

HepG2 간암세포에서 아라키돈산에 의한 세포사멸기전에 미치는 NADPH 산화효소의 역할

남정원 · 이용수[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received December 26, 2011; Accepted January 9, 2012)

Role of NADPH Oxidase in the Mechanism of Arachidonic Acid-induced Apoptosis in HepG2 Human Hepatoblastoma Cells

Jyung-Won Nam and Yong Soo Lee[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Previously, we have reported that arachidonic acid (AA) appears to be involved in the induction of apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. In this study we investigated the possible role of the NADPH oxidase, a membrane-bound enzyme generating reactive oxygen species (ROS), in the mechanism of AA-induced apoptosis in HepG2 cells. Apoptotic cell death induced by AA was significantly suppressed by various inhibitors of the NADPH oxidase, diphenylene iodonium (DPI), apocynin (Apo) and neopterin (NP). In addition, these inhibitors of the NADPH oxidase completely blunted the AA-induced ROS elevation. Next, we investigated the implication of metabolic pathway of AA in these AA actions. Both apoptosis and ROS production induced by AA were not significantly altered by treatment with indomethacin (Indo) or nordihydroguaiaretic acid (NDGA), selective inhibitors of cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX), respectively, suggesting that AA metabolites produced by COX or LOX may not have an essential role in the AA-induced apoptosis and ROS generation. Collectively, these results suggest that the NADPH oxidase may be a key player in the mechanism of AA-induced apoptosis in HepG2 cells. These results further suggest that NADPH oxidase may be a good target for the management of human hepatomas.

Keywords □ apoptosis, arachidonic acid, NADPH oxidase, reactive oxygen species, HepG2 hepatoblastoma cell

세포사멸(apoptosis)은 자연적으로 일어나는 세포죽음의 과정으로서 그 특징은 세포골격 붕괴(cytoskeletal disruption), 세포 수축(cell shrinkage) 및 세포막의 불규칙한 만곡(membrane blebbing) 등의 세포 미세구조의 변화, 염색질 응축(chromatin condensation)과 DNA의 분절(cleavage) 등 핵에서의 변화와 프로테아제의 활성화 등의 생화학적 변화를 동반한다.¹⁾ 세포사멸은 여분의 세포를 제거함으로써 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 담당하고 있다.²⁾ 유전적 변이에 의해 세포사멸을 일으키는 신호경로에 이상이 생겨 세포사멸이 일어나지 않는 현상은 발암과정과 연관성이 있는 것 같다.³⁾ 또한 암세포의 사멸은 암치료의 중요한 방법의 하나로 인식되고 있다.⁴⁾

NADPH 산화효소는 중성구에서 처음으로 호흡폭발(respiratory

burst) 중 발생하는 활성산소종의 원인이 된다는 사실이 알려졌다.⁵⁾ 이 효소는 또한 내피세포,⁶⁾ 혈관평활근 세포,⁷⁾ 폐의 신경상피세포,⁸⁾ 경동맥체의 제 1형 세포⁹⁾ 및 흑색종 세포¹⁰⁾ 등에서도 존재하고 있으며 세포기능에 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀졌다. 이 효소의 활성화에는 세포막에 존재하는 여러 인자, 즉 cytochrome b558(p22^{phox} 및 gp91^{phox}), GTP-결합단백(Rac 및 Rap1A)과 세포질 인자(p40^{phox}, p47^{phox} 및 p67^{phox})가 관여하고 있다.¹¹⁾ NADPH 산화효소는 특히 HepG2 간암세포에서 칼슘-염소이온수송체의 활성화¹²⁾ 및 세포사멸¹³⁾ 기전에 깊이 관여하고 있다는 사실이 밝혀졌다.

아라키돈산은 여러 종류의 암세포에서 세포사멸 유도기전에 그 관련성이 보고되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 세포내 아라키돈산의 증가가 미토콘드리아-매개성 세포사멸 경로를 통한 세포사를 일으킬 수 있다는 증거가 발견되었고,¹⁷⁾ 특히 쥐의 간암세포에서 아라키돈산은 미토콘드리아 투과변화구멍(mitochondrial permeability transition pore)을 개방함으로써 시토크롬씨의 유리를 일으켜 세

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8396 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) yongslee@duksung.ac.kr

포사멸을 유도한다는 사실이 밝혀졌다.¹⁸⁾ 또한 사람 전골수성 백혈병 세포에서는 아라키돈산의 세포독성이 세라마이드의 농도를 높임으로써 일어난다는 주장도 있으며,¹⁹⁾ 사람 유방암세포에서 아라키돈산에 의한 세포성장 억제효과가 peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)와 관련이 있다는 사실도 보고된 바 있다.²⁰⁾ 그럼에도 불구하고 아라키돈산에 의한 세포사멸 작용기전은 아직까지 확실히 밝혀진 바 없다.

본 연구실에서도 아라키돈산이 세포사멸 기전에 중요한 매개체로 작용하고 있다는 사실을 보고한 바 있다.²¹⁾ 이러한 기존 연구결과를 바탕으로 하여 본 연구에서는 사람 간암세포인 HepG2 암세포에서 아라키돈산에 의한 세포사멸 기전에 미치는 NADPH 산화효소의 역할을 밝히고자 한다.

실험방법

시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), arachidonic acid(AA), indomethacin(Indo), nordihydroguaiaretic acid(NDGA), propidium iodide(PI), diphenylene iodonium(DPI), apocynin(Apo), neopterin(NP) 및 각종 용매와 염류는 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 혼합액은 GIBCO(미국)에서 구입하였으며, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA)는 Molecular Probes, Inc.(미국)에서 구입하여 사용하였다.

암세포의 배양

American Type Culture Collection에서 구입한 HepG2 사람 간암세포를 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Eagle's minimum essential medium(MEM)으로 세포수가 5×10^5 cells/m² 가 되도록 하여 배양하였다. 배양용기는 75 mm² flask를 사용하며 15 ml의 배지로 37°C, 포화습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 단층배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluence에 도달한 세포는 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization 한 후 계대배양하여 유지하였다.

세포내 활성산소종 측정

세포내 활성산소종은 형광침투인 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통하여 쉽게 세포내로 들어가서 세포내에 존재하는 여러 에스터라제에 의해 가수분해되어 형광을 발생하지 못하는 2',7'-dichlorofluorescin(DCFH)로 바뀐 후, 활성산소종이 존재할 경우 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 빠르게 산화되어 형광을 나타낸다. DCF 형광세기는 세포내에서 발생하는 활성산소종의 양과 비례하는 값이다. 세포를 두 번 세척하

고 Hank 용액에 4×10^5 cells/ml 밀도로 현탁시킨 후 5 μ M의 DCFH-DA를 가해 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 봉입시켰다. 세포 현탁액을 cuvette에 옮겨 485 nm 파장에서 excitation 시켜, 530 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기(Hitachi F4500, 일본)로 측정하였다.

유세포분석기(flow cytometry)를 이용한 세포사멸의 정량화

세포사멸이 일어난 세포는 단편화된 DNA를 소실하므로, 유세포분석기 방법을 이용하여 sub-G₁ DNA content를 가진 세포 수를 측정함으로써 세포사멸을 정량하였다. 세포를 PBS로 세척한 후, trypsinization하여 세포를 배양용기로부터 탈리시킨 다음, 원심분리(1200 rpm)하여 세포 pellet을 얻고, 다시 PBS와 Mcllvaine's buffer(0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M citric acid, pH 7.5) 1:1 혼합액으로 세척 후 찬(4°C) ethanol 2 vol을 가하여 조심스럽게 섞어 고정시켰다. 고정된 세포를 0.1% Triton X-100, 32 μ g/ml RNase A 및 50 μ g/ml PI를 포함하는 4 mM sodium citrate 용액에 현탁시켜 4°C에서 16시간 이상 방치한 후, 유세포분석기로 DNA 함량을 분석하였다.

자료분석 및 통계적 검정

모든 실험은 네 번 반복해서 실시하고 실험 결과는 대조군의 조건에 대한 백분율로 나타내었다. Data는 평균값 \pm SEM으로 표시하고 ANOVA로 분석하며 각각의 유의성 비교는 Student-Newman-Keul's test를 이용하여 실시하였다. P값이 0.05 이하인 경우에만 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험결과 및 고찰

아라키돈산에 의한 간암세포 사멸 및 활성산소종 발생에 미치는 NADPH 산화효소의 역할

이전 본 연구실에서 발표한 논문에 의하면 HepG2 간암세포에서 아라키돈산은 10 μ M 농도에서 3일간 배양하면 유의성 있는 세포사멸을 유도하였다.²¹⁾ 따라서 본 실험에서는 아라키돈산의 농도를 10 μ M로 하여 사용하였다. 그림 1에서 보면 아라키돈산(10 μ M)은 유의성 있게 HepG2 세포의 사멸(그림에서 A₀로 표시된 부분)을 유도하였다. 본 연구에서는 NADPH 산화효소 저해제로 DPI, Apo 및 NP를 사용하였는데 이들 약물의 농도는 이전 발표된 논문을 따라 각각 50, 100, 및 50 μ M을 사용하였다.^{12,13)} 아라키돈산에 의한 세포사멸은 이들 NADPH 산화효소 저해제의 전처리에 의해 현저히 억제됨을 관찰하였다(Fig. 1). 이 결과는 아라키돈산에 의한 간암세포 사멸에 NADPH 산화효소가 중요한 매개체로 작용하고 있음을 시사한다. 최근 다른 연구에서도 아라키돈산이 HepG2 간암세포의 사멸을 유도한다는 사실을 밝혔으나 그 기전에 대한 실험은 행해지지 않았다.²²⁾ NADPH 산화

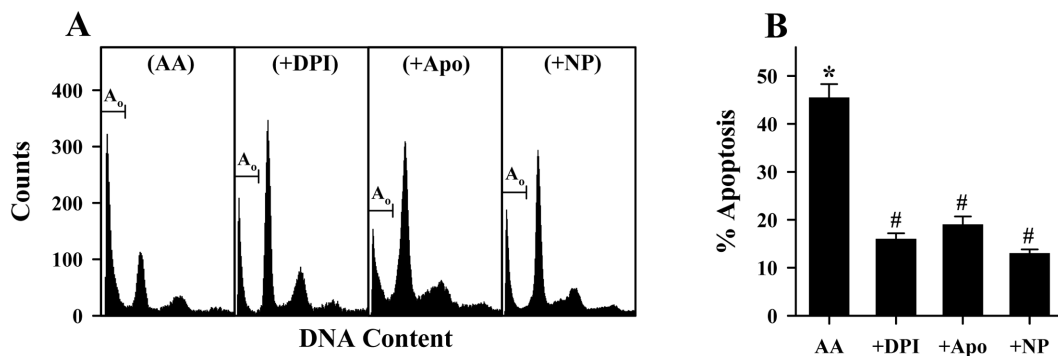


Fig. 1 – Effects of NADPH oxidase inhibitors on the AA-induced apoptosis in HepG2 cells. In these experiments cells were incubated with or without AA (10 μ M) for 72 hr. DPI (50 μ M), Apo (100 μ M) and NP (50 μ M) were used as an inhibitor of NADPH oxidase. These drugs were added 30 min before AA treatment. The number of apoptotic cells was measured by flow cytometry. The region designated A_0 , was defined as cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation. In bar graphs (B), the data represent the mean values of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control in which the cells were incubated with AA-free medium. # $P < 0.05$ compared to AA alone.

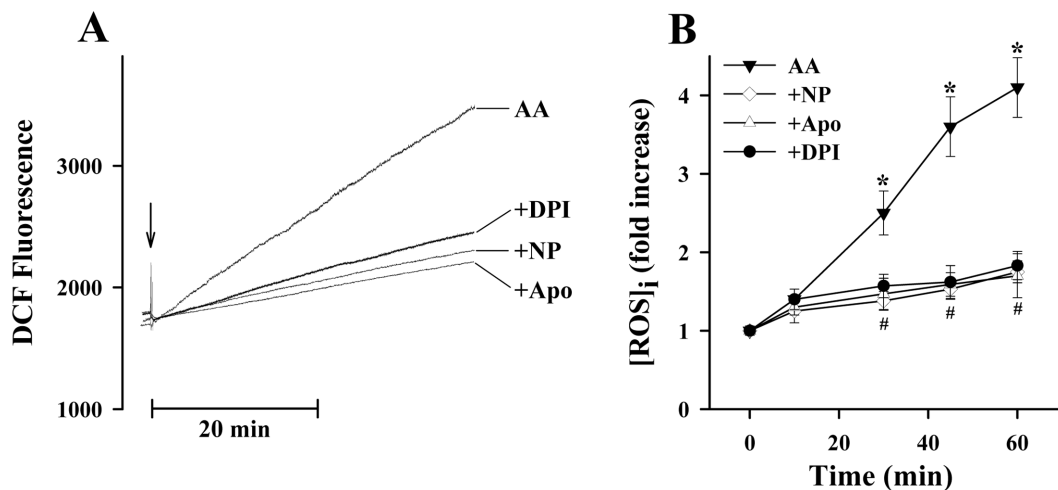


Fig. 2 – NADPH oxidase mediates the ROS production induced by AA in HepG2 cells. The data (A) show changes in ROS levels as a function of time, which was measured by DCF fluorescence method. The arrows show the time point for addition of AA (10 μ M). In these experiments, DPI (50 μ M), Apo (100 μ M) and NP (50 μ M) were used as an inhibitor of NADPH oxidase. These drugs were given 10 min before AA application. In the data (B), results are expressed as fold increase compared to the initial DCF fluorescence intensity. Data points represent the mean values of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control in which the cells were incubated with AA-free medium. # $P < 0.05$ compared to apigenin alone.

효소가 여러 종류의 암세포의 사멸에 연루되어 있음이 알려지고 있고,^{23,24} 특히 HepG2 간암세포에서 아피제닌,¹³ 캡사이신,²⁵ methyl antcinat A,²⁶ isoobtusilactone A,²⁷ 페놀신²⁸ 등에 의한 세포사멸기전에 NADPH 산화효소가 연루되어 있다는 사실이 밝혀졌다.

위 실험에서 밝혀진 아라키돈산에 의한 HepG2 세포의 사멸 기전의 매개체로서 NADPH 산화효소의 역할이 활성산소종의 발생과 인과관계가 있는 지를 확인하기 위하여 아라키돈산(10 μ M)에 의한 활성산소종의 발생에 미치는 NADPH 산화효소 저해제의 영향을 조사하였다. DPI(50 μ M), Apo(100 μ M) 및 NP(50 μ M)를 전처리하였을 때 아라키돈산에 의한 활성산소종의 발생이 유

의성 있게 억제되었다(Fig. 2). 이 실험결과로 미루어 보아 아라키돈산은 NADPH 산화효소의 활성화를 통하여 활성산소종을 발생시키며 나아가 세포사멸을 유도하는 것으로 판단된다.

최근 암세포의 사멸을 유도하는 물질들의 작용기전과 활성산소종의 발생과의 연관성에 관한 연구들이 많이 발표되고 있다.²⁹ 세포내 활성산소종의 발생은 여러 기전에 의해 일어날 수 있는데 최근 미토콘드리아 유래 활성산소종이 암세포의 사멸을 유도하며 이 결과를 항암제의 개발에 활용할 수 있다는 보고가³⁰ 있었지만, 세포막에 존재하는 NADPH 산화효소 유래 활성산소종의 발생에 의한 암세포의 사멸에 관한 연구가 더 많이 보고되고 있다.^{13,23-28}

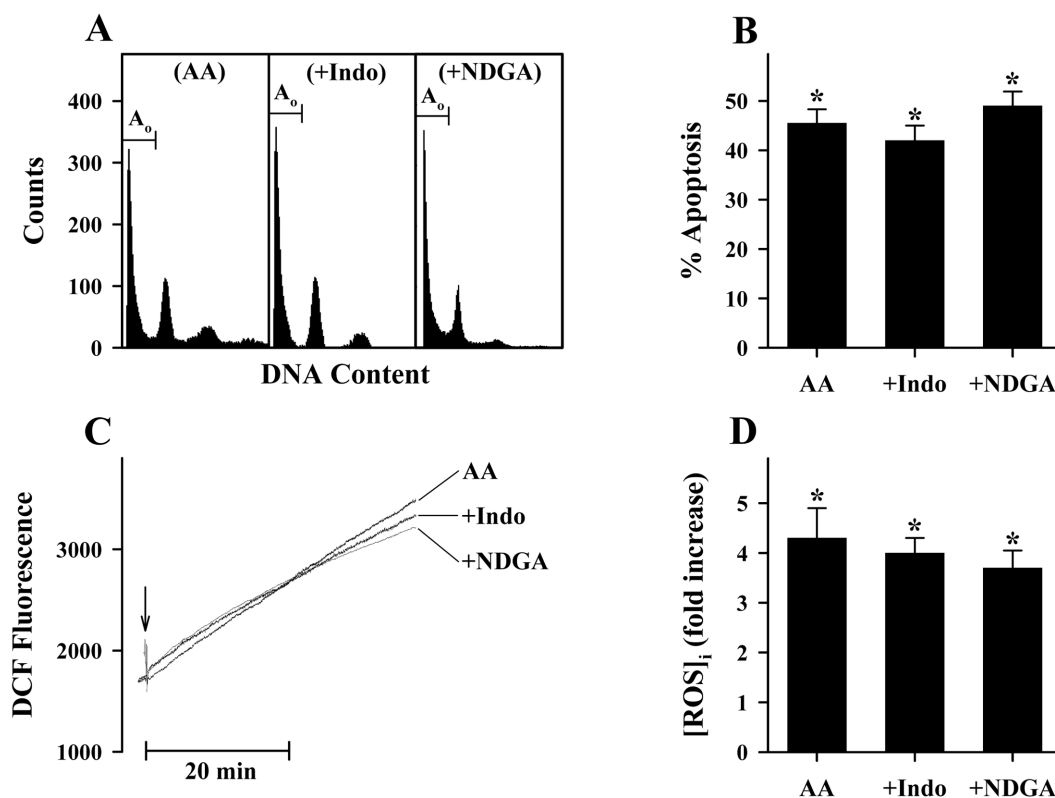


Fig. 3 – Effects of inhibitors of COX and LOX on the apoptosis (A and B) and ROS production (C and D) induced by AA in HepG2 cells. Data presentation and experimental methods for apoptosis and ROS production are the same as Fig. 1 and 2, respectively. In these experiments Indo (30 μ M), a COX inhibitor and NDGA (50 μ M), a LOX inhibitor were used. In bar graphs (B and D), the data represent the mean values of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control in which the cells were incubated with AA-free medium. # $P < 0.05$ compared to AA alone.

아라키돈산의 작용에 미치는 COX 및 LOX 저해제의 영향

아라키돈산은 포유동물의 세포막내에서 에스테르화된 상태로 존재하며 phospholipase A₂(PLA₂) 효소에 의해 sn-2 위치에서 acyl 결합이 가수분해 되어 유리되며,³¹⁾ 유리된 아라키돈산은 cyclooxygenase(COX) 및 lipoxygenase(LOX) 효소의 작용에 의해 각각 프로스타글란딘류와 류코트리엔 합성의 전구체로 이용된다.³²⁾ 따라서 아라키돈산에 의한 HepG2 간암세포 사멸작용이 이러한 COX와 LOX에 의한 대사생성물에 의해 일어날 수 있기 때문에 이들 효소에 대해 억제제로 알려져 있는 Indo 및 NDGA를 활용하여 이들 억제제가 아라키돈산에 의한 암세포 사멸작용 및 활성산소종 발생에 미치는 효과를 조사하였다. 결과에서 보여주듯이 Indo(30 μ M) 또는 NDGA(50 μ M)를 전처리했을 때 아라키돈산(10 μ M)에 의한 세포사멸(Fig. 3A와 B) 및 활성산소종 발생(Fig. 3C와 D)이 유의성있는 영향을 받지 않았다. 이 결과는 아라키돈산 대사체가 아라키돈산에 의한 암세포 사멸작용 및 활성산소종의 발생에 중요한 역할을 하지 않는다는 것을 시사한다. 하지만 COX 및 LOX 대사체가 암세포의 성장을 유도하며,^{33,34)} 특히 췌장암세포에서 이들 효소가 암세포의 성장과 깊은 관계가 있다는 사실이 보고되었다.³⁵⁾ 최근에는 HepG2 세포에서도 COX-

2 선택적 저해제인 meloxicam³⁶⁾ 및 5-LOX 선택적 저해제인 zileuton³⁷⁾에 의해 세포사멸이 일어난다는 사실이 발표되었다. 현재로서 이와 같은 서로 다른 연구결과들의 정확한 이유는 모르지만 이 결과들이 시사하는 바는 같은 신호라 하더라도 암세포의 종류와 환경에 의해서 다르게 나타날 수 있다는 것이다.

결론

본 연구실에서는 HepG2 간암세포에서 아라키돈산이 세포사멸 이전에 중요한 매개체로 작용하고 있다는 사실을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이러한 아라키돈산의 작용기전에 미치는 NADPH 산화효소-매개성 활성산소종의 역할을 조사하였다. 실험결과에서 아라키돈산에 의한 HepG2 세포의 사멸은 다양한 NADPH 산화효소 저해제에 의해 유의성 있게 억제되었다. 또한 아라키돈산에 의한 활성산소종의 발생도 이러한 NADPH 산화효소 저해제에 의해 유의성 있게 차단되었다. 하지만 아라키돈산에 의한 세포사멸은 COX와 LOX 저해제의 전처리에 의해 영향을 받지 않았다. 종합적으로 이 결과는 HepG2 세포에서 아라키돈산에 의한 세포사멸에 NADPH 산화효소가 중요한 매개체

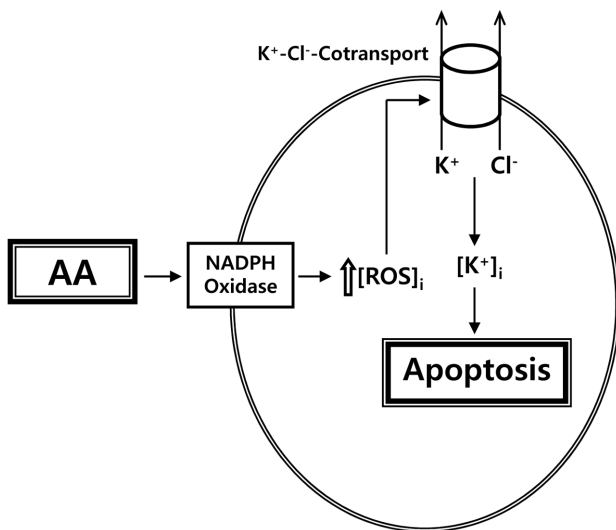


Fig. 4 – Proposed role of NADPH oxidase in the mechanism of AA-induced apoptosis in HepG2 cells.

로 작용하고 있음을 시사한다(Fig. 4). 또한 이 결과로서 NADPH 산화효소가 간암 치료제의 개발에 표적으로 활용될 충분한 가치가 있다고 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2011년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 1) Kidd, V. J. : Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 533 (1998).
- 2) Mondello, C. and Scovassi, A. I. : Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell. Biochem.* **50**, 307 (2010).
- 3) Isaacs, J. T. : Role of programmed cell death in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **101**, 27 (1993).
- 4) Speirs, C. K., Hwang, M., Kim, S., Li, W., Chang, S., Varki, V., Mitchell, L., Schleicher, S. and Lu, B. : Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 43 (2011).
- 5) Babior, B. M. : The respiratory burst oxidase. *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 55 (1995).
- 6) Jones, S. A., O'Donnell, V. B., Wood, J. D., Broughton, J. P., Hughes, E. J. and Jones, O. T. : Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **271**, H1626 (1996).
- 7) Marshall, C., Mamary, A. J., Verhoeven, A. J. and Marshall, B. E. : Pulmonary artery NADPH oxidase is activated in

- hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 633 (1996).
- 8) Youngson, C., Nurse, C., Yeger, H., Curnutte, J. T., Vollmer, C., Wong, V. and Cutz, E. : Immunocytochemical localization on O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 101 (1997).
- 9) Kummer, W. and Acker, H. : Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J. Appl. Physiol.* **78**, 1904 (1995).
- 10) Zhao, Y., Liu, J. and McMartin, K. E. : Inhibition of NADPH oxidase activity promotes differentiation of B16 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **19**, 1225 (2008).
- 11) Babior, B. M. : NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464 (1999).
- 12) Kim, J. A. and Lee, Y. S. : Role of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase in the mechanism of activation of K⁺-Cl⁻-cotransport by N-ethylmaleimide in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic. Res.* **35**, 43 (2001).
- 13) Choi, S. I., Jeong, C. S., Cho, S. Y. and Lee, Y. S. : Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 1328 (2007).
- 14) Monjazebe, A. M., High, K. P., Koumenis, C. and Chilton, F. H. : Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 463 (2005).
- 15) Claria, J. : Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **1**, 369 (2006).
- 16) Nakanishi, M. and Rosenberg, D. W. : Roles of cPLA2a and arachidonic acid in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 1335 (2006).
- 17) Pompeia, C., Lima, T. and Curi, R. : Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell. Biochem. Funct.* **21**, 97 (2003).
- 18) Scorrano, L., Penzo, D., Petronilli, V., Pagano, F. and Bernardi, P. : Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **276**, 12035 (2001).
- 19) Jayadev, S., Linardic, C. M. and Hannun, Y. A. : Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor α . *J. Biol. Chem.* **269**, 5757 (1994).
- 20) Bocca, C., Bozzo, F., Martinasso, G., Canuto, R. A. and Miglietta, A. : Involvement of PPAR α in the growth inhibitory effect of arachidonic acid on breast cancer cells. *Br. J. Nutr.* **100**, 739 (2008).
- 21) Lee, Y. S. : Arachidonic acid mediates apoptosis induced by N-

- ethylmaleimide in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Biomole. Thera.* **17**, 379 (2009).
- 22) Notarnicola, M., Messa, C., Refolo, M. G., Tutino, V., Miccolis, A. and Caruso, M. G. : Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line. *Lipids Health Dis.* **10**, 10 (2011).
- 23) Jiang, F., Zhang, Y. and Dusting, G. J. : NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol. Rev.* **63**, 218 (2011).
- 24) Morgan, M. J. and Liu, Z. G. : Reactive oxygen species in TNF α -induced signaling and cell death. *Mol. Cells* **30**, 1 (2010).
- 25) Lee, Y. S., Kang, Y. S., Lee, J. S., Nicolova, S. and Kim, J. A. : Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic. Res.* **38**, 405 (2004).
- 26) Hsieh, Y. C., Rao, Y. K., Wu, C. C., Huang, C. Y., Geethangili, M., Hsu, S. L. and Tzeng, Y. M. : Methyl antcinatate A from *Androdia camphorata* induces apoptosis in human liver cancer cells through oxidant-mediated cofilin- and Bax-triggered mitochondrial pathway. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1256 (2010).
- 27) Chen, C. Y., Liu, T. Z., Chen, C. H., Wu, C. C., Cheng, J. T., Yiin, S. J., Shih, M. K., Wu, M. J. and Chern, C. L. : Isoobtusilactone A-induced apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells is mediated via increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) production and the mitochondria-associated apoptotic mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1268 (2007).
- 28) Lee, Y. S. : Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 1183 (2005).
- 29) Montero, A. J. and Jassem, J. : Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* **71**, 1385 (2011).
- 30) Li, Z. Y., Yang, Y., Ming, M. and Liu, B. : Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 5 (2011).
- 31) Bonventre, J. V. : Phospholipase A₂ and signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 128 (1992).
- 32) Harizi, H., Corcuff, J. B. and Gualde, N. : Arachidonic acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* **14**, 461 (2008).
- 33) Cuendet, M. and Pezzuto, J. M. : The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. *Drug Metabol. Drug Interact.* **17**, 109 (2000).
- 34) Pidgeon, G. P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O'Byrne, K., Nie, D. and Honn, K. V. : Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 503 (2007).
- 35) Ding, X. Z., Tong, W. G. and Adrian, T. E. : Cyclooxygenases and lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology* **1**, 291 (2001).
- 36) Li, J., Chen, X., Dong, X., Xu, Z., Jiang, H. and Sun, X. : Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1814 (2006).
- 37) Xu, X. M., Deng, J. J., Yuan, G. J., Yang, F., Guo, H. T., Xiang, M., Ge, W. and Wu, Y. G. : 5-Lipoxygenase contributes to the progression of hepatocellular carcinoma. *Mol. Med. Report* **4**, 1195 (2011).