

수종 탄닌의 역전사효소와 HIV-1 복제 저해활성

김영호 · 이성우 · 김항섭 · 이승호* · 송만기** · 성영철** · 이정준*

KIST 생명공학연구소, *영남대학교 약학대학, **포항공과대학

(Received July 25, 1995)

Inhibitory Activities of Tannins against Reverse Transcriptase and HIV-1 Replication

Young Ho Kim, Sung Woo Lee, Hang Sub Kim, Seung Ho Lee*, Man Ki Song**,
Young Chul Sung** and Jung Joon Lee*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon 305-606, Korea

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Dept. of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea

Abstract—Thirty ellagitannins originated from some Euphorbiaceous plants were tested for the inhibitory activities against AMV reverse transcriptase and replication of HIV-1 using syncytia forming assay. Most of ellagitannins showed strong inhibitory activities against AMV reverse transcriptase. Some ellagitannins including geraniin, mallotusin, elaeocarpusin, euphorscopin and jolkianin, showed significant inhibitory activities of syncytia formation of supT1 cell line.

Keywords □ AMV reverse transcriptase, *Euphorbia* sp., ellagitannin, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), syncytia formation.

탄닌은 식물체에 널리 분포하고 있으며 다양한 구조를 갖는 polyphenol 화합물군으로서 최근 식물화학적 연구를 통하여 새로운 구조의 탄닌이 계속 보고되고 있으며, 흥미있는 활성들이 속속 밝혀지고 있다. 지금까지 알려진 탄닌의 생물활성으로는 지질과산화 저해¹⁾, Ca²⁺-activated hyaluronidase 활성저해²⁾, protein kinase C 저해³⁾, antitumor activity⁴⁾, antiviral activity⁵⁾ 등이 있다. 일부 탄닌의 역전사효소 저해활성은 Kakiuchi⁶⁾ 및 Nishizawa 등⁷⁾에 의하여 보고된바 있으며, 본 실험에서는 천연에서 항바이러스 활성물질 탐색연구의 일환으로 주로 대극과의 *Euphorbia* 속 식물에서 분리된 탄닌을 시료로 하여 retrovirus 의 RNA 가 DNA 로 복제하는 과정에 관여하는 reverse transcriptase에 대한 저해활성을 검색한 후, 활성을 나타낸 시료에 대하여 *in vi-*

tro 에서 항바이러스 활성을 확인하기 위하여 HIV-1 의 복제저해 활성을 조사하였다.

실험방법

바이러스 및 세포 - 실험에 이용한 바이러스는 HIV-1/HTLV-IIIB(pSVC21) 의 nef gene 을 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene 으로 치환한 pHXB-CAT1 을 사용하였다.⁸⁾ 세포는 HIV-1 에 의해 syncytium 형성이 잘 이루어지는 CD4⁺ human T cell line 인 supT1 을 이용하였다. 세포배양 배지는 10% fetal calf serum(FCS) 이 들어간 RPMI 1640 을 이용하였다.

시약 및 기기 - AMV reverse transcriptase는 Promega 에서 구입하였고, [³H]-TTP 는 NEN 제품을 사용하였다. Polyadenylic acid 와 oligodeoxythymidylic acid 는 Pharmacia 에서 구입하였고, di-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-860-4360 (팩스) 042-860-4595

thiothreitol, TTP, ddTTP 등은 모두 Sigma 제품을 사용하였다. Scintillation cocktail 로는 NEN 에서 pre-mixing 한 Econofluor-2 를 사용하였으며, scintillation counter 로는 Beckman LS 6000LL analyzer 를 이용하였다.

시료의 제조 - 실험에 사용한 탄닌 화합물은 주로 대극과의 *Euphorbia* 속 식물에서 분리된 화합물을 사용하였다. 시료는 20 mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹여 stock solution을 제조하였다. Reverse transcriptase에 대한 저해활성을 측정하기 위해서는 최종농도가 80, 20, 5, 1.25 µg/ml이 되도록 stock solution을 증류수로 희석하여, 각 성분에 대한 저해활성을 측정하였다. 세포독성의 측정과 syncytia forming assay를 하기 위해서는 stock solution을 최종농도가 5, 2.5, 0.5, 0.25, 0.05 µg/ml이 되도록 RPMI 1640 medium으로 희석하여 각 시료에 대한 세포독성과 syncytia의 수를 counting 하였다.

Reverse transcriptase inhibition assay - 30종의

polyphenol 화합물들에 대하여 AMV(avian myeloblastosis virus)의 reverse transcriptase를 이용하여 각 화합물의 inhibition 정도를 측정하였으며, template-primer 로는 poly(rA)-oligo(dT)를 사용하였다. 저해활성의 측정은 Nakamura 등⁹⁾이 기존에 쓰고 있던 방법을 Promega 사의 standard assay condition을 참고로 하여 최종농도를 50 mM Tris-HCl (pH8.3), 6 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 40 mM KCl, 0.1 mM TTP, 5.0 g/ml poly(rA), 0.02 U/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈, 5 µCi/ml [³H]-TTP, 0.1 mg/ml BSA, 3 U/ml reverse transcriptase로 변경하여 사용하였다. Reverse transcriptase 1U는 standard assay condition에서 37°C로 10분간 반응시켰을 때 1 mM의 dTTP가 acid insoluble form으로 혼입되도록 하는 enzyme의 양으로 하였다. 반응의 적정도를 확인하기 위하여 2',3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate를 지표물질로 이용하였으며, 각 시료의 저해활성을 percentage로 계산하였

Table I— Inhibitory effects of ellagitannins against AMV reverse transcriptase

	compound	IC ₅₀ (µg/ml)
control	2', 3'-dideoxy thymidine 5'-phosphate (AZT)	0.5
E1	1-0-galloyl-3, 6-(R)-HHDP-β-D-glucose (corilagin)	21.4
E2	1, 2, 3-tri-O-galloyl-3, 6-(R)-HHDP-β-D-glucose (punicafolin)	1.4
E3	1, 2-di-O-galloyl-3, 6-(R)-HHDP-β-D-glucose (tercatain)	4.2
E4	1-0-galloyl-2, 3-(R)-DHHDP-3, 6-(R)-HHDP-β-D-glucose (geraniin)	7.3
E5	mallotusin	13.4
E6	1-0-galloyl-2,3-(R)-DHHDP-3, 6-(R)-HHDP-β-D-glucose (elaecarpusin)	3.8
E7	bixanin	72.4
E8	putranjivain A	8.0
E9	acetonylgeraniin	16.7
E10	3-0-galloyl-1-2, 4-(R)-DHHDP-1, 6-(S)-HHDP-β-D-glucose (carpinusin)	6.2
E11	acetonylcarpinusin	>80
E12	acetonylhelioscopin A	>80
E13	2-0-galloyl-4, 6-(S)-HHDP-D-glucose (hippomanin A)	10.9
E14	gemin D	31.7
E15	2, 3-(S)-HHDP-4, 6-(S)-HHDP-D-glucose (pedunculagin)	2.4
E16	2, 3-di-O-galloyl-4, 6-(S)-HHDP-glucose (1-desgalloyleugeniin)	4.0
E17	1, 2, 3-tri-O-galloyl-4, 6-(S)-HHDP-β-D-glucose (eugeniin)	5.4
E18	casuariin	13.7
E19	2, 4-(S)-HHDP-3, 6-anhydromannofuranose	1.9
E20	rugosin E	8.1
E21	excoecarianin	2.8
E22	macaranganin	9.2
E23	1, 6-(S)-HHDP-3-O-galloyl-2, 4-(S)-DHHDP-β-D-glucose (helioscopin A)	3.0
E24	1, 6-(S)-HHDP-3-O-galloyl-4, 6-(S)-HHDP-β-D-glucose (helioscopin 8)	21.5
E25	1, 3-(S)-DHHDP-2-O-galloyl-4, 6-(S)-HHDP-β-D-glucose (euphorscopin)	2.4
E26	helioscopin A	>80
E27	jolkianin	13.2
E28	jolkinin	>80
E29	terchebin	>80
E30	supinanin	8.6

Table II— Cytotoxicity and inhibitory effects of syncytia formation of ellagitannins

Compound	syncytia formation						SI
	0	0.05	0.25	0.5	2.5	5 (ug/ml)	
control AZT	6/1*	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	>100
E1 corilagin	8/4	15/6	9/2	5/2	5/2	4/1(++)	6.0
E2 punicafolin	9/3	7/4	10/5	16/4	3.2	4/2(++)	1.2
E3 tercatain	7/4	6/3	5/2	4/2	4/1	2/1(++)	10.0
E4 geraniin	7/5	6/1	4/2	5/1	3/1	0/0(++)	15.0
E5 mallotusin	13/2	15/3	5/3	4/1	3/1	3/1(++)	13.0
E6 elaeocarpusin	11/2	8/1	5/2	4/3	0/0(+)*	0/0(++)	18.0
E7 bixanin	12/3	6/1	7/3	3/1	3/3	1/1(++)	8.0
E8 putranjivain A	8/2	7/2	8/2	6/1	8/2	2/1(++)	3.0
E9 acetonylgeraniin	6/2	6/2	6/1	4/1	5/1	1/4(++)	5.0
E10 carpinusin	7/5	9/4	0/3	4/1	3/2	2/0(++)	8.0
E13 hippomanin A	8/2	14/3	8/2	15/2	1/2	4/1(++)	1.4
E14 gemin D	17/7	11/4	8/2	11/1	0/0	0/0(++)	3.0
E15 pedunculagin	13/3	6/4	7/1	6/2	3/1	0/0(++)	8.0
E16 l-desgalloylgeraniin	11/3	11/3	8/2	4/3	1/1	2/1(++)	10.0
E17 eugeniin	12/7	8/2	4/3	8/3	2/0	3/3(++)	2.3
E18 casuarin	11/2	6/3	2/1	5/2	4/1	0/1(++)	5.0
E19 2, 4-(S)-HHDP-3, 6-anhydromannofuranose	6/3	7/1	2/2	6/1	1/3	2/0(++)	5.0
E20 rugosin E	7/3	3/1	5/1	8/3	9/1	4/2(+)	1.2
E21 excoecarianin	15/7	7/1	1/1	7/1	6/1	5/1(++)	1.2
E22 macaranganin	15/5	4/1	1/1	6/1	10/2	0/2(++)	3.0
E23 helioscopinin A	11/7	9/2	0/4	3/1	1/1	8/0(++)	1.0
E24 helioscopinin B	11/6	9/2	9/1	8/1	4/2	2/2(++)	3.0
E25 euphorscopin	8/3	7/2	5/1	2/6	0/0(+)	0/0(++)	12.0
E27 jolkianin	10/5	5/4	9/0	3/1	0/0(+)	0/0(++)	18.0

* a/b(a: number of large syncytia, b: number of small syncytia)

#+: 25% death, ++: 50% death of cell

다.

세포독성검사 - 각 시료의 세포에 대한 독성을 검사하기 위해 24-well 세포배양 plate 에 2.5×10^5 개의 supT1 cell을 넣고, 단계별로 희석한 시료를 처리하여 3일 배양한 후 생존한 세포의 수를 계산하여 시료의 독성여부를 판정하였다.

Syncytia forming inhibition assay - Reverse transcriptase 에 대하여 높은 저해활성을 보인 화합물들에 대하여 *in vitro* 에서 HIV-1에 대한 직접적인 저해활성을 측정하기 위하여 syncytia forming inhibition assay 를 실시하였다. 24 well 세포배양 plate에 2.5×10^5 개의 supT1 과 50TCID₅₀(50%-tissue culture infective dose)의 HIV-1 그리고 단계별로 희석한 시료를 함께 처리한 뒤 3일 후에 HIV-1에 의해 유도된 syncytia 의 갯수를 측정하여 저해정도를 측정하였으며, control 로는 azidothymidine을 사용하였다. 세포에 대한 독성은 적으면서 HIV-1 의 복제를 효과적으로 저해하는 시료를 선별하기 위하여 각각의 시료에 대해 selective index(SI) 를 계산하였다.

Selective index(SI)=

$$\frac{50\% \text{ cytotoxic dose in supT1 cells (CC}_{50})}{50\% \text{ inhibitory dose of syncytium formation(IC}_{50})}$$

결과 및 고찰

Reverse transcriptase는 virus의 RNA genome 을 DNA로 복제하는 역할을 담당하는 효소로서 anti-HIV drugs을 개발하는데 가장 매력적인 target으로 꾸준히 연구되어왔다. 지금까지 밝혀져 있는 reverse transcriptase 저해제로는 방선균에서 분리된 streptonigrin과 sakyomycin A¹⁰⁾, 해조류에서 분리된 sulfated polysaccharides¹¹⁾, 고등식물 유래의 fulvoplumierin¹²⁾, salaspermic acid¹³⁾ 등의 많은 화합물이 보고되었다. 최근 polyphenol 화합물이 다양한 생리활성을 나타내는 것에 착안하여 주로 대극과의 *Euphorbia* 속 식물에서 분리한 30 종의 ellagitannin 류에 대하여 reverse transcriptase 저해 활성을 측정하여 본 결과 분자내에 hexahydroxydiphenoyl(HHDP)

group 을 갖는 ellagitannin의 경우 거의 모든 시료에서 높은 활성을 보였으며 분자량의 크기에 따른 (E20-E22, E27은 dimeric ellagitannin) 뚜렷한 활성의 차이는 없었다. 또 분자내에 HHDP 이외에 HHDP group의 산화형인 dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP) group이 ascorbic acid, acetone 등과 같은 acyl group과 coupling 하여 좀더 bulky 한 group 으로 변한 경우 활성이 현저하게 저하되었다(E 9(E4, E11(E10, E12(E23, E26(E23, E28(E4). Ellagitannine 류의 화합물이 reverse transcriptase에 대하여는 높은 활성을 보였으나 실제로 항바이러스 활성을 측정해 본 결과, geraniin(E4), mallotusin(E5), elaeocarpusin(E6), euphorscopin(E25) 와 jolkianin(E27)등의 화합물이 각각 15.0, 13.0, 18.0, 12.0, 18.0 등의 높은 SI 값을 나타내면서 syncytia의 형성을 유의성있게 저해하였다. 일반적으로 식물 polyphenol인 tannin은 template primer-enzyme-nucleotide complex의 형성을 저해함으로 reverse transcriptase 저해 활성을 나타낸다고 보고되었다.⁶⁾ 그러나 탄닌의 이러한 저해활성 mechanism으로 인하여 탄닌이 항 virus 활성을 나타낸다고는 생각되지 않고 있으며, 탄닌의 항 virus 활성은 탄닌이 virion에 tight하게 결합함으로 virus와 cell 의 interaction을 방해하여 항 virus 활성을 나타낸다고 하며¹⁴⁾, 특히 functional group을 많이 가진 high molecular weight tannin이 nucleotide나 protein과 더 강력하게 반응하여 항 virus 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 최근 탄닌의 다양한 생리활성들이 계속 밝혀지고 있어 이 분야의 계속적인 연구가 기대된다.

결 론

대극과의 *Euphorbia* 속 식물로부터 분리된 30 여종의 ellagitannin들에 대하여 AMV reverse transcriptase 저해활성과 HIV-1 의 복제 저해활성을 측정하였다. 대부분의 ellagitannin 의 경우 AMV reverse transcriptase 에 대하여 1.4~20.0 ug/ml의 낮은 농도에서 IC₅₀ 치를 나타내었다. 분자내에 DHHDP group 이 다른 acyl group에 의해 coupling 되어 있는 화합물의 경우 활성이 현저하게 저하되었다. 높은 활성을 보인 ellagitannin들에 대하여 세포독성과 syncytia 의 형성 저해 활성을 조사하여 본 결과 geraniin, mallotus-

inin, elaeocarpusin, euphorscopin 과 jolkianin 등의 화합물이 syncytia 의 형성을 저해함으로서 유의성 있는 HIV-1 의 복제 저해활성을 나타내었다.

문 헌

- 1) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1625 (1983).
- 2) Lee, J., Lee, S. -H., Min, K. R., Lee, K. -S., Ro, J. -S., Ryu, J. -C. and Kim, Y.: Inhibitory effects of hydrolyzable tannins on Ca²⁺-activated hyaluronidase. *Planta Med.* **59**, 381 (1993).
- 3) Kashiwada, Y., Nonaka, G. -i., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janjen, W. P. and Lee, K. -H.: Tannins as selective inhibitors of protein kinase C. *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* **2**, 239 (1992).
- 4) Miyamoto, K., Kishi, N., Koshiura, R., Yoshida, T., Hatano, T. and Okuda, T.: Relationship between the structures and antitumor activities of tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 814 (1987).
- 5) Takechi, M. and Tanaka, Y.: Antiviral substances from the root of *Paeonia* species. *Planta Med.* **45**, 252 (1982).
- 6) Kakiuchi, N., Hattori, M., Namba, T., Nishizawa, M., Yamagishi, T., and Okuda, T.: Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *J. Nat. Prod.* **48**, 614 (1985).
- 7) Nishizawa, M., Yamagishi, Y., Dutschman, G., Parkor, W. B., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. -C., and Lee, K. -H.: Anti-AIDS agents. 1. Isolation and characterization of four new tetragalloylquinic acids as a new class of HIV reverse transcriptase inhibitors from tannic acid. *J. Nat. Prod.* **52**, 762 (1989).
- 8) Terwilliger, E. F., Godin, B., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A.: Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that express the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **86**, 3857 (1989).
- 9) Okada, H., Mukai, H., Inouye, Y. and Nakamu-

- ra, S.: Biological properties of streptonigrin derivatives II. Inhibition of reverse transcriptase activity. *J. Antibiotics* **39**, 306 (1986).
- 10) Nakashima, H. and Yamamoto, N.: Inhibition by sakyomycin A of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and proliferation of AIDS-associated virus (HTLV-III/LAV). *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **77**, 324 (1986).
- 11) Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N.: Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1524 (1987).
- 12) Tan, G. T., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. and Hughes, S. H.: Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-I) reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* **54**, 143 (1991).
- 13) Chen, K., Shi, Q., Kashiwada, Y., Zhang, D., C., Hu, C., -Q., Jin, J., -Q., Nozaki, H., Kikuski, R. E., Tramontano, E., Cheng, Y., -C., McPhail, A. T., and Lee, K., -H.: Anti-AIDS agents, 6. Salaspermic acid, an anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*, and the structure-active correlation with its related compounds. *J. Nat. Prod.* **55**, 340 (1992).
- 14) Nonaka, G., -I., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R., Cheng, Y., -C. and Lee, K., -H.: Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53**, 587 (1990).