



Original Article

Metformin에 의해 발생한 H4IIE 간암세포의 세포사멸 과정에서 자가포식의 역할

백근호¹, 박덕배¹✉

¹제주대학교 의학전문대학원 의학과

Role of autophagy in metformin-induced apoptosis of H4IIE hepatocellular carcinoma cells by Keunho Baek¹, Deokbae Park¹ (Department of Medicine, School of Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakro, Jeju 63243, Republic of Korea)

Abstract Metformin, a predominantly prescribed anti-diabetic drug for decades, has gained new insights for its anti-tumor activity in a variety of cancer cells. Our previous studies also showed the obvious pro-apoptotic activity of metformin and the underlying action mechanisms in hepatocellular carcinoma cells. Together with apoptosis, autophagy is a crucial intracellular process to determine the survival or death of cells under some stressful environments. The present study aimed to determine the role of autophagy in metformin-induced death of H4IIE hepatocellular carcinoma cells. Metformin blocked the formation of autophagosome and the expression of LC3A, generally described as a biomarker of autophagy. Inhibition of AMPK reversed the metformin-induced blockade of autophagy. Antioxidant (NAC) suppressed the metformin-induced cell death but not affected LC3A. The inhibition of protein kinase C totally restored the metformin-suppressed expression of LC3A. In summary, our present study suggests that autophagy is an anti-apoptotic player in metformin-induced apoptosis in H4IIE cells.

Key words: Metformin, Apoptosis, Autophagy, H4IIE hepatocellular carcinoma cells, PKC

서 론

메트포르민 (metformin)은 현재 전 세계에서 제2형 당뇨병 (type II diabetes mellitus) 환자들에게 가장 많이 처방되고 있는 약제이다. 메트포르민은 여러 과정의 대사조절을 통해 과도하게 증가되어 있는 혈중 포도당 농도를 낮춘다.¹⁾ 메트포르민은 AMP-stimulated protein kinase (AMPK)를 활성화시켜서 간세포에서의 포도당신생 (gluconeogenesis)을 억제하고

반대로 근육세포에서의 포도당흡수를 증가시킨다.²⁾ 메트포르민은 인슐린수용체의 발현을 증가시키거나 수용체의 티로신 인산화효소의 활성을 자극하여 제2형 당뇨병환자에서 나타나는 인슐린저항성을 극복하는 데 기여하기도 한다.³⁾ 최근의 연구결과들은 메트포르민의 새로운 약리활성들에 주목하고 있는데 그중에서도 메트포르민의 항암활성이 실제 암환자들에게서 기존 항암요법의 대체 또는 보완요법으로 도입될 수 있는지에 대한 관심이 높아지고 있다.⁴⁻⁷⁾ 실제 여러 후향적 연구들에서 제2형 당뇨병환자 그룹에서의 암발생률이 정상인에 비해 높게 나타난다.⁸⁻¹¹⁾ 세포수준에서의 작동기전으로는 메트포르민은 직접 세포사멸 (apoptosis)을 일으키거나 세포증식 (proliferation)을 억제하는 방법으로 항암활성을 유도할 수 있는데, 실제로 메트포르민은 AMPK 활성이나 mammalian

Received: March 13, 2020; Revised: May 8, 2020; Accepted: May 9, 2020

✉ Correspondence to : Deokbae Park

Department of Medicine, School of Medicine, Jeju National University,
102 Jejudaehakro, Jeju 63243, Republic of Korea
Tel: 82-64-753-3827
E-mail: parkdb@jeju.ac.kr

target of rapamycin (mTOR)의 활성화에 변화를 일으켜 세포증식이나 단백질합성에 영향을 미칠 수 있으나 여러 관련 연구들에도 불과하고 아직 메트포르민이 어떻게 암세포의 사멸을 유도하거나 증식을 억제하는지에 대한 자세한 작동기전은 아직 분명하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구자들 또한 이전의 연구결과들에서 메트포르민이 간암세포의 포도당대사를 과도하게 증가시키는 과정에서 활성산소의 생성이 증가하여 이로 인한 산화스트레스가 세포사멸을 유도하는 중요한 요인으로 지목한 바 있다.^{12,13} 세포의 증식 또는 죽음에 영향을 미치는 또 다른 조절요인은 세포의 자가포식(autophagy)의 작동이다. 자가포식의 역할에 대해서는 서로 다른 견해들이 있는데, 세포가 스트레스를 받는 환경에서 죽지 않고 생존하기 위한 수단이라는 주장과 함께, 세포사멸의 한 과정이라는 상반된 견해도 있다.^{14,15} 이런 견해들로부터, 자가포식은 주어진 생리적, 병리학적 환경에 따라 서로 다른 역할을 담당하는 소위 양날의 검과 같은 세포활성으로 이해하여야 하므로 실제로 살아있는 각각의 세포들이 처해있는 환경이나 질병조건에 따라 서로 다른 활성이 나타나는 특이성을 이해하고 그에 따르는 작동기전을 규명하여야 한다. 본 연구는 배양 중인 간암세포에서 메트포르민이 세포사멸을 유발하는 과정에서 나타나는 자가포식의 바이오마커가 어떻게 변화하는지를 관찰하고 이러한 자가포식 현상이 세포사멸의 유발에 따른 현상인지, 아니면 세포사멸을 회피하기 위한 생존수단인지를 확인하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

실험재료

우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 제외한 세포배양 및 분석실험에 필요한 시약들은 씨그마-알드리치(Sigma-Aldrich Chemical Corp., Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 FBS는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)로부터, poly ADP ribose polymerase (PARP), cleaved caspase-3, LC3A, β -actin 다중/단일클론항체는 Cell Signaling Technology (Denvers, MA, USA)로부터 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였고 전기영동과 Western blot 분석에 필요한 시약들은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 이외의 일반 시약들은 씨그마-알드리치로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

흰쥐의 간세포암(hepatocellular carcinoma) 세포주인 H4IIE 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea) 으로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 기본배양액으로는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함되어 있는 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, 5.5 mM glucose)를 세포의 계대배양에 사용하였다.

MTT 활성분석

세포의 생존 정도(viability)는 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 활성을 측정하여 비교분석하였다.¹⁶ 요약하면, H4IIE 세포를 계대배양 시에 10% FBS를 포함하고 있는 24-well 배양접시에 옮겨 70~80% 밀도에 도달할 때까지 배양한 후 FBS가 제외된 배양액에서 24 시간 더 배양하여 FBS에 의한 잔존 증식유발 요인을 회피(serum-starvation)하였다. 시료 처리가 끝난 세포는 MTT (0.5 mg/mL)를 포함한 Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (D-PBS)에서 30분간 배양하여 생성된 formazan product를 0.5 mL isopropyl alcohol로 녹인 뒤 570 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

Western blotting 분석

Serum-starvation 후 시료처리가 끝난 배양세포를 저온의 균질완충액(ice-cold lysis buffer; 50 mM Tris-HCl, 1% nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, and 1 mM pepstatin A)에 넣어 균질화시키고 4°C, 10,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻고 단백질의 농도를 측정하였다. 동일한 양(20 mg protein)의 시료를 4~12% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 PVDF filter로 옮긴 뒤 Western blotting에 사용하였다. PVDF filter를 blocking buffer (5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline [TBS]-0.1% Tween-20 [TBS-T])에 넣어 상온에서 1 시간 동안 반응시키고 난 뒤 1,000~2,000으로 희석한 1차 항체 TBS-T 완충액에 넣어 10시간 이상 반응시켰다. 이어 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 이차항체 (10,000배 희석) 완충액에서 30분간 반응시키고 난 뒤 enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Intron, Seongnam, Korea)를 사용하여 x-ray film에 노출시킨 뒤 현상하였다.

H33342-acridine orange 염색

세포사멸 biomarker인 세포핵의 응축은 세포막투과성 DNA 형광염색제인 H33342 (bisBenzimide H33342 trihydrochloride)로 염색하여 관찰하였다. 배양과 시료처치가 끝난 뒤 H33342 (1 mg/mL in D-PBS)를 배양접시에 넣어 10분간 반응시킨 뒤 디지털카메라(DP-70, Olympus, Japan)가 장착되어 있는 형광현미경(IX70, Olymou, Japan)으로 관찰하고 촬영하였다. 세포질 내부에 형성된 자가포식체 (autophagosome)는 acridine orange를 사용한 가수분해소체 (lysosome) 형광염색으로 관찰하였다. 배양과 시료처치가 끝난 세포를 acridine orange (1 mg/mL)이 포함된 2% acetone (in D-PBS) 염색액에서 15분간 염색하고 세척한 뒤 디지털카메라(DP-70, Olympus, Japan)가 장착되어 있는 형광현미경(IX70, Olymou, Japan)으로 관찰하고 촬영하였다.

통계분석

각 실험결과는 평균값±표준오차 (mean±standard error)로 표시하였다. 대조군과 실험군과의 통계적 유의성 검정은 student's t-test로 시행하였고 $p < 0.05$ 의 범위에서 유의적 차이를 부여하였다.

결 과

이전의 연구결과^{12,13}에서, 메트포르민이 H4IIE 세포의 생존능을 감소시키고 세포사멸의 여러 바이오마커들을 자극한다는 결과를 확인하였으나 자가포식에 어떤 영향에 미치는지는 확인하지 못하였다. 이전의 실험에서와 동일한 배양 및 처리 조건에서 메트포르민이 H4IIE 세포의 자가포식을 억제 또는 자극하는지를 확인하기 위하여 자가포식의 대표 현상인 자가포식체 (autophagosome)의 생성을 나타내는 지표 단백질인 LC3A 단백질의 발현 정도를 Western blot 분석으로 확인하였고 동시에 자가포식체 형성과정에서 초기에 형성되는 가수분해소체 (lysosome)의 생성이 실제로 세포질 안에서 일어나는지를 acridine orange 염색으로 확인하였다. MTT assay 결과로부터, 메트포르민에 의해 감소한 세포의 생존도는 AMPK 저해제인 compound C 처리에 의해 유의하게 증가하였다 (Fig. 1A). 세포사멸의 대표적 바이오마커인 poly-ADP ribosyltransferase (PARP)와 caspase-3의 가수분해가 메트포르민 처리로 증가한 반면 LC3 단백질의 발현은 메트포르민의 처리로 감소하였다가 AMPK 저해제인 compound C 처리로 다시 증가하였다 (Fig. 1B). 세포사멸의 또다른 바이오마

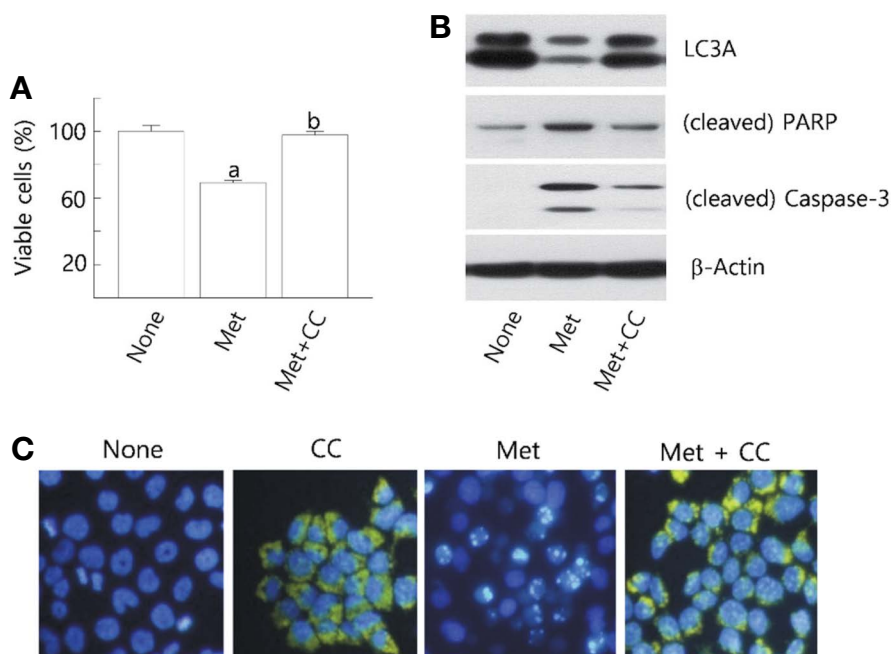


Figure 1. Effect of metformin on the apoptosis and autophagy in H4IIE cells. Cells were serum-starved overnight then preincubated with 20 μ M Compound C (CC) for 30 min before the additional treatment with metformin (Met, 1 mM) for 24 h. (A) The viability of cells were presented as a percentage of control (none) from results of MTT assay. Each bar represented the mean \pm S.E. (n=4). ^a $P < 0.01$ vs. the non-treated control, ^b $P < 0.01$ vs. Met. (B) Each panel from Western blot analysis is a representative of duplicated experiments. (C) Cells were stained with H33342 (blue), thereafter stained with acridine orange (yellow-green) as described in “Materials and Methods”.

커인 세포핵염색질의 응축과 세포사멸소체 (apoptotic body) 형성이 메트포르민의 처리로 증가하였는데 compound C 처리로 감소하였다 (Fig. 1C). 자가포식체의 형성을 보여주는 acridine orange 형광염색도는 대조군에서 관찰되지 않았으나 compound C를 처리하였을 때 분명하게 증가하였는데 세포사멸소체 형성이 억제됨과 동시에 자가포식체의 형성이 증가하는 현상을 확인할 수 있었다.

본 연구자들의 이전 연구에서 메트포르민이 포도당대사를 과도하게 증진하는 동시에 활성산소종의 생성을 증가시켰기 때문에 이러한 현상들이 세포의 자가포식에 어떤 영향을 미치는지를 판별하기 위해 메트포르민의 작용에 항산화제의 처리가 어떤 영향을 미치는지를 분석하였다. 항산화제인 NAC의 전처리는 메트포르민에 의해 감소한 세포생존도를 다시 유의하게 회복시켰다 (Fig. 2). 동일한 환경에서 메트포르민에 의해 증가하는 caspase-3의 가수분해가 NAC에 의해 분명히 억제된 반면, 메트포르민에 의해 감소하였던 LC3A 단백질

의 발현이 NAC에 의해 회복되지는 못하였다. 이러한 결과로부터 메트포르민에 의해 생성이 증가된 활성산소종이 최소한 자가포식과정에서 자가포식체의 생성에 직접 영향을 미치는 단계인 LC3A 단백질의 발현에는 직접 관여하지 않는 것으로 추측할 수 있으나 자가포식의 여러 바이오마커를 복수로 확인하지 못하였기 때문에 더 많은 타겟을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

메트포르민이 H4IIE 세포의 사멸을 유도하는 과정에서 AMPK의 활성을 필요로 한다는 사실이 확인되었으나 그 외의 다른 어떤 세포 내 신호전달단백질 활성들을 필요로 하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서도 세포 내 신호전달단백질들에 대한 다양한 저해제들이 메트포르민의 세포사멸 유도효과를 저해할 수 있는지를 검색하였고 그중 protein kinase C 저해제 (PKCi) 가 유의하게 메트포르민의 효과를 저해할 수 있음을 알 수 있었다 (data not shown). 따라서 PKCi 처리가 메트포르민에 의한 자가포식 억제에 영향

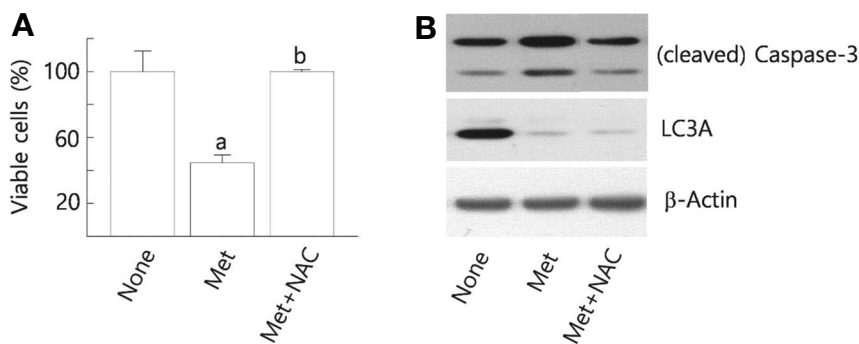


Figure 2. Effect of NAC on metformin-induced changes in the degree of apoptosis and autophagy in H4IIE cells. Cells were serum-starved overnight then preincubated with N-acetylcysteine (NAC, 4 mM) for 30 min before the additional treatment with metformin (Met, 1 mM) for 24 h. (A) The viability of cells were presented as a percentage of control (none) from results of MTT assay. Each bar represented the mean \pm S.E. (n = 4). ^a*P* < 0.01 vs. the non-treated control, ^b*P* < 0.01 vs. Met. (B) Each panel from Western blot analysis is a representative of duplicated experiments.

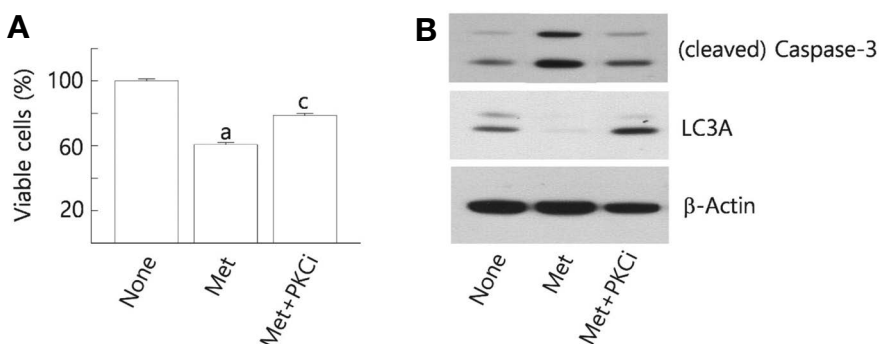


Figure 3. Effect of protein kinase C inhibitor (PKCi) on metformin-induced changes in the degree of apoptosis and autophagy in H4IIE cells. Cells were serum-starved overnight then preincubated with 200 nM PKCi for 30 min before the additional treatment with metformin (Met, 1 mM) for 24 h. (A) The viability of cells were presented as a percentage of control (none) from results of MTT assay. Each bar represented the mean \pm S.E. (n = 4). ^a*P* < 0.01 vs. the non-treated control, ^c*P* < 0.05 vs. Met. (B) Each panel from Western blot analysis is a representative of duplicated experiments.

을 미치는지를 확인하였는데, PKCi는 메트포르민에 의해 억제된 LC3A 단백질의 발현을 완벽하게 회복시켰다(Fig. 3). 이러한 결과로부터 메트포르민에 의해 증가된 PKC 활성이 세포의 자가포식을 유도하는 주요 조절인자임을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구로부터 메트포르민은 H4IIE 간암세포의 세포사멸을 유도하는 반면에 세포의 자가포식을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 메트포르민 처리로 활성산소종의 생성과 이로 인한 산화스트레스의 발생이 세포사멸을 유도하는 주요한 요인들 중 하나인 것은 분명하지만 세포의 자가포식 억제나 회복과정에는 중요하게 관여하지는 않을 것이라는 것을 알 수 있었다. 따라서 적어도 H4IIE 간암세포에서는 자가포식이 세포사멸을 유도하기 위한 동일선상의 작동기전은 아닌 것으로 판단할 수 있다. 현재까지 알려진 사실들에 따르면 세포의 생사는 자가포식-세포사멸, 두 기전의 작동여부에 의해 조절된다. 특히 자가포식 활성은 칼의 양면과 같은 기능을 갖는데, 세포 내 손상된 단백질, 소기관, 병원요인 (pathogens) 등을 적절히 제거하여 세포의 생존에 기여하는 반면에 과도하게 세포 내 소기관을 가수분해하거나 파괴하여 세포사멸을 유도하기도 한다.^{17,18)} 이런 세포사멸-자가포식의 상호작용(interplay)은 대단히 복잡한 현상이다.¹⁹⁾ 세포사멸과 자가포식의 서로 상대활성을 증진하거나 반대로 억제할 수 있고 또 각각 독립적으로 발생할 수도 있다.²⁰⁾ 따라서 자가포식의 양면적 활성이 어느 조건에서 정교하게 조절되는지를 무엇보다 중요하게 규명하여야 한다.

본 연구의 실험조건에서 메트포르민에 의해 포도당대사가 과도하게 증진되는 결과로 세포 내 산화스트레스가 누적되고 이로 인해 증가하는 산화-손상된 단백질들을 일시적으로 제거하기 위한 세포방어 작용으로서 세포자가포식이 일어날 수 있다. 그러나 세포들이 24시간 이상 메트포르민에 지속적으로 노출되어 산화적 손상 정도가 회복하기 어려운 수준으로 증가하게 되면 결과적으로 세포사멸 활성이 증가되는 방향으로 바뀌어질 수 있다. 결국 세포사멸-자가포식이 단순히 동반- 또는 반대 방향을 향해 수반되는 현상이라기보다는 세포 내 손상의 강도와 지속시간의 정도에 따라 순차적으로 일어나는 현상이라는 점을 이해하고 이를 구체적으로 확인하기 위한 다양한 분석들이 치밀하게 수반되어야 할 것으로 판단된다. 이를 위해 자극(메트포르민)의 강도와 지속시간

을 세밀하게 분류하여 세포사멸-자가포식의 상대적 발생빈도와 추이에 관한 결과들을 세밀하게 분석하면 두 현상의 임계(또는 전이) 시점과 그 시점에서의 세포 내 환경요인들을 파악할 수 있을 것으로 기대된다.

메트포르민에 의해 세포사멸이 유도되고 자가포식이 억제되는 과정에서 PKC의 역할에 대해서는 현재까지의 연구결과들이 분명한 증거들을 보여주고 있지 못하다. 본 연구에서, 메트포르민의 작동기전 중에 PKC가 어느 단계에 개입하는가에 대한 질문에 대답하기 위한 한 가지 가능성은 활성산소종의 생성과 PKC의 역할 관계를 포함할 수 있다. 메트포르민은 미토콘드리아의 complex I을 저해하여 활성산소 생성을 증가시킬 수 있다.²¹⁾ 실제로 대장암세포에서 메트포르민은 활성산소종 생성을 증가시켜 세포의 증식을 억제하기도 한다.²²⁾ 미토콘드리아를 제외하고 활성산소종의 또다른 생성요인은 NADP oxidases (NOXs)를 들 수 있다. 혈관세포에서는 포도당농도가 증가하면 세포 내 diacylglycerol 생성이 증가하고 PKC가 활성화되어 활성산소종 생산이 증가하는데 이 과정에서 PKC가 NOXs 활성을 자극하는 것이 중요한 원인으로 알려져 있다.²³⁾ 실제로 간암세포에서도 여러 종류의 NOXs가 발현된다.²⁴⁾ 이러한 이전 연구결과들을 본 연구결과의 해석에 이용하면, 메트포르민의 포도당대사 활성 자극으로 인해 세포 안으로의 포도당 유입이 증가하고 이 과정에서 미토콘드리아 complex I뿐 아니라 PKC-NOXs 활성을 통한 활성산소종의 증가가 세포사멸을 유도할 수 있을 것이다. 다만 이 과정에서 자가포식 활성이 세포 내 활성산소종 생성증가와 연관되어 있는지는 아직 불분명하고 추후 계속 규명되어야 할 과제이다.

결론적으로 본 연구에서는 메트포르민이 H4IIE 세포사멸을 유도하는 과정에서 자가포식이 억제되는 현상이 발견되었고 이 과정에 PKC가 중요한 조절요인으로 작동한다는 사실을 확인하였다. 이후의 연구에서는 메트포르민-자가포식-PKC의 순차적 작동 기전이 어떻게 조절되는지를 규명할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 제주대학교 발전기금 제주대학교병원 학술연구기금의 지원에 의해서 연구되었음.

REFERENCES

1. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, An-

- dreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (London, England: 1979)* 2012;122: 253-70.
2. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 2011;54:3101-10.
 3. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1323-32.
 4. Quinn BJ, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:469-80.
 5. Forouzandeh F, Salazar G, Patrushev N, Xiong S, Hilenski L, Fei B, et al. Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e001202.
 6. Hattori Y, Hattori K, Hayashi T. Pleiotropic benefits of metformin: macrophage targeting its anti-inflammatory mechanisms. *Diabetes* 2015;64:1907-9.
 7. Khang R, Park C, Shin JH. Dysregulation of parkin in the substantia nigra of db/db and high-fat diet mice. *Neuroscience* 2015;294:182-92.
 8. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1103-23.
 9. Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 2010;33:322-6.
 10. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergental RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 2010;33:1674-85.
 11. Fransgaard T, Thygesen LC, Gogenur I. Metformin Increases Overall Survival in Patients with Diabetes Undergoing Surgery for Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2016;23:1569-75.
 12. Park DB. Metformin Promotes Apoptosis but Suppresses Autophagy in Glucose-Deprived H4IIE Hepatocellular Carcinoma Cells. *Diabetes Metab J* 2015;39:518-27.
 13. Park D. Metformin Induces Oxidative Stress-Mediated Apoptosis without the Blockade of Glycolysis in H4IIE Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biol Pharm Bull* 2019;42:2002-8.
 14. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:741-52.
 15. Nezis IP, Shrivage BV, Sagona AP, Lamark T, Bjorkoy G, Johansen T, et al. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J Cell Biol* 2010;190:523-31.
 16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 17. Gump JM, Thorburn A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol* 2011;21:387-92.
 18. Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 2015;22:367-76.
 19. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddi JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 2014;112:24-49.
 20. Mi Y, Xiao C, Du Q, Wu W, Qi G, Liu X. Momordin Ic couples apoptosis with autophagy in human hepatoblastoma cancer cells by reactive oxygen species (ROS)-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Free Radic Biol Med* 2016;90:230-42.
 21. Bridges HR, Jones AJ, Pollak M, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* 2014;462:475-87.
 22. Mogavero A, Maiorana MV, Zanutto S, Varinelli L, Bozzi F, Belfiore A, et al. Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Sci Rep* 2017;7:15992.
 23. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11059-63.
 24. Eun HS, Cho SY, Joo JS, Kang SH, Moon HS, Lee ES, et al. Gene expression of NOX family members and their clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2017;7:11060.