

Human Immunodeficiency Virus Type I 에 대한 龍葵 추출물의 억제활성

유 영 범
한국한의학연구원

Abstract

The Extracts of *Solanum nigrum* L. for Inhibitory Effects on HIV-1 and Its Essential Enzymes

Yu Youngbeob
Korea Institute of Oriental Medicine

For the purpose of developing new anti-HIV agents from natural sources, the extracts of *Solanum nigrum* L. were tested for their inhibitory effects on HIV-1 replication and its essential enzymes as the reverse transcriptase (RT), protease and α -glucosidase.

In the assay of HIV-1-infected human T-cell line, water extracts inhibited the HIV-1-induced cytopathic effects with IC (inhibitory concentration) of 100 ug/ml. Moreover water extracts (100ug/ml) of aerial parts showed strong activity of 32.6% on anti-HIV-1 PR using the activity of the enzyme to cleave an oligopeptide. In the HIV-1 reverse transcriptase inhibition assay, aqueous extract a inhibited 17.4%, but no glucosidase inhibitory activities.

We found out this result, for these samples it is possible that the inhibition of the viral replication in vitro is due to the inhibition at least one of PR and RT. It would be of great interest to identify the compounds which are responsible for this inhibition, since all therapeutically useful agent up to date are PR, RT and α -glucosidase inhibitors.

Key words : *Solanum nigrum* L., anti HIV-1, reversetranscriptase, protease, α -glucosidase

I. 서론

천연물을 대상으로 한 에이즈 치료제 연구가 광범위하게 이루어지고 있다.¹⁻⁵⁾ 본 연구에서는 에이즈의 원인 바이러스인 HIV-1의 주요 효소와 그 바이러스를 대상으로 용규 추출물의 억제효과를 살펴보고 있으며 유의적 활성이 관찰되어 보고하고자 한다.

용규(龍葵, *Solanum nigri* Herba)는 가지과 Solanaceae에 속하는 까마중(*Solanum nigrum* Linne)전초로 우리나라 각처의 밭이나 길가에 흔히 나는 1년초이다. 키는 20-90cm이며 가지가 옆으로 많이 퍼지고, 원줄기에는 약간의 능선이 나타난다. 잎은 호생, 난형 또는 타원형, 길이 6-10cm, 폭 4-6cm이며 가장자리는 밋밋하거나 물결모양의 톱니가 있다. 꽃은 취산화서가 산형으로 3-8송이씩 달리고, 흰색, 지름 6-7mm, 꽃받침은 5갈래, 1개의 암술과 5개의 수술이 있다. 열매는 장과로 둥근 모양이며 검게 익고, 지름은 약 6mm, 단맛이 있으나 약간 독성이 있다⁶⁾. 性은 寒하고 味는 苦□微甘하며 효능주치는 淸熱解毒, 散結, 利尿, 消炎, 血糖低下, 鎮咳, 祛痰, 血液凝固阻止한다.⁷⁾ 함유성분으로는 Solanine, olasonine, Solamargin, Diosgenin, Tigogenin, Vitamin A□C. Steroidal oligoglycosides인 nigrumnin I, nigrumnin II 등이 알려져 있으며,⁸⁾ 용규의 약리활성으로는 간보호작용,⁹⁾ 신장세포보호작용,¹⁰⁾ 중추신경계진정,¹¹⁾ 항위궤양작용,¹²⁾ 항 당뇨작용, 혈압강화작용, 항염증작용 등이 보고되어 있으나, 용규의 HIV 억제활성에 관한 보고는 발견되지 않았다.

본 연구에서는 용규 지상부의 물 및 메탄올 엑스를 이용하여 HIV-1 기원의 효소인 reverse transcriptase 억제활성을 ELOSA(Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay) 방법으로 실험하였고, HIV-1 protease 억제활성을 기질 분해를 HPLC로 검출하는 방법으로, 그리고 α -glucosidase의 억제활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside의 분해를 spectrophotometer로 각각

측정하였다. 식물엑스의 항 HIV-1 복제억제활성은 MT-4 세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성억제를 광학현미경으로 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

1. 식물재료

시료로 사용한 용규는 전남 순천시 난봉산에서 채취한 후, 순천대학교 한약자원학과에서 동정한 후 통풍이 잘되는 곳에서 음건 세절하여 추출용 시료로 사용하였다 (Table I).

2. 시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였다. Microplate washer는 Immunowash model 1250(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo, Japan)을, microplate reader는 Biorad 3550-UV(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo, Japan)를, HPLC는 System controller: Shimadzu SCL-6B, Pump: Shimadzu LC-9A, Detector: Shimadzu SPD-6A(UV spectrophotometric detector), Recorder & integrator: Shimadzu C-R6A Chromatopac.을 각각 이용하였다.

3. 시료의 추출

시료 5 g을 각각 물(100 ml) 또는 메탄올(100 ml)로 3시간씩 열수 추출한 후 감압농축하여 메탄올의 최종농도가 2%가 넘지 않게 동결건조하여 활성실험의 재료로 사용하였다. 시료는 활성실험시에 멸균된 증류수나 DMSO에 100 μ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

4. HIV-1 reverse transcriptase 활성 억제

Reverse transcriptase(RT) 억제활성 실험은 Dupont 사로부터 구입한 RT-Detect™ kit NEK-070A (Dupont medical products, Boston, MA, USA)를 이용한 ELOSA 방법으로 4℃ 이하에서 저장하면서 assay 조건을 설정하였다. 효소는 유전자 재조합에 의해 생산된 HIV-1 RT (10 U/μl, 100 mM potassium phosphate, pH 7.1, 1 mM dithiothreitol, 50% glycerol)를 효소완충액[100mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM KCl, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 0.3% (v/v) Triton X-100, and 10% (v/v) glycerol]에 0.005 U/μl로 희석하여 사용하였고 반응혼합물(reaction mixture)은 primer가 부착된 RNA template와 triphosphate-DNA nucleosides를 반응혼합물 완충액(reaction buffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM MgCl₂)에 희석하여 사용하였다. 역전사 효소의 활성억제는 10 μl 반응혼합물 완충액, 20 μl 반응혼합물, 4 μl 식물추출물, 5.2 μl 효소완충액을 500 μl test tube (ependorf)에 넣고 37℃에서 4분간 예비배양한 후 효소 0.8 μl를 가해 37℃에서 1시간동안 역전사시키고 90℃에서 1분간 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 RNA template를 알카리용액(5.62% potassium hydroxide, 94.38% water) 으로 37℃ 에서 15분간 가수분해한 후, 완충액 (13.6% sodium phosphate, monobasic monohydrate, 86.4% water)으로 중화하였다. ELOSA 반응을 위해 중화시킨 반응액 50 μl를 streptavidin-coated microplate well에 옮기고, horseradish peroxidase(HRP)-labeled detector probe 와 biotin-labeled capture probe를 포함하는 ELOSA 용액 50 μl 첨가하여 37℃에서 2시간동안 배양하였다¹³⁾. 반응을 마치고 microplate well에 남은 시약이나 가수분해된 RNA를 제거하기 위해 세척액(2-chloroacetamide 용액 20X)을 D.W로 희석

하여 3회 세척하였다. 세척한 microplate에 형광검출액(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate 용액) 100 μl를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 정지액(2.2% citric acid, 1.5% HCl, 1.5% sulfuric acid and 94.8% water) 100 μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

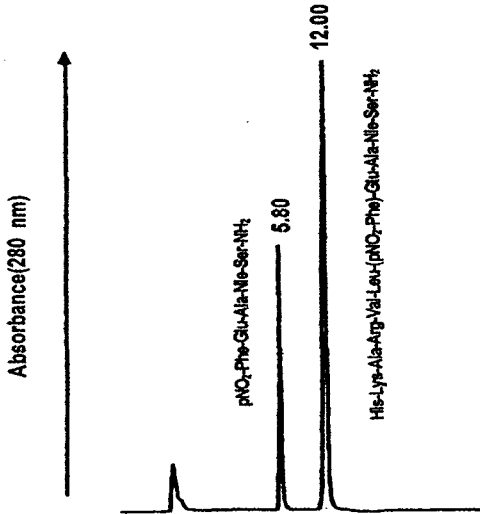
$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}})}{\text{Activity}_{\text{control}}} \times 100$$

5. HIV-1 protease 활성 억제

유전자 재조합으로 생산된 HIV-1 protease에 의해 기질의 cleavage를 HPLC로 측정하였고 효소원은 Kusumoto 등의 방법⁵⁾에 의해 준비하였다. 즉 HIV-1 protease (PR)의 DNA를 나타내는 JM 105 *Escherichia coli* 에서 생산된 HIV-1 protease를 {[50 mM NaOAc(pH 5.0), 1 mM EDTA-2Na, 2mM 2-Mercaptoethanol]:Glycerol}=75:25 용액에 희석하여 사용하였고, 기질은 oligopeptide{His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-(pNO₂-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂ (M.W. 1315)}를 (주) 단백질 연구소(Osaka, Japan)로부터 구입하여 완충액 (50 mM NaOAc, pH 5.0)에 2 mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항 HIV-1 protease 반응은 완충액 1 μl, 기질 1.0 μl, 식물추출물 1 μl, 효소용액 2 μl을 각각 가하여 전량 5 μl의 반응혼합물을 조제하고 37℃에서 1시간 반응시킨 후 90℃에서 60초간 가열하여 효소 반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 증류수 35 μl로 희석한 후 HPLC 분석을 행하였으며 HPLC 분석 조건으로 column은 LiChrospher 100 RP-18 (column size, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, FRG)을, 용매는 0.1% TFA와 acetonitrile(20%-50% gradient)로 하였으며, 유속은 1.0 ml/min로 하면서 UV 280 nm

에서 분석하였다(Fig. 1).

Fig. 1. HPLC profile of the reaction mixture of HIV-1 protease. The substrate and its hydrolysate were detected 280nm and their retention times were 12.00 and 5.80 min. respectively.



6. α -glucosidase 억제 활성

α -glucosidase에 의해 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside의 cleavage를 spectrophotometer로 측정하는 방법을 이용하였다. 실험에 사용한 효소원은 *Saccharomyces sp.*에서 얻은 α -glucosidase(Toyobo Company, Osaka, Japan)를 완충액(10mM sodium phosphate, pH 7.0, 20% glycerol)에 0.5U/ml가 되도록 하여 사용하였으며, 기질은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan)를 멸균 증류수에 10mM이 되도록 하여 사용하였다. 항 α -glucosidase 반응액의 조성은 50 μ l 완충액(100 mM Sodium phosphate, pH 7.0), 100 μ l 기질용액과 20 μ l 식물추출물로 하고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비배양한 후 30 μ l 효소를 첨가하

여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 그리고 140 μ l 정지액(0.2 M sodium carbonate)으로 반응을 정지시킨 후 microplate well에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}})}{\text{Activity}_{\text{control}}} \times 100$$

7. HIV-1 복제 억제

HIV-1 복제억제활성 실험은 Otake 등의 방법¹⁴⁾에 의해 수행하여 졌다. 실험에 사용된 세포는 HTLV-1에 감염된 MT-4 cell line으로 penicillin G 100 U/ml(Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)와 streptomycin 100 μ g/ml(Meiji Seika, Tokyo, Japan) 그리고 10% fetal calf serum(FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia)이 제공되는 RPMI-1640배지(Flow Laboratories, Irvine, Scotland)에 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 실험에 사용하였다. 바이러스는 MOLT-4/HTLV-3 III_B 세포로부터 얻은 HIV-1 (strain HTLV-3 III_B)을 이용하였다. 항 HIV-1 활성은 MT-4 세포를 50%-tissue culture infective dose(TCID₅₀)에서 1시간 동안 HIV-1(HTLV-3 III_B)에 감염시켰다. 그리고 RPMI-1640배지에서 1×10^5 cells/ml로 재현탁시키고 현탁된 세포를 200 μ l/well 씩 96-well culture plate에 식물엑스와 함께 처리하고 5일간 배양하였다. 식물엑스의 MT-4세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성(CPE, cytopathic effect)을 완전히 억제하는 농도(IC, inhibitory concentration)을 광학현미경으로 관찰하였으며 세포독성(CC, cytotoxic concentration)은 MT-4 세포의 생존력 감소로 측정하였다. 대조군은 HIV-1에 감염시킨 세포와 시키지 않은 세포에 식물엑스를 넣지 않고 측정하였다. 양성대조군은 AZT와 DS8000을 각각 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

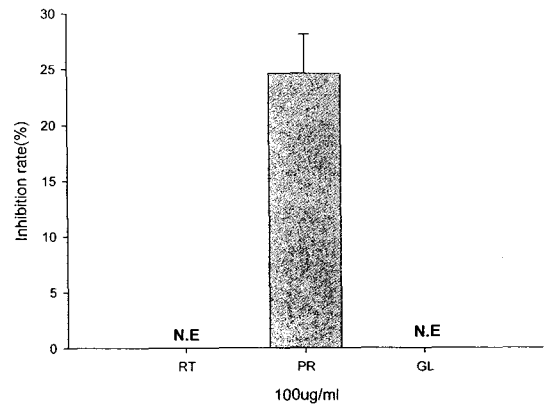
에이즈(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)의 병인학적 원인인 HIV-1(human immunodeficiency virus type I)은 RNA를 유전적 모태로 하는 레트로바이러스이다.^{15,16)} HIV-1은 RNA를 숙주 세포에 삽입하고 reverse transcriptase (RT)¹⁷⁾에 의해 viral DNA로 전사되어 host chromosome에 proviral DNA 형태로 존재한다. 숙주세포에서 잠복기를 거쳐 protease(PR),¹⁸⁾ glucosidase (GL)등의 작용으로^{19,20)} mature virion으로 budding된다. 이렇듯 virus가 복제하는 과정에서 host cell을 파괴하므로써 인간의 면역기전에 심각한 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 천연물을 이용한 AIDS 치료약물 개발이 활성화되고 있으며 gossypol과 그 합성 유도체,²⁾ 해양 천연 알카로이드인 pyrido[4,3,2-mn]thiazolo [5,4-b]acridine,³⁾ tannin,⁴⁾ flavonoid 등의 항 HIV-1 억제활성이 보고되었고, 또한 천연물엑스의 광범위한 screening이⁵⁾ 행해지고 있는 실정이다.

용규 추출물의 HIV-1 억제활성을 검색한 결과 용규 지상부의 물추출물은 역전사 효소와 유전자 재조합을 이용한 HIV-1 protease 억제 활성에서

100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 17.4%, 32.6%의 효소 억제 활성을 나타내었으나 글루코시다제 억제활성에서는 그 효과가 나타나지 않았다(Fig. 2).

그리고 용규 MeOH 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 역전사 효소와 글루코시다제에서는 그 효과가 미미하며, 유전자 재조합을 이용한 HIV-1 protease에서 24.6%로 유의적 활성이 나타났다(Fig. 3).

Fig. 3. Inhibition rates of methanol extracts of Solani nigri Herba on HIV-1 reverse transcriptase(RT), HIV-1 protease(PR) and α -glucosidase(GL)



용규 추출물의 HIV-1 바이러스 증식(복제)억제 실험에서는 물추출물이 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 바이러스 증식을 완전히 억제하는 것으로 나타났으며 세포독성을 거의 일으키지 않음을 알 수 있었다(Table 1).

Fig. 2. Inhibition rates of water extracts of Solani nigri Herba on HIV-1 reverse transcriptase(RT), HIV-1 protease(PR) and α -glucosidase(GL)

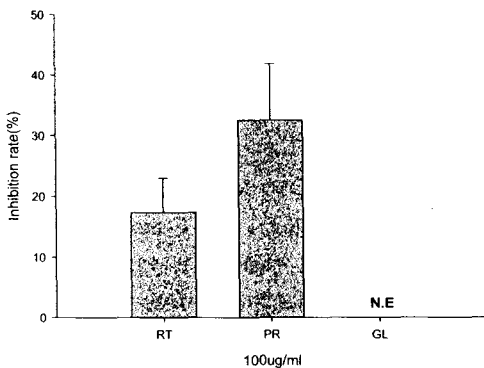


Table 1. Inhibitory effects of extracts of *Solanum nigrum* L. against HIV-1 viral replication

Sample No.	Botanical Name	Used Parts	Extracts	IC(μ g/ml)	CC(μ g/ml)
1	<i>Solanum nigrum</i> L.	aerial part	Water	100	>100
2	<i>Solanum nigrum</i> L.	aerial part	Methanol	NE	>100
Positive	AZT			0.00195	>1
control	DS8000			0.97	>1000

Water extracts are dissolved in distilled water, methanol extracts are dissolved in DMSO or 10% DMSO in water.

IC, the minimum concentration for complete inhibition of HIV-1 induced CPE(cytopathic effect) in MT-4 cells by microscopic observation.

CC, the minimum concentration for appearance of MT-4 cell toxicity by microscopic observation.

NE, not effective 200

이상의 결과로 보아 용규의 물추출물이 항 프로테아제 활성을 가짐과 동시에 바이러스의 복제억제에도 크게 기여하는 것을 알 수 있었으며 이는 용규의 HIV-1 복제 억제활성이 프로테아제 억제와 상관관계가 있는 것으로 추정된다. 또한 메탄올추출물은 유전자 재조합 HIV-1 protease 억제활성에서 활성을 나타냄으로써 바이러스 복제억제에 일부 기여하는 것으로 추정된다. 반면 물과 메탄올 추출물 모두 글루코시다제 억제활성에서는 유의한 활성을 보이지 않았다. 물추출물에서 효소억제나 바이러스 복제억제에 높은 활성을 나타내는 것은 식물 중 고분자 활성 물질인 tannin, polysaccharide, protein 등이 물추출물에 다량 함유되어 있어 효소결합능력이 탁월하고, 바이러스 표면의 당단백에 결합이 용이하므

로 강한 활성을 보이는 것으로 추정된다.^{6,21,22)} 또한 용규엑스의 활성요인은 다양한 복합분자들이 분포되어 있어 효소 억제 작용, virus-cell 융합 억제^{23),24)}, 감염된 세포로부터 virus분자의 방출억제²⁵⁾ 등에도 관여하는 것으로 생각되어 진다. 용규 추출물의 HIV-1활성에 관여하는 화합물 탐색을 위하여 active guided fractionation을 실시하고 있으며, 향후 NMR 등 분광학적 방법을 통해 활성화합물의 구조를 동정할 것이다.

검색어 : 용규, 까마중, 에이즈, 역전사효소, HIV-1 바이러스

참고 문헌

1. Yang, S. S., Cragg, G. M., Newman, D. J., Bader, J. P. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(2): 265-277.
2. 유행병, 박종철, 이종호, 김경업, 조성기, 변명우, Hirotsu Miyashiro, Masao Hattori. Human Immunodeficiency Virus Type I 에 대한 수종 식물 추출물의 억제활성 검색. *생약학회지*. 1998; 29(4): 338-346.
3. Taraporewala, I.B., Cessac, J.W., Chanh, T.C., Delgado, A.V. and Schinazi, R.F. HIV-1 neutralization and tumor cell proliferation inhibition in vitro by simplified analogues of pyrido[4,3,2-mn]thiazolo [5,4-b]acridine marine alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992;35(15): 2744-2752.

4. Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tanuma, S., Hatano, T., Yoshida, T. and Okuda, T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 1992;18: 91-103.
5. Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba T. and Shimotohno, K. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Research*. 1995;9: 180-184.
6. 이창복. 「대한식물도감」. 서울: 향문사. 1993:665.
7. 국가중의약관리국<중화본초>편위원회. 「중화본초」. 상해: 상해과학기술출판사. 1999:7-309.
8. Ikeda T, Tsumagari H, Nohara T., Steroidal oligoglycosides from *Solanum nigrum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2000 Jul;48(7):1062-4.
9. Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, Rajkapoor B, Jayakar B, Manian S. Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* LINN against CC14-induced hepatic damage in rats. *Biol Pharm Bull*. 2003 Nov;26(11):1618-9.
10. Cytoprotective role of *Solanum nigrum* against gentamicin-induced kidney cell (Vero cells) damage in vitro. *Fitoterapia*. 2001 Jun;72(5):481-6.
11. Perez RM, Perez JA, Garcia LM, Sossa H., Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. *J Ethnopharmacol*. 1998 Aug;62(1):43-8.
12. Akhtar MS, Munir M., Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats., *J Ethnopharmacol*. 1989 Nov;27(1-2):163-76.
13. Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. and Salemme, F.R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*. 1989;243: 85-88.
14. Otake, T., Mori, H., Morimoto, M., Ueba, N. and Kusumoto, I.T. Anti-human immunodeficiency virus activity of some tropical medicinal plants. *J. Traditional Medicines*. 1994;11: 188-193.
15. Kaminchik, J., Margalit R., Yaish S., Drummer H., Amit B., Saver N., Gorecki M. and Panet A. Cellular distribution of HIV type I nef protein: Identification of domains in nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *Aids Research and Human Retroviruses*. 1994;10: 1003-1010.
16. Peliska, J.A. and Benkovic, S. J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1992;258: 1112-1118.
17. Prasad, V.R. and Goff, S.P. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86: 3104-3108.
18. Katz, R.A. and Skalka, A.M. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem*. 1994;63: 133-173.
19. Taylor, D.L., Kang, M.S., Brennan, T.M., Bridges, C.G., Sunkara, P.S. and Tyms, A.S. Inhibition of alpha-glucosidase I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T cells. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1994;38 (8): 1780-1787.
20. Mohan, P. Anti-AIDS drug development: challenges and strategies. *Pharmaceutical Research*. 1992;9 (6): 703-714.
21. Kakiuchi, N., Hattori, M. and Namba T. Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *Journal of Natural Products*. 1985;48 (4): 614-621.
22. Batinic, D. and Robey, R.A. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267: 6664-6671.
23. Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W. and De clercq, E. The mannose-specific plants lectins from *Cymidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the

- (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res.* 1992;18: 191-207.
24. Mayaux, J.F., Bousseau, A., Pauwels, R., Huet, T., Henin, Y., Dereu, N., Evers, M., Soler, F., Poujade, C., De Clercq, E. and Le Pecq J.B. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91: 3564-3568.
25. Rossmann, M.G. Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85: 4625-4627.