



Original Article / 원저

독소루비신에 의한 인간 위암 세포사멸에서 홍화의 시너지 효능 연구

김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학교실

A study on the synergistic efficacy of *Carthami flos* in apoptosis of human gastric cancer by doxorubicin

Byung Joo Kim*

*Division of Longevity and Biofunctional Medicine School of Korean Medicine,
Pusan National University*

ABSTRACT

Objectives : This study is to investigate whether *Carthami flos* exhibits a synergistic effect on the apoptotic effect of doxorubicin on human gastric cancer cells.

Methods : We used AGS, a human gastric cancer cell line. To investigate the apoptotic efficacy of doxorubicin and *Carthami flos*, MTT and CCK-8 methods were used. To confirm apoptosis, cell cycle and mitochondrial membrane potential changes were confirmed. To investigate the mechanism of apoptosis, the reactive oxygen species (ROS) experiment was performed.

Results :

1. Doxorubicin or *Carthami flos* induced cell death in the human gastric cancer cell line AGS.
2. *Carthami flos* showed a synergistic effect of cell death by doxorubicin.
3. The cell cycle and mitochondrial membrane potential changes revealed that cell death was apoptosis.
4. Apoptosis was related to reactive oxygen species (ROS) generation.

Conclusions : This result shows the anticancer synergistic effect of *Carthami flos* in gastric cancer cells, and is considered to be an important basis for the development of anticancer drugs for *Carthami flos*.

Key words : *Carthami flos*, Doxorubicin, Human Gastric Cancer Cell, Apoptosis.

I. 서론

한약제제는 오랜기간 동안 암을 포함한 다양한 질환의 예방과 치료에 사용되어왔다. 한약제제는 일반적으로 세포독성이 낮고 화학 치료제와 시너지 효과를 나타낼 수 있다^{1,2)}. 따라서 이들은 잠재적인 항암제일 뿐만 아니라 다른 화학요법제와 함께 보조제로 사용될 수도 있다^{3,4)}.

홍화는 다양한 활성 성분을 포함하는 국화과의 식물이다⁵⁾. 홍화는 항산화⁶⁾, 항염⁷⁾, 항균⁸⁾ 활성 등 다양한 생물학적 효과를 발휘하며, 급성 뇌경색⁹⁾ 및 허혈성 뇌졸중¹⁰⁾의 개선에 유익한 것으로 보고되고 있다. 또한 면역 조절 기능 및 항암 효과를 보이는 다양한 증거도 있다^{11,12)}. MCF-7 유방암 세포 증식 및 전이를 억제하는 것으로 나타났고¹³⁾, 또한 세포주기 관련 유전자의 발현 조절을 통해 인간 간암 SMMC-7721 세포의 증식을 억제하는 것으로 밝혀졌다¹⁴⁾. 또한, 비소세포폐암과 결장직장암에서도 세포 성장과 세포사멸에 영향을 미치는 것으로 확인되었다^{15,16)}.

세포사멸(apoptosis)은 프로그램된 세포사멸의 과정으로 일반적으로 뚜렷한 형태학적 특성과 에너지 의존적 생화학적 메커니즘을 특징으로 한다¹⁷⁾. 세포사멸은 정상적인 세포 회전을, 면역 체계의 적절한 발달 및 기능, 호르몬 의존성 위축, 배아 발달 및 화학 물질에 의한 세포사멸을 포함한 다양한 과정의 중요한 구성 요소로 간주된다¹⁷⁾. 부적절한 세포사멸은 신경퇴행성 질환, 허혈성 손상, 자가면역 장애 및 다양한 유형의 암을 포함한 많은 질환을 일으키고, 세포의 삶이나 죽음을 조절하는 능력은 엄청난 치료 잠재력으로 알려져 있다¹⁸⁾. 과거 연구를 보면 위암 세포주에서 독소루비신과 함께 연합하여 시너지 효과를 보이는 물질들이 알려지고 있다^{19,20)}. 본 연구에서는 홍화의 위암 세포주에서의 효능을 확인하고 독소루비신에 의한 세포사멸에 홍화의 시너지 효과를 확인하는 기초적 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(1) 약재

독소루비신은 Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom)

에서 구입하였고, 홍화 추출물은 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행(Plant Extract Bank; CA04-085 (2nd))에서 구입한 알콜 추출물을 사용하였다. 그 외의 모든 재료는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

(1) MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석

인간 위암 세포는 AGS 세포주를 사용하였고, RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 세포를 키웠다. 12웰 플레이트에 3×10^5 개의 세포 밀도로 접종 후 MTT (100 μ l) 분석을 사용하여 흡광도 570 nm에서 세포사멸을 측정하였다.

(2) 세포 계수 키트-8 분석

세포 계수 키트-8(CCK-8; Abbkine Co., Ltd., Hubei, China)를 사용하여 2시간 동안 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 세포 주기(cell cycle) 측정

AGS 세포를 에틸 알코올로 처리한 후 5분 동안 원심분리하고 상층액을 버렸다. 세포 펠렛은 RNase를 포함하는 propidium iodide (PI)로 염색하고 40분 동안 어두운 곳에서 배양한다. 샘플은 형광 활성화 세포 분류기를 사용하여 분석 (BD FACSCANTO II; BD Biosciences, Sunnyvale, CA, USA)하였다.

(4) 미토콘드리아 막전압 변화 측정

AGS 세포를 50nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 30분 동안 처리한 후 510 및 580 nm 방출 파장에서 BD FACSCANTO II (BD Biosciences, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

(5) 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 측정

ROS 수준은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로

*Corresponding author: Byung Joo Kim, Division of Longevity and Biofunctional Medicine School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel : +82-51-510-8469, Fax : +82-51-510-8420, E-mail : vision@pusan.ac.kr

•Received : April 18, 2022 / Revised : May 11, 2022 / Accepted : May 16, 2022

측정하였다. 형광은 488/525 nm의 파장으로 BD FACSCANTO II (BD Biosciences, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

(4) 통계 분석

실험성적은 평균±표준편차(mean ± SEM)로 나타내었으며, 결과의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test 또는 one-way ANOVA로 검정하여 p 값이 0.05 미만 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과

1. 인간 위암 세포에서 독소루비신과 홍화의 세포 사멸 효능 확인

인간 위암 세포에서 독소루비신의 세포사멸 효능을 MTT 방법을 통해서 확인해 보았다. 독소루비신 0.5-50

μM에 의해서 세포가 농도 의존적으로 사멸함을 알 수 있었다(Fig. 1A). 독소루비신의 항암 효능에 홍화의 시너지 효능을 확인하기 위해서 먼저 홍화에 의한 위암 세포 사멸 효능을 확인해 보았다. 홍화 50-400 μg/ml에 의해서 세포가 농도 의존적으로 사멸함을 알 수 있었다(Fig. 1B). 독소루비신에 의한 세포 생존 정도는 0.5 μM에서는 60.9±4.2% ($P<0.001$), 1 μM에서는 39.7±3.3% ($P<0.0001$), 5 μM에서는 28.1±2.5% ($P<0.0001$), 10 μM에서는 18.4±2.3% ($P<0.0001$), 50 μM에서는 15.2±1.8% ($P<0.0001$)이다. 홍화에 의한 세포 생존 정도는 50 μg/ml에서는 91.1±1.7% ($P<0.01$), 100 μg/ml에서는 80.5±2.0% ($P<0.0001$), 200 μg/ml에서는 69.3±1.9% ($P<0.0001$), 300 μg/ml에서는 59.3±3.0% ($P<0.0001$), 400 μg/ml에서는 39.8±3.8% ($P<0.0001$)를 나타내었다(Fig. 1A와 1B).

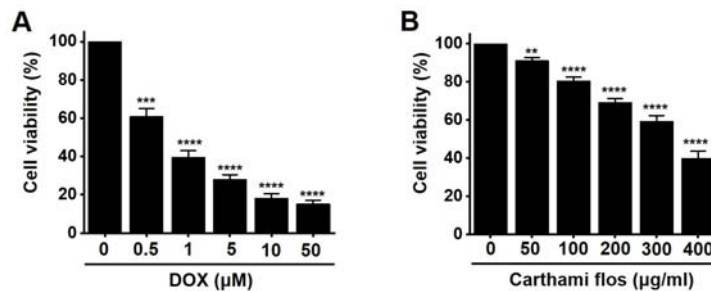


Fig. 1. DOX or Carthami flos reduces human gastric cancer cell viability after 24 h. (A) DOX or (B) Carthami flos reduces AGS cell viability dose-dependently. Results are presented as the mean ± SEM. ** $p<0.01$. *** $p<0.001$. **** $p<0.0001$. DOX, Doxorubicin.

2. 인간 위암 세포에서 독소루비신에 의한 세포사멸 효능에서 홍화의 시너지 효능 확인

독소루비신에 의한 인간 위암 세포사멸 효능에 홍화의 시너지 효능을 확인해 보았다. 독소루비신 0.5 μM와 홍화 100 μg/ml을 사용하였다. MTT 방법을 사용해 확인해 보니 독소루비신에 홍화를 함께 투여하면 세포사멸 효능이 증가하는 걸 확인할 수 있었다. 독소루비신에 의한 세포 생존은 59.9±3.7% 이지만 홍화를

함께 투여하면 세포 생존은 41.1±2.1% ($P<0.01$) 이었다(Fig. 2A). 같은 실험을 cell counting kit 방법을 이용해서 확인해 보았다. 독소루비신 0.5에 의한 세포 생존은 52.7±6.6% 이지만 홍화를 함께 투여하면 세포 생존은 39.1±2.7% ($P<0.001$)이었다. cell counting kit 방법을 통해서도 독소루비신과 홍화의 시너지 세포사멸 효능을 확인 할 수 있었다(Fig. 2B).

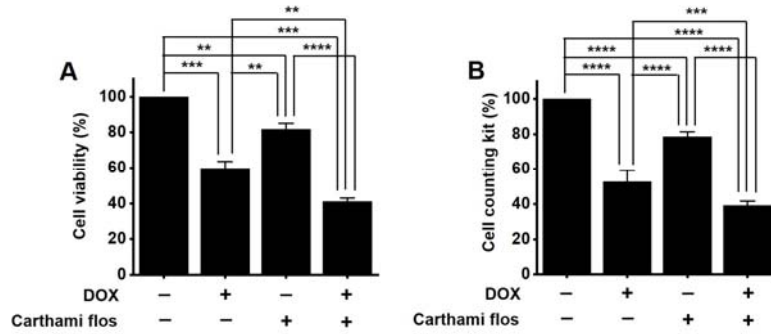


Fig. 2. Synergistic efficacy of Carthami flos in cell death of human gastric cancer cells by DOX. (A) MTT and (B) cell counting kit-8 assays showed that DOX and Carthami flos showed a synergistic effect of cell death on human gastric cancer cells. Results are presented as the mean \pm SEM. ** p <0.01. *** p <0.001. **** p <0.0001. DOX, Doxorubicin.

3. 세포주기 분석을 통한 세포사멸 기전 확인

세포주기 분석에 의한 세포사멸 유도를 확인하기 위해 독소루비신과 홍화에 의한 sub G1 비율의 변화를 확인하였다. 독소루비신 단독에 의해서는 8.1 \pm 1.1% 만큼 증가하였고, 홍화 단독에 의해서는 7.9 \pm 1.1% 만큼

증가하였다. 하지만 독소루비신과 홍화를 함께 투여하면 14.9 \pm 2.9% (P <0.05) 만큼 증가하였다(Fig. 3). 독소루비신 단독보다 홍화와 함께 투여하면 세포사멸 효능이 증가하는 걸 확인 할 수 있었다.

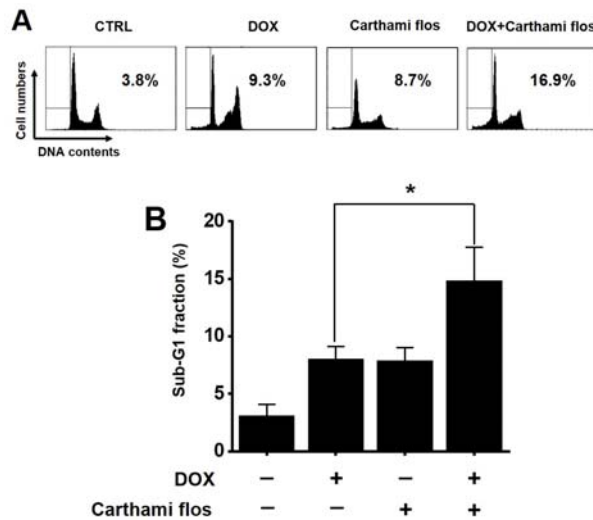


Fig. 3. Synergistic efficacy of Carthami flos in apoptosis of human gastric cancer cells by DOX in the sub-G1 phase. (A) Flow cytometric analysis showed that sub G1 cell cycle increased. (B) sub-G1 fractions are expressed. Results are presented as the mean \pm SEM. * p <0.05. DOX, Doxorubicin.

4. 미토콘드리아 막전압 분석을 통한 세포사멸 기전 확인

미토콘드리아 막전압 분석에 의한 세포사멸 유도를 확인하기 위해 독소루비신과 홍화에 의한 막전압 변화

를 TMRM를 통해서 확인하였다. 독소루비신 단독에 의해서는 119.8 \pm 4.6% (P <0.001) 만큼 증가하였고, 홍화 단독에 의해서는 43.5 \pm 3.8% (P <0.0001)로 감소하

였다. 또한 독소루비신과 홍화를 함께 투여하면 56.9±3.8% ($P<0.0001$)을 보였다(Fig. 4). 독소루비신

단독보다 홍화와 함께 투여하면 미토콘드리아 막전압 변화가 크게 변하는 걸 확인 할 수 있었다.

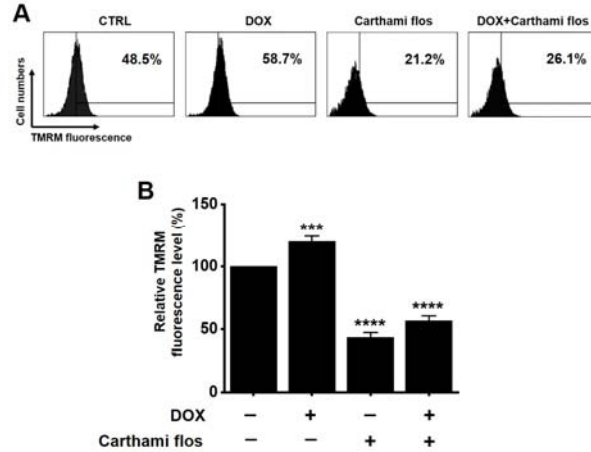


Fig. 4. Synergistic efficacy of *Carthami flos* in apoptosis of human gastric cancer cells by DOX in the depolarization of the mitochondrial membrane. (A) Fluorescence of mitochondrial membrane depolarization measured using FACS analysis. (B) Relative mitochondrial TMRM fluorescence levels. Results are presented as the mean ± SEM. *** $p<0.001$. **** $p<0.0001$. DOX, Doxorubicin.

5. 세포 내 ROS 생성 조절을 통한 세포사멸 기전 확인
 ROS는 또한 세포사멸에서 중요한 역할을 하기 때문에 독소루비신과 홍화에 의한 세포사멸에 ROS 관련성을 확인하였다. 세포 분석 결과 독소루비신이 ROS 수준을 증가시키지만 홍화와 함께 투여시 ROS발생이 더

증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 독소루비신 단독 처리시는 117.4±10.2%를 나타냈으며, 홍화 단독 처리시는 193.7±12.1% ($P<0.0001$), 독소루비신과 홍화를 함께 투여시는 194.9±10.9% ($P<0.0001$)를 나타냈다 (Fig. 5).

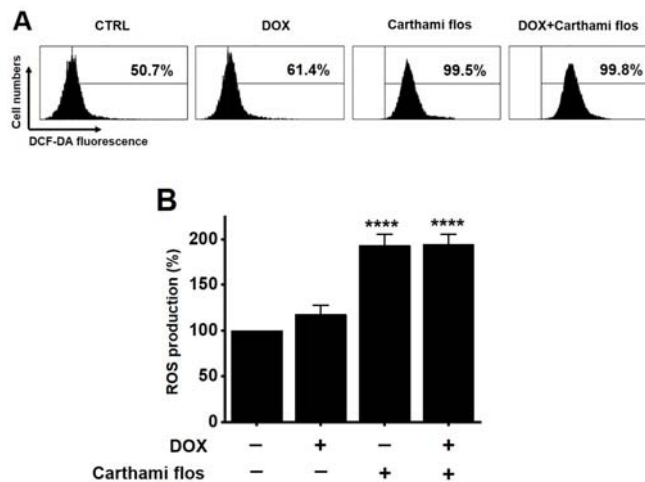


Fig. 5. Both DOX and *Carthami flos* increase ROS levels in human gastric cancer cells. (A) ROS levels measured with DCF-DA. (B) ROS productions are expressed. Results are presented as the mean ± SEM. **** $p<0.0001$. DOX, Doxorubicin.

IV. 고찰

수년 동안 한약제제는 사용되어 왔으며 여전히 많은 나라에서 의학적 치료의 주요 원천으로 사용되고 있다²¹⁾. 한약제제를 포함한 식물은 천연 방부제 특성으로 인해 의학에서 오랜기간 사용되어 왔고 암을 포함한 질병에 대한 잠재적인 나노물질 기반 약물의 제조를 위한 한약제제 추출물의 잠재적 특성 및 용도를 조사하는 것으로 발전 했다^{21,22)}. 많은 한약제제들이 이미 암의 발병을 치료하거나 예방한다. 여러 연구자들은 한약제제에 사용된 식물에 많은 초점을 두고 항암 특성을 입증한 식물 종을 확인 했다^{23,24)}.

홍화는 골다공증 유도 난소 절제술 쥐의 개선과 에스트로겐 결핍 유도 골 손실을 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되었고^{25,26)}, 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐의 혈장간 간 지질을 낮추는 효능을 가지고 있다²⁷⁾. 또 항암 활성에서 홍화는 MCF-7 인간 유방암 세포, HepG-2 인간 간세포 암종 세포 및 Hela 인간 자궁경부 선암종 세포에서 암세포 증식을 억제하는 것으로 보고 되었다²⁸⁾. 그러나 홍화의 암세포 증식을 억제하는 메커니즘은 여전히 확실하지 않다.

독소루비신은 널리 사용되는 항암제이다. 그러나 독소루비신 적용의 한계는 약물 내성 및 관련 심장 독성 효과 때문이다²⁹⁾. 독소루비신은 p-glycoprotein이라고도 하는 multi-drug resistance 1 (MDR1) 유전자를 상향 조절하여 약물 내성을 유도하고, 또한 독소루비신의 장기간 사용과 심장 독성 사이의 강력한 연관성을 보여 주었다^{30,31)}. 따라서 독소루비신은 오랜기간 많은 양을 사용할 수가 없다. 본 연구에서는 홍화에 의한 독소루비신의 항암 시너지 효능을 확인하였다. 독소루비신과 홍화 각각 세포사멸의 효능은 있지만 독소루비신 단독 투여 보다는 홍화와 함께 투여하였을 때 시너지 효능의 세포사멸이 나타남을 확인하였다.

세포사멸은 발달과 노화 그리고 조직의 세포 집단을 유지하기 위한 항상성 기전으로 정상적으로 발생 된다. 또한 면역 반응에서 세포가 질병이나 유해 물질에 의해 손상될 때와 같은 방어 메커니즘으로 발생 한다³²⁾. 세포사멸을 유발할 수 있는 생리학적 및 병리학적 다양한 자극과 조건이 있지만 모든 세포가 동일한 자극에 반응하여 반드시 죽는 것은 아니다. 암 화학 요법에 사용되는 방사선이나 약물은 일부 세포에서 DNA 손상을 일으키며, 이는 p53 의존성 경로를 통해 세포사멸을 유발

할 수 있다¹⁷⁾. 코르티코스테로이드와 같은 일부 호르몬은 일부 세포에서 세포사멸을 유발할 수 있지만 다른 세포는 영향을 받지 않거나 자극만 받기도 한다¹⁷⁾. 세포사멸 경로는 수많은 항암 치료의 핵심 표적이다³³⁾. Bcl-2 계열의 단백질은 세포사멸 관련 단백질로, Bcl-2 및 Bcl-xl은 생존 세포 신호 전달을 매개하는 반면 Bax와 Bad는 세포사멸 유도제로 작용 한다³⁴⁾. 앞으로 Bcl-2 계열 단백질의 관련성에 대한 다양한 연구를 진행할 예정이다. 본 연구 결과를 바탕으로 한의학에서 사용하는 홍화의 항암 효능에 대한 적응증을 확대 시킬 수 있는 좋은 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 성과는 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2021R1I1A3042479).

References

1. Lewandowska U, Gorlach S, Owczarek K, Hrabec E, Szweczyk K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014;68:528-540.
2. Yu RJ, Liu HB, Yu Y, Liang L, Xu R, Liang C, et al. Anticancer activities of proanthocyanidins from the plant *Urceola huaitingii* and their synergistic effects in combination with chemotherapeutics. *Fitoterapia.* 2016;112:175-182.
3. Marienfeld C, Tadlock L, Yamagiwa Y, Patel T. Inhibition of cholangiocarcinoma growth by tannic acid. *Hepatology.* 2003;37:1097-1104.
4. Naus PJ, Henson R, Bleeker G, Wehbe H, Meng F, Patel T. Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways. *J Hepatol.* 2007;46:222-229.
5. Wakabayashi T, Hirokawa S, Yamauchi N, Kataoka T, Woo JT, Nagai K. Immunomodulating activities of polysaccharide fractions from dried safflower petals. *Cytotechnology.* 1997;25:205-211.

6. Ali Sahari M, Morovati N, Barzegar M, Asgari S. Physicochemical and antioxidant characteristics of safflower seed oil. *Curr Nutr Food Sci.* 2014;10:268–274.
7. Toma W, Guimarães LL, Brito AR, Santos AR, Cortez FS, Pusceddu FH, et al. Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2014;24:538–544.
8. Sabah FS, Saleh AA. Evaluation of antibacterial activity of flavonoid and oil extracts from safflower (*Carthamus tinctorius* L). *Evaluation.* 2015;5:41–44.
9. Li LJ, Li YM, Qiao BY, Jiang S, Li X, Du HM, et al. The value of safflower yellow injection for the treatment of acute cerebral infarction: a randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:478793.
10. Fan S, Lin N, Shan G, Zuo P, Cui L. Safflower yellow for acute ischemic stroke: a systematic review of randomized controlled trials. *Complement Ther Med.* 2014;22:354–361.
11. Shi X, Ruan D, Wang Y, Ma L, Li M. Anti-tumor activity of safflower polysaccharide (SPS) and effect on cytotoxicity of CTL cells, NK cells of T739 lung cancer in mice. *China journal of Chinese materia medica.* 2010;35:215–218.
12. Xi SY, Zhang Q, Wang C, Zhang JJ, Gao XM. Discussion of safflower inhibiting tumor in application and its mechanism of action. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine.* 2008;26:1916–1917.
13. Luo Z, Zeng H, Ye Y, Liu L, Li S, Zhang J, et al. Safflower polysaccharide inhibits the proliferation and metastasis of MCF-7 breast cancer cell. *Mol Med Rep.* 2015;11:4611–4616.
14. Sun Y, Yang J, Zhang QQ, Wang X, Xu F, Li MZ, et al. Mechanism investigation of cell cycle arrest in hepatic cancer cell induced by safflower polysaccharide *Chinese J Experimental Traditional Medical Formulae.* 2014;13:046.
15. Li JY, Yu J, Du XS, Zhang HM, Wang B, Guo H, et al. Safflower polysaccharide induces NSCLC cell apoptosis by inhibition of the Akt pathway. *Oncol Rep.* 2016;36:147–154.
16. Liang A, Jianghong Z, Taijun Z, Xiaoqing L, Qiong Z, Jun C. Analysis of the inhibitory effect of safflower polysaccharide on HT29 colorectal cancer cell proliferation and its relevant mechanism. *Biomed Res.* 2017;28:2966–2970.
17. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516.
18. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death?. *Autophagy.* 2005;1:66–74.
19. Yu RJ, Liu HB, Yu Y, Liang L, Xu R, Liang C, et al. Anticancer activities of proanthocyanidins from the plant *Urceola huaitingii* and their synergistic effects in combination with chemotherapeutics. *Fitoterapia.* 2016;112:175–182.
20. Liang L, Amin A, Cheung WY, Xu R, Yu R, Tang J, et al. Parameritannin A-2 from *Urceola huaitingii* enhances doxorubicin-induced mitochondria-dependent apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt, ERK1/2 and p38 pathways in gastric cancer cells. *Chem-Biol Interact.* 2020;316:108924.
21. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res.* 2015;6:4103–4112.
22. Sivaraj R, Rahman PKSM, Rajiv P, Vanathi P, Venckatesh R. Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;129:255–258.
23. Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J Ethnopharmacol.* 2008;119:455–461.
24. Kamatou GPP, Van Zyl RL, Davids H, Van Heerden FR, Lourens ACU, Viljoen AM. Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*. *S Afr J Bot.* 2008;74:238–243.

25. Alam MR, Kim SM, Lee JI, Chon SK, Choi SJ, Choi IH, et al. Effects of Safflower seed oil in osteoporosis induced-ovariectomized rats. *Am J Chin Med.* 2006;34:601-612.
26. Hong HT, Kim HJ, Lee TK, Kim DW, Kim HM, Choo YK, et al. Inhibitory effect of a Korean traditional medicine, Honghwain-Jahage (water extracts of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Hominis placenta*) on interleukin-1-mediated bone resorption. *J Ethnopharmacol* 2002;79:143-148.
27. Moon KD, Back SS, Kim JH, Jeon SM, Lee MK, Choi MS. Safflower seed extract lowers plasma and hepatic lipids in rats fed high-cholesterol diet. *Nutr Res.* 2001;21:895-904.
28. Bae SJ, Shim SM, Park YJ, Lee JY, Chang EJ, Choi SW. Cytotoxicity of phenolic compounds isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) on cancer cells lines. *Food Sci Biotechnol.* 2002; 11:140-146.
29. Frishman WH, Sung HM, Yee HC, Liu LL, Keefe D, Einzig AI, et al. Cardiovascular toxicity with cancer chemotherapy, *Curr Probl Cancer.* 1997; 21:301-360.
30. Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie BG, Taylor CW, et al. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1989;7:415-424.
31. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-627.
32. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
33. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001;11:526-534.
34. Karch J, Molkentin JD. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. *Circ Res.* 2015;116:1800-1809.