

자생 식물로 부터 Cyclin-dependent Kinase 4/Cyclin D1 저해물질의 탐색

성낙도* · 김미란 · 하지홍¹ · 권병목² · 정하원² · 안병태² · 유시용³

충남대학교 농과대학 응용생물화학부, ¹경북대학교 자연과학대학 유전공학과,
²생명공학연구소 항생물질연구실, ³한국화학연구소 화학물질 연구부

초 록 : 인체 세포의 세포주기를 조절하는 Cyclin-dependent Kinase(CDK) 중 CDK4/Cyclin D1 효소 저해 물질을 찾기 위하여 국내에 자생하는 37과 87종의 식물 추출물을 탐색한 결과, 50%(5 µg/ml) 이상의 CDK4/Cyclin D1 효소 저해활성을 보인 것은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*), 노박덩굴(*Celastrus orbiculatus*), 삼백초(*Saurus chinensis*), 목단(*Paeonia suffruticosa*) 및 오이풀(*Sanguisorba officinalis*)이었다. 이들 중에서 목단과 오이풀 추출물이 가장 높은 56%의 저해율을 각각 나타내었다. 또한 추출물에서 활성물질을 추출 정제하여 2차원 NMR 등을 포함한 각종 기기분석을 통하여 cryptotanshinone으로 동정하였다. (2000년 4월 29일 접수, 2000년 8월 20일 수리)

서 론

세포주기는 전형적으로 4개의 phase [G1-S-G2-M]로 나누어진다.¹⁾ DNA가 합성되는 시기인 S(synthesis)기와 두 개의 딸세포로 분열이 일어나는 M(mitosis)기가 있고 이들 두 phase 전 후에 현미경적으로는 아무 변화도 관찰되지 않는 G1, G2(휴지기)기가 존재한다. 이미 성장하고 분화하여 더 이상 분열하지 않는 대부분의 세포는 바로 G1기에 해당하며, 분열이 장기간 일어나지 않는 상태를 특별히 G0 상태로 서술한다. S, G2, M phase에 소요되는 시간은 세포에 따라 별차이가 없으나 G1은 세포에 따라 큰 차이가 있어 세포분열에 소요되는 시간을 결정짓는 요인이 된다. 형태적으로 큰 변화가 없음에도 불구하고 G1 및 G2 phase는 정작 세포주기의 핵심조절기구가 작동하는 시기로서 성장인자(growth factor)와 같은 외부신호는 바로 이 시기를 통해 세포분열이 출발, 혹은 정지할 지의 여부를 결정짓곤 한다. 따라서 세포성장과 관련해서 G1, G1/S, G2/M phase에 일어나는 분자적 기전이 세포주기 연구의 관건이 되고 있다.

만약 세포가 어떤 자극에 의해 '분열'하기로 결정하면 세포 내에 일련의 효소와 그의 조절 단백질이 소집되고 이들로부터 세포주기 조절기구(cell cycle machinery)가 구성된다. 이 중 세포주기의 핵심 분자는 'CDK(cyclin dependent kinase)'라고 하는 serine/threonine kinase로서 세포주기가 진행하는데 있어 엔진의 역할을 한다.²⁾ 이 효소는 이미 이름에서 시사하듯 조절단위로 cyclin이라는 분자를 파트너로 하여 복합체를 이룰 때 활성화된다. 지금까지 8종류의 CDK가 알려졌고, 이들은 각각 CDK1~8로 명명되고 있다. Cyclin도 A, B, C, D, E, F, G, H, I 타입이 있고 이중 D 타입 cyclin은 다시 D1, D2, D3의 세종류로 구분되고 있다. CDK들은 각 세포단계에서 cyclin 분자와 고유

의 조합을 이루어 활성화되고 세포주기진행을 담당하게 된다.

Cyclin은 특정 세포단계에서 합성되기 시작하여 세포 내에서 축적되었다가 특정 CDK와 결합을 이루고 CDK를 활성화시킨 이후에 분해되는, 합성-분해의 과정을 반복하는 방식으로 작용한다. 세포의 종류에 따라 약간의 차이는 있지만 포유동물세포의 G1기에는 주로 D-type cyclin들과 CDK2, 4, 6등이 결합된 복합체들이 활성화되고, 이보다 더 늦은 G1기에는 cyclin E가 합성되기 시작, CDK2와 결합하여 G1/S 이행을 담당한다. Cyclin A는 G1기 후반부에 합성되기 시작하여 S기에 와서 CDK2와 결합하여 활성을 나타내다가 G2기에서는 CDK1과 결합하여 최고조의 활성을 보이고 M기에 들어가서는 급격히 분해된다. 모든 세포에서 Mitosis로의 진입은 CDK1과 cyclin B와의 복합체에 의해 일어나며 cyclin B가 분해되어야 M기에서 빠져 나오는 것으로 보인다.

암은 조절되지 않는 세포성장에 기인하는 질병이다. 즉 세포주기를 담당하는 CDK/cyclin 분자의 활성이 정상적으로 조절받지 못하여 세포가 비정상적인 성장을 하게 되는 것이다. 여러 종류의 암에서 여러 세포주기 조절자들의 과활성이 나타나고 있고, 이중 cyclin D1 유전자의 증폭 재배열 등으로 인한 CDK/cyclinD1 효소활성의 과발현이 많은 암세포에서 관찰되고 있다. 이에 CDK4/cyclin D1 활성 저해제는 좋은 항암 활성을 가질 수 있다.³⁾

지금까지 알려진 좋은 CDK 저해제들로는 flavopiridol, olomoucine, butyrolactone-1, 9-hydroxyellipticine 및 suramine 등이 있는데⁴⁾ 가장 저해효과가 좋아 현재 임상 3단계에 있는 flavopiridol은 Indian식물, *Dysoxylum binectariferum*에서 분리된 alkaloid계 유사체로 세포의 synchronization 방법에 따라 다소 다르지만, 주로 세포주기 중의 후기 G1기나 G2기에서 세포 성장을 저해한다.⁵⁾

본 연구에서는 새로운 항암제 개발을 위한 시도의 일환으로⁶⁾ 국내 자생식물 37과 87종을 대상으로 세포주기 G1에서 S기로의 진행을 조절하는 CDK4/Cyclin D1 효소활성 저해물질에 대한 탐색 결과를 보고 하고자 한다.

찾는말 : CDK4/Cyclin D1 효소 저해물질, *Salvia miltiorrhiza*, *Paeonia suffruticosa*, *Sanguisorba officinalis*, Cryptotanshinone
*연락처 : Tel : 82-42-821-6737; Fax : 82-42-825-3306
E-mail : ndsung@cuvic.cnu.ac.kr

Table 1. Anti-CDK4/Cyclin D1 inhibitory effect of extracts (5 µg/ml) of various native plants

Family	Genus	Species	Tissue sampled	Inhibition(%)	
Juglandaceae	<i>Platycarya</i>	<i>P. strobilacea</i>	stem bark	43	
Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>S. nigrum</i>	fruit	-13	
	<i>Capsicum</i>	<i>C. annuum</i>	fruit	0	
Rhamnaceae	<i>Rhamnus</i>	<i>R. davurica</i>	flower	-13	
Compositae	<i>Youngia</i>	<i>Y. denticulata</i>	aerial part	16	
	<i>Ligularia</i>	<i>L. fischeri</i>	leaves	28	
	<i>Inula</i>	<i>I. britannica</i> var. <i>chinensis</i>	stem bark	-16	
	<i>Carpesium</i>	<i>C. macrocephalum</i>	root	30	
	<i>Gnaphalium</i>	<i>G. japonicum</i>	aerial part	32	
	<i>Eupatorium</i>	<i>E. chinense</i> var. <i>simplicifolium</i>	aerial part	33	
	<i>Atractylodes</i>	<i>A. japonica</i>	underground part	27	
	<i>Artemisia</i>	<i>A. japonica</i>	aerial part	35	
	<i>Lactuca</i>	<i>L. triangulata</i>	aerial part	-23	
		<i>L. raddeana</i>	aerial part	17	
		<i>Siegesbeckia</i>	<i>S. glabrescens</i>	aerial part	7
			<i>S. pubescens</i>	aerial part	30
		<i>Cephalonoplos</i>	<i>C. segetum</i>	aerial part	44
		<i>Achillea</i>	<i>A. sibirica</i>	aerial part	20
	Labiatae	<i>Isodon</i>	<i>I. japonicus</i>	aerial part	-3
		<i>I. excisus</i>	leaves	-3	
<i>Salvia</i>		^a <i>S. miltiorrhiza</i>	root	52	
<i>Clinopodium</i>		<i>C. gracile</i> var. <i>multicaule</i>	aerial part	36	
Juncaceae	<i>Juncus</i>	<i>J. effusus</i> var. <i>decipiens</i>	aerial part	-11	
Rubiaceae	<i>Rubia</i>	<i>R. akane</i>	aerial part	4	
	<i>Paederia</i>	<i>P. scandens</i>	leaves	34	
Celastraceae	<i>Celastrus</i>	^a <i>C. orbiculatus</i>	flower	52	
	<i>Tripterygium</i>	<i>T. regelii</i>	leaves	48	
Pyrolaceae	<i>Pyrola</i>	<i>P. japonica</i>	aerial part	40	
Symplocaceae	<i>Symplocos</i>	<i>S. chinensis</i> for. <i>pilosa</i>	leaves	40	
Ulmaceae	<i>Ulmus</i>	<i>U. parvifolia</i>	stems	31	
Actinidiaceae	<i>Actinidia</i>	<i>A. arguta</i>	stem	17	
Crassulaceae	<i>Sedum</i>	<i>S. kamschaticum</i>	aerial part	17	
Eucommiaceae	<i>Eucommia</i>	<i>E. ulmoides</i>	stem	19	
Styracaceae	<i>Styrax</i>	<i>S. obassia</i>	leaves	8	
Araliaceae	<i>Aralia</i>	<i>A. elata</i>	stem	32	
Polygonaceae	<i>Polygonum</i>	<i>P. aviculare</i>	aerial part	30	
	<i>Fagopyrum</i>	<i>F. esculentum</i>	sprout	-5	
	<i>Rumex</i>	<i>R. acetosella</i>	aerial part	-15	
Valerianaceae	<i>Partrinia</i>	<i>P. villosa</i>	aerial part	4	
Verbenaceae	<i>Callicarpa</i>	<i>C. japonica</i>	stem	19	
Guttiferae	<i>Hypericum</i>	<i>H. erectum</i>	aerial part	26	
Berberidaceae	<i>Berberis</i>	<i>B. amurensis</i>	leaves	23	
	<i>Jeffersonia</i>	<i>J. dubia</i>	aerial part	-32	
	<i>Caulophyllum</i>	<i>C. robustum</i>	aerial part	10	
Ranunculaceae	<i>Thalictrum</i>	<i>R. aquilegifolium</i>	aerial part	14	
	<i>Ranunculus</i>	<i>R. japonicus</i>	aerial part	17	
	<i>Aconitum</i>	<i>A. pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i>	aerial part	40	
	<i>Clematis</i>	<i>C. apiifolia</i>	aerial part	17	
		<i>C. mandshurica</i>	stem bark	27	
Menispermaceae	<i>Paeonia</i>	^a <i>P. suffruticosa</i>	aerial part	56	
	<i>Sinomenium</i>	<i>S. acutum</i>	aerial part	-3	
Liliaceae	<i>Menispermum</i>	<i>M. dauricum</i>	stem bark	32	
	<i>Allium</i>	<i>A. anisopodium</i>	aerial part	35	
	<i>Hemerocallis</i>	<i>H. fulva</i>	root	-1	
	<i>Smilax</i>	<i>S. riparia</i> var. <i>ussuriensis</i>	aerial part	39	

Table 1. Continued

Family	Genus	Species	Tissue sampled	Inhibition(%)
Saxafragaceae	<i>Philadelphus</i>	<i>P. schrenckii</i>	leaves	18
	<i>Astilbe</i>	<i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	aerial part	2
	<i>Rodgersia</i>	<i>R. podophylla</i>	aerial part	15
	<i>Hydrangea</i>	<i>H. serrata</i> for. <i>acuminata</i>	aerial part	27
Lythraceae	<i>Lythrum</i>	<i>L. anceps</i>	aerial part	35
Amaranthaceae	<i>Achyranthes</i>	<i>A. japonica</i>	aerial part	16
Cyperaceae	<i>Scirpus</i>	<i>S. triqueter</i>	aerial part	23
Umbelliferae	<i>Peucedanum</i>	<i>P. terebinthaceum</i>	aerial part	30
	<i>Torilis</i>	<i>T. japonica</i>	aerial part	36
	<i>Angelica</i>	<i>A. polymorpha</i>	aerial part	18
		<i>A. cartilagino-marginata</i>	underground part	17
Saururaceae	<i>Saururus</i>	* <i>S. chinensis</i>	root	53
Caryophyllaceae	<i>Melandrium</i>	<i>M. firmum</i>	aerial part	-7
	<i>Lychnis</i>	<i>L. cognata</i>	aerial part	5
	<i>Dianthus</i>	<i>D. sinensis</i>	leaves	17
Simaroubaceae	<i>Picrasma</i>	<i>P. quassioides</i>	aerial part	26
Urticaceae	<i>Boehmeria</i>	<i>B. tricuspis</i>	aerial part	14
		<i>B. spicata</i>	aerial part	19
Cruciferae (or	<i>Arabis</i>	<i>A. glabra</i>	fruit	30
Brassicaceae)	<i>Capsella</i>	<i>C. bursa-pastoris</i>	flower	-16
Caprifoliaceae	<i>Viburnum</i>	<i>V. dilatatum</i>	aerial part	19
	<i>Lonicera</i>	<i>L. maackii</i>	stem bark	-30
Betulaceae	<i>Betula</i>	<i>B. Costata</i>	stem bark	-4
Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>P. persica</i>	aerial part	31
	<i>Crataegus</i>	<i>C. pinnatifida</i>	stem bark	39
	<i>Rubus</i>	<i>R. coreanus</i>	leaves	32
	<i>Potentilla</i>	<i>P. cryptotaeniae</i>	aerial part	19
	<i>Sanguisorba</i>	* <i>S. officinalis</i>	aerial part	56
	<i>Spiraea</i>	<i>S. fritschiana</i> var. <i>obtusifolia</i>	aerial part	24
			<i>S. blumei</i>	aerial part
		<i>S. prunifolia</i> for. <i>simpliciflora</i>	leaves	49
	<i>Agrimonia</i>	<i>A. coreana</i>	root	32

*Significantly inhibited extract.

재료 및 방법

재료와 시약 및 기기

재료 식물의 대부분은 채집하였으나 일부는 약재상에서 구입하여 사용하였으며 실험에 쓰인 adenosine triphosphate(ATP), dithiothreitol(DTT), dimethylsulfoxide(DMSO), Hepes, magnesium chloride, sodium fluoride, trichloroacetic acid (TCA), sodium orthovanadate 및 sodium diazide 등 시약은 Sigma사(USA)이었다. [γ - 32 P]ATP는 Amersham pharmacia biotech.사 제품을 사용하였고 cocktail 용액은 Packard사제 이었다. Acetone, chloroform, ethyl acetate, methyl alcohol, methylene chloride 및 n-hexane 등 용매는 EP급의 국내 덕산화학 제품을 정제하여 사용하였고 silica gel과 TLC판은 Merck사(Germany) 제품을 썼다.

구조분석을 위한 기기로는 NMR(Bruker AMX-400), Mass (Hewlett-Packard 5988, VG 2AB-7070) spectrometer, IR spectrophotometer(Perkin-Elmer 1420) 및 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-265)를 각각 사용하였다.

저해 물질의 분리

재료를 메칠알콜로 24시간 용출시키고 methylene chloride층에서 얻은 추출물을 분리하기 위하여 silica gel(Merck제, Kieselgel 60, 230-460 mesh)로 column chromatography 하였다. 전개용매로는 10-20% ethyl acetate로 용출한 다음에 MeOH:CHCl₃ 용매를 0:1에서 1:1로 혼합비율을 달리하여 다시 용출하였으며 인산화 효소 활성 검정을 통하여 활성분획을 모아 감압 농축하였다. 활성을 보인 물질은 다시 silica gel을 이용하여 분리하고 ethyl acetate:n-hexane 용매를 0:1에서 1:4로 혼합비율을 달리하여 용출시켜 저해활성 분획을 농축하였다. 각 단계에서 TLC(ethyl acetate:n-hexane = 80:20)로 각 분획의 분리 정도를 anisaldehyde 염색용매로 검색하였다.

Plasmid 구축

Retinoblastoma(RB) 유전자는 polymer chain 반응(PCR)을 이용하여 인체 Testis cDNA library에서 RB 단백질의 C-terminal coding region(단백질 잔기 792-928 영역)을 증폭하였다. 이 DNA 조각은 glutathion-S-transferase(GST) fusion을 위

하여 pGEX-KG vector(Pharmacia제)에 cloning하였다. 그리고 인체 cDNA library에서 증폭된 CDK4 유전자는 GST와 융합을 위해 pGEX2T vector에 cloning 한 후, GST 유전자와 융합된 형태로 잘라내었다. 이 융합된 DNA 가닥과 cyclin D1 유전자를 다시 baculovirus vector인 pBacPAK8에 cloning하고 이 두개의 재조합 vector는 곤충세포(Sf21)에 cotransfection시켜 CDK4/cyclin D1 복합 단백질을 생성하게 하였다.

GST-Rb 단백질 발현 및 분리

GST-Rb 융합 vector로 형질전환된 대장균(*E. coli* strain, BL21)은 37°C에서 3시간 배양후, 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside(Sigma제)로 30°C에서 6시간 동안 유도하여 GST-Rb단백질이 발현되도록 하였다. 원심분리로 채취한 배양세포는 초음파로 세포를 깨 후에 원심분리하여 상등액을 Glutathion affinity column(Pharmacia)으로 분리하였다. 그리고 GST 융합 단백질은 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM reduced glutathion 용액으로 용출한 후에 Centriprep(Amicon사제)으로 투석하고 농축하여 인산화 완충용액에 녹여 사용하였다.

CDK4/CyclinD1 복합 단백질 발현 및 분리

GST-CDK4와 Cyclin D1 재조합 virus를 곤충세포(Sf21)에 감염시켜 27°C에서 60시간 배양하고 원심분리를 통해 채취된 세포는 용해액(50 mM HEPES, 0.1% Tween-20, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM NaF 및 protease 저해제 1정) 50 ml에 재현탁하여 얼음상에서 1시간 동안 분해시켰다. 분해된 세포는 원심분리하여 상등액을 Glutathion affinity column으로 분리하였다.

Kinase 저해활성 측정

CDK4/Cyclin D1 인산화 효소활성을 측정하기 위하여 완충 용액(50 mM HEPES(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM NaF)에 2 μg GST-CDK4/CyclinD1 복합체와 5 μg GST-Rb를 혼합하여 85 μl가 되게 한 후, 이 용액에 DMSO로 녹인 시료 5 μg(DMSO 5%)를 넣었다. 이것을 30°C에서 preincubation 한 후에 ATP 용액([γ-³³P]ATP 0.5 μCi 와 50 μM ATP) 10 μl를 첨가하여 30°C에서 30분 동안 인산화 반응시켰다. 이어서 차가운 25% TCA 100 μl를 넣어 반응을 중지시키고 이 plate를 4°C에서 30분간 정치시켜 단백질이 침전되도록 한 후에 반응용액을 PVDF-well plate(Multiscreen HV, Opaque plates, Milipore)에 각각 넣어 진공 펌프를 이용하여 여과시켰다. 여과된 막은 차가운 15% TCA 300 μl로 세 차례 씻어준 다음에 공기중에서 말린 막에 scintillation counting 용액 25 μl를 각각 넣어 microscintillation counter(Wallac사제)로 인산화 수용체로 작용하는 기질인 RB단백질에 결합된 [γ-³³P]ATP의 방사선 량(ccpm)을 측정하였다.^{6,7)} 추출물(5 μg/ml)에 대한 저해활성(%)은 다음 식으로 계산하였으며 오차는 ± 15%이었다.

$$\text{저해율}(\%) = 100 - \left[\frac{\text{시료(ccpm)}}{\text{대조구(ccpm)}} \times 100 \right]$$

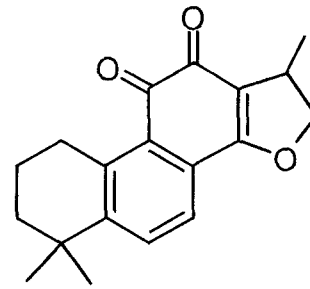


Fig. 1. Structure of cryptotanshinone as CDK/Cyclin D1 inhibitor.

결과 및 고찰

정상세포에서부터 암세포로의 전환에는 첫째 세포의 성장자극 전달체계(signal transduction pathway)의 차단으로 인한 정상적인 신호전달과 이에 필요한 세포내 물질의 활성화 방해, 둘째 암유전자 물질의 활성화에 의한 세포내 성장균형조절 불가능, 셋째 세포주기(cell cycle)의 이상으로 인한 세포성장조절의 불균형 등의 원인을 들 수 있다. 세포주기는 모든 진핵세포들의 성장에 필수적으로 거치는 주기로서 세포가 G1에서 S, G2, M phase를 거치면서 분열, 성장한다. 각 세포 단계별로 관련되는 효소가 정상적으로 조절받지 못하게 되면 세포성장은 암세포와 같은 비정상적인 세포성장이 일어나게 된다. 암세포에서는 이런 세포주기 조절 효소인 CDK/cyclin이 비정상적으로 과활성화되어져 있으며 특히 G1/S기의 전이에 관련하는 CDK4/cyclinD1의 과활성이 많은 암세포에서 발견되어지고 있다.⁸⁾ 더욱이 세포내 CDK4/cyclin D1의 저해단백질인 p16, p21, p27등의 유전자 변이도 많은 암세포에서 나타난다. 이에 CDK4/cyclin D1 저해제는 분열하고 있는 암세포를 G1기에 정지시키는 작용을 하는 좋은 항암제가 될 수 있다.

현재 주로 임상에서 이용되고 있는 항암제들은 대개 특정 세포주기를 대상으로 작용하는 것이 아니며 일반세포에 대한 독성이 크게 문제가 된다. 지금 까지 알려진 CDK 저해제는 flavopiridol과 UCN-01을 제외하고는 거의 알려진 바 없으며 CDK4/cyclin D1에 특이적인 저해제는 거의 전무한 상태이다.

본 연구에서는 항암제 탐색계로서 세포주기중 G1기에서 S기로의 이행을 조절하는 CDK4/cyclin D1 효소 저해제를 탐색하기 위하여 국내에 자생하는 37과 87종의 식물체 부위 별 추출물(5 μg/ml)에 대한 저해율(%)을 Table 1에 정리하였다. 이 중에서 50%이상의 저해활성을 보인 식물은 단삼(*S. multiorrhiza*), 노박덩굴(*C. orbiculatus*), 삼백초(*S. chinensis*), 목단(*P. suffruticosa*) 및 오이풀(*S. officinalis*) 등 이었으며 목단과 오이풀이 56%로 가장 높은 저해율을 나타내었다.

50%이상의 저해활성을 보인 식물 중에서, 단삼은 약리작용으로 혈관확장 작용, 항균작용, 진정작용 및 진통작용 등이 있으며 신선한 뿌리에는 tanshinone A, B, C와 cryptotanshinone 등이 함유되어 있다.^{9,12)} 이 중에서 특히, CDK4/cyclin D1 효소 저해활성(52%)을 나타내는 화합물에 대한 2차원 NMR 등을 포함한 각종 기기분석 결과, 이미 알려진 cryptotanshinone (Fig. 1, C₁₉H₂₀O₃, UV : 263 nm(log ε = 4.45/CH₂Cl₂), MS : m/

z, 167(100) 296(M+))¹³)으로 밝혀졌으나 CDK4/cyclin D1 효소 저해활성에 관련된 연구는 아직 보고된 바가 없다.

참고문헌

1. Giannino, D. and Massimo, L. (1996). Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Critical Reviews in Oncogenesis* **7**, 127-142.
2. Kang, G. and Brian D. D. (1998). Activity and nature of p21WAF1 complexes during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12254-12259.
3. Alexandros, K. K. and R. Radhakrishnan. (1998) Purification, characterization, and kinetic mechanism of cyclin D1 · CDK4, a major target for cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26506-26515
4. Kevin, G. C., Joseph, P. L. and Bingwei, V. Y. (1997) Chemical Inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Ann. Rep. Med. Chem.* **32**, Ch. 17.
5. Ryu, S. Y., Lee, C. O. and Choi, S. U. (1997) In vitro cytotoxicity of transhinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica*. **63**, 339-342.
6. Gavin, B., Nicholas, B. and La, T. (1999) The cell cycle and drug discovery: The promise and the hope. *Drug Discov. Today* **4**, 455-464.
7. Chun, Y. G. and Peggy, S. Z. (1997) Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *Bioessays* **19**, 307-314.
8. Robert, A. W. (1996) How cancer arises. *Scientific American* **275**, 62-70.
9. Yagi, A., Fujimoto, K. and Tanonaka, K. (1989) Possible active components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza*) for protection of the myocardium against ischemia-induced derangements. *Planta Medica*. **55**, 51-54.
10. Kohda, H., Takeda, O. and Tanaka, S. (1989) Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from Dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1287-1290.
11. Honda, G., Koezuka, Y. and Tabata, M. (1988) Isolation of an antidermatophytic substance from the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 408-411.
12. Tezuka, Y., Kasimu, R. and Basnet, P. (1997) Aldolase reductase inhibitory constituents of the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1306-1311.
13. Kim, M. R. (2000) Isolation and Structure Determination of Cyclin-dependent Kinase 4 (CDK4/cyclinD1 Inhibition Material from Tanshen. M. Sc. Thesis, Graduate School Chungnam National University, Taejeon, Korea.

Searching of Cyclin-Dependent Kinase 4/Cyclin D1 Enzyme Inhibition Materials from the Native Plants

Nack-Do Sung*, Mi-Ran Kim, Ji-Hong Ha¹, Byung-Mok Kwon², Ha-Won Chung², Byung-Tae Ahn², Shi-Yong Ryu³(Department of Agricultural Chemistry, Graduate School, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea., Department of Genetic engineering, Graduate School, Kyungpook National University, Taegu 702-701, ²Protein Regulator RU, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115 Yusong, Taejeon, 305-600, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 9 Yusong, Taejeon 305-343)

Abstract : To search CDK4/Cyclin D1 enzyme inhibition materials, methanol extracts of native eighty seven plant species in thirty seven families were screened in vitro for their inhibiting activities against CDK4/Cyclin D1 enzyme which are control to the normal cell division cycle in human body. Extracts of *Paeonia suffruticosa*, *Saurus chinensis*, *Sanguisorba officinalis* and *Celastrus orbiculatus* among them significantly inhibited above fifty percent (in 5 µg/ml) against CDK4/ Cyclin D1 enzyme. Especially, the extracts of *P. suffruticosaa* and *S. officinalis* showed moderately strong inhibition. Also, cryptotanshinone was identified as active compound from a extracts of *Salvia miltiorrhiza* by spectroscopic analyses including 2D NMR experiments.

Key words : CDK4/Cyclin D1 enzyme inhibition materials, *Salvia miltiorrhiza*, *Paeonia suffruticosa*, *Sanguisorba officinalis* and Cryptotanshinone

*Corresponding author