

인체 흑색종 세포주 SK-MEL-1에 대한 인삼 panaxynol의 항증식 효과 기전

조홍근 · 유수진* · 노주영** · 하영미 · 황우익 · 손정원#

고려대학교 의과대학 생화학 교실, *고려대학교 생명공학원,

**한림대학교 의과대학 피부과학교실

(1999년 8월 9일 접수)

Molecular Mechanism of the Antiproliferative Effect by Ginseng Panaxynol on a Human Malignant Melanoma Cell Line, SK-MEL-1

Hongkeun Cho, Su-Jin Yu*, Joo Young Roh**, Woo-Ik Hwang and Jeongwon Sohn

Department of Biochemistry, Korea University College of Medicine, Seoul 136-705, Korea

*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea

**Department of Dermatology, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Gangwon Do, Korea

(Received August 9, 1999)

Abstract : In this study, the molecular mechanism of the growth inhibitory effect of panaxynol was investigated in a human malignant melanoma cell line, SK-MEL-1. In the cell cycle analysis, panaxynol arrested cell cycle progression of SK-MEL-1 at the G1 phase. Immunoblot analysis demonstrated that panaxynol increased p21^{WAF1} and decreased cdc2 expression. Protein levels of p16, p27, E2F-1, Rb, and p53 were not changed. Thus, the changes in expression levels of p21^{WAF1} and cdc2 apparently mediate the cell cycle arrest caused by panaxynol. In addition, cycloheximide (CHX) partially reversed the growth inhibition by panaxynol, which suggested that new protein synthesis was required. On the other hand, LLnL, a proteasome inhibitor, increased antiproliferative effect of panaxynol. This may be due to stabilization of the protein(s) responsible for the growth inhibition such as p21^{WAF1}. In summary, these results demonstrate that panaxynol inhibits proliferation of SK-MEL-1 by inducing cell cycle arrest at the G1 phase and the inhibitory effect is mediated by the increased level of p21^{WAF1} as well as decreased cdc2 expression.

Key words : Panax ginseng, panaxynol, p21^{WAF1}, cdc2, cell cycle, cycloheximide, N-acetyl-L-leucinyl-norleucinal

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Mayer)은 수천년간 강장제로 한방에서 널리 사용되어 왔으며, 항암효과를 포함한 다양한 약효를 가지는 것으로 알려져 있다.^{1,4)} 인삼 성분 중 ginsenoside에 의한 항암효과로는 생쥐에서 흑색종 세포주에 의한 폐전이나 암종의 혈관 신생을 억

제하고⁴⁾ cisplatin 보다 더 유의하게 인체 난소 암종 세포주의 성장을 억제시킨다는 보고가 있다.⁵⁾ 인삼 지용성 성분에 의한 항암효과로는 1970년대에 인삼의 석유에텔 추출물이 백혈병, 대장암, 간암 등의 암세포주 성장을 억제시킨다는 것이 처음 보고되었으며,^{6,7)} 그 후 인체 위장관암, 전립선암 등의 암세포주에 대해서도 항암효과가 보고되었다.⁸⁻¹²⁾ 인삼 지용성 성분 중 항암작용을 나타내는 주요 성분으로는 panaxynol(heptadeca-1,9-dien-4,6-diy-3-ol), panaxydol(heptadeca-1-en-4,6-diy-9,10-epoxy-3-ol), panaxytriol(heptadeca-1-en-4,6-diy-

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-920-6192; (팩스) 02-923-0480
(E-mail) biojs@kucncx.korea.ac.kr

nitrocellulose(NC)막에 electrotransfer하고, NC막을 차단완충액{5% skim milk를 포함한 TBS-T(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)}에 담그고 실온에서 1시간 두었다. 차단완충액에 희석한 1차 항체 용액을 넣고 다시 실온에서 1시간 흔들며 반응시켰다. 막을 TBS-T에 10분씩 3번 씻은 후 horse radish peroxidase(HRP)가 붙은 2차 항체(anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG)용액에 넣고, 1차 항체 때와 같이 처리한 후 TBS에 씻었다. 이 NC막에 chemiluminescence 기질 용액(ECL, Amersham)을 더하여 반응시키고 X선 필름에 노출시킨 후, 현상하였다.

5. 세포증식분석

SK-MEL-1 세포를 96 well 배양판에 1×10^4 /well로 분주하고 actinomycin D(Act D), CHX, N-acetyl-L-leucyl-norleucinal(LLnL)을 농도별로 1시간동안 처리한 후 panaxynol을 10 ug/ml로 더해주고 18시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. [³H]thymidine을 1 Ci/well로 더해주고 6 시간 더 배양한 다음 반자동 세포 수확기로 유리섬유 filter에 수확하여 DNA에 포함된 [³H]thymidine의 양을 β-scintillation counter로 측정하였다. 암세포의 성장억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{growth inhibition rate (\%)} = [1 - (\text{cpm of treated cells} / \text{cpm of control cells})] \times 100$$

결 과

1. Panaxynol이 세포주기에 미치는 효과

Panaxynol이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기와 SK-MEL-1에 panaxynol을 농도별로 각각 24시간 동안 처리하여 세포주기를 분석한 결과, 처리한 panaxynol의 농도가 증가함에 따라 G1 단계 세포가 증가하고, S 단계 세포가 감소하는 것이 관찰되었다(Table 1). SK-MEL-1을 panaxynol로 처리하였을 때, G1 단계 세포가 증가하고 S 단계 세포가 감소하는 것은, panaxynol이 세포주기의 G1-S 단계 이행을 억제함을 보여 주는 것이다. G2+M 단계의 세포비는 panaxynol의 농도증가에 따라 증가하는 경향이 있었으나 변화하는 양상이 일정하지 않았다(Table 1).

2. Panaxynol이 세포주기 조절인자들의 발현에 미치는 영향

Panaxynol 처리에 의해 일어나는 세포주기 조절인자

Table 1. Effect of panaxynol on the cell cycle distribution of SK-MEL-1

panaxynol (μg/ml)	Cell cycle distribution (%)		
	G1	S	G2+M
0	65.71	21.91	12.38
5	73.03	22.89	4.09
10	84.13	8.61	7.26
20	81.89	4.57	13.53

Cells were treated with 5, 10, and 20 mg/ml of panaxynol for 4 hours and harvested. Cells were prepared for cell cycle analysis as described in 'Materials and Methods'

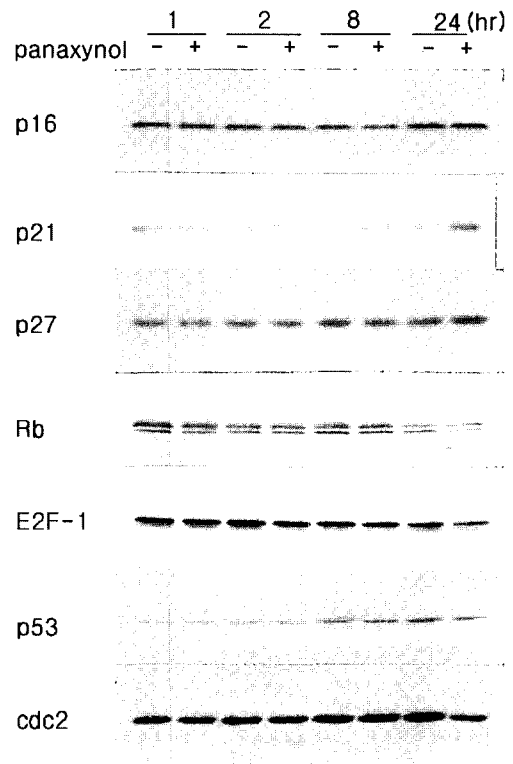


Fig. 2. Effect of panaxynol on expression of cell cycle regulators in SK-MEL-1. Cells were treated with 10 μg/ml of panaxynol or vehicle alone and harvested at the indicated time intervals for Western blot analysis.

들의 발현을 알아보기 위해 SK-MEL-1에 panaxynol을 시간별로 처리하여 immunoblot 분석을 시행하였다. 음성 세포주기 조절인자들로 알려진 p16^{INK4a}, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}의 발현양상을 살펴본 결과, p21의 경우에는 8시간까지 변화가 없었으나, 24시간에는 발현의 증가가 나타났다. 암억제 단백질인 p53은 발현변화를 보이지 않았으므로, panaxynol의 처리에 따른 p21의 발현증가는

p53에 무관한 경로를 통한 것으로 보인다. p16과 p27의 발현도 panaxynol 처리 시간에 따른 변화가 없었다 (Fig. 2).

탈인산화형태의 retinoblastoma(Rb) 단백질은 S기의 개시에 필요한 E2F와 결합하여 세포주기의 G1-S 단계 진행을 억제하는 것으로 알려져 있는데,^{20,21)} SK-MEL-1에 panaxynol을 처리하였을 때는 Rb의 발현이나 인산화에 변화를 보이지 않았다. 또한

Rb에 의해 음성적으로 조절받는 E2F-1도 변화가 없었다(Fig. 2). 따라서 세포주기 조절의 p16-cyclin D/Cdk4-Rb-E2F-1 경로는 panaxynol에 의해 변화를 보이지 않는 것으로 생각된다.

세포주기의 G2+M 진행에 필요한 mitosis 활성화로 알려진 cdc2의 발현은 panaxynol 처리 후 8시간까지는 변화를 보이지 않았으나, 24시간에는 발현이 감소되었다(Fig. 2).

3. 단백질 및 RNA 합성 억제제와 proteasome 억제제가 panaxynol의 항암효과에 미치는 영향

Panaxynol에 의한 항암효과에 새로운 유전자의 전사나 새로운 단백질의 합성이 필요한지를 알아보기로 RNA 합성 억제제인 Act D와 단백질 합성 억제제인 CHX를 각각 농도별로 panaxynol과 함께 처리하여 세포증식정도를 관찰하였다. SK-MEL-1에 CHX를 전처

리하고 panaxynol을 더하여 주었을 경우, 대조군에 비해 성장이 29% 억제되었다(Fig. 3). 이것은 같은 농도의 panaxynol만을 처리하였을 때 38%의 성장억제 효과가 나타나고, CHX만 처리하였을 때에도 성장이 21% 억제된 것과 비교할 때, CHX가 panaxynol의 성장억제효과를 저지한다는 것을 의미한다. 따라서 이 결과는 panaxynol이 SK-MEL-1에서 성장억제효과를 나타내기 위해서는 새로운 단백질 합성의 유도가 필요하다는 것을 보여주고 있다.

한편 Act D는 panaxynol의 세포증식억제 효과에 영향을 미치지 못하였다(Table 2). 그러나 이 결과에서는 Act D 자체의 세포에 대한 독성이 지나치게 높아 결과를 해석하기에 어려움이 있었으며, Act D 자체의 독성을 줄이기 위하여 그 농도를 1 ng/ml 이하로 처리하였을 때에도 역시 panaxynol에 의한 성장억제를 저지시키지 못하였다(성적은 생략). 이러한 결과를 종합하여 볼 때, panaxynol은 새로운 단백질 합성을 유도하여 증식억제 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

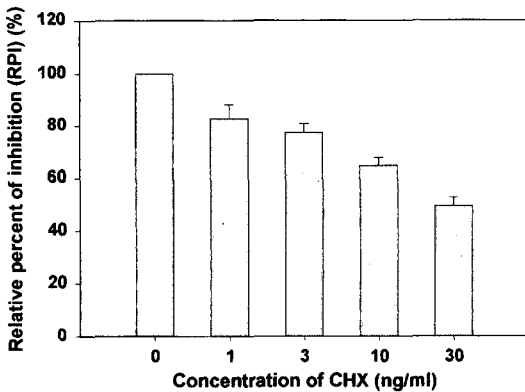


Fig. 3. Effect of CHX on the growth inhibition by panaxynol. Cells were pretreated with 1, 3, 10, and 30 ng/ml of CHX for 1 hour and then incubated with 5 µg/ml of panaxynol for 18 hours. After addition of [³H]thymidine, cells were incubated for 6 hours and harvested. [³H]thymidine incorporation was measured by β-scintillation counting.
inhibition by panaxynol and CHX
RPI (relative percentage of inhibition)
inhibition by panaxynol + inhibition by CHX

Table 2. Effect of actinomycin D on the growth inhibition by panaxynol

panaxynol (µg/ml)	actinomycin D (ng/ml)	growth inhibition (%)
0	1	42
	3	92
5	0	38
	1	45
	3	90

Cells were pretreated with 1 and 3 ng/ml of actinomycin D for 1 hour and then incubated with 5 µg/ml of panaxynol for 18 hours. After adding [³H]thymidine, cells were incubated for 6 hours and harvested. [³H]thymidine incorporation was measured by β-scintillation counting.

Table 3. Effect of LLnL on the growth inhibition by panaxynol

panaxynol (µg/ml)	LLnL (mM)	growth inhibition (%)
0	2	-25
	3	-34
10	0	46
	2	42
	3	64

Cells were pretreated with 2 and 3 mM of LLnL for 1 hour and then incubated with 10 µg/ml of panaxynol for 18 hours. After adding [³H]thymidine, cells were incubated for 6 hours and harvested. [³H]thymidine incorporation was measured by β-scintillation counting.

세포의 성장에 관련된 인산화 단백질이나 많은 세포 주기 조절 단백질들은 proteasome 경로를 통해 분해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 여기에서는 proteasome 억제제인 N-acetyl-L-leucynyl-norleucinal(LLnL)을 사용하여 이러한 단백질의 분해를 차단하였을 때 panaxynol의 성장억제효과에 미치는 영향을 조사하였다. 세포에 LLnL만을 처리하였을 때는 세포증식이 25~34% 증가한 반면 panaxynol과 LLnL을 함께 처리하였을 때는 각각 42~64% 세포증식이 억제되었다(Table 3). panaxynol만을 처리했을 때 세포증식이 46% 억제되었고 LLnL만은 세포증식을 증가시키므로, 이는 LLnL이 panaxynol의 세포성장억제 효과를 증가시킨다는 것을 보여주는 결과이다. p21은 ubiquitin-proteasome 경로를 통하여 분해되는 것으로 알려져 있고, panaxynol에 의하여 발현이 증가되므로, LLnL과 panaxynol을 같이 처리하였을 때 LLnL이 p21의 분해를 억제함으로써 panaxynol에 의한 성장억제 효과를 증폭시켰을 것으로 생각된다. LLnL만을 처리하였을 때 보인 세포성장 증가 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 그러나 세포의 증식신호를 주는 인산화 단백질이 정상적으로는 빠르게 ubiquitination되어 proteasome 경로에 의해 분해되므로, LLnL이 이러한 단백질들의 축적을 우선적으로 유도하였을 가능성이 있다.

고 찰

항암 약제들은 암세포의 세포주기 진행을 조절함으로써 세포의 성장을 억제시킨다. 예를 들어 TGF- β 는 흑색종 세포에서 G1 단계세포를 증가시키고, S 단계와 G2+M 단계의 세포는 감소시킨다. 즉, 세포주기의 G1-S 이행을 막음으로써 세포의 증식을 억제시킨다.²²⁾ 또한 IL-4에 의해 신장암 세포의 증식이 억제되는 경우에도 G1 단계 세포가 증가되는 것이 보고되었다.²³⁾

인삼의 석유에텔 추출물인 GX-PE는 인체 신장암 세포주와 인체 흑색종 세포주에서 각각 G1-S 이행단계를 억제시킴으로써 세포의 증식을 억제시킨다고 보고된 바 있다.^{18,24)} 그러나 GX-PE에는 여러 가지 성분이 포함되어 있어 그 작용기전을 추궁하기에는 부적합하므로, 이 실험에서는 GX-PE의 성분 중 세포독성을 나타내는 polyacetylene계 알콜 성분의 하나인 panaxynol을 정제하여 세포 주기에 미치는 효과를 검토하고 그 기전을 추궁하였다. SK-MEL-1에 24시간동안 panaxynol을 처

리하여 세포주기를 분석한 결과, 농도에 비례하여 G1 단계 세포가 증가하고 S 단계 세포가 감소하는 것이 관찰되었다. G2+M 단계의 세포비도 panaxynol의 농도가 높아지면서 증가하는 양상을 보였으나(Table 1), 저농도의 panaxynol을 처리하였을 때에는 처리하지 않은 경우보다 G2+M 세포비가 뚜렷이 감소하여 G2+M 단계의 진행에 미치는 영향은 분명치 않다. 따라서 panaxynol은 SK-MEL-1에서 G1 단계 세포비의 증가와 S 단계 세포비의 감소를 유도하였으며, 이는 panaxynol이 세포주기 진행을 G1 단계에서 억제한다는 것을 보여주고 있다.

세포주기의 진행은 주로 세포주기 각 단계에 특이한 cyclin-dependent kinases(CDKs)의 활성에 의해 이루어진다.²⁵⁾ Cdk에는 cdc2, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk5, Cdk6등이 알려져 있고, 이들은 cyclin과 결합되었을 때 활성화된다. 이 중 Cdk4나 Cdk6는 cyclin D와 결합하여 G1 초기 단계에서 작용하고, Cdk2는 cyclin E와 결합하여 G1에서 S로 진행되는 시기에 작용한다. 또한 Cdk2는 S기에는 cyclin A와 결합하여 활성화된다. Cdk는 cyclin과의 결합에 의해 조절받는 것 이외에도 Cdk activating kinase(CAK)에 의한 인산화에 의해서도 조절을 받는다.²⁶⁾ 또한 세포주기 음성조절자로서 Cdk의 활성을 억제하는 Cdk 억제자(CKI)가 있는데, CKI는 크게 p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}를 포함하는 군과 p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}를 포함하는 군으로 나눌 수 있다.²⁷⁾ p16이 속한 군은 특이적으로 cyclin D-Cdk4 또는 cyclin D-Cdk6의 활성을 저해하고, p27은 cyclin E-Cdk2 또는 cyclin D-Cdk4 복합체를, p21은 대부분의 Cdk를 억제한다고 알려져 있다.²⁷⁾ 이러한 CKI와의 결합에 의해 Cdk의 활성이 억제되면, 각각의 Cdk에 의해 진행이 촉진되는 세포주기 단계가 억제될 수 있다.

세포주기 분석에서 panaxynol이 세포 주기의 G1 단계 진행을 억제하였기 때문에, panaxynol이 Cdk 억제 인자의 발현을 변화시키는 지를 알아보고자 immunoblot 분석을 시행하였다. panaxynol은 SK-MEL-1에서 처리 후 24시간에 p21의 발현을 증가시켰으나 p16과 p27의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2). 따라서 panaxynol이 p21의 발현을 증가시켜 세포주기의 G1 단계 진행을 억제시킴으로써, SK-MEL-1 세포의 성장을 억제시킨 것으로 생각할 수 있다. 이 연구에서는 Cdk2의 활성을 직접 조사하지 않았으나, GX-PE를 이용한

이전의 실험결과에서 GX-PE는 SK-MEL-1에서 Cdk2의 활성을 억제하였다(not published). 따라서 panaxynol에 의한 p21의 발현 증가도 Cdk2의 활성 억제를 유도하였을 것으로 추측할 수 있다.

p53은 포유동물의 주요 암 억제 단백질로서²⁹⁾ DNA 손상과 같은 유전자 독성을 일으키는 자극에 반응하여 발현이 증가되고 이에 따라 G1 정지나 세포괴사를 유도한다고 보고되어 있다.^{30,31)} 유전자독성을 일으키는 자극에 의한 G1 정지는 p53이 cyclin B-cdc2 또는 cyclin A-Cdk2에 의해 인산화되어 p21의 전사를 촉진 시킴으로써 유발된다고 하며, 이는 DNA가 손상된 세포의 계속적인 분열을 차단하는 효과를 가진다. 이렇게 p21의 발현은 'p53 의존성 경로'에 의해서 조절될 수 있으나, 이와는 무관한 'p53 비의존성 경로'에 의해서도 조절된다는 것이 알려져 있다. p53 의존성 경로에 대한 예로는 이온 방사선(ionizing radiation)에 의해 DNA가 손상될 때, p53의 발현증가와 더불어 p21의 발현이 증가되는 것이 알려져 있다.³²⁾ Li-Fraumeni 증후군 환자에서 얻은 p53이 없는 세포에서는 p21이 발현되지 않는다는 보고도 있다.³³⁾ p53 비의존성 경로에 대한 예로서 발생기에 있거나 성장한 생쥐에서 p21의 발현 조절은 p53의 발현과 무관하다는 보고가 있다.³⁴⁾ 또한 TGF- β 처리에 의해 p53이 증가하지 않고 p21이 증가한 경우도 보고되었다.³⁵⁾

본 연구 결과에서는 panaxynol을 처리하였을 때, p21의 발현 증가가 관찰되었으나 p53의 발현에는 변화가 없었으므로(Fig. 2), SK-MEL-1에서 panaxynol은 p53과는 무관하게 p21의 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있다. 그러나 p21의 발현증가가 비교적 늦게 나타나고 증가의 정도가 크지 않아, 실제로 panaxynol의 효과가 전적으로 p21의 발현증가를 통해 일어나는 것은 아닐 가능성이 있다.

cdc2는 mitosis 단계에서 특이적으로 활성화되는 것으로 보고되었다.³⁶⁾ cdc2는 cyclin A와 결합하여 G2 단계에서 작용하며 cyclin B와 결합하여 cdc2-cyclin B 복합체로서 mitosis 단계를 조절한다.³⁷⁾ cdc2는 티로신 15와 트레오닌 161의 인산화 상태에 의해 활성이 조절되는데, 티로신 15가 cdc25c에 의해 탈인산화되면 cdc2의 활성화가 유도되고, Wee1/Mik1 단백질 키나제에 의해서 티로신 15가 인산화되면 cdc2가 불활성화된 다. 반대로 cdc2의 트레오닌 161이 Cdk7을 촉매부위로 하는 cdc2-activating kinase(CAK)에 의해 인산화되면,

cdc2가 활성화된다. Yolanda등³⁸⁾은 DNA가 손상되면 Chk1이 cdc25c를 인산화시켜 14-3-3과 결합하게 함으로써 cdc25c의 활성을 억제하고, 따라서 cdc2-cyclin B 복합체가 활성화되지 못하여 mitosis로의 진행이 억제된다는 것을 보고하였다. 그러나 최근의 논문에 따르면 cdc2가 G2+M 단계 뿐 아니라 G1 단계의 진행에도 영향을 미친다고 한다.²⁸⁾ cdc2는 단백질 발현변화 없이 활성이 조절되는 cdk2와는 달리 흔히 단백질 발현 변화가 관찰되므로 panaxynol 처리시 cdc2의 발현이 변화하는지를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 cdc2의 단백질 발현은 panaxynol 처리 후 24시간에 감소하여, panaxynol에 의한 세포주기 정지에 cdc2가 관여할 가능성을 보여준다.

Panaxynol의 암세포에 대한 성장억제 효과가 새로운 전사 또는 해독과정에 의해 발현이 유도되는 단백질 인자에 의해 매개되는지를 알아보기 위해, CHX와 ActD가 panaxynol의 항증식효과에 영향을 미치는지를 조사하였다. CHX는 mRNA상에서 리보솜의 이동(translocation)을 방해함으로써 단백질 합성을 억제한다고 알려져 있고, Act D는 DNA에 끼어들어가 RNA polymerase의 이동을 물리적으로 막음으로써 RNA 합성을 저해한다고 알려져 있다.^{39,41)} 이 실험에서는 CHX를 전처리한 후 panaxynol을 더해 주었을 때, panaxynol만 처리하였을 때에 비하여 세포성장억제 효과가 감소된 것을 관찰하였다(Fig. 3). Act D를 처리한 경우에는 panaxynol만 처리한 것과 비교해서 panaxynol의 항암효과가 감소되지 않았다(Table 2). 그러나 Act D 자체의 세포독성 때문에 결과의 해석이 어려워 panaxynol의 성장억제 효과에 새로운 유전자의 전사가 필요한지에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 것으로 생각된다. 어떤 경우라도 panaxynol의 항암효과에는 전사단계의 조절에 의한 것이든 또는 해독 단계의 조절에 의한 것이든 p21과 같은 새로운 단백질의 발현유도가 필요한 것으로 보인다. CHX를 처리해 주고 panaxynol에 의한 p21의 발현증가 효과가 없어지는지를 조사한다면 panaxynol에 의한 성장억제 효과에서 p21의 중요성을 확인할 수 있을 것이다.

Proteasome은 ubiquitination된 단백질을 ATP에 의존하여 분해시키는 기구로서, 단백질 분해에 관여하는 20S proteasome과 기질특이성과 조절에 관여하는 두 개의 19S complex로 이루어져 있다. 알려진 proteasome 억제제로는 MG132, MG115, LLnL, PSI와 같

은 peptide aldehyde, lactacystin, β -lactone, vinylsulfone이 있으며, 이들의 작용기전도 알려져 있다.⁴²⁾ 20S proteasome은 β 부위 트레오닌 잔기의 hydroxyl기를 이용하여 펩티드 결합을 공격함으로써 단백질을 분해시키는데, LLnL은 20S proteasome β 부위의 트레오닌 hydroxyl기와 hemiacetyl 복합체를 형성함으로써 20S proteasome의 분해작용을 억제한다.^{43,44)}

세포의 성장과 대사에 중요한 여러 단백질들은 짧은 반감기를 가지고 proteasome에 의해 분해되며, 이들은 proteasome 억제제를 사용하였을 때 안정화된다. NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합하여 불활성화 되어 있다가, NF- κ B를 활성화시키는 자극에 의하여 I κ B가 인산화 및 ubiquitination되고 이에 따라 proteasome에서 분해되면, NF- κ B는 세포질에서 핵안으로 이동해 들어가 여러 유전자의 전사를 일으키게 된다. 이러한 I κ B의 분해과정은 proteasome 억제제에 의해 저해되며, 그 결과 proteasome 억제제를 처리하였을 때 NF- κ B의 활성화에 의한 세포의 생존증가 효과가 저지된다는 보고가 있다.⁴⁵⁾ 본 연구에서 LLnL을 panaxynol과 함께 처리하여 세포증식을 분석한 결과, LLnL만을 처리했을 때는 농도가 높아짐에 따라 세포증식이 증가하였으나, panaxynol과 함께 처리하였을 때는 panaxynol을 단독으로 처리했을 때보다 세포증식 억제 정도가 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Table 3). 현재로서는 LLnL이 어떤 단백질의 분해를 억제하여 panaxynol에 의한 세포증식억제 효과를 증가시키는지는 알 수 없으나, p21이나 다른 Cdk 억제제들의 분해를 막는 것이 그 기전이 될 수 있다.

요 약

본 연구는 인삼 panaxynol이 인체 흑색종 세포주 SK-MEL-1에 미치는 항증식효과의 분자적 기전을 알아보고자, 세포주기와 세포주기 조절인자들의 발현변화, 단백질 합성 억제제와 proteasome 억제제가 panaxynol의 항암효과에 미치는 영향을 조사하였다.

panaxynol은 세포주기의 G1 단계 진행을 억제시켰으며, 동시에 p21^{WAF1}의 발현 증가와 cdc2의 발현 감소를 유발하였다. 이에 비해 p16, p27, E2F-1, Rb, p53의 발현에는 변화가 없었다. 이 결과는 panaxynol이 SK-MEL-1 세포에서 p21^{WAF1}의 발현을 증가시키고 cdc2의 발현을 감소시켜, 세포주기의 G1-S 이행 단계

를 억제한다는 것을 보여준다. 또한 CHX는 panaxynol의 항암효과를 감소시키고, LLnL은 panaxynol의 항암효과를 증가시켰는데, 이는 panaxynol에 의한 SK-MEL-1 세포의 증식억제에 새로운 단백질 합성이 필요하며, LLnL이 panaxynol에 의한 세포증식억제를 매개하는 p21^{WAF1}등의 단백질 분해를 저해시키기 때문인 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 한국담배인삼공사의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Noh, Y. H., Lim, G. R. and Koo, J. H. : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 241-247 (1996).
2. Lee, S. D., Hwang, W. I. and Okuda H. : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 248-255 (1996).
3. Oura, H., Nakashima, S., TsuKada, T. and Ohita, Y. : *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980-986 (1972).
4. Sato, K., Mochizuki, M., Saiki, I. and Yoo, Y. C., Samukawa, K., Azuma, I. : *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 635-639 (1994).
5. Tode, T., Kikuchi, Y., Hirata, J. and Imaizumi, E., Nagata, I. : *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120**, 24-26 (1993).
6. Hwang, W. I. and Cha, S. M. : *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.* 43-49 (1978).
7. Lee, S. H. and Hwang, W. I. : *J. Ginseng Sci.* **10**, 141-150 (1986).
8. Hwang, W. I. : *Korean J. Ginseng Sci.* **17**, 52-60 (1993).
9. Yamamoto, H., Katano, M. and Matsunaga, H. : *Proceedings of international symposium on Korean red ginseng, the society for Korean red ginseng, Seoul, Korea* (1990).
10. Saita, T., Matsunaga, H., Yamamoto, H., Nagumo, F., Fujito, H., Mori, M. and Katano, M. : *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 798-802 (1994).
11. Fujimoto, Y., Satoh, M., Takeuchi, N. and Kirisawa, M. : *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 521-523 (1991).
12. Hwang, W. I. and Sohn, J. : *J. Ginseng Sci.* **17**, 196-202 (1993).
13. Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M. and Takata, K. : *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3480-3482 (1990).
14. Matsunaga, H., Katano, M., Saita, T., Yamamoto, H. and

- Mori, M. : *Cancer Chemother. Pharmacol.* **33**, 291-297 (1994).
15. Matsunaga, H., Saita, T., Nagumo, F., Mori, M. and Katano, M. : *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**, 291-296 (1995).
16. Park, M. K. and Hwang, W. I. : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 219-225 (1996).
17. Cantrell, R. W. In: Fee, Goepert, Johns, Strong, Ward. : *Head & Neck Cancer.* vol 2. Philadelphia: B.C. Decker Inc, 203-206 (1990).
18. Kim, H. J., Rho, J. Y., Choi, J. O, Park, S. H., Kim, I. S., Sohn, J. and Ryu, C. K. : *J. Korean Cancer Assoc.* **29**, 965-976 (1997).
19. Laemmli, U. K. : *Nature* **227**, 680-685 (1970).
20. Weinberg, R. A. : *Cell* **81**, 323-330 (1995).
21. Sherr, C. J. : *Science* **274**, 1672-1677 (1996).
22. Rodeck, Melber, K., Kath, R., Menssen, H. D., Varello, M., Atkinson, B. and Herlyn, M. : *J. Invest. Dermatol.* **97**, 20-26 (1991).
23. Morisaki, T., Uchiyama, A., Yuzuki, D., Essner, R., Morton, D. L. and Hoon, D. S. B. : *Cancer Res.* **54**, 1113-1118 (1994).
24. Sohn, J., Lee, C. H., Chung, D. J., Park, S. H., Kim, I. S. and Hwang, W. I. : *Exp. Mol. Med.* **30**, 47-51 (1998).
25. Sherr, C. J. : *Cell* **79**, 551-555 (1994).
26. Fisher, R. P. and Morgan, D. O. : *Cell* **78**, 713-724 (1994).
27. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. : *Genes Dev.* **9**, 1149-1163 (1995).
28. Liu J. H., Wei S, Burnette P. K., Gamero A. M., Hutton M., Djeu J. Y. : *Oncogene* **18**, 269-75 (1999).
29. Cox, L. S. and Lane, D. P. : *Bioessays* **17**, 501-508 (1995).
30. Yin, Y., Tainsky, M. A., Bischoff, F. Z., Strong, L. C. and Wahl, G. M. : *Cell* **70**, 937-948 (1992).
31. Lowe, S. W., Schmitt, S. W., Smith, B. A., Osborne, B. A. and Jacks, T. : *Nature* **362**, 847-849 (1993).
32. El-deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. : *Cell* **75**, 817-825 (1993).
33. Xiong, Y., Zhang, Y. and Beach, D. : *Genes Dev.* **7**, 1572-1583 (1993).
34. Kay, F. M., Nicole, S., Greg, H., David, B., Takashi, T., Kenneth, K., Bert, V. and Tyler, J. : *Genes Dev.* **9**, 935-944 (1995).
35. Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. and Wang, X. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5545-5549 (1995).
36. Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D. and Beach, D. : *Cell* **57**, 393 (1989).
37. Pagano, M., Peoerokok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. : *EMBO J.* **11**, 761 (1992).
38. Yolanda, S., Calvin, W., Richard, S. T., Ron, R., Zhiqi, W., Helen, P. W. and Stephen, J. E. : *Science* **277**, 1497-1501 (1997).
39. Jimenez, A. : *Trends Biochem. Sci.* **1**, 28-30 (1988).
40. Lord, J. M., Hartely, M. R. and Roberts, L. M. : *Semin. Cell Biol.* **2**, 15-22 (1991).
41. Perentesis, J. P., Miller, S. P. and Bodley, J. W. : *Biofactors* **3**, 173-184 (1992).
42. Lee, D. H. and Alfred, L. G. : *Trends Cell Biol.* **8**, 397-403 (1998).
43. Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Hurber, R. : *Science* **268**, 533-539 (1995).
44. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Hurber, R. : *Nature* **386**, 463-471 (1997).
45. Vito, J. P., Oliver, J. R., Alfred, L. G. and Tom, M. : *Cell* **78**, 773-785 (1994).