

자궁경부암 세포주에서 Isoliquiritizinin의 세포자멸사 유도 효과

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과학교실
정선욱 · 김윤옥 · 김숙현 · 권상훈 · 조치흠 · 차순도

목적 : 본 연구는 isoliquiritizinin (ISL)을 자궁경부암 세포인 HeLa 세포주에 처리한 후 자궁경부암세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고 세포주기 분석과 DNA fragmentation 분석을 통하여 세포자멸사와의 연관성을 규명하고 그 기전을 밝히고자 세포주기 관련 유전자의 발현에 대하여 조사하였다.

연구 방법 : 자궁경부암 세포를 일차배양한 후 ISL을 농도별로 처리하고 세포생존수로 증식억제효과를 관찰하고 FACS분석 및 DNA 분절분석을 통하여 세포자멸사와의 관계를 조사하였으며 Western blot analysis 방법으로 세포주기 관련 유전자의 발현도를 측정하였다.

결과 : ISL을 투여한 자궁경부암 세포는 농도 의존적으로 증식억제 효과가 증가하였으며 이러한 증식억제 효과는 FACS분석 및 DNA 분절분석을 통하여 괴사에 의한 것이 아니라 세포자멸사에 의한 것임을 확인하였으며, 이러한 기전에 대하여 세포주기 관련 유전자 발현도를 측정된 결과 p27^{kip1}과 p21^{Cip1/Waf1}은 ISL의 처리 농도에 비례하여 발현도가 증가하였으며, cyclin E는 농도에 비례하여 발현의 감소를 확인하였다. Caspase pathway를 조사한 결과 pro-caspase 3의 감소와 PARP 단백질의 분절은 농도 의존적으로 발현의 증가를 보였다.

결론 : ISL에 의해서 자궁경부암 세포의 증식억제가 일어나며 이러한 현상은 세포자멸사에 의한 것이며 그 기전은 p27^{kip1}과 p21^{Cip1/Waf1}의 발현 증가로 인한 세포자멸사가 일어나는 것과 PARP 분절 및 pro-caspase 3의 발현이 감소하는 것으로 보아 중국에는 caspase pathway를 거쳐 세포자멸사를 유도하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

중심단어 : Isoliquiritizinin (Chalcone flavonoid), 자궁경부암, 세포자멸사

서 론

자궁경부암은 우리나라 여성에서 유방암, 위암, 대장암에 이어 네 번째로 높은 발생빈도를 보이는 악성종양으로서¹ 2003년 한국 중앙 암등록사업 연례보고서에 의하면 전체 여성암의 약 10.1%에 달하고 2001년도 대한 산부인과학회 부인암 등록사업 결과를 보면 연간 2,800명의 신환이 발생하고 있다.² 전 세계적으로는 여성에서 발생하는 암 중 두번째로 많이 발생하며 연간 50여만 명

의 신환이 발생하는 것으로 추정되고 있고,³ 전체 환자의 약 80% 정도가 아시아, 아프리카 및 남미 등지에서 발생하고 있다. 자궁경부암의 발생은 거의 100%에서 인 유두종바이러스(human papillomavirus; HPV) 감염과 연관되어 있으며, HPV 감염에 의해 HPV E6, E7 발암 유전자 단백질이 각각 p53, pRb 종양억제인자 산물을 불활성화시켜 자궁경부세포를 악성변형(malignant transformation), 불멸화(immortalization)를 유발하여 전구 암 상태인 상피이형증(dysplasia)과 상피내암(carcinoma in situ)까지는 발생할 수 있다는 것이 국내외 많은 연구 결과로서 과학적으로 증명되었다.^{4,5} 특히 80여종의 HPV 아형 중 HPV 16, 18의 경우 고위험 바이러스로서 이들에 감염된 세포에서 초기 발현하는 E6 단백질은 종양억제유전자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고, E7 단백질은 pRb 단백질을 인산화시켜 E2F 단백질을 방출시킴으로써 세포주기를 변화시키고 자궁경부암을 일으키

논문접수일 : 2006년 1월 27일 채택일 : 2006년 2월 8일
교신저자 : 조치흠, 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지
계명대학교 동산의료원 산부인과학교실
전화 : (053) 250-7518 · 전송 : (053) 250-7599
E-mail : c0035@dsme.or.kr

본 논문은 2005년 제20차 부인종양 추계학술대회에서 포스터 발표하였음.

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI 04-03-02)지원으로 수행되었음.

게 된다.⁶⁻⁸

최근에 자연 추출물에 관심이 높아지면서, 한방에서 사용되는 약제의 유용성에 대해서 많은 관심을 보이고 있다. 그러나 이러한 것의 유용성이나 부작용, 작용 기전에 대해서는 많이 알지 못하고 있다. 이 중 하나로 한방에서 사용되는 계혈 등이 항암 효과나 부인과 질환의 치료에 좋은 성적을 보인다는 여러 연구가 있어왔다. 이에 대한 실적 연구로는 막지질 조성변화, HIV-1 protease 활성 억제, 항염 활성 효과, 조혈 및 면역작용, 종양전이 억제효과, 활막세포에 대한 면역반응, 세포주기 억제 효과 등이 보고되었다.^{9,10} 이 연구는 계혈 등이 암화의 억제에 관여한다는 기존의 연구에서, 계혈 등의 주요 구성 성분 중의 하나인 isoliquiritigenin (ISL)이 자궁경부암에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없어 자궁경부암 세포에 대한 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 HPV-18 양성인 HeLa 세포주에 ISL을 처리한 후 증식억제 효과 및 세포자멸사 유도를 확인하고 이와 관련된 유전자의 발현에 대하여 관찰하였다.

연구 대상 및 방법

1. 자궁경부암 세포의 배양

HPV-18 양성인 HeLa 세포주를 10% fetal bovine serum 이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24-48시간 후 배양액을 교환하였다.

2. 생존세포수의 산정

자궁경부암 세포주인 HeLa 세포를 60 mm tissue culture dish에 2×10^5 cell/dish로 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 lipofectamine을 이용하여 ISL을 농도별로 처리한 후 transfection 시켰다. 이렇게 배양시킨 세포를 24-48시간 PBS 용액으로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1,000 rpm 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS 용액으로 수세하여 재부유시킨 후, 세포부유액 20 µl와 동량의 trypan blue 용액을 혼합하여 1분간 방치해 두었다. Hemacytometer 상에서 3회 반복하여 살아있는 세포수 만을 계산하였다.

3. FACS (fluorescence-activated cell sorter)에 의한 세포주기 분석

자궁경부암 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 세포분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 ISL을 농도별로 처리하였다. 세포를 24-48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1.5 ml tube에 옮기고 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재부유시킨 뒤 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 차가운 알콜 1 ml를 넣고 재부유시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS 용액으로 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/ml, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후, 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4. DNA fragmentation assay

자궁경부암 세포주에 ISL을 농도별 처리한 후 Nucleosome ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, USA)를 이용하여 cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono and oligonucleosomes)의 생성량을 ELISA reader를 통해 회사의 지침대로 정량 분석하였다.

5. Western blot analysis

ISL을 농도별로 처리한 후 cyclin E, A 및 세포자멸사에 관계하는 p27^{kip1} (p27), p53, p21^{Cip1/Waf1} (p21), cdk2, cdk4, pro-caspase 3 및 PARP 유전자 단백질의 발현차이를 확인하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer [10 mM/L Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM/L NaCl, 1% TritonX-100], 0.2 mM/L phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리하여 상층을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, UK)로 전기이동(electro-

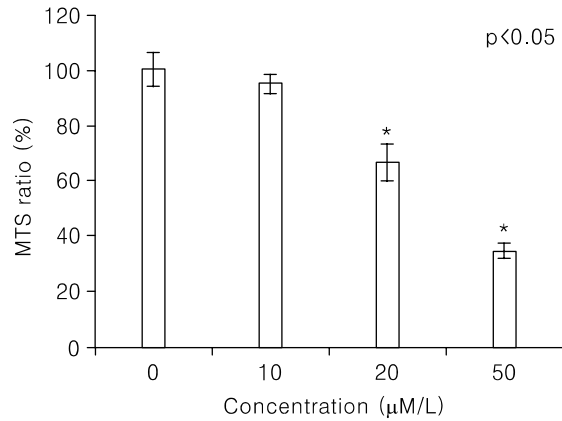
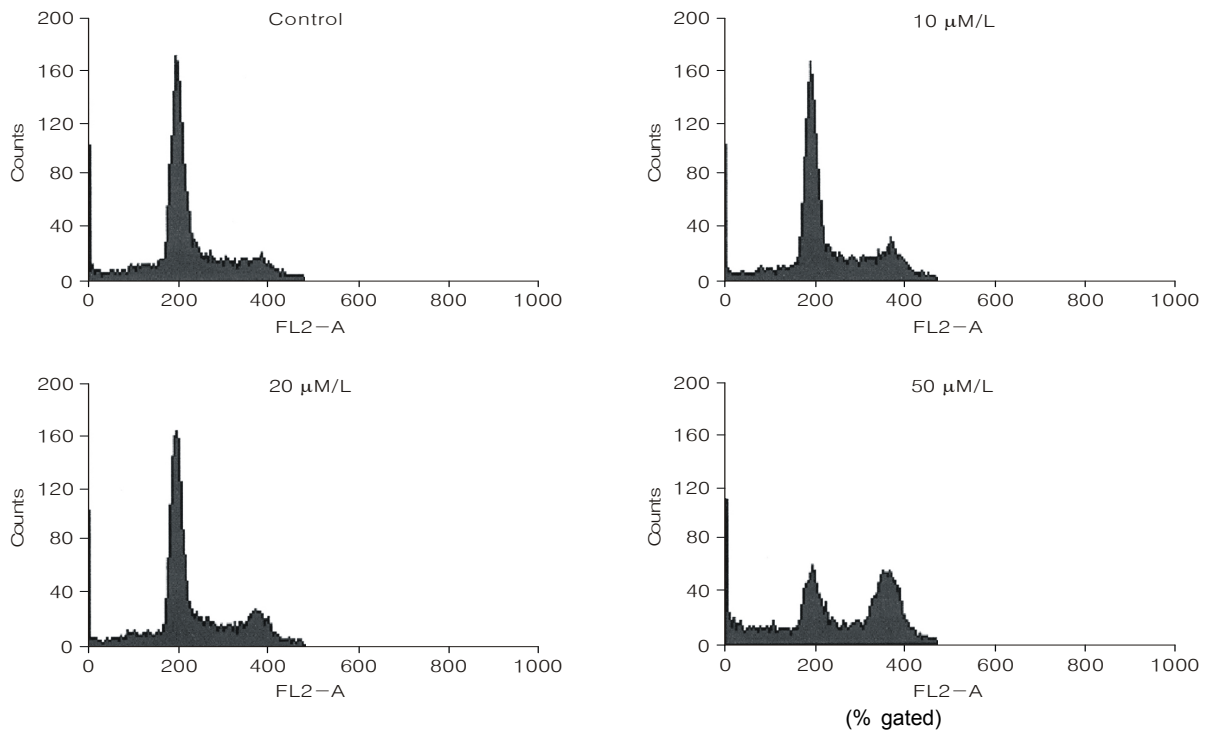


Fig. 1. Effect of ISL on cell growth of human cervical carcinoma cell line. Growth inhibition in HeLa cells treated for 24 hs with various concentrations of ISL. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay and expressed as % of control culture conditions. * $p < 0.05$.

transfer)을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking 용액 (5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber 내에서 12시간 흔들어 주었다. Blocking 용액을 제거하고 일차항체인 p27, p53, p21, p16, cyclin E, cyclin A, cdk2, cdk4, pro-caspase 3, PARP (Santa Cruz, USA)를 1 : 1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20 mM/L Tris, 137 mM/L NaCl, 0.5% Tween 20%)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, USA)를 1 : 1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3회 세척하여 비 특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL



	Control	10 μ M/L	20 μ M/L	50 μ M/L
Sub G1	15.33	13.19	17.34	34.63
G1	62.53	60.63	55.43	23.01
S	14.32	14.94	16.02	17.68
G2/M	7.72	11.20	11.27	24.51

Fig. 2. Effect of ISL treatment on the cell cycle profile. After treatment with indicated concentrations of ISL treatment for 0 or 24 hs, HeLa cells were collected, fixed, stained with PI and analyzed by flow cytometry. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, USA)로 검출하였다.

6. 통계처리

통계의 처리는 대조군과 실험군 사이의 유의성을 Student-t 방법을 이용하여 검정하였으며, 최소 3번의 실험을 하여 mean±SD로 나타내었고, $p < 0.05$ 일때 유의성이 있다고 하였다.

결 과

1. ISL의 자궁경부암 세포에 대한 증식억제 효과

ISL에 의한 자궁경부암 세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에 ISL을 농도별로 처리한 결과 24시간 후의 세포증식 억제 효과는 농도가 증가할수록 증가하였으며, 50 $\mu\text{M/L}$ 에서는 70%의 증식이 억제되었으며 통계적으로 의미 있는 유의성을 보였다(Fig. 1).

2. ISL이 세포주기 회로에 미치는 효과

자궁경부암 세포에 ISL을 10, 20, 50 $\mu\text{M/L}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과 대조군은 sub G1이 15.33%로 나타났으나 ISL 투여군은 50 $\mu\text{M/L}$ 농도에서 34.63%의 sub G1기의 증가가 확인되어 세포자

멸사의 양적 증거를 확인하였고 농도의 증가에 따라 sub G1의 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2).

3. ISL의 세포자멸사 유도 효과

자궁경부암 세포에 ISL을 10, 20, 50 $\mu\text{M/L}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 ISL의 농도가 증가할수록 DNA의 분절현상이 통계적으로 의미있게 증가함을 관찰하였다(Fig. 3).

4. ISL의 p27, p53, p21 및 cyclin A, E 유전자에 대한 효과

자궁경부암 세포에 ISL을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포주기에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27와 p21유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 cyclin A, E 및 D1은 농도가 증가할수록 발현이 감소하였으며, p53 유전자의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4).

5. ISL의 pro-caspase 3, PARP, cdk2 및 cdk4 유전자에 대한 효과

자궁경부암 세포에 ISL을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3와 PARP 유전자의 발현을 측정한 결과, ISL의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 PARP는 농도가 증가할수록 발현이 감소하며 PARP cleavage는 농도가 증가할수록 발

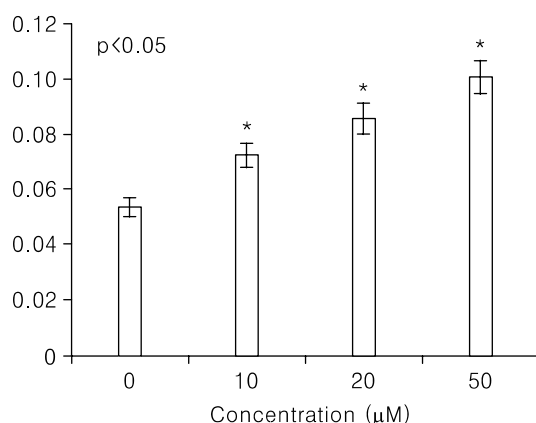


Fig. 3. DNA fragmentation assay of ISL on cell growth of human cervical carcinoma cell line. Cells were seeded at a density of 5000 cells/well in 96-well culture plate. Cells were then treated with a indicated concentrations of isoliquiritigenin for 48 hrs. Apoptosis was estimated by an ELISA method. * $p < 0.05$.

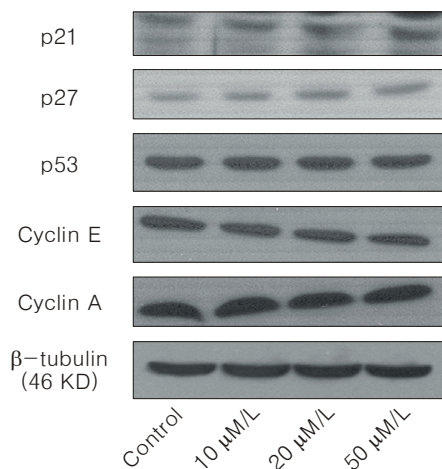


Fig. 4. Effect of ISL treatment on the cell cycle related gene expression. β -tubulin was shown as an internal control.

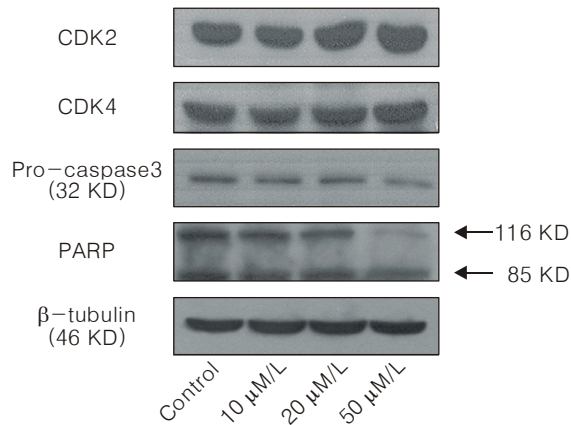


Fig. 5. Effect of ISL treatment on caspase activation and PARP cleavage. β -tubulin was shown as an internal control.

현이 증가되었으나, cdk2와 cdk4 단백질의 변화는 없었다 (Fig. 5).

고 찰

인유두종바이러스는 자궁경부암 조직에서 발견되며 자궁경부암의 주 요인으로 알려져 있다. 그러므로 자궁경부암은 인유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV)의 감염 후 p53, pRb 단백질의 분해로 인한 세포주기의 변화로 암화과정이 발생하는 경우가 대부분을 차지하고 있으며, 일부의 경우 p53 유전자의 점 돌연변이에 의한 p53 단백질의 불활성화로 인한 세포주기 변화로 발생한다.⁷ 특히 80여종의 인유두종 바이러스 아형 중 HPV 16, 18의 경우 고위험 바이러스로서 이들에 감염된 세포에서 초기 발현하는 E6 단백질은 종양억제 유전자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고 E7 단백질은 pRb 단백질을 인산화시켜 E2F 단백질을 방출시킴으로써 세포주기를 변화시키고 자궁경부암을 일으키게 된다.⁶⁻⁸

이번 실험에 사용된 ISL은 flavonoid로 chalcone 그룹에 속하며, 과일이나 채소에 많이 있으며, 특히 감초나 샬롯(서양과 재배종의 일종)에 많이 함유되어 있다.¹¹ 여러 문헌에서 ISL의 항암효과와 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴ 그러나 자궁경부암에 미치는 영향에 대한 연구에 대해 보고된 바가 없어 이에 저자는 ISL이 계열 등의 주성분으로 자궁경부암에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각되어 자궁경부암 세포의 직접적인

증식억제 효과를 조사하고 분자생물학적 기법인 세포주기 분석법을 통하여 세포주기와 관련한 유전자들의 발현을 조사하였으며 DNA 분절 분석을 통하여 이러한 증식억제 효과가 세포자멸사와 관련된 것임을 확인하고 또한 세포자멸사를 일으키는 기전에 대하여 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

배양된 자궁경부암 세포에 ISL을 농도로 처리한 후 24 시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포수를 측정하여 농도가 높아질수록 증식억제 효과가 증가되는 것을 관찰하였으며, 세포주기에 미치는 영향을 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석하여 농도의 증가에 따라 sub G1기의 증가됨이 관찰되었으며, 또한 G2/M 기의 연장도 동반된 세포자멸사에 의한 것이라 판단되었다. 이러한 결과는 항암제에 의한 자궁경부암의 세포자멸사 유도도 G2/M기의 정지와 관련한다고 보고하고 있어 같은 결과를 도출하였다.¹⁵ ISL에 의한 세포자멸사의 또 다른 증거로 DNA fragmentation 분석을 시도한 결과, 대조군에 비하여 ISL의 농도가 증가할수록 특징적인 DNA의 분절현상이 증가됨이 통계적으로 의미 있게 증가되어, ISL에 의한 증식억제 효과는 세포자멸사에 의한 것임이 확인하였다.

현재까지 수많은 세포자멸사 관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성화와 관련이 깊음이 알려져 있다. 특히 시스테인계 단백질분해 효소인 caspase가 발견되면서 세포자멸사 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다.¹⁶ Caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase 3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 세포자멸사의 경로를 밝히고자 caspase 3의 활성화의 관계에 대하여 알아본 결과, ISL 처리 농도가 증가할수록 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 이러한 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소는 caspase 3의 활성화도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다. 또한 PARP 단백질의 양적인 감소가 관찰되어 활성화된 caspase 3에 의하여 116 kDa의 PARP가 85 kDa로 절단되는 정도가 증가하였음을 확인함으로써 DNA 회복의 실패로 인한 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다. 따라서 자궁경부암 세포에 대한 ISL의 투여로 세포자멸사 수용체 조절 경로와

미토콘드리아 세포사멸 경로를 통하여 세포자멸사가 유도됨을 실험을 통해 확인하였다.

이러한 세포자멸사가 일어나는 기전을 관찰하기 위해 세포주기관련 유전자인 p27, p53, p21, cyclin A, cyclin E, CDK2 및 CDK4에 대하여 Western blot 분석을 실시하여 G1 checkpoint에 관계하는 p27과 p21의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이러한 p27과 p21의 증가는 cyclin E-CDK2 복합체와 결합함으로써 CDK의 활성화를 저해하여 G1기 정지를 유발하여 결과적으로 세포자멸사를 일으키는 것으로 생각되며 이는 ISL의 처리 농도가 증가할수록 발현도가 증가하는 것으로 보아 농도에 비례하여 세포증식을 억제하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 p53의 변화는 없으며, p27과 p21의 활성의 증가만을 보여주어, p53의 제어를 받지 않고, 독립적으로 활성화하는 것으로 생각된다. 이러한 결과로 보아 p27, p21의 증가는 ISL의 처리로 인하여 DNA에 심각한 손상을 당하였을 것으로 생각되는 자궁경부암세포가 회복되지 못한 상태에서 세포자멸사가 유도된 것으로 생각되며 이는 p21과 p27의 생성을 유도한 결과 CDK와 결합하여 G1기 정지를 유도하여 결국 자궁경부암 세포는 세포자멸사를 일으켜 증식이 억제되고 사멸되는 효과를 나타내게 되며 이는 ISL의 처리 농도에 비례하여 증가되는 것을 관찰하였다. Cyclin E는 p27과 p21의 하향흐름에 있는 것으로 농도의존적으로 소량의 감소를 보여 주었으나, cyclin A와 CDK2, 4의 변화는 보이지 않았다.

이상으로 ISL은 자궁경부암 세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포자멸사에 이르게 하고, 세포주기상에서 subG1 phase 증가 및 G2/M phase의 연장을 통해 일어나며 여기에는 p27과 p21의 세포주기 관련 유전자가 관계되어 있음을 알 수 있었다. 이에 ISL이 향후 자궁경부암의 치료에 있어서 효과적인 대체 치료 약물의 가능성이 있다고 생각된다.

참고문헌

1. Central Cancer Registry Center in Korea. Ministry of Health and Welfare. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea (Jan. 1997-Dec. 1997), 1999.
2. Korean Soc Obstet Gynecol. Annual Report of Gynecologic Cancer Registry program in Korea for 1998 (Jan. 1. 1998-Dec. 31. 1998), Korean J Obstet Gynecol 2001; 44: 426-59.
3. Parkin DM, Piasini P, Fearly J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1990; 80: 827-41.
4. Zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989; 49: 4677-81.
5. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992; 12: 197-217.
6. Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Lee MC, Park CS. Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 and c-erbB-2 protein expression. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 469-75.
7. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973-83.
8. Weber T, Dalen H, Andera L, Negre-Salvayre A, Auge N, Sticha M. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3602-6.
9. Wang W, Wang J, Zhao D, Liu H, Zhou W, Chen K. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dum, *Euonymus alatus* (Thunb) Sieb and *Eupolyphaga sinensis* Walker on regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhongguo Yao Za Zhi* 1991; 16: 299-301.
10. Lam T, Lam ML, Au TK, Ip DT, Ng TB, Fong WP, et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 2000; 67: 2889-96.
11. Tawata M, Aida K, Noguchi T, Ozaki Y, Kume S, Sasaki H. Anti-platelet action of ISOLIQIRITIGENIN, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur J Pharmacol* 1992; 212: 87-92.
12. Yamamoto S, Aizu E, Jiang H, Nakadate T, Kiyoto I, Wang JC, et al. The potent anti-tumor-promoting agent ISOLIQIRITIGENIN. *Carcinogenesis* 1991; 12: 317-23.
13. Baba M, Asano R, Takigami I, Takahashi T, Ohmura M, Okada Y. Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXV. Inhibitory effect of ISOLIQIRITIGENIN on azoxymethane-induced murine colon aberrant crypt focus formation and carcinogenesis. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 247-50.
14. Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1382-6.
15. Lee SB, Bae JS, Kim JJ, Tong SY, Yim E, Lee KH, et al. Differential protein expression of etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells. *Korean J Gynecologic Oncology* 2005; 4: 333-46.
16. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68: 29-43.

Induction of apoptosis in human cervical cancer cells by isoliquiritizinin

Sun Wook Jung, Yun Ok Kim, Suk Hyun Kim,
Sang Hun Kwon, Chi Heum Cho, Soon Do Cha

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Objective : Isoliquiritizinin (ISL) is a chalcone flavonoid, present in licorice, shallot and bean sprouts, has cancer preventing properties and often used in chinese medicine. In this study, ISL to determine its effect on cell proliferation and cell cycle progression in human cervical cancer cells were evaluated.

Methods : Cell viability assay was carried out to determine the viability of human cervical cancer cells. We tested the several experimental methods for verification and functional identification, including MTT assay, FACS analysis, DNA fragmentation assay, and Western blot analysis for ISL treated human cervical cancer cells (HeLa).

Results : ISL, induced growth inhibition in a dose dependent manner, treatment with 50 μ M/L ISL blocked 50% cell growth. FACS results showed that there was no change in the S phase, but on the other hand ISL increased the percentage of cells in G1 phase. DNA fragmentation assay by ELISA was done to find the rate of apoptosis. Apoptosis took place but in a reduced manner. From Western blot analysis, it revealed ISL induced the expression of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1} but not mediated by p53. Caspase pathway was revealed and cleavage of PARP took place.

Conclusion : ISL, a chalcone flavonoid, inhibited cell proliferation and induced cell cycle arrest at sub G1 by enhancing the production of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1}. These results indicate that ISL will be a promising agent for use in chemopreventive or therapeutic against human cervical cancer cells.

Key Words : Chalcone flavonoid, Cervical cancer, Apoptosis
