

능소화의 꽃받침으로부터 Protein Kinase C 저해물질인 Verbascoside의 분리 및 그 생물활성

이현선* · 박문수 · 오원근 · 안순철 · 김보연 · 김환목 · 오구택 · 민태익 · 안종석

한국과학기술연구원 유전공학연구소

(Received August 9, 1993)

Isolation and Biological Activity of Verbascoside, A Potent Inhibitor of Protein Kinase C from the Calyx of *Campsis grandiflora*

Hyun Sun Lee*, Moon Su Park, Won Ken Oh, Soon Cheol Ahn, Bo Yeon Kim,

Hwan Mook Kim, Goo Taeg Oh, Tae Ick Mheen and Jong Seog Ahn

Laboratory of Microbial Technology, Genetic Engineering Research Institute,

KIST P. O. BOX 17 Daeduk Science Town, Taejon 305-606, Korea

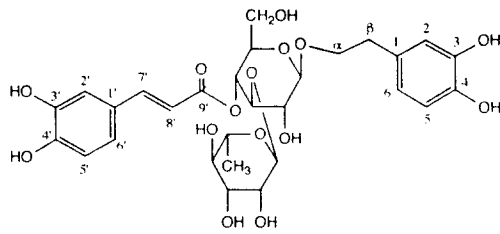
Abstract—The calyx extract of *Campsis grandiflora* displayed inhibitory activity against protein kinase C from the bovine brain. Separation guided by protein kinase C enzyme assay and bleb forming assay led to isolation of a potent protein kinase C inhibitor that was identified as a known phenylpropanoid glycoside, verbascoside. It suppressed completely bleb-formation of K562 cell surface induced by phorbol 12,13-dibutylate at the concentration of 60 µg/ml and IC₅₀ of the protein kinase C occurred at 20 µM. This compound was tested for cytotoxic activity against ten human tumor cell lines *in vitro*. it exhibited moderate cytotoxic activity against skin tumor cell line M14 (IC₅₀ 2.2 µg/ml) and very weak cytotoxicity against other cell lines (IC₅₀>10 µg/ml)

Keywords □ *Campsis grandiflora*, verbascoside, protein kinase C inhibitor, anti-bleb forming activity, cytotoxicity, human tumor cell lines.

Protein kinase C (PKC, Ca⁺/phospholipid-dependent kinase)는 세포내 신호전달 뿐만 아니라 세포 반응의 조절, 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)와 같은 phorbol ester 화합물들에 의해 선택적으로 활성화된다는 것과 phorbol ester 화합물의 세포막 수용체가 PKC임이 보고되었다.^{6,7)} 이제까지 알려진 PKC의 세포반응의 다양한 역할은 선택적인 PKC

저해제가 항암제를 비롯하여 신경계, 순환기계질환, 면역계질환의 치료제로의 개발 가능성을 보여주고 있어 PKC 저해제에 대한 탐색이 활발하게 진행되고 있다.⁸⁻¹²⁾ 임상에 사용되는 약물로서 알려진 PKC저해제는 tamoxifen, adriamycin, trifluoroperazin, chlorpromazine, polymixin B, aminoacridine등을 들 수 있으며, 합성품인 Et-18-OMe, HAG, H-7등과 lipidal amine계열의 sphinganin, palmitoylcarnitine 등은 강력한 PKC저해제로 알려져 있다.^{13,14)} 또한 천연물 유래의 PKC저해제는 거의 대부분이 미생물 유래의 대사산물로서 indolocarbazole alkaloid인 staurosporine유도체,¹⁵⁻¹⁷⁾ perylenequinone인 calphostin 류¹⁹⁾ 및 nucleoside계열인 sangivamycine¹⁸⁾ 등이 보

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.



LMT-1(1) : verbascoside

고되어 있으며, 특히 곰팡이인 *Cladosporium cladosporioides*가 생산하는 calphostin (UCN 1068)은 선택적인 PKC 저해제로 암전이 억제제, 내성암 치료제로 개발을 위한 phase II 단계의 임상실험이 진행중이다.^{20,21)} 그러나 생약자원으로 부터의 PKC 저해제 탐색은 미진한 상태에 머물러있다.

저자들은 미생물의 이차 대사산물과 생약자원으로 부터 PKC 저해제를 탐색할 목적으로 사람의 만성골수백혈병 세포인 K562 세포주를 이용한 bleb-forming assay와 PKC 효소활성검정을 병용하여 PKC 저해제를 탐색하고 있다.³⁵⁻³⁷⁾ 본 실험에서는 생약자원으로 부터 PKC 저해제의 예비스크리닝 결과 활성을 보여 준 능소화 (*Campsis grandiflora*)의 butanol분획으로 부터 PKC 저해물질인 LMT-1(1)을 분리하여 구조를 동정했으며, 10종의 인체암 세포주에 대한 세포성장 저해활성을 측정하였다.

실험방법

시약 및 기기—박층 크로마토그래피는 precoated TLC plate Kiesel gel 60F₂₅₄ Merck)와 RP-18 F₂₅₄S (Merck)를 이용하였고 컬럼 크로마토그래피는 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, Merck), Europrep 60~60 C18 (35~70 μm, Eurochrom), Sephadex LH-20 (Sigma)를 사용하였다. Chromatotron은 Harrison Research, HPLC는 Shimadzu LC-6A, UV spectrum은 Shimadzu UV-260 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 AMX-300 NMR spectrometer로 측정하였으며, 내부표준물질로는 TMS를 사용하였다. protein kinase C 효소활성 측정에 사용된 staurosporine, PDBu(phorbol 12,13-dibutylate), histon III-S와 phosphatidylserine은 Sigma Chemical Co.에서, diolein은 Serdary Research Lab.에서, (γ-³²

p)ATP는 Amersham에서 구입하여 사용했으며 K562 cell의 배양을 위한 RPMI1640 배지는 Gibco, fatal calf serum은 Hyclone Co.에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분리—1991년 7월 무등산 증심사(전남 광주 소재)일대에서 채취한 능소화(*C. grandiflora*)의 꽃받침 760 g을 음건한 후 세절하고 MeOH로 실온에서 추출 여과하였다. 농축한 MeOH 엑스 60 g을 증류수에 현탁한 후 CHCl₃, BuOH과 H₂O의 순서로 분획하여 PKC 저해활성을 보여주는 BuOH 분획 22 g을 얻었다. 그 중 20 g을 취하여 SiO₂ c.c. (CHCl₃/MeOH=5/1→2/1, step gradient)와 RP-18 c. c. (MeOH/H₂O=1/1)를 실시하여 6개의 소분획으로 나누고 PKC 저해활성을 보여주는 5번 fr.에 대해 Sephadex LH-20 c. c. (CHCl₃/MeOH=1 : 1)와 Chromatotron (SiO₂, thickness : 2 mm, solvent : CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/0.5)를 실시하여 조LMT-1을 얻었다. 이 혼합물을 HPLC (column;Senshupack ODS, 6×250 mm, solvent;50% MeOH, flow rate;1 ml/min, UV detector; 254 nm)를 통하여 retention time 5.04 min의 peak를 모아 순수한 LMT-1 (11 mg)을 얻었다.

물질 LMT-1(1)—이 물질은 TLC(SiO₂, CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/0.5)상에서 R_f값이 0.28을 갖는 미황색 분말로서 2% ferric chloride시액, 20% H₂SO₄, phosphomolybdenic acid, I₂ vapor에 양성, ninhydrine, Ehrlich, Dragendorff's 시액에 음성으로 나타났다.

UV λ_{max}(MeOH); 217, 244, 290, 330 nm; ¹H-NMR (CD₃OD)δ 1.11(3H,d,J=5.4 Hz, rham-CH₃),2.79(2H,t, J=7.5 Hz, Ar-CH₂-), 3.30~3.79(m,sugar-H),4.38(1H, d,J=7.5 Hz, glc-anomeric-H), 5.20(1H,br.s,rham-anomeric-H), 6.29(1H,J=15 Hz,8'-H), 6.55~6.68(3H, aromatic-H), 6.80(1H,dd,J=8.7,2.1 Hz,5'-H), 6.97(1H, dd,J=8.4,2.4 Hz,6'-H), 7.05(1H,br.s,2'-H), 7.61(1H,J=15.3 Hz,8'-H), ¹³C-NMR(CD₃OD, DEPT)ppm; 131.6 (C,C-1), 116.6(CH,C-2), 144.7(C,C-3), 146.2(C,C-4), 117.2(CH,C-5), 121.3(CH,C-6), 36.6(CH₂,C-β), 72.4 (CH₂,C-α), 127.8(C,C-1'), 114.9(CH,C-2'), 149.8(C,C-3'), 146.9(C,C-4'), 116.4(CH,C-5'), 123.2(CH,C-6'), 148.0(CH,C-7'), 115.4(CH,C-8'), 168.4(C=O,C-9'), 104.3 (CH,Glc-1), 76.1(CH,Glc-2), 81.7(CH,Glc-3), 70.8(CH, Glc-4), 76.3(CH,Glc-5), 62.5(CH₂,Glc-6), 103.4(CH, Rham-1), 72.2(CH,Rham-2), 72.2(CH,Rham-3), 73.9

(CH,Rham-4), 70.5(CH,Rham-5), 18.5(CH₃,Rham-6)

Bleb Forming Assay—Bleb forming assay는 Osada 등의 방법²²⁾을 약간 수정하여 실험하였다. 세포주로는 K562 cell (human chronic myelocytic leukemia cell)을 사용하였다. 배지로는 10% fetal calf serum과 penicillin G 100 unit/ml, streptomycin 100 µg/ml을 함유한 RPMI1640 배지를 사용했으며, 5% CO₂ 농도, 37°C의 조건으로 CO₂ incubator에서 배양하였다. assay는 K562 cell을 1×10⁵ cell/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 100 µl씩 분주한 후 검정시료용액 10µl를 첨가하고, 37°C의 CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후, phorbol 12,13-dibutyrate(PDBu)를 최종농도 1 µg/ml이 되게 처리한 후 세포표면의 소포형성유무를 역상현미경상에서 관찰하였다.

Protein kinase C 효소활성 측정—Protein kinase C 효소는 Huang등의²³⁾ 방법에 따라 소뇌로부터 부분정제하여 사용하였다. PKC 효소활성 측정은 Ca⁺⁺, phospholipid와 diolein의 존재하에 기질인 histon III-S에 (γ-³²p)ATP의 ³²p가 phosphorylation되는 정도를 측정하였다. 반응액 25 µl에는 30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 6 mM magnesium acetate, 0.12 mM (γ-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 µg을 포함한다. 여기에 검정시료 5 µl를 첨가하고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid용액 20 µl로 미리 적신 cellulose-pi paper에 반응액 10 µl를 점적하고 말린 후 0.2 M KCl이 함유된 5% TCA용액으로 전개시킨 paper의 하단부 2 cm 정도를 절단하여 scintillation counter를 사용하여 histon III의 인산화 정도를 측정하였다. 이때 background로 phosphatidylserine과 diolein을 뺀 반응액을 사용하여 검정시료의 protein kinase C 저해활성 정도를 조사하였다.

항암효과검정—미국 국립암연구소(NCI)에서 유래한 10종의 인체암세포주를 사용하였다. 암세포주 panel에 이용된 세포명은 M14(skin), K562(leukemia), NCI-H23(lung), SNB-19(CNS), SF-539(CNS), PC-3(prostate), SW620(colon), KM12(colon), UO-31(renal), ACHN(renal)이었다. 세포들은 일반적으로 37°C CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air)를 이용하여 배양하였으며, 주로 사용된 배양액은 10% FCS를 함유한

RPMI1640배지였다. 암세포주는 사용할 때까지 액체 질소하에서 보관하였으며, 가능한 한 초기단계의 세포를 사용하였다.

인체암세포주의 종류에 따라, 각기 다른 농도의 세포수의 세포를 96 well microplate에 배양을 시작하였다. 사용된 배양액은 5% FCS를 함유한 RPMI 1640배지를 이용하였으며, 각 세포주의 초기세포농도는 Table 1에 명시하였다. 배양후 24시간부터, 검체(LMT-1)를 10, 3, 1, 0.3, 0.1 µg/ml의 농도로 처리하였다. 검체를 녹이기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하였으며, 최종 DMSO의 농도는 0.1%로 보정하였다. 검체의 처리전에 time zero(Tz) plate를 만들었으며, K562의 경우는 80%, 그외의 세포의 경우는 50%의 TCA용액으로 고정하였다. 검체를 처리한 후 세포는 48시간 동안 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다.

비부착 세포인 K562의 경우는 pipet을 사용하여 single cell suspension을 만들었으며, 2분간 1,000 rpm에서 원심분리하였다. 다른 부착 세포들은 바로 TCA용액으로 고정하였다. 비부착 세포와 부착 세포는 각각 80%와 50%의 TCA용액을 well당 100 µl씩 가하여 2시간 또는 1시간 4°C에서 방치하였다. 고정이 완료된 후, plate를 tap water로 15회 세척하고 건조시켰다. 염색을 위해서는 SRB용액(0.4% in 1% acetic acid)을 100 µl씩 가하고 상온에서 30분간 방치한 후, 1% acetic acid로 수회 세척한 후 건조시켰다. 각 well에 100 µl의 TRIS용액(10 mM, pH 10.5)을 가하여 염색된 SRB를 용출시켜 570 nm에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.^{33,34)} 성장억제도는 처리군의 흡광도에서 Tz plate의 흡광도를 뺀 후

Table 1—Cytotoxicity assay에 사용된 초기세포 농도

세포명	유래장기	초기세포농도 (cells/well)
M14	skin	15,000
K562	leukemia	5,000
NCI-H23	lung	20,000
SNB-19	CNS	15,000
SF-539	CNS	15,000
PC-3	prostate	10,000
SW620	colon	10,000
KM12	colon	15,000
UO-31	renal	15,000
ACHN	renal	15,000

대조군의 흡광도를 나누어 계산하였다.

결 과

LMT-1(1)의 분리 정제—능소화를 꽃과 꽃받침으로 나누어 PKC 저해활성을 조사한 바 꽃받침의 MeOH 엑스가 강한 활성을 나타냈다. 꽃받침의 MeOH엑스는 500 µg/ml의 농도에서 PDBu에 의해 유도된 K562 세포표면의 소포(bleb)형성을 80~90% 저해했으며, 830 µg/ml의 농도에서 78%의 protein kinase C 효소저해활성을 보여주었으며 용매분획 결과 BuOH분획으로 이행되었다. 이 분획을 SiO₂, Sephdex LH-20, RP-18 column chromatography와 chromatotron, HPLC를 이용하여 PKC 저해물질 LMT-1(1)을 얻었다.

LMT-1(1)의 구조결정—이 물질은 2% FeCl₃ 시액에 청색으로 발색되어 분자내에 phenolic OH의 존재를 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum은 1.11 ppm에서 한개의 2급 methyl group, 2.78 ppm에서 methylene proton을 볼 수 있었으며 4.38 ppm(1H,d, J=7.5 Hz)과 5.29 ppm(1H,br.s)에서 당에 기인한 2개의 anomeric proton을 확인할 수 있었다. 또한 6.29 ppm(1H,J=15 Hz)와 7.61 ppm(1H,J=15 Hz)에서 AB type의 2개의 trans olefinic proton, 6.55~6.97 ppm 사이에서 6개의 aromatic proton을 관찰할 수 있었다. ¹³C-NMR DEPT spectrum은 CH₃, 3×CH₂, 18×CH, 6×C, 1개의 C=O를 보여주고 있으며, 104.3 ppm과 103.4 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon을 확인할 수 있었다. ¹H-과 ¹³C-NMR, UV등으로부터 분자내에 caffeoyl moiety와 3,4-dihydroxyl-phenethyl moiety를 갖는 것으로 phenylpropanoid 배당체에 속하는 물질로 추정할 수 있었으며, 문헌 조사 결과^{24, 26)} 기지물질인 verbascoside(3,4-dihydroxy-β-phenethyl-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→3)-4-O-caffeoyl-β-D-glucopyranoside)의 기기data와 일치하여 LMT-1의 구조는 C₂₉H₃₆O₁₅(분자량 : 624)의 분자식을 갖는 verbascoside로 결정했다

LMT-1(1)의 생물활성—소포(bleb)형성저해의 판정 기준은 K562 cell에 검정시료 대신 강력한 protein kinase C 저해제로 알려진 staurosporin을 첨가한 것을 positive control로 하고, 검정시료를 첨가하지

않고 PDBu만을 첨가한 것을 negative control로 하여 시료용액을 첨가한 검정구와의 소포(bleb)형성 저해 정도를 비교하여 20~40%; +, 40~60%; ±±~80%; ++, 80~95%; ±±±%; +++로 나타냈다. 소포는 최종농도 1 µg/ml의 PDBu 첨가 후 10분이내에 나타났으며, staurosporin(1 µg/ml)를 처리하고 1시간 배양한 후 PDBu(1 µg/ml)를 첨가한 경우 K562 cell 표면의 소포형성을 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 또한 LMT-1의 경우 60 µg/ml의 농도에서 소포형성을 완전히 저해했으며 IC₅₀는 40 µM로 나타났으며(Fig. 2) 소의 뇌에서 추출한 protein kinase C에 대한 IC₅₀는 20 µM(12.5 µg/ml)을 보여주었다(Fig. 3).

LMT-1(1)의 종양세포에 대한 작용—종양세포에 대한 작용으로 NCI 종양panel인 10종의 인체암세포주에 대한 항암활성을 조사한 결과, 인체 피부암세포주인 M14에 대해서만 IC₅₀가 2.2 µg/ml로서 약한 세포성장 저해효과를 보였으나 그외 9가지 암세포주에서는 IC₅₀가 10 µg/ml이상이므로 세포성장 저해효과는 아주 미약했다.

고 찰

Protein kinase C는 세포내에 미량으로 존재하고

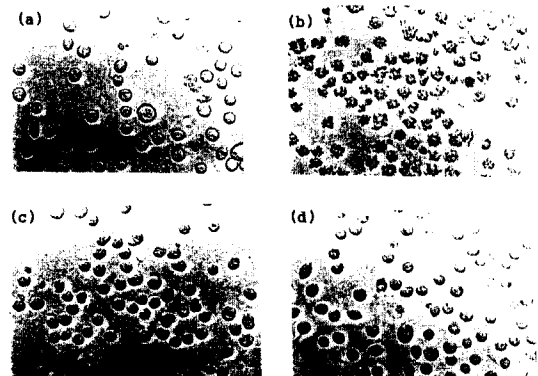


Fig. 1—Microscopic observation of morphological changes on K562 cell (a) control(K562 cell only) (b)treated with 1 µg/ml of PDBu for 10 min. (c)pretreated staurosporin (1 µg/ml) for 1 hr. and then treated with PDBu(1 µg/ml) for 10 min. (d) LMT-1(60 µg/ml)+PDBu(1 µg/ml)

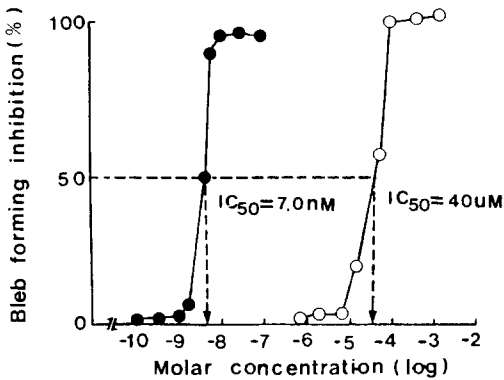


Fig. 2—Inhibition of Bleb formation by LMT-1(1) Bleb forming cell were counted under a microscope 10 min. after addition of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PDBu, K562 cell were pretreated with following compounds for 1 hr before addition of PDBu: LMT-1(O), staurosporin(●)

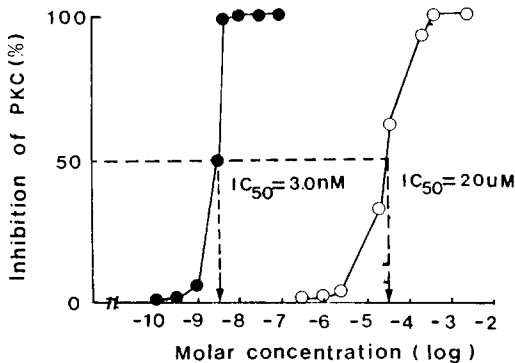


Fig. 3—Inhibition of bovine brain PKC by LMT-1(O) and staurosporin(●)

조직이나 세포의 종류에 따라 수종의 isozyme으로 존재하며 세포내에는 PKC와는 다른 여러 종류의 protein kinase가 존재하기 때문에 PKC를 분리하여 활성을 측정하기가 간단하지 않으며 미생물 배양액을 비롯한 많은 수의 천연물시료에 대한 PKC 저해활성을 검정하는데 더욱 어려움이 야기된다. 따라서 본 실험에서는 Osada 등이²²⁾ 개발한 bleb forming assay를 PKC 저해활성물질의 1차 탐색법으로 활용하였다. 현재 강력한 tumor promoter로 알려져 있는 phorbol ester유도체에 의한 K562 cell의 소포형성에 관한 기작이 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 pro-

tein kinase C의 활성화에 의한 세포내 Ca^{++} 의 이동에 따른 세포막 구조의 변화가 일어난다는 설명과 세포골격 유지를 위한 주요 구조단백질인 actin filament 형성의 변화에 의한 것으로 설명되고 있다.²⁷⁾ 그러나 phorbol ester 화합물에 의한 소포형성은 10~20분 이내의 짧은 시간내에 일어난다는 점과 PKC의 저해물질들이 소포형성을 저해한다는 연구 결과로 인해, PKC 활성화에 의한 세포막의 구조변화로 이해되고있는 추세이다.²²⁾

저자들은 이러한 방법을 이용하여 미생물의 이차 대사산물과 생약자원으로부터 PKC 저해활성을 탐색하던 중 강한 활성을 보여준 능소화 (*C. grandiflora*) 꽃받침의 BuOH 분획으로부터 PKC 저해활성을 갖는 verbascoside를 분리하였다. phenylpropanoid 배당체에 속하는 verbascoside는 여러 식물로부터 일명 acteoside로 분리 보고되었으며, 항균활성, 면역억제활성, c-AMP phosphoesterase의 저해활성, lense-al-dose reductase의 저해활성, 항산화활성, superoxide anion scavenger, anti-anoxia 활성등 다양한 활성이 알려졌으며,²⁸⁻³¹⁾ 최근에는 이 물질을 생산하기 위한 조직배양이 진행되고 있다.³²⁾ 최근 Pettit등은 *Castilleja linariaefolia*로부터 분리한 acteoside(verbascoside)와 iso-acteoside의 murine P-388(PS) lymphocytic leukemia에 대한 ED_{50} 를 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 보고한 바있다. 저자 등이 P-388이외의 10종의 인체암세포주에 대한 세포성장 저해활성을 조사한 바, 인체피부암세포주인 M14에 대해서만 2.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LC_{50} 를 보였으나 다른 세포주에 대해서는 IC_{50} 가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 아주 미약한 세포성장 저해활성을 보였다.

현재 저자들은 verbascoside의 유도체와 protein kinase C 저해활성과의 구조 상관관계에 대한 검토를 진행 중이며, 세포내 신호전달 과정의 중요한 역할을 하고 있는 protein tyrosin kinase와 phosphatidylinositol(PI) turn-over에 작용하는 PI-kinase 및 phosphoinositide-specific-phospholipase C(PLC)에 대한 영향도 검토할 예정이다.

결 론

생약자원으로부터 protein kinase C 저해제를 탐색하던 과정 중 강한 활성을 보여준 능소화(*Campsis grandiflora*) 꽃받침의 butanol 분획으로부터 SiO_2 , RP-

18, Sephadex LH-20과 prep. HPLC를 통하여 활성 물질 LMT-1을 얻었으며, 이 물질은 물리화학적 성질과 기기분석을 통하여 phenylpropanoid glycoside계 물질인 verbascoside(C₂₉H₃₆O₁₅, 분자량 : 624)로 동정했다. 이 물질은 PDBu에 의해 유도된 K562(사람의 만성골수백혈병세포)세포표면의 소포형성을 60 µg/ml의 농도에서 완전히 저해했으며 IC₅₀는 40 µM, 소뇌의 protein kinase C에 대한 IC₅₀는 20 µM로 나타났다. 또한 10종의 인체암세포주에 세포성장 저해활성을 조사한 결과 인체피부암세포주인 M14에 대해서는 2.2 µg/ml의 IC₅₀를 보여주었으나 그외의 9종의 인체암세포에서는 아주 미약한 세포성장 저해 효과를 나타냈다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 선도기술 개발 및 첨단요소 연구개발 사업비에 의해 수행되었음을 밝히는 바이며, protein kinase C 효소를 제공해 주신 포항공대 유성호교수와 실험재료로 사용된 능소화의 채집에 도움을 주신 김인섭씨께 감사드립니다.

문헌

- 1) Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y.: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.* **254**, 3692-3695 (1979).
- 2) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**, 693-698 (1984).
- 3) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312 (1986).
- 4) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **91**, 1218-1224 (1979).
- 5) Kishimoto, A., Takai, Y., Morri, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol and its possible relation to phosphatidylinositol tu-

- rnover. *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276(1980).
- 6) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851 (1982).
- 7) Niedal, J. E., Kuhn, L. J. and Bandenberk, G. R.: Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 36-40 (1983).
- 8) Powis, G.: Signalling targets for anticancer drug development. *Trends in Pharmacological Science.* **12**, 188-194 (1991).
- 9) Sugiura, M., Inagami, T., Gregory, M. T. and Johns, A.: Endothelin action inhibition by a protein kinase C inhibitor and involvement of phosphoinositols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 170-176 (1989).
- 10) Whatley, P. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. and Prescott, S. M.: Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells. *Prog. Lipid. Res.* **29**, 45-63 (1990).
- 11) Powis, G. and Kozikowski, A.: Growth factor and oncogene signalling pathways as targets for rational drug development. *Clin. Biochem.* **24**, 385-397 (1991).
- 12) O'Brain, C. A., Liskamp, R. M., Solomon, D. H., Weinstein, I. B.: Inhibition of Protein kinase C by Tamoxifen. *Cancer Research*, **45**, 2462-2465 (1985).
- 13) Hidaka, H. and Hagiwara, M.: Pharmacology of isoquinoline sulfonamide protein kinase C inhibitors. *Trends in Pharmacological Science*, **8**, 162-164 (1987).
- 14) Gescher, A. and Dale, I. L.: Protein kinase C-a novel target for rational anticancer drug design. *Anti-Cancer Drug Design* **4**, 93-105 (1989).
- 15) Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Matson J. A. and Forenza, S.: Isolation of a bromo analogue of rebeccamycin. *J. Antibiotics*, **44**, 934-939 (1991).
- 16) Kase, H., Iwahashi, K. and Matsuda, Y.: K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiotics* **39**, 1059-1065 (1986).
- 17) Takahashi, I., Saitoh, Y., Yoshida, M., Sano, H., Na-

- kano, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiotics* **42**: 571-576 (1989).
- 18) Osada, H., Sonoda, T., Tsunoda, K. and Isono, K.: A New biological role of sangivamycin; Inhibition of protein kinase. *J. Antibiotics* **42**, 102-106 (1989).
- 19) Kobayashi, E., Ando, K., Nakano, H., Iida, T., Ohno, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: Calphostins (UCN-1028), novel and specific inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiotics* **42**, 1470-1484 (1989).
- 20) Kulkarni, R. and Madhukar, B. V.: 83th Annual Meeting American Association Cancer Research Proceedings p. 484 (Abstr. No. 2889), 1992.
- 21) Collapudi, S. and Patel, K.: *Ibid.* p. 458 (Abstr. No. 2734), 1992.
- 22) Osada, H., Magae, J., Watanabe, C. and Isono, K.: Rapid screening method for inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiotics* **41**, 925-931 (1988).
- 23) Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y.: Biochemical characterization of rat brain protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**, 14839-14845 (1988).
- 24) Nishibe, S., Sasahara, M., Ying, J. and Tanaka, T.: Phenylpropanoid Glycosides from *Plantago depressa*. *Phytochemistry* **32**, 975-977 (1993).
- 25) Zhongjian, J., Zimin, L. and Changzeng, W.: Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis spicata*. *Phytochemistry* **30**, 3745-3747 (1991).
- 26) Kitagawa, S., Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe, S.: Studies on the chinese crude drug "Forsythiae Fructus." VII. A new caffeoyl glycoside from *Forsytia viridissima* Chem. Pharm. Bull. **32**, 1209-1213 (1984).
- 27) Magae, J., Watanabe, C., Osada, H., Cheng, X. C. and Isono, K.: Induction of morphological change of human myeloid leukemia by a novel antibiotic, tautomycin. *J. Antibiotics* **41**, 932-937 (1988).
- 28) Zhou, Y. C. and Zheng, R. L.: Phenolic compounds and an analogue as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1177-179 (1991).
- 29) Yamahara, J., Kitani, T., Kobayashi, H. and Kawahara, Y.: Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents. *Yakugaku Zasshi* **110**, 932-935 (1990).
- 30) Pettit, G. R., Numata, A., Takemura, T., Ode, R. H., Narula, A. S., Schmidt, J. M., Cragg, G. M. and Pase C. P.: Antineoplastic agent, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 456-458 (1990).
- 31) Kohda, H., Tanaka, S., Yamaoka, Y., Yahara, S., Nohara, T., Tanimoto, T. and Tanaka, A.: Studies on lens-aldoase-reductase inhibitor in medicinal plant. II. Active constituents of *Monochasma savatierii* Franch. et Maxim. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3153-4 (1989).
- 32) Inagaki, N., Nishimura, H., Okada, M. and Mitsuhashi H.: Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant cell Rep.* **9**, 484-487 (1991).
- 33) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112(1990).
- 34) Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C. Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J. and Boyd M. R.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757-766(1991).
- 35) Lee, H. S., Ahn, S. C., Kim, B. Y., Park, M. S., Ahn, J. S.: Inhibitory activity against protein kinase C of some medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 142-145(1992).
- 36) Ahn, J. S., Park, M. S., Ahn, S. C., Lee, H. S.: MT-2007, protein kinase C inhibitor from actinomycetes isolate No. 2007-18. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **21**, 54-58(1993).
- 37) Ahn, J. S., Ahn, S. C., Lee, H. S. Park, M. S., Oh, W. K., Mheen, T. I.: Purification and chemical identification of the inhibitor on blep formation of K 562 cell induced by phorbol ester from actinomycetes isolate No. 1882-5. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **20**, 565-573(1992).