약학회지 제 47 권 제 1 호 46~51 (2003)
Yakhak Hoeji Vol. 47, No. 1

면역결핍바이러스 인테그라제 억제제로서 Baicalein과 Baicalin

이민전 · 김미라 · 이용섭* · 신차균#
중앙대학교 산업과학대학 생명공학과, *한국과학기술연구원 생체과학 연구부
(Received January 2, 2003; Revised February 18, 2003)

Baicalein and Baicalin as Inhibitors of HIV-1 Integrase

Min Jun Lee, Mira Kim, Yong Sup Lee* and Cha-Gyun Shin#
Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansung, Kyungki 456-756, Korea
**Life Sciences Division, Korea Institute of Science & Technology, Seoul 130-650, Korea*

Abstract — Baicalein and baicalin are flavonoid compounds isolated from medicinal herb *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Labiatae*) and have been known to possess antiviral activities. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of baicalein and baicalin on the three distinctive enzymatic activities of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) integrase - endonucleolytic, integration, and disintegration activities. Both compounds inhibited the three enzymatic activities in a dose-dependent manner. The 50% inhibitory concentrations of baicalein and baicalin for endonucleolytic activities of HIV-1 integrase were 4.4±3.3 and 25.9±4.0 μM, respectively. In general, baicalein exhibited nearly 6- to 10-fold stronger inhibition than baicalin for the three enzymatic activities. These data demonstrate that baicalein or baicalin can be used as a leading compound to develop anti-AIDS chemotherapeutic agents targeting to the HIV-1 integrase.

Keywords □ HIV-1, integrase, baicalein, baicalin

리트로바이러스는 자신의 복제과정의 일부로서 바이러스 유전자를 숙주세포의 유전자에 중합시킨다. 이 과정은 바이러스 증식을 위하여 필요불가결하며 이때 작용하는 것이 바이러스 특유의 효소인 integrase이다.[1] 박테리아에서 정제한 리트로바이러스의 integrase는 *in vitro*에서 3 가지의 생물학적 활성이 있다. 첫째, endonucleolytic 활성으로 바이러스 DNA 끝의 염기서열을 갖는 짧은 duplex oligonucleotide를 기질로 사용하여 DNA의 3'-말단의 2개의 핵산을 제거한다. 둘째, integration 활성으로 integrase는 3'-말단의 2개의 핵산이 절단된 dulpex oligonucleotide를 target DNA에 집어넣는다.[2] 셋째, integrase는 disintegration 활성을 나타낸다.[3] Duplex oligonucleotide의 기질이 integration 된 형태와 같은 Y-형태의 합성된 duplex oligonucleotide에 integrase를 첨부하면 선택적으로 branch부분을 끊어낸다.[3] 이러한 integrase의 효소활성의 차단은 바이러스의 증식을 차단하여, 에이즈 발병 및 진행을 억제할 수 있기 때문에, 효소활성 억제제의 개발은 많은 연구자들의 관심이 되어왔다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-670-3067 (팩스) 031-675-0409
(E-mail) cgshin@cau.ac.kr

2002년 현재 약 4500만 명을 감염하고 있는 에이즈 바이러스의 전파와 감염자들의 에이즈 발병 및 치료를 위하여 수 많은 화합물들이 개발되었으나, 미국 식품의약청에서 공인되어 사용되고 있는 약물은 바이러스의 역전사효소를 목표로 하는 약물 9가지, 단백분해효소를 목표로 하는 약물 5가지 정도이다.[4] 이들 약물도 단일약물의 처방으로는 6개월 이내에 약물 내성 바이러스들이 생겨나기 때문에 효과적으로 바이러스의 증식을 차단하지는 못하고 있다.[5] 최근에 개발된 방법으로 약물의 목표를 달리하는 2종 이상의 약물의 복합처방은 바이러스의 증식을 상당기간 억제하여 보균자의 발병과 환자의 질병 진행을 상당히 억제하는 효과를 보이고 있다.[6] 그러나, 이방법도 바이러스 증식의 완전한 억제와 바이러스의 제거는 불가능하여 질병의 완치를 위하여 더 효과적인 치료 방법이나 치료제의 개발을 필요로 하고 있다. 따라서, 이러한 요구는 아직까지 공인된 약물이 개발되지 않은 바이러스의 효소 integrase를 목표로 하는 약물의 개발을 서두르게 하고 있다.

Integrase의 효소활성을 억제하는 것으로 최근까지 알려진 화합물들의 주요 부류는 aurintricarboxylic acids, cosalene analogues, caffeic acid phenylethyl ester(CAPE), flavones, DNA-결합 펩타이드 및 올리고 핵산, topoisomerase 억제제들이

다.[7-10] 이중에서도 flovones에 속하는 quercetagetin, robinetin, myricetin등의 화합물은 항 integrase 활성이 있다. 그러므로 이 화합물들을 선도물질로 하여 화학적으로 합성하거나 식물에서 추출된 유도체들의 항 integrase 활성을 검사하는 것은 항 에이즈 치료제의 개발에 중요한 과정의 하나이다. Scutellaria속의 식물에서 추출되는 baicalin은 baicalein의 유도체로서 세포에 생리적으로 다양한 영향를 준다. Baicalin은 세포에서 대사과정에서 생긴 자유 radical들을 제거하여 항산화작용을 수행하며,[11] 세포주기를 억제하고, 세포자살을 유발하여 암세포의 증식을 억제한다.[12-14] 또한 면역결핍바이러스의 역전사효소에 작용하여 바이러스의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.[15] 본 연구에서는 *in vitro*에서 baicalin과 baicalein의 항 integrase 활성을 조사한 결과, baicalin과 baicalein은 integrae의 세 가지 활성을 모두 억제하며 억제작용은 baicalein이 더 효과적인 것으로 밝혀졌다.

실험방법

시약 및 재료

Baicalein(분자량; 270)은 일본米山藥品에서 구입하였다. Baicalin은 황금[*Scutellaria baicalensis* Georgi(*Labiatae*)]에서 추출, 정제한 것으로 서울대학교 생약실(故 허훈 교수)에서 얻었다. Integrase 단백질 정제와 관련된 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 실험에 사용된 oligonucleotide들은 Takara (Korea)에서 제작하였다.

단백질의 정제

Integrase 단백질의 정제는 본연구실에서 제작한 integrase 발현벡터(pQEIN)을 이용하였다.[16] pQEIN을 갖고 있는 박테리아 (*E. coli*, XL-1 Blue)를 ampicillin이 100 μg/ml 들어 있는 Luria-Bertani배지 내에서 배양을 하여 흡광도가 600 nm에서 0.7이 될 때 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 넣고 3시간 동안 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 모으고, 완충용액 A[50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 20 mM β-MeOH, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1 M NaCl, 10 mM CHAPS]에 현탁한 후, 초음파 파쇄기(XL2020, Misonix, USA)을 이용해서 균체를 파괴하였다. 파괴된 균체의 용액을 4°C에서 40,000 × g로 20분간 원심분리하여 integrase 단백질을 함유하는 상등액을 따로 분리하였다. 상등액을 미리 준비한 Ni-NTA column(Quagen, USA)을 통과시키고, 완충용액 B[50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 20 mM β-MeOH, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 1 M NaCl, 10 mM CHAPS]로 충분히 세척한 후, 완충용액 B에 imidazole의 농도를 증가시키면서 integrase 단백질의 추출을 유도하였다. Integrase 단백질은 약 100 mM imidazole 농도에서 추출되며 2리터 박테리아 배양액에서 약 2 mg을 얻었다.

효소활성 측정용 기질의 제작

Endonucleolytic 반응 기질은 바이러스 DNA의 끝의 염기서열과 동일한 20 base-pair의 이중가닥 oligonucleotide를 방사능으로 표식하여 기질로 사용하였다. Oligonucleotide K16(U5-LTR, +strand; 5'-TGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3')와 oligonucleotide K17(U5-LTR, -strand; 5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACA-3')에 방사능이 표식된 20 base-pair의 DNA기질을 제작하기 위하여 먼저 약 15 nM의 oligonucleotide K16을 40 μl의 반응용액 [70 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT]에서 250 mCi의 γ^{32}P-ATP(3000 Ci/nM, 1 Ci = 37 GBq, Amersham)와 10 unit의 T4 PNK로 37°C에서 15분간 처리하였다. 0.5 M EDTA 1 μl와 5 M NaCl을 첨가하고, 18 nM의 oligonucleotide K17을 넣은 후, 3분간 100°C에서 가열하고 천천히 식힌다. 반응용액을 Sephadex G25에 통과시켜, 반응하지 않은 γ^{32}P-ATP를 제거하였다.[17]

Disintegration 활성의 측정에 사용되는 기질로써는 Y-모양의 oligonucleotide를 다음과 같이 제작하였다.[3,17] 16mer인 oligonucleotide T1(5'-CAGCAACGCAAGCTTG-3')을 위의 방법으로 방사능을 표식하고, 32mer인 T2(5'-TGTGGAAAATCTCT-AGCAGGCTGCAGGTCGAC-3')와 30mer인 T3(5'-GTCGACC-TGCAGCCCAAGCTTGCGTTGCTG-3'), 그리고 20mer인 oligonucleotide K17을 넣어서 상보적인 결합이 일어나게 하였다.

Integration 활성의 측정에는 바이러스 DNA끝의 염기서열과 동일하며 3' 말단이 CA로 노출된 18mer와 상보적인 20mer oligonucleotide 이중가닥 DNA를 oligonucleotide 기질로 사용하였다. Oligonucleotide CA104(U5-LTR, +strand; 5'-TGTGGA-AAATCTCTAGCA-3')에 방사능으로 표식하고 oligonucleotide K17 을 넣어서 상보적인 결합이 일어나게 하였다. 또한, 중합반응에 첨가하는 표적 DNA는 각기 32mer인 두 개의 상보적인 oligonucleotide IG1B(5'-TCGAGAAAAAAAAAAACTTAAGCC-CCCCCCCCC-3')와 IG2B(5'-TCGAGGGGGGGGGGGCTTAA-GTTTTTTTTTTC-3')를 동량 섞은 후 상보적인 결합이 일어나게 하여 제작하였다.[17]

효소 활성의 측정

Endonucleolytic 활성은 10 mM Tris-HCl[pH 7.4], 5 mM $MnCl_2$을 함유하는 반응용액 10 μl에 최종농도로써, 방사능으로 표식된 기질 10 nM, 각 실험에서 표시된 활성억제제의 일정량과 효소 300 nM을 넣고 33°C에서 90 분간 반응시켰다. 4 μl의 정지용액(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 첨가하여 정지시키고 90°C에서 3분간 가열한 후 19% acrylamide gel에서 분석하였다. 20mer

의 기질이 18mer로 전환된 반응의 진행정도는 전기영동 젤을 phosphoimage analyzer(GS-525, Bio-Rad)에서 정량하였다.[16,17]

Integration 활성은 방사능으로 표식 된 integration 기질을 사용하여 100 nM의 표적 DNA(IG1B/IG2B)를 함유하며 endonucleolytic 반응과 같은 조건에서 실시하였다.

Disintegration 활성 확인을 위한 반응조건은 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10 mM $MnCl_2$에서 방사능으로 표식된 Y-모양의 기질, 활성억제제와 효소를 첨가하고 위에서와 같은 조건에서 반응시키고 분석하였다.

결과 및 고찰

황금 [Scutellaria baicalensis Georgi(Labiatae)]에서 분리하는 baicalin은 예로부터 한국, 중국 등에서 만성간염을 치료하는 약재의 주요 성분이다. Baicalin은 baicalein의 유도체로써 7번 탄소에 한 개의 글루코우론산을 갖고 있다(Fig. 1). 이 화합물들은 항세균작용,[18] 항산화작용, 항염증작용,[19] 혈관근육이완작용,[20] 항바이러스작용,[15] 등을 나타낸다. 최근의 연구들에 의하면, baicalein과 baicalin은 배양된 세포에서 면역결핍바이러스의 증식을 억제한다. Baicalin은 역전사효소의 활성을 억제하며,[15] baicalein은 integrase의 endonucleolytic 활성을 억제한다.[9] 이러한 결과는 구조적으로 유사체인 baicalin도 integrase의 활성을 억제 할 수 있을 것으로 사료되어 baicalin의 항 integrase 활성 여부를 baicalein과 비교하였다. Fig. 2A는 integrase의 endonucleolytic 활성을 도식화한 것이다. Integrase는 세포 안에서 바이러스 DNA의 양쪽 3'-말단 끝의 두 개의 핵산을 절단한다. 이 특성을 측정하기 위하여, 바이러스 DNA 한쪽 끝의 3'-말단의 염기서열을 갖는 올리고핵산을 제작하고 이것의 5'-말단을 방사능으로 표식한 기질을 제작한다. Integrase의 endonucleolytic 활성은 방사능으로 표식된 기질을 integrase와 반응시킬 때, integrase

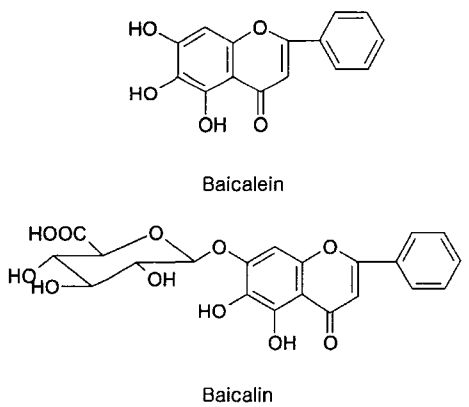

Fig. 1 – Chemical structures of baicalein and baicalin. Baicalin has a β-D-glucopyranosideuronic acid at the C-7 position of a 5,6,7-trihydroxyflavone.

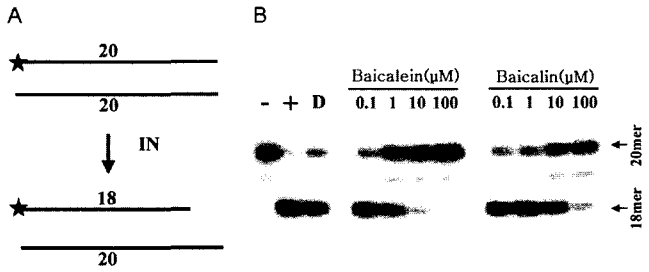

Fig. 2 – Inhibition of endonucleolytic activities of HIV-1 integrase by baicalein and baicalin. **A.** Schematic illustration of endonucleolytic reaction. **B.** Endonucleolytic activities of HIV-1 integrase in the presence of baicalein or baicalin. The radiolabeled (★) substrates of 10 nM were in- cubated 33°C for 90 min with purified integrase of 300 nM in the presence of an inhibitor of concentration indicated above. Conversion of the 20mer oligonucleotide to the 18mer was analyzed in a 19% polyacrylamide gel. IN, integrase; –, no integrase and no inhibitor; +, no inhibitor; D, 5% DMSO as a solvent control.

가 3'-말단의 2개의 핵산을 제거하여, 방사능으로 표식된 20mer의 올리고핵산이 18mer로 전환되는 것을 아크릴아마이드 젤에서 분리하여 관측할 수 있다. Fig. 2B에서 baicalein과 baicalin을 최종농도로 0.1, 1, 10, 100 μM 되게 반응에 넣고 integrase의 활성억제를 조사하였다. 이 화합물들의 활성억제능력은 첨가한 화합물의 농도에 비례하여 증가하고 있음을 보여준다. 반응이 일어난 기질의 양과 반응하지 않은 기질의 양을 phosphoimage 분석기로 측정하여 IC_{50}(50% 반응억제 농도)를 조사하였을 때, baicalein의 IC_{50}는 4.4±3.3 μM, baicalin의 IC_{50}는 25.9±4.0 μM로 나타났다. Baicalein의 IC_{50}는 미국 보건원의 Fesen 등이 보고한 1.2 μM와 매우 유사한 값을 보여 주여, baicalein이 면역결핍바이러스의 integrase에 효과적으로 작용함을 나타낸다.[9] Baicalin의 integrase에 대한 endonucleolytic 활성억제 능력은 baicalin 보다 약 5.8배 약한 것으로 나타난다. 이것은 flavone 구조의 7번 탄소에 결합한 한 개의 글루코우론산이 상대적으로 integrase 단백질에 대한 친화력을 떨어뜨린 것 때문으로 사료된다. 그러나 임상실험까지 진행되었던 curcumin(IC_{50}: 90 μM) 보다 활성억제능이 강하여 baicalein 및 baicalin 유도체들이 항 integrase 약물로 개발될 수 있음을 보여준다.[21]

Integrase는 양쪽 3'-말단의 2개의 핵산이 제거된 바이러스 DNA를 세포의 유전자에 도입하는 integration 활성이 있다. *In vitro*에서 integration 활성은 5'-말단에 방사능이 표식된 올리고핵산 기질을 이용하여 측정 할 수 있다(Fig. 3A). Baicalein과 baicalin의 농도를 증가시키면서 integration 반응을 시킬 때, 반응의 진행이 첨가한 화합물의 농도에 비례하여 억제되고 있다(Fig. 3B). 이 결과는 baicalin이 integrase의 integration 활성을 효과적으로 억제함을 보여준다. Integrase가 보유한 세 번째 효소활성인 disintegration활성은 바이러스 DNA가 중합되어 있는

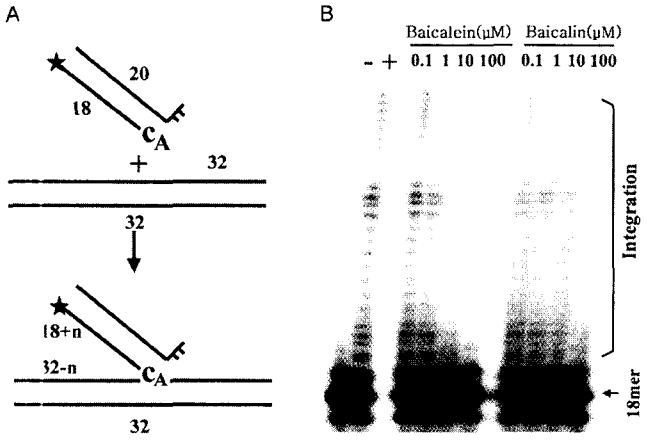

Fig 3 – Inhibition of integration activities of HIV-1 integrase by baicalein and baicalin. **A.** Schematic illustration of integration reaction. The substrates prelabeled with radioactivity ^{32}P (★) on its 5' end are randomly inserted to the target DNA by integrase. Integration can occur at many positions in the target DNA, producing multiple oligonucleotides of various size. **B.** Integration activities of HIV-1 integrase in the presence of baicalein or baicalin. The symbols have the same meanings as those in the legend for Fig. 2.

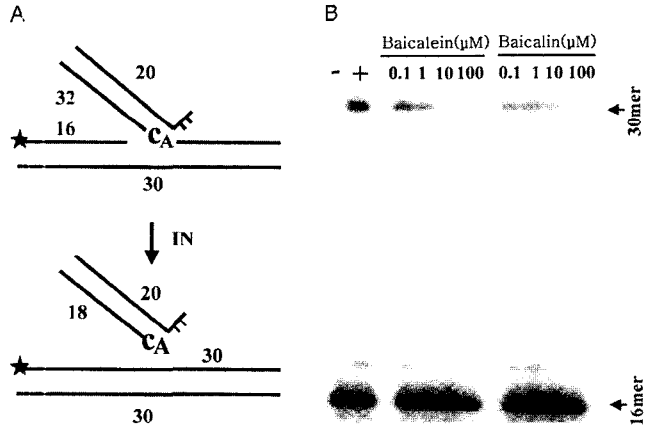

Fig 4 – Inhibition of disintegration activities of HIV-1 integrase by baicalein and baicalin. **A.** Schematic illustration of disintegration reaction. The 16mer oligonucleotides prelabeled with radioactivity ^{32}P (★) on its 5' end are converted to the 30 mer oligonucleotides in the presence of integrase. **B.** Disintegration activities of HIV-1 integrase in the presence of baicalein or baicalin. The symbols have the same meanings as those in the legend for Fig. 2.

형태의 유전자에서 바이러스 DNA를 분리한다. 이 활성은 *in vitro*에서 방사능이 표식된 올리고핵산을 이용하여 측정할 수 있다(Fig. 4A). Baicalein과 baicalin은 integrase의 disintegration도 10 μM 정도에서 억제하고 있음을 보여준다(Fig. 4B).

생약 중에서 integrase는 대부분 monomer로 존재하며, 극히 일부분이 이량체나 사량체 등의 복합체로 존재한다. 기질에 작용하여 효소활성을 나타내는 것은 이량체나 사량체로 알려져 있

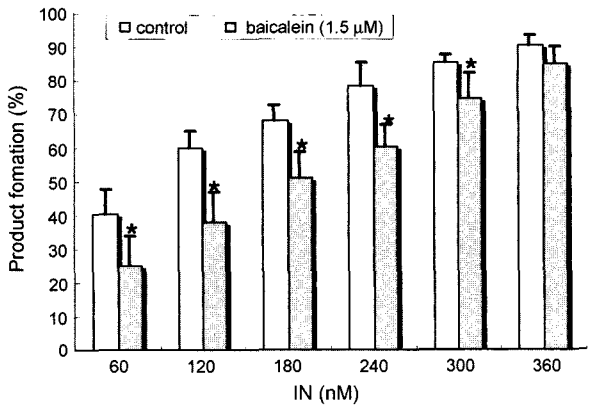

Fig. 5 – Inhibition of endonucleolytic activities by baicalein in the presence of integrase of various amounts. The endonucleolytic substrates of 8 nM were incubated 33°C for 90 min with integrase of various concentrations indicated above in the absence or presence of 1.5 μM baicalein. Product formation was analyzed in a phosphoimage analyzer. *Significantly different from control group ($p<0.05$).

다.[22] 따라서, integrase의 효소반응은 다른 효소들의 반응과는 달리 기질의 양에 비하여 과량의 효소를 사용한다. 또한, 최근의 연구는 integrase와 baicalein이 상호작용 할 때, baicalein이 integrase 단백질의 중앙영역의 소수성 지역에 결합하는 것으로 밝혀졌다.[23] 따라서, 본 연구에서는 baicalein이 효소에 직접 결합하여 활성을 억제한다면 baicalein이 효소활성을 억제할 때, 반응의 효소의 양을 증가시킴에 따라 활성억제 효과가 감소할 것으로 예상하고 기질의 양을 일정하게 하고 효소의 농도를 변화시키며 endonucleolytic 반응의 진행 정도를 조사하였다. 기질 8 nM에 효소를 60, 120, 180, 240, 300, 360 nM로 변화시키며 반응시킬 때, 반응이 일어난 기질의 양은 40.4±7.2, 59.9±5.2, 68.1±4.6, 78.4±6.8, 85.5±2.2, 90.4±2.9%로서 효소의 양에 따라 반응이 진행되는 정도가 크게 차이를 보여 준다(Fig. 5). 효소의 양이 기질 농도에 비하여 절대적으로 많은 조건에서도 기질에 작용할 수 있는 효소의 이량체나 사량체의 양이 반응을 완결할 수 있을 정도로 충분하지 않음을 알 수 있다. 또한, 효소의 반복작용에 의하여 반응의 진행을 증가시키기 위하여 반응시간을 120, 180, 240분으로 증가시켰을 때에도 반응의 진행이 별로 증가하지 않았다(Data not shown). 이것은 integrase가 기질 DNA에 염기서열에 무관하게 강하게 결합하고, 결합된 염기서열이 효소가 작용할 수 있는 특이적인 염기서열인 경우는 절단반응을 하고, 비특이적인 염기서열에는 결합하여 정착하는 성질 때문으로 사료된다.[23] 같은 조건에서 baicalein을 최종농도로 1.5 μM을 첨가하면 반응의 진행 정도는 25.1±8.6, 38.2±8.9, 51.0±7.8, 60.4±6.7, 74.8±7.5%, 85.0±5.1%로 효소의 농도가 감소함에 따라 baicalein의 반응억제 작용이 더욱 크게 작용하고 있음을 보여준다(Fig. 5). 이것은 baicalein이 효소에 결합하여 효소의 작용을

억제하기 때문으로 효소의 농도를 증가하면 baicalein의 억제 효과가 상실될 수 있음을 보여준다. Baicalin과 baicalein의 integrase 활성억제 효과는 이 화합물들이 효소 단백질에 직접 결합함으로 나타나는 것으로, 이 화합물들이 integrase에 결합하면 효소의 구조가 변화하는 것으로 알려져 있다.[23] 따라서, 이들의 결합은 효소의 활성구조를 바꾸어 항 integrase 작용이 나타나게 하는 것으로 사료된다.

Baicalin은 면역결핍바이러스의 역전사효소의 작용을 억제하고 감염된 여러 종류의 세포에서 바이러스 증식을 억제한다.[15] 본 연구에서는 baicalin이 integrase의 활성을 억제하는 것을 밝혔다. 따라서, baicalein과 baicalin의 다양한 유도체의 제작 및 검색은 역전사효소와 integrase의 활성을 동시에 억제하여, 항 면역결핍바이러스의 활성을 갖는 약물을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Baicalin과 baicalein의 면역결핍바이러스 integrase의 효소활성 억제을 조사하여 보았을 때, 두 개의 화합물이 모두 integrase의 3가지 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. Integrase의 endonucleolytic 활성에 대한 각 화합물의 IC_{50}는 baicalein이 4.4±3.3 μM, baicalin이 25.9±4.0 μM로 나타나 baicalein이 baicalin보다 약 5.8배 더 활성억제능이 강한 것으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 2002학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드리며, 부분적으로 과기부 중점국가연구개발사업과 중앙대 선도특성화사업의 지원을 받았다.

문 헌

1) Colicelli, J. and Goff, S. P. : Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site. *J. Mol. Biol.* **199**, 47 (1988).
2) Fujiwara, T. and Mizuuchi, K. : Retroviral integration; structure of an integration intermediate. *Cell* **54**, 497 (1988).
3) Chow, S. A., Vincent, K., Ellison, V. and Brown, P. O. : Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* **255**, 723 (1992).
4) UNAIDS and WHO : Global summary of HIV/AIDS epidemics, AIDS epidemics update (December), Geneva, Switzerland p. 5 (2002).
5) Eastman, P. S., Mittler, J., Kelso, R., Gee, C., Boyer, E., Kolberg, J. and Markowitz, M. : Geneotypic changes in human immunodefiecincy virus type 1 associated with loss of suppression of plasma viral RNA levels in subjects treated with ritonavir monotherapy. *J. Virol.* **72**, 5154 (1998).
6) Richman, D. D. : HIV therapeutics. *Science* **272**, 1886 (1996).
7) Cushman, M., Golebiewski, W. M., Pommier, Y., Mazumder, A., Reymen, D., Clercq, E. De, Graham, L. and Rice, W. G. : Cosalane analogues with enhanced potencies as inhibitors of HIV-1 protease and integrase. *J. Med. Chem.* **38**, 443 (1995).
8) Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteurtre, F. and Pommier, Y. : Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2399 (1993).
9) Fesen, M. R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J. and Kohn, K. W. : Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 595 (1994).
10) Carteau, S., Mouscadet, J. F., Goulaouic, H., Subra, F. and Auclair C. : Effect of topoisomerase inhibitors on the *in vitro* HIV DNA integration reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1409 (1993).
11) Shieh, D. E., Liu, L. T. and Lin, C. C. : Antioxidant and free radical scavenging effects of baicaalein and wogonin. *Anticancer Res.* **20**, 2861 (2000).
12) Ikezoe, T., Chen, S. S., Heber, D., Taguchi, H. and Koeffler, H. P. : Baicalin is a major component of PC-SPES which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. *Prostate* **49**, 285 (2001).
13) Nakamura, U. S., Masutani, H., Sasada, T., Takabayashi, A., Yamaoka, Y. and Yodoi, J. : Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol. Immunol.* **38**, 781 (2002).
14) Chan, F. L., Choi, H. L., Chen, Z. Y., Chan, P. S. and Huang, Y. : Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.* **160**, 219 (2000).
15) Kitamua, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, M., Ono, K. and Tokunaga, T. : Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. *Antiviral Res.* **37**, 131 (1998).
16) Oh, J.-W. and Shin, C.-G. : Purification and characterization of the human immunodeficiency virus type-1 integrase expressed in *E. coli*. *Mol. Cells* **6**, 96 (1996).
17) Oh, Y. T. and Shin, C.-G. : Comparision of enzymatic activities of the HIV-1 and HFV integrases to their U5 LTR substrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 621 (1999).
18) Huang, K. C. : *Antibacterial, antiviral, and antifungal herbs*, The phamacology of chinese herbs, CRC Press, Boca Raton, FL. p. 385 (1999).
19) Kubo, M., Matsuda, H., Tani, T., Arichi, S., Kimura, Y. and Okuda, H. : Studies on Scutellariae radix. XII. Anti-thrombic actions of various flavonoids from Scutellariae radix. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2411 (1985).
20) Chen, Z. Y., Su, Y. L., Lau, C. W. and Huang, Y. C. :

Endotheelium-dependent contraction and direct relaxation induced by baicalin in rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **374**, 41 (1999).

21) Mazumder, A., Raghavan, K. C., Weinstein, J., Kohn, K. W. and Pommier, Y. : Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1165 (1995).

22) Jones, K. S., Coleman, J., Merkel, G. W., Laue, T. M. and Skalka, A. M. : Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J. Biol. Chem.* **267**, 16037 (1992).

23) Ahn, H.-C., Lee, S.-Y., Kim, J.-W., Son, W.-S., Shin, C.-G. and Lee, B.-J. : Binding aspects of baicalein to HIV-1 integrase. *Mol. Cells* **12**, 127 (2001).