

대추나무 껍질 유래 Betulinic acid의 in vitro rotavirus 감염억제 효과

이경호*, 이기형¹, 조좌형²

코오롱 생명과학(주), 국립공주대학교¹, 전북대학교²

Effect of Betulinic Acid Isolated from *Ziziphus jujuba* Lam on Infection of Rotavirus in MA-104 Cell

Keyong Ho Lee*, Ki Hyeong Rhee¹, and Choa Hyung Cho²

Kolon Life Science, Yongin-city, 446-797 Korea

¹College of Industrial Science, Kongju National University, 340-702 Yesan, Korea

²College of Environmental & Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 570-752 Korea

Abstract – This study was conducted to evaluate the inhibitory effects of betulinic acid isolated from *Ziziphus jujuba* on various human rotavirus, such as KU, S2 and YO. The results obtained are summarized as follows: At the concentration of betulinic acid 0.1/2%, all human rotavirus showed a maximum effect on their growth even though it's evaluated on the in vitro test. The each inhibitory rate of MA-104 cells infected by human rotavirus KU, S2 and YO was 62.1%, 59.7% and 65.2%, respectively, at the concentration of 0.1/2%. The anti-virus activity of betulinic acid was showed as the dose-dependent manner at the used dosages except at the dose of 0.1%.

Key words – *Ziziphus jujuba*, Betulinic acid, Rotavirus

대추나무는 (*Ziziphus jujuba* var. *inermis*) 줄기에 가시가 있으나 오래되면 없어진다. 잎은 어긋나고 밑이 약간 넓은 난형이며, 3개의 잎맥이 뚜렷이 보인다. 잎 윗면은 연한 초록색으로 약간 광택이 나며 잎가장자리에는 잔 톱니들이 있다. 잎자루에 가시로 된 턱잎이 있고 꽃은 연한 초록색이며 여름에 잎겨드랑이에서 조그만 취산(聚)꽃차례를 이루어 핀다. 꽃잎, 꽃받침잎, 수술은 각각 5개이며 암술은 1개이다. 열매인 대추는 길이가 2.5~3.5 cm 정도 되는 타원형 핵과(核果)로, 9~10월에 푸른색을 띤 붉은색으로 익는데 겉껍질은 가죽질이며 과육은 솜을 단단히 눌러놓은 것 같고 그 안에 씨가 들어 있다. 일반적으로 betulinic acid는 나무에 비교적 널리 존재하고 있는 성분으로 이 물질자체는 오래 전부터 알려져 오고 있다. 그러나 90년대 중반 들어 여러 가지 천연 물질에 대한 생리활성 연구가 체계적으로 진행되면서 그 효과가 세계적으로 인정되고 있는 물질이다.

지금까지 알려진 betulinic acid의 생리활성효과는 대표적으로 항암효과이다. betulinic acid의 암세포에 대한 작용기전

(mechanism)은 apoptosis (programmed cell death)이며¹⁻⁴), 비교적 일반적인 세포에 대하여 독성이 적으며 암세포에 특이적으로 작용하는 것으로 보고되었다. 실질적으로 betulinic acid은 암치료에 대한 화학요법제인 camptothecin, ellipticine, methramycin A, etoposide, vinblastine, 그리고 vincristine등과 비교해서 보다 특이적으로 암세포에 작용하는 한다고 한다⁴).

Betulinic acid은 또한 syncytia (cellular aggregates)의 형성을 방지하게 함으로서, AIDS을 유발시키는 HIV-1 바이러스감염의 진행과정을 저지하는 항바이러스효과도 가지고 있다⁵⁻⁷). Betulinic acid의 이와같은 항암, 항바이러스효과 뿐만 아니라, *Staphylococcus aureus* 와 *Escherichia coli*의 성장을 억제하는 항박테리아 효과도 가지고 있는 물질이다⁸). 일반적으로 대추나무의 열매는 한약재로 많이 이용되고 있으나, 껍질의 경우는 거의 사용례가 드물다. 따라서 본 연구에서는 대추나무의 추출성분에 대한 연구를 통하여 본 수종의 MeOH 추출물이 항바이러스 효과를 나타냄을 확인하였고, 그 대표 성분으로 betulinic acid가 동정되었다. Betulinic acid을 이용하여 유아 설사를 유발하는 human rotavirus(KU, S2 및 K-21)에 대한 저해 효과를 규명함으로써, 이 성분을 이용한 의약 및 동물약품으로 rotavirus 억제

*교신저자(E-mail):keyho625@hotmail.com
(FAX):031-280-8760

제의 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

재료 - 대추나무 껍질은 대구시 동구지역의 농장에서 채취하였고, 채취한 껍질은 건조하여 잘게 썬 후, 분쇄하여 100 mesh 정도의 분말로 하였다.

추출 및 분리 - 대추나무 껍질 분말 1 kg을 10 L의 toluene으로 약 90°C에서 12시간 교반 추출한 후, 24시간 동안 냉장온도에서 정치시켜 침전을 얻었다. 침전물을 hot methanol에 녹인 후, 활성탄과 섞어 celite bed로 여과, 건조하여 crude betulinic acid(약 70 g)를 얻었다. Crude betulinic acid로부터 순수한 betulinic acid는 1차로 silica gel column chromatography(이동상 hexane:ethyl acetate=10:1~0:1)과 2차로 Sephadex LH-20 chromatography (이동상 Methylene chloride:methanol=1:1)로 분획하여 백색분말의 betulinic acid 41 g을 얻었다.

Betulinic acid - $C_{30}H_{48}O_3$, mp 282°C; EI-MS m/z (rel. int.): 456 (M^+ , 30), 438(12), 411(6), 248(45), 228(57), 207(66), 203(36), 189(100); 1H -NMR (500MHz, C_5D_5N) δ : 4.94(1H, d, J=2.0Hz), 4.77(1H, s), 3.55(1H, m, H-3), 1.80, 1.23, 1.08, 1.06, 1.02 및 0.84(each 3H, s, $6 \times CH_3$); ^{13}C -NMR (125MHz, C_5D_5N) δ : 15.6(C-27), 17.1(C-24), 17.2(C-25), 16.1(C-26), 18.3(C-6), 19.4(C-30), 20.8(C-11), 25.5(C-12), 27.4(C-2), 27.8(C-23), 29.7(C-21), 30.6(C-15), 32.1(C-16), 34.3(C-7), 37.0(C-22), 37.2(C-10), 38.5(C-13), 38.7(C-1), 38.8(C-4), 42.0(C-8), 43.6(C-14), 48.5(C-18), 50.4(C-19), 51.5(C-9), 57.3(C-5), 58.1(C-17), 80.5(C-3), 110.6(C-29), 152.2(C-20), 179.6(C-28).

Rotavirus - 본 실험에 사용된 rotavirus로서 표준 human rotavirus는 일본 삿포로 의과대학에서 분양받은 KU, S2, YO을 사용하였다.

세포 - Rotavirus를 증식시키기 위해 사용된 MA-104(원숭이 신장) 세포의 계대배양은 Feng 등⁹⁾의 방법에 따라 시행하였다. MA-104 세포는 Medium 199 Earle's salts에서 계대 배양하면서 사용하였다.

Rotavirus 배양 - 공시 rotavirus는 Chiarini 등¹⁰⁾의 방법에 따라서 배양하였다. 0.2% acetylated trypsin (10 μ l/ml)을 넣어 5% CO₂ incubator에서 활성화 시켰고, MA-104 세포에 미리 활성화시킨 바이러스를 넣어 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 흡착시킨 후, trypsin (μ l/ml) 가 함유된 무혈청 M199배지를 3 ml 첨가하여 재차 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 중 현미경으로 세포변성효과(CPE: Cytophatic effect)를 관찰하면서 세포변성효과가 완전히 일어났을 때 -80°C 동결과 해동을 반복하여 바이러스를 수확한 후 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Ratovirus의 역가분석 - Rotavirus의 역가분석은 Ruggeri와 Greenberg의 방법¹¹⁾에 따라 수행하였다. 바이러스는 0.2% trypsin을 첨가하여 30분간 활성화시켜 무혈청 M199로 10¹에서 10⁸까지 희석하였고, MA-104세포가 배양된 6 well plate는 무혈청 M199로 세척한 후 희석한 바이러스 액을 각 well에 0.5 ml씩 넣어 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 흡착시켰다. 1.1% agarose를 용해하여 2배 농도의 M199배지와 1:1로 섞어 각 well에 남아있는 바이러스를 제거한 후 agarose가 첨가된 배지 4 ml씩 증충하여 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. 배양 후 neutral red를 무혈청 M199와 1:20으로 희석한 다음 1 ml씩 각 well에 넣어 배양기에서 7시간 동안 염색하여 plaque forming unit(PFU)를 계수하였다.

세포독성효과 - 숙주세포 MA-104에 대한 세포독성효과는 MTT assay을 응용하였다¹²⁾. MA-104 세포를 96-well plate의 각 well에 200 μ l씩 넣고 5일 동안 배양하고 나서 무혈청 M199로 세척한 후 betulinic acid를 1%~0.1/128%까지 연속적으로 희석하여 96-well에 150 μ l씩 접종 하여 24시간 동안 배양하여 세포독성을 측정하였다.

Anti-rotavirus 효과 - Anti-rotavirus 효과는 MTT assay을 응용¹²⁾하여 MA-104 세포를 96-well plate의 각 well에 200 μ l씩 넣고 5일 동안 배양하고 해동된 바이러스 100 μ l에 0.2% trypsin 1 μ l를 넣은 후 37°C 배양기에서 30분 동안 활성화시켜 사용하였다. MA-104 세포가 배양된 96 well을 무혈청 M199로 세척하고 rotavirus를 100 μ l씩 접종하였다. Betulinic acid는 계속적으로 2진 희석법으로 희석하여, 각 농도의 시료에 rotavirus를 100 μ l씩 혼합한(최종농도 0.1%~0.1/128%) 후 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 완료 후, MTT 용액을 첨가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균 \pm 표준오차(Mean \pm S.E.)로 계산하였다. 각 군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 실시하였고, P값이 5% 미만일 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Betulinic acid 동정 - 분리한 betulinic acid에 대하여 EI-MS, NMR 등의 분석을 하였다. MS 측정 결과, 분자량 456에 해당하는 m/z 456[M]⁺의 peak가 나타났고, 1H 및 ^{13}C -NMR 결과, hydroxyl group의 존재로부터 측정되는 3.55 ppm의 multiple signal과 80.5 ppm에서 carbon signal이 특징적으로 관찰되어 triterpene계의 구조를 가지고 있는 betulinic acid로 확증하였으며, 이 결과는 기존에 보고된 문헌의 결과와 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 1)¹³⁻¹⁵⁾.

Rotavirus의 역가측정 - 실험에 사용된 Rotavirus의 역가

로 KU는 2.5×10^7 PFU/ml, S2는 2.8×10^7 PFU/ml 그리고 YO는 2.0×10^7 PFU/ml로 나타나 억제능력을 측정하기 위한 기본적인 활력을 갖춘 것으로 판단하였다.

세포독성효과 - Betulinic acid의 rotavirus 숙주세포인 MA-104에 대한 독성을 측정된 결과, MA-104세포에 대한 IC_{50} 값은 약 607ug/ml으로 측정되었다. 즉, betulinic acid 1%와 0.5%에서 각각 32%와 57%의 생존율을 나타내었으며, 0.1%에서는 82%의 생존율을 나타내었다. 나머지 0.1/2%에서 부터는 숙주세포에 대한 생존에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서 rotavirus 감염억제효과를 위한 betulinic acid의 측정농도는 0.1% 이하에서 실시하기로 하였다.

Rotavirus 감염 억제효과 - MTT assay에 의한 betulinic acid의 감염억제효과는 Fig. 1~3과 같다. Betulinic acid의 농도가 각각 0.1%, 0.1/2%, 0.1/4%, 0.1/8%, 0.1/16%, 0.1/32%, 0.1/64%, 0.1/128%이었을 경우 human KU에 대한 억제효과는 각각 54%, 62.1%, 58.9%, 52.7%, 22.4%, 24.3%, 12.4% 및 10.5%로(Fig. 2), human S2에 대한 억제효과는 각각 52.6%, 59.7%, 48.6%, 42.6%, 38.4%, 26.8%, 19.4% 및 12.4%로 나타났고(Fig. 3), human YO에 대한 억제효과는 각각 60.1%, 65.2%, 57.0%, 49.8%, 36.1%, 21.5%, 22.4% 및 11.0%로 나타났다 (Fig. 4). 0.1% 농도를 제외하고 0.1/2%~0.1/128%의 농도구간에서는 농도 의존적으로 억제효과를 나타내었다.

고 찰

Betulinic acid의 생리활성으로는 항암, 항 HIV 및 항균활성이 있는 것으로 보고되었다. 가장 많이 보고된 생리활성으로는 항암효과로 melanoma, neuroblastoma 및 neuroectodermal tumor 등 다양한 암종에 대하여 효과가 있는 것으로 보고 되었으며¹⁻³⁾, betulinic acid의 암세포에 대한 작용기전

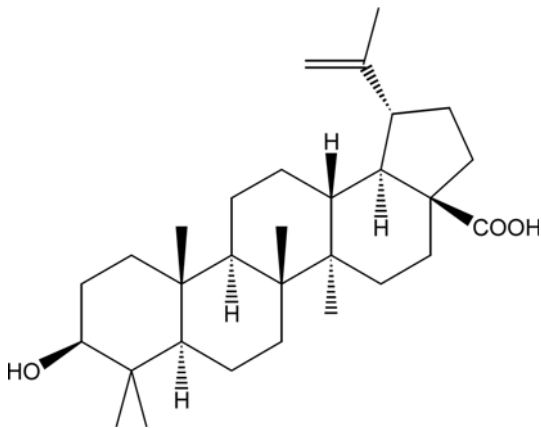


Fig. 1. Structure of betulinic acid isolate from *Ziziphus jujuba*.

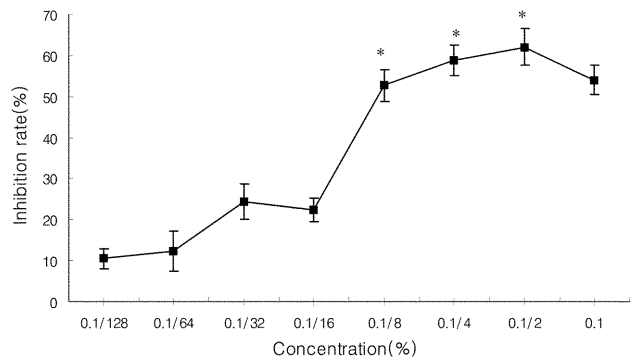


Fig. 2. Inhibitory effect of betulinic acid on the infection of human rotavirus KU in MA-104 cells (*p<0.05).

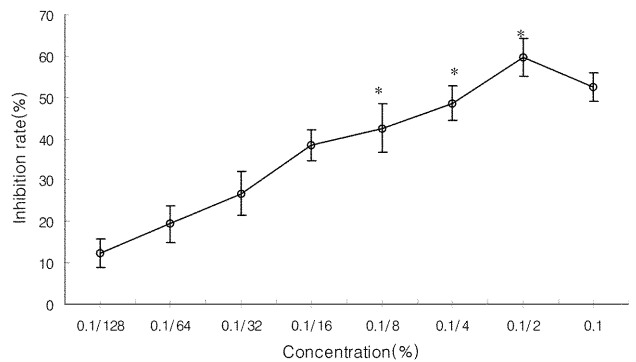


Fig. 3. Inhibitory effect of betulinic acid on the infection of human rotavirus S2 in MA-104 cells (*p<0.05).

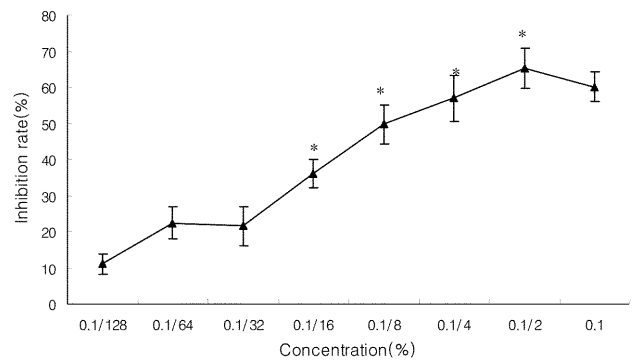


Fig. 4. Inhibitory effect of betulinic acid on the infection of human rotavirus YO in MA-104 cells (*p<0.05).

(mechanism)은 apoptosis (programmed cell death)이며, 비교적 일반적인 세포에 대하여 독성을 나타내는 taxol보다도 암세포에 특이적으로 작용한다는 보고도 있다⁴⁾. 그 다음으로는 항 HIV 및 AIDS에 대한 억제효과⁵⁻⁷⁾와 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*의 성장을 억제하는 항박테리아 효과도 가지고 있는 물질이다⁸⁾.

Rotavirus는 1973년 Bishop 등¹⁶⁾에 의해 위장염을 앓고 있는 유아의 소장 용모 상피세포에서 최초 분리하였고, 사람

뿐만 아니라 포유동물 및 조류에서 비세균성 위장염의 주요 원인 바이러스로 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹). 이에 대한 백신의 개발을 위하여 많은 연구가 진행되고 있지만 현재까지는 만족스런 결과는 없는 실정이다. 현재까지도 매년 주로 빈국들에서 50만 명 이상의 사상자를 유발하는 rotavirus에 감염된 아동의 경우 특별한 치료제가 없는 실정으로 최근에는 단기간의 nitazoxanide 투여를 통하여 설사 증상을 경감시킬 수 있다는 연구이외에 치료제에 대한 결과는 없는 편이다²⁰).

본 연구자는 대추나무의 껍질로부터 rotavirus 감염 억제 효과가 있는 분획으로부터 betulinic acid을 분리하였고, 이 물질의 human rotavirus에 대한 감염억제 실험을 통하여 rotavirus 감염에 대한 억제효과를 증명하였다. 실험결과, betulinic acid은 human KU, S2 및 YO rotavirus을 이용한 in vitro 바이러스 감염억제효과가 나타났다. Betulinic acid의 농도 0.1%, 0.1/2%, 0.1/4%, 0.1/8%, 0.1/16%, 0.1/32%, 0.1/64%, 0.1/128%에서 바이러스 감염억제 시험을 실시한 결과, 0.1% 농도를 제외하고 0.1/2%~0.1/128% 농도 구간에서는 유의차 있게 농도의존적인 바이러스 감염억제효과를 나타내었다. 0.1%의 농도에서는 사용한 바이러스 모든 종에서 0.1/2% 농도 대비 감염억제효과가 떨어졌으며, 이는 이 농도에서 숙주세포인 MA-104 세포에 대한 저해율이 나타나기 때문인 것으로 추정된다. 바이러스의 종에 따른 차이로는 human S2와 YO의 경우, 농도에 따른 저해율의 패턴이 유사하였고, human KU에서는 0.1/6%에서 0.1/8%로 농도 증가율 대비 억제율이 22.4%에서 52.7%로 상승률이 크다는 것 이외에는 대체적으로 3종류의 바이러스에 대하여 유사한 패턴을 관찰할 수 있었다.

Betulinic acid에 대한 이러한 결과는 Fujioka⁵⁾와 Kashiwarda 등⁶⁾이 보고한 betulinic acid와 그 유도체인 3-O-(3',3'-Dimethylsuccinyl)- betulinic acid의 HIV에 대한 억제시험에서도 나타났다⁵⁻⁷⁾. 그 메카니즘으로는 cell fusion assay를 실시한 결과, syncytia (cellular aggregates)의 형성을 방지하게 함으로서, AIDS을 유발시키는 HIV-1 바이러스 감염의 진행과정을 억제하는 것으로 보고되었다. 현재 rotavirus의 억제에 관한 주장으로는 anti-VP6 MAb에 의한 이중나선의 RNA의 transcription을 방해하는 것으로 보고되었으나²¹⁾, 본 연구에서의 betulinic acid는 이러한 기작을 갖는지는 알 수 없었고 다만 human KU, S2 및 YO rotavirus에 in vitro에서 바이러스 감염억제효과가 나타남을 확인한 것으로 기전에 관한 연구 및 in vivo 시험은 계속적으로 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Beecher, C.W., Fong, H.H., Kinghorn, A.D., Brown, D.M., Wani, M.C., Wall, M.E., Hieken, T.J., Das Gupta, T.K. and Pezzuto, J.M. (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1**: 1046-1051.
- Schmidt, M. L., Kuzmanoff, K.L., Ling-Indeck, L. and Pezzuto, J.M. (1997). Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **33**: 2007-2010.
- Fulda, S., Friesen, C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict, M., Nunez, G., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Debatin K.M. (1997) Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* **57**: 4956-4964.
- Jeong, H.J., Chai, H.B., Park, S.Y., Kim D.S. (1999) Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**:1201-1204.
- Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R.E., Cosentino, L.M., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Chen, I.S. and Lee, K.H. (1994) Anti-AIDS agents II, Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum* and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **57**:243-247.
- Kashiwada, Y., Hashimoto, F., Cosentino, L.M., Chen, C.H., Garrett, P.E. and Lee, K.H. (1996) Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **39**:1016-1017.
- Hashimoto, F., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M., Chen, C.H., Garrett, P.E. and Lee, K.H. (1997) Anti-AIDS agents-XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorg Med. Chem.* **5**:2133-2143 .
- Hess, S.C., Brum, R.L., Honda, N.K., Cruz, A.B., Moretto, E., Cruz, R.B., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel Filho, V. and Yunes, R.A. (1995) Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **47**:97-100.
- Feng, N., Burns, J.W., Bracy, L. and Greenberg, H.B. (1994) Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J. Virol.* **68**:7766-7773.
- Chiarini, A., Arista, S., Giammanco, A. and Sinatra, A. (1983) Rotavirus persistence in cell cultures: selection of resistant cells in the presence of foetal calf serum. *J. Gen. Virol.* **64**:1101-10.
- Ruggeri, F.M. and Greenberg, H.B. (1991) Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* **65**: 2211-2219.
- Weber, J.M., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. and Sircar, S. (2003) Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res.* **58**:167-173.

13. Kojima, H., Tominaga, H., Sato, S. and Ogura, H. (1987) Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* **26**:1107-1111.
14. Mahato, S.B. and Kundu, A.P. (1994) ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **37**:1517-1575.
15. Choi, S.Z., Yang, M.C., Choi, S.U. and Lee, K.R. (2006) Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia*. *Arch. Pharm. Res.* **29**:203-208
16. Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J. (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* **2**:1281-1283.
17. Kapikain, A.Z. and Chanock, R.M. (1991) Rotaviruses. In Fields, B.N.(ed), *Virology*, 1353-1404, Raven Press, New York.
18. Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M.C., Greenberg, H. and Santos, N. (1994) Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1408-1409.
19. Kaga, E., Iizuka, M., Nakagomi, T. and Nakagomi, O. (1994) The distribution of G (VP7) and P (VP4) serotypes among human rotaviruses recovered from Japanese children with diarrhea. *Microbiol. Immunol.* **38**:317-320.
20. Lanata, C.F. and Franco, M. (2006) Nitazoxanide for rotavirus diarrhoea? *Lancet* **368**:100-101.
21. Ginn, D.I., Ward, R.L., Hamparian, V.V. and Hughes, J.H. (1992) Inhibition of rotavirus in vitro transcription by optimal concentrations of monoclonal antibodies specific for rotavirus VP6. *J. Gen. Virol.* **73**:3017-3022.

(2007년 11월 27일 접수)