

**\*Corresponding author:**

Hong-Gu Joo  
Laboratory of Veterinary Pharmacology,  
College of Veterinary Medicine and  
Veterinary Medical Research Institute, Jeju  
National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju  
63243, Korea  
Tel: +82-64-754-3379  
Fax: 82-64-756-3354  
E-mail: joooh@jejunu.ac.kr

ORCID:  
<https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

Conflict of interest:  
The authors declare no conflict of interest.

Received: Oct 5, 2021  
Revised: Nov 15, 2021  
Accepted: Nov 29, 2021

## 마우스 림프종세포에 대한 disulfiram/copper의 항암증진효과

정해빈<sup>1</sup>, 주홍구<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 수의과대학 수의약리학실  
<sup>2</sup>제주대학교 수의과학연구소

## Synergistic anticancer activity of disulfiram/copper against mouse lymphoma cells

Haebeen Jung<sup>1</sup>, Hong-Gu Joo<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>2</sup>Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

### Abstract

Disulfiram (DSF) is a marketed drug to treat patients with alcohol dependence by inhibiting aldehyde dehydrogenase. Over the last few decades, DSF has been shown to have anticancer effects through different mechanisms. Moreover, this effect can be elevated when used with copper (Cu). Subsequent studies have been conducted on various cancers, but few on lymphoma. This study investigated the anticancer effects of DSF on lymphoma and how this effect changed when treated with Cu. DSF synergistically decreased the metabolic activity of EL4 lymphoma cells when combined with Cu. At 1  $\mu$ M of DSF alone, the metabolic activity of EL4 cells decreased by 49% compared to the control, whereas it decreased by 87% with a DSF + CuCl<sub>2</sub> treatment. Rhodamine 123 and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate staining showed that DSF induced the reduction of the mitochondrial membrane potential and promoted the production of reactive oxygen species. In particular, the combined treatment of DSF + Cu induced cell death based on multiple assays, including annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide staining. Overall, DSF has anticancer effects on lymphoma cells and exhibits synergistic effects when combined with Cu. This study provides some valuable information to broaden the use of DSF in clinics and basic research.

**Keywords:** disulfiram; copper; lymphoma cells; anticancer effect; repurposing drug

### 서론

Disulfiram (DSF)은 60년 이상 알코올의존증 치료제로 사용되었다[1]. 알코올 섭취 후, 에탄올은 alcohol dehydrogenase에 의해 acetaldehyde로 전환되고, aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해 acetate로 대사된다. DSF는 ALDH의 효소 활성을 억제하여 체내에서 acetaldehyde를 축적시키고, 이는 두통, 어지러움, 홍조 등의 불쾌한 증상을 유발하여 알코올 섭취를 제한시킨다[2]. 한편 최근에는 DSF를 항암제로 활용하기 위한 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다[3].

DSF의 항암효과는 유방암[4-6], 폐암[7], 교모세포종[8], 대장암[6] 등에서 연구되었

으며, reactive oxygen species (ROS) 생성[4], proteasome 활성 억제[5], nuclear factor-kappa B [6]나 mitogen-activated protein kinase [9]와 같은 신호전달 체계를 조절하는 등의 다양한 항암 기전이 알려졌다. 특히 copper (Cu)와 결합되었을 때는 DSF의 항암효과를 증대시켰다[6,8,9].

다양한 암에서 DSF의 항암효과가 연구되고 있는 가운데, 림프종에 관한 연구는 아직 부족하다. 본 연구에서는, EL4 세포를 이용하여 T 림프종에 대한 DSF의 항암효과와 작용기전을 알아보았다. 이를 위해, EL4 세포에 DSF를 농도 별로 처리한 후 세포의 핵 형태를 관찰하였고, EL4 세포의 대사활성도, 미토콘드리아 막 전위(mitochondria membrane potential, MMP), ROS 관련성 등을 측정하였다. 또한, DSF과 Cu를 함께 처리하여 Cu가 DSF의 효능에 미치는 영향도 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 세포주와 시약

EL4 세포주(mouse lymphoma cell line)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. DSF는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)에 녹인 후 사용하였다. DMSO 사용농도는 DSF 10 µM의 경우 1% (v/v)를 사용하였으며, 나머지 모든 DSF 처리군에서는 0.1% (v/v) 이하로 사용하였다. Cu<sup>2+</sup> 처리를 위해 CuCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)를 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

### 세포배양과 물질처리

EL4 세포는 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine을 포함한 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하였다. 6-, 24- 또는 96-well culture plate (ThermoFisher Scientific, USA)에 분주한 뒤, DSF과 CuCl<sub>2</sub>를 농도 별로 처리하여 배양한 후 분석하였다.

### EL4 세포의 대사활성도 측정

1 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF를 농도 별로 처리하고, CuCl<sub>2</sub> 1 µM을 추가하여, 96-well culture plate에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 세포의 대사활성도 측정을 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma-Aldrich) 용액을 0.5 mg/mL 농도로 넣고 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 처리하였다. 세포에 의해 환원된 formazan product (crystal violet)을 용해시키기 위해 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 microplate reader (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

### Hoechst 33342 염색을 이용한 EL4 세포 핵 관찰

세포 핵 모양의 관찰을 통해 세포사를 확인하기 위해 EL4 세포의 핵을 염색하였다. 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF를 농도 별로 처리하고 CuCl<sub>2</sub> 1 µM을 추가하여, 24-well culture plate에서 2일 동안 배양하였다. 세포에 Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) 용액을 2.5 µg/mL 농도로 처리하여 37°C에서 10분간 염색하였다. 그 후 형광현미경(ZOE Fluorescent Cell Imager; BIO-RAD, USA)을 이용해 관찰하였다.

### 세포사 측정

세포의 세포사 측정을 위해 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)와 propidium iodide (PI) 용액으로 염색하였다. 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF를 농도 별로 처리하고 CuCl<sub>2</sub> 1 µM을 추가하여, 24-well culture plate에서 2일 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 annexin V binding buffer (ThermoFisher Scientific)로 세척 후 annexin V-FITC (BD Bioscience, USA)를 2 µg/mL 농도로 처리한 다음 상온, 암실의 조건에서 10분간 반응시켰다. PI 용액은 분석 5분 전 0.1 µg/mL 농도로 처리하였다. LSRFortessa flow cytometer와 FlowJo software (BD Bioscience)를 이용하여 유세포분석하였다.

### ROS 관련성 분석

1 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF과 3 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich)을 처리한 후 96-well culture plate에서 3일 동안 배양하였다. NAC는 ROS의 inhibitor로, ROS의 관련성 분석을 위해 사용하였다. 배양 후 대사활성도 측정방법으로 MTT assay를 이용해서 분석하였다. CuCl<sub>2</sub>가 ROS의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; Sigma-Aldrich)를 이용하여 유세포분석을 하였다. DCFDA는 ROS에 의해 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)으로 산화되어 측정된다. 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF과 CuCl<sub>2</sub>를 처리하여 2일 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 인산원충액으로 세척한 후 DCFDA를 10 µM 농도로 처리하였다. 37°C에서 30분간 반응시킨 후 유세포분석 염색용액으로 세척한 뒤 분석하였다. 유세포분석은 LSRFortessa flow cytometer와 FlowJo software를 이용하였다.

### MMP 측정

2 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도의 EL4 세포에 DSF를 농도 별로 처리하고 CuCl<sub>2</sub> 1 µM을 추가하여, 6-well culture plate에서 2일 동안 배양하였다. MMP 측정을 위해 Rhodamine 123 (Sigma-Aldrich) 용액을 0.1 µg/mL 농도로 처리한 후 상온, 암실의 조건에서 30분 간 반응시켰다. LSRFortessa flow cytometer와 FlowJo software를 이용하여 유세포분석하였다.

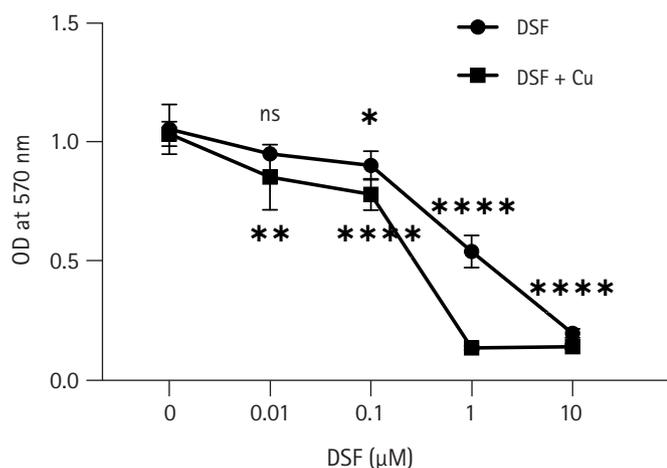
## 통계분석

MTT assay에 대한 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며, ordinary two-way ANOVA (GraphPad Prism; GraphPad Software, USA)를 통해 유의성을 확인하였다. ns는 유의성이 없음을, \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*는 각각 대조군과 비교하여  $p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$  임을 나타낸다. #은 같은 DSF 농도에서 NAC 처리 유무에 따른 처리군 간의  $p$ 값을 나타내며, 개수에 따른 유의성 정도는 위와 동일하다.

## 결과

### EL4 세포에 대한 DSF와 CuCl<sub>2</sub>의 대사활성도 감소 효과

DSF 단독 또는 DSF + CuCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) 처리군에서 EL4 세포의 대사활성도 변화를 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였다(Fig. 1). 분석 결과 DSF의 모든 농도(0.01-10  $\mu$ M)에서 DSF 단독에 비해 DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군이 낮은 대사활성도를 나타냈다. 특히 DSF 1  $\mu$ M에서 대조군과 비교했을 때 DSF 단독은 49%, DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군은 87%의 대사활성도 감소를 보였다. DSF 단독처리군의 경우 0.01  $\mu$ M에서 대사활성도가 약간 감소하였지만 유의하지 않았고, 10  $\mu$ M에서는 대사활성이 거의 보이지 않았다. 이는 DSF가 0.01  $\mu$ M 이하의 농도에서는 sub-cytotoxic하다는 것을 나타낸다. Half maximal inhibitory concentration (IC50)을 계산한 결과 DSF 단독은 1.02  $\mu$ M, DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군은 0.25  $\mu$ M으로, DSF 단독에 비해 CuCl<sub>2</sub>와 함께 처리했을 때 세포독성이 약 4배 증가하였음을 알 수 있었다.



**Fig. 1.** Effect of disulfiram (DSF) and CuCl<sub>2</sub> on the metabolic activity of EL4 cells. EL4 cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 96-well culture plates with 0 to 10  $\mu$ M of DSF with or without 1  $\mu$ M of CuCl<sub>2</sub>. A MTT assay was performed 3 days after treatment. The optical density (OD) was measured at 570 nm using a microplate reader. The results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation, and the statistical significance was performed by ordinary two-way ANOVA. \*, \*\*, \*\*\*\* indicate  $p < 0.05, 0.01, 0.0001$  respectively compared to control EL4 (DSF 0  $\mu$ M). ns, not significant.

### DSF와 CuCl<sub>2</sub>에 의한 세포사 증가

세포핵의 형태학적 관찰을 통해 세포자멸사가 일어나는지 확인하기 위해 Hoechst 33342과 PI로 세포를 염색하였다(Fig. 2A). 살아있는 세포(파란색)와 죽은 세포(붉은색과 분홍색)를 색깔로 구분하여 분석하였다. DSF 단독처리군은 대조군과 죽은 세포의 수가 비슷하였고, CuCl<sub>2</sub>와 함께 처리했을 때는 DSF 0.1  $\mu$ M + CuCl<sub>2</sub>에서 현저하게 죽은 세포의 비율이 높았다(Fig. 2B). 또한 annexin V-FITC/PI 염색 후 유세포분석을 실시하여 세포사를 단계별로 분석하였다(Fig. 2C). Necrosis (annexin V-/PI+), early apoptosis (annexin V+/PI-), late apoptosis (annexin V+/PI+)로 구분하였다. DSF 0.1  $\mu$ M에 비해 DSF 0.1  $\mu$ M + CuCl<sub>2</sub>에서 early apoptosis와 late apoptosis가 더 증가했다. 특히 DSF 0.1  $\mu$ M + CuCl<sub>2</sub>처리군은 전 실험군에서 viable cell (annexin V-/PI-)의 비율이 가장 낮았다. 이를 통해 DSF는 CuCl<sub>2</sub>에 의해 EL4 세포의 세포사를 더욱 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

### DSF에 의한 EL4 세포의 MMP 감소

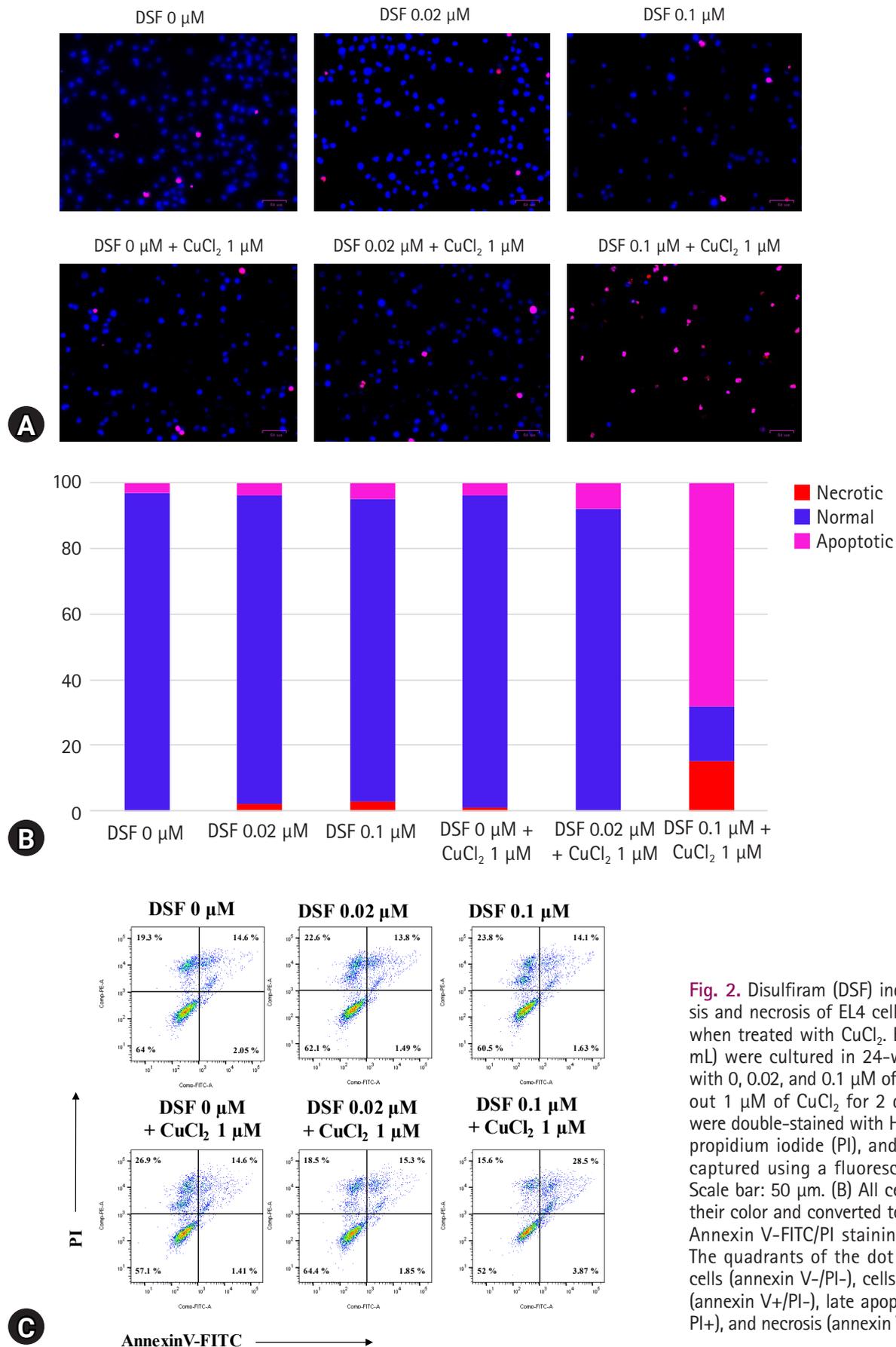
MMP는 미토콘드리아의 기능을 유지하기 위한 필수조건이다. 유세포분석에서 forward scatter/side scatter에 근거하여 debris로 추정되거나 죽은 세포는 배제한 후 살아있는 세포들을 gating하여 MMP 값을 측정했다(Fig. 3). DSF 0.1  $\mu$ M + CuCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M)에서 fluorescence intensity 평균값은 가장 현저히 낮았는데, 대조군에 비해 48% 낮았다. DSF 0.02  $\mu$ M 농도와 0.1  $\mu$ M 농도 모두에서 CuCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M)를 함께 처리했을 때가 DSF 단독처리군보다 평균값이 40% 낮았다. DSF를 CuCl<sub>2</sub>와 함께 사용할 경우 EL4 세포의 미토콘드리아 기능을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인했다.

### DSF에 의한 항암효과에서 ROS의 관련성

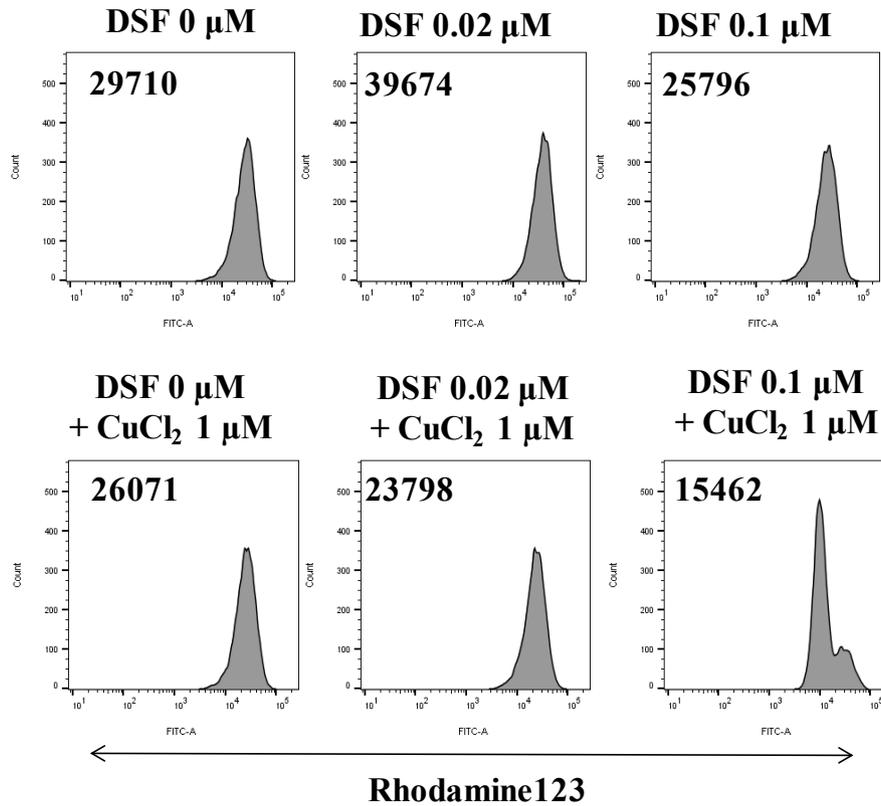
DSF의 항암효과에서 ROS가 어떻게 관련되는지 알아보기 위해 ROS의 inhibitor 중 하나인 NAC를 사용하였다. DSF의 처리 농도 범위(0-10  $\mu$ M)에서 DSF 단독처리군보다 DSF와 NAC를 함께 처리했을 때 세포의 대사활성도가 높은 것으로 보아, ROS가 DSF로 처리된 EL4 세포의 대사활성도를 낮추는 사실을 알 수 있었다(Fig. 4A). 하지만 DSF + CuCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) 처리군에 NAC를 더해 반응시키면 DSF의 모든 농도에서 세포의 대사활성도가 매우 떨어졌다(Fig. 4B). DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군의 ROS 생성량을 알아보기 위해 DCFDA를 이용하였다. DSF 또는 CuCl<sub>2</sub> 처리군은 대조군에 비해 ROS 생성량이 증가했다(Fig. 5).

## 고찰

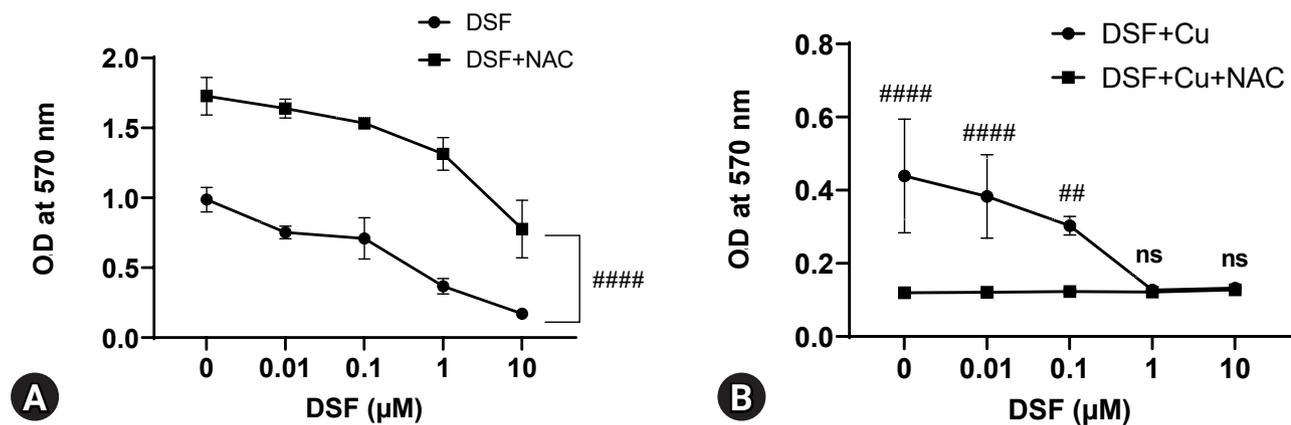
DSF는 60년 이상 알코올의존증 치료제로 사용되어 왔다[1]. 이후 DSF가 알코올의존증 치료제로 사용되는 기전과는 다른 기전으로 항암작용을 한다는 연구도 진행되었다[4-6]. 또한 대규모로 4,910종



**Fig. 2.** Disulfiram (DSF) induces the apoptosis and necrosis of EL4 cells and is enhanced when treated with  $\text{CuCl}_2$ . EL4 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 24-well culture plates with 0, 0.02, and 0.1  $\mu\text{M}$  of DSF with or without 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{CuCl}_2$  for 2 days. (A) The cells were double-stained with Hoechst 33342 and propidium iodide (PI), and the images were captured using a fluorescence microscope. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . (B) All cells were sorted by their color and converted to a percentage. (C) Annexin V-FITC/PI staining was performed. The quadrants of the dot plot indicate live cells (annexin V-/PI-), cells in early apoptosis (annexin V+/PI-), late apoptosis (annexin V+/PI+), and necrosis (annexin V-/PI+).



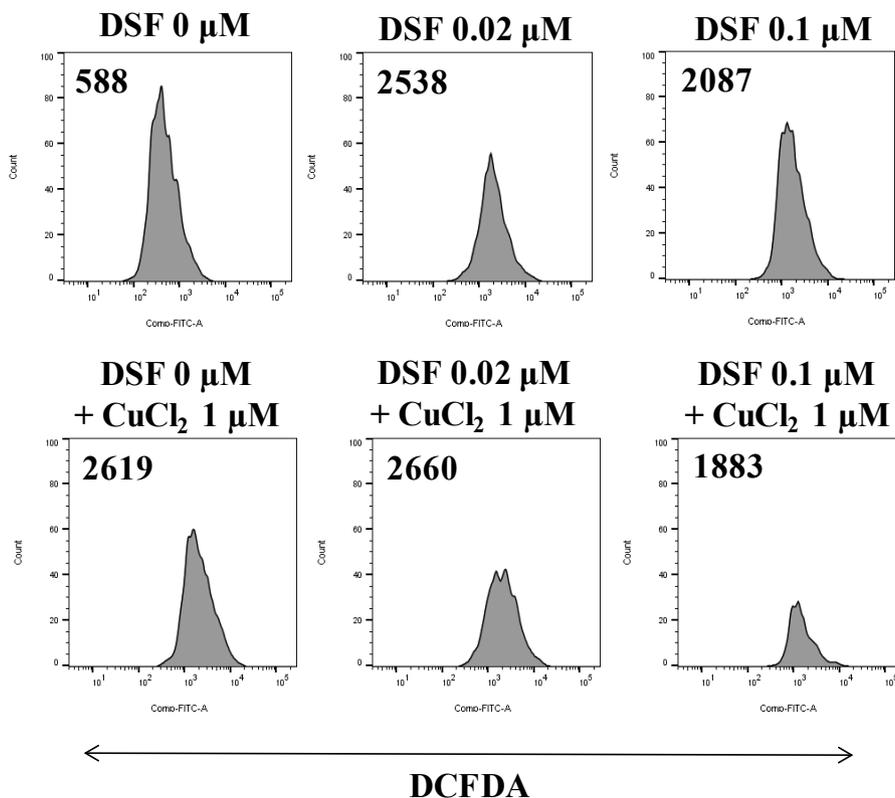
**Fig. 3.** Disulfiram (DSF) treated with  $\text{CuCl}_2$  reduces the mitochondria membrane potential of EL4 cells. EL4 cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 6-well culture plates and treated as described in Fig. 2. The cells were stained with a Rhodamine123 solution and analyzed by flow cytometry on the FL1 channel. The number in histograms indicates the mean fluorescence intensity.



**Fig. 4.** Involvement of reactive oxygen species generation in the effect of disulfiram (DSF). EL4 cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 96-well culture plates with 3 mM NAC and the following treatments: (A) 0 to 10  $\mu\text{M}$  of DSF. (B) 0 to 10  $\mu\text{M}$  of DSF with 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{CuCl}_2$ . A MTT assay was performed after 3 days of incubation. The optical density (OD) was measured at 570 nm using a microplate reader. The results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation, and the statistical significance was analyzed by ordinary two-way ANOVA. ## and #### indicate  $p < 0.01$  and 0.0001, respectively, compared to the groups with and without NAC in each DSF concentration.

의 약물 및 후보물질을 실험한 결과 DSF가 전립선 암세포의 성장을 억제하는 물질로 밝혀지기도 했다[10]. DSF는 비교적 가격이 저렴

하고, 사람에서 부작용과 독성에 관한 연구가 충분히 진행되었기 때문에 항암제로써 repurposing drug으로 사용될 수 있는 가능성을



**Fig. 5.** Disulfiram (DSF) and CuCl<sub>2</sub> enhance ROS generation. EL4 cells (2 × 10<sup>5</sup> cells/mL) were cultured and treated as described in Fig. 2. The cells were then treated with 10 μM DCFDA for 30 minutes and analyzed by flow cytometry on the FL1 channel. The number in the histograms indicates mean fluorescence intensity.

지냈다. 이러한 DSF의 항암효과는 Cu와 함께 처리했을 때 더욱 증강되며, 다양한 암에서 DSF와 Cu의 항암효과에 대한 연구가 이루어졌다[8,9]. 본 연구에서는 악성 T 림프종에서 이를 연구하였다.

DSF의 모든 농도(0.01-10 μM)에서 DSF 단독에 비해 DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군이 더 낮은 대사활성도를 보였다(Fig. 1). CuCl<sub>2</sub>의 유무에 따른 차이는 DSF 1 μM에서 가장 컸다. DSF + CuCl<sub>2</sub>의 세포활성도 저하에 대한 작용기전을 분석하기 위해 세포사 여부, 미토콘드리아 기능 등을 분석하였다. Hoechst 33342는 건강한 세포막을 관통하여 DNA를 파란색으로 염색한다[11]. 반면 PI는 건강한 세포막을 통과하지 못하고 손상된 세포의 염색체를 빨강색으로 염색한다. Hoechst 33342/PI 염색을 통해 DSF와 CuCl<sub>2</sub>를 함께 처리했을 때 세포사가 가장 증가했다 (Fig. 2). 또한 Annexin V/PI 염색을 통해 세포사를 단계적으로 나누어 수치화 했으며, DSF 0.1 μM + CuCl<sub>2</sub>에서 살아있는 세포 수가 가장 낮은 사실을 확인했다.

세포사의 기전으로 MMP와 ROS의 관련성을 알아보았다. Rhodamine 123은 미토콘드리아의 세포막을 통과하는 형광염료로, 정상세포에서는 미토콘드리아 내에 축적되지만, 손상된 MMP를 가진 세포에서는 축적되지 않는다[12]. ROS는 미토콘드리아의 전자전달계에서 정상적으로 생성되는 과산화물(peroxide) 등을 말하며, 증

가된 ROS는 세포자멸사 조절 단백질(apoptosis regulatory protein)의 발현에 관여하여 세포사를 일으킨다[13]. 두 가지 기전연구를 통해 DSF가 MMP의 감소와 ROS의 생성을 유도하였고, CuCl<sub>2</sub>를 함께 처리했을 때 세포사가 증가한 것으로 보아 상승효과가 있다는 사실을 알 수 있었다. 또한 NAC를 이용한 ROS 생성량 분석에서 DSF + CuCl<sub>2</sub> 처리군의 대사활성도가 DSF의 모든 농도에서 매우 떨어졌는데, 이는 CuCl<sub>2</sub> + NAC가 세포독성 작용을 나타낸 것으로 판단된다[14]. 또한 골수중세포에서 DSF 단독에 비해 DSF와 Cu를 함께 사용했을 때 JNK 신호전달이 활성화되었다[9]. 향후 EL4 세포에서도 Cu의 상승효과와 관련된 신호전달에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서 DSF + Cu의 항암효과를 확인했음에도, DSF가 항암제로 개발되는 데에는 몇 가지 단점이 있다. DSF는 혈액(pH 7.4) 내에서 반감기가 1-1.5분으로 매우 짧아[15], 혈액에서 대사되는 과정에서 항암능력이 떨어질 수 있다. 다양한 암에서 항암제가 표적장기에 효과적으로 침투하고 오래 머물게 하기 위해 nanoparticle로 packaging하여 생체에 적용하는 방법이 연구되고 있다[16,17]. 따라서 DSF도 단독 또는 DSF + Cu를 새로운 drug delivery system (DDS)으로 접근할 필요가 있다. 이번 연구에서 DSF의 T 림프종에 관한 항암효과가 *in vitro*에서 확인되었으므로, 향후 DSF의 *in vivo*

에서 항암효과에 대한 연구와 림프종에 DSF 또는 DSF + Cu를 효과적으로 전달할 수 있는 DDS 연구가 필요하다.

## ORCID

Haebeen Jung, <https://orcid.org/0000-0002-2840-2541>

Hong-Gu Joo, <https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

## References

- Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1992;369:15–26.
- Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol* 2006;26:290–302.
- Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, Friis S, Majera D, Gursky J, Ozdian T, Bartkova J, Turi Z, Moudry P, Kraus M, Michalova M, Vaclavkova J, Dzubak P, Vrobel I, Pouckova P, Sedlacek J, Miklovcova A, Kutt A, Li J, Mattova J, Driessen C, Dou QP, Olsen J, Hajdich M, Cvek B, Deshaies RJ, Bartek J. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature* 2017;552:194–199.
- Yang Z, Guo F, Albers AE, Sehoul J, Kaufmann AM. Disulfiram modulates ROS accumulation and overcomes synergistically cisplatin resistance in breast cancer cell lines. *Biomed Pharmacother* 2019;113:108727.
- Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res* 2006;66:10425–10433.
- Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2010;290:104–113.
- Butcher K, Kannappan V, Kilari RS, Morris MR, McConville C, Armesilla AL, Wang W. Investigation of the key chemical structures involved in the anticancer activity of disulfiram in A549 non-small cell lung cancer cell line. *BMC Cancer* 2018;18:753.
- Lun X, Wells JC, Grinshtein N, King JC, Hao X, Dang NH, Wang X, Aman A, Uehling D, Datti A, Wrana JL, Easaw JC, Luchman A, Weiss S, Cairncross JG, Kaplan DR, Robbins SM, Senger DL. Disulfiram when combined with copper enhances the therapeutic effects of temozolomide for the treatment of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:3860–3875.
- Xu Y, Zhou Q, Feng X, Dai Y, Jiang Y, Jiang W, Liu X, Xing X, Wang Y, Ni Y, Zheng C. Disulfiram/copper markedly induced myeloma cell apoptosis through activation of JNK and intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biomed Pharmacother* 2020;126:110048.
- Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, Grafström RC, Perälä M, Kallioniemi O. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res* 2009;15:6070–6078.
- Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016.
- Huang M, Camara AK, Stowe DE, Qi F, Beard DA. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. *Ann Biomed Eng* 2007;35:1276–1285.
- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 2006;10:241–252.
- Zheng J, Lou JR, Zhang XX, Benbrook DM, Hanigan MH, Lind SE, Ding WQ. N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Lett* 2010;298:186–194.
- Agarwal RP, Phillips M, McPherson RA, Hensley P. Serum albumin and the metabolism of disulfiram. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3341–3347.
- Wang Z, Tan J, McConville C, Kannappan V, Tawari PE, Brown J, Ding J, Armesilla AL, Irache JM, Mei QB, Tan Y, Liu Y, Jiang W, Bian XW, Wang W. Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells. *Nanomedicine* 2017;13:641–657.
- Lee MS, Dees EC, Wang AZ. Nanoparticle-delivered chemotherapy: old drugs in new packages. *Oncology (Williston Park)* 2017;31:198–208.