

甘草湯의 Human Immunodeficiency Virus-1 抑制能에 關한 研究

*李 泰 均 · **文 濬 典

Anti-HIV-1 Viral Activity of Glycyrrhizin

Tae-kyun Lee · Jun-Joon Moon

College of Oriental Medicine Dong Guk Univ. Kyung Ju Korea.

ABSTRACT

The microculture XTT antiviral assay method is used to quantitate HIV-1 induced cytopathic effects as modulated by test substances. This relatively simple assay facilitated the safe and rapid determination of in vitro antiviral activity of selected chemicals as well as direct cytotoxicity. This experiment also confirmed that this system measures infection and subsequent viral replication in target cells and XTT formazan formations correlated with the accumulation of extracellular virions, as measured by quantitative HIV-1 induced syncytium formation.

The present results with Glycyrrhizin using this in vitro culture system demonstrated that effective dose, EC50 (the concentration at which increases XTT formazan production in infected cultures to 50% of that in untreated, uninfected controls) was 250g/ml. As comparison, AZT was included in this experiment and demonstrated that EC50 AZT of was 0.05g/ml, approximately 5,000 times more potent than Glycyrrhizin based on EC50 ratio's alone.

However, this potency is limited by severe cytotoxicity of AZT, while Glycyrrhizin is approximately 16 times less toxic (IC50 of Glycyrrhizin 800 and AZT 51 g/ml).

While AZT's anti-HIV-1 viral activity is mediated by inhibition of reverse transcriptase of the virus, Glycyrrhizin failed to demonstrate any inhibitory activity against reverse transcriptase.

Further study is necessary in order to understand the precise mechanisms of Glycyrrhizin action against HIV-1 viruses.

* 東國大學校 韓醫科大學 婦人科學教室

** 東國大學校 韓醫科大學 病理學教室

Although Glycyrrhizin is less effective antiviral agent than AZT, much less toxicity of Glycyrrhizin is desirable in terms of chronic treatment. Combination treatment of AZT and Glycyrrhizin may be therapeutically beneficial.

Clinical effectiveness of two drug combination therapy for AIDS patient is unknown at this time. However, this experimental investigation presents the scientific rational basis for such therapeutic approach.

I. 緒 論

後天性 免疫缺乏 症候群(Acquired Immuno-Deficiency Syndrome, AIDS)은 死亡率이 높은 感染疾患으로, 1981년 5월 美國에서 男性 同性戀愛者와 靜脈注射 麻藥 中毒者에서 처음 보고^{36, 37}된 이후, 現代 醫學이 당면하고 있는 가장 큰 과제중의 하나이다. 이 질환은 뚜렷한 원인없이 免疫缺乏이 심하게 나타나며, 臨床的으로는 重症의 機會 感染과 Kaposi's 肉腫을 동반하는 症候群으로 초기에 임상적 정의를 내렸다.³⁸ 1983년 原因 病原體가 분리됨으로서 診斷과 疫學, 그리고 發生 機轉 등을 명확히 규명할 수 있는 계기가 되었으며, 후에 이 바이러스의 명칭이 Human Immunodeficiency Virus (HIV)로 통일 命名되었다³⁹. HIV는 두가지의 형태가 있는데, HIV-1은 세계적으로 流行하는 AIDS의 原因 病原體이며, HIV-2는 어떤 면에 있어서는 AIDS와 관련성을 가지고 있지만, 그 作用面에 있어서는 HIV-1에 比하여 有毒性이 弱하게 나타나며 주로 서아프리카에서 發病한다. 현재 전세계적으로 HIV-1 감염자는 백만에서 천만을 헤아리며, 우리나라에서도 1990년 3월말까지 보고된 HIV-1 감염자는 모두 85명으로, 이들 중 9명이 사망하고 1명이 출국해서 남자 63명 여자 12명 등 75명이 특별관리를 받고 있다.

AIDS의 원인이 HIV-1이고, AIDS는 HIV-1

감염의 마지막 단계에 나타남이 밝혀지면서 HIV-1감염의 全段階에 대한 研究가 활발히 이루어 졌다. 1986년 Robert 등⁴⁰은 HIV-1감염을 Walter Reed Classification System에 依據하여 6단계로 分類하였으며, AIDS는 마지막 단계인 제 6단계로 機會感染의 발생이 그 特徵이다.

HIV-1 표면의 糖蛋白質인 gp120이 T₄-세포 표면의 CD₄ 收容體에 결합하면서 감염은 시작된다⁴¹. T₄-세포내에서 RNA-genome은 DNA로 逆傳寫되어 세포의 DNA에 插入된 후 새로운 viral RNA와 蛋白質을 합성하고, 이에 따른 또 다른 바이러스를 형성하여 T₄-세포를 죽이게 된다.

따라서 바이러스의 增殖이 T₄-세포의 破壞를 초래하며, 특히 감염된 T₄-세포가 활성화되면 바이러스의 증식이 증가되어 T₄-세포의 파괴도 현저히 증가한다. 이러한 표적세포의 활성화가 세포의 충분한 감염과 바이러스의 증식에 필수적이다. 그러나 HIV-1의 증식은 T₄-세포의 일부에서만 관찰되기 때문에 바이러스의 증식으로 인한 T₄-세포의 감소로는 AIDS를 초래할 만큼 充分하지가 않다⁴². 최근 보고에 의하면 T₄-세포의 파괴는 HIV-1의 증식 뿐 아니라 syncytia의 형성과 cytotoxic 세포에 의해서도 일어난다고 한다⁴³. HIV-1 감염이 진행되는 동안 T₄-세포는 수가 감소될 뿐아니라 기능면에서 缺陷이 생겨 抗原에 대한 特異性 反應이 현저히 低下되어 있다⁴⁴

56). 반면에 HIV-1은 B-세포를 활성화시켜 hypergammaglobulinemia를 초래하고⁵⁴⁾, 免疫複合體와 自家抗體의 생성을 증가시킨다^{60, 75)}. 또한 HIV-1은 단구, 대식세포, dendritic 세포 등을 감염시키지만, 이들 세포에서는 HIV-1의 증식만 일어나고 세포가 죽지 않기²⁹⁾ 때문에 바이러스 전파에 중요한 역할을 한다⁵⁸⁾. HIV-1 감염은 서서히 진행되어 평균 7~8년이 지나고 나서야 AIDS로 진행되며, 이와 비례하여 T₄-세포의 수도 감소한다.

HIV-1이 AIDS의 원인임이 알려진 이후, 치료제의 개발에 많은 연구가 진행중인데, 그 가운데에서 2', 3'-dideoxynucleosides 계열의 약제(AZT, DDC, DDI, 그리고 D4T 등)가 다소 효과가 있다고^{27, 32, 38, 40, 74, 79, 95)} 보고 되었다. 그러나 이들 약제는 副作用이 심하여 치료제로서 계속 활용되기에는 상당한 制限이 있는 것으로 보인다.

역사적으로 대부분의 西洋에서 開發된 藥劑는 單一 成分으로 特異的인 藥理作用을 가지는데, 이러한 치료제는 호르몬 감소로 인한 질환의 치료나 感染疾患, 그리고 末梢 혹은 中樞 神經系 疾患의 치료에 우수한 효과를 나타내지만, cytotoxic drugs의 경우는 특별한 종류의 세포에만 선택적으로 작용하지 못하기 때문에 병적 세포와 함께 정상세포도 공격하게 됨으로서 심한 부작용이 나타나게 된다. 이러한 이유로 최근에는 癌患者의 치료 등에, 東洋에서 수세기 동안 臨床에 活用되어온 東洋醫學의 치료법이 注目을 받고 있다. 이러한 치료법은 人體의 恒常性(homeostasis) 維持에 基本을 두고 있으며, 치료약물로는 韓藥을 辨證에 맞추어 단일 혹은 복합적으로 투여함으로써, 主藥劑는 病的 細胞나 原因 物質을 공격하고, 나머지 藥劑는 主藥劑의 作用을 돕거나, 副作用을 極小化하도록 한다는 것이다.

최근에 甘草의 活用に 關한 研究로 抗바이러스 작용^{6, 76)}, 免疫調節 作用¹⁶⁾, ACTH 및 MSH의 分泌抑制^{49, 66, 87)}, 인터페론의 分泌增加 및 NK cells의 活性誘導 등이 報告되고 있는데¹⁷⁾, 東洋醫學에서 甘草는 神農本草經에 “甘草味甘平 主五臟六腑寒熱邪氣 堅筋骨 長肌肉 倍力 金瘡腫 解毒 久服輕身延年”이라고^{9, 14)} 記述된 이후, 咳嗽, 口渴, 藥物解毒, 腹痛, 一切虛損, 咽痛, 瘡疽, 小兒胎毒 등에^{3, 13, 35)} 활용되고 있다. 甘草湯은 傷寒論 少陰病 咽痛에 “¹¹⁾ 활용되고 있으며, 이에 대해 席 등은 “甘草는 性涼하여 清熱解毒할 수 있다. 따라서 肌肉을 生하고, 瘡腫毒을 治愈할 수 있으며, 咽喉腫痛도 치료할 수 있다”고⁷⁾ 하였다.

이러한 甘草의 成分은 단맛이 나는 백색 결정 분말의 Glycyrrhizin (6~8%) 과, 糖分, 澱粉(29%), 蛋白質, 脂肪(0.8%), resin, asparagin(2~4%), 그리고 약간의 tannin 등으로 구성되어 있으며, 그 주요 성분은 Glycyrrhizin으로 알려져 있다.⁹⁾

이에 著者는 甘草湯이 HIV-1 바이러스의 增殖을 抑制할 수 있는지를 알아보기 위한 目的으로 XTT formazan formation法과 Reverse transcriptase activity 측정법을 이용하여 HIV-1에 감염된 細胞의 傷害程度를 檢査하고, 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. Glycyrrhiza.glabra L. 로 부터 glycyrrhizin 의 抽出^{20, 43, 52)}

乾燥된 G. glabra 1 kg 을 粉碎하여 乾燥粉末을 만든후 증류수 5 L 를 가하여 80~100 °C에서 4시간동안 추출하였다. 추출물을 Whatman No. 1 종이 여지로 거른후 추출물을 冷凍乾燥하였다. 냉동건조한 추출물 400g 에

glacial acetic acid 1.5 L 를 가하여 60~70°C 에서 1시간 진탕한 후 실온에 1~2일간 放置하였다. 이를 다시 Buchner funnel로 여과하여 진공건조기로 적당히 건조시킨 다음 600 ml 의 뜨거운 80% ethanol 에 다시 녹여 100 °C로 15분간 加溫 후 이를 4°C에 1~2일간 방치하여 crystallization 시키고 濾過하였다. Crystallization 과정을 4~5회 반복하고 Norit 를 添加 후 加熱하여 색깔을 제거하여 白色 結晶粉末을 얻었다.

2. Glycyrrhizin의 antiretroviral activity의 檢査 原理

AIDS 에 대한 抗바이러스 能을 檢査하기 위한 理想的인 動物實驗 모델이 아직 확립되지 않은 상태인데, 최근 미국의 National Cancer Institute 에서 실험적으로 이를 검사할 수 있는 방법을 개발하였다⁹⁷⁾. 이 방법은 cell free HIV나 HIV가 감염된 H9 세포를 숙주 세포와 같이 培養함으로써 일어나는 실험적 감염을, 藥劑가 얼마나 抑制할 수 있는가를 檢査한다. 그 原理는 T-cell derived cell lines 에 HIV가 감염되면 세포가 파괴되는 原理를 利用한 것인데, 살아있는 세포는 tetrazolium reagent(2, 3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonphenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide (XTT))를 還元시켜 색을 나타내는 formazan으로 변하게 한다. 이에 약제를 첨가하지 않은 것과 약제를 첨가한 것이 상호 비교되어 어느 정도의 保護能을 가지는가를 formazan 의 양에 따른 색의 程度를 일반 비색 정량기로 측정함으로써 알 수 있다. 이 방법은 지금까지 infectious virus를 定量하는 방법인 syncytium formation 법이나 p24 antigen 검사법보다 매우 간편하고 정확하다.

3. Cell lines 과 viruses

HIV-1 이 감염할 宿主細胞로는 CEM-SS

세포주⁶⁸⁾를 이용하였으며, HIV-1을 생성하는 세포는 慢性的으로 HIV-1 이 감염되어 있는 H9 세포주를 이용하였다. 모든 세포는 10% fetal calf serum과 gentamicin 50 ug/ml이 함유된 RPMI-1640 media 에서 培養하였다.

4. XTT assay⁹⁷⁾

표1에 나타난 것과 같이 두가지의 방법으로 抗바이러스 能을 試驗하였다. 표1-A 는 HIV가 감염되어 있는 H9 세포를 바이러스의 source 로 이용한 것을 나타낸 것이다. 96 well microtiter plate의 각 well 에 target cell 인 CEM-SS 104 cells과 HIV infected H9 400 cells 을 함유하는 溶液 100 ul와 약제 혹은 media 100ul를 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 7일간 배양한 후 XTT 1 mg/ml과 0.01~0.02 mM의 N-methylphenazonium methosulfate (PMS ; Polysciences, Washington, PA) 混合液 50ul를 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 plates 를 adhesive plate sealers 로 덮고 450 nm 에서의 흡광도를 ELISA reader 를 이용하여 측정하였다.

표1-B는 HIV infected H9 세포를 이용하지 않은 cell free virus infection 에 의한 것을 나타낸 것이다. CEM-SS 세포를 hexadimethrine bromide (polybrene) 1-2 ug/ml 溶液으로 처리한 후, 50ml tube 내에서 cell free virus 와 함께 37°C, 5% CO₂의 배양기 내에서 1시간 반응시켜 100ul씩 각 well 에 분주하고 약제 혹은 media 100ul를 첨가하여 7일간 배양 후 위와 같은 방법으로 XTT formazan 생성에 의한 발색정도를 측정한다.

결과의 해석은 藥劑의 效能을 나타내 주는 EC50(HIV-1 감염과 함께 약제를 투여한 세포에서 생성되는 XTT formazan 의 양이 감염되지 않고 약제도 투여하지 않은 세포에 의한 XTT formazan 형성의 50% 에 해당하는

약제의 농도, protection in infected cells) 과 藥劑의 毒性을 나타내 주는 IC50(감염되지 않은 세포에 약제만 투여하였을 때, 감염되지 않고 약제도 투여하지 않은 군에 비하여 XTT

formazan 형성이 50% 되는 때의 약제농도, cytotoxicity in uninfected cells) 그리고 IC50 /EC50 으로 표현되는 therapeutic index 로 나타내었다.

표1. Time lines of critical events in drug-screening protocols.

A.			
07 days post incubation	4 hrs later
Pipette 10,000 target cells,		Add XTT & PMS	Cover with
mixed with 400 HIV-infected		(50 ul)	adhesive.
or uninfected H9 cells in 100 ul.			Mix.
Add dilutions of test drug.			Read O.D.
B.			
01 hr7 days4 hrs
Treat cells with	Distribute/well	Add XTT	Cover.
polybrene. Infect	100 ul cells	&	Mix.
cells in 50 ml tubes	100 ul test drug	PMS	Read O.D.
with cell free HIV-1			

5. Syncytium assay⁶⁸⁾

細胞培養 上層液 내에서 감염시킬 수 있는 바이러스를 定量하기 위하여 syncytium assay 를 시행하였다. 培養 上層液 40 ul 를 단계적으로 회석하여 CEM-SS cell monolayers 에 첨가한 후 syncytia 형성정도를 SFU(syncytia forming unit)/ml 의 단위로 나타내었다.

6. Reverse transcriptase activity⁶⁷⁾

AMV (avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase (RT) (P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee, WI) 1 unit 에 여러 농도의 SAE (sea algal extract from Schizymania pacifica, cytotoxicity 는 없으면서 AMV 의 RT 를 억제하는 물질) 또는 glycyrrhizin 용액 50 ul 와 동량의 reaction mixture (50 mM Tris HCl

pH 8.4, 2mM dithiothreitol, 100mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 50 ug/ml of poly(rA)-oligo(dT)P-L Biochemicals), and 1. 25 uCi O³H-dTTP (57 mCi/mmol)) 를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 5% trichloroacetic acid 200 ul 를 첨가하여 반응을 중지시키고 침전물을 glass fiber filter 를 통과시켜 여과한 후 liquid scintillation counter 로 radioactivity 를 측정한다. SAE 의 1 inhibitory unit (IU) 는 1 U 의 AMV-RT 의 활성도를 50% 억제하는 것으로 정한다.

7. 통계처리

실험한 것에 적절하게 변수를 분석한 후, 유의성 검정은 Student's t-test 를 이용하였다.

III. 實驗成績

1. XTT formazan 형성에 의한 HIV-1 抑制能 試驗法

그림 1 은 7일간의 세포배양에서 XTT formazan 의 형성을 표시한 것이다. HIV 에 감염되지 않은 세포에서 XTT formazan 의 생성은 4일 까지는 계속 增加하다가 그 이후는 plateau 를 형성 하였고, HIV 에 감염된 세포에서 XTT formazan 생성은 3일 까지는 대조군과 별 차이를 보이지 않았으나 4일 이후부터는 약 80% 정도의 감소를 보였다. 감염된 세포에서의 XTT formazan 법과 syncytium assay 법에 의한 배양상층액 내의 바이러스의 정량법과는 그 결과가 잘 일치하였다.

(그림2). Trypan blue dye exclusion 법으로 측정된 살아있는 세포의 수와 cell viability

검사에서 감염되지 않은 세포군에서는 7일 동안 세포수가 계속 증가하였으며 cell viability 도 약 95% 정도로 거의 변화가 없었으나 HIV 에 감염된 세포군에서는 살아있는 세포의 수와 cell viability 모두 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. (그림3, 4).

2. Glycyrrhizin 의 HIV-1 抑制能의 檢査

그림 5와 6에서 나타난 것과 같이, AZT의 경우는 藥劑의 效能을 나타내는 EC50 은 0.05 ug/ml, 藥劑의 毒性을 나타내는 IC50 은 51 ug/ml, 그리고 in vitro therapeutic index (IC50/EC50) 는 1,002 였으며, Glycyrrhizin 의 EC50 은 250 ug/ml, IC50 은 800 ug/ml, 그리고 in vitro therapeutic index (IC50/EC50) 는 3.2로서 AZT가 Glycyrrhizin에 비하여 效能面에서는 優秀하지만 藥劑의 毒性은 더 強하다는 것을 알수 있다(표2).

Table 2. Comparison of EC50 and IC50 between AZT and Glycyrrhizin.

	EC50	IC50
AZT	0.05	51
Glycyrrhizin	250	800

* EC50 represents concentrations of drugs that protects XTT formazan formation in infected cultures to 50% of that in untreated uninfected control cells.

* IC50 represents inhibitory or toxic concentration of drugs that reduces XTT formazan formation in uninfected cultures to 50% of that in untreated, uninfected control cell.

* The concentrations of EC50 and IC50 are expressed as ug/ml.

XTT & formazan formation

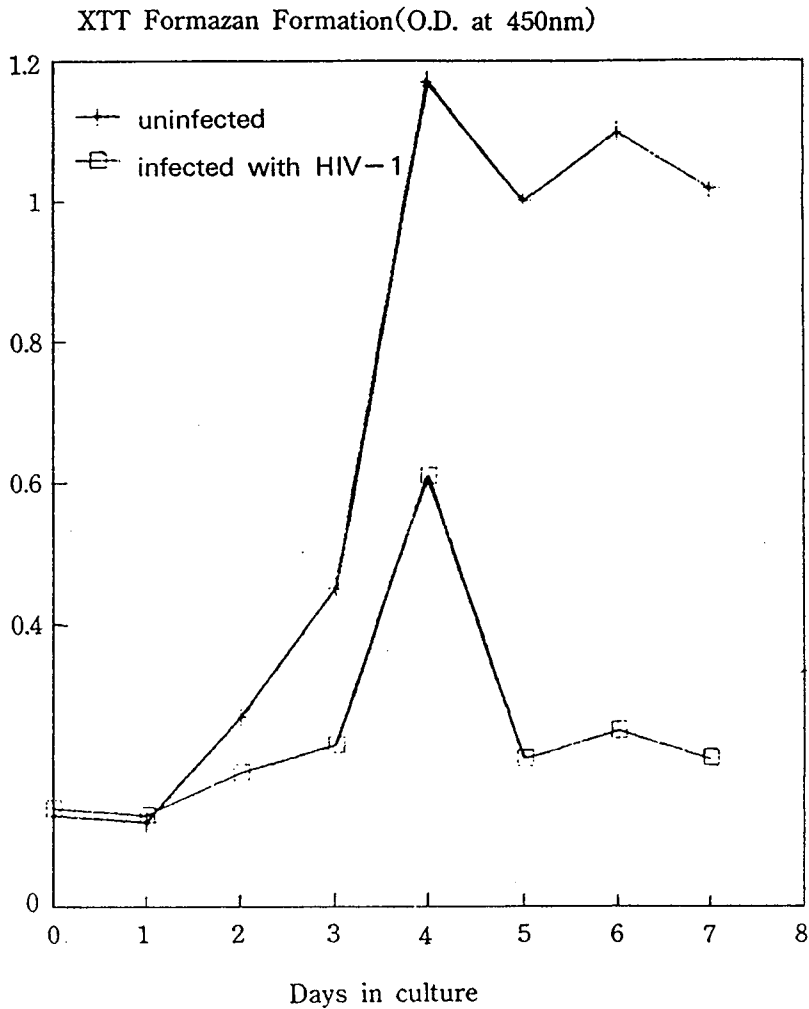


Fig 1. XTT formazan formation in the CEM-SS cells. 10,000 CEM-SS cells are mixed with 400 infected or uninfected H9 cells per well. Samples are taken from triplicated assays of XTT formazan over 7-day incubation periods.

XTT & Syncytium formation

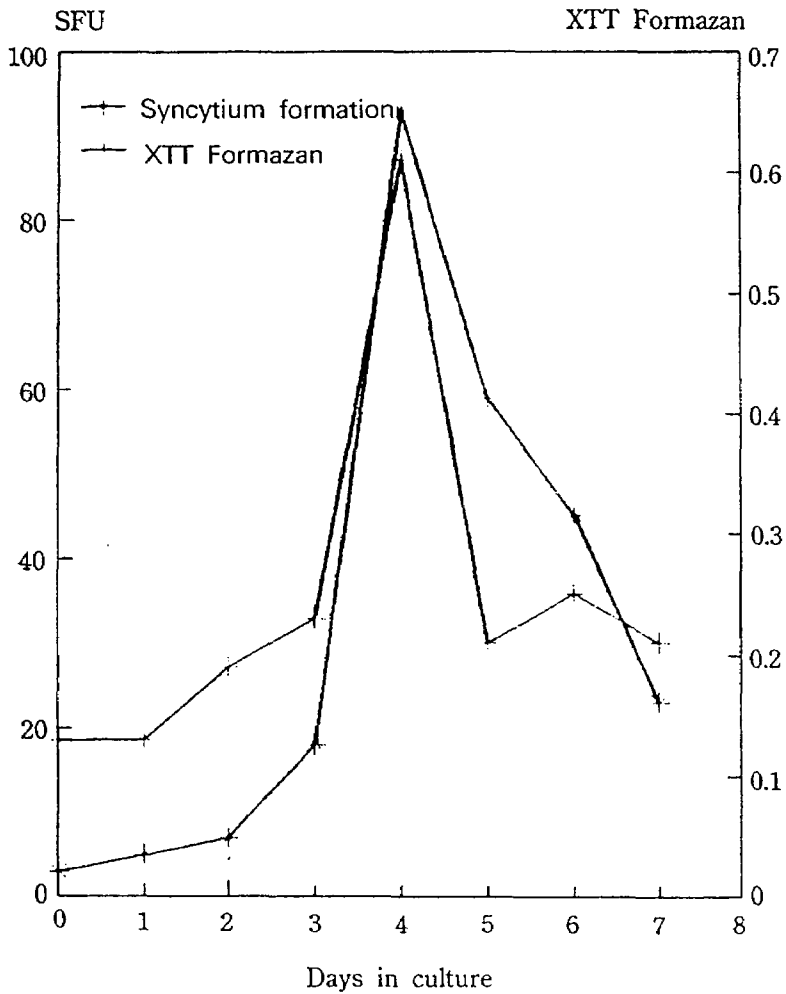


Fig 2. Comparison of XTT formazan assay and syncytium assay in HIV-1 infected CEM-SS cell cultures over 7-day incubation periods.

Viable cell numbers

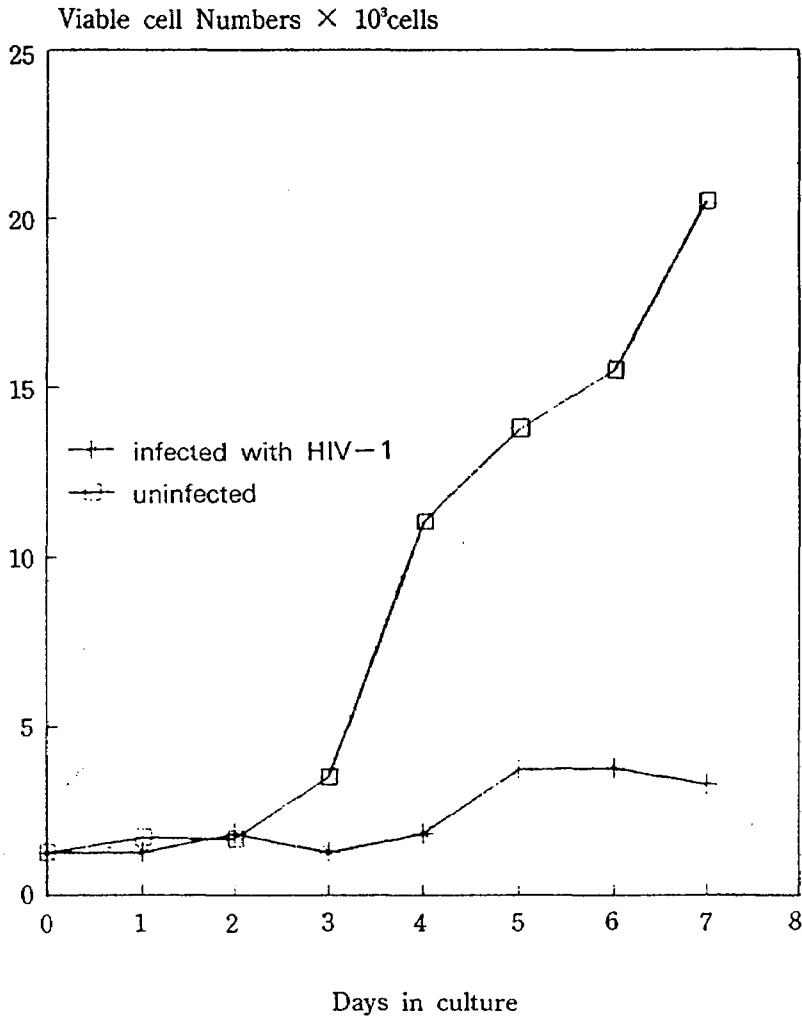


Fig 3. Viable cell numbers of CEM-SS cells as measured by trypan blue exclusion method. 10,000 CEM-SS cells are mixed with 400 infected or uninfected H9 cells per well.

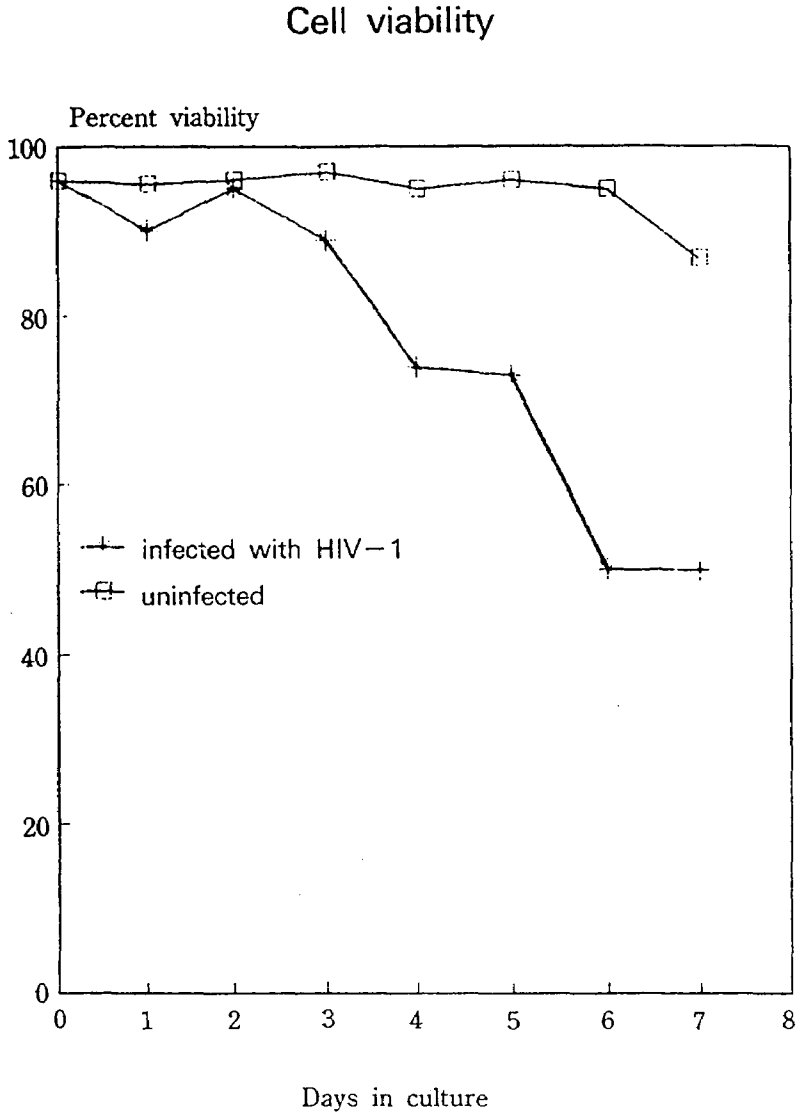


Fig 4. Percent viability of CEM-SS cells as measured by trypan blue exclusion method. 10,000 CEM-SS cells are mixed with 400 infected or uninfected H9 cells per well.

Infected Treated Culture

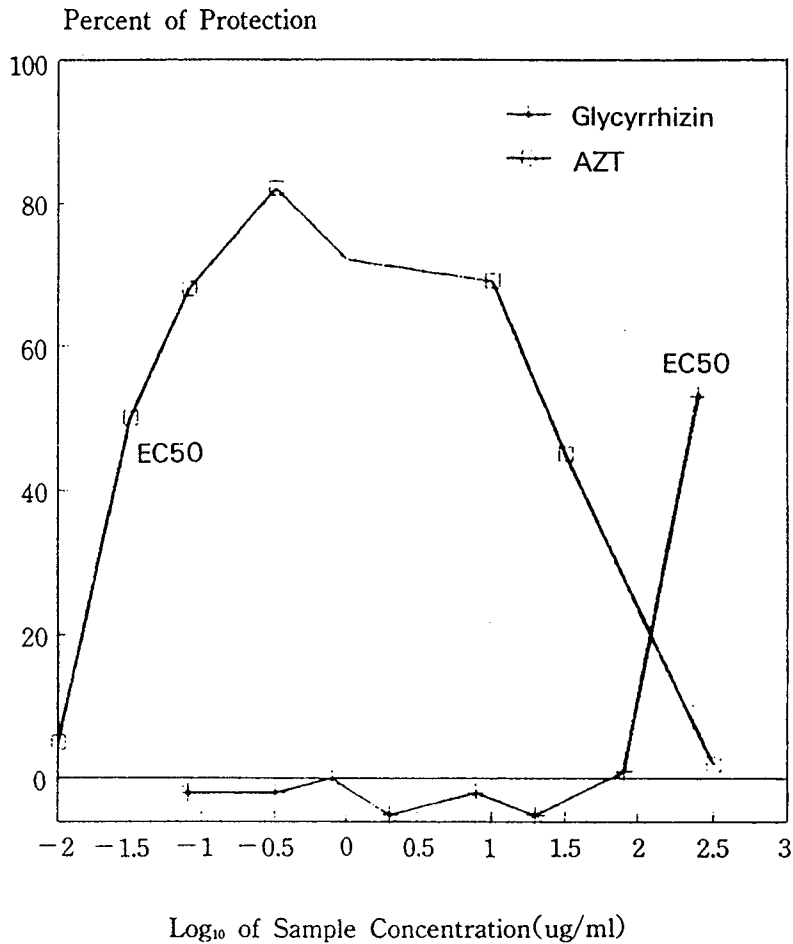


Fig 5. Quantitation of XTT formazan formation in both serial dilutions of AZT and Glycyrrhizin treated cultures of HIV-1 infected CEM-SS cells. EC50 represents concentrations of drugs that protects XTT formazan formation in infected cultures to 50% of that in untreated uninfected control cells.

Uninfected Treated Culture

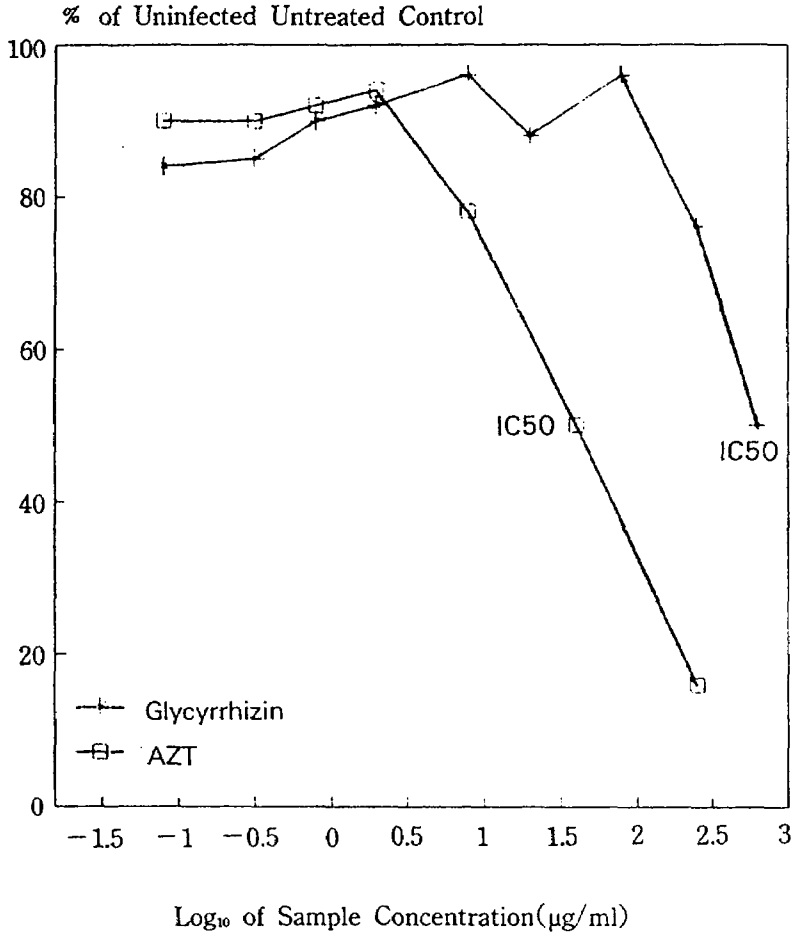


Fig 6. Quantitation of XTT formazan formation in both serial dilutions of AZT and Glycyrrhizin treated cultures of uninfected CEM-SS cells. IC50 represents inhibitory or toxic concentration of drugs that reduces XTT formazan formation in uninfected cultures to 50% of that in untreated, uninfected control cell.

Cell Free Infection & Treated

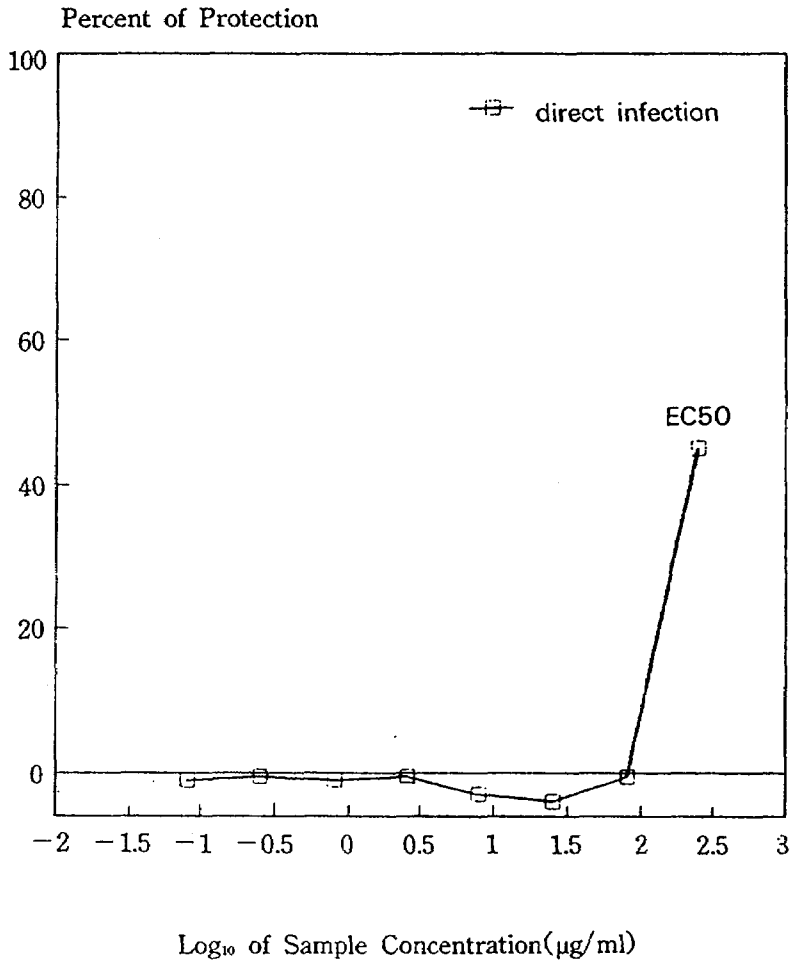


Fig 7. Quantitation of XTT formazan formation in cell free virus infected CEM-SS cells, treated with various concentrations of Glycyrrhizin

3. Direct exposure of HIV-1 to Glycyrrhizin

HIV 에 감염된 H9 세포를 이용하지 않고 바이러스를 직접 CEM-SS 세포에 감염시키는 방법을 이용한 경우, Glycyrrhizin 의 EC50 은 250 ug/ml, IC50 은 >700 ug/ml, in vitro therapeutic index 는 약 2.8 로서 위의 경우와 거의 비슷한 값을 보여 주었다 (그림7).

4. Glycyrrhizin 과 다른 抗 HIV 製劑와의 比較

표3 은 알려진 몇 종류의 항 HIV 제제들의 EC50 값을 비교한 것이다. 그 효능이 강한 순서에 따라 열거하면 AZT > DDA > cyclosporin > suramine analogue > castanospermine > glycyrrhizin > pepstatin 의 순이다.

Table 3. Comparison of CEM-SS cell line sensitivities with protection induced by various antiviral agents.

Drugs	CEM-SS cells(EC50 uM)*
AZT	0.2
DDA	7
Cyclosporin	13
Suramine	28
ATA	35
Castanospermine	201
Glycyrrhizin	285
Pepstatin	380

+DDA(2', 3'-dideoxyadenosine), ATA(aurintricarboxylic acid)

* EC50 : concentration of drug at which infected cells produced level of XTT formazan 50% of that produced by uninfected control cells.

5. Glycyrrhizin 의 reverse transcriptase activity 에 대한 實驗

농도에서 AMV reverse transcriptase 의 활성도를 억제하는 효과는 없었다.

표4에 나타낸 것과 같이 Glycyrrhizin은 모든

Table 4. AMV Reverse Transcriptase Activity.

Log concentration Glycyrrhizin	RT Activity* (% of Control)
-2	100
-1	96
0	99
1	97
2	102
3	98

* No statistically significant difference was observed.

IV. 考 察

HIV-1이 AIDS의 原因임이 알려진 이후, 治療劑의 開發이 Virus의 特性研究에 基本하여 進行 중에 있다.

甘草는 神農本草經에 “五臟六腑寒熱邪氣를 治癒하며, 筋骨과 肌肉을 堅實하게 하고, 氣力을 튼튼케 한다. 金瘡腫毒을 治療하며, 長服하면 長壽한다.”^{9, 10}고 記述된 以後, 傷寒論 少陰病 咽痛에 甘草湯으로 活用되고 있으며^{4, 11}, 本草綱目 등에서는 咳嗽, 口渴, 藥物解毒, 腹痛, 一切虛損, 瘡疽, 胎兒胎毒 등에 活用되고 있다¹².

한편 葉桂는 “甘草가 味甘하여 寒을 解할 수 있고, 氣平하여 淸熱할 수 있으며, 甘平한 氣味는 肺와 脾로 入하므로 五臟六腑寒熱邪氣를 治할 수 있다.”¹³하였고, 陳修園은 “甘草가 脾氣를 旺盛하게 함으로서 五臟의 機能이 모두 活性化되고, 이로 因하여 筋骨과 肌

肉이 堅實하게 된다.”¹³하였으며, 李杲는 “甘草가 甘溫하여 熱을 除할 수 있으며, ... 藥性의 毒性을 緩和시킬 수 있다.”¹³고 하였다. 李時珍은 “甘草가 여러 藥物과 잘 和合하므로 元老의 功이 있고, 많은 病邪를 治療하니 王道의 調和가 있다. ... 그러나 中滿, 嘔吐, 酒客의 病 등에는 甘草를 禁한다.”¹³하였다. 甘草는 益氣 藥物로서 脾의 虛弱으로 인한 倦怠, 또는 心의 虛弱으로 인한 心悸 등에 四君子湯, 炙甘草湯 등으로 活用되고 있으며^{7, 12}, 止咳平喘 藥物로서, 肺의 機能失調로 인한 咳嗽氣喘 등에 三幼湯, 桑菊飲, 麻杏石甘湯, 小青龍湯 등으로 活用되고 있다.^{1, 12, 15} 腹痛 등에는 小建中湯, 芍藥甘草湯 등으로 活用되고 있으며, 咽喉痛 등에는 鎮痛 및 淸熱^{2, 14}의 藥物로서 甘草湯, 桔梗湯 등으로 活用되고 있다^{4, 11}. 또한 甘草는 藥物의 相互 藥效를 調和시켜주는 作用을 가짐으로서 白虎湯, 四逆湯, 半夏瀉心湯, 調胃承氣湯 등에도 活用되

고 있다^{10, 15)}.

이러한甘草의藥效에 대한實驗的 研究로는, 1946년 消化性 潰瘍을 앓고 있는 患者들에게 甘草湯을 投藥한 것이 有意한 效果를 나타내었다는 報告가 있으며⁷⁸⁾, 甘草湯이 Glucocorticoid Hormone과 類似한 效果를 가짐으로서 Addison's disease에도 有意한 效果를 나타내었다는 보고가 있다^{37, 66, 72)}.

또한 甘草湯이 抗바이러스作用이 있다고 보고된 바 있는데, 이것은 甘草湯이 몇 種類의 DNA와 RNA 바이러스의 細胞病理과 成長을 抑制한다는 것이다. 반면에 甘草湯은 細胞活動性이나 複製能力에는 效果가 없는 것으로 밝혀졌다. 특히 vaccinia, Herpes simplex type 1, Newcastle disease, vesicular stomatitis 및 polio type 1 바이러스 등의 成長抑制에 대한 效果를 시험관 내에서 실험한 결과, Herpes simplex는 약 8mM의 甘草湯 濃度에서 매우 有意한 成長抑制 效果를 보였으나, polio type 1 바이러스에서는 有意한 成長抑制 效果가 없는 것으로 나타났다. 한편 varicella-zoster virus는 0.55 mg/ml의 甘草湯 濃度에서 有意한 成長抑制 效果가 있는 것으로 나타났다. 이것은 바이러스를 활성화시키지 못하게 하는 甘草湯의 效果에 의한 것이라고 하였다^{6, 76)}. 甘草湯은 인터페론의 分泌增加를 유도할 뿐만 아니라 NK Cells의 활성을 유도하는 작용이 있다는 보고도 있다¹⁷⁾.

일반적으로 抗바이러스 製劑는 바이러스의 構成成分이나, 바이러스에 의해 合成되는 蛋白質, 바이러스 遺傳子, 細胞 受容體, 또는 바이러스의 增殖에 필요한 효소나 다른 여러 인자들과 반응하여 작용을 나타내게 된다.

HIV (Human Immunodeficiency Virus)는 Retrovirus로, 2가닥의 RNA와 reverse transcriptase, 이를 둘러싸고 있는 바이러스 蛋白質(p24, p17), 그리고 가장 바깥을 둘러싼 이

중의 인지질막(gp120, gp41) 등으로 구성되어 있다.

HIV는 표면에 CD4 를 가지는 T cells 에 選擇的으로 감염되어 이들 세포를 파괴는데^{77, 78)}, HIV가 세포에 들어가는 그 첫단계는 外皮의 gp120 과 CD4의 결합으로 시작된다⁸⁰⁾. CD4 와 결합한 후 바이러스와 細胞膜과의 融合 (fusion process) 이 일어나게 되는데, gp120 과 결합되어 있는 gp41 이 여기에 작용한다⁸⁰⁾. 이렇게 하여 HIV 가 細胞質 내로 들어가게 되면 바이러스의 逆傳寫 酵素(reverse transcriptase)의 作用으로 RNA 를 이용한 DNA 合成이 일어나고, 다시 RNase H 의 作用으로 RNA 가닥은 分解되고 다시 두번째 가닥의 DNA 가 合成되어 double-stranded form 으로 되는데⁸⁰⁾, 이것을 provirus 라고 한다. Provirus 는 原形으로 되어 核內로 들어가 T cells 의 遺傳子에 끼어들게 되고 이때 세포가 抗原刺戟을 받지 않으면 latent proviral form 으로 潛在해 있다가 세포가 抗原刺戟을 받았을 때 proviral DNA 에서 RNA 를 合成하게 된다^{39, 33)}. 生成된 viral mRNA 로부터 合成된 viral 단백질은 viral protease 에 의한 cleavage 나, myristoylation, 그리고 glycosylation⁸⁰⁾ 등의 몇가지 變形 過程을 거친 후, 세포 표면으로 옮겨지고 再組立되어 새로운 바이러스가 budding 에 의해 세포밖으로 빠져 나와 또다른 세포에 감염된다. 이과정에서 감염된 T cells 은 죽게 되는데 이것을 細胞毒作用 (cytopathic effect) 이라 한다.

한편 이러한 human immunodeficiency virus (HIV) 의 增殖을 抑制하는 藥劑의 開發로는 Table 5 에서 나타낸 것과 같이 增殖의 각 段階에 대해 作用하도록 하는 여러가지 治療法이 있다. 그 중에서 2', 3'-dideoxynucleoside analogs 와 같이 HIV 의 reverse transcriptase 를 抑制할 수 있는 藥劑의 開發이

가장 注目받고 있다⁶²⁾.

이론적으로는 HIV의 生活環의 各 段階가 治療의 標적이 될 수 있는데, 실제로 HIV의 生活環에 關하여 새로운 知識을 알게 되면서 여러가지의 새로운 抗 HIV 製劑가 考案 되고 있다⁶⁴⁾. 그러한 例로서 HIV-1 protease inhibitors 製劑가 새로 試圖되고 있는 약제의 하나이다.

1. Inhibition of viral entry

바이러스와 표적세포의 受容體와의 결합은 감염을 일으키는데 결정적인 역할을 하기 때문에 항바이러스제의 개발에 受容體가 관심을 끌어들였다. HIV는 표면의 gp120이 helper T cells, monocytes/macrophages, dendritic cells, Langhans cells, brain glial cells 표면에 있는 CD4 molecule을 통하여 감염이 시작되는데⁴¹⁾, 실험적으로 CD8 T cells, some neuronal cells, muscle cells, fibroblastoid cells 과 같이 CD4를 가지지 않은 세포에도 감염된다^{25, 93)}. HIV 감염 환자의 血清에서 발견되는 어떤 抗體는 HIV 감염을 오히려 助長시킨다고 한다⁹²⁾. Recombinant soluble CD4 (rCD4)가 實驗적으로 HIV 感染을 抑制한다는 報告가 있다⁸⁹⁾.

rCD4는 CD4를 주요 受容體로 이용하는 HIV-1과 HIV-2에 모두 有效하지만 fresh primary HIV-1 isolates에 대한 抑制力은 적다고 한다^{28, 50)}.

CD4 蛋白質과 免疫글로불린의 constant heavy-chain domains을 결합한 hybrid CD4은 unmodified CD4에 비하여 몇가지의 장점을 가지지만²²⁾ 어느 정도의 임상적 효과를 나타내는 지는 아직 疑問이다^{42, 84, 100)}.

Dextran sulfate와 heparin, 그리고 pentosan sulfate 등의 sulfated polysaccharides가 HIV의 CD4와의 결합과 syncytia 形成을 억제한

다는 보고가 있지만^{19, 63, 94)} 큰 효과는 없는 것 같다^{18, 51)}. 바이러스의 세포내 侵入過程 中 fusion process에 關여하는 gp41과 반응하는 물질은 아직 알려져 있지 않은데, fusion 후 uncoating 과정에 작용하는 aromatic polycyclic dione compounds인 hypericin과 pseudohypericin²¹⁾이 試圖되고 있다. gp120이 神經細胞와 結合하게 되면 세포내 遊離 칼슘이온의 濃度가 증가하게 되는데³¹⁾ 이러한 세포는 HIV가 감염되지 않은 상태에서도 神經세포의 손상이 일어난다고 한다. Dihydropyridine calcium channel antagonist인 nimodipine이 gp120에 의한 세포내 칼슘의 농도의 증가와 神經세포 損傷을 방지할 수 있다고 한다³¹⁾.

2. Reverse Transcriptase as a target molecule

Uncoating 과정 후에는, reverse transcriptase에 의해 viral RNA를 template(原形)으로 하여 proviral DNA 合成이 일어난다. 이 과정이 抗 HIV 製劑 開發의 초점이 되고 있는데^{65, 70)}, 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine(AZT)를 비롯하여, 2', 3'-dideoxycytidine(ddI), 2', 3'-dideoxyinosine(ddI), 2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxythymidine (d4T), 3'-azido-2', 3'-dideoxyuridine(AZddU), 그리고 phosphonylmethoxyethyladenine (PMEA) 등의 몇종의 dideoxynucleosides 제제가 개발되어 그 중 AZT와 같은 일부 약제는 이미 臨床적으로 널리 쓰이고 있으며^{27, 32, 38, 40, 74, 79, 95)}, 최근에 benzodiazepin 誘導體(TIBO 誘導體)와 dipyrroldiazepinon 誘導體가 HIV-1의 reverse transcriptase를 強力하게 억제하는 것으로 밝혀졌다^{29, 59)}. HIV-1의 reverse transcriptase는 逆傳寫過程에서 아주 頻發하게 error를 일으키는데, 生體內에서 매회 증식때 마다 genome 당 5~

10 nucleotide 의 error 를 일으킨다고⁷¹⁾ 하는데, 이로 인하여 HIV 의 變異가 아주 심하며 치료제에 잘 반응하지 않는 strain 이 생겨나게 되는 것으로 생각된다.

3. Transcription and translation

HIV는 일반적인 retrovirus 가 가지는 遺傳子인 gag, pol, env 외에 적어도 6개의 유전자를 더 가진다. 이들중 어떤 것은 바이러스 蛋白質의 合成을 增加 시키고 어떤 것은 減少시키기도 하는데, NF-kB와 같은 細胞內的 蛋白質은 HIV 의 transcription 을 增加 시킨다⁶⁴⁾. Herpes simplex virus type I 이나, adenovirus, cytomegalovirus, 혹은 human herpes virus type 6 와 같은 DNA 바이러스가 合成하는 단백질도 HIV 의 增殖을 助長할 수 있다^{61, 62, 63)}.

4. The tat gene

tat 遺傳子는 HIV에서 필수적인 調節遺傳子로서, 바이러스 遺傳子の 발현을 증폭시키고 새로운 virions 의 生成을 助長한다⁹¹⁾. tat 단백질의 작용은 TAR(trans-acting responsive sequence) 와 결합함으로써 일어나는데, tat 단백질이 TAR 에 결합하지 못하게 하는 antisense oligonucleotides 의 개발이 진행중에 있다.

5. The rev gene

Rev 遺傳子도 바이러스 增殖에 필요한 trans-acting factor 를 合成한다⁹¹⁾. 이 regulatory factor 가 없으면 gag- 와 env- 에 의해 合成되는 단백질이 상당히 減少된다. Rev 는 HIV-1 RNA 의 splicing 과정에 작용할 것으로 생각된다⁵³⁾. 최근에 rev 유전자의 antisense 의 한 형태인 nuclease resistant phosphorothioate analog 가 바이러스의 증식을 억제한다는 보

고 있다⁶⁶⁾.

6. Viral protease as a rational target

HIV 增殖의 後期 段階에는 바이러스의 protease 에 의한 바이러스 단백질 (pol gene products) 의 二次的 processing 이 일어나는데 여기에 작용하는 HIV 의 protease 는 동일한 두개의 monomer 로 이루어지는, 對稱構造를 가지는 것으로 細菌의 aspartyl protease 와 構造가 類似하다^{61, 60)}. 最近의 構造分析에 의하면⁵⁷⁾, 이 酵素의 活性化 部位와 결합할 수 있는 물질은 약 10,000 가지 정도로 생각되는데, 精神科에서 사용하는 haloperidol 이 그 중의 하나이다⁵⁷⁾. Haloperidol 은 그 자체의 毒性이 심하여 직접 이용될 수 없고, 合成된 peptide 계열의 XVII 이나 A77003 등이 실험적으로 試圖되고 있다^{66, 66)}.

7. Maturation and assembly of viral components

HIV 의 gp120 은 heavily glycosylated 된 것으로 N-linked sugars 가 표적 세포와 반응할 때 어떤 역할을 할 것으로 생각된다. Castanospermin⁴⁶⁾ 과 deoxynojirimycin⁵⁵⁾과 같은 trimming glycosidase inhibitors 가 실험적으로 syncytia 의 형성을 억제한다고 한다.

8. Budding process

마지막으로 HIV virion particles 은 viral budding 의 과정을 거쳐 분비되는데 그 정확한 機轉은 잘 모른다. Interferon-alpha 가 이 과정에 작용하는 것으로 알려졌는데^{45, 72)}, IFN- α 는 AIDS 환자의 Kaposi's sarcoma 에도 효과가 있다고 한다⁶⁸⁾.

본 실험에서는 甘草湯의 HIV-1 抑制能을 檢査하기 위하여, HIV-1 감염에 의한 細胞傷害 程度를 XTT formazan formation 법을 이

용하여 판정하였다. 이 방법은 지금까지의 syncytium assay 법에 비하여 간편하고 안전하며 결과도 잘 일치하였다. 본 방법은 미국의 National Cancer Institute 에서 1988년부터 항 HIV-1 제제를 실험하는 방법으로 이용되고 있는데 연간 약 40,000 종의 물질을 실험하고 있다.

본 實驗의 結果 Glycyrrhizin 의 EC50 은 250 ug/ml 로서 지금까지 알려진 AZT 에 비하면 (AZT 의 EC50 은 0.05 ug/ml) 효능 면에서는 많이 떨어지지만, 약제의 毒性面에서는 심한 副作用을 나타내는 AZT 에 비하여 毒性이 아주 적으므로 (AZT 의 IC50 은 51 ug/ml, Glycyrrhizin 의 IC50 은 800 ug/ml) 長期間의 治療가 필요한 HIV 감염의 경우에 적절한 治療제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

한편 AZT 의 主作用 機轉이 reverse transcriptase 를 抑制하는 것인데 비하여 Glycyrrhi-

zin 은 reverse transcriptase 를 抑制하는 능력은 없는 것으로 생각된다. Glycyrrhizin 이 HIV 를 抑制하는 機轉으로는 gp120 이나 gp41 의 構造를 變更시킴으로서 HIV-1 이 target cells 표면의 CD4 분자에 결합하는 것을 妨害하는 것이라고 생각된다.

gp120 이나 gp41 의 구조 변경은 Glycyrrhizin 분자내의 glucuronic acid 의 carboxyl group 과 gp120 이나 gp41 의 anchoring position 의 asparagine 과의 상호작용으로 일어난다고 한다. 이러한 Glycyrrhizin 의 작용기전에 대한 결론은 다른 바이러스의 단백질과의 상호작용 기전에서 유추한 것으로 그에 대한 계속적인 연구가 필요할 것으로 본다.

결론적으로 Glycyrrhizin 은 AZT 보다는 그 약효가 떨어지지만 독성이 적으므로 장기간의 治療제로 이용될 가능성이 있으며, AZT 와의 복합투여도 권장할만 하다고 생각된다.

Table 3. Stages in the HIV replicative cycle which may serve as targets for therapeutic information.

Stage	Possible intervention
Binding to target cell	Antibodies to HIV or cellular receptors CD4 analogs ; calcium channel antagonist may rescue neuronal cells from possible gp120 cytotoxic effect.
Fusion to target cells	Antibodies or drugs that block the gp41 fusogenic domain function.
Entry, uncoating of RNA	Drugs or antibodies that can block viral entry or uncoating; hypericin.
Transcription of RNA to DNA by reverse transcriptase	RT inhibitors ; AZT, DDI, DDC
Migration of viral DNA to nucleus	Agents unknown.
Integration of HIV DNA into host genome	unknown
Transcription/translation	Inhibitors of Tat or Rev activity ; mutant Tat molecu-

	les ; TAR inhibitors; TAR decays ; Rev protein inhibitors.
Translation	Antisense constructs against regulatory HIV genes like rev.
Gag-Pol polyprotein cleavage	HIV protease inhibitors and C2 symmetric protease inhibitors.
Myristoylation/glycosylation by enzyme	Castanospermine and inhibitors of trimmin glycosidase
Packaging	Antisense constructs
Viral budding	Interferons or interferon inducers
Extracellular processing	HIV protease inhibitors

V. 結 論

1. 甘草湯의 HIV-1 抑制能을 檢査하기 위하여, HIV-1 感染에 의한 細胞 傷害 程度를 XTT formazan formation 법을 이용하여 判定하였다. 이 방법은 지금 까지의 syncytium assay 법에 비하여 간편하고 안전하며 結果도 잘 一致하였다.

2. 甘草湯의 EC50 은 250 ug/ml 로서 지금까지 알려진 AZT 에 비하면 (AZT의 EC50 은 0.05 ug/ml) 효능면에서는 많이 떨어지지만, 약제의 독성면에서는 심한 副作用을 나타내는 AZT 에 비하여 독성이 아주 적으므로 (AZT 의 IC50 은 51 ug/ml, Glycyrrhizin 의 IC50 은 800 ug/ml) 長期間의 治療가 필요한 HIV 감염의 경우에 적절한 治療제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

3. AZT의 主作用 機轉이 reverse transcriptase 를 抑制하는 것인데 비하여 甘草湯 은 reverse transcriptase 를 抑制하는 능력은 없는 것으로 생각된다. 甘草湯 이 HIV를 抑制하는 機轉에 대해서는 계속적인 研究가 필요할 것으로 보인다.

4. 結論의으로 甘草湯 은 AZT 보다는 그 藥效가 떨어지지만 毒性이 적으므로 長期間의 治療제로 이용될 가능성이 있으며, AZT 와의 複合投與도 권장할 만 하다고 생각된다.

參 考 文 獻

1. 高學敏 ; 中藥學, 中醫古籍出版社, 北京, 1986, p.45.
2. 唐慎微 外 ; 重修政和經史證類備用本草, 南天書局有限公司, 臺北, 1976, p.148.
3. 陶弘景 ; 名醫別錄, 人民衛生出版司, 北京, 1986, p.28
4. 文潸典 外 ; 東醫病理學, 高文社, 서울, 1990, p.431
5. 沙世炎 外 ; 中草藥有效成分分析法, 人民衛生出版社, 北京, 1982, p.87.
6. 常雅萍 外 ; 甘草多糖抗病毒作用研究, 中國中藥雜誌, 第14卷 第4期, pp.44~46, 1989.
7. 席與民 外 ; 本草備要精解, 光明日報出版社, 北京, 1988, pp.506~508.

8. 孫思邈；備急千金要方，人民衛生出版社，北京，1982，p.4.
9. 孫星衍；神農本草經，集文書局，臺北，1979，p.12.
10. 王好吉 外；湯液本草，人民衛生出版社，北京，1987，pp.86, 87.
11. 吳謙 外；醫宗金鑑，人民衛生出版社，北京，1979，p.246.
12. 李尙仁；本草學，醫藥社，서울，1975，pp. 57~59.
13. 李時珍；本草綱目，人民衛生出版社，北京，1982，pp.691~695.
14. 曹元宇；本草經，上海科學技術出版社，1987，p.75.
15. 崔對德；中藥大全，黑龍江科學技術出版社，1989，p.501.
16. 韓宗鉉；甘草의 免疫調節에 관한 研究，pp.43, 44.
17. Abe, N., Ebina, T. and Ishida, N. : Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhizinic acid in mice. *Microbiol. Immunol.*, 26 : 535~539, 1982.
18. Abrams, D.I., Kuno, S., Wong, R. and Ueno, R. : Oral dextran sulfate(UA001) in the treatment of the acquired immunodeficiency syndrome(AIDS) and AIDS-related complex. *Ann. Int. Med.*, 110 : 183~188, 1989.
19. Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J. and De Clercq, E. : Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 6132~6136, 1988.
20. Bergmann, F. : Uber das Enzymatische Verhalten von Gluroulden und under Glycyrrhinzinsäure, *Biochem. Ztscher.*, 267 : 296~308, 1983.
21. Brennenman, D.E., Westbrook, G.L. Fitzgerald, S.P., Enninst, D.L., Elkins, K.L., Ruff, M.R. and Pert, C.B. : Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature*, 335 : 639~642, 1988.
22. Byrn, R.A., Mordenti, J., Lucas, C., Smith, D., Marsters, S.A., Johnson, J.S., Cossum, P., Chamow, S.M., Wurm, F.M., Gregory, T., Groopman, J.E. and Capon, D.J. : Biological properties of a CD4 immunoadhesin. *Nature*, 344 : 667~670, 1990.
23. Centers for Disease Control : Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-United States, *MMWR*, 31 : 507~513, 1982.
24. Centers for Disease Control : Kaposi's sarcoma and pneumonia in homosexual men-New York City and California, *MMWR*, 30 : 305, 1982. 8. Siegal, F.P., Lopez, C. and Hamer, G.S. : Severe acquired immunodeficiency in homosexual males, manifested by chronic perianal lesions, *N. Engl. J. Med.* 305 : 1439, 1981.
25. Clapham, P.R., Weber, J.N., Whitby, D., McIntosh, K., Dalgleish, A.G., Maddon, P.J., Deen, K.C., Sweet, R.W., and Weiss, R.A. : Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. *Nature*, 337 : 368~370, 1989.
26. Clotet, B. and Grifol, T.J. : Helper/inducer T cells and disease progression in patients with antibodies, *Ann. Int. Med.*, 106(4) : 634~5, 1987.

27. Cooley, T.P., Kunches, L.M., Saunders, C. A., Ritter, J.K., Perkins, C.J., Mc Laren, C., Mc Caffrey, R.P. and Liebman, H.A. : Once-daily administration of 2', 3'-dideoxyinosine(ddI) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. Results of a phase I trial. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 1340~1345, 1990.
28. Daar, E.S., Li, E.L., Moudgil, T. and Ho, D.D. : High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary HIV-1 isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 6574~6579, 1990. 140. Capon, D.J., Chamow, S.M., Mordenti, J., Marsters, S.A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R.A., Lucas, C., Wurm, F.M., Groopman, J.E., Broder, S. and Smith, D.H. : Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*, 337 : 525~531, 1989.
29. Dahlberg, J.E., Mitsuya, H., Broder, S., Blam, S.B. and Aaronson, S.A. : Broad spectrum antiretroviral activity of 2', 3'-dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 2469~2473, 1987.
30. Dalglish, A.G., Beverly, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A.(1984) : The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312 : 763~767.
31. Dreyer, E.B., Kaiser, P.K., Offermann, J.T. and Lipton, S.A. : HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science*, 248 : 364~367, 1990.
32. Fischl, M., Galpin, J.E., Levine, J.D., Groopman, J.E., Henry, D.H., Kennedy, p., Miles, S., Robbins, W., Starrett, B., Zalusky, R., Abels, R.I., Tsai, H.C. and Rudnick, S.A. : Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 1488~1493.
33. Folks, T., Powell, M.D., Lightfoote, M.M., Bennis, Martin, M.A., and Fauci, A.S. (1986) : Induction of HTLV-3/LAV from nonvirus-producing T-cell line : Implications for latency. *Science*, 231 : 600~602.
34. Friedman-Kien, A.E., Lanbenstein, L.J. and Rubenstein, p. : Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men, *N. Engl. J. Med.*, 305 : 1425, 1981.
35. George, F. : *The New Honest Herbal : A sensible guide to the use of herbs and related remedies*, ed. by V.E. Tyler, Stickley Company, Philadelphia, PA, pp.43~145, 1982.
36. Gottlieb, M.S., Schroff, R. and Schander, H.M. : Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men : Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency, *N.Engl. J. Med.*, 305 : 1425, 1981.
37. Groen, J., Pelser, H.E., Frenkel, M., Kamminga, C.E. and Willebrands, A.F. : Effect of Glycyrrhizinic acid on the electrolyte metabolism in Addison's disease. *J. Clin. Invest.*, 31 : 87~91, 1952.
38. Hamamoto, Y., Nakashima, H., Matsui, T., Matsuda, A., Ueda, T. and Yamamoto, N. : Inhibitory effect of 2', 3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency

- virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31 : 907~910, 1987.
39. Hoxie, J.A., Haggarty, B.S., Rackowsik, J.L., Pillsbury, N., and Levy, J.A.(1985) : Persistence noncytotoxic infection of normal human T lymphocytes with AIDS-associated retrovirus. *Science*, 299 : 1400~1402.
 40. Johnson, V.A., Barlow, M.A., Merrill, D.P., Chou, T.C. and Hirsch, M.S. : Three-drug synergistic inhibition of HIV-1 replication in vitro by zidovudine, recombinant soluble CD4, and recombinant interferon-alpha. *A. J. Infect. Dis.*, 161 : 1059~1067, 1990.
 41. J.S. Mc Dougal, M.S. Kennedy, J.K.A. Nicholson, T.J. Spira, H.W. Jaffe, J.E. Kaplan, D.B. Fishbein, P.O'Malley, C.H. Aloisio, C. M. Black, M. Hubbard and C.B. Reimer : Antibody response to human immunodeficiency virus in homosexual men, *J.Clin. Invest.*, 80 : 316~324, 1987.
 42. Kahn, J.O., Allan, J.D., Hodges, T.L., Kaplan, L.D., Arri, C.J., Fitch, H.F., Izu, A.E., Mordenti, J., Sherwin, S.A., Groopman, J.E. and Volberding, P.A. : The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 in subjects with the AIDS and AIDS-related complex. *Ann. Int. Med.*, 112 : 254~261, 1990.
 43. Karrer, C. : Extraction from *Glycyrrhiza glabra* L., *Leguminosae*, *Helv. Chim. Acta.*, 4 : 100, 1921.
 44. Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Dauguet, C., Vilmer, E., Gricelli, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Gluckman, J.C., Chermann, J.C., and Montagnir, L.(1984) : Selective tropism of lymphadenopathy associated virus(LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*, 225 : 59~63.
 45. Kovacs, J.A., Deyton, L., Davey, R., Falloon, J., Zunich, K., Lee, K., Metcalf, J.A., Bigley, J.W., Sawyer, L.A., Zoon, K.C., Masur, H., Fauci, A.S. and Lane, H.C. : Combined zidovudine and interferon-alpha therapy in patients with Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann. Int. Med.*, 111 : 280~287, 1989.
 46. Kramer, R.A., Schaber, M.D., Skalka, A.M., Ganguly, K. Wong-Staal, F. and Reddy, E. P. : HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease. *Science*, 231 : 1580~1584, 1986.
 47. Lardr, B.A., Darby, G. and Richman, D.D. : HIV with reduced sensitivity to zidovudine(AZT) isolated during prolonged therapy, *Science*, 243 : 1731~1734.
 48. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. and Sodroski, J. : Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.*, 63 : 4085~4087, 1989.
 49. Lerner, A.B., Shzume, K. and Dunding, J. : The mechanism of endocrine control of melanin pigmentation. *J. Clin. Endocrinol.*, 14 : 1463~1490, 1954.
 50. Looney, D.J., Hayashi, S., Nicklas, M., Redfield, R.R., Broder, S., Wong-Staal, F. and Mitsuya, H. : Differences in the interaction of HIV-1 and HIV-2 with soluble CD4, *J. Acq. Immun. Def. Synd.*, 3 : 649~657, 1990.
 51. Lorentsen, K., Hendrix, C., Collins, J., Ec-

- kel, R., Petty, B. and Lietman, P. : Dextran sulfate is poorly absorbed after oral administration. *Ann. Int. Med.*, 111 : 561~566, 1989.
52. Louis, L.H. and Conn, J.W. : Preparation of Glycyrrhizinic acid, the electrolyte active principle of Licorice : Its effects upon metabolism and upon pituitary-adrenal function in man. *J. Lab. Clin. Med.*, 47 : 20~28, 1956.
53. Luciw, P.A., Cheng-Meyer, C. and Levy, J.A. : Mutational analysis of the human immunodeficiency virus : the orf-B region down-regulates viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 1434~1438, 1987.
54. Lusso, P., Ensoli, B., Markham, P.D., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Tschachler, E., Wong-Staal, F. and Gallo, R.C. : Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature*, 337 : 370~373, 1989.
55. Lusso, P., Di Marzo, Veronese, F., Ensoli, B., Franchini, G., Jemma, C., De Rocco, S.E., Kalyanaraman, V.S. and Gallo, R.C. : Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science*, 247 : 848~852, 1990.
56. Masur, H., Michelis, M.A. and Greene, J.B. : An outbreak of community-acquired *P. Carinii* pneumonia : Initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.*, 305 : 1431, 1981.
57. Meek, T.D., Dayton, B.D., Metcalf, B.W., Dreyer, G.B., Strichler, J.E., Gorniak, J., Rosenber, M., Moore, M.L., Mafard, V.W. and Debouck, C. : Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in *Escherichia coli* behaves as a dimeric aspartic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 1841~1845, 1989.
58. Melbye M., Grossman RJ, Goedert JJ, Eyster ME, Biggar RJ. : Risk of AIDS after herpes zoster. *Lancet*, i : 728~30, 1987.
59. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shin, C.K., Eckner, K., Hattox, S., Adams, J., Roshthal, A.S., faanes, R., Eckner, R.J., Koup, R.A. and Sullivan, J.L. : Inhibition of HIV-1 replication by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science*, 250 : 1411~1413, 1990.
60. Mildvan, D., Mathur, U. and Enlow, R.W. : Opportunistic infections and immunodeficiency in homosexual men, *Ann. Intern. Med.*, 96 : 700, 1982.
61. Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B.K., Toth, M.V., Marshall, G.R., Clawson, L., Selk, S.B., Kent, H. and Wlodawer, A. : Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science*, 246 : 1149~1152, 1989.
62. Mitsuya, H., Yarchoan, R. and Broder, S. : Molecular targets for AIDS therapy. *Science*, 249 : 1533~1544, 1991.
63. Mitsuya, H., Looney, D.J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F. and Broder, S. : Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family : inhibition of virion binding to CD4+ cells. *Science*, 240 : 646~649, 1988.
64. Mitsuya, H., Matsukura, M. and Broder,

- S. : Rapid in vitro systems for assessing activity of agents against HTLV-III/LAV. In *AIDS : Modern Concepts and Therapeutic Challenges*. Broder, S., ed., Marcel-Dekker, New York, pp.303~333, 1987.
65. Mitsuya, H. and Broder, S. : Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus (HTLV-III/LAV) by 2', 3'-dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 1911~1915, 1986.
66. Molhuysen, J.A., Gerbrandy, J., De Vries, L.A., de Jong, J.C., Lensra, K.B., Turner, K. and Borst, J.G.G. : A Licorice extract with desoxycortisone, like action *Lancet*, 2 : 381~386, 1950.
67. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N. : Purification and characterization of an Avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae, 1987.
68. Nara, P.L., Hatch, W.C. and Dunlop, N.M. : Simple rapid, quantitative syncytium forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS res. Human Retroviruses*, 3 : 283~302, 1987.
69. Pal, R., Gallo, R.C. and Sarngadharan, M.G. : Processing of the structural proteins of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of monensin and cerulenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 9283~9286, 1988.
70. Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Gelder, J.V., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellenkens, K., Janssen, M.A.C., De Clercq, E. and Janssen, P.A.J. : Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature*, 343 : 470~474, 1990.
71. Pauza, C.D. and Galindo, J. : Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of monoblastoid cells leads to accumulation of self-integrated viral DNA and to production of defective virions. *J. Virol.*, 63 : 3700~3707, 1989.
72. Pelsler, H.E., Willebrands, A.F., Frenkel, M., van der Heids, R.M. and Groen, J. : Comparative study of the use of Glycyrrhizic and glycyrrhithinic acids in Addison's disease. *Metabolism*, 2 : 322~334, 1952.
73. Perno, C.F., Yarchoan, R., Cooney, D.A., Hartman, N.R., Gartner, S., Popovic, M., Hao, Z., Gerard, T.L., Wilson, Y.A., Johns, D.G. and Broder, S. : Inhibition of HIV-1 replication in fresh and cultured human peripheral blood monocytes/macrophages by azidothymidine and related 2', 3'-dideoxynucleosides. *J. Exp. Med.*, 168 : 1111~1125, 1988.
74. Pizzo, P.A., Eddy, J., Faloon, J., Balis, F., Murphy, R.F., Moss, H., Wolters, P., Borrowers, P., Jarosinski, P., Rubin, M., Broder, S., Yarchoan, R., Brunetti, A., Maha, M., Nusinoff-Lehrman, S., and Poplack, D.G. : Effect of continuous intravenous infusion of zidovudine(AZT) in children with symptomatic HIV infection. *N. Engl. J.*

- Med., 319 : 889~896, 1988.
75. Polk BF, Fox R, Brookmeyer R, et al. : Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. *N Engl J Med.*, 316 : 61-6, 1987.
 76. Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M.A., Pani, A. and Loddo, B. : Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, 281 : 689~690, 1979.
 77. Popovic, M., Sarngadharan, N.G., Read, E., and Gallo, R.C.(1984) : Detaction of cytopathic retroviruses(HLTV-3) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 224 : 868~871.
 78. Revers, F.E. : Heeft Succus Liquiritiae een genezende werking op de Maagzweer Nederl. Tijdschr. Geneesk., 90 : 135~137, 1946.
 79. Richman, D.D., Fischl, M.A., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Hirsch, M.S., Jackson, G.G., Durack, D.T., Nusin-off-Lehrman, S. and The AZT Collaborative Working Group : The toxicity oif azidothymidine(AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.*, 317 : 192~197, 1987.
 80. Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craing, J.C., Duncan, I.B., Galpin, S.A., Handa, B.K., Kay, J., Krohn, A., Lambert, R.W., Merrett, J.H., Mills, J.S., Parkes, K.E.B., Redshaw, S., Ritchie, A.J., Taylor, D.L., Thomas, G.J. and Machin, P.J. : Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science*, 248 : 358~361, 1990.
 81. Rosen, C.A., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. : The location of cis-acting regulatory sequences in human T cell lymphotropic virus type III long terminal repeat. *Cell*, 41 : 813~823, 1985.
 82. Rosen, C.A. and Pavlakis, G.N. : Tat and Rev : positive regulation of HIV gene expression. *AIDS*, 4 : 499~509, 1990.
 83. Sarver, N., Cantin, E.M., Chang, P.S., Zaia, J.A., Ladne, P.A., Stephens, D.A. and Rossi, J.J. : Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 247 : 1222~1225, 1990.
 84. Schooley, R.T., Merigan, T.C., Gaut, P., Hirsch, M.S., Holodney, M., Flynn, T., Liu, S., Byington, R.E., Henochowicz, S., Gubish, E., Spriggs, D., Kufe, D., Schindler, J., Dawson, A., Thomas, D., Hanson, D.G., Letwin, B., Liu, T., Gulinello, J., Kennedy, S., Fisher, R. and Ho, D.D. : Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I - II escalating dosage trial. *Ann. Int. Med.*, 112 : 247~253, 1990.
 85. Seligmann, M., Pinching, A.J. and Rosen, F.S. : Immunology of human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. An update. *Ann. Int. Med.*, 107 : 234~42, 1987.
 86. Seligmann, M., Pinching, A.J. and Rosen, F.S. : Immunology of human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. An update. *Ann. Int. Med.*, 107 : 234~42, 1987.

87. Shiaume, K. and Lerner, A.B. : The determination of the melanocyte-stimulating hormone in urine and blood. *J. Clin. Endocrinol.*, 14 : 1491~1510, 1954.
88. Shirasaka, T., Murakami, K., Ford, H., Jr., Kelley, J.A., Yoshioka, H., Kojima, E., Aoki, S., Broder, S. and itsuya, H. : Lipophilic halogenated congeners of 2', 3'-dideoxypurine nucleosides active against human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 9426~9430, 1990.
89. Smith, D.H., Byrn, R.A., Marsters, S.A., Gregory, T., Groopman, J.E. and Capon, D.J. : Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science*, 238 : 1704~1707, 1987.
90. Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W.A.(1986) : Role of the HTLV-3/LAV envelope in syncytia and cytopathicity. *Nature*, 332 : 470~474.
91. Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G. E. and Gilboa, E. : Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell*, 63 : 601~608, 1990.
92. Takeda, A., Sweet, R.W. and Ennis, F.A. : Two receptors are required for antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection : CD4 and FcR. *J. Virol.*, 64 : 5605~5610, 1990.
93. Tateno, M., Gonzalez-Scarano, F. and Levy, J.A. : Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 4287~4290, 1989.
94. Ueno, R. and Kuno, S. : Dextran sulfate, a potent anti-HIV agent in viro having synergism with zidovudine. *Lancet*, 1 : 1379~1380, 1987.
95. Volberding, P.A., Lagakos, S.W., Koch, m. A., Pettinelli, C., Myers, M.W., Booth, D.K., Balfour, H.H., Reichman, R.C., Bartlett, J. A., Hirsch, M.S., Murphy, R.L., Hardy, W. D., Soeiro, R., Fischl, M.A., Bartlett, J.G., Merigan, T.C., Hyslop, N.E., Richman, D. D., Valentine, F.T., Corey, L. and The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases : Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 941~949, 1990.
96. Walker, B.D., Kowalski, M., Goh, W.C., Kozarsky, K., Krieger, M., Rosen, C. Rohrscheider, L., Haseltine, W.A. and Sodroski, J. : Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 8120~8124, 1987.
97. Weislow, O.S., Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. : New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects : Application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS antiviral activity. *J. Nat. Cancer Inst.*, 81 : 577~586, 1989.
98. *Who Weekly Epidemiological Record*, 16 (3) : 229, 1986.
99. Wong-Staal, F., and Gallo. R.C.(1985) : Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature*, 317 : 395~403.

100. Yarchoan, R., Thomas, R.V., Pluda, J.M., Perno, C.F., Mitsuya, H., Marczyk, K.S., Sherwin, S.A. and Broder, S. : Phase I study of the administration of recombinant soluble CD4 by continuous infusion to patients with AIDS or ARC. Proceedings of Vth International Conference on AIDS, Motreal, Canada, June 4-9, 1989, p.564, MCP 137.