

# 꽃치자나무 추출물의 HIV-1 효소 억제 활성과 QSAR에 의한 활성인자 예측

유영범\*

남부대학교 한방제약개발학과

## Inhibitory Effects of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino on HIV-1 Enzymes and Prediction of Inhibitory Factor by QSAR

Young-Beob Yu\*

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

**Abstract** - In this study, we conducted the anti- HIV-1 enzymes assay *in vitro* and its active components were predicted by QSAR *in silico* for the elucidation of action mechanism on anti-HIV of natural resources. The extracts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino were tested for their inhibitory effects on the reverse transcriptase (RT), protease and  $\alpha$ -glucosidase. In the enzyme inhibition assay, the methanol extracts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino stem showed a strong activity of 32.5% on the enzyme activity to cleave an oligopeptide, resembling one of the cleavage sites in the viral polyprotein which can only be processed by HIV-1 protease. Moreover the methanol extracts of stem exhibited alpha-glucosidase inhibitory activities of 26.1%. The methanol extracts (100  $\mu$ g/ml) of stem showed a weak activity of 13.4% on anti-HIV-1 RT using Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay (ELOSA) method. However, all extracts of leaf and stem didn't exhibit the HIV-1-induced cytopathic effects with IC (inhibitory concentration) of 100  $\mu$ g/ml in HIV-1-infected human T-cell line. From these results, it is suggested that *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino extracts may possibly be involved in the inhibition of reverse transcriptase, protease and alpha-glucosidase but can't vitally concerned with the viral replication *in vitro*.

**Key words** - *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino, Anti HIV-1, Reverse transcriptase, Protease,  $\alpha$ -glucosidase, QSAR

## 서 언

자원식물을 대상으로 에이즈의 원인바이러스인 HIV-1에 대한 억제활성연구가 활발히 진행되어오고 있다(Yang *et al.*, 2001; Taraporewala *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1992; Kusumoto *et al.*, 1995). 또한 한국의 자원식물을 대상으로도 HIV-1과 그 주요효소에 대한 억제활성연구가 지속적으로 보고되고 있다(Yu *et al.*, 2007, 2012).

치자(梔子)는 꽃치자나무(*Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino)와 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로서, 꽃치자나무는 주로 우리나라 남부지방에 재배하거나 자생한다(Moon *et al.*, 2002). 꽃치자나무(*Gardenia jasminoides* var.

*radicans* Makino)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 높이 60 cm의 상록관목이며 잎(치자엽, 梔子葉)은 마주나기하고 윤채가 있으며 가장자리가 밋밋하다. 꽃(치자화, 梔子花)은 7~8월에 백색으로 피고, 열매(치자, 梔子)는 긴 타원모양이며 약용으로 사용된다. 청열(淸熱)효능이 있는 치자는 10월경 과실을 따서 햇볕이나 불에 쪄어서 말려서 사용하며, 치자 엽은 종(腫)을 삭이고 타박상을 치료하는 데 사용된다(Shin *et al.*, 2003).

치자와 치자 잎의 화학성분으로는 genipin, geniposide, gardenoside와 shanzhiside 등 iridoid 계열의 성분들이 밝혀져 있으며, 꽃에서는 crocin, crocetin 등 황색 색소 성분이 보고되어 있다(Moon *et al.*, 2002). 이외에도 6'-O-trans-feruloylgenipin gentiobioside, 2'-O-trans-caffeoylgardoside, jasmigeniposide A 등 iridoid 배당체와 jasmigeniposide B 등 bis-iridoid 배당체가 보고되었다(Li *et al.*, 2013). 치자의 생리활성에 관한 연구

\*교신저자(E-mail) : flavone@naver.com

로는 genipin의 노화관련 인슐린 저항성 개선 연구(Guan *et al.*, 2013)와 geniposide의 기도염증과 과민성 유발 억제에 관한 연구(Deng *et al.*, 2013)가 보고되었다. 그리고 포제한 치자와 crocetin의 항산화, 항염활성에 관한 연구(Hong *et al.*, 2013) 등이 알려져 있으나 꽃치자나무 줄기 및 잎의 HIV 억제 활성에 관한 연구는 아직까지 찾아보기 어려운 실정이다.

본 연구에서는 꽃치자나무 잎, 줄기의 물 및 메탄올 엑스를 활용하여 유전자 재조합 방법으로 생산한 HIV-1 protease의 억제활성을 HPLC로 측정하였으며, HIV-1 reverse transcriptase 억제활성을 ELOSA (Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay) 방법으로, 그리고  $\alpha$ -glucosidase의 억제활성은 spectrophotometer 측정법으로 실시하여 유의한 활성이 관찰되어 보고하고자 한다. 또한 HIV-1의 주요 효소의 *in vitro* 활성실험 결과를 뒷받침하기 위하여 이들의 억제활성 인자를 구조활성상관(Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR) 분석(Han and Yu, 2006)을 이용한 *in silico* 방법으로 예측하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 추출

시료로 사용한 꽃치자나무는 전남 순천시 난봉산에서 채취하였으며, 식물학적 동정을 실시한 후 잎, 줄기를 통풍이 잘되는 곳에서 음건 세절하여 추출용 시료로 사용하였다. 시료 5 g을 각각 물(100 ml) 또는 메탄올(100 ml)로 3시간씩 열수 추출한 후 감압 농축하여 메탄올의 최종농도가 2%가 넘지 않게 동결 건조하여 활성 실험의 재료로 사용하였다. 시료는 활성 실험 시에 멸균된 증류수나 DMSO에 100  $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

### 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.

### HIV-1 reverse transcriptase 억제 활성

Reverse transcriptase (RT) 억제활성 실험은 Dupont사로부터

터 구입한 RT-Detect™ kit NEK-070A (Dupont medical products, Boston, MA, USA)를 이용한 ELOSA 방법으로 4°C 이하에서 저장하면서 assay 조건을 설정하였다. 효소는 유전자 재조합에 의해 생산된 HIV-1 RT (10 U/ $\mu$ l, 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/ $\mu$ l로 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 MgCl<sub>2</sub>)에 희석하여 사용하였다. 10  $\mu$ l 반응혼합물 완충액, 20  $\mu$ l 반응혼합물, 4  $\mu$ l 식물 추출물, 5.2  $\mu$ l 효소완충액을 500  $\mu$ l test tube (ependorf)에 넣고 37°C에서 4분간 예비배양한 후 효소 0.8  $\mu$ l를 가해 37°C에서 1시간동안 역전사시키고 90°C에서 1분간 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 RNA template를 알카리용액(5.62% potassium hydroxide, 94.38% water)으로 37°C에서 15분간 가수분해한 후, 완충액(13.6% sodium phosphate, monobasic monohydrate, 86.4% water)으로 중화하였다. ELOSA 반응을 위해 중화시킨 반응액 50  $\mu$ l를 streptavidin-coated microplate well에 옮기고, horseradish peroxidase (HRP)-labeled detector probe와 biotin-labeled capture probe를 포함하는 ELOSA 용액 50  $\mu$ l 첨가하여 37°C에서 2시간동안 배양하였다(Weber *et al.*, 1989). 반응을 마치고 microplate well에 남은 시약이나 가수분해된 RNA를 제거하기 위해 세척액(2-chloroacetamide 용액 20X)을 D.W로 희석하여 3회 세척하였다. 세척한 microplate에 형광검출액(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate 용액) 100  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 정지액(2.2% citric acid, 1.5% HCl, 1.5% sulfuric acid and 94.8% water) 100  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

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

### HIV-1 protease 억제 활성

유전자 재조합으로 생산된 HIV-1 protease에 의한 기질의 cleavage를 HPLC로 측정하였고 효소원은 Otake *et al.* (1994)의 방법에 의해 준비하였다. 즉 HIV-1 protease (PR)의 DNA를

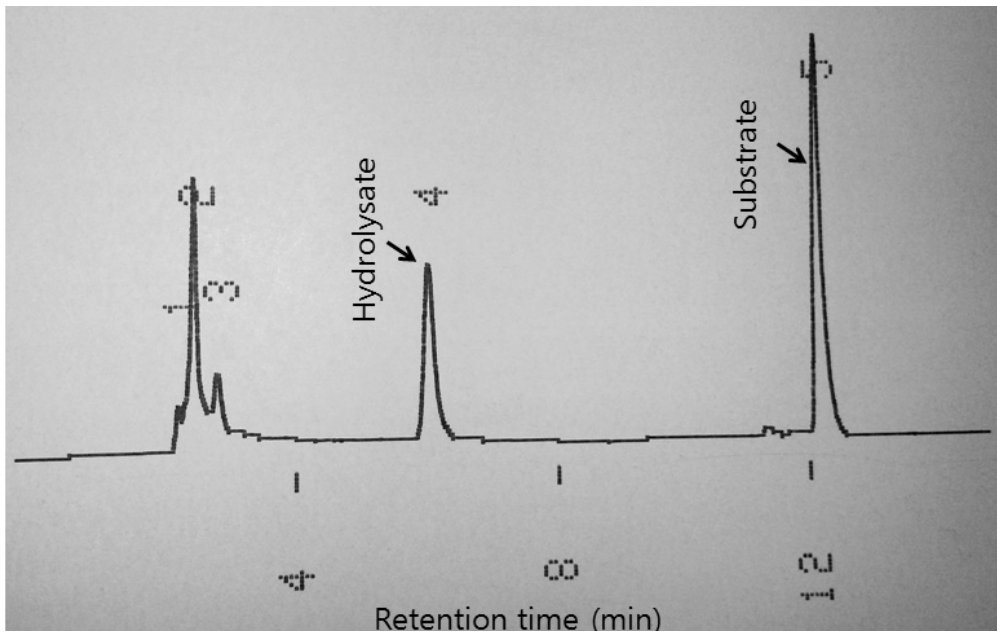


Fig. 1. HPLC profile of the reaction mixture of HIV-1 protease. The substrate and its hydrolysate were detected at 280 nm and their retention times were 12.23 and 6.01 min, respectively.

나타내는 JM 105 *Escherichia coli* 에서 생산된 HIV-1 protease 를 {[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-(pNO<sub>2</sub>-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH<sub>2</sub> (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, 식물 추출물 1 µl, 효소용액 2 µl을 각각 가하여 전량 5 µl의 반응혼합물을 조제하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 90°C에서 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 × 4 mm, Merck, Darmstadt, FRG)을, 용매는 0.1% TFA와 acetonitrile (20%~50% gradient)로 하였으며, 유속은 1.0 ml/min로 하면서 UV 280 nm에서 분석하였다(Fig. 1).

#### α-glucosidase 억제 활성

α-glucosidase에 의한 *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(10

mM sodium phosphate, pH 7.0, 20% glycerol)에 0.5 U/ml 가 되도록하여 사용하였으며, 기질은 *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan)를 멸균 증류수에 10 mM이 되도록하여 사용하였다. 항 α-glucosidase 반응액의 조성은 50 µl 완충액(100 mM Sodium phosphate, pH 7.0), 100 µl 기질용액과 20 µl 식물 추출물로 하고 37 °C에서 5분간 예비배양한 후 30 µl 효소를 첨가하여 37°C에서 10분간 배양하였다. 그리고 140 µl 정지액(0.2 M sodium carbonate)으로 반응을 정지시킨 후 microplate well에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

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

#### HIV-1 복제 억제

HIV-1 복제억제활성 실험은 Otake *et al.* (1994)의 방법에 의해 행하여 졌다. 실험에 사용된 세포는 HTLV-1에 감염된 MT-4 cell line으로 penicillin G 100 U/ml (Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)와 streptomycin 100 µg/ml (Meiji Seika, Tokyo, Japan), 그리고 10% fetal calf serum (FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia)을 포함하는 RPMI-1640 배지(Flow Laboratories, Irvine, Scotland)를 이용하여 5%

CO<sub>2</sub>와 37°C의 조건하에서 배양하여 실험에 사용하였다. 바이러스는 MOLT-4/HTLV-3III<sub>B</sub> 세포로부터 얻은 HIV-1 (strain HTLV-III<sub>B</sub>)을 이용하였다. 항 HIV-1 활성은 MT-4 세포를 50%-tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>)에서 1시간 동안 HIV-1 (HTLV-III<sub>B</sub>)에 감염시켰다. 그리고 RPMI-1640배지에서 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 재현탁시키고 현탁된 세포를 200 µl/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)를 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.

**정량적 구조활성 상관관계(QSAR)를 이용한 활성인자 예측**

꽃치자나무의 HIV-1 주요 효소에 대한 활성인자를 추정하기 위하여 주요성분들을 문헌적으로 검색하고 화학성분들의 3차 구조를 완성하였다. HIV-1 효소 억제활성이 보고된(Kusumoto *et al.*, 1991) 화학성분들의 3차 구조를 이용하여 QSAR (MDL QSAR, USA) tool을 활용한 부분최소자승법(PLS, Partial Least Squares Regression) (Han and Yu, 2006)으로 예측식을 수립하였다. 그리고 모델의 적합정도를 결정계수(R<sup>2</sup>)로 확인하였으며 모델의 예측능력척도를 Q<sup>2</sup> 값으로 확인하였다. 그리고 꽃치자나무의 주요성분의 3차 구조를 예측식에 대입하여 추정하였다.

**통계**

HIV-1의 주요효소의 억제활성에 관한 모든 실험은 triplicate로 실시하였으며, 실험 시료군간 변동과 군내 변동의 비를 활용하여 일원배치분산분석(ANOVA)의 F검정을 확인하였고, 귀무가설이 기각되어 시료간의 평균에 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 등분산가설을 Levene의 통계량으로 확인하였다. 그리고 개별시료군 간의 평균차이를 Duncan's multiple range test 사후분석(SPSS ver. 20)으로 확인하였다.

**결과 및 고찰**

레트로바이러스의 한 종인 HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1)은 에이즈(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)의 원인 바이러스로 알려져 있다(Kaminchik *et al.*,

1994; Peliska *et al.*, 1992). HIV-1의 생애는 RNA를 숙주 세포에 전이하고 reverse transcriptase (RT) (Prasad and Goff, 1989)에 의해 viral DNA로 전사되어 host chromosome에 proviral DNA형태로 존재하게 된다. 숙주세포에서 일정한 잠복기를 거친 viral DNA는 integrase, protease (PR) (Katz and Skalka, 1994), glucosidase (GL) 등의 작용으로(Taylor *et al.*, 1994; Mohan, 1992) 성숙된 virus로 복제된다. HIV-1 바이러스는 복제 과정에서 host cell을 파괴하여 면역기능의 저하를 일으키고 감염에 대한 저항성을 약화시키는 것으로 알려져 있다. 자원식물에 대한 HIV-1 활성억제연구가 지속적으로 보고되고 있으며(Yu *et al.*, 2007; Kusumoto *et al.*, 1995), 탄닌(Nakashima *et al.*, 1992), 플라보노이드(Kusumoto *et al.*, 1995), 해양 천연 알카로이드인 pyrido[4,3,2-*mn*]thiazolo[5,4-*b*]acridine (Taraporewala *et al.*, 1992) 등의 항 HIV-1 억제활성이 보고되었다.

본 연구에서는 꽃치자나무 잎과 줄기 추출물의 HIV-1 효소 억제활성을 실험하였다. 그 결과 꽃치자나무 잎 MeOH 추출물 100 µg/ml 농도에서 13.4%의 약한 HIV-1 역전사 효소 억제 활성이 나타났으며, 잎과, 줄기의 물추출물 그리고 줄기의 메탄올 추출물에서는 역전사효소억제활성이 나타나지 않았다(Fig. 2).

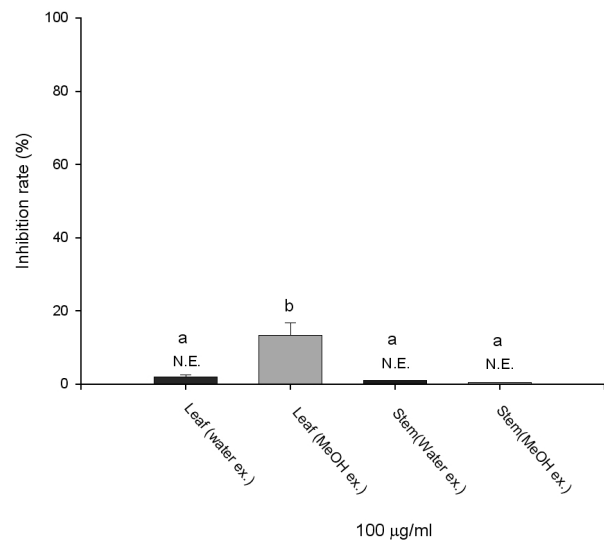


Fig. 2. Inhibition rates of leaf methanol extracts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino on HIV-1 reverse transcriptase. The results are the mean ± S.E. from three replication. Different letters indicate a significant difference by Duncan's multiple range test at p < 0.05. Water extracts were dissolved in distilled water, and methanol extracts were dissolved in DMSO or 10% DMSO in water. NE, not effective.

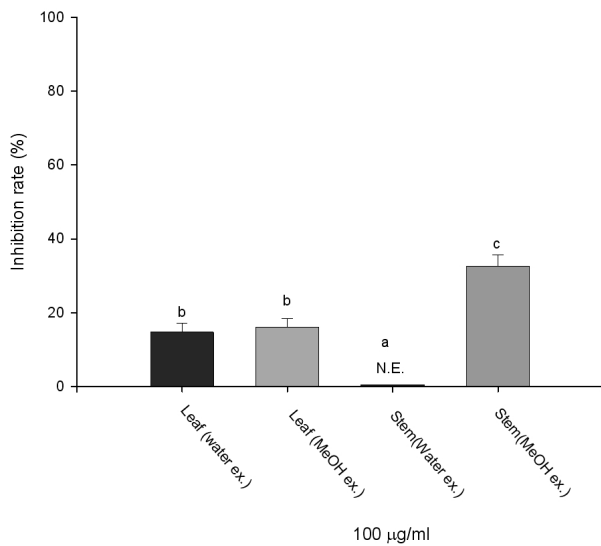


Fig. 3. Inhibition rates of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino on HIV-1 protease. The results are the mean  $\pm$  S.E. from three replication. Different letters indicate a significant difference by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ . Water extracts were dissolved in distilled water, and methanol extracts were dissolved in DMSO or 10% DMSO in water. NE, not effective.

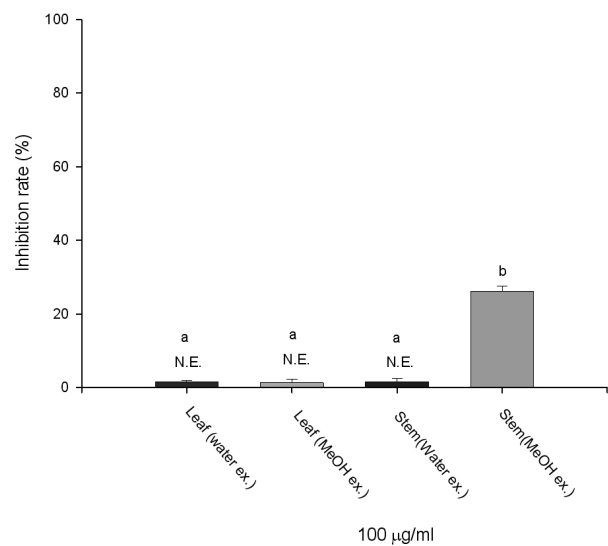


Fig. 4. Inhibition rates of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino on  $\alpha$ -glucosidase. The results are the mean  $\pm$  S.E. from three replication. Different letters indicate a significant difference by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ . Water extracts were dissolved in distilled water, and methanol extracts were dissolved in DMSO or 10% DMSO in water. NE, not effective.

Table 1. Inhibitory effects of extracts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino against HIV-1 viral replication

Sample No.	Used Parts	Extracts	IC ( $\mu$ g/ml)	CC ( $\mu$ g/ml)
1	leaf	W	NE	>100
2	leaf	M	NE	>100
3	stem	W	NE	>100
4	stem	M	NE	>100
AZT			0.00195	>1
DS8000			0.97	>1000

W, water extract; M, methanol extract. Water extracts were dissolved in distilled water, and methanol extracts were 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.

재조합 HIV-1 프로테아제 억제활성 실험에서는 꽃치자나무 잎의 물과 메탄올 추출물 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 14.7%와 16.0%의 약한 억제 활성이 관찰되었으며, 줄기의 메탄올추출물에서는 32.5%의 높은 프로테아제 억제활성이 관찰되었다 (Fig. 3). 꽃치자나무 잎과 줄기의 물 추출물에서는 글루코시다제 억제 활성을 나타내지 않았지만 줄기의 메탄올 추출물에서는 26.1%의 억제활성을 나타내었다 (Fig. 4). 꽃치자나무 추출물의 HIV-1 바이러스 증식억제 실험에서는 잎과 줄기 추출물 모두 100  $\mu$ g/ml에서 활성이 관찰되지 않았다 (Table 1).

꽃치자나무 줄기의 메탄올 추출물이 HIV-1 protease와  $\alpha$ -glucosidase에 대해 높은 효소 억제활성을 나타내었고, 역전사효소에 대해서도 약한 억제활성이 관찰되었다. 하지만 바이러스 복제에서는 거의 활성이 관찰되지 않아 효소억제와 바이러스 복제억제와의 관련성을 도출하기가 어려웠다. 비록 바이러스 복제억제에는 활성이 관찰되지 않았지만, 효소활성 억제에서는 유의적인 활성이 관찰되어 향후 HIV-1 관련효소 억제에 진행된 연구의 가능성이 있을 것으로 생각된다.

*In vitro* 실험결과에 따른 활성물질을 예측하기 위하여

Table 2. Prediction of inhibition activity of *Gardenia asminoides* var. *radicans* Makino by QSAR

Molecules Name	Inhibition rates (pred. %)
Crocetin	81.83
Crocin	2.70
Genipin-1-O-gentiobioside	0.41
Cerbinal	34.82
Geniposidic acid	30.35
Genipin	55.39
Geniposide	18.19
Gardenoside	9.03
Geniposidic acid aglycone	64.53

QSAR기법을 활용한 *in silico* 실험을 실시하였다. 천연물 성분의 역전사 효소억제와 관련된 문헌을 검색하여(Kusumoto *et al.*, 1991) 활성화합물과 구조와의 상관성을 부분최소자승법으로 하여 활성 예측식을 수립하였다(Inhibition rate (%) = 0.1704\*tp1 + 0.2704\*tp2 + 0.2651\*tp3 + 0.1026\*tp4 + 0.1512\*tp5 + 0.05398\*tp6 + 0.05754\*tp7 + 0.06988\*tp8 + 0.03486\*tp9). 예측식의 적합정도를 나타내는 결정계수(R<sup>2</sup>) 0.9957이고, 모델의 예측능력척도를 Q<sup>2</sup> 값은 0.9603으로 우수하였다. 이들 예측식으로 억제활성을 검색하기위하여 꽃치자나무 성분의 3차원 화학구조를 database화(ISIS base, MDL, USA)하였다. *In silico* 실험결과 주요성분인 crocetin이 81.8%의 높은 역전사 효소억제활성이 예측되었으며, genipin이 55.39%, geniposidic acid aglycone 가 64.5% 역전사효소 억제활성이 예측되었다. 주로 비당부의 활성이 높게 예측되었으며 배당체의 경우 활성이 현저하게 저하되는 것으로 나타났다(Table 2).

일반적으로 식물의 효소억제나 바이러스 복제억제에 활성은 식물 중 tannin, polysaccharide, protein 등에 기인한 것으로 알려져 있으며, 이들은 탁월한 효소결합능력과 바이러스 당단백에 결합력에 의해 높은 활성을 보이는 것으로 알려져 있다(Kakiuchi *et al.*, 1985, Batinic and Robey, 1992). 꽃치자나무의 HIV-1 효소억제활성은 다양한 복합분자들에 기인한 것으로 추정되며, 효소 억제 작용 뿐만 아니라 virus-cell 융합 억제(Balzarini *et al.*, 1992; Mayaux *et al.*, 1994), 감염된 세포로부터 virus분자의 방출억제(Rossmann, 1988) 등 에도 관여하는 것으로 생각되어진다.

## 적 요

꽃치자나무 추출물의 HIV-1 reverse transcriptase, protease 및 alpha-glucosidase에 대한 억제활성실험을 실시하였다. ELOSA 방법으로 실험한 역전사효소 억제활성 실험에서는 꽃치자나무 잎 MeOH 추출물 100 µg/ml 농도에서 13.4%의 약한 억제활성이 관찰되었고, 줄기의 메탄올추출물에서는 32.5%의 높은 HIV-1 protease 억제활성과 줄기의 메탄올 추출물에서는 26.1%의 alpha-glucosidase 억제활성이 관찰되었다. 그리고 HIV-1 복제 억제활성은 MT-4 세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성억제를 광학현미경으로 관찰하여 살펴본 결과 잎과 줄기의 모든 추출물에서 HIV-1 바이러스 증식억제에 억제활성이 관찰되지 않았다. *In silico* 실험결과 주요성분인 crocetin이 81.8%의 높은 역전사 효소활성이 예측되었으며, genipin이 55.39%, geniposidic acid aglycone이 64.5% 역전사효소 활성이 예측되었다. 주로 aglycone의 활성이 높게 예측되었으며 배당체의 경우 활성이 현저하게 저하되는 것으로 나타났다.

## References

- Balzarini, J., J. Neyts., D. Schols., M. Hosoya., E. Van Damme., W. Peumans and E. De clerq. 1992. The mannose-specific plants lectins from *Cymvidium 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.* 18:191-207.
- Batinic, D. and R.A. Robey. 1992. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *J. Bio. Chem.* 267:6664-6671.
- Deng, Y., M. Guan, X. Xie, X. Yang, H. Xiang, H. Li, L. Zou, J. Wei, D. Wang and X. Deng. 2013. Geniposide inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *Int Immunopharmacol.* 17(3):561-567.
- Guan, L., H. Feng, D. Gong, X. Zhao, L. Cai, Q. Wu, B. Yuan, M. Yang, J. Zhao and Y. Zou. 2013. Genipin ameliorates age-related insulin resistance through inhibiting hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Exp Gerontol.* 48(12):1387-94.
- Han, C.H. and Y.B. Yu. 2006. Inhibitory effects of *Ricinus communis* on HIV-1 essential enzymes *in vitro* and Prediction

- of inhibitory facto using QSAR in silico. Korean J. Oriental Int. Med. 27(4):888-894 (in Korean).
- Hong, Y.J. and K.S. Yang. 2013. Anti-inflammatory activities of crocetin derivatives from processed *Gardenia jasminoides*. Arch Pharm Res. 36(8):933-940.
- Kakiuchi, N., M. Hattori and T. Namba. 1985. Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. J. Nat. Prod. 48(4):614-621.
- Kaminchik, J., R. Margalit, S. Yaish., H. Drummer., B. Amit., N. Saver., M. Gorecki and A. Panet. 1994. Cellular distribution of HIV type I nef protein: Identification of domains in nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. Aids Res. and Human Retrovir. 10:1003-1010.
- Katz, R.A. and A.M. Skalka. 1994. The retroviral enzymes. Annu. Rev. Biochem. 63:133-173.
- Kusumoto, I.T., M. Hattori, Y. Miyaichi, T. Tomimori, M. Hanaoka and T. Namba. 1991. Effects of flavonoids and alkaloids on reverse transcriptase. Shoyakugaku Zasshi 45: 240-254.
- Kusumoto, I.T., T. Nakabayashi., H. Kida., H. Miyashiro., M. Hattori, T. Namba and K. Shimotohno. 1995. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. Phytotherapy Res. 9:180-184.
- Li, H.B., Y. Yu, Z.Z. Wang, Y. Dai, H. Gao, W. Xiao and X.S. Yao. 2013. Iridoid and bis-iridoid glucosides from the fruit of *Gardenia jasminoides*. Fitoterapia 88C:7-11.
- Mayaux, J.F., A. Bousseau., R. Pauwels., T. Huet., Y. Henin., N. Dereu., M. Evers., F. Soler., C. Poujade., E. De Clercq and J.B. Le Pecq. 1994. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3564-3568.
- Mohan, P. 1992. Anti-AIDS drug development: challenges and strategies. Pharmaceutical Res. 9(6):703-714.
- Moon, H.I., J.S. Oh, J.S. Kim, P.C. Chen and O.P. Zee. 2002. Phytochemical Compounds from the underground parts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino. Kor. J. Pharmacogn. 33(1):1-4 (in Korean).
- Nakashima, H., T. Murakami., N. Yamamoto., H. Sakagami., S. Tanuma., T. Hatano., T. Yoshida and T. Okuda. 1992. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. Antiviral Res. 18:91-103.
- Otake, T., H. Mori., M. Morimoto., N. Ueba and I.T. Kusumoto. 1994. Anti-human immunodeficiency virus activity of some tropical medicinal plants. J. Traditional Med. 11:188-193.
- Peliska, J.A. and S. J. Benkovic. 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. Science 258:1112-1118.
- Prasad, V.R. and S.P. Goff. 1989. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3104-3108.
- Rossmann, M.G. 1988. Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4625-4627.
- Shin, Y.W., D.H. Kim. and N.J. Kim. 2003. Studies on the processing of crude drugs (VII)-On the constituents and biological activities of *Gardeniae Fructus* by processing. Kor. J. Pharmacogn. 34(1):45-54 (in Korean).
- Taraporewala, I.B., J.W. Cessac., T.C. Chanh., A.V. Delgado and R.F. Schinazi. 1992. 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. J. Med. Chem. 35(15):2744-2752.
- Taylor, D.L., M.S. Kang., T.M. Brennan., C.G. Bridges., P.S. Sunkara and A.S. Tysms. 1994. 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 and Chemother. 38(8):1780-1787.
- Weber, P.C., D.H. Ohlendorf., J.J. Wendoloski and F.R. alemme. 1989. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. Science 243:85-88.
- Yang, S.S., G.M. Cragg., D.J. Newman and J.P. Bader. 2001. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. J. Nat. Prod. 64(2):265-277.
- Yu, Y.B., H. Miyashiro., N. Nakamura., M. Hattori and J.C. Park. 2007. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes. Arch. Pharm. Res. 30(7):820-826.
- Yu, Y.B. 2012. Inhibitory effects of *Campsis grandiflora* on HIV-1 reverse transcriptase, HIV-1 protease and  $\alpha$ -glucosidase. Korean J. Plant Res. 25(2):169-175 (in Korean).

(Received 20 January 2014 ; Revised 30 January 2014 ; Accepted 3 February 2014)