

수종 생약의 Protein kinase C 저해활성

이현선* · 안순철 · 김보연 · 박문수 · 오원근 · 윤병대 · 안중석 · 민태익
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Inhibitory Activity against Protein Kinase C of Some Medicinal Plants

Hyun Sun Lee*, Soon Cheol Ahn, Bo Hyun Kim, Moon Su Park,
Won Keun Oh, Byung Dae Yoon, Jong Seog Ahn and Tae Ick Mheen
Laboratory of Microbial Technology, Genetic Engineering Research
Institute, KIST, P.O.Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

Abstract—MeOH extract of twenty medicinal herbs were screened for their effects against protein kinase C (PKC) using bleb-forming assay and PKC enzyme assay. *Smilax china* and *Sanguisorba officinalis* showed potent anti-PKC activity. *Campsis grandiflora* and *Galla Halepensis* showed moderate inhibitory effect on PKC.

Keywords—Protein kinase C · bleb forming assay · *Smilax china* · *Sanguisorba officinalis* · *Campsis grandiflora* · *Galla Halepensis*

Protein kinase C(PKC, Ca⁺⁺/phospholipid-dependent protein kinase)는 세포내 신호전달 뿐만 아니라 세포반응조절, 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 하고 있다.¹⁻³⁾ 이 효소는 phospholipase C에 의한 phosphoinositide의 가수분해에 의해 생성된 diacylglycerol과 Ca⁺⁺에 의해 생리적으로 활성화되며^{4,5)}, 또한 tumor promoter인 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate(TPA)와 phorbol-12, 13-dibutylate(PDBu) 같은 phorbol ester들에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} 이제까지 알려진 PKC의 세포반응조절의 다양한 역할은 선택적인 PKC 저해제가 항암제를 비롯하여 신경계, 순환기계 질환, 면역계 질환의 치료제로의 개발가능성을 보여주고 있어 이들에 대한 탐색이 이루어지고 있다.⁸⁻¹¹⁾ PKC 저해제로서 임상적으로 사용되고 있는 약물로는 tamoxifen, adriamycin trifluoroperazine, chlorpromazine, polymixin B, aminoacridine 등을 들 수 있으며, 합성품인 Et-18-OMe, HAG, HMG, H-7 등과 lipoidal amine 계열의 sphinganine,

palmitoylcarnitine 등은 강력한 PKC 저해제로 알려져 있다.^{8,12)} 천연물 유래의 PKC 저해제는 거의 대부분이 미생물유래 대사산물로서 staurosporine, calphostin, sangivamycin 등이 알려져 있으나 생약자원으로 부터의 PKC 저해제 탐색은 미진한 상태이다.

본 실험에서는 국내 생약자원으로 부터 PKC 저해제를 탐색할 목적으로 K562 세포주를 이용한 bleb forming assay와 PKC 효소활성검정을 병용하여 20종의 생약시료에 대한 PKC 저해활성을 검토했다.

실 험 방 법

시약—Protein kinase C 효소활성측정에 사용된 staurosporine, PDBu(phorbol 12, 13-dibutylate), histon III-S와 phosphatidylserine은 Sigma Co.에서, diolein은 Serdary Research Lab.에서 [³²P]ATP는 Amersham에서 구입하여 사용하였으며, K562 cell의 배양을 위한 RPMI1640 배지는

GIBCO, fetal calf serum은 Hyclone Co.에서 구입하여 사용하였다.

생약시료의 조제—실험에 사용한 생약들은 직접 채취하거나 시중 건재 한약방에서 선별 구입하였다. 각 건조생약(10~20 g)을 MeOH(200~400 ml)로 실온에서 2일간씩 2회 추출·여과한 후 45°C 이하에서 감압농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이 엑스를 5 mg/ml의 농도가 되도록 MeOH에 녹여 bleb-forming assay와 PKC 저해 활성검정에 사용하였다. 실험에 사용된 20종의 생약은 다음과 같다: 시호 *Bupleurum falcatum*, 오수유 *Evodia officinalis*, 명감나무 *Smilax china*, 오이풀 *Sanguisorba officinalis*, 능소화 *Campsis grandiflora*, 화살나무 *Euonymus alatus*, 황벽나무 *Phellodendron amurense*, 현삼 *Scrophularia buergeriana*, 하수오 *Polygonum multiflorum*, 맛두릅나무 *Oplopanax elatus*, 백선 *Dictamnus dasycarpus*, 노박덩굴 *Celastrus orbiculatus*, 오가피 *Acanthopanax sessiliflora*, 마전자 *Strychnos nux-vomica*, 사위질빵 *Clematis apiifolia*, 솔나물 *Galium verum*, 머느리밑씻개 *Polygonum senticosum*, 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina*, 땀말기 *Duchesnea chrysantha*, 몰식자(*Galla Halepensis*).

Bleb Forming Assay—Bleb forming assay는 Osada 등¹³⁾의 방법을 약간 수정하여 실험하였다. 세포주로는 K562 cell(human chronic myelocytic leukemia cell)을 사용하였다. 배지로는 10% fetal calf serum을 함유한 RPMI1640 배지를 사용했으며, 5% CO₂ 농도, 37°C의 조건으로 CO₂ incubator에서 배양하였다. 1×10⁵ cell/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 100μl씩 분주한 후 시료용액 10μl를 첨가하고, 37°C의 CO₂ incubator에서 1시간 배양하여 세포의 이상유무를 역상현미경상에서 관찰하였다. 그후 PDBu를 1 μg/ml의 농도가 되도록 첨가하고 10분 후 K562 세포의 표면에 나타난 소포(bleb)의 형성정도를 역상현미경상에서 관찰하였다. 소포형성저해의 판정기준은 K562에 검정시료대신 staurosporin을 첨가한 것을 positive control로 하고, 검정시료를 첨가하지 않고 PDBu만을 첨가한 것을 negative control로 하여 시료

용액을 첨가한 검정구와의 bleb형성 저해정도를 비교하여 20~40% : +, 40~60% : ##, 60~80% : ###, 80~95% : #### 95% > : #####로 나타냈다.

Protein kinase C 효소활성 측정—PKC는 Huang 등¹⁴⁾의 방법에 따라 소뇌로부터 부분정제하여 사용하였다. PKC 효소활성측정은 Ca⁺⁺, phospholipid와 diolein의 존재하에 기질인 histone III-S에 [r-³²p] ATP의 ³²p가 phosphorylation되는 정도를 측정하였다. 반응액 25 μl에는 30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 6 mM magnesium⁺⁺ acetate, 0.12 mM [r-³²p] ATP(4×10⁴ cpm/μl), 0.25 mM EGTA, 0.4 mM CaCl₂, phosphatidylserine 2.5 μg, diolein 0.5 μg, histone III-S 25 μg과 PKC 효소액 5 μl를 포함한다. 여기에 검정시료 5 μl를 첨가하고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid(TCA)용액 20 μl로 더러 적신 cellulose-pi paper 반응액 10 μl를 점적하고 말린후 0.2 M KCl이 함유된 5%-TCA용액으로 전개시킨 paper 하단부 2 cm 정도를 절단하여 scintillation counter를 사용하여 histone III의 인산화 정도를 측정하였다. 이때 back ground로 phosphatidylserine과 diolein을 벤 반응액을 사용하여 검정시료의 PKC활성저해정도를 조사하였다.

실험 결과

20종의 생약시료의 MeOH 엑스의 K562에 대한 bleb forming assay를 행하여 PDBu에 의해 유도된 bleb 형성을 저해하는 활성을 나타내는 시료를 1차적으로 선별하였고, 이들에 대한 PKC 효소저해활성 효과를 검토했다. 이들중 7종의 생약시료가 2회 반복 실험에서 재현상을 보여주었다(Table 1). 명감나무, 지유, 능소화, 몰식자, 거지덩굴은 50% 이상의 bleb 형성저해 효과를 나타냈으며, 이들의 PKC 효소활성 또한 bleb 형성저해활성과 상관성 있는 저해활성을 나타냈다. 특히 명감나무와 지유의 근경의 MeOH 엑스는 500 μg/ml의 농도에서 K562 세포표면의 소포(bleb) 형성을 완전히 억제하였으며 PKC 효소에 대한 저해활성도 100%로 강력한 PKC 저해활성을 나타냈다. 또한 능소화나 몰식자도

Table I. Suppression of bleb formation and protein kinase C inhibitory activity of some medicinal plants MeOH extract

Sample		Inhibition	
Plant name	Parts	Bleb formation ^{a)} (500 µg/ml)	PKC(833 µg/ml)
시 호 <i>Bupleurum falcatum</i>	radix	### ^{b)}	26(%)
오 수 유 <i>Evodia officinalis</i>	fructus	### ^{b)}	23
명감나무 <i>Smilax china</i>	rhizome	###	100
지 유 <i>Sanguisorba officinalis</i>	rhizome	##	100
능 소 화 <i>Campsis grandiflora</i>	herb	##	78
거지덩굴 <i>Caryatia japonica</i>	herb	##	50
물 식 자 <i>Galla Halepensis</i>		##	71

MeOH extracts were tested twice. a) The degree of inhibitory activity were described in materials and method. b) The flattening phenomena in cell morphology were observed.

80~95%의 bleb 형성억제와 70% 이상의 PKC 저해활성을 보여주었다. 한편 시호와 오수유의 경우 K562 세포의 형태가 편평하게 되는 현상을 나타냈으며 PKC 저해활성도 30% 이하로서 미약하게 나타났다.

고 찰

Protein kinase C는 세포내에 극히 미량으로 존재하고 각각의 조직이나 세포의 종류에 따라 수종의 isozyme으로 존재하며, 세포내에는 PKC와는 다른 여러 종류의 protein kinase가 존재하기 때문에 이들과 PKC를 분리하여 활성을 측정하기가 간단하지 않다. 또한 PKC 효소활성은 [$r\text{-}^{32}\text{p}$]ATP를 사용하여 기질인 histone III의 ^{32}p -인산화정도를 측정해야 하므로 radioisotope를 사용하는 불편함이 따른다. 따라서 미생물배양액을 비롯한 많은 수의 천연물시료에 대한 PKC 저해활성을 검정하는데 더욱 어려움이 야기된다. 따라서 본 실험에서는 강력한 tumor promoter인 phorbol ester 화합물이 PKC의 activator이고 phorbol ester의 세포막 수용체가 PKC의 regulatory subunit라는 사실을 이용하여 phorbol ester 투여시 세포형태 변화를 일으키는 K562 세포를 이용하여 PKC의 활성화정도를 1차적으로 판단하고자 하였으며, 이 세포는 다루기 쉽고 현미경관찰이 용이한 장점을 가지고 있다. 또한 phorbol ester에 의해 PKC가 활성화되면 세포표

면에 작은 소포(bleb)들이 형성되며 이 현상은 강력한 PKC 저해제인 staurosporine, H-7 등에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다.

저자 등은 이와 같은 현상을 이용하여 Osada 등¹⁴⁾이 개발한 방법을 약간 변형한 bleb forming assay를 PKC 활성저해물질 탐색의 1차검색법으로 이용했으며, 1차검색결과 bleb 형성억제활성을 나타내는 시료에 대하여 소뇌로 부터 부분정제한 PKC 효소활성저해 효과를 검토하였다. bleb forming assay와 PKC는 서로 상관성을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나 Table 1의 시호나 오수유는 bleb 형성을 완전히 저해했으나 PKC 저해활성은 미약하게 나타났으며, K562 세포가 원래의 세포형태로 회복되지 못하고 편평하게 되는 현상을 보였다. 또한 지모로 부터 분리한 saponin으로 sarsapogenin-3-O- β -glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside와 markogenin-3-O-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside¹⁵⁾, 방선균에서 분리한 항생물질인 gluco-piericidin A는 K562 세포의 소포(bleb) 형성을 강력히 억제했으나 아주 미약한 PKC 저해활성을 보여주었다.¹⁶⁾ 이 같은 현상은 PDBu에 유도된 K562 세포표면의 bleb 형성이 PKC의 활성화에 기인된 것으로 알려져 있으나 이 이외의 다른 기전에 의해 K562 세포의 bleb 형성이 억제될 수도 있다는 가능성을 제시해준다. 현재 강력한 PKC 저해활성을 나타내는 명감나무와 능소화에 대한 PKC 저해활성물질을 탐색 중에 있다.

결 론

20종의 생약시료의 MeOH 엑스에 대하여 K562 세포를 이용한 bleb forming assay와 porotein kinase C 활성검정법을 병용하여 PKC 저해활성 효과를 검토했다.

1. 명감나무와 지유 근경의 MeOH 엑스는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 PDBu에 의해 유도된 K562 세포표면의 스포(bleb)을 완전히 저해했으며, protein kinase C에 대한 저해활성은 833 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 100%로 강력한 PKC 저해활성을 보였다.

2. 능소화와 물식자는 80~90% 정도의 bleb 형성억제효과를 보여주었으며, 70% 이상의 protein kinase C 저해활성을 나타냈다.

3. 시호와 오수유는 bleb 형성을 완전히 저해했으나 K562의 세포형태가 원래의 형태로 회복되지 못하고 편평하게 되는 현상을 보여주었으며 미약한 PKC 저해활성을 나타냈다.

〈1992년 8월 25일 접수 : 9월 1일 수리〉

References

1. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y.: *J. Biol. Chem.* 254, 3692 (1979).
2. Nishizuka, Y.: *Nature* 308, 693 (1984).
3. Nishizuka, Y.: *Science* 225, 1365 (1984).
4. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 91, 1218 (1979).
5. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: *J. Biol. Chem.* 255, 2273 (1980).
6. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: *J. Biol. Chem.* 257, 7847 (1982).
7. Niedal, J.E., Kuhn, L.J. and Bandenberk, G.R.: *Natl. Acad. Sci.* 80, 36 (1983).
8. Powis, G.: *Tips*, 12, 188 (1991).
9. Sugiura, M., Inagami, T., Gregory M.T., and Johns, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 170 (1989).
10. Whatley, P.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M.: *Prog. Lipid. Res.* 29, 45 (1990).
11. Powis, G. and Kozikowski, A.: *Clin. Biochem.* 24, 385 (1991).
12. Gescher, A. and Dale, I.L.: *Anti-Cancer Drug Design* 4, 93 (1989).
13. Osada, H., Magae, J., Watanabe, C. and Isono, K.: *J. Antibiotics* 41, 925 (1988).
14. Huang, K.P., Huang, F.L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y.: *J. Biol. Chem.* 263, 14839 (1988).
15. 안중석, 이현선, 민태익 : 세포내 경보전달 억제물질의 탐색(II). KIST, 유전공학연구소, 과학기술처 연구보고서 (1992).
16. 민태익, 안중석, 이현선, 윤병대 : 방사선균류의 신규 생체활성물질 탐색(V) KIST, 유전공학연구소, 과학기술처 연구보고서 (1992).