

대장암 세포주에서 메타아비산 나트륨에 의한 G1 세포주기 정지

홍윤경* · 김선미**** · 이승훈* · 강재선**** · 홍용근*****#

*인제대학교 대학원 재활과학과, **인제대학교 대학원 물리치료학과,
인제대학교 의생명공학대학 심혈관 및 대사성질환센터, *경성대학교 약학대학 약학과
(Received August 4, 2011; Revised August 18, 2011; Accepted August 29, 2011)

Sodium Metaarsenite (KML001) Induces G1 Phase Arrest in HCT116 Colorectal Cancer Cells

Yunkyung Hong*, Sunmi Kim****, Seunghoon Lee*, Jae Seon Kang**** and Yonggeun Hong*****#

*Department of Rehabilitation Science in Interdisciplinary PhD Program,
Graduate School of Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

**Department of Physical Therapy, Graduate School of Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

***Cardiovascular & Metabolic Disease Center, College of Biomedical Science & Engineering,
Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

****Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract — KML001 reduced the proliferation of HCT116 cells in a concentration- and time-dependent manner without change of cell viability. Beclin-1 expression was significantly attenuated by KML001 ($P < 0.05$), but no significant changes were observed in KML001-treated cells. The number of cells in G1 phase was increased 48 hr after KML001 treatment. Furthermore, a dramatic reduction in the frequency of beating and the number of embryoid bodies of the cells was noted after treatment. Taken together, KML001 suppresses the proliferation of HCT116 cells, which might be due to G1 phase arrest.

Keywords □ KML001, colorectal cancer cell, G1 phase arrest, cardiac toxicity

대장암은 우리나라에서 발생하는 종양 중 3위로 조사 되었으며, 전 세계적으로 약 9.4%의 발병율을 나타낸다.¹⁾ 이와 같은 경향은 사회-경제적 발전에 따른 육류 위주의 서구화된 식생활, 신체 활동의 감소 및 비만의 유병률 증가 등과 밀접한 관련이 있다.²⁾ 한국중앙암등록본부(2005)에 등록된 암환자를 대상으로 조사한 연구 결과, 대장암에 의한 우리나라의 사회-경제적 비용 부담이 연간 1조 4,000억원에 이르는 것으로 추산되었다.³⁾ 따라서 보건 산업에서 대장암의 중요성은 증가할 것이며, 그에 대한 의료 정책이 시급한 실정이다.

비소와 비소 유도 화합물은 오래 전부터 동양에서 암을 비롯한 여러 질환을 치료하기 위해 사용되었으나, 독성 때문에 현재에는 주로 외용제로 사용되고 있다.⁴⁾ 최근 항암제로서 육산화비

소(As_4O_6)의 개발 가능성이 시사되어 의약품으로 개발 단계에 있으나 경구 투여 후의 흡수율이 낮다.⁵⁾ 반면에 KML001(메타아비산 나트륨, $NaAsO_2$)는 경구 투여가 가능한 수용성의 비소 화합물로서 전립선암과 같은 고형 종양에 대한 세포독성을 나타낸다.⁶⁾ Trichostatin A(TSA)는 1세대 Histone deacetylase(HDAC) 억제제이며, 반응성과 독성이 비교적 높다고 알려져 있다.⁷⁾ 이에 본 연구에서는 두 약제의 종양 증식 억제 효과, 관련 기전 및 심장 독성 정도를 비교하고자 하였다.

실험재료 및 방법

세포배양 및 약제의 처리

HCT116 대장암 세포주는 인제대학교 의과대학 약리학교실로부터 제공받아 배양하였다(PI: Oh ST). KML001은 제조사(KOMIPHARM, 한국)로부터 제공 받았으며, TSA(Sigma-Aldrich, 미국)는 구입하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 055-320-3681 (팩스) 055-329-1678
(E-mail) yonghong@inje.ac.kr

켜 사용하였다.

세포 성장 및 세포 생존율 측정

세포는 각 실험 조건에 따라 배양되었으며, 약물 처리 후 정해진 시간에 트립신-EDTA를 사용하여 수거하였다. 0.4% 트립판 블루 용액으로 염색한 다음, 염색 유무에 따라 헤모시토크미터를 사용하여 생존 세포와 사멸 세포의 수를 각각 측정하였다. 세포의 성장 곡선은 염색되지 않은 생존한 세포의 수로 나타내었으며, 세포 생존율은 전체 세포에 대해 생존한 세포의 상대적 비율로 나타내었다.

단백질 추출 및 Western blot 분석

RIPA 완충액(135 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.5 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 10 mg/ml each of aprotinin, leupeptin, pepstatin)을 사용하여 실험 조건에서 배양한 HCT116 세포에서 단백질을 추출하였다. Bradford 단백질 정량 시약(Bio-Rad Laboratories, USA)과 분광광도계(Mecasys, Korea)를 사용하여 함유된 단백질 농도를 측정하였다. 단백질(30 µg)을 15% SDS-PAGE에서 전기영동 하여 분리한 다음, 완충액(pH 8.3)을 사용하여 polyvinylidene fluoride(PVDF) 막으로 이동시켰다. 막과 5% 차단용 완충액(non-fat dry milk)을 1시간 동안 실온에서 반응시키고, 0.5% 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체를 6시간 이상 처리했다. 실온에서 40분 동안 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고, Tris buffered saline with Tween-21(TBST)을 사용하여 10분 간격으로 5회 세척하였다. Tris buffered saline(TBS)로 1회 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액으로 2분간 반응시켜 X-선 필름에 노출시켰다. 밴드의 두께를 Image J(1.43, USA)를 사용하여 정량하였다.

세포주기 측정

HCT116 세포(5×10⁵ cells/ml)에 1 µM 농도의 KML001을 처리한 다음 24시간 주기로 세포를 수확하여 PBS로 수세 하였다. 그 후 -20°C에서 70% ethanol을 사용해 30분 동안 세포를 고정시켜 PBS로 세척한 다음, RNase A(1 mg/ml)를 처리하고 propidium iodide(BD Pharmingen, USA)로 염색했다. 세포주기는 FACS Calibur와 CellQuest acquisition software(BD Biosciences, USA)로 측정 및 분석하였다. propidium iodide는 585/42 nm 필터로 측정되었으며, 최소 20,000개 이상의 세포의 자료를 수집하여 세포주기를 측정하였다.

심근 세포 독성 측정

심근 세포는 생후 3일령(n=15)의 신생 백서를 희생시켜 심장

을 적출한 다음, 심방으로부터 심실을 분리했다. Neonatal Cardiomyocyte Isolation System(Worthington Biochemical Corporation, USA)의 매뉴얼에 따라 심근을 분리하였으며 과정은 다음과 같다. 심실을 1 mm³의 크기로 잘라 트립신을 처리하여 8시간 동안 반응시킨 다음 트립신 억제제를 첨가하였다. 교반기 위에서 2시간 동안 40 rpm의 강도로 반응시킨 다음 스트레이너를 사용하여 여과시켰다. 여과액을 2시간 동안 배양시켜 세포 배양용 플레이트에 부착된 섬유모세포를 제거하고, 부유 상태의 심근세포는 수거하여 실험에 사용하였다.

각 실험 조건에 따라 약물을 처리하고 다음과 같은 것을 측정하였다. 생리학적 지표로 박동 빈도와 배아유사세포덩어리(embryoid body)의 박동 백분율을 측정하였으며, 방법은 다음과 같다. 편을 사용하여 세포배양접시 바닥에 1 mm 직경의 원을 그리고, 박동하는 심근 세포의 수를 도립현미경(배율, ×200)아래에서 측정하였다. 박동 빈도(1/min)는 분당 박동하는 횟수로 나타내었으며, 박동유무에 따른 배아유사세포덩어리의 백분율(%)은 박동하는 세포와 박동하지 않는 세포의 합에 대한 박동하는 세포 수의 비율로 나타냈다.⁸⁾

통계 처리

모든 실험은 세 차례 이상 수행되었으며, 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계 처리는 SPSS 18.0을 사용했으며, 독립표본 t검정, 일원분산분석 및 반복측정 분산분석을 실시하였다. 사후 검정은 Turkey 검정법을 사용하였으며, 통계적 유의성은 P<.05로 나타내었다.

실험결과

KML001에 의한 HCT116 대장암 세포주의 성장 억제

HCT116 대장암 세포주에 KML001을 처리한 결과 대조군에 비해 중앙 세포의 증식이 억제되었으며, 이는 KML001의 처리 농도에 대해 의존적인 양상을 나타낸다(Fig. 1A, 1B). 대조군과 비교하였을 때 시간에 따른 증식 곡선의 기울기는 KML001(1 µM) 및 TSA(1 µM) 처리에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 1C). TSA(1 µM) 처리에 따른 세포의 생존율은 시간에 따라 유의하게 감소하였으나, KML001을 처리한 그룹에서는 대조군과 유사하였다(Fig. 1D).

KML001이 자가포식기전의 활성화에 미치는 영향

대조군과 비교하여 1 µM과 0.01 µM 농도의 KML001을 처리한 대장암 세포주에서 Beclin 1의 발현은 유의하게 감소하였다(P<.05). 하지만 TSA를 처리한 그룹에서 Beclin 1의 발현은 농도에 관계없이 대조군과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 2).

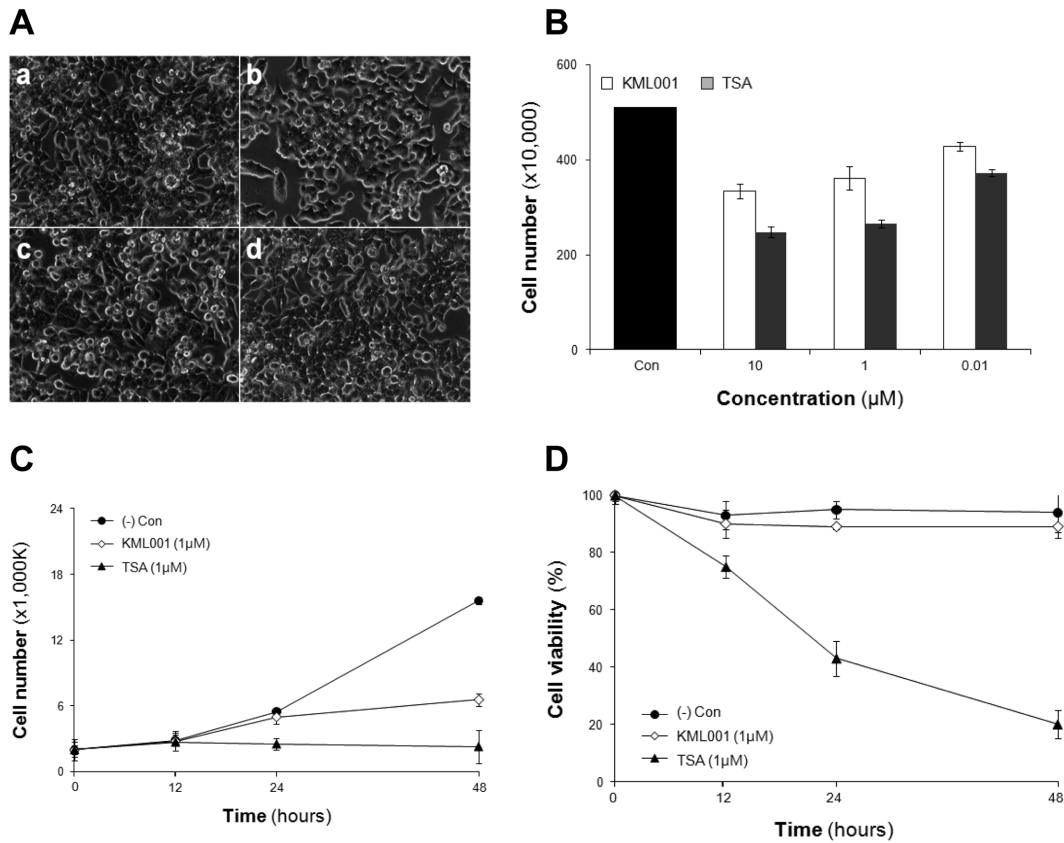


Fig. 1 – Antiproliferative effect of KML001 in HCT116 colorectal adenocarcinoma cells. (A) Representative photographs after KML001 treatment (Magnification $\times 200$): a, negative control; b, $10 \mu\text{M}$; c, $1 \mu\text{M}$; and d, $0.01 \mu\text{M}$. (B) HCT116 cells were incubated with different concentrations of KML001 or TSA for 24 hr, and were then counted using a hemocytometer. (C) KML001- and TSA-treated cells ($1 \mu\text{M}$) were counted, and (D) cell viability was measured using a 0.4% trypan blue assay at the indicated time.

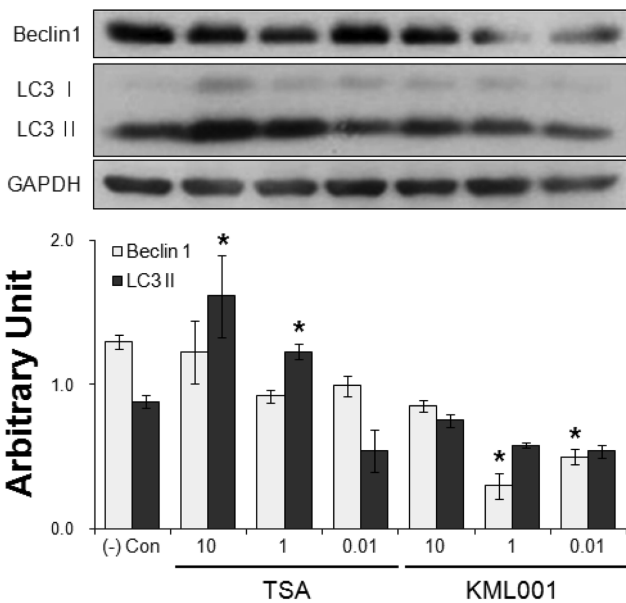


Fig. 2 – Anti-cancer drugs induced protein expression. Expression of autophagy-related protein markers with anti-cancer drug treatment. $*P < 0.05$ compared to the negative control.

또 다른 자가포식기전의 마커인 LC3 II의 발현은 대조군에 비해 고농도($10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$)의 TSA를 처리함에 따라 유의하게 증가하였으나($P < .05$), 저농도($0.01 \mu\text{M}$)에서는 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 동일한 농도의 KML001을 처리한 대장암 세포주에서 LC3 II의 발현은 대조군에 비해 감소하는 양상을 보였으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

KML001에 의한 세포 주기 변화 확인

HCT116 대장암 세포주에 $1 \mu\text{M}$ KML001을 처리한 다음 유세포 분석기를 사용하여 매 24시간 마다 세포 주기를 측정하였다. 대장암 세포주의 세포 주기 분포는 KML001 처리 24시간 후 (55.22%)에 대조군(59.16%)과 유사하였다.

KML001 처리 후 24시간(55.22%) 및 48시간(67.19%)이 경과한 시기에 G1기에 존재하는 세포의 분포를 비교하였을 때, 통계적으로 유의하게 증가하였다(11.97%). 뿐만 아니라 KML001 처리 후 24시간(26.52%)과 48시간(14.28%)에 S기에 존재하는 세포의 분포를 비교한 결과, 통계적으로 유의하게 감소하였다 (12.24%)(Fig. 3A, 3B).

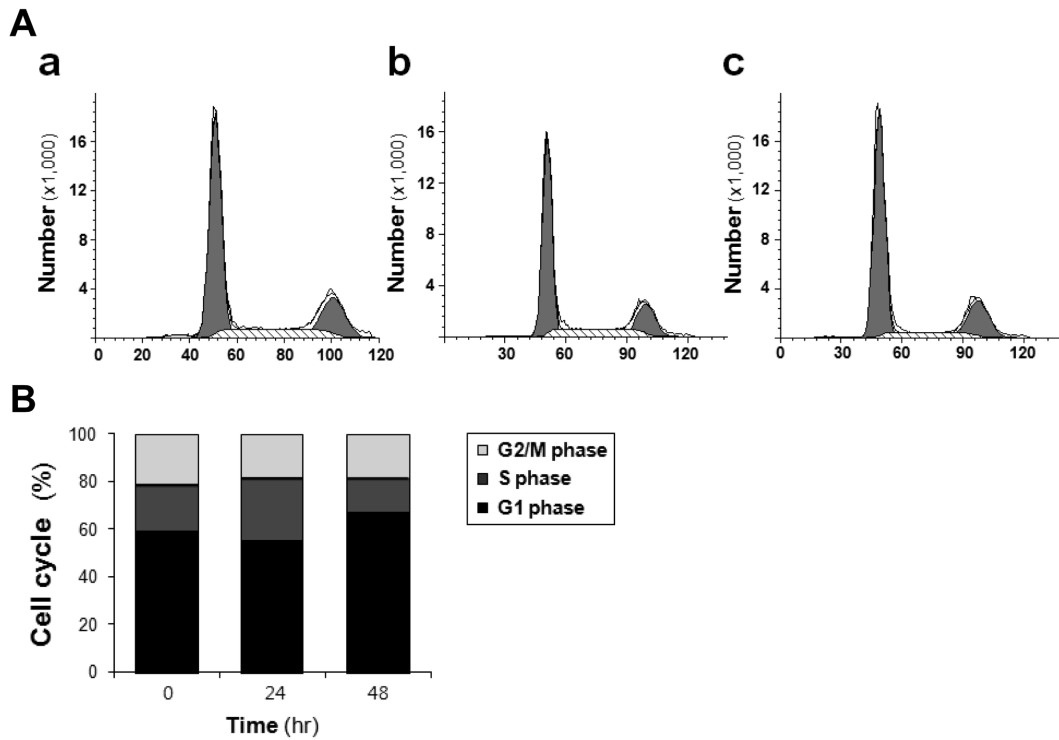


Fig. 3 – 1 μM KML001 induced G1 phase cell cycle arrest. (A) Histograms of the cell cycle: a, before; b, at 24 hr; and c, at 48 hr after KML001 treatment. (B) Percentages of cells in each phase.

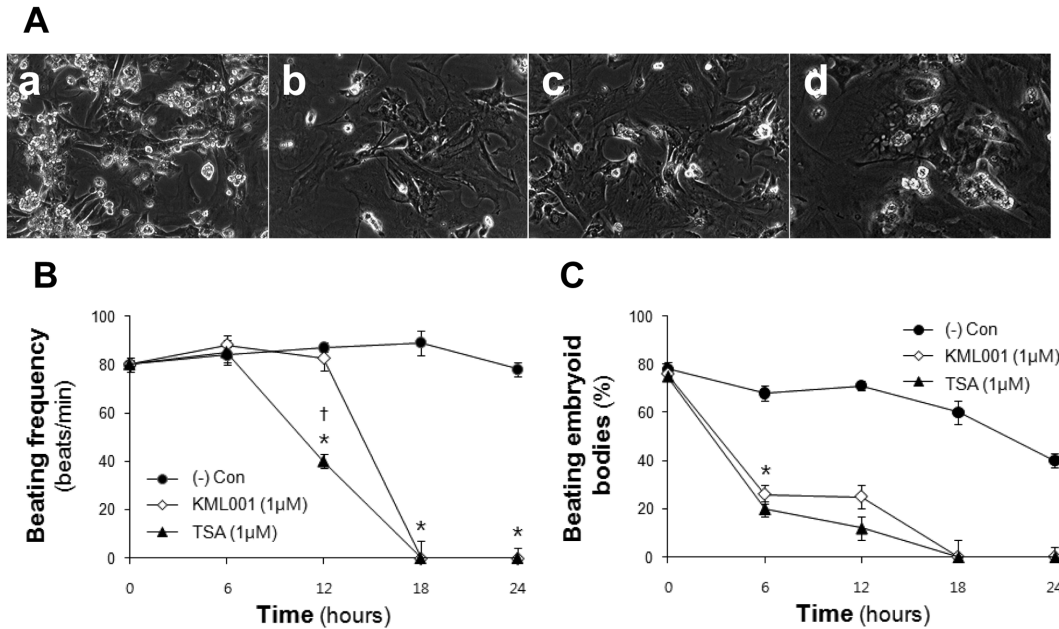


Fig. 4 – Toxicity of anti-cancer drugs in cultured neonatal cardiomyocytes. (A) Changes in cellular morphology with KML001: a, negative control; b, 10 μM; c, 1 μM; and d, 0.01 μM. (B) Beating frequency (beats/min) and (C) beating embryoid bodies (%) were calculated as in a previous study. * $P < 0.05$ compared to the negative control; † $P < 0.05$ compared to KML001-treated cells.

항암제의 심장 독성 비교

초대 배양한 신생 백서의 심장 세포에 다양한 농도의 KML001을 처리한 다음, 세포의 형태학적 및 기능적 변화를 관찰하였다.

대조군과 비교하여 KML001을 처리한 그룹에서 농도에 관계없이 세포의 위축이 나타났다(Fig. 4A).

심장 근육 세포의 초대 배양 후 24시간 동안 박동 빈도는 분

당 80회로 유지되었다. TSA 처리 12시간 후 심근 세포의 박동 빈도 및 박동 유무에 따른 배아세포덩어리의 백분율은 약 50% 정도 감소하였으며, 18시간 후에는 심근의 박동이 완전히 멈추었다($P < .05$, Fig. 4B, 4C).

KML001(1 μM)을 처리한 심근 세포의 박동 빈도는 12시간까지 대조군과 유사한 수준이었으나, 18시간 후부터 박동 빈도가 0회로 급격히 감소하였다($P < .05$, Fig. 4B). 대조군의 배아세포덩어리 백분율은 초대 배양 후 12시간에 약 80% 정도였으나, 24시간 경과 후에 급격히 감소했다(40%). KML001(1 μM) 처리 전과 비교하였을 때 처리 후 6시간에 배아세포덩어리의 박동 비율은 26%로 급격히 감소하였으며, 18시간 후에는 0%로 기록되었다($P < .05$, Fig. 4C).

고 찰

본 연구에서는 선행 문헌의 연구를 바탕으로 하여 1 μM 농도의 TSA를 대장암 세포에 처리하였고,⁹⁾ 종양의 증식 및 생존율이 감소됨을 확인하였다. 이는 신경모세포암, 자궁내막암, A549 폐암 세포 및 PC-3 전립선암 세포에서 아포토시스(apoptosis)를 유발한다는 선행 문헌의 결과와 일치하였다.¹⁰⁻¹²⁾ 뿐만 아니라, Olaharski 등(2006년)은 사람 TK6 림프모구에 TSA를 처리하고 24시간 후 G1기에 정지한 세포의 분포가 농도 의존적으로 유의하게 증가하였으며, 이는 cyclin 의존 효소 억제 단백질(Cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) 중 p21의 발현이 증가한 것과 밀접한 관련이 있다고 발표하였다.¹³⁾ 하지만 Dong 등(2008)은 신장의 근위 세뇨관 세포에 10 μM 의 TSA를 처리한 결과 아포토시스를 유발하는 등 신장 독성을 나타낸다고 보고하였다.¹⁴⁾ 이 연구에서 초대 배양한 심근 세포에 TSA를 처리하였을 때 심근의 박동 빈도 및 박동중인 배아세포덩어리의 비율은 급격히 감소하였으며, 24시간 후에는 박동이 완전히 멈추었다. 이들 결과를 종합하면, TSA는 종양 조직 외에 정상 조직에 대한 독성이 존재하는 것으로 사료된다.

KML001은 텔로머라제 효소(telomerase)의 활성을 저하시켜 텔로미어(telomere)의 길이를 단축시키고 궁극적으로는 세포사멸을 유발해 종양의 과증식을 억제하는 약물이다. 현재 임상 I/II 상 단계에서 개발중인 약물로 전립선암과 같은 고형 종양에 효과적이다.⁶⁾ 본 연구에서 HCT116 대장암 세포주에 KML001(1 μM)을 처리하였을 때 시간에 따른 세포의 증식은 저하되었으나, 세포 생존율은 대조군과 유사한 수준이었다. 이는 세포 주기 중 G1기에 분포하고 있는 세포의 비율이 증가한 것과 일치하는 결과이다. KML001은 대조군에 비해 심장 독성이 있는 것으로 나타났으나, TSA에 비해서는 현저하게 낮은 양상을 보였다.

일반적으로 자가포식기전(autophagy)은 산성화된 리소좀 내에서 여러 가수분해 효소의 작용으로 세포내 단백질 또는 소기관

이 분해되어 세포질로 운반되는 과정을 이룬다.^{15,16)} 종양에서 항암제 처리에 따른 자가포식기전의 활성화는 스트레스에 대한 생존 및 종양 성장의 억제 등에 관여하며, 이는 세포 및 약물의 종류에 따라 다양하다.^{17,18)} 특히 macroautophagy는 이중의 자가포식막 형성이 특징적이며, 이 과정 동안 Beclin 1 복합체와 LC3 system이 중요하게 작용한다.¹⁹⁾ 본 실험에서 KML001을 처리한 HCT116 대장암 세포에서 대조군에 비해 Beclin 1 및 LC3 II의 발현이 감소하였다. 반면 고농도(10 μM , 1 μM)의 TSA 처리는 LC3 II의 발현을 유의하게 증가시켰으나 Beclin 1의 발현에는 영향을 끼치지 않았다. 이는 유방암 세포에 resveratrol을 처리한 Scarlati 등의 연구 결과와 일치하는 결과이며,¹⁹⁾ 최근 Beclin 1의 발현에 비의존적인 자가포식기전의 활성화가 보고되고 있음을 미루어 볼 때 고농도의 TSA는 HCT116 세포의 자가포식기전을 활성화 시킨다는 것을 알 수 있다. 즉 세포 성장 곡선 및 세포 생존율과 자가포식활성 정도를 비교해 보면 종양의 과증식을 억제하는 과정 동안 두 약물에 의해 자가포식기전이 다르게 작용함을 확인할 수 있다.

최근에는 자가포식, 아포토시스 및 세포 주기 조절에 관한 연구가 활발하게 진행되는 추세이다.²⁰⁻²⁴⁾ Shin 등(2011)에 의한 연구에서는 5-Methoxyflavone를 처리한 대장암 세포주에서 농도 및 시간 의존적으로 자가포식기전이 활성화 되었으며, G2/M기의 세포 정지가 나타남을 확인하였다.²⁰⁾ 더불어 Filippi-Chiela 등(2011)은 아교모세포종에 resveratrol을 처리하였을 때 자가포식이 활성화 되었으며, 이는 G2/M기의 세포 주기 정지와 밀접한 관련이 있다는 것을 확인한 결과이다.²¹⁾ 그리고 종양세포에 삼산화 비소를 처리하였을 때 G1기 또는 G2/M기에서 세포 주기의 진행을 억제함으로써 과증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다.²⁵⁻²⁷⁾

이러한 선행 연구처럼 본 연구에서도 대장암 세포에서 KML001에 의한 자가포식기전의 활성화 및 G1기 세포 정지를 확인하였으나, 세부 신호 전달 기작에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 대장암 세포주에 KML001과 TSA 처리에 따른 항암 효과 및 심장 독성 효과를 비교하였다. 두 약물의 처리에 따라 대장암 세포의 과증식이 억제 되었으나 관련 기작은 달랐다. TSA는 HDAC 효소의 활성을 억제하고 항암 유전자를 전사시켜 종양 세포의 사멸을 유발하는 반면, KML001은 자가포식기전을 억제하고 G1기에서 세포 주기의 진행을 차단해 종양의 증식을 억제하였다. 약물 처리에 따라 심근 세포의 박동 빈도 및 박동 유무에 따른 배아세포덩어리 백분율을 비교한 결과, 두 약물 모두 대조군에 비해 현저하게 감소하였으며, 이를 통해 심장 세포에 대한 독성이 존재함을 알 수 있다.

감사의 말씀

본연구는 KRIBB 기관고유사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다(KGM0321112).

참고문헌

- 1) Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. : Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74 (2005).
- 2) Koh, S.-J. and Kim, J. S. : The reasons for the increased incidence of colorectal cancer in Korea. *Korean J. Med.* **79**, 97 (2010).
- 3) Kim, J. H., Hahm, M.-I., Park, E.-C., Park, J.-H., Park J.-H., Kim, S. E. and Kim, S. G. : Economic burden of cancer in South Korea for the year 2005. *J. Prev. Med. Public Health* **42**, 190 (2009).
- 4) Seo, M. Y., Park, E. K., Pang, G. Y., Kim, C. K., Park, Y. S., Ahn, W. S., Lee, J. M., Namkoong, S. E. and Kim, D. G. : The gene expression profile using cDNA microarray after treatment arsenic compound (As₂O₃, As₄O₆) in SiHa cell. *Korean J. Obstet. Gynecol.* **45**, 1191 (2002).
- 5) Lee, P. S., Shin, D. H., Lee, S. Y., Lee, J. Y., Lee, K. M., Kwon, K. H. and Chung, Y. B. : Pharmacokinetics of arsenic hydroxide, an anticancer compound, in rats. *J. Kor. Pharm. Sci.* **36**, 377 (2006).
- 6) Phatak, P., Dai, F., Butler, M., Nandakumar, M. P., Gutierrez, P. L., Edelman, M. J., Hendriks, H. and Burger, A. M. : KML001 cytotoxic activity is associated with its binding to telomeric sequences and telomere erosion in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* **14**, 4593 (2008).
- 7) Downs, J. A., Nussenzweig, M. C. and Nussenzweig, A. : Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**, 951 (2007).
- 8) Toyota, N., Takano-Ohmuro, H., Yoshida, L. S., Araki, M., Yoshinobu, K. and Suzuki-Toyota, F. : Suppression of cardiac troponin T induces reduction of contractility and structural disorganization in chicken cardiomyocytes. *Cell Struct Funct.* **33**, 193 (2008).
- 9) Wilson, A. J., Chueh, A. C., Tögel, L., Corner, G. A., Ahmed, N., Goel, S., Byun, D. S., Nasser, S., Houston, M. A., Jhaver, M., Smartt, H. J., Murray, L. B., Nicholas, C., Heerdt, B. G., Arango, D., Augenlicht, L. H. and Mariadason, J. M. : Apoptotic sensitivity of colon cancer cells to histone deacetylase inhibitors is mediated by an Sp1/Sp3-activated transcriptional program involving immediate-early gene induction. *Cancer Res.* **70**, 609 (2010).
- 10) Hřebačková, J., Poljaková, J., Eckschlagler, T., Hraběta, J., Procházka, P., Smutný, S. and Stiborová, M. : Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells. *Interdiscip. Toxicol.* **2**, 205 (2009).
- 11) Takai, N., Desmond, J. C., Kumagai, T., Gui, D., Said, J. W., Whittaker, S., Miyakawa, I. and Koeffler, H. P. : Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res.* **10**, 1141 (2004).
- 12) Sonnemann, J., Gänge, J., Kumar, K. S., Müller, C., Bader, P. and Beck, J. F. : Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines. *Invest New Drugs.* **23**, 99 (2005).
- 13) Olaharski, A. J., Ji, Z., Woo, J. Y., Lim, S., Hubbard, A. E., Zhang, L. and Smith, M. T. : The histone deacetylase inhibitor trichostatin A has genotoxic effects in human lymphoblasts *in vitro*. *Toxicol. Sci.* **93**, 341 (2006).
- 14) Dong, G., Wang, L., Wang, C. Y., Yang, T., Kumar, M. V. and Dong, Z. : Induction of apoptosis in renal tubular cells by histone deacetylase inhibitors, a family of anticancer agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 978 (2008).
- 15) Wong, E. and Cuervo, A. M. : Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1 (2010).
- 16) Meijer, A. J. and Codogno, P. : Autophagy: Regulation and role in disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **46**, 210 (2009).
- 17) Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. and Kondo, S. : The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 726 (2005).
- 18) Moretti, L., Yang, E. S., Kim, K. W. and Lu, B. : Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **10**, 135 (2007).
- 19) Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P. and Ghidoni, R. : Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* **15**, 1318 (2008).
- 20) Shin, S. Y., Hyun, J., Yu, J. R., Lim, Y. and Lee, Y. H. : 5-Methoxyflavone induces cell cycle arrest at the G2/M phase, apoptosis and autophagy in HCT116 human colon cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **254**, 288 (2011).
- 21) Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Zamin, L. L. and Lenz, G. : Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One.* **6**, 1 (2011).
- 22) Ko, H., Kim, Y. J., Amor, E. C., Lee, J. W., Kim, H. C., Kim, H. J. and Yang, H. O. : Induction of autophagy by dimethyl cardamonin is associated with proliferative arrest in human colorectal carcinoma HCT116 and LOVO cells. *J. Cell Biochem.* **112**, 247 (2011).

- 23) Zhang, J., Li, Y., Chen, X., Liu, T., Chen, Y., He, W., Zhang, Q. and Liu, S. : Autophagy is involved in anticancer effects of matrine on SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* **26**, 115 (2011).
- 24) Cerquetti, L., Sampaoli, C., Amendola, D., Bucci, B., Masuelli, L., Marchese, R., Misiti, S., De Venanzi, A., Poggi, M., Toscano, V. and Stigliano, A. : Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells. *Exp. Cell Res.* **317**, 1397 (2011).
- 25) Park, W. H., Seol, J. G., Kim, E. S., Hyun, J. M., Jung, C. W., Lee, C. C., Kim, B. K. and Lee, Y. Y. : Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 3065 (2000).
- 26) Bazarbachi, A., El-Sabban, M. E., Nasr, R., Quignon, F., Awaraji, C., Kersual, J., Dianoux, L., Zermati, Y., Haidar, J. H., Hermine, O. and de Thé, H. : Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. *Blood.* **93**, 278 (1999).
- 27) Ma, D. C., Sun, Y. H., Chang, K. Z., Ma, X. F., Huang, S. L., Bai, Y. H., Kang, J., Liu, Y. G. and Chu, J. J. : Selective induction of apoptosis of NB4 cells from G2+M phase by sodium arsenite at lower doses. *Eur. J. Haematol.* **61**, 27 (1998).