

## 지치뿌리로부터 분리한 Acetylshikonin의 LDL 산화 저해활성과 FPTase 저해활성

김금숙<sup>1\*</sup> · 정태숙<sup>2</sup> · 권병목<sup>2</sup> · 김영옥<sup>1</sup> · 차선우<sup>1</sup> · 송경식<sup>3</sup> · 백남인<sup>4</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, <sup>2</sup>한국생명공학연구원, <sup>3</sup>경북대학교 농업생명과학대학, <sup>4</sup>경희대학교 생명공학원

### Inhibitory Effect of Acetylshikonin from Roots of *Lithospermum erythrorhizon* on LDL Oxidation and FPTase Activity

Geum-Soog Kim<sup>1\*</sup>, Tae-Sook Jeong<sup>2</sup>, Byoung-Mok Kwon<sup>2</sup>, Young-Ok Kim<sup>1</sup>, Seon-Woo Cha<sup>1</sup>, Kyung-Sik Song<sup>3</sup>, and Nam-In Baek<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873, Korea

<sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

<sup>3</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>4</sup>Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Youngin 446-701, Korea

Received October 31, 2009; Accepted November 26, 2009

*Lithospermum erythrorhizon* has been known well as one of traditional medicine for fever reduction, detoxication, and blood circulation improvement. This study was carried out to isolate biological active compounds from roots of *Lithospermum erythrorhizon* and to investigate their low density lipoprotein (LDL) antioxidant and anticancer activities. The hexane extract of *Lithospermum Radix* has been separated on silica gel chromatography and a naphthoquinone pigment compound 1 has been isolated. The structure of the compound 1 has been identified by spectroscopic technique, including MS and NMR, as acetylshikonin (1). Acetylshikonin showed significantly inhibitory activity on Cu<sup>2+</sup>-induced human LDL oxidation with IC<sub>50</sub> value of 8.8 μM and obvious anticancer effect by inhibiting farnesyl:protein transferase (FPTase) activity with IC<sub>50</sub> value of 23 μM, which suggested that acetylshikonin might be useful for the treatment of atherosclerosis and cancer.

**Key words:** acetylshikonin, FPTase, LDL oxidation, *Lithospermum erythrorhizon*

지치(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 지치과의 다년생 초본 식물로서 우리 나라의 강원도, 제천 등의 야산에 주로 자생하고 지치 뿌리는 예로부터 우리나라, 중국과 일본에서 한약재와 식용색소로 이용되었다. 한방에서 혈액순환 촉진, 해열, 해독 작용에 주로 이용하거나 토혈, 혈뇨, 변비, 화상, 습진, 요로 감염 등을 치료하는데 사용되어왔다[Lee 등, 1998]. 주요성분으로는 acetylshikonin, shikonin, alkannan, isobutyryl-shikonin, β,β-dimethyl-acrylshikonin, β-hydroxy isovaleryl shikonin, teracryl

shikonin 등의 다양한 shikonin 유도체들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 *Arnebia* 속의 식물 4종(*A. euchroma*, *A. guttata*, *A. benthamii*, and *A. hispidissima*)에 함유되어 있는 shikonin 유도체 성분들을 신속하게 동시 정량분석하는 high-performance thin-layer chromatography(HPTLC) 방법에 대한 보고가 있었다[Sharma 등, 2009]. 한편, 중국에서는 *Lithospermum* 속의 뿌리는 경자초, *Arnebia*속의 뿌리는 연자초로 유통되고 있는데, 연자초는 겉질이 종이처럼 여러 겹으로 되어 한 장씩 한 장씩 쉽게 벗겨지므로 질이 단단한 경자초와는 쉽게 구분되며, 신강자초(*Arnebia euchroma*)와 내몽자초(*A. guttata*)가 포함된다. 지치의 acetylshikonin 등을 포함한 shikonin 유도체 성분은 항산화 활성[Weng 등, 2000]를 비롯하여, shikonin 유도체 성분의 항염증 활성[Tanaka 등, 1986; Staniforth 등, 2004], 혈전용집 억제활성[Chang 등, 1993], 항미생물 효과[Tabata 등, 1982], 항산화 효과[Sekine 등, 1998] 등이 알려져 있다. 또한 acetylshikonin를 포함한 shikonin 유도체들은 항암효과가 우수

\*Corresponding author  
Phone: +82-43-871-5582; Fax: +82-43-871-5589  
E-mail: kims0725@korea.kr

**Abbreviations:** FPTase, farnesyl:protien transferase; HDL, high density lipoprotein; IC<sub>50</sub>, half-inhibition concentration; LDL, low density lipoprotein

doi:10.3839/jabc.2009.038

한 것으로 보고되었다[Sakawa 등, 1977; 1981; Lee 등, 2008]. 최근에는 acetylshikonin이 cytosolic phospholipase A2(cPLA2) membrane recruitment와 5-lipoxygenase 활성억제를 통해 eicosanoid의 생성을 억제하는 효과가 있음이 보고되기도 하였다[Hsu 등, 2009].

한편, 저밀도지질단백질(Low density lipoprotein, LDL)은 혈액 중 콜레스테롤의 주요 운반체로서, 혈액 중 LDL-콜레스테롤 산화는 동맥경화적 손상의 중요과정으로서 제안되고 있어 [Steinberg 등, 1989; Diaz 등, 1997] 이는 동맥경화성 심장질환을 유발하는 직접적인 원인이 될 수도 있다. 항산화제는 동맥경화를 억제하는 것으로 보고되었는데[Bjorkhem 등, 1991; Mashima 등, 2001], 항산화제 중에 probucol과 비타민 E는 지질농도를 낮추고 동맥경화성 심장질환의 발병 위험을 감소시키는 것으로 잘 알려져 있으나[Nagano 등, 1992] 이 약물은 동시에 혈청의 고밀도 지질단백질-콜레스테롤(high density lipoprotein (HDL)-cholesterol)의 농도수준을 낮추는 부작용도 있어 문제가 있는 것으로 알려져 있다[Jeong 등, 2004]. 따라서 보다 안정적인 LDL 산화 저해제의 개발이 필요하다고 하겠다. FPTase는 세포의 증식과 분화를 조절하는 신호전달 과정에 관여하는 효소의 일종으로 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 ras protein에 전달하는 역할을 한다[Pompliano 등, 1992]. 즉 포유류의 세포를 변환하기 위해서는 악성 종양의 발현과 관련된 ras oncoproteins에 FPTase이 작용하여 단백질의 번역 후 변형(posttranslational modification) 과정을 거쳐 farnesyl group이 결합되어야 한다[Omer 등, 2000]. 최근 FPTase의 특이적 저해제가 암 치료를 위한 치료제 개발의 화학적 선도물질이 될 수 있음이 증명되고 있어[Leonard, 1997] FPTase 저해제는 항암제의 훌륭한 타겟으로 평가되고 있다.

본 연구에서는 지치의 색소성분을 활용한 기능성 건강기능식품 소재를 개발하기 위해 지치 뿌리의 핵산 추출물로부터 acetylshikonin을 분리하고, 저밀도지질단백질(LDL) 산화 저해활성과 새로운 항암제 개발 타겟인 farnesyl:protein transferase (FPTase) 효소에 대한 저해활성을 검증하였다.

**추출 및 분리.** 지치뿌리 시료는 1년근 재배 지치를 한국생약협회에서 구입하여 사용하였으며, voucher specimen (MPS000071)은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 식물 표본실에 보관중이다. 지치 뿌리의 분말 시료 3 kg에 핵산 12 L를 넣고 10일 동안 상온에 방치하여 총 4회 동일 방법으로 추출하고, 여과한 후 진공 농축하였다. 5-6회 추출은 남아있는 시료 잔사에 용매 6 L 정도 추가하여 상온 진탕 추출한 후 여과하여 진공 농축하였다. 총 6회에 걸쳐 농축한 핵산 농축액(Hexane ext., 26 g)은 silica gel이 충전된 column(5×40 cm)에서 column chromatography를 실시하였다. 용출용매로는 Hexane:EtOAc(30:1→1:11) 혼합용매와 EtOAc:MeOH(25:1→1:2) 혼합용매의 기울기 용리로 용출하면서 500 mL씩 분취하여 총 421개 분획을 분취하였다. 각 분취 분획은 UV 검출기 520 nm의 파장에서 HPLC 분석으로 동일성을 확인한 후 유사한 패턴의 분획들은 서로 합쳐 재농축하여 최종 농축 분획 30 개(Fr. 1~30)를 얻었다. 최종 30개의 분획 중 Fr. 6, 7 분획을 MeOH로 침전화하여 compound 1(1.1 g)을 최종 분리, 정제하였

다. 분리한 화합물의 구조 동정을 위한 분광학적 분석의 NMR 측정에는 JEOL JNM-LA400 FT-NMR spectrometer(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)가 사용되었고, EI/MS 측정에는 JEOL JMS-AX505WA(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)가 사용되었다.

**Compound 1:** Red brown amorphous powder; EI/MS (positive ion mode)  $m/z$  330.95 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  1.64 (3H, s, H-15), 1.75 (3H, s, H-16), 2.20 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>-18), 2.53~2.66 (2H, m, H-12), 5.18 (1H, m, H-13), 6.08 (1H, m, H-11), 7.05 (1H, s, H-3), 7.24 (2H, s, H-6, H-7), 12.48 (1H, s, OH-5), 12.64 (1H, s, OH-8); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  178.19 (C, C-4), 176.68 (C, C-1), 169.74 (C, C-17), 167.45 (C, C-5), 166.92 (C, C-8), 148.19 (C, C-2), 136.09 (C, C-14), 132.85 (CH, C-6<sup>a</sup>), 132.69 (CH, C-7<sup>a</sup>), 131.44 (CH, C-3), 117.65 (CH, C-13), 111.80 (C, C-9<sup>b</sup>), 111.54 (C, C-10<sup>b</sup>), 69.50 (CH, C-11), 32.81 (CH<sub>2</sub>, C-12), 25.74 (CH<sub>3</sub>, C-16), 20.95 (CH<sub>3</sub>, C-18), 17.92 (CH<sub>3</sub>, C-15) (<sup>a,b</sup>Assignments with the same superscript may be interchanged.).

**LDL oxidation 측정.** 분리한 acetylshikonin의 생리활성 측정을 위해 먼저 human LDL의 Cu<sup>2+</sup>-유도형 과산화에 대한 보호 효과를 *in vitro* 측정하였다. 혈액은 대한적십자혈액원의 연구용 혈액기증프로그램의 가이드라인에 대하여 동의한 건강한 정상인으로부터 지원받은 후 표준방법[Havel 등, 1955]을 약간 변형하여 LDL을 분리하였다[Ahn 등, 2001]. LDL 산화정도는 Buege와 Aust의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) assay[Buege와 Aust, 1978]를 약간 변형한 Ahn 등의 방법[2001]으로 측정하였다. 즉 PBS용액에 있는 LDL 용액(250  $\mu$ L, 50-100  $\mu$ g protein)에 10  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>를 추가하였다. LDL의 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준물질로 하여 정량하였다. LDL의 산화는 5 mL screw-capped glass vial에 반응액을 넣고 온도 37°C의 진탕수조에서 진행하였다. 반응 4시간 후에 1 mL의 20% trichloroacetic acid를 넣고 반응을 종결시켰다. 침전이 생긴 후에 1 mL의 0.67% TBA(in 0.05 N NaOH)를 첨가하여 vortexing 하였다. 최종 혼합물은 95°C에서 5분간 가열하고 얼음으로 냉각시킨 후 1000×g에서 2분간 원심분리 하였다. 생성된 MDA(malondialdehyde)의 흡광도는 532 nm에서 측정하였으며 tertamethoxypropane으로부터 얻은 MDA를 표준품으로 이용하여 정량하였다.

**FPTase 효소활성 측정.** FPTase 효소활성은 섬광근접법(scintillation proximity assay, SPA)으로 측정하였으며[Reiss 등, 1990b], FPTase 효소는 Reiss 등의 방법[Reiss 등, 1990a]에 따라 정제하였다. FPTase의 효소활성은 [<sup>3</sup>H]-farnesyl pyrophosphate로부터 Biotin-KKKSCTKCVM으로 [<sup>3</sup>H]-farnesyl이 전이되는 것을 측정하는 것으로 검증하였다. 즉 20  $\mu$ L tritium으로 치환된 <sup>3</sup>H-Farnesyl pyrophosphate(<sup>3</sup>H-FPP), 20  $\mu$ L biotin lamin B peptide, 10  $\mu$ L acetylshikonin, 10  $\mu$ L의 buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분 동안 진 배양한 후 40  $\mu$ L FPTase를 넣어주고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 150  $\mu$ L STOP/bead 시약을 넣어주어 반응을 종결시키고 30분간

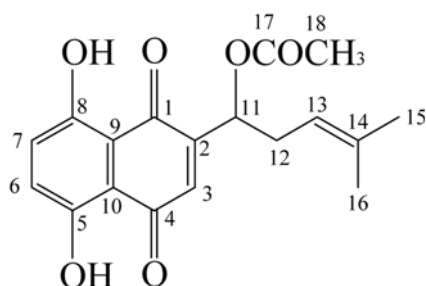


Fig. 1. Chemical structure of acetylshikonin from roots of *Lithospermum erythrorhizon*.

상온에서 방치한 후에 liquid scintillation counter로 반응정도를 측정하였다. 효소 억제도는 “[1-(Sample-Blank 2)/(Control-Blank 1)]×100”의 수식으로 계산하였다. 이때 Blank 1은 시료와 효소가 모두 없는 경우이고, Blank 2는 시료는 있고 효소가 없는 경우이고, Control은 시료는 없고 효소만 있는 경우이다. 이렇게 계산된 값들로부터 자료회귀(data regression)을 이용하여 acetylshikonin이 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 FPTase 저해활성을 측정하였다.

Compound 1의 성상은 적갈색의 색소 분말상이었으며, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR 결과와 EI/MS(positive ion mode *m/z* 330 [M]<sup>+</sup>)에 의해 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>인 것으로 추정되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서, δ 178.19(C-4), 176.68(C-1), 169.74(C-17)에서 총 3개의 carbonyl group carbon signal과 δ 167.45(C-5), 166.92(C-8)에서 총 2개의 hydroxylated aromatic carbon signal을 관찰할 수 있었다. 또 3개의 methyl carbon signal들이 각각 δ 25.74(C-16), 20.95(C-18), 17.92(C-15)에서 관측되었으며 이 signal들에 상응하는 methyl proton signal들을 각각 δ 1.75(1H, s, H-16), 2.20(1H, s, H-18), 1.67(1H, s, H-15)에서 관측하였다. 그외, <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 δ 7.05(1H, s, H-3), 7.24(2H, s, H-6, H-7)에서 aromatic group proton signal들을 관찰할 수 있었다. 또한, 1개의 olefinic methine proton signal과 1개의 oxygenated methine proton signal을 각각 δ 5.18(1H, m, H-13), 6.08(1H, m, H-11)에서 관찰할 수 있었다. 2개의 hydroxyl group proton signal은 각각 δ 12.64(1H, s, OH-8), 12.48(1H, s, OH-5)에서 관찰할 수 있었다. 이외 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMQC, HMBC spectra data를 면밀히 분석한 결과, compound 1은 naphthoquinone계 화합물인 acetylshikonin인 것으로 추정되었다. 또한 compound 1의 NMR 분석 데이터가 문헌치와도 일치하여[Hwang 등, 2000] 그 구조를 최종 acetylshikonin (Fig. 1)으로 결정하였다.

지치의 compound 1을 이용한 건강기능식품 소재 개발 가능성을 검토하기 위해 동맥경화증 개선효과와 새로운 타겟에 의한 항암효과를 평가하였다. 먼저 동맥경화증 개선효과를 평가하기 위해 Cu<sup>2+</sup>로 유도된 human LDL 산화억제 효과를 검증한 결과, 단일농도 20 µg/mL 처리에서 compound 1은 92%의 LDL 산화 저해도를 나타내었다(Table 1). 단일농도에서의 acetylshikonin의 우수한 항산화능을 1차 확인한 후, 강력한 항산화제인 probucol을 양성대조구로 하여 acetylshikonin(1)의 LDL 산화 저해를 농도별로 측정하여 비교한 결과, IC<sub>50</sub> 값이

Table 1. Inhibitory activity of acetylshikonin from roots of *L. erythrorhizon* on LDL-oxidation

Samples	Inhibition of LDL-oxidation (%)
Acetylshikonin	92

<sup>†</sup>Final conc. of acetylshikonin: 20 µg/mL.

Table 2. IC<sub>50</sub> values of acetylshikonin from roots of *L. erythrorhizon* on LDL-oxidation inhibition

Samples	IC <sub>50</sub> (µM)
Acetylshikonin	8.8
Probucol	5.7

Table 3. Inhibitory activity of acetylshikonin from roots of *L. erythrorhizon* on FPTase.

Samples	IC <sub>50</sub> (µM)
Acetylshikonin	23

8.8 µM로 측정되었다(Table 2). 최근, 고삼 뿌리에 함유된 isoxanthohumol을 비롯한 9종의 flavonoid 성분의 강력한 LDL 산화 저해효과가 보고된 바 있다[Jeong 등 2008]. 이들 flavonoid 성분의 LDL 산화 저해도 IC<sub>50</sub> 값이 6.3~26.9 µM 수준임을 감안할 때 acetylshikonin(1)은 천연물 수준에서는 상당히 우수한 LDL 산화 저해능으로 평가되었다. 또한, acetylshikonin(1)이 probucol의 IC<sub>50</sub> 값인 5.7 µM 보다는 LDL 산화 저해활성이 약간 떨어지는 수치를 보이고 있는데, probucol은 우수한 항산화제로서 지질농도를 낮추어 동맥경화성 심장질환의 발병 위험을 감소시키지만 동시에 혈청의 고밀도 지질단백질-콜레스테롤(HDL-cholesterol)의 농도수준도 낮추기 때문에 문제가 제기되고 있다. 반면에 지치의 뿌리는 전통적으로 식용, 약용으로 이용되었을 정도로 안전성이 높기 때문에[Lee 등, 1998], 지치의 주요 색소 성분인 acetylshikonin(1)은 보다 안전한 LDL 산화 저해제로서 개발이 가능할 것으로 예상되었고 동맥경화성 심장질환을 개선하거나 예방하는 효과가 클 것으로 기대되었다. 다만, 지치의 acetylshikonin에 대해서도 HDL-cholesterol의 농도변화에 미치는 영향에 대한 검토가 차후에 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

지치 뿌리에서 분리한 acetylshikonin(1)의 FPTase에 대한 저해 활성을 측정한 결과, Table 3에서와 같이 IC<sub>50</sub> 값이 23 µM (7.7 µg/mL)로서 우수한 저해능을 나타내었다. 황해쭈(*Artemisia argyi*)에서 분리한 arteminolide B(IC<sub>50</sub>=0.76 µM), C, D 등과 같은 천연물보다는 활성이 상대적으로 낮은 경향이었지만[Lee 등, 2002] 지치의 acetylshikonin의 FPTase에 대한 보고로는 처음이다. 한편, 하수오 뿌리에 함유된 노란색소인 anthraquinone 배당체 성분 physcion-8-O-β-D-glucopyranoside, emodin-8-O-β-D-glucopyranoside의 FPTase 저해활성이 IC<sub>50</sub>값으로 각각 46.3, 28.2 µg/mL로서 보고되기도 하였는데[Kwon 등, 2009], quinone계 구조를 가진 천연색소 성분들이 비교적 우수한 FPTase 저해활성을 나타내고 있어 구조-활성 상관성이 있을 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 이 부분에 대한 판단은 다양한 화합물 구조-활성 상관성에 대한 연구가 이루어져야 가능할 것이다.

본 연구의 결과로부터, 지치 색소는 동맥경화성 심장질환을 개선하거나 예방하는 효과 및 항암 활성이 우수하므로 이들 활성과 관련된 건강기능식품 소재로 개발이 가능할 것으로 기대되었다. 특히 식품 안전성과 기능성에 대한 요구도가 점차 높아지는 요즘, 지치 색소는 기능성 천연색소로서 그 가치가 새롭게 부각될 것으로 전망된다.

### 참고문헌

- Ahn BT, Lee SG, Lee SB, Lee ES, Kim JG, Bok SH, and Jeong TS (2001) Low-density lipoprotein-antioxidant constituents of *Saururus chinensis*. *J Nat Prod* **64**, 1562-1564.
- Bjorkhem I, Henriksson-Freyschuss A, Breuer O, Diczfalusy U, Berglund L, and Henriksson P (1991) The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* **11**, 15-22.
- Buege JA and Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**, 302-310.
- Chang YS, Kuo SC, Weng SH, Jan SC, Ko FN, and Teng CM (1993) Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchromoma*. *Planta Med* **59**, 401-404.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, and Jr. Keaney JF (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**, 408-416.
- Havel RJ, Eder HA, and Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**, 1345-1353.
- Hsu MF, Chang LC, Huang LJ, Kuo SC, Lee HY, Lu MC, and Wang JP (2009) The influence of acetylshikonin, a natural naphthoquinone, on the production of leukotriene B-4 and thromboxane A(2) in rat neutrophils. *Eur J Pharmacol* **607**, 234-243.
- Hwang SY, Hwang BY, Kang SS, Kim CM, Park JH, Bae KH, Son KH, Lee SH, Chang SY, Kan SJ, Ro JS, and Lee KS (2000) Isolation and quantitative analysis of acetylshikonin from *Lithospermi Radix*. *Kor J Pharmacogn* **31**, 295-299.
- Jeong TS, Kim JR, Kim KS, Cho KH, Bae KH, and Lee WS (2004) Inhibitory effects of multi-substituted benzylidenehydrazolidine-2,4-diones on LDL oxidation. *Bioorg Med Chem* **12**, 4017-4023.
- Jeong TS, Ryu YB, Kim HY, Curtis-Long MJ, An SJ, Lee JH, Lee WS, and Park KH (2008) Low density lipoprotein (LDL)-antioxidant flavonoids from roots of *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull* **31**, 2097-2102.
- Kwon BM, Kim SH, Baek NI, Lee SI, Kim EJ, Yang JH, Chae BS, Lee JH, Park HW, Park JS, and Kim DK (2009) Farnesyl protein transferase inhibitory components of *Polygonum multiflorum*. *Arch Pharm Res* **32**, 495-499.
- Lee HJ, Lee HJ, Magesh V, Nam DW, Lee EO, Ahn KS, Jung MH, Ahn KS, Kim DK, Kim JY, and Kim SH (2008) Shikonin, acetylshikonin, and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma-bearing mice *Yakugaku Zasshi* **128**, 1681-1688.
- Lee SH, Kim HK, Seo JM, Kang HM, Kim JH, Son KH, Lee HS, and Kwon BM (2002) Arteminolides B, C, and D, new inhibitors of farnesyl protein transferase from *Artemisia argyi*. *J Org Chem* **67**, 7670-7675.
- Lee KS, Ahn DK, Shin MK, Kim CM *et al.* (1998) In *The Encyclopedia of Oriental Herbal Medicine*, pp. 4657-4663, *Jungdam Publishing Co.*, Seoul, Korea.
- Leonard DM (1997) Ras farnesyltransferase: A new therapeutic target. *J Med Chem* **40**, 2971-2990.
- Mashima R, Witting PK, and Stecker R (2001) Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **12**, 411-418.
- Nagnao Y, Nakamura T, Matsuzawa Y, Cho M, Ueda Y, and Kita T (1992) Probucol and atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit: long-term antiatherogenic effect and effects on established plaques. *Atherosclerosis* **92**, 131-140.
- Omer CA, Chen Z, Diehl RE, Conner MW, Chen HY, Trumbauer ME, Gopal-Truter S, Seeburger G, Bhimnathwala H, Abrams MT, Davide JP, Ellis MS, Gibbs JB, Greenberg I, Hamilton K, Koblan KS, Kral AM, Liu D, Lobell RB, Miller PJ, Mosser SD, O'Neill TJ, Rands E, Schaber MD, Senderak ET, Oliff A, and Kohl NE (2000) Mouse mammary tumor virus-Ki-rasB transgenic mice develop mammary carcinomas that can be growth-inhibited by a farnesyl:protein transferase inhibitor. *Cancer Res* **60**, 2680-2688.
- Pompliano DL, Rands E, Schaber MD, Mosser SD, Anthony NJ, and Gibbs JB (1992) Steady-state kinetic mechanism of ras farnesyl:protein transferase. *Biochemistry* **31**, 3800-3807.
- Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, and Brown MS (1990a) Inhibition of purified p21<sup>ras</sup> farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* **62**, 81-88.
- Reiss Y, Seabra MC, Goldstein JL, and Brown MS (1990b) Purification of ras farnesyl:protein transferase. *Methods: Companion Methods Enzymol* **1**, 241-245.
- Sankawa U, Ebizuka Y, Miyazaki T, Isomura Y, and Otsuka H (1977) Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem Pharm Bull* **25**, 1392-1395.
- Sankawa U, Otsuka H, Kataoka Y, Iitaka Y, Hoshi A, and Kureitani K (1981) Antitumor activity of shikonin and its derivatives. II. X-ray analysis of cyclo-alkannin leucoacetate, tautomerism of alkannin and cyclo-alkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chem Pharm Bull* **29**, 116-122.
- Sekine T, Masumizu T, Maitani Y, and Nagai T (1998) Evaluation of superoxide anion radical scavenging activity of shikonin by electron spin resonance. *Int J Pharm* **174**, 133-139.
- Sharma N, Sharma UK, Gupta AP, Devla, Sinha AK, Lal B, and Ahuja PS (2009) Simultaneous densitometric determination of shikonin, acetylshikonin, and beta-acetoxyisovalerylshikonin in ultrasonic-assisted extracts of four *Arnebia* species using reversed-phase thin layer chromatography. *J Sep Sci* **32**, 3239-3245.
- Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, and Yang NS (2004) Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter *in vivo*. *J Biol Chem* **279**, 5877-5885.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, and Witztum JL (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**, 915-924.
- Tabata M, Tsukada M, and Fukui H (1982) Antimicrobial activity of quinone derivatives from *Echium lycopsis* callus cultures.

- Planta Med* **44**, 234-236.
- Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, and Tabata M (1986) A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin *J Nat Prod* **49**, 466-469.
- Weng XC, Xiang GQ, Jiang AL, Liu YP, Wu LL, Dong XW, and Duan S (2000) Antioxidant properties of components extracted from puccoon (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.). *Food Chem* **69**, 143-146.