

에탄올에 의해 추출한 황금이 구강암 세포에서 나타나는 자가포식작용

최별보라

동서대학교 치위생학과

Effect of autophagy in human tongue squamous cell carcinoma SCC 25 cells from *Scutellariae Radix* by ethanol extract

Byul Bo-Ra Choi

Department of Dental Hygiene, Dongseo University

Received : 3 February, 2014
Revised : 17 March, 2014
Accepted : 3 April, 2014

Corresponding Author

Byul Bo-Ra Choi
Department of Dental Hygiene
Dongseo University
Busan 617-716, Korea.
Tel : +82-51-320-2722
+82-10-2229-7182
Fax : 82-51-320-2732
E-mail : cbbstar@naver.com

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the study is to examine the cell growth effect and autophagy effect of *Scutellariae Radix* by ethanol extract in SCC 25 cells.

Methods : Cell growth inhibitory effect and autophagy induced by *Scutellariae Radix* were confirmed by WST-1 assay, monodansylcadaverine(MDC) stain, and flow cytometry by acridine orange(AO) stain.

Results : The *Scutellariae Radix* treatment decreased the cell proliferation in a dose and time dependent manner. *Scutellariae Radix* has anticancer effects that autophagic vacuoles were apparent by MDC and AO staining in SCC 25 cells.

Conclusions : *Scutellariae Radix* showed anticancer activity against SCC 25 cells via autophagy. The data provided the possibility that *Scutellariae Radix* may potentially contribute to oral cancer treatment.

Key Words : autophagy, *Scutellariae Radix*, squamous cell carcinoma

색인 : 자가 포식, 편평세포암종, 황금

서론

최근 인간의 평균 수명이 늘어남에 따라¹⁾ 만성질환 환자의 증가를 보이고 있다²⁾. 만성질환 중에서 사망률이 높다고 알려진 암 질환은 앞으로도 그 수가 증가 될 것으로 보고 있다. 그 중 구강과 관련된 편평 세포암은 전 세계적으로 매년 600,000명이 발병하고 있으며 모든 악성 종양에서 약 3%를 차지하고 있다. 또한 5년 동안 생존율이 50%에 불과하며 좋지 못한 예후를 가지고 있다^{3,4)}. 현재 치료법으로 외과 수술, 방사선 치료, 화학 요법 또는 복합 요법 등이 쓰여지고 있으나 정상조직에 부작용을 유발하고 저항성을 가지는 한계가 있다.

최근 효과적인 항암예방과 치료를 위하여 빠르게 증식하는 암세포를 제거하는 천연 유래 소재의 치료제 개발이 중요시 되고 있다. 황금(*Scutellariae Radix*)은 꿀풀과에 속한 뿌리로 성분은 주로 flavonoids 계열로 구성되어 있으며 baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside, chrysin 등이 포함되어 있다⁵⁻⁷⁾. 황금과 관련된 연구는 주로 구성 성분의 효과 및 기능에 관련 되어 보고되어 왔다. 또한 항암작용⁶⁾, 항알레르기작용⁸⁾, 항염증작용⁹⁾, 항산화작용¹⁰⁾, 중추신경계 질환¹¹⁾에 대한 작용 등 이와 관련 연구 역시 매우 폭넓게 보고되어 왔다. 암 세포 성장 저해와 제거의 한 방법으로 제1형 세포계획사로 불리는 세포 자멸사(apoptosis)와 제2형 세포계획사로 불리는 자가 포식(autophagy)을 들 수 있다¹²⁾. 세포자멸사와 자가 포식은

암세포에 있어서 성장과 죽음을 조절하므로 암 치료에 있어서 매우 중요하다고 볼 수 있다.

세포자멸사는 세포의 성장조절 및 항상성 유지에 관여하게 되며, 발생할 시 염색질 응축, DNA 분절, 세포 수축, 수포형성 등 여러 가지 현상이 세포 내부에서 발생된다^{13,14}. 세포자멸사는 다음의 두 가지의 기전으로 나뉘어져 있다. 그 중 하나는 외인성 경로(extrinsic pathway)로 death receptor가 활성화되어 caspase-8을 통해 유도된다¹⁵. 나머지 하나는 내인성 경로(intrinsic pathway)로 mitochondria pathway와 관련된 caspase-9를 통해 유도된다¹⁶. Apoptotic body는 체내 면역 세포에 의해 제거되며 괴사(necrosis)와는 달리 염증이 발생되지 않는다. 자가포식이란 '스스로 먹는다'라는 뜻으로 세포가 영양결핍이나 스트레스에 대한 대사분해반응으로 인해 세포내의 단백질, 소기관을 탐식하여 소화시키고 재사용하는 기전을 말한다¹⁷⁻¹⁹. 즉, 다시 말해 세포 내부에서 일어나는 재활용 시스템이라고 볼 수 있다.

자가포식은 미토콘드리아나 골지체, 소포체와 같은 세포 소기관을 둘러싸으로써 자가포식체(autophagosome)를 형성하고 소포(vesicle)내에 격리된다. 연이어 소포는 라이소좀(lysosome)과 결합하여 자가라이소좀(autolysosome)을 형성하고, 이에 의해 둘러싸인 내부 물질은 라이소좀에 존재하는 소화 효소에 의하여 분해된다. 이렇게 분해된 부산물들은 세포 소기관을 형성하는데 사용된다^{20,21}. 최근 Zhang 등²²에 따르면 황금 추출물이 구강암세포에서 COX-2를 통한 기전으로 성장을 저해한다는 보고가 있으나 자가 포식을 통한 기전으로 성장 저해를 시키는 연구는 아직 미비하다.

본 실험에서는 황금 추출물의 항암활성 기전을 조사하기 위해서 구강암세포인 SCC 25 세포를 대상으로 황금 메탄올 추출물의 암세포 성장 억제 효과 및 자가 포식작용에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

연구방법

1. 연구 설계

본 연구는 구강암 세포의 한 종류인 SCC 25 세포에서 황금 추출물이 성장 억제에 미치는 효과와 항암 작용을 하는 기전인 자가 포식 작용에 대해서 연구하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시료준비

본 실험에서 사용된 황금(Fig. 1)은 국내산(전남 여수)이며(주) 화림 제약에서 구입하였다. 황금은 분쇄될 크기로 자르고

파쇄한 다음 시료의 5배 정도에 해당되는 70% 에탄올 용매를 처리해 60°C에서 8시간 처리하였다. 추출된 황금의 상층액만 획득하여 여과한 뒤 감압 농축기(Buchi, Meierseggstrasse, Flawil, Switzerland)로 50-55°C에서 농축하였다. 농축된 황금 추출물은 다시 동결건조기(Ilshin Lab, Yangju-kun, Kyunggi-do, Korea)로 건조하여 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)에 0.1 g/ml의 농도로 용해 시켰다²³. 실험에 사용된 농도는 최소농도부터 최대농도인 100-500 µg/ml으로 배지에 희석하여 사용하였다. 세포의 반수 최대 억제 농도인 IC 50(half-maximal inhibitory concentration)을 400 µg/ml로 잡고 실험을 진행하였다.

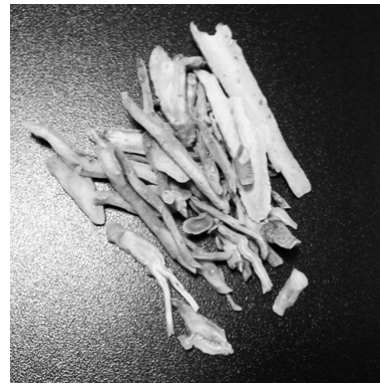


Fig. 1. Appearance of *Scutellariae Radix*

2.2. 세포배양

사람혀편평암종세포인 SCC 25는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, DMEM/F12 1:1 배지(Gibco, Gaithersburg, MD, USA)에서 100 µg/ml penicillin/streptomycin, 4 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 다음 37°C의 5% CO₂ humidified air incubator에서 배양되었다.

2.3. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 WST-1(Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 방법으로 사용되었다. 96 well plate에서 5x10³으로 분주한 뒤 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 세포의 상층 배지를 제거한 다음, 황금 추출물을 농도별(100-500 µg/ml)로 24, 48, 72시간동안 반응시켰다. 그런 다음 각 시간에 맞추어 각각의 well에 WST-1 용액을 10 µl씩 2시간 동안 배양기에서 반응을 시켰다. 이후, ELISA reader(Sunrise Remote Control, Tecan, Austria)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정했다. 각각의 분석은 세 번 시행되었고, 실험 결과를 바탕으로 적정 처리 농도를 정하였다.

2.4. Dansylcadaverine(MDC) 염색 후 공초점 레이저 촬영 및 유세포 분석기 측정

세포를 35 mm dish에 1×10^5 로 분주한 뒤 24시간 배양 시킨 후 황금을 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간 뒤 dish의 배지를 제거하고 자가 포식 형상의 특징인 산성 소포성 소기관을 염색시키는 MDC를 0.05 mM의 농도로 처리 한 후 37°C 에서 1시간 동안 처리하였다. 염색된 세포는 수거하여 공초점 레이저 현미경 LSM 700(Carl Zeiss, Germany)과 유세포 분석기 CYTOMICS FC500(Beckman Coulter, FL, CA, USA)을 사용하여 관찰하였다. FL1은 MDC에 의한 형광의 세기를 보여주는 것으로 산성 소포성 소기관이 염색이 많을수록 증가한다.

2.5. Acridine orange(AO) 염색 후 유세포 분석기 측정

세포를 35 mm dish에 1×10^5 로 분주한 뒤 24시간 배양 시킨 후 황금을 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간 뒤 배지를 제거하고 자가 포식 형상의 특징인 산성 소포성 소기관을 염색시키는 AO를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 한 후 37°C 에서 20분 동안 처리하였다. 염색된 세포는 수거하여 유세포 분석기 CYTOMICS FC500(Beckman Coulter, FL, CA, USA)을 사용하여 관찰하였다. FL4는 AO에 의한 형광의 세기를 보여주는 것으로 산성 소포성 소기관이 염색이 많을수록 증가한다.

2.6. 통계 처리 분석

실험군과 대조군의 통계 처리 결과는 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics 21(SPSS Inc., NY, USA)을 통해 paired T-test statistical method를 이용하였다. $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 3번 이상의 독립적인 실험 결과를 통해 평균과 표준편차를 산출하였다.

연구결과

1. 황금 추출물에 의한 SCC 25 세포 성장 억제 유도

SCC 25 세포에서 황금이 생존율에 미치는 영향을 보기 위해서 WST-1분석을 했다. 먼저 SCC 25 세포에 황금 추출물을 각각의 농도(100-500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 24시간이 지났을 때, 99, 84, 49, 33%로 농도의존적인 감소를 보였으며(Fig. 2), 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 IC 50의 농도로 잡고 시간별로 확인을 했을 때는 49, 44, 33%로 시간의존적인 감소형태를 보였다(Fig. 3). 이 결과로 볼 때, 황금 추출물이 구강암의 한 종류인 사람혀편평암세포의 생존율을 농도의존, 시간 의존적 성장억제효과를

확인할 수 있었다.

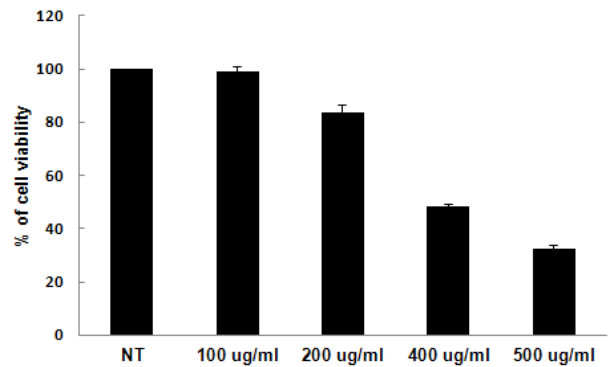


Fig. 2. *Scutellariae Radix* showed cell proliferation in a dose-dependent manner by WST-1 assay on SCC 25 cells

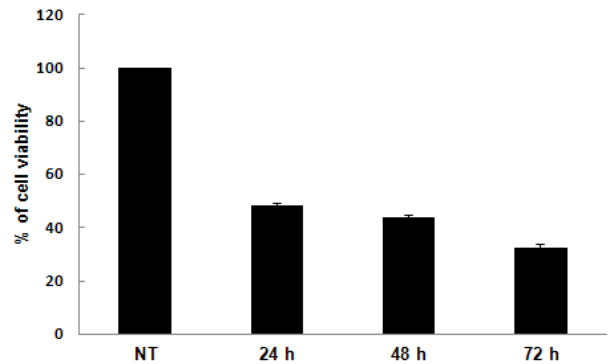


Fig. 3. *Scutellariae Radix* showed cell proliferation in time-dependent manner by WST-1 assay on SCC 25 cells

2. 황금 추출물에 의한 SCC 25 세포의 자가 포식 작용 확인

24시간 동안 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 황금 추출물을 처리한 SCC 25 세포에서 MDC를 염색한 후 공초점 레이저로 확인을 하였을 때 자가 포식의 형태학적 특징인 자가포식낭이 세포질에서 많이 발현하는 것을 관찰하였다(Fig. 4). 또한 유세포 분석기를 이용한 결과에서도 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 황금 추출물을 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 FL1의 염색 강도가 강한 것으로 나타났다(Fig. 5). 세포를 AO 염색 시 핵과 세포질은 녹색(FL1)으로 염색되고 자가 포식이 일어나면 산성소포체가 형성되어 주황색(FL4)으로 염색된다. Fig. 6의 결과를 보면 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 황금 추출물을 처리한 세포에서 유세포 분석기를 통한 정량적 측정을 분석한 결과 세포질 내 산성소포체가 24시간에 증가하여 자가 포식이 증가됨을 확인할 수 있었다(FL 4: 대조군-2.68%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 황금추출물을 24시간 처리한 군-12.78%).

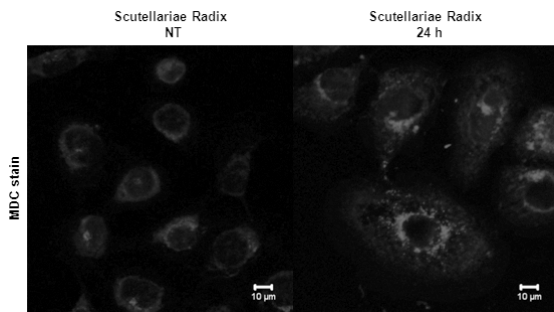


Fig. 4. *Scutellariae Radix* induces autophagy by MDC stain using confocal microscope on SCC 25 cells

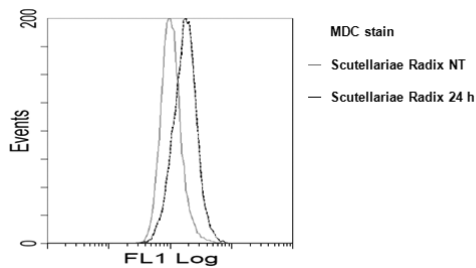


Fig. 5. *Scutellariae Radix* induces autophagy by MDC stain using flow cytometry on SCC 25 cells

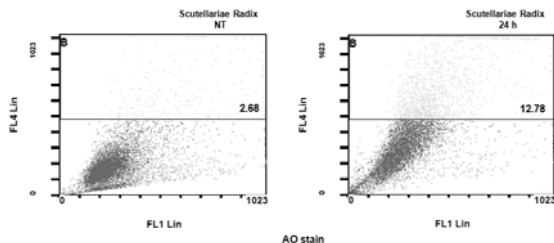


Fig. 6. *Scutellariae Radix* induces autophagy by AO stain using flow cytometry on SCC 25 cells

총괄 및 고안

본 연구에서는 다양한 약리학적 기전을 가지는 것으로 알려진 황금의 항암효과를 알아보기 위하여 구강암인 SCC 25 세포의 증식 및 생존율, 그리고 자가포식현상 유발 여부에 대해서 조사하였다.

이를 위하여 에탄올에 의해 추출된 황금의 처리에 따른 증식억제정도를 WST-1 분석법으로 실험한 결과, 농도 의존적, 시간 의존적으로 감소하였다. 이는 황금이 구강암의 항암 치료에 있어서 매우 효과적이라는 것을 보여준다. 황금은 최근 체내에서 생성되는 암세포에서 세포주기 정지 및 세포자멸사를 통해 항암활성을 가지는 것으로 보고되고 있다²³⁻²⁵. Pan

등²⁴)은 황금이 간암의 진행을 촉진하는 간성상세포에서 G2/M기 세포 주기 정지와 ERK활성을 통한 세포자멸사가 유도된다는 사실을 보고하였고 또 다른 세포인 폐암세포에서도 Gao 등²³)이 세포주기 정지 및 세포자멸사가 유도된다는 유사한 결과가 보고되었다. 하지만 아직까지 황금이 구강암에서 성장 억제와 관련한 자가 포식에 대한 연구는 보고되지 않았다.

최근 자가 포식과 관련하여 Lin 등²⁶)에 따르면 황금의 주요 구성 물질인 baicalin이 방광암인 T24 세포에서 AKT 기전을 통해 자가 포식을 유발시킨다는 사실이 보고된 바 있고, Bai 등²⁷)이 보고한 연구에서는 구강암세포에서 G protein-coupled receptor for estrogen(GPR30)의 길항제인 G15가 자가포식을 유발시키는 사실이 보고되었다. 또한 Kim 등²⁸)에 의해 강황의 주성분으로 알려진 curcumin이 구강암세포에서 reactive oxygen species(ROS)생산을 통한 자가 포식을 유도된다는 연구도 보고되었다. 자가포식은 세포가 영양결핍 등의 상태에 놓였을 때 생존을 유지하기 위한 적응현상의 일종으로 활성화되는 세포 내 단백질 및 소기관을 자가소화하게 된다¹⁷⁻¹⁹). 일부 연구에서는 자가포식이 과도하게 활성화되는 경우 세포자멸사와는 다르게 새로운 형태의 세포사를 유도한다고 보고되고 있다¹²). 황금 처리된 SCC 25 세포에서 자가포식현상이 관여하는지 확인하기 위해서 자가포식의 일반적인 현상인 산성 소포성 소기관(acidic vesicular organelles)생성의 산성 성분을 선택적으로 염색하는 AO 염색과 MDC 염색을 하였다. SCC 25 세포에 MDC를 염색한 결과 산성 소포성 소기관이 황금을 처리하지 않은 군에서보다 황금을 처리한 군에서 유의하게 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 유세포 분석기를 이용한 결과에서도 MDC와 AO 염색 시 형광의 강도가 황금을 처리하지 않은 군에서보다 황금을 처리한 군에서 강하게 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 황금이 SCC 25 세포에서 자가포식을 유도할 수 있음을 알 수 있다. 이에 본 연구에서는 황금이 구강암세포인 SCC 25에서 성장 억제를 유도하고 이와 관련된 기전은 자가 포식에 관련해서 나타나는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 본 연구는 *in vitro* 즉, 세포 단계에서 효과가 보여지는 것일 뿐, *in vivo* 실험에서 동물이나 인체에 효과가 있을 지 불분명하다. 그러므로 황금 추출물이 항암 효과를 보이는 천연물로 쓰여 지기 위해 *in vivo*상에서도 효과가 있는 지 연구해 볼 필요가 있다. 또한 추후 연구에서 황금이 자가 포식과 관련하여 다른 기전이 있는 지도 연구 및 검증을 해볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

결론

현재 빠르게 증식하는 암을 치료하기 위해서 항암 효과가 있는 천연 성분의 약제들이 개발되어지고 있다. 이에 본 연구는 천연 한약물인 황금이 구강암 세포 중 하나인 SCC 25 세포에서 성장억제 및 자가 포식 효과에 대한 분자생물학적 기전을 밝히기 위해 실험을 수행하였다. 본 연구의 실험을 위하여 구강암 세포 중 하나인 SCC 25 세포를 사용하였고 WST-1 분석법, 공초점 레이저와 유세포 분석기를 포함한 실험방법을 시행하였다.

1. SCC 25세포에 황금 추출물을 100-500 µg/ml의 농도로 처리한 후 24시간이 지났을 때, 99, 84, 49(p<0.05), 33%(p<0.05)로 농도의존적인 증식 억제를 보였으며, 실험농도인 400 µg/ml를 시간별로 확인한 결과, 49(p<0.05), 44(p<0.05), 33%(p<0.05)로 시간의존적인 증식 억제를 보였다.
2. 24시간 동안 400 µg/ml 농도의 황금 추출물을 처리한 SCC 25 세포에서 MDC를 염색을 한 후 공초점 레이저와 유세포 분석기를 분석한 결과, 400 µg/ml 농도의 황금 추출물을 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 염색 강도가 강한 것으로 나타났다.
3. AO를 염색 시킨 후 유세포 분석기를 통한 정량적 측정을 분석한 결과 대조군은 2.68%, 400 µg/ml 농도의 황금추출물을 24시간 처리한 군은 12.78%로 나타내었다.

위의 연구 결과, 에탄올에 의해 추출한 황금은 구강암 세포 사멸 효과가 뛰어나며 그 기전은 자가 포식에 의한 것으로 관찰된다. 이로써 황금이 구강암에 항후 약물 치료나 예방에 있어서 매우 효과적인 것으로 생각된다.

References

1. Kim CS. A study on the socio-economic study on the characteristics and oral health of national basic livelihood security. *J Korean Soc Dent Hyg* 2013; 13(6): 955-1004.
2. Cheon HW, Yu MS, Choi MH. The association of oral diseases and chronic diseases in Korean adult population. *J Korean Soc Dent Hyg* 2012; 12(1): 235-49.
3. Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, et al The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther* 2013; Epub ahead of print.
4. Besic Gyenge E, Darphin X, Wirth A, Pielas U, Walt H, Bredell M, et al. Uptake and fate of surface modified silica nanoparticles in head and neck squamous cell carcinoma. *J Nanobiotechnology* 2011; 9: 32. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-9-32>.
5. Hong GE, Kim JA, Nagappan A, Yumnam S, Lee HJ, Kim EH, et al. Flavonoids Identified from Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi Inhibit Inflammatory Signaling by Suppressing Activation of NF-κB and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 912031. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/912031>.
6. Wang CZ, Calway TD, Wen XD, Smith J, Yu C, Wang Y, et al. Hydrophobic flavonoids from *Scutellaria baicalensis* induce colorectal cancer cell apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 1018-26. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2013.1777>.
7. Li C, Lin G, Zuo Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32(8): 427-45. <http://dx.doi.org/10.1002/bdd.771>.
8. Jung HS, Kim MH, Gwak NG, Im YS, Lee KY, Sohn Y, et al. Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(1): 345-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.044>.
9. Kim EH, Shim B, Kang S, Jeong G, Lee JS, Yu YB, et al. Anti-inflammatory effects of *scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J Ethnopharmacol* 2009; 126(2): 320-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.027>.
10. Choi J, Conrad CC, Malakowsky CA, Talent JM, Yuan CS, Gracy RW. Flavones from *scutellaria baicalensis* georgi attenuate apoptosis and Gragiiin oxidation in neuronal cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1571(3): 201-10.
11. Song HR, Cheng JJ, Miao H, Shang YZ. *Scutellaria flavonoid* supplementation reverses ageing-related cognitive impairment and neuronal changes in aged rats. *Brain Inj* 2009; 23(2): 146-53. <http://dx.doi.org/10.1080/02699050802649670>.
12. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahl M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001; 61(2): 439-44.
13. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341(8855): 1251-4.
14. Zhang Y, Sun S, Chen J, Ren P, Hu Y, Cao Z, et al. Oxymatrine induces mitochondria dependent apoptosis in human osteosarcoma MNNG/HOS cells through inhibition of PI3K/Akt pathway. *Tumour Biol* 2013; Epub ahead of print.
15. Elumalai P, Gunadharini DN, Senthilkumar K, Banudevi S, Arunkumar R, Benson CS, et al. Induction of apoptosis in

- human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. *Toxicol Lett* 2012; 215(2): 131-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.10.008>.
16. S.J. Riedl, G.S. Salvesen. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 405-13.
 17. Kim AD, Kang KA, Kim HS, Kim DH, Choi YH, Lee SJ, et al. A ginseng metabolite, compound K, induces autophagy and apoptosis via generation of reactive oxygen species and activation of JNK in human colon cancer cells. *Cell Death Dis* 2013; 1(4): e750. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.273>.
 18. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011; 17(4): 654-66. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2634>.
 19. Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012; 31(49): 5045-60. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.7>.
 20. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005;115(10): 2679-88.
 21. Kumar D, Shankar S, Srivastava RK. Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells: molecular mechanisms. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 171. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-12-171>.
 22. Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, et al. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4037-43.
 23. Gao J, Morgan WA, Sanchez-Medina A, Corcoran O. The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 254(3): 221-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.03.016>.
 24. Pan TL, Wang PW, Leu YL, Wu TH, Wu TS. Inhibitory effects of *Scutellaria baicalensis* extract on hepatic stellate cells through inducing G2/M cell cycle arrest and activating ERK-dependent apoptosis via Bax and caspase pathway. *J Ethnopharmacol* 2012; 139(3): 829-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.028>.
 25. Kumagai T, Müller CI, Desmond JC, Imai Y, Heber D, Koeffler HP. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res* 2007; 31(4): 523-30.
 26. Lin C, Tsai SC, Tseng MT, Peng SF, Kuo SC, Lin MW, et al. AKT serine/threonine protein kinase modulates baicalin-triggered autophagy in human bladder cancer T24 cells. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 993-1000. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2013.1791>.
 27. Bai LY, Weng JR, Hu JL, Wang D, Sargeant AM, Chiu CF. G15, a GPR30 antagonist, induces apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. *Chem Biol Interact* 2013; 206(2): 375-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.10.014>.
 28. Kim JY, Cho TJ, Woo BH, Choi KU, Lee CH, Ryu MH, et al. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. *Arch Oral Biol* 2012; 57(8):1018-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.04.005>.