정 접종세포수의 결정)

본 실험에 앞서 각 세포주마다 MTT assay에 사용할 각 well의 적정 접종세포수(optimal seeding density)를 결정한다. 이 세포수는 약물 처리하지 않은 대

조균에서 세포접종 당시와 4일후 MTT 실험종료시에도 세포가 활발히 증식하면서 OD540가 충분히 높은값을 나타낼 수 있는 최적의 접종(seeding)세포수로 대개 number of cells/well로 나타낸다. 이 세포수를 결정하기 위해 한 well당 1~ $100 \times 10^3$ 개의 범위에서 몇가지 세포밀도로 96 well plate에 접종하고 약제나 검체 대신 PBS만을 가해주어 4일간 배양한 후 아래에 기술된 MTT assay의 과정을 동일하게 시행해 준다. 실험종료시 흡광도(OD540)를 측정하여 가장 적당한 세포밀도를 결정한 후 이후의 실험에 이용한다.

#### 2-7-3. 세포 접종, 검체 투여 및 배양

예비실험에서 결정된 적정 수의 세포를  $180\mu\text{l}$ 의 배지에 부유시켜 96 well plate의 각 well에 동일하게 접종한다. 한약추출물이나 분획의 용액을 HSV를 포함하고 있는 2% FBS 배지에 섞어 6배 계단희석하여  $20\mu\text{l}$ 씩 well에 첨가한다. 투여가 끝난 plate는  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  하에서 4일간 배양한다.

#### 2-7-4. 생존 세포수의 측정

4일 후 plate의 각 well에  $0.1\text{mg}(50\mu\text{l of } 2\text{mg/ml})$ 의 MTT를 가해주고 다시  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 한다. 배양 종료시 각 well에  $100\mu\text{l}$ 의 solubilization solution(SDS, 10% in HCl,  $0.01\text{mol/l}$ )을 첨가하여 기형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인 후에 ELISA plate reader(Molecular devices)로 흡광도(test wavelength 540nm, reference wavelength 690nm)를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 생존세포수를 의미 한다.

시료의 항HSV활성평가는 HSV에 감염된 세포군 및 비감염 대조 세포군의 흡광도를 기준으로 억제 정도를 측정한 후 결정하였다.

#### 2-7-5. 결과 분석

시험군에서 각 well로부터 한 컬럼의 평균 OD540값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율을 산출한다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다.  $\text{ED}_{50}$ 과  $\text{CD}_{50}$ , SI 값을 항바이러스효과의 지표로 사용한다.

### Ⅲ. 실험결과

#### 1. 시료의 Vero 세포에 대한 세포독성 시험

시료의 Vero 세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 시료를 농도별로 Vero 세포( $1.0 \times 10^3$  cells/well)에 첨가한 후 37°C, 5% 보습 인큐베이터에서 날짜별로 현미경으로 관찰하였고, 배양 3일후에 MTT assay로 살아 있는 세포에 의한 formazan 생성율을 측정하여 시료의 세포독성 시험결과를 비교하였다.

Table 1에 나타낸 바와 같이 MeOH추출시료 No.3, No.4, No.6, No.11(M-3, M-4, M-6, M-11) 과 열수추출 시료 No.8, No.11(W-8, W-11)에서 Vero 세포에 대한 세포독성도 가장 적을 뿐만 아니라 Vero 세포 증식을 증진시키는 효과가 있는 것으로 나타났고 나머지 시료에서는 모두 비교적 강한 세포 독성을 나타내었다. 특히 MeOH 추출시료 No.4는  $0.01 \mu\text{g/ml}$ 에서 formazan 생성이 1.1배 증가하였으며, No.6는 0.1과  $0.01 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 1.1배, No.11의  $0.01 \mu\text{g/ml}$ 에서 1.1배 formazan 생성율이 증가하였다. 열수추출시료 No.8의  $1 \mu\text{g/ml}$ 에서는 1.4배 살아있는 세포수가 증가하였고, No.11의  $1 \mu\text{g/ml}$  과  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 에서는 각각 1.13배, 1.15배 증가하였다.

Table 1. Viability test of Vero cells on natural product by MTT assay

|           | viability(%)                       |       |       |       |       |
|-----------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           | 50                                 | 10    | 1     | 0.1   | 0.01  |
|           | Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |       |
| MeOH 추출   |                                    |       |       |       |       |
| No. 3     | 15.6                               | 14.6  | 35.4  | 73.1  | 94.0  |
| No. 4     | 37.2                               | 89.6  | 83.1  | 85.1  | 107.6 |
| No. 6     | 20.2                               | 60.4  | 103.1 | 107.2 | 108.2 |
| No. 11    | 5.5                                | 24.5  | 63.4  | 89.1  | 107.0 |
| 열수추출      |                                    |       |       |       |       |
| No. 8     | 38.7                               | 124.0 | 140.4 | 125.0 | 98.5  |
| No. 11    | 31.8                               | 94.4  | 113.0 | 114.9 | 99.5  |
| (control) |                                    |       |       |       |       |
| acyclovir | 64.3                               | 83.4  | 95.0  | 95.5  | 97.8  |



## 2. 천연물의 항 HSV 활성

각 시료의 항 HSV활성을 MTT assay로 검색하였다. 검색시료는 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 총 13종의 탕제에 대하여 methanol 또는 열수 추출하였다.

각 탕제의 항 HSV 활성검색을 한 결과 MeOH 추출시료 No.3, No.4, No.6, No.11(M-3, M-4, M-6, M-11)과 열수추출시료 No.8, No.11(W-8, W-11)에서 ED<sub>50</sub> 이상의 활성을 나타내었다. Table 2에서 보는바와 같이 MeOH 추출시료 No.4, No.6, No.11은 control drug인 Acyclovir에 비해 높은 SI값을 나타내었고 특히 No.4는 현저히 증가된 SI값을 나타내었으며 항 HSV활성도 ED<sub>90</sub> 이상의 효과를 보여 이 물질이 항 HSV 활성을 강하게 나타냄을 알 수 있었다. 열수추출물 No.8, No.11도 유의성 있는 결과를 나타내 더욱 연구를 진행해야할 것으로 보이며 앞으로의 plaque reduction assay 실험에서 이들의 정확한 활성을 평가하고자 한다. MeOH 추출시료 No.3, No.4, No.6, No.11 과 열수추출시료 No.8, No.11의 세포독성 및 항 HSV활성 그래프를 Figure 1-7에 나타내었다.

Table 2. Inhibitory effects of natural products against HSV type 1

| No. of specimens | anti- HSV-1 activity     |                          |             |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
|                  | ED <sub>50</sub> (μg/ml) | CD <sub>50</sub> (μg/ml) | SI          |
| MeOH추출           |                          |                          |             |
| No. 3            | 0.00189                  | 0.612                    | 323.809     |
| No. 4            | 0.000462                 | 37.298                   | 80731.601   |
| No. 6            | 0.0048                   | 13.493                   | 2811.041    |
| No. 11           | 0.00256                  | 1.813                    | 708.20      |
| 열수추출             |                          |                          |             |
| No. 8            | 2.495                    | 41.065                   | 16.458      |
| No. 11           | 0.530                    | 32.011                   | 60.398      |
| (control)        |                          |                          |             |
| acyclovir        | 0.000347                 | 174.61                   | 503,198.847 |

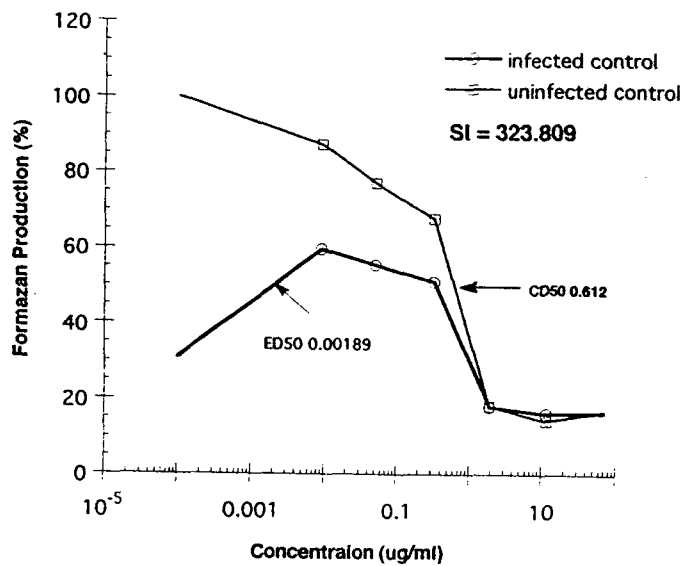


Fig. 1. Quantitation MTT formazan production M-3 treated cultures of vero cells.

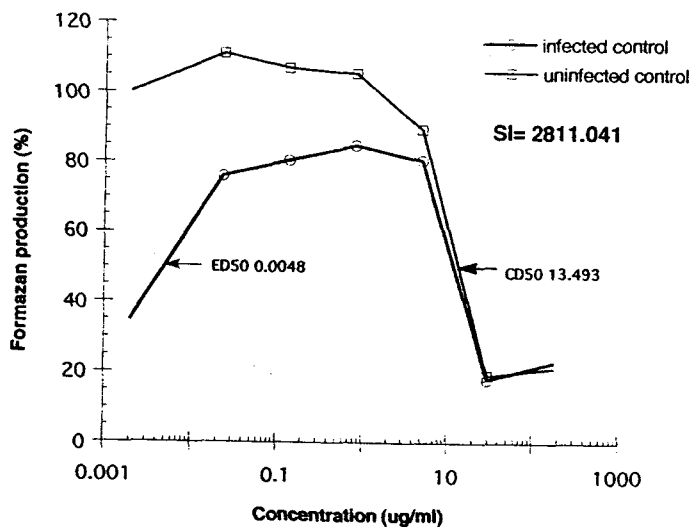


Fig. 2. Quantitation MTT formazan production M-6 treated cultures of vero cells.

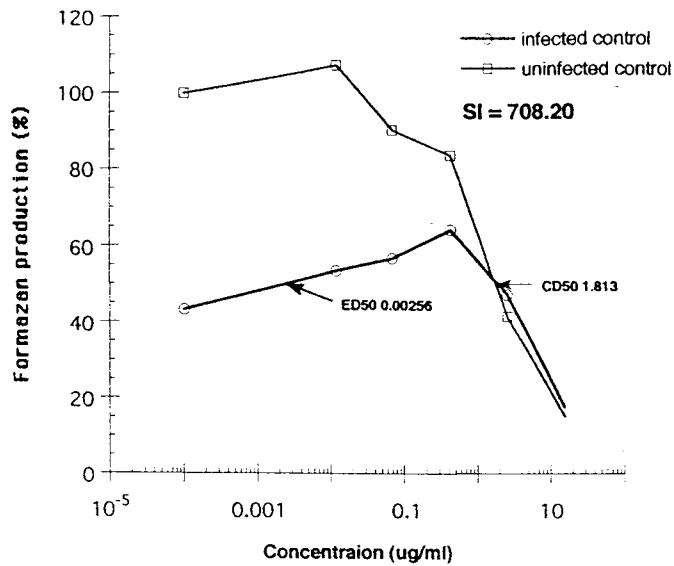


Fig. 3. Quantitation MTT formazan production M-11 treated cultures of vero cells.

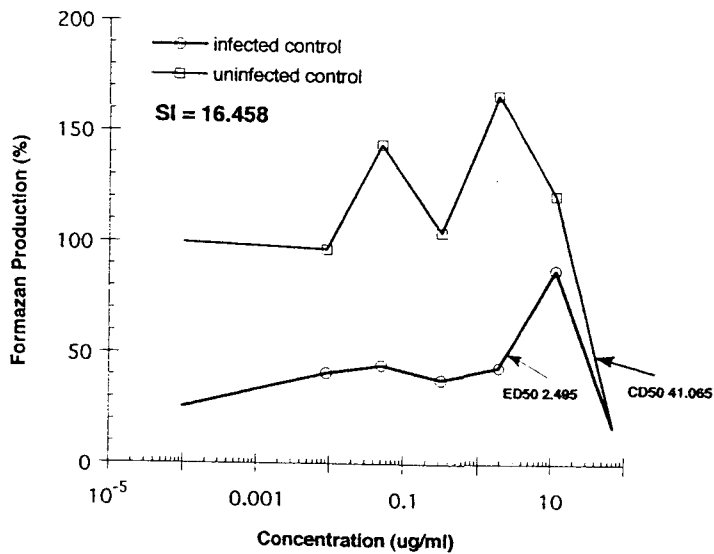


Fig. 4. Quantitation of MTT formazan production W-8 treated cultures of vero cells.

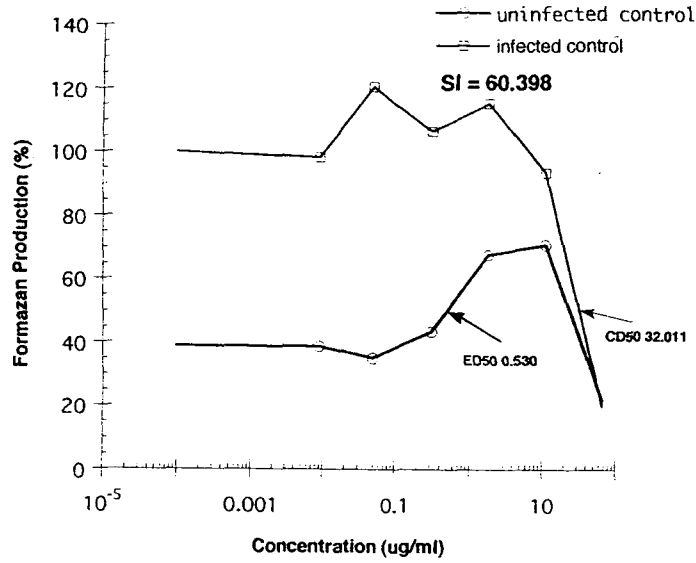


Fig. 5. Quantitation of MTT formazan production W-11 treated cultures of vero cells.

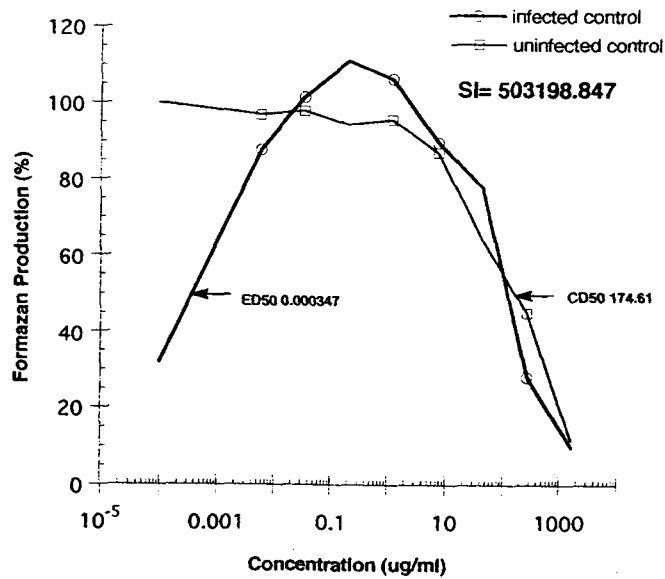


Fig. 6. Quantitation of MTT formazan production acyclovir treated cultures of vero cells.

## 참 고 문 헌

1. Darby, G., Field, H. J., and Salisbury, S. A. 1981. Altered substrates specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir resistance. *Nature* 289:81-83.
2. De Clercq, E. 1990. New acquisition in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52:69-99.
3. Douglas, J. M., Critchlow, C., and Bennedetti, J. 1984. A double-blind study of oral acyclovir for suppression of genital herpes simplex virus infection. *New England Journal of Medicine* 52: 154- 163.
4. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. A. 1957. *J. Biol. Chem.* 226, 497.
5. Hewitt, R. G., and Morse, G. D. 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and zidovudine in the treatment of neutropenia and human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy* 12(6):455-461.
6. Hill, T. J. 1985. Herpes simplex virus latency. In: *The Herpesviruses*, Vol. 3, B. Roizman, pp. 175-240. *New York : Plenum Press.*
7. Nelson, J. A., Ghazal, P., and Wiley, C. A. 1990. Role of opportunistic viral infections in AIDS. *ADIS* 4:1-10.
8. Novel sensitivity of acyclovir-resistant varicella-zoster to anti-herpetic drugs. *Antiviral Chem Chemother* 1:373-375.
9. Shiraki, K., Namazue, J., Okuno, T., Yamanishi, K., and Takahashi, M. 1990.
10. Straus, S. E., Rakiff, H. E., and Seidlin, M. 1984. Suppression of frequently recurring genital herpes: a placebo-controlled, double blind trial of oral acyclovir. *New England Journal of Medicine* 310:1545.
11. Prusoff, W. H., Lin, T-S., and Zucker, M. 1986. Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Research* 6:311-328.

- 
12. 이시경, 주현규. 1985. 인삼 Saponin이 *Rhodotorula glutinis*의 지방산 조성  
에 미치는 영향. 한국산업미생물학회지. 13(2):109-114
  13. 최옥자. 식물의 진화와 성분. 과학 백과사전 출판사 편. 약초의 성분과 이용.  
일월서각. 1991:pp20-26