

# Anti-proliferation, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induced by Natural Liquiritigenin from Licorice Root in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells

Ah-Won Kwak<sup>1</sup>, Goo Yoon<sup>1</sup>, Jung-Il Chae<sup>2\*</sup> and Jung-Hyun Shim<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea

<sup>2</sup>Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, BK21 Plus, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

<sup>3</sup>The China-US (Henan) Hormel Cancer Institute, Zhengzhou, Henan, 450008, P.R. China

Received November 8, 2018 / Revised December 28, 2018 / Accepted February 12, 2019

Liquiritigenin (LG) is a chiral flavonoid isolated from the roots of licorice. It exhibits multiple biological activities including anti-oxidant, anti-cancer, and anti-inflammatory effects. In particular though, the anti-cancer activity of LG in oral squamous cell carcinoma has yet to be elucidated, and LG-induced apoptosis in oral squamous cell carcinoma remains poorly understood. In the present study, we tested the role of LG in inducing apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. LG treatment of HN22 cells resulted in a dose-dependent inhibition of cell viability as detected by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide assay. The induction of apoptosis in terms of Annexin V/7-Aminoactinomycin D staining, sub-G1 population, and multi-caspase activity were assessed with a Muse™ Cell Analyzer. Flow cytometric analysis revealed that LG treatment resulted in G2/M arrest in cell cycle progression and downregulation of cyclin B1 and CDC2 expression in a concentration-dependent manner. It also resulted in significant upregulation of p27. In addition, LG was seen to trigger the generation of reactive oxygen species and induce CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein and 78-kDa glucose-regulated protein in concentration-dependent upregulation. The LG treatment of HN22 cells led to a loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ); it also reduced the levels of anti-apoptotic protein and increased the expression of apoptotic protease activating factor-1, cleaved poly (ADP-ribose)polymerase and Bax. Overall, our results indicate that the pro-apoptotic effects of LG in HN22 cells depend on the activation of both intrinsic and extrinsic signaling pathways. Thus, our results suggest that LG constitutes a natural compound with a potential role as an anti-tumor agent in oral squamous cell carcinoma.

**Key words** : Apoptosis, Liquiritigenin; oral squamous cell carcinoma, reactive oxygen species

## 서 론

전세계적으로 암은 인간의 사망원인 중 많은 부분을 차지하며, 그 중 구강암은 인체에 발생하는 전체 암종의 3-5% 정도를 차지한다[36]. 구강암은 다른 부위의 암종과 비교하여 발현빈도는 낮으나 악성도가 높고 5년 생존율이 비교적 낮다[17]. 구강암중에서 90% 이상을 차지하는 구강편평세포암종은 주변 조직으로 쉽게 침습하여 잦은 전이를 보인다[22]. 최근 구강암의 치료를 위해 크게 수술, 방사선, 항암화학요법 등의 3가지 치료방법이 사용되고 있다[4, 16]. 주요 치료법 중에서 1980년

대부터 cisplatin 등의 약제가 구강암을 포함한 두경부 암종에 효과적으로 작용한다는 보고가 알려지면서 항암 화학요법이 증가되었지만, 골수기능저하나 소화기계 합병증 및 면역력저하 등과 같은 부작용이 나타나고 있다[1]. 따라서, 최근에는 합성화학물에 비해 상대적으로 부작용이 적은 천연물의 활성 연구가 진행되고 있다[27].

천연물인 감초에서 추출한 Liquiritigenin (LG)은 플라보노이드 구성원이다[21]. LG는 항암, 항산화, 항염증, 항고지혈증 및 항알레르기작용을 포함하여 다양한 생화학적 활성을 가지고 있다[1, 37]. LG는 포유류 세포주에서 세포사멸을 통한 항종양 활성을 나타낸다는 연구 결과가 있다[14, 21, 37]. 그렇지만 인간 구강편평세포암종 세포 내에서 LG이 어떠한 분자적 기작을 통하여 세포사멸에 의한 항종양 활성을 나타내는지에 대한 연구가 필요하다.

세포사멸은 발달과 노화과정에서 정상적으로 일어나며, 면역반응이나 질병 및 유해 물질에 의해 세포가 손상 될 때와 같은 방어 기작으로 발생한다[8]. Apoptosis는 크게 외인적 경로(death receptor-mediated)와 내인적 경로(mitochondrial-mediated)로 구분된다[9]. 외인적 경로는 세포막에 존재

### \*Corresponding authors

Tel : +82-61-450-2684, Fax : +82-61-450-2689

E-mail : s1004jh@gmail.com (Jung-Hyun Shim)

Tel : +82-63-270-4024, Fax : +82-63-270-4037

E-mail : jjichae@jbnu.ac.kr (Jung-Il Chae)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하는 death receptor에 death ligand가 결합하여 death complex를 형성하고, death domain-containing protein [Fas-associated protein with death domain (FADD)]와 결합하여 caspase-8을 포함한 initiator caspase를 활성화 시켜 이루어진다 [6, 9, 30]. 내인성 경로는 미토콘드리아의 막투과성과 관련있으며, Bcl-2 family protein의 비활성화를 통하여 cytochrome C (cyto C)의 방출을 유도한다[11]. 방출된 cyto C는 apoptotic protease activation factor-1 (Apaf-1)과 initiator caspase인 caspase-9과 결합하여 apoptosome 복합체를 형성한다[31]. Apoptosome은 caspase-9을 활성화 시켜 effector caspase (caspase-3/-7)의 활성을 통해 apoptosis를 유발한다[9]. 본 논문에서는 LG가 구강편평상피암 세포(HN22)의 성장 억제 및 세포사멸 기전을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 항체

본 실험에 사용된 LG는 목포대학교 약학대학의 윤구 교수에게 제공받아 실험을 수행하였다[24]. 세포의 배양에 사용된 DMEM 배지는 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Phosphate buffered saline (PBS) 및 trypsin은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 세포증식 측정을 위해 사용된 Dimethyl sulfoxide 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위하여 사용된 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양

인간 구강편평상피암 HN22 (RRID:CVCL\_5522) 세포는 한국대학교에서 제공받았다[29]. HN22 세포는 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다.

### Cell viability assay

HN22 세포를 96-well plates에 각 well 당  $1.5 \times 10^3$ 으로 100  $\mu$ l의 배지와 함께 분주하고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 배양 후, 50, 100 및 150  $\mu$ M 농도의 LG를 24시간 및 48시간 동안 처리하였다. 배양된 배지를 제거하고 MTT 30  $\mu$ l/well 넣고 incubator에서 1시간 30분간 반응 뒤에 상층액을 제거하고 DMSO를 100  $\mu$ l/well 넣고 5분간 반응시켰다. 흡광도는 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

### 세포주기변화 분석

HN22 세포에서 LG의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 6-well plate에 HN22 세포를  $5.4 \times 10^4$  cell/3 ml 씩 분주하여 배양한 후, 다양한 농도(0, 50, 100 및 150  $\mu$ M)의 LG를 처리하였다. 48시간 동안 처리 후 세포를 회수하여 PBS로 세척한 다음 70% 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 하루 동안 고정하였다. 고정된 세포를 다시 PBS로 세척하고 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. PBS를 제거한 후 Muse Cell cycle reagent (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 200  $\mu$ l 첨가하여 상온에서 30분간 반응하였다. HN22 세포의 세포주기는 Muse™ Cell Analyzer (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### Annexin V 염색에 의한 apoptosis 관찰

LG 처리에 따른 HN22 세포의 apoptosis 유도를 관찰하기 위하여 Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. HN22 세포를 6-well plate 배양한 후, LG를 다양한 농도로 48시간 동안 처리하였다. 약물 처리 후 세포를 회수하여 Muse™ Annexin V & Dead reagent 100  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응하였다. 염색한 세포는 Muse™ Cell Analyzer로 분석하였다.

### Mitochondrial membrane potential (MMP)의 분석

HN22 세포의 MMP 변화 정도를 측정하기 위하여 HN22 세포를 6-well plate에 배양하고, LG를 0, 50, 100 및 150  $\mu$ M의 농도로 48시간 처리하였다. LG를 처리한 세포를 회수하여 1X Assay buffer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)로 세척한 후, MitoPotential working solution (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 95  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 다음 세포에 7-aminoacino-mycin D (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 5  $\mu$ l 처리하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 Muse™ Cell Analyzer로 측정하였다.

### 활성산소종 분석

HN22 세포 내 활성산소종 생성 변화를 확인하기 위하여, HN22 세포를 6-well plate에 24시간 동안 배양한 후, LG를 다양한 농도로 처리하였다. LG 처리 후, 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후 Muse Oxidative Stress Reagent working solution (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)을 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세포는 Muse™ Cell Analyzer를 이용하여 분석하였다.

### 단백질 발현 분석

LG의 항암 활성 기전을 밝히기 위해 apoptosis 조절에 관여하는 단백질 발현을 확인하고자 Western blot을 수행하였다. LG를 농도 별로 처리한 HN22 세포를 PBS로 세척한 후, RIPA

lysis buffer (iNtRON, Korea)를 첨가하여 sonication 하였다. 용해된 단백질을 13,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 추출한 단백질 농도를 Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-RAD, Hercules, CA, USA)로 결정한 후 SDS-PAGE로 전기 영동 하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride로 전이시킨 후 0.1% tween-20을 함유한 PBS (PBST)에 녹인 탈지유를 이용하여 blocking하였다. PBST로 2차례 세척한 후 1차 항체를 처리하여 4°C에서 14시간 동안 반응하였다. Polyvinylidene fluoride를 PBST로 30분간 세척한 후에 Horse radish peroxidase가 표지된 2차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 단백질은 Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용해 ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)로 분석하였다.

**통계분석**

모든 실험 결과는 평균값(mean values) ± 표준편차(SD)로 나타내었다. 분석된 실험 데이터의 통계적 유의성은 분산분석 (Analysis of Variance, ANOVA)을 사용하여 검증하였고, *p* value<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**LG 처리에 의한 HN22 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발**

플라보노이드 화합물은 항산화제, 항균제 및 항암제와 같은 많은 유익한 활성을 나타낸다[20, 40]. 이전 연구에서 Hepatocellular carcinoma 세포인 HepG2 및 PLC/PRF/5 세포에 24 시간 동안 LG를 처리한 하였을 때, IC<sub>50</sub> 값은 각각 495.5 μM 및 372.5 μM으로 나타났다[37]. 또한, Glycyrrhizae radix에서 추출한 플라보노이드 중 하나인 LG를 pituitary adenoma 세포인 MMQ 세포와 GH3 세포에 48시간 처리하였을 때 IC<sub>50</sub> 값이 각각 289.2 μM 및 272.9 μM로 나타났다[38]. 감초에서 추출된 LG가 구강편평상피암세포 HN22에서의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 HN22 세포에 LG (50, 100 및 150 μM)를 24, 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, LG를 처리하였을 때 시간 및 농도 의존적으로 HN22 세포의 증식이 유의적으로 감소되었다. HN22에 LG를 24시간 동안 처리하였을 때 IC<sub>50</sub> 값은 204 μM이며, 48시간 동안 처리하였을 때 IC<sub>50</sub> 값은 HN22에서 138 μM이었다. 기존의 논문에서 보고한 바와 같이, 다양한 암종에서 LG의 항암 효능을 확인할 수 있는 IC<sub>50</sub> 농도 보다는 구강편평상피암세포에서 더 낮은 IC<sub>50</sub> 농도로 세포증식을 억제함을 확인하였다. Apoptosis가 유발되면 염색질 응축, 핵 분열, 세포자멸체 형성, 세포 수축, 막 소포 및 세포 내막에 존재하던 phosphatidylserine의 노출과 같은 뚜렷한

형태학적 특징이 나타난다[18, 39]. 세포증식 억제가 apoptosis 유발과 관련성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여, Annexin V/7-aminoacinoicin D 이중 염색을 통해 Muse™ Cell Analyzer로 측정하였다. 실험 결과, 대조군에서 자연적으로 apoptosis가 유발된 세포의 빈도가 5.55±0.23%로 나타났으며, 고농도인 150 μM에서는 31.84±0.44%로 농도의존적으로 apoptosis가 유발된 세포의 빈도가 증가하였다(Fig. 1B). 이는 LG 처리에 의한 HN22 세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 연관되어 있음을 확인하였다.

**HN22 세포의 세포주기 조절 및 G2/M기 조절 단백질의 발현에 미치는 LG의 영향**

세포주기의 진행은 세포가 DNA를 복제, 분열 및 증식시키는 일련의 신호전달에 의해 조절된다[34]. Cyclin D1과 CDK4

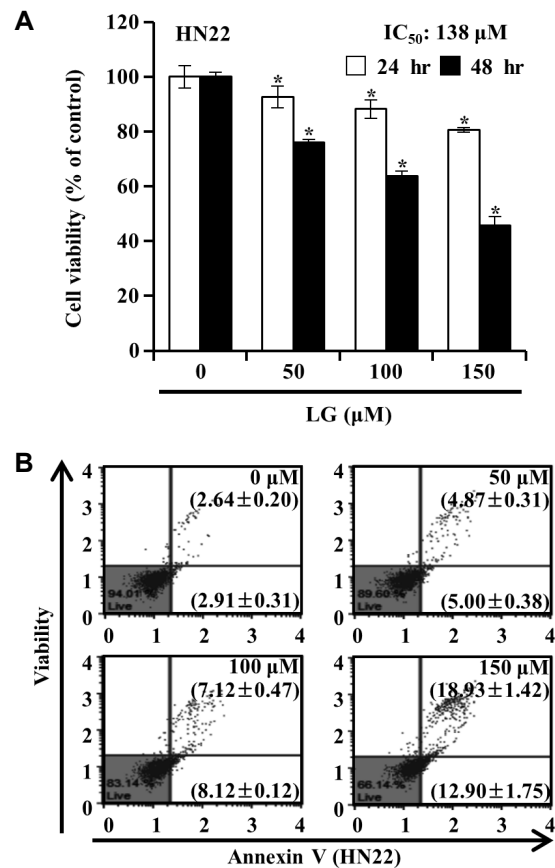


Fig. 1. Effects of LG on the cell viability and apoptosis in human oral squamous carcinoma HN22 cells. HN22 cells were treated with the indicated concentration of LG for 24 and 48 hr. (A) Cell viability was assessed by MTT assay. (B) The apoptotic status was evaluated by Annexin V/7-aminoacinoicin D assay. The lower right part was perceived as early stage of apoptotic cells and top right part was considered as late stage of apoptotic cells. The significance was presented as mean ± SD, *p*<0.05 compared to control group.

및 CDK6의 결합은 G1 단계를 거치면서 진행되며, cyclin E 및 cyclin A가 CDK2와 결합하여 중심체 G1/S와 S 단계 동안 중심체의 복제를 조절하며, cyclin A/cyclin B/ CDK1복합체는 G2/M checkpoint를 조절한다[5, 34]. p27, p21 및 p57은 각각의 표적과 CDK의 상호 작용을 차단하여 세포주기 정지를 일으킨다[25, 34]. LG에 의한 세포 증식 억제 효과가 세포주기 조절에 영향을 있는지 확인하기 위하여, HN22 세포에 LG를 48시간 동안 농도별로 처리한 후 Muse™ Cell Analyzer를 통해 세포주기를 측정하였다. 그 결과 Apoptosis를 나타내는 sub-G1 기의 세포 비율은 대조군 경우 6.63±.12%로 나타났으며, 고농도인 30 µM에서 27.00±0.44%로 세포 비율이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 G2/M 기는 대조군일 때 26.7±0.60%였던 세포 빈도가 고농도인 30 µM에선 37.10±0.26%로 농도 의존적으로 증가된 것을 확인했다(Fig. 2B). cyclin B1은 CDC 2를 활성화 시켜 복합체를 형성해 G2/M기 전이를 조절한다[35]. 반면, cip/kip family은 cyclin/CDKs 활성 억제제이며, 세포 주기의 진행을 막는다[42]. HN22 세포에서 LG 처리에 의한 G2/M arrest 유발에 관련된 기전 확인을 위하여, G2/M 기 주요 세포주기 조절인자들의 단백질 발현 변화를 Western blot으로 확인하였다. Fig. 2C에 나타난 바와 같이 LG처리에 의해 세포주기 양성 조절 인자인 cyclin B1의 발현이 감소 되었으며, cyclin 단백질들과 결합하여 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 CDKs인 CDC2의 발현 또한 감소 하였다. cip/kip family 구성원인 p27의 발현이 증가하였다. 따라서, LG가 HN22 세포에서 sub-G1기의 증가 및 G2/M arrest를 통하여 세포사멸 유도함을 시사한다.

**LG에 의한 apoptosis 유발에서 활성산소종 및 MMP의 역할**

활성산소종은 생체 내에서 일어나는 대사과정 중 발생된다 [7]. 높은 수준의 ROS는 세포에 DNA 손상, 미토콘드리아 기능 장애 및 apoptosis를 일으켜 암에서 치료 효과를 가져온다 [15]. 많은 항 종양 약물은 암세포의 활성산소종 생산과 미토콘드리아 경로에 영향을 주어 세포사멸을 유도한다고 보고되어 있다[23]. LG의 처리에 따른 활성산소종 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 48시간 동안 LG를 처리한 HN22 세포로 Muse™ Cell Analyzer를 통해 분석하였다. Fig. 3A에 나타난 결과, 대조군에서의 M2 값은 24.18±1.29%로 나타났다. LG (50, 100 및 150 µM) 를 처리한 HN22 세포의 M2 값은 각각 24.69±0.54%, 48.38±0.63%, 59.45±1.08%로 농도의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. MMP는 mitochondrial apoptosis 경로의 중요한 초기 결정 인자이다[23]. 활성산소종의 생성이 증가하면 미토콘드리아 막전위의 손실이 일어나 apoptosis를 유발한다[23]. LG 처리에 따른 HN22 세포에서의 apoptosis 유발에 있어서 미토콘드리아 기능 소실에 관여하는지를 확인하기 위하여 MMP의 변화 정도를 조사한 결과는 Fig. 3B에

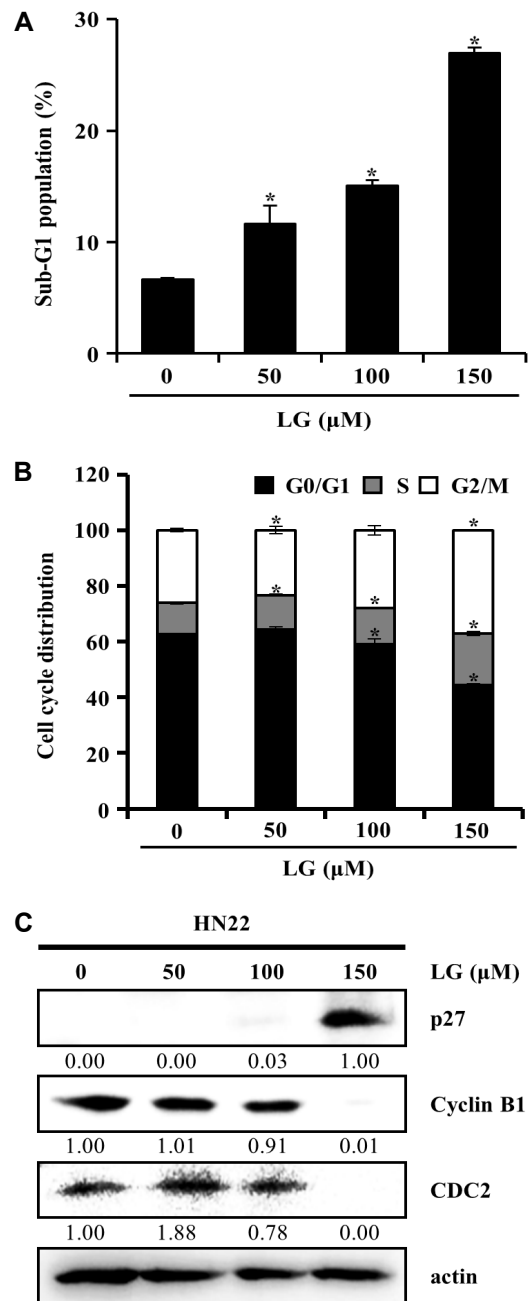


Fig. 2. Effects of LG on cell cycle distribution and cell cycle regulation protein expression in HN22 cells. Cells was treated with 0, 50, 100 and 150 µM of LG for 48 hr. Following incubation, cells were harvested, fixed and stained with Muse™ Cell cycle reagent and analysed by Muse™ cell analyzer. (A) Bar diagram showing the percentage of apoptotic cells in Sub-G1 phase of cell cycle. (B) The proportions (%) in each phase (G0/G1, S and G2/M) of the HN22 cells. Each point represents the mean of three independent experiments, expressed by mean ± SD. \**p*<0.05 significantly different from control. (C) The cells were lysed and performed to western blotting. The expression level of actin was used as internal controls.

나타난 바와 같다. 정상적인 미토콘드리아 막전위를 가지는 대조군에서는 살아있는 세포가 93.24±0.33%로 나타났다. LG (50, 100 및 150 μM)를 처리한 HN22는 11.61±0.93%, 13.61±0.26%, 29.54±0.31%로 처리한 LG의 농도가 증가할수록 미토콘드리아 막전위의 소실 정도가 증가하였다. 내인성 apoptosis 경로는 MMP 소실 및 ROS 생산과 같은 내부 자극에 의한 세포 사멸을 일으키는 것으로 입증되었다[33, 39]. 이 결과는 LG 처리에 의한 HN22 세포의 apoptosis 유발에는 ROS의 생성과 이를 통한 미토콘드리아 기능 소실이 관여함을 보여준다.

**HN22 세포에서 apoptosis 관련 단백질의 발현 및 Multi-caspase 활성화에 대한 LG의 효과**

LG의 처리에 의한 HN22 세포의 세포사멸 효과 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 관련 단백질들의 발현양상을 확인하고자 Western blotting을 실시하였다(Fig. 4A). 과도한 ROS가 생성됨에 따라 ER stress에 의하여 apoptosis가 유도된다[10]. 78-kDa glucose regulated protein (GRP78) 및 CCAAT/

enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)은 ER stress의 maker로서 사용되며, GRP78은 anti-apoptotic 인자로서 작용하고 CHOP은 ER stress에 의해 유발되는 세포사의 주요 전사 인자이다[2, 41]. Western blotting을 실시한 결과, LG처리에 의해 ER stress marker인 GRP78과 CHOP의 발현수준이 농도의존적으로 증가하였다. Bcl-2 family에는 apoptosis를 유도하는 pro-apoptotic protein (Bad, Bax, BID 및 BIM 등)과 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic protein (Bcl-2,

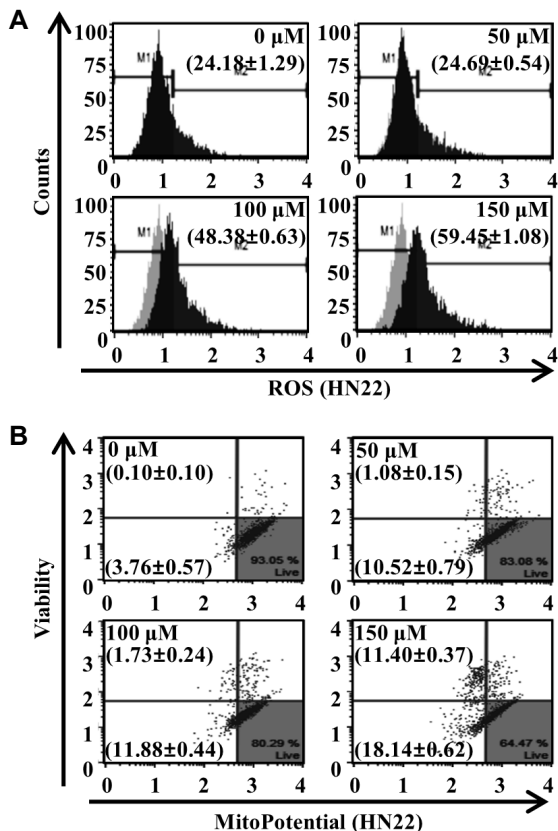


Fig. 3. Generation of ROS and defect of MMP by LG treatment in HN22 cells. After treatment with various concentrations of LG for 48 hr, the generation of ROS (A) and change of MMP (B) were analyzed by Muse™ cell analyzer. The results are presented as the mean ± SD of three independent experiments.

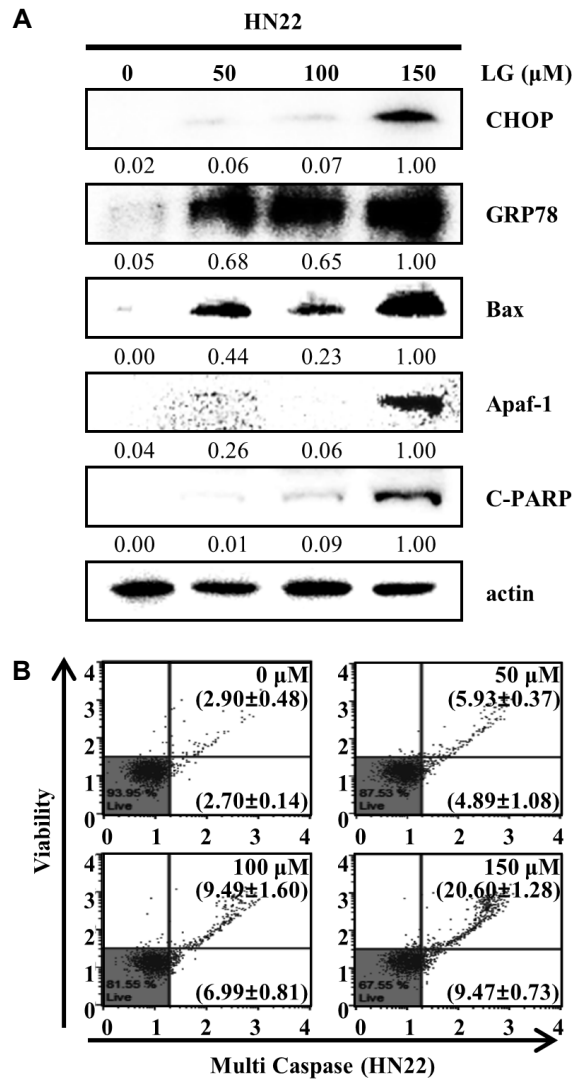


Fig. 4. Effects of LG on protein expression and multi-caspases activation related to apoptosis. The HN22 cells were incubated for 48 hr in the presence of LG (0, 50, 100 and 150 μM) concentrations. (A) The cell lysed and performed to western blotting using specific antibodies. Expression of CHOP, Bax, Bcl2, Apaf-1 and C-PARP are shown. Actin was used as an internal control. (B) Multi-caspase (caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 and -9) activity was measured by Muse™ cell analyzer. The values are expressed as the mean ± SD of three independent experiments.

Bcl-XL, Bcl-W 및 Mcl-1 등)으로 구성되어 있다[13, 19]. Pro-apoptotic Bcl-2 family 로서 Bax는 전압 의존성 음이온 채널의 개방을 자극하고 Bad는 Bcl-2 및 Bcl-xL과 상호 작용하는 것을 돕는다[28, 32]. 전압 의존성 음이온 채널이 열리면 caspase와 proteolytic protein의 활성화가 촉진되어 세포사멸을 유발한다[32]. 따라서, LG이 HN22 세포에서 apoptosis를 유발하기 위하여 Bcl-2 family 단백질의 발현 양상을 Fig. 4A에 나타냈다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 LG 처리에 의하여 Bcl-2 family 단백질 중 대표적인 pro-apoptotic protein에 해당하는 Bax의 발현이 농도의존적으로 증가하였다. Bax를 억제하는 anti-apoptotic protein인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 경우에는 감소할 것으로 추측할 수 있으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 이는 Bax의 발현 증가가 mitochondria-mediated intrinsic pathway 활성화에 기여하였을 것으로 추정할 수 있다. 아울러 미토콘드리아 막전위의 손실로 인해 세포질 내로의 cyto C가 방출됨에 따라 Apaf-1 및 caspase 9 과 결합하여 apoptosome을 형성하고 caspase들을 활성화시켜 apoptosis를 유도한다[12]. Apoptosome이 pro-apoptotic marker 인 cleaved Poly (ADP-Ribose) Polymerase (C-PARP)을 유도하여 DNA의 복구를 막아 세포사멸을 일으킨다[26]. 따라서, HN22 세포에 LG 처리한 결과 Apaf-1과 C-PARP의 발현이 농도 의존적으로 증가였다. Caspase는 세포가 세포사멸 유발 신호를 받을 때 내부 aspartate 잔기에서 단백질 분해 과정에 의해 활성화 되어 세포사멸을 촉진시킨다[3]. LG가 caspase 미치는 영향을 알아보기 위하여, multi-caspase (caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9)의 활성도를 Muse™ Cell Analyzer로 측정하였다(Fig. 4B). 대조군에서는 5.60%로 나타났으며, 고농도로 갈수록 caspase의 활성도가 10.82%, 16.48%, 30.07%로 나타났다. HN22세포에서 LG의 처리에 의해 caspase들의 활성도가 농도의존적으로 증가함을 확인하였다. 이는 LG가 HN22 세포에서 외인적 및 내인적 경로를 통하여 세포사멸을 유도한다는 것을 시사한다. 이상의 결과를 종합해 보면 LG에 의한 인간 구강상피세포암종인 HN22 세포의 증식 억제가 세포사멸 유도에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한, LG은 sub-G1기의 세포 수 증가, G2/M기 cell cycle arrest 현상, 활성산소종에 의한 소포체 스트레스, 미토콘드리아 막전위 소실 및 세포사멸 단백질들을 조절함으로써 내·외인적 경로를 통해 세포사멸을 유도하였다. 따라서, LG의 임상적 실현 가능성을 확인하기 위해 *in vivo* 실험을 수행할 수 있지만, 다른 약물에 비하여 분리과정 과정이 어렵다. 그러므로 향후 충분한 양의 LG를 분리한 후 생물학적 영향에 대한 효과를 확인하기 위하여 본 *in vitro* 연구결과를 토대로 *in vivo* 실험을 진행하여 암세포 사멸기전에 대한 상세한 기전 규명, 항암 효과에 대한 연구 및 향후 항암제로써 활용하기 위한 동물실험 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 성과물은(논문) 농촌진흥청 연구사업(Project No. PJ 013842)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Alrushaid, S., Davies, N. M., Martinez, S. E. and Sayre, C. L. 2016. Pharmacological characterization of Liquiritigenin, a chiral flavonoid in licorice. *Res. Pharm. Sci.* **11**, 355-365.
- Ariyasu, D., Yoshida, H. and Hasegawa, Y. 2017. Endoplasmic Reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J. and Segal-Bendirdjian, E. 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* **20**, 3354-3362.
- Bundela, S., Sharma, A. and Bisen, P. S. 2014. Potential therapeutic targets for oral cancer: ADM, TP53, EGFR, LYN, CTLA4, SKIL, CTGF, CD70. *PLoS One* **9**, e102610.
- Chen, J. 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026104.
- Degli Esposti, M. and Dive, C. 2003. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 455-461.
- Dickinson, B. C. and Chang, C. J. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504-511.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Ge, G., Yan, Y. and Cai, H. 2017. Ginsenoside Rh2 inhibited proliferation by inducing ROS Mediated ER stress dependent apoptosis in lung cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 2117-2124.
- Green, D. R. and Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 150845.
- Hata, A. N., Engelman, J. A. and Faber, A. C. 2015. The BCL2 Family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov.* **5**, 475-487.
- Huang, C. H. and Chan, W. H. 2017. Protective effects of Liquiritigenin against citrinin-triggered, oxidative-stress-mediated apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, pii:E2538.
- Kardeh, S., Ashkani-Esfahani, S. and Alizadeh, A. M. 2014. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **735**, 150-168.
- Kishimoto, K., Yoshida, S., Ibaragi, S., Yoshioka, N., Hu, G. F. and Sasaki, A. 2014. Neamine inhibits oral cancer pro-

- gression by suppressing angiogenin-mediated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Anticancer Res.* **34**, 2113-2121.
17. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G. and Dobariya, C. 2016. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J. Cancer Res. Ther.* **12**, 458-463.
  18. Lee, S. H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A. and Kaufmann, S. H. 2013. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ.* **20**, 64-76.
  19. Leibowitz, B. and Yu, J. 2010. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol. Ther.* **9**, 417-422.
  20. Liu, C., Wang, Y., Xie, S., Zhou, Y., Ren, X., Li, X. and Cai, Y. 2011. Liquiritigenin induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome c release and caspases activation in HeLa Cells. *Phytother. Res.* **25**, 277-283.
  21. Liu, Y., Xie, S., Wang, Y., Luo, K., Wang, Y. and Cai, Y. 2012. Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. *Molecules* **17**, 7206-7216.
  22. Lu, W., Feng, F., Xu, J., Lu, X., Wang, S., Wang, L., Lu, H., Wei, M., Yang, G., Wang, L., Lu, Z., Liu, Y. and Lei, X. 2014. QKI impairs self-renewal and tumorigenicity of oral cancer cells via repression of SOX2. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 1174-1184.
  23. Ma, Y., Zhang, J., Zhang, Q., Chen, P., Song, J., Yu, S., Liu, H., Liu, F., Song, C., Yang, D. and Liu, J. 2014. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 8-14.
  24. Mersereau, J. E., Levy, N., Staub, R. E., Baggett, S., Zogovic, T., Chow, S., Ricke, W. A., Tagliaferri, M., Cohen, I., Bjeldanes, L. F. and Leitman, D. C. 2008. Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. *Mol. Cell Endocrinol.* **283**, 49-57.
  25. Mills, C. C., Kolb, E. A. and Sampson, V. B. 2017. Recent Advances of Cell-Cycle Inhibitor Therapies for Pediatric Cancer. *Cancer Res.* **77**, 6489-6498.
  26. Mishra, D., Singh, S. and Narayan, G. 2016. Curcumin induces apoptosis in Pre-B acute lymphoblastic Leukemia cell lines via PARP-1 cleavage. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **17**, 3865-3869.
  27. Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N. and Ghosh, A. C. 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1467-1486.
  28. Oh, H., Yoon, G., Shin, J. C., Park, S. M., Cho, S. S., Cho, J. H., Lee, M. H., Liu, K., Cho, Y. S., Chae, J. I. and Shim, J. H. 2016. Licochalcone B induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma through the extrinsic- and intrinsic-signaling pathways. *Int. J. Oncol.* **48**, 1749-1757.
  29. Oh, H. N., Seo, J. H., Lee, M. H., Kim, C., Kim, E., Yoon, G., Cho, S. S., Cho, Y. S., Choi, H. W., Shim, J. H. and Chae, J. I. 2018. Licochalcone C induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells by regulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *J. Cell Biochem.* **119**, 10118-10130.
  30. Oh, H. N., Seo, J. H., Lee, M. H., Yoon, G., Cho, S. S., Liu, K., Choi, H., Oh, K. B., Cho, Y. S., Kim, H., Han, A. L., Chae, J. I. and Shim, J. H. 2018. Oridonin induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma probably through the generation of reactive oxygen species and the p38/JNK MAPK pathway. *Int. J. Oncol.* **52**, 1749-1759.
  31. Passante, E., Wurstle, M. L., Hellwig, C. T., Leverkus, M. and Rehm, M. 2013. Systems analysis of apoptosis protein expression allows the case-specific prediction of cell death responsiveness of melanoma cells. *Cell Death Differ.* **20**, 1521-1531.
  32. Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.
  33. Simon, H. U., Haj-Yehia, A. and Levi-Schaffer, F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**, 415-418.
  34. Singh, S. K., Banerjee, S., Acosta, E. P., Lillard, J. W. and Singh, R. 2017. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget* **8**, 17216-17228.
  35. Taylor, W. R. and Stark, G. R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-1815.
  36. Vilen, S. T., Salo, T., Sorsa, T. and Nyberg, P. 2013. Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *ScientificWorldJournal* **2013**, 920595.
  37. Wang, D., Lu, J., Liu, Y., Meng, Q., Xie, J., Wang, Z. and Teng, L. 2014. Liquiritigenin induces tumor cell death through mitogen-activated protein kinase- (MPAKs-) mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 965316.
  38. Wang, D., Wong, H. K., Feng, Y. B. and Zhang, Z. J. 2014. Liquiritigenin exhibits antitumour action in pituitary adenoma cells via Ras/ERKs and ROS-dependent mitochondrial signalling pathways. *J. Pharm. Pharmacol.* **66**, 408-417.
  39. Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 87.
  40. Yuan, X., Li, T., Xiao, E., Zhao, H., Li, Y., Fu, S., Gan, L., Wang, Z., Zheng, Q. and Wang, Z. 2014. Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **65**, 242-251.
  41. Zheng, Y. Z., Cao, Z. G., Hu, X. and Shao, Z. M. 2014. The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 349-358.
  42. Zhou, Y., Wang, K., Zhen, S., Wang, R. and Luo, W. 2016. Carfilzomib induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells via upregulation of p21 (Waf1/Cip1) and p27(Kip1). *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **55**, 847-851.

**초록 : 구강편평세포암종 세포에서 감초 유래 Liquiritigenin의 항증식, 세포주기 정지 및 세포사멸 유도**

곽아원<sup>1</sup> · 윤구<sup>1</sup> · 채정일<sup>2\*</sup> · 심정현<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>목포대학교 약학대학, <sup>2</sup>전북대학교 치과대학, <sup>3</sup>중국-미국(허난) 호멜 암 연구소)

Liquiritigenin (LG)은 licorice 뿌리에서 분리된 chiral flavonoid이다. LG는 항산화, 항암 및 항염증 효과를 포함하여 다양한 생물학적 활성을 가지고 있다. 구강편평세포암종에서 LG의 항암 활성은 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 구강편평상피암 세포(HN22)에서 LG의 항암 효능을 시험하였다. HN22 세포에 LG를 처리하여 MTT 분석으로 세포 생존율을 평가하였으며, Annecin V/7-Aminactinomycin D 염색, 세포주기 및 Multi-caspase 활성을 Muse™ cell Analyzer로 분석하여 세포사멸 유도를 확인하였다. 분석결과, 구강편평상피암 HN22 세포에 LG를 처리시 G2/M 세포주기 정지를 일으켰으며, Western blotting 통하여 cyclin B1 및 CDC2 발현 감소와 p27 발현 증가를 확인하였다. LG는 활성산소종의 생성을 유발하고, CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) 및 78-kDa glucose regulated protein (GRP78)의 발현을 농도의존적으로 유도하였다. HN22 세포에 LG의 처리는 미토콘드리아 막전위의 손실( $\Delta\Psi_m$ )을 일으켰다. LG를 처리한 HN22 세포의 단백질 분석결과 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), cleaved Poly (ADP-Ribose) Polymerase (C-PARP) 및 Bax의 발현을 증가함을 확인하였다. 따라서 우리의 결과는 LG이 구강편평상피암 세포의 세포사멸을 유도하여 항암제 역할을 할 수 있는 천연 화합물임을 시사한다.