

## 생열귀나무의 항 HIV-1 protease 작용과 생체내 과산화지질생성 저해효과

박종철,\* 김석남,<sup>1</sup> 장광진,<sup>2</sup> 최종원<sup>3</sup>

순천대학교 한약자원학과, <sup>1</sup>정선생열귀영농조합법인,

<sup>2</sup>한국농업전문학교 특용작물과, <sup>3</sup>경성대학교 약학과

### Anti-HIV-1 Protease Activity and *in Vivo* Anti-lipid Peroxidative Effect on *Rosa davurica*

Jong Cheol Park,\* Suk Nam Kim,<sup>1</sup> Kwang Jin Chang<sup>2</sup> and Jong Won Choi<sup>3</sup>

Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University,

Suncheon 540-742, Republic of Korea

<sup>1</sup>Jungsun-RoseHip, Yongtan-ri, Jungsun-kun, 233-800, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Industrial Crops, Korea National Agricultural College, RDA,

Suwon 445-890, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Republic of Korea

**Abstract** – Anti-human immunodeficiency virus (HIV) type I protease (PR) and anti-lipid peroxidation effects on *Rosa davurica* were investigated. Of the various parts tested from *R. davurica*, the water extracts of stem and leaves inhibited the HIV-1 PR activity by more than 45% at a concentration of 100 µg/mL. Hyperoside from the pericarp of title plant showed 25% inhibition on HIV-1 PR at 200 µM. The methanol extract of the root of *R. davurica* reduced the level of lipid peroxides induced by bromobenzene *in vivo*.

**Key words** – *Rosa davurica*, Rosaceae, HIV-1 protease, protease inhibitor, bromobenzene-induced rat, lipid peroxidation

생열귀나무 (*Rosa davurica* Pall.)는 장미과에 속하며 소화불량, 위통, 월경불순 등의 치료에 사용되는 약용식물이다.<sup>1)</sup> 특히 중국 동북지방에 널리 분포되어 있으며, 열매에 비타민 C가 풍부하게 함유되어 중국 민간에서는 강장음료로 사용하고 있다.<sup>2)</sup> 이 식물에 대한 성분연구로는 과피<sup>2)</sup>에서 betulinic acid, aliphatic acid, oleanolic acid, maslinic acid, ursolic acid, pomolic acid, tormentic acid, euscaphic acid 등의 triterpene과 quercetin, hyperoside, tiliroside 등의 flavonoid, 그리고 뿌리<sup>3,4)</sup>에서는 davuricin D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, casuarictin, agrimoniin, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose 등의 tannin이 분리되어 있다. 에이즈는 Human

Immunodeficiency Virus (HIV)에 의해 발생하는 질병이며, HIV는 에이즈바이러스 입자를 세포외에 방출할때는 protease가 필요하다. 생물공학을 이용하여 얻은 HIV protease에 대한 억제반응과, bromobenzene으로 간독성을 유발한 흰쥐에서 과산화지질생성에 미치는 영향을 생열귀나무를 실험재료로 사용하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

**식물재료 및 화학물** – 실험에 사용한 생열귀나무는 1998년 9월 2일 정선생열귀영농조합 (강원도 정선군 정선읍 용탄리)에서 재배한 것을 채집하여 음건, 사용하였으며 표준품은 순천대 한약자원학과 표본실 (표본번호: 0353)에 보관중이다. 이 식물은 부위별로 메

\*교신저자 : Fax : 061-752-8551

타늘 또는 물을 가하여 수욕상에서 환류냉각하면서 추출물을 제조하였으며, 플라보노이드인 hyperoside는 해당화에서 저자 등<sup>3)</sup>이 이미 분리한 화합물을 사용하였다.

**HIV-protease 분석** - HIV-1 protease는 일본 도야마의과대학 Hattori 교수로부터 제공받아 Kusumoto 등의 방법<sup>6)</sup>에 의해 준비하였다. 기질은 oligopeptide [(His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-(pNO<sub>2</sub>-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH<sub>2</sub>] (단백질연구소, Osaka, Japan)를 구입하여 완충액 (50 mM NaOAc, pH 5.0)에 2 mg/mL 농도로 희석하여 사용하였다. 반응혼합물은 50 mM NaOAc (pH 5.0) 1 μL, 기질용액 1 μL, 생열귀나무 추출물 또는 성분 1 μL, 효소용액 2 μL을 각각 가하여 전체 5 μL로 조제하였다. 물 추출물은 증류수에, 메타놀 추출물과 성분은 DMSO에 녹여 사용하였으며, 농도로서 추출물은 100 μg/mL, 화합물은 100 μM 또는 200 μM으로 제조하였다. 37°C에서 1시간 반응시킨 후 90°C에서 60초간 가열하여 효소 반응을 정지시킨 후, 이 반응혼합물을 증류수 35 μL로 희석한 후 HPLC 분석을 위해 5 μL 취하였다. 대조군은 샘플 대신 증류수 또는 DMSO를 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다.

**HIV분석을 위한 HPLC - HPLC system**은 LC 9A liquid chromatograph, SPC-6A UV spectrophotometric detector, auto injector SIL-6B, integrator C-R6A Chromatopac (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)로 구성된 것을 사용하였으며, column은 Li-Chrospher 100 RP-18 (column size, 250×4 mm, Merck, Darmstadt, FRG), flow rate 1.0 ml, 40°C에서, 용매는 0.1% TFA중에서 20%-50% acetonitrile의 gradient로 분석하였다. 기질과 그의 가수분해물은 UV 280 nm에서 retention time이 각각 11.72와 5.3분에서 검출되었으며, 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

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

**과산화지질 함량 측정용 실험동물** - 일정한 조건으로 사육한 Sprague-Dawley계 숫쥐를 사용하여 고형 사료 및 일정한 조건하에서 충분히 적응시킨 후 사용하였다. 독성물질인 브로모벤젠은 460 mg/kg 되게 현탁시켜 12시간 간격으로 2일간 흰쥐에 복강주사하며,<sup>7)</sup> 전처리로 생열귀나무 추출물은 1주간 500 mg/kg 경구 투여하고, 대조군은 동량의 생리식염수와 1% tween 80을 투여하였다.

**간조직중 과산화지질 함량 측정** - 간 조직 1 g당 9 배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고, 이 마쇄액에 8.1 % sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시켜 n-BuOH-pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리한 후 홍색의 n-BuOH-pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정한 다음 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당 malondialdehyde n mole 수로 표시하였다.<sup>8)</sup> 통계처리는 Duncan's multiple range test로 하였다.

## 결과 및 고찰

생열귀나무는 중국 흑룡강성, 길림성 등의 동북지방에서 많이 재배되면서 강장제로 사용되고 있다. 이 식물의 활성연구의 일환으로서 항HIV작용과 지질과산화생성억제작용을 관찰하였다.

1981년 미국의 질병관리센터가 처음으로 에이즈 환자를 보고한 이래 전세계적으로 환자 및 감염자가 급속히 증가되고 있다. 국내 HIV 감염자수(환자포함)도 지속적인 확산을 보이고 있으며 앞으로도 감염자수의 증가가 예상된다. 에이즈로 인한 문제를 해결하고자 세계각국에서 여러가지 연구가 진행되고 있으며 에이즈 백신보다는 치료제를 개발하는 것이 더욱 빠른 시일내에 성공가능한 것으로 판단하고 있다. 현재 에이즈치료제로 AZT등이 환자에 투여되고 있으나 아직까지 획기적인 물질은 개발되지 못하고 있다.

에이즈는 후천성면역결핍증후군으로 HIV에 의해 발생되는 질병이다. 바이러스는 자신만으로는 살 수 없고, 숙주가 필요하며 세균보다도 작은 입자이다. 에이즈바이러스 (HIV) 경우, 직경이 약 100 nm이고 사람의 "Helper-T cell"이라 불리는 면역세포를 숙주로 하여 침입하고 핵안에 있는 유전자 안에 자신의 유전자를 넣는다. 이 HIV는 인간에게는 없는 효소 및 효소의 유전자를 가지고 있다. 인간의 유전자는 DNA이지만 HIV 유전자는 RNA이므로, 인간의 면역세포 유전자에 들어가기 위해서는 reverse transcriptase가 필요하며, 또 자손의 HIV 입자를 세포외에 방출할 때는 protease를 필요로 하게 된다.<sup>9,10)</sup> 인간에게는 없고 HIV만이 가지고 있는 효소에 대한 억제물질을 찾는 것이 가능하면 인간의 생체내 반응에는 영향을 주지 않고, 에이즈만을 특이적으로 공격하는 것이 가능하게 되고, 에이즈치료약으로 될 가능성도 있다. 따라서

HIV 억제제 개발을 위한 기초연구로서 생물공학을 이용하여 얻은 HIV-1 protease를 사용하여 일어나는 화학반응을 생열귀나무가 어느정도 억제반응을 보이는가 HPLC를 이용하여 측정하였다.

HIV-1 protease에 대한 생열귀나무의 부위별 추출물 100 µg/mL 농도에서의 실험에서 줄기와 잎의 물 추출물은 49.5%와 47.8%, 뿌리의 메타놀 추출물도 비교적 강한 37.4% 저해효과를 나타내었다. 뿌리의 물추출물은 32.0%, 잎, 줄기, 씨, 과피의 메타놀 추출물도 각각 29.5%, 27.0%, 26.0%, 21.7%의 억제작용이 관찰되었다. 생열귀나무 과피에서 분리된 바 있는 플라보노이드인 hyperoside는 200 µM 농도에서는 24.6%의 HIV-1 protease 저해작용이 나타났다 (Table I).

브로모벤젠은 간독소의 일종이며 cytochrome P-450 monooxygenase에 의해 bromobenzene 2,3-oxide와 bromobenzene-3,4-oxide로 전환된다. 3,4-oxide는 독성물질로서 epoxide hydrolase에 의해 독성이 없는 bromobenzene-3,4-dihydrodiol로 대사되며 또는 glutathione S-transferase에 의하여 bromobenzene glutathione 으로 배설되기도 한다.<sup>11)</sup> 이 때 쉽게 비독성화 되는 것보다 독성이 큰 3,4-oxide가 많이 생성되면 세포손상이 증가된다. Bromobenzene으로 간 독성을 유발한 흰쥐에서의 간 과산화지질 함량을 생열귀나무의 경구투여로 관찰하였다. 과산화지질은 미토콘드리아, 마이크로솜 등에서 산화되어 polyunsaturated fat로부터 생성된다. 세포막에는 polyunsaturated fatty acid를 함유하는 인지질이 풍부하므로 과산화지질의 생성은 세포손상 등을 초래할 수 있다.

생열귀나무로 전처리하고 bromobenzene으로 독성

**Table I.** HIV-1 protease inhibitory effects of the extract of *Rosa davurica* and hyperoside

sample	extract	concentration	inhibition (%)
leaves	water	100 µg/mL	47.8 ± 2.6
	methanol	100 µg/mL	29.5 ± 1.4
stem	water	100 µg/mL	49.5 ± 3.7
	methanol	100 µg/mL	27.0 ± 2.2
root	water	100 µg/mL	32.0 ± 6.7
	methanol	100 µg/mL	37.4 ± 3.4
seed	water	100 µg/mL	6.6 ± 7.4
	methanol	100 µg/mL	26.0 ± 1.0
pericarp	water	100 µg/mL	6.5 ± 5.7
	methanol	100 µg/mL	21.7 ± 8.3
hyperoside		200 µM	24.6 ± 10.1

The results are the mean ± S.D. of 3 replications.

**Table II.** Effect of the extract of *Rosa davurica* on the hepatic lipid peroxidation in bromobenzene-treated rats *in vivo*

group	dose (mg/kg)	content*	%
control		20.8 ± 3.08 <sup>c</sup>	
bromobenzene	460 / i.p.	56.5 ± 8.92 <sup>a</sup>	100
root extract	500 / p.o.	42.9 ± 4.95 <sup>b</sup>	76
seed extract	500 / p.o.	49.5 ± 5.29 <sup>ab</sup>	88

Rats were orally administered by the methanol extract of *R. davurica* daily for one week and then bromobenzene (BB, 460 mg/kg) was i.p. injected four times with 12 hrs interval for final two days. Rats were decapitated 12 h after the injection of BB treatment. The values are mean ± S.D. of 5 animals.

Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

\*unit: malondialdehyde n mole/g of tissue.

을 유발한 흰쥐의 간장중 과산화지질 함량을 관찰하였다. 즉 bromobenzene 투여로 과산화지질의 생성은 정상군에 비해 172% 증가되었다. 이 함량은 생열귀나무 뿌리와 씨 추출물의 500 mg/kg 경구투여 전처리에서 각각 24% 및 12%로 함량이 줄었다 (Table II). 따라서 생열귀나무의 뿌리와 씨에는 간독성물질인 브로모벤젠에 의해 증가된 과산화지질의 함량의 생성을 억제하는 작용이 있음을 관찰할 수 있다. 생열귀나무의 항HIV 화합물과 bromobenzene대사계에 대한 활성물질 연구는 현재 진행중이다.

## 결 론

생열귀나무를 실험재료로 하여 HIV protease에 대한 억제반응과, bromobenzene으로 간독성을 유발한 흰쥐에서 과산화지질생성에 미치는 영향을 검토하였다. 생열귀나무의 부위중에서 줄기와 잎의 물 추출물 그리고 뿌리의 메타놀 추출물이 HIV-1 protease의 저해효과를 나타내었다. 이 식물의 과피에서 분리된 hyperoside는 200 µM 농도에서 25% 저해작용이 관찰되었다. Bromobenzene으로 처리한 흰쥐에서 생열귀나무 뿌리의 경구투여는 간장중의 지질과산화 생성을 억제하였다.

## 사 사

HIV-1 protease 활성분석에 도움을 준 일본 도야마 의과약과대학 화학약연구소의 Masao Hattroi 교수와 Hirotsugu Miyashiro 조교수에게 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Shanghai Science and Technological Publisher (1985) "The Dictionary of Chinese Drugs" Vol. 2, Shougakukan, Tokyo, p.1100.
2. Kuang, H., Kasai, R., Ohtani, K., Liu, Z., Yuan, C. and Tanaka, O. (1989) Chemical constituents of pericarps of *Rosa davurica*, a traditional Chinese medicine. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2232-2233.
3. Yoshida, T., Jin, Z. X. and Okuda, T. (1989) Taxifolin apioside and davuriciin M1, a hydrolysable tannin from *Rosa davurica*. *Phytochemistry* 28: 2177-2181.
4. Yoshida, T., Jin, Z. X. and Okuda, T. (1991) Hydrolysable tannin oligomers from *Rosa davurica*. *Phytochemistry* 30: 2747-2752.
5. Park, J. C. and Ok, K. D. (1993) Phenolic compounds isolated from *Rosa rugosa* in Korea. *Yakhak Hoeji* 37: 365-369.
6. Kusumoto, I. T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba, T. and Shimotohno, K. (1995) Screening of various plant extracts used in Ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phytotherapy Research* 9: 180-184.
7. Zampaglione, N., Jollow, D. J., Mitchell, J. R., Manrick, M. and Gillette, J. R. (1973) Role of detoxifying enzymes in bromobenzene-induced liver necrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 218-227.
8. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
9. McQuade, T. J., Tomasselli, A. G. and Liu, L. (1990) A synthetic HIV-1 protease inhibitor with antiviral activity arrests HIV-like particle maturation. *Science* 247: 454-456.
10. Meek, T. D., Dayton, B. D. and Metcalf, B. W. (1989) Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in *Escherichia coli* behaves as a dimeric aspartic protease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 1841-1845.
11. Croci, T. and Williams, G. M. (1985) Activity of several phase I and phase II xenobiotics biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3029-3035.

(2000년 7월 6일 접수)