

천마(*Gastrodia elata*)로부터 분리한 VHR DS-PTPase 저해 물질이명선 · 오원근 · 배은영 · 안순철 · 손천배¹ · 히로유키 오사다² · 안종석*한국생명공학연구원, ¹충남대학교 식품영양학과, ²이화학연구소The VHR Dual-Specificity Protein Tyrosine Phosphatase (DS-PTPase) Inhibitor Isolated from *Gastrodia elata*Myung Sun Lee, Won Keun Oh, Eun Young Bae, Soon Cheol Ahn, Cheon Bae Sohn¹, Hiroyuki Osada² and Jong Seog Ahn*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

¹Department of Food and Nutrition, Chungnam National University²The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

In the course of screening program for VHR DS-PTPase (dual-specificity protein tyrosine phosphatase) from natural sources, *Gastrodia elata* was selected. One compound showing potent inhibitory activity was isolated by the solvent extraction and column chromatography including silica gel, ODS RP-18, Sephadex LH-20, and HPLC. This compound was identified as baicalein by several NMR techniques such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and DEPT. Baicalein showed selective inhibitory activity against VHR DS-PTPase with IC₅₀ = 2.4 μM, and showed cytotoxicity against several human cancer cell lines with an GI₅₀ of 5.26~12.93 μg/mL range, including, melanoma (LOX-IMVI), lung cancer (NCI H23 and A549), colon cancer (HCT 116 and SW 620), prostate cancer (PC-3), and leukemia (MOLT 4F).

Key words: *Gastrodia elata*, VHR DS-PTPase, baicalein, cytotoxicity

서 론

Dual specificity-protein tyrosine phosphatase(DS-PTPase)란 단백질 타이로신 탈인산화 효소(protein tyrosine phosphatase; PTPase)의 한 부류로서, 생체 내에서 타이로신과 쓰레오닌 잔기가 가까이 존재하고 있을 경우 이들로부터 인산을 동시에 제거할 수 있는 특별한 기능을 갖고 있는 효소이다⁽¹⁾. 일반적으로 단백질 탈인산화 효소를 분류하여 보면 세린/쓰레오닌 잔기의 인산을 제거하는 효소(protein phosphatase; PPase)와 타이로신 잔기의 인산을 제거하는 효소(protein tyrosine phosphatase; PTPase)의 두 그룹으로 나누어볼 수 있다. 그러나 1990년대 초반에 vaccinia virus로부터 발견된 VH1은 세린/쓰레오닌은 물론 타이로신 잔기의 인산을 동시에 제거하는 기능을 가진 것으로 알려졌고 이를 필두로 DS-PTPase에 대한 연구가 시작되었다. 현재까지 포유류로부터 발견된 DS-PTPase만도 20종류가 넘고 있고⁽²⁾, 그 중 VH1과

유사한 구조를 가지면서 포유류에서 가장 먼저 발견된 VHR (VH1-related)⁽³⁾에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있는 실정이다^(4,5). 그 외에도 cdc25⁽⁶⁾, kinase associated phosphatase (KAP)^(7,8), MAP kinase phosphatase⁽⁹⁾ 등의 DS-PTPase가 알려지면서 이 효소에 대한 연구는 급진전을 이루기 시작했다. 지금까지 알려진 대부분의 DS-PTPase들이 세포 내에서 비슷한 기능을 하고 있다고 알려져 있는데, mitogen-activated protein kinase(MAPK)인 ERK, Jnk와 p38에 작용한다는 점이 그것이다⁽¹⁰⁾. VH1은 MAPK와 Stat1을⁽¹¹⁾ 탈인산화 시키고, VHR은 ERK와 Jnk에^(12,10) 특이적으로 작용한다고 보고되었다. 그러나 MAPK에 특이하게 작용한다고 알려진 몇몇 DS-PTPase 중에서도 VHR은 다른 종류에 비하여 그 생리적 기능이 많이 알려지지 않았다. 또한 VHR의 기능을 저해하는 물질에 대한 연구도 미비한데 면역억제제로 개발된 stevastins⁽¹³⁾와 인간 B 세포 백혈병 세포(human B cell leukemia)인 Ball-1 세포주의 세포 주기를 G1 단계에서 억제시킨다고 알려진 RK 682(3-hexadecanoyl-5-hydroxymethyl-tetronic acid)⁽¹⁴⁾를 제외하면 천연물로부터 분리된 VHR 저해물질은 거의 전무한 상태다. 특히 약용이나 식용 식물로부터 분리된 VHR 저해 물질은 아직 보고된 바가 없다.

천마(*Gastrodia elata*)는 난초과(Orchidaceae)의 덩이줄기로 이를 말린 후 식용하게 된다. 이 식물에 함유되어 있는 성분

*Corresponding author : Jong Seog Ahn, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600
Tel: 82-42-860-4312
Fax: 82-42-860-4595
E-mail: jsahn@kribb.re.kr

을 보면 페놀 유도체인 gastrodin, *p*-hydroxybenzylalcohol, parishin, *p*-(*p*-hydroxybenzylloxymethyl)phenol glucoside, vanillyl alcohol과 phytosterol류인 β -sitosterol, daucosterol, campesterol, α -spinasterol, stigmasterol등이 대표적이다⁽¹⁵⁾. 예로부터 동양 의학에서는 항경련제, 안정제, 진통제로 이용되었고⁽¹⁶⁾, 혈관을 확장시켜 관상동맥과 대뇌의 혈류량을 증가시키고 말초 혈압을 낮추어 주는 작용도 한다고 알려져있다⁽¹⁵⁾.

본 연구에서는 VHR이 암과 같은 질병에 관련된다라는 보고⁽¹⁷⁾에 따라, 150종 이상의 약용 또는 식용 식물을 대상으로 VHR에 대한 저해 활성을 탐색하여 선택된 천마로부터 VHR 저해 물질을 정제하여 구조를 결정한 후 여러 종류의 암세포주에 처리하여 그 항암 효과를 조사 하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약

T-cell PTPase는 New England of Biolabs(Beverly, USA)로부터, PPase 1과 단백질 탈인산화 효소의 기질로 이용된 p-NPP(para-nitrophenyl phosphate)는 Sigma Chemical사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 활성 물질 분리 및 확인에 사용된 silica gel(Kiesegel 60, particle size: 0.040-0.063 mm)은 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터, ODS RP-18(ODS-A, 120 A, S-150 μ m)은 YMC-GEL사(Tokyo, Japan)로부터, Sephadex LH-20은 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden)에서 구입하여 사용하였고, TLC(thin layer chromatography)에 이용된 precoated silica gel plates 60F₂₅₄(0.25 mm and 0.5 mm in thickness)와 ODS RP-18 F_{254s}(25 DC-Platten 5×10 cm)는 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 각 분리 단계에 이용된 유기 용매는 덕산 종합 과학 상사의 고순도 제품을 이용하였고, HPLC 용매는 Burdick & Jackson(Muskegon, USA) 제품을 사용하였다. NMR용 DMSO-d₆는 Norell사(Landisville, USA)로부터 구입하였다.

세포 배양에 사용된 RPMI 1640와 fetal bovine serum은 Gibco BRL(Grand Island, USA) 제품을 이용하였으며 그 외 bioassay에 이용된 시약류는 초순도 등급을 사용하였다. 천마는 일신약품(Taejon, Korea)에서 구입하여 본 실험에 이용하였다.

활성 물질의 분리 및 정제

저해 물질을 분리하기 위하여 silica gel, ODS RP-18, Sephadex LH-20, HPLC(YMC-Pack ODS-AM, Φ 150×6 mm, Japan) column chromatography 등을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu사(Tokyo, Japan)의 SCL-6A system controller, SPD-6A UV spectrophotometric detector, LC-6A liquid chromatograph를 사용하여 분리하였다.

이화학적 특성 및 구조 분석

Mass spectrum은 HREI-MS(VG Automatic III Ultra mass spectrometer, USA)를 이용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Varian unity-300(USA)을 이용하여 ¹H-NMR은 300 MHz에서 ¹³C-NMR은 75 MHz에서 측정하였고, 용매로는 DMSO-d₆를 사용하였다.

VHR DS-PTPase의 분리

VHR은 Ishibashi 등의 방법에 따라 *E. coli*를 이용하여 제조 하였다⁽¹⁸⁾. 플라스미드 pGEX로부터 glutathione-S-transferase (GST)-VHR fusion protein을 발현시킨 후 정제하여 본 실험에 이용하였다. 이 방법으로 제조된 GST-VHR fusion protein은 SDS/polyacrylamide gel에 전기영동 후 Coomassie blue로 염색하여본 결과 >98%의 순도를 보였으며 이를 VHR phosphatase assay에 이용하였다.

VHR DS-PTPase 활성 측정

Tonks 등의 방법에 따라 p-NPP를 기질로 이용하여 탈인산화 정도를 측정하여 VHR에 대한 저해 활성을 조사하였다⁽¹⁹⁾. VHR을 100 μ L완충용액(50 mM succinate, pH 6.0, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 녹여 10 mM p-NPP와 반응시킨 후 30°C에서 1시간 동안 방치한 후 1 N NaOH를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 Dynatech MR 700 automated microplate spectrophotometer(Chantilly, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

T-cell PTPase 활성 측정

New England Biolabs에서 구입한 T-cell PTPase와 완충 용액(25 mM imidazole, 50 mM NaCl, 2.5 mM Na₂EDTA, 5mM DTT), 100 μ g/mL BSA와 기질로서 20 mM p-NPP를 100 μ L로 만들어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 반응을 종결하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽²⁰⁾.

PPase 1 활성 측정

PPase 1의 활성을 측정하기 위하여 10 mM p-NPP와 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1% β -mercaptoethanol, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM MnCl₂, 20 mM MgCl₂가 함유된 완충 용액을 섞어 30°C에서 30분 반응시킨 후 1 N NaOH로 처리한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽²¹⁾.

세포 배양

흑색종 세포주인 LOX-IMVI, 폐암 세포주인 NCI H23와 A549, 대장암 세포주인 HCT 116과 SW 620, 전립선암 세포주인 PC-3, 백혈병 세포주인 MOLT 4F는 미국의 National Cancer Institute(NCI)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM sodium bicarbonate, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 RPMI1640 배지에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 독성의 측정

세포 독성의 측정은 NCI의 Developmental Therapeutic Program 방법에 따라 시행하였다⁽²²⁾. 활성 물질은 최종 농도 0.1%가 되도록 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 세포에 처리하였다. 48시간 후에 활성 물질을 가해준 plate를 차가운 50% trichloroacetic acid(TCA)로 100 μ L/well씩을 넣어서 고정시키고 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 tap water로 4~5 번 정도 세척하였다. 이를 건조한 후 0.4% sulforhodamine B

(SRB)(0.1% acetic acid로 용해한 용액)을 100 μ L/well씩 가하고 30분 정도 방치한 후 0.1% acetic acid로 세척하여 결합하지 않은 염색 시약을 제거했다. Plate를 다시 건조한 후에 10 mM Tris-base(pH 10.5)를 100 μ L/well씩 가하여 염색시약을 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 용매 처리군에 대한 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

천마(*Gasrodia elata*)로부터 VHR DS-PTPase 저해 물질의 분리

천마 1 kg을 methanol로 3회 추출한 후 여과하여 감압 농축 하였다. 농축액을 증류수에 현탁하여 ethyl acetate로 추출한 다음 silica gel column chromatography를 실시하여 ethyl acetate/ methanol(20 : 1) 용매 조건의 fraction에서 VHR 저해 활성을 확인하였다. 활성 분획(10 g)을 모은 후 ODS RP-18 column에서 methanol/H₂O를 이용하여 단계별로 용출한 결과 methanol/H₂O(7 : 3)에서 활성 부분(2 g)이 확인되었다. 다시 이 활성 부분을 모아 농축한 후 chloroform/n-hexane/methanol (2 : 3 : 1) 용매 조건으로 충전된 Sephadex LH-20 column chromatography를 시행하였고, 이 활성 물질의 순도를 높이기 위하여 HPLC(YMC-Pack ODS-AM, Φ 150 \times 20 mm, 254 nm, flow rate: 4 mL/min)를 methanol/H₂O(7 : 3)의 용매 조건으로 시행하여 GE-1(4.6 mg)을 분리하였다(Fig. 1). 이 물질을 분석용 HPLC(ODS-H80, Φ 150 \times 6 mm, 254 nm, flow rate: 0.8 mL/min)로 분석하여 본 결과 95%의 순도를 보였다.

구조 분석

HREI-MS 분석 결과 m/z 269에서 (M-H)⁻ 피크가 관찰되어 분자량이 270으로 확인 되었다(Fig. 2). GE-1에 대한 ¹H-NMR 분석 결과 6.54 (1H, s, C9-H), 6.927 (1H, C3-H), 7.583 (3H, m), 8.047 (2H, m), 8.811(1H, s, C7-OH),

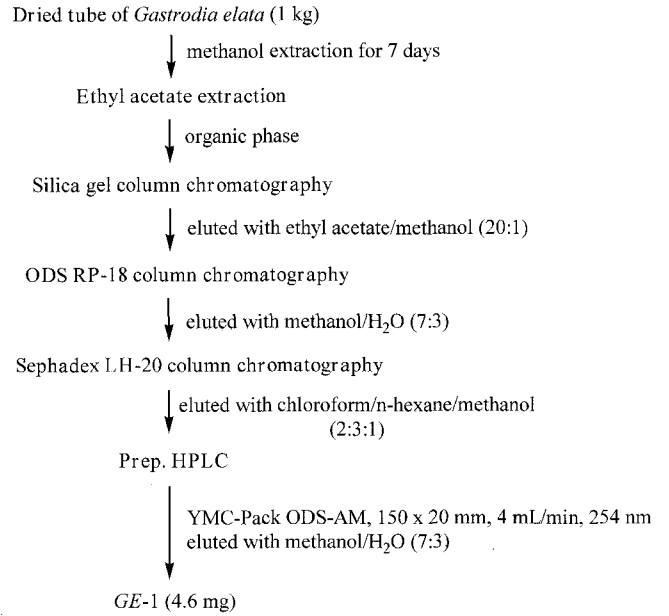


Fig. 1. Isolation procedure of VHR DS-PTPase inhibitor (GE-1) from *Gastrodia elata*.

10.572 (1H, s, C8-OH), 12.653 (1H, s, C6-OH)에서 피크가 관찰되었다. ¹³C-NMR과 DEPT NMR data 분석 결과 162.88 (C2), 104.46 (C3), 181.98 (C4), 104.25 (C5), 162.37 (C6), 153.52 (C7), 149.73 (C8), 94.73 (C9), 146.86 (C10), 130.94 (C1'), 126 (C2'), 129 (C3'), 131.80 (C4'), 129 (C5'), 126 (C6')의 결과를 얻었다. 이상의 NMR data와 분자량으로부터 본 구조는 6번, 7번과 8번 탄소 위치에 하이드록시기가 각각 존재하며 2번과 3번 탄소 사이에 이중결합이 존재하는 flavone 구조임이 판명되었고 실험식은 C₁₅H₁₀O₅로 결정 할 수 있었으며, 데이터베이스 검색 결과 천마로부터 분리된 VHR 저해제의 구조를 baicalein으로 동정

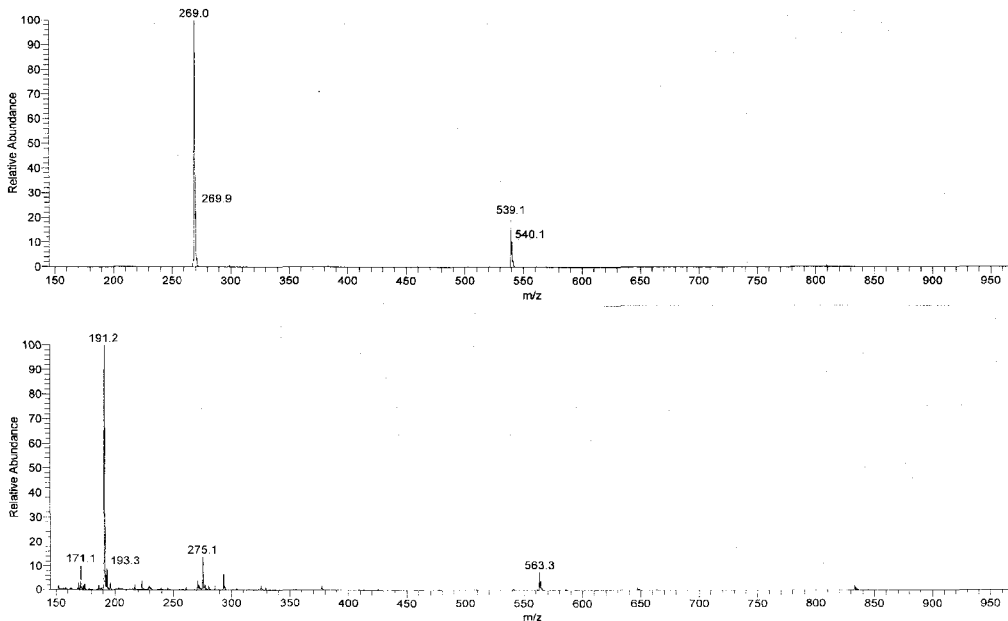


Fig. 2. HREI-MS spectrum of VHR DS-PTPase inhibitor (GE-1) from *Gastrodia elata*.

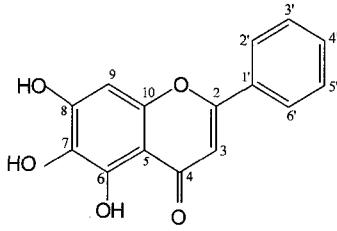


Fig. 3. Structure of VHR DS-PTPase inhibitor (baicalein) isolated from *Gastrodia elata*.

할 수 있었다(Fig. 3). Baicalein은 *in vitro*상에서 antigenotoxic⁽²³⁾하고 antioxidant⁽²⁴⁾한 물질로 발표된 바 있다. 또한 baicalein은 C6 rat glioma cell에서 히스타민이나 A23187에 의해 유도된 MAPK 인산화를 억제하여 MAPK cascade의 활성화를 억제하는 활성을 갖는다고 알려져 있다.⁽²⁵⁾

Baicalein의 생물활성

천마로부터 분리한 baicalein은 VHR에 대하여 $IC_{50} = 2.4 \mu M$ 로 강한 저해 활성을 나타내었지만, T-cell PTPase나 PPase 1과 같은 다른 단백질 탈인산화 효소에 대하여는 $200 \mu M$ 이상의 농도에서도 저해활성을 보이지 않아 VHR에 만 특이적으로 작용한다는 결과를 얻었다. 그 외 다른 몇몇 flavonoid계 물질인 luteolin, quercetin, naringenin, hesperetin, genistein, daidzein을 이용하여 VHR을 포함한 단백질 탈인산화 효소들의 저해 활성을 관찰한 바 천마에서 분리한 baicalein을 제외하고 그 외 어떤 flavonoid 구조도 VHR을 포함한 다른 단백질 탈인산화 효소에 대해 저해 활성을 나타내지 않았다(Table 1).

Baicalein이 여러 종류의 암세포주에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 세포 독성을 측정하여 보았다. 그 결과 7종류 암세포주에 대하여 평균 GI_{50} 값이 $8.06 \mu g/mL$ 로 나타났고, 각각에 대하여 살펴보면 흑색종 세포주인 LOX-IMVI에서는 $6.76 \mu g/mL$, 폐암 세포주인 NCI H23과 A549에서는 각각 5.26 과 $12.93 \mu g/mL$, 대장암 세포주인 HCT 116과 SW620에서는 각각 5.44 와 $6.79 \mu g/mL$, 전립선암 세포주인 PC-3에서는 $12.77 \mu g/mL$, 백혈병 세포주인 MOLT 4F에서는 $6.50 \mu g/mL$ 에서 GI_{50} 값을 나타내었다. 이 7종류의 암세포주에 대하여 $0.3 \mu g/mL$ 의 평균 GI_{50} 값을 갖는 아드리아마이신(ADR)과 비교하여 볼 때 강력한 세포독성을 나타내는 것은 아니지만 baicalein이 비교적 암세포에 대한 성장 저해 효과가 있는 것으로 보여진다(Table 2). 이러한 결과로 VHR 저해 물질로 분리된 baicalein이 VHR에 의해 조절된다고 알려진 암세포 성장을 억제할 수 있으리라 사료된다.

단백질 탈인산화 효소가 cell cycle이나 세포 성장 및 증식에 있어 그 신호 전달에 깊이 관여하고 있음은 일반적으로 알려져 있으나, 타이로신과 세린/쓰레오닌 잔기에 동시에 작용하는 DS-PTPase인 VHR에 대하여는 기능이 잘 알려져 있지 않으므로 본 연구에서 분리된 baicalein을 이용하여 암세포에 대한 독성 효과 외에 VHR과 관련되어 있다고 알려진 면역기능이나 당뇨 질환에서의 기작에 대한 연구도 계속 진행할 예정이다.

Table 1. Inhibitory activity of baicalein and several flavonoids against VHR, T-cell PTPase and PPase 1 *in vitro*

Compounds	IC_{50} value (μM) ¹⁾		
	VHR DS-PTPase	T-cell PTPase	PPase 1
Baicalein	2.4	- ²⁾	-
Luteolin	-	-	-
Quercetin	-	-	-
Naringenin	-	-	-
Hesperetin	-	-	-
Genistein	-	-	-
Daidzein	-	-	-
Baicalin	-	-	-

¹⁾The concentration of the compound that result in 50% inhibition (IC_{50}) was calculated from a least-squares fit of inhibition and inhibitor concentration.

²⁾Inactive (IC_{50} value is above $200 \mu M$).

Table 2. Cytotoxicity of baicalein from *Gastrodia elata* against various human cancer cell lines *in vitro*

Cell lines	GI_{50} Value ($\mu g/mL$) ¹⁾
	Baicalein
LOX-IMVI (melanoma)	6.76 ± 1.27 ²⁾
NCI H23 (lung cancer)	5.26 ± 0.95
A549 (lung cancer)	12.93 ± 1.93
HCT 116 (colon cancer)	5.44 ± 0.87
SW 620 (colon cancer)	6.79 ± 1.74
PC-3 (prostate cancer)	12.77 ± 1.28
MOLT 4F (leukemia)	6.50 ± 0.95
Mean GI_{50}	8.06 ± 1.16

¹⁾The GI_{50} values represent inhibition concentration of 50% cell growth. Cells in exponential growth phase were dispensed in $100 \mu L$ volume into 96-well microplates and incubated with test sample for 48 hours. Cytotoxicity was measured by the SRB method.

²⁾Each value in the Table is the mean \pm standard deviation of three trials.

요 약

천마의 methanol 추출물로부터 VHR DS-PTPase 저해 물질을 분리하여 이를 HREI-MS와 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 등의 기기 분석 자료에 의하여 baicalein으로 구조를 동정 하였다. 이 물질은 VHR에 대하여 $2.4 \mu M$ 의 IC_{50} 값을 나타내었고 T-cell PTPase나 PPase 1과 같은 다른 단백질 탈인산화 효소에 대하여는 저해 활성을 나타내지 않았다. 또한 7종류의 인간 암세포주(흑색종 세포주인 LOX-IMVI, 폐암 세포주인 NCI H23과 A549, 대장암 세포주인 HCT 116과 SW 620, 전립선암 세포주인 PC-3와 백혈병 세포주인 MOLT 4F)에 대한 세포독성을 조사하여 본 결과 5.26 - $12.93 \mu g/mL$ 에서 GI_{50} 값을 나타내었다.

문 헌

1. Camps, M., Nichols, A. and Arkinstall, S. Dual specificity phos-

- phatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14: 6-16 (2000)
2. Guan, K., Broyles, S.S. and Dixon, J.E. A Thr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* 350: 359-362 (1991)
 3. Martell, K.J., Angelotti, T., Ullrich, A. The "VH1-like" dual-specificity protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cells* 8: 2-11 (1998)
 4. Sodeoka, M., Sampe, R., Kojima, S., Baba, Y., Usui, T., Ueda, K. and Osada, H. Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition. *J. Med. Chem.* 44: 3216-3222 (2001)
 5. Usui, T., Kojima, S., Kidokoro, S., Ueda, K., Osada, H. and Sodeoka, M. Design and synthesis of a dimeric derivative of RK-682 with increased inhibitory activity against VHR, a dual-specificity ERK phosphatase: implications for the molecular mechanism of the inhibition. *Chem. Biol.* 8: 1209-1220 (2001)
 6. Galaktionov, K. and Beach, D. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitosis cyclins. *Cell* 67: 1181-1194 (1991)
 7. Hannon, G.J., Casso, D. and Beach, D. KAP: A dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1731-1735 (1994)
 8. Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75: 791-803 (1993)
 9. Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F. and Tonks, N.K. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP Kinase *in vivo*. *Cell* 75: 487-493 (1993)
 10. Alonso, A., Merlo, J.J., Na, S., Kholod, N., Jaroszewski, L., Kharitonov, A., Williams, S., Godzik, A., Posada, J.D. and Mustelin, T. Inhibition of T cell antigen receptor signaling by VHx, a new dual-specificity phosphatase related to VHR. *J. Biol. Chem.* 277: 5524-5528 (2001)
 11. Najarro, P., Traktman, P. and Lewis, J.A. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J. Virol.* 75: 3185-3196 (2001)
 12. Denu, J.M. and Dixon, J.E. A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5910-5914 (1995)
 13. Terrence, R.B. and Zhang, Z.Y. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers* 47: 225-241 (1998)
 14. Hamaguchi, T., Sudo, T. and Osada, H. RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1 phase. *FEBS Letters* 372: 54-58 (1995)
 15. Han, D.Y. *Modern Pharmacognosy*, 8th ed., pp. 446-447. Hakchangsa, Seoul (1994)
 16. Huang, K.C. *The pharmacology of Chinese herbs*, p. 138, CRC Press, Boca Ranton, USA (1993)
 17. Hunter, T. Oncoprotein networks. *Cell* 88: 333-346 (1997)
 18. Ishibashi, T., Bottaro, D.P., Chan, A., Miki, T. and Aaronson, S.T. Expression and cloning of a human dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12170-12174 (1992)
 19. Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. Characterization of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263: 6731-6737 (1988)
 20. Zander, N.F., Lorenzen, J.A., Cool, D.E., Tonks, N.K., Daum, G., Krebs, E.G. and Fischer, E.H. Purification and Characterization of a human recombinant T-cell protein tyrosine phosphatase from a baculovirus expression system. *Biochemistry* 30: 6964-6970 (1991)
 21. Zhang, Z., Bai, G., Deans, Z.S., Browner, M.F. and Lee, E.Y.C. Expression of the catalytic subunit of phosphorylase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 1484-1490 (1992)
 22. 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. 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)
 23. Lee, B.H., Lee, S.J., Kang, T.H., Kim, D.H., Sohn, D.H., Ko, J.I. and Kim, Y.C. Baicalein: An *in vitro* antigenotoxic compound from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica* 66: 70-71 (2000)
 24. Gao, Z., Huang, K., Yang, X. and Xu, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 643-650 (1999)
 25. Nakahata, N., Kyo, R., Kutsuwa, M. and Ohizumi, Y. Inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade by baicalein, a flavonoid of natural origin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 114: 215-219 (1999)