VAN TIP DERGİSİ Medical Journal

KLİNİK ÇALIŞMA / *CLINICAL RESEARCH*

Bu çalışma Creative Commons GayriTicari 4.0 Uluslararası lisansı ile lisanslanmıştır

Van Tıp Derg 29(4):401-406,2022
DOI: 10.5505/vtd.2022.87094

Neferinin Servikal Kanser Hücreleri (HeLa) Üzerinde Apoptotik Etkisi

Apoptotic Effect Of Neferine On Cervical Cancer Cells (HeLa)

Gözde Sahin[1*], Tuğçe Duran[2], Serkan Küççüktürk[3], Nadir Kocak[4], Denizhan Bayramoğlu[5], Ayşegul Kebapcılar[6], Çetin Çelik[6]

[1]Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye
[2]KTO Karatay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya, Türkiye
[3]Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Karaman, Türkiye
[4]Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Konya, Türkiye
[5]Mardin Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Bölümü, Mardin, Türkiye
[6]Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Özet

Amaç: Serviks kanseri, dünya çapında dördüncü en yaygın kanser olmakla birlikte jinekolojik kanserler içinde önde gelen ölüm nedenidir. Neferin, Nelumbo Nucifera'nın tohum embriyosundan izole edilen bir bisbenzilizokinolin alkaloididir. Çalışmalar, neferinin çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde antikanser etkileri olduğunu göstermiştir. Neferin, kanser hücrelerinde çeşitli mekanizmalarla apoptozu indükleyebilir. Bu yazıda, doğal bir bileşik olan neferinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu deneysel çalışmada 1 adet insan servikal kanser hücre hattı serisi ve kontrol grubu olarak 1 adet insan embriyonik böbrek hücre hattı serisi kullanıldı. Hücre kültürleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyon'undan elde edilmiştir.Neferinin maksimal inhibisyon konsantrasyon dozunu saptamak için 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür testi yapıldı. Apoptotik genlerin ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edildi. Çalışma triplicate olarak tekrar edildi.

Bulgular: Neferinin insan servikal kanser hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği maksimal inhibisyon konsantrasyon dozu 20 mikromol olarak belirlendi. Ayrıca, Neferin apoptotik genlerin seviyesini arttırırken, antiapoptotik genlerin seviyesini azaltmıştır.

Sonuç: Neferin insan servikal kanser hücreleri üzerinde apoptotik genlerin expresyonunu aktive ederek apoptozisi indüklemiştir .

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; servikal kanser; bisbenzilizokinolin; HeLa hücresi.

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common cancer in worldwide and the leading cause of death among gynecological cancers. Neferine is a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the seed embryo of Nelumbo Nucifera. Studies have shown that Neferine has anticancer effects on a variety of human cancer cells. Neferine can induce apoptosis in cancer cells by various mechanisms. In this article; we aimed to show the apoptotic effects of neferin, a natural compound on HeLa cells.

Materials and Methods: In this experimental study, 1 human cervical cancer cell line and 1 human embryonic kidney cell line as a control group were used. Cell cultures were obtained from the American Type Culture Collection. 3-4,5-dimethyl-thiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide test was performed to determine the maximal inhibition concentration dose of neferin. Expression levels of apoptotic genes and antiapoptotic genes were determined by real-time polymerase chain reaction. The study was repeated in triplicate.

Results: The maximal inhibition concentration dose at which neferin inhibited the viability of human cervical cancer cells was determined as 20 micromol. Also, Neferin increased the level of apoptotic genes while decreasing the level of antiapoptotic genes.

Conclusion: Neferin induced apoptosis by activating the expression of apoptotic genes on human cervical cancer cells.

Keywords: Apoptosis; cervical cancer; bisbenzylisoquinoline; HeLa cell.

Giriş

Serviks kanseri, ileri cerrahi ve tıbbi tedavilere rağmen jinekolojik kanserler arasında halen en ölümcül kanser türlerinden biridir. İleri evrelerde kullanılan kemoterapötikler, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreleri de etkiler. Bu nedenle sağlıklı hücreler için daha az toksik olabilecek bitkisel tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Yüzyıllardır bitkisel ilaçlar farmakolojik

***Sorumlu Yazar:** Gözde Şahin, Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye
E-mail: sahin.gozde1983@gmail.com **Orcid: Gozde Sahin 0000-0003-3067-9125, Tuğçe Duran 0000-0002-7353-4527, Serkan Küççüktürk 0000-0001-8445-666X, Nadir Kocak 0000-0002-1727-1582, Denizhan Bayramoğlu 0000-0002-6183-8398, Ayşegul Kebapcılar 0000-0002-4188-2199, Çetin Çelik 0000-0001-6165-5092**

Geliş Tarihi: 28.05.2022, Kabul Tarihi: 13.09.2022

etkilerinden dolayı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bitkisel tedavi yöntemleri kemoterapiye göre daha az yan etki profiline sahiptir. Doğal bileşikler, kanser önleyici aktiviteye sahip olabilir. Apoptoz, tümör hücrelerinde hücre ölümüyle sonuçlanan hücre stresinin hücreyi yok edici bir sürecidir. Doğal maddeler farmakolojik etkileri ile çeşitli mekanizmalar üzerinden apoptozu indükleyebilir ve çeşitli kanserlerde tedavi için kullanılabilir (1). Doğal bileşiklerden biri olan neferin; antitümöral, antidepresan, antioksidan, antiinflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğu bildirilen Nelumbo Nucifera tohum embriyosundan elde edilen bir bisbenzil izokinolin alkaloididir (2,3). Neferin' in çoklu ilaç direncini tersine çevirip, sisplatin gibi kemoterapötik ajanların antitümör etkisini güçlendirebileceği bildirilmiştir (4). Neferin, farklı kanser hücrelerinde apoptozu birçok farklı şekilde indükleyebilir. Poormina ve ark. (5) neferinin serbest oksijen radikalleri üzerinden akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve p38 MAPK yolunu aktive ederken, PI3K/AKT/mTOR yolunu down regüle ederek kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü başlatabileceğini bildirmişlerdir. Literatürde neferinin; meme kanseri, akciğer kanseri, glioma, serviks kanseri, nöroblastom gibi çeşitli kanserlerde kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax ekspresyonunun up regülasyonunu ve Bcl-2 expresyonunun down regülasyonunu sağlayarak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (3,6-9). Ayrıca neferinin HEP G2 hücrelerinde de, apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırırken, antiapoptotik proteinleri azalttığı bildirilmiştir (10). Bu çalışmada, doğal bir alkoloid olan neferinin serviks kanseri hücre hattı (HeLa) üzerinde canlılığı inhibe ederken aynı zamanda gösterdiği apoptotik etkiler araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma 2019-2021 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan 16/01/2019 tarihli 25 numaralı kararı ile Konya Ticaret Odası Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. HeLa hücrelerinde neferinin apoptoz etkilerini saptamak amacıyla, efektif maksimal inhibisyon konsantrasyon dozu (IC50) değerlendirildi. Apoptotik ve antiapoptotik gen ekspresyon seviyelerini incelemek için apoptoz yolağı üzerindeki intrinsik elementlere gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) uygulandı.

Hücre Kültürü: Çalışmamızda 1 HeLa hücre hattı ve kontrol grubu olarak 1 insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) kullanıldı. HeLa hücre hattı, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyon'undan (ATCC) elde edildi. HeLa hücresi %10 fetal bovin serumu (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya) ve %5 CO_2 ile 37 °C' de nemlendirilmiş bir inkübatörde %1 penisilin/streptomisin antibiyotiklerini içeren Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu (DMEM) içinde kültüre edildi. Hücreler flask yüzeyinin %80 ile %90' ını kapladığında pasajlandı ve saklandı.

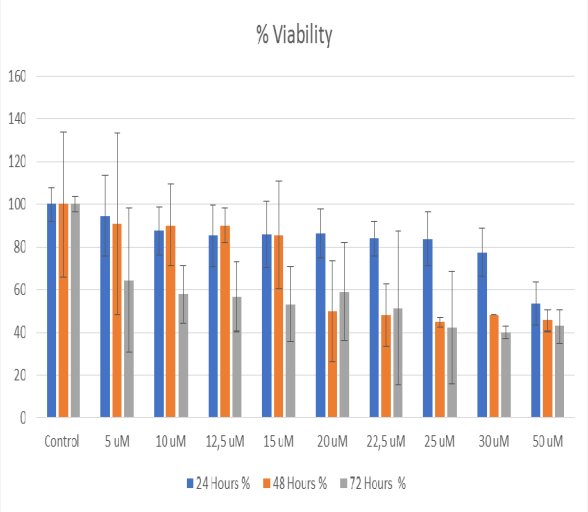
MTT Proliferasyon Analizi: Servikal kanser hücresinde canlılık ve neferinin etkin IC50 dozu için standart bir yöntemle 3-4,5-dimethyl-thiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide test (MTT) proliferasyon analizi yapıldı. HeLa hücreleri, 96 oyuklu plakalarda (~4.5-5x10^3 hücre) well oyuğu başına 100 µl taze kültür besiyeri ile ekildi. Hücreler 48 saat kültüre edildikten sonra, neferin well oyuklarına 24, 48 ve 72 saat için ayarlanmış dozlarda 5 µM, 10 µM, 12.5 µM, 20 µM, 22.5 µM, 25 µM, 30 µM ve 50 µM konsantrasyonda muamele edildi. Neferinle muamele edilen ve muamele edilmeyen kontrol hücreleri, 10 µl 12mM MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich, Almanya) ile muamele edildi ve 4 saat boyunca 37°C' de inkübe edildi. Daha sonra karanlık bir hücre kültür ortamında besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Oyuklara dimetilsülfoksit (DMSO) 50 µl ilave edildi ve kristal mavisi eriyikleri çözmek için 20 dakika hafifçe çalkalandı. 575 nm'de absorbans, Multiskan SkyHigh Mikroplaka Spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak kaydedildi ve neferinin IC50 dozu 20 µM olarak belirlendi.

IC50 Etken Dozunun Hücrelere Uygulanması, Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi: HeLa ve HEK 293 hücreleri, bir hücre kültürü ortamında 20 µM neferin etken IC50 dozu ile muamele edildikten 48 saat sonra tekrar işleme tabi tutuldu. Kontrol grubu dahil tüm hücre grupları trizol (Sigma-Aldrich), kloroform ve izoamil alkol yöntemi uygulanarak klasik RNA izolasyon prosedürüne tabi tutuldu. RNA peleti, %75 etanol (%96, v/v) ile çökeltildi ve nükleaz içermeyen su içinde çözüldü. cDNA' lar, üreticinin talimatlarına göre 1 µg' ye eşitlenmiş total RNA'lardan RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre sentezlendi.

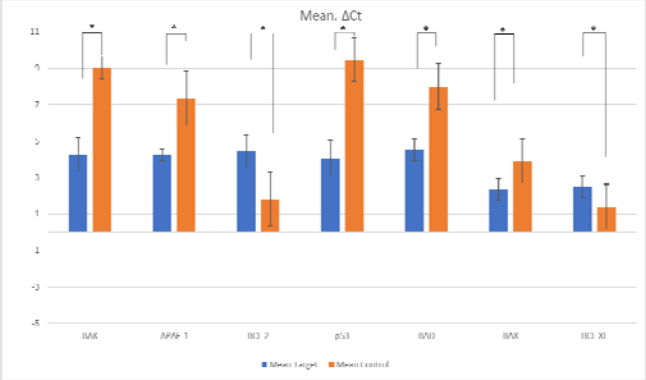
Kantitatif Real Time PCR (qPCR): QuantStudio™3 Real Time PCR sistemi (Applied Biosystems) ile üç kopya halinde tüm genler için

Tablo 1: qPCR analizi için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri

Gen	Oligonükleotid sekans (5'-3')	Amplikasyon boyut
Bax	F-CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	155
Bad	F-CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG R-CCCATCCCTTCGTCGTCCT	249
Bak	F-CATCAACCGACGCTATGACTC R-GTCAGGCCATGCTGGTAGAC	192
p53	F-CAGCACATGACGGAGGTTGT R-TCATCCAAATACTCCACACGC	125
Bcl-2	F-GGTGGGGTCATGTGTGTGG R-CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	89
Bcl-XL	F-GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC R-TCCATCTCCGATTCAGTCCCT	119
APAF-1	F-AAGGTGGAGTACCACAGAGG R-TCCATGTATGGTGACCCAT	116
GAPDH	F-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R-GGCTGTTGTCATACTTCTCAT	197



Şekil 1. MTT Analiz Grafiği



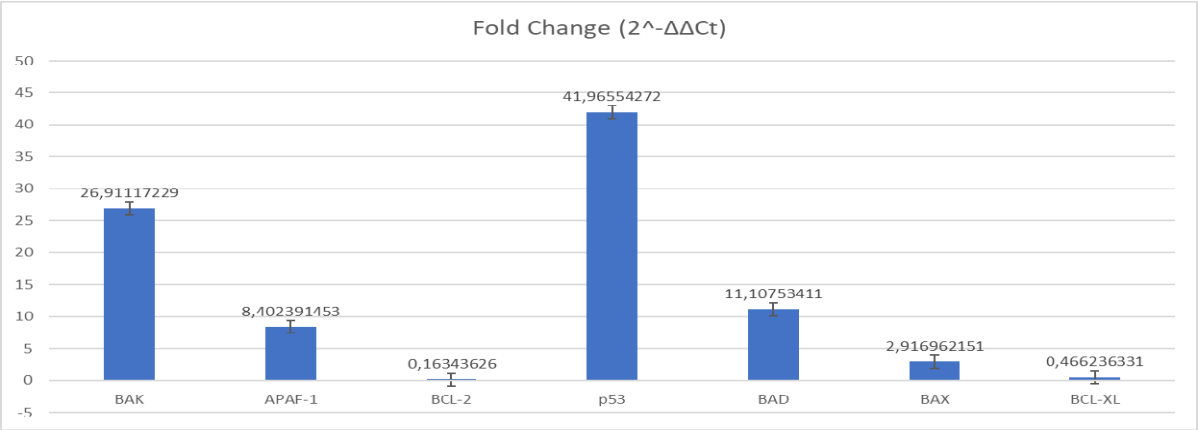
Şekil 2. Genler arasındaki ekspresyon farkı ve reaksiyona girme zamanlarına göre kıyaslanması

bir qPCR analizi yapıldı. Bcl-*2*, Bcl-XL, BAK, kullanılarak değerlendirildi (Tablo 1). Bir termal profil ve ardından erime eğrisi analiz aşamaları 15 dakika boyunca 95 °C' de, 40 döngü 95 °C' de 15 saniye, 56-60°C' de 30 saniye ve 72 °C' de 15 saniye boyunca gerçekleştirildi. Karşılaştırmalı ΔCT yöntemi ve housekeeping geni olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPHD), gen ekspresyonlarının normalizasyonunda kullanıldı.

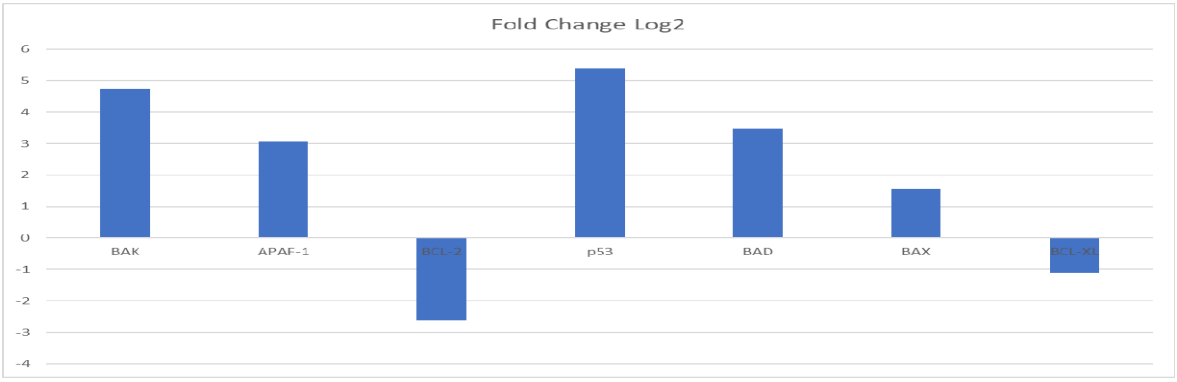
İstatistik Analiz: İstatistiksel analiz için IBM SPSS sürüm 21.0 kullanıldı. Delta delta Ct verilerine dayanarak, analiz edilen genler için APAF-1, p53, BAD, BAX ekspresyonu primerleri kontrol ve tedavi grupları arasında Student-t testi yapıldı *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *BAK*, *BAD*, *APAF-1*, *BAX*, *p53* ekspresyonlarının düzeyleri Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular

MTT analiz sonuçları kullanılarak neferinin IC50 dozu 48 saat boyunca 20 µM olarak belirlendi (Şekil-1). HeLa hücrelerinde neferin uygulamasından sonra antiapoptotik genlerde (Bcl-2 ve Bcl-XL) down regülasyon, apoptotik genlerde (BAK, APAF-1, p53, BAD ve BAX) up regülasyon tespit edildi (Şekil-3). Uyguladığımız neferin sonrası en yüksek gen ekspresyon değişiklikleri BAK, APAF-1, p53 ve BAD üzerinde oldu. (Şekil-4). APAF-1'de 3 kat, BAK'ta 4.8 kat, p53 'te 5.4 kat, BAD'da 3.5 kat artış olduğu gösterildi.



Şekil 3. Artış ve azalış gösteren genlerin kantitatif değişiklikleri 0 ve 1 arasındaki değerler: down regülasyonu göstermektedir.



Şekil 4. Artış ve azalış gösteren genlerin kalitatif değişiklikleri

Tartışma

Serviks kanseri jinekolojik kanser türleri arasında mortalite ve morbiditesi yüksek bir kanserdir. Sağlıklı hücreler için daha az toksik olabilecek bitkisel tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Bitkisel tedavi yöntemleri kemoterapiye göre daha az yan etki profiline sahiptir. Bitkisel ajanlar farmakolojik özellikleri nedeniyle hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (1). Neferin, Nelumbo Nucifera'nın tohumlarından elde edilen doğal bir alkaloiddir. Çalışmamızda Neferin'in, HeLa hücre hatlarının canlılığını *in vitro* olarak inhibe ettiği tespit edildi. Neferinin IC50 dozu 48 saat boyunca 20 µM konsantrasyonunda HeLa hücrelerinin canlılığına karşı güçlü bir etkisi olduğu gösterildi. Neferin antiapoptotik genleri down regülasyon yaparken, apoptotik genlerde up regülasyon yaptığı saptandı. Apoptoz, hücre büyümesi ve ölümünü dengeleyen ve hedefe yönelik kanser tedavisinde kullanılabilen programlanmış bir hücre ölümüdür (11). Apoptotik sürece mitokondri veya endoplazmik retikulum aracılık edebilir. Bcl-2 ailesinin bir protein sınıfı bu olayları kontrol eder.

Mitokondriyal membranın geçirgenliği yoluyla sitokrom c salınımının düzenlenmesinde rol oynayan proapoptotik proteinler (BAK, BCL-10, BAX, BAD, BID, BIM, BIK, HRK) ve antiapoptotik proteinler (BCL-2, BCL-X, BCL-W, BF-1, BCL-XL, B-XS, BCL-W, BAG) apoptoz gelişiminde önemlidir (12). Ayrıca p53'ün Bcl-2 protein ailesinin üyelerini düzenlediği gösterilmiştir. p53, proapoptotik bir protein olan Bax'ın transkripsiyonunu doğrudan indükleyerek apoptoz gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir (13). Çalışmamızda apoptozda yer alan proapototik proteinlerin ve p53 gen ekspresyonu artmış olup antiapoptotik proteinlerin gen ekspresyonu azalmış olduğu saptandı. Neferin' in HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olduğu tespit edildi. Kemoterapötik ajanlar tarafından apoptoz indüksiyonu, kanser tedavisi için en etkili yöntemlerden biri olmuştur. Sitotoksik ajanlara yanıt olarak gelişen apoptozis hedeflenen kanser tedavisinde yararlı bir araç haline gelmiştir. Doğal bileşikler düşük yan etki profili ve daha az kemoterapi direnci geliştirmesi nedeniyle, farklı mekanizmalarla apoptozu indükleyerek kanser

tedavisinde kullanılabilir (1). Neferin servikal kanser tedavisinde apoptotik ve hücre canlılığını inhibe edici etkileriyle, daha az yan etki profili sağlayarak farmakolojik tedavide kullanılabilir. Dassari ve ark. (14) neferinin HEK-293 hücrelerine minimum toksik etkiler gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Neferin' in antitümöral etki mekanizması net tanımlanmamıştır. Serbest oksijen radikalleri, otofaji ve apoptozun önemli bir rol aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, neferinin akciğer, meme ve serviks kanserinde kaspaz 3, kaspaz 9 ve BAX ekspresyonunu artırarak ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptoza neden olduğu rapor edilmiştir (3,6,8). Dassari ve ark. (14) neferinin, HeLa ve SiHa servikal kanser hücrelerinde Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9' un up regülasyonu ve Bcl-2' yi down regüle ederek apoptozu aktive ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca apoptozu bloke eden p53 ile ilişkili E6 onkoproteini down regüle edildiğini bildirmişlerdir. Eid ve ark. (8) neferin ile mitomisin kombinasyon tedavisinin, tek başına verilen mitomisin tedavisine göre apoptozu daha fazla indüklediğini bildirmişlerdir. Kombinasyon tedavisinin Bax, kaspaz 3 ve Bad protein seviyelerini daha fazla arttırdığını ve Bcl-2 protein seviyelerinini daha fazla azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada neferinin HeLa dışındaki farklı servikal kanser hücre dizilerinde de aynı apoptotik etkiyi göstererek; antitümör etkisinin HeLa hücre dizisine özgü olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak HeLa hücrelerinde neferinin intrensink yol ile proapoptotik gen ekspresyonunu (BAK, APAF-1, P53, BAD, BAX) arttırdığını ve antiapoptotik gen ekspresyonunu (Bcl-2, Bcl-XL) azalttığını belirledik (Şekil -3, Şekil -4). Çalışmamızda tek tip servikal kanser hücre hattı ile çalışılması, tek merkezli çalışma olması,apoptoziste extrensenk yolun araştırılmaması gibi kısıtlılıklar mevcuttur. Bu çalışma farklı hücre kültür hatları ile çok merkezli olarak desteklenmesi durumunda daha değerli olacak ve literatüre katkıda bulunacaktır.

Çalışma Sınırlamaları:

Çalışmamızda tek tip servikal kanser hücre hattı HeLa ile çalışılması diğer serviks kanser hücre hatları kullanılmaması (SiHa vb .) tek merkezli çalışma olması , apoptoziste extrensenk yolun araştırılmaması ve apoptoziste annexin v yönteminin kullanılmaması gibi kısıtlılıklar mevcuttur. Bu çalışma farklı hücre kültür hatları ile çok merkezli olarak desteklenmesi ve apoptozisin farklı mekanizmalarla gösterilmesi durumunda daha değerli olacak ve literatüre katkıda bulunacaktır.

Sonuç

Neferin'in servikal kanser hücrelerinde canlılığı inhibe ettiğini, başta p53 gibi tümör supressör apoptotik genlerin expresyonunu arttırarak anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu ve antiapoptotik genleri down regüle ettiğini gösterdik. Bu bulgular, neferinin serviks kanseri hücrelerine karşı potansiyel anti-proliferatif ve apopitotik aktiviteye sahip farmakolojik bir bileşik olabileceğini göstermekle birlikte, aynı zamanda yeni servikal kanser tedavilerinin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya koymuştur.

Etik Onam: Etik kurul izni, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan 16/01/2019 tarihli 25 numaralı kararı ile alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarların bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma Konya Selçuk Üniversitesi BAP projesi kapsamında finanse edilmiştir.

Yazar Katkıları: Konsept (GŞ), Tasarım (GŞ, TD, DB), Veri Toplama ve/veya Işleme (GŞ, TD, NK), Analiz ve/veya yorumlama (GŞ, SK, AK, ÇÇ)

Kaynaklar

1. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, et al. Progress in cancer chemoprevention: Development of diet-derived chemopreventive agents. J Nutr 2000; 130: 467-471.
2. Kadioglu O, Law BYK, Mok SWF, Xu SW, Efferth T, Wong VKW. Mode of Action Analyses of Neferine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid of Lotus (Nelumbo nucifera) against Multidrug - Resistant Tumor Cells. Front Pharmacol 2017; 8: 238.
3. Sivalingam KS, Paramasivan P, Weng CF, Viswanadha VP. Neferine potentiates the antitumor effect of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells via a mitochondria-mediated apoptosis pathway. J Cell Biochem 2017; 118: 2865-2876.
4. Huang C, Li Y, Cao P, Xie Z, Qin Z. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant SGC7901/ADM

gastric cancer cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2011; 31: 488-496.
5. Poornima P, Weng CF, Padma VV. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest. Biofactors 2014; 40: 121-131.
6. Liu Z, Zhang S, Wang T, Shao H, Gao J, Wang Y, et al. Neferine inhibits MDA-MB-231 cells growth and metastasis by regulating miR-374a/FGFR-2. Chem Biol Interact 2019; 309: 108716.
7. Liang HX, Sun L, Liu N. Neferine inhibits proliferation, migration and invasion of U251 glioma cells by down-regulation of miR-10b. Biomed Pharmacother 2019; 109: 1032-1040.
8. Eid W, Abdel-Rehim W. Neferine enhances the antitumor effect of mitomycin-C in Hela cells through the activation of p38-MAPK pathway. J Cell Biochem 2017; 118: 3472-3479.
9. Pham DC, Chang Y, Lin S, Fuh Y, Tsai M, Weng C, et al. FAK and S6K1 inhibitor, neferine, dually induces autophagy and apoptosis in human neuroblastoma cells. Molecules 2018; 23: 3110.
10. Poornima P, Quency RS, Padma VV. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. Food Chem 2013; 136: 659-667.
11. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. Cell 1994; 78: 539-542.
12. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res 2009; 15: 1126-1132.
13. Bai L, Zhu WG. P53: structure, function and therapeutic applications. J Mol Cancer 2006; 2: 141-153.
14. Dasari S, Bakthavachalam V, Chinnapaka S, Venkatesan R, Samy ALPA, Munirathinam G. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo targets HeLa and SiHa cervical cancer cells via pro-oxidant anticancer mechanism.Phytother Res 2020; 34: 2366-2384.