

Investigating the synergistic effect of berberine and cisplatin on induction of apoptosis in Calu-6 cell line and evaluation of changes in the expression level of BAX, p53, Caspase 3, Caspase 9 genes

Shadab-Abhari Sh¹, Baharara J^{2*}, Balanezhad SZ¹

1- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran.

2- Department of Biology and Research Center, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran.

Received: 2020/08/1 | Accepted: 2021/11/9

Abstract:

Background: Lung cancer is the most common cause of cancer death worldwide. Berberine as a herbal alkaloid has antioxidant, anti-cancer and anti-tumor properties. Cisplatin is a potent inducer of apoptosis in most types of cancer cells. In the present study, investigated the ability of berberine alone and in combination with cisplatin to induce apoptosis in the Calu-6 cell line (human lung cancer cell line).

Materials and Methods: In this experimental study, MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effects of combination of berberine with cisplatin on Calu-6 cell proliferation; DAPI staining and annexin V-FITC assay were also used to evaluate apoptosis in treated cells; changes in the level of transcripts of BAX, Caspase 3,9, p53 genes were examined by real-time PCR. Quantitative data were analyzed by one-way ANOVA at a significant level of $P < 0.05$.

Results: The MTT assay results showed that the combination of berberine with cisplatin inhibits the proliferation of Calu-6 cells in a concentration- and time-dependent manner. Morphological observations obtained from DAPI staining method and annexin V-FITC assay showed an increase in apoptotic cells in the treatment groups. The real-time PCR results showed an increase in the expression of transcripts of BAX, Caspase 3,9, p53 genes in the treatment groups.

Conclusion: The results of this research showed that the concomitant use of berberine with cisplatin inhibits the proliferation of Calu-6 cells and induces apoptosis in these cells.

Keywords: Lung cancer, Apoptosis, Berberine, Cisplatin, Calu-6 cell line

***Corresponding Author**

Email: baharara78@gmail.com

Tel: 0098 513 843 7092

Fax: 0098 513 843 7092

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2022; Vol. 25, No 6, Pages 1275-1285

Please cite this article as: Shadab-Abhari Sh, Baharara J, Balanezhad SZ. Investigating the synergistic effect of berberine and cisplatin on induction of apoptosis in Calu-6 cell line and evaluation of changes in the expression level of BAX, p53, Caspase 3, Caspase 9 genes. *Feyz* 2022; 25(6): 1275-85.

بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در رده سلولی Calu-6 و ارزیابی تغییرات به‌وجودآمده در سطح بیان ژن‌های BAX, p53, Caspase3, Caspase9

شاداب ابهری^۱، جواد بهارآرا^{۲*}، سعیده ظفر بالانژاد^۱

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است. بربرین یک آلکالونید گیاهی و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدتوموری می‌باشد. سیس‌پلاتین یک القاکننده قوی آپوپتوز در اکثر انواع سلول‌های سرطانی می‌باشد. در مطالعه حاضر توانایی بربرین به‌تنهایی و در ترکیب با سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در رده سلولی Calu-6 (دودمان سرطان ریه انسانی) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب توأم بربرین با سیس‌پلاتین بر تکثیر سلول‌های Calu-6 از آزمون MTT استفاده شد؛ جهت بررسی آپوپتوز در سلول‌های تحت‌تیمار از رنگ‌آمیزی DAPI و آزمون Annexin V-FITC استفاده شد؛ تغییرات در سطح بیان نسخه رونوشت ژن‌های BAX, Caspase 3,9, p53 با تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد. داده‌های کمی حاصل توسط آزمون آماری واریانس یک‌طرفه ANOVA در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تحلیل گردید.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که ترکیب بربرین با سیس‌پلاتین، تکثیر سلول‌های Calu-6 را به‌صورت وابسته به غلظت و زمان، مهار می‌کند، مشاهدات مورفولوژیک حاصل از روش DAPI و نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان‌دهنده افزایش سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیماری بود. نتایج Real-time PCR نشان‌دهنده افزایش بیان نسخه رونوشت ژن‌های BAX, Caspase 3,9, p53 در گروه‌های تیماری بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاربرد توأم بربرین همراه با سیس‌پلاتین، تکثیر سلول‌های Calu-6 را مهار می‌کند و باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود.

واژگان کلیدی: سرطان ریه، آپوپتوز، بربرین، سیس‌پلاتین، رده سلولی Calu-6

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۴۰۰، صفحات ۱۲۸۵-۱۲۷۵

مقدمه

براساس جدیدترین گزارش‌های سال ۲۰۲۰، ۱۹/۳ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان گزارش شده است [۲]؛ در ایران سرطان سومین علت شایع مرگ پس از بیماری‌های قلبی، حوادث و پدیده‌های طبیعی می‌باشد [۳،۴]. سرطان ریه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و مهم‌ترین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد؛ در سال ۲۰۲۰؛ بیش از ۲/۲ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان ریه گزارش شده است؛ همچنین این نوع از سرطان بالاترین میزان مرگ ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است؛ سرطان ریه به دو گروه تقسیم می‌شود: سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک و سرطان ریه سلول‌های کوچک؛ میزان پیشرفت سرطان ریه براساس نوع سلول درگیر، متفاوت می‌باشد [۵،۶]. ایمونوتراپی، جراحی، پرتودرمانی و درمان‌های هدفمند از جمله گزینه‌های درمانی سرطان ریه می‌باشند [۷]. سیس‌پلاتین از جمله مؤثرترین داروهای شیمیایی مورد استفاده برای درمان تومورهای توپر است؛ سیس‌پلاتین باعث تشکیل ترکیبات اضافی درون‌رشته‌ای و یا بین رشته‌ای با DNA می‌شود و یک القاکننده قوی برای توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در انواع سلول‌های سرطانی به‌شمار می‌رود؛ سیس‌پلاتین در درمان سرطان‌های کبد، سر

سرطان، بیماری است که در اثر تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها که تحت کنترل فاکتورهای تومورزا می‌باشند، ایجاد می‌شود؛ بیشتر تومورها توسط شش قابلیت فیزیولوژیکی مشخص می‌شوند؛ که عبارتند از: خودکفایی در سیگنال‌های رشد، عدم حساسیت به سیگنال‌های بازدارنده رشد، فرار از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، توان همانندسازی نامحدود، رگ‌زایی، تهاجم و متاستاز [۱].

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی،

تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲ دوزنویس: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲

پست الکترونیک: baharara78@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۱ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۹/۲۷

بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در...

القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود [۲۰]. هدف از این پژوهش تجربی؛ بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین در رده سلولی Calu-6 (سلول‌های سرطانی ریه انسانی) و ارزیابی تغییرات در سطح بیان نسخه رونوشت ژن‌های Caspase 3, BAX, p53, Caspase 9 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مقاله با شماره طرح ۱۶۲۳۳۷۸۰ و کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.055 مورد تأیید می‌باشد.

تهیه و کشت سلول‌های رده Calu-6

رده سلولی سرطان ریه انسانی Calu-6؛ متعلق به سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک از انستیتو پاستور ایران (NCBI Code: C431) تهیه شد و در محیط کشت RPMI BIO-IDEA; Iran حاوی ۱۰ درصد FBS Gibco; USA و یک درصد آنتی‌بیوتیک BIO-IDEA; Iran؛ کشت داده شد [۲۱].

آزمون MTT جهت تعیین سمیت سلولی

به منظور بررسی تأثیر بربرین Sigma-Aldrich; USA

سیس‌پلاتین و کاربرد توأم بربرین و سیس‌پلاتین، بر روی تکثیر سلول‌های Calu-6 از آزمون MTT استفاده شد؛ برای این کار ابتدا تعداد 3×10^3 عدد از سلول‌ها؛ بعد از شمارش توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو BIO-IDEA; Iran؛ در یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد، بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها؛ سلول‌های Calu-6 با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین؛ غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین و غلظت‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین برای زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند؛ بعد از گذشت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول Sigma-Aldrich; USA MTT به محیط سلول‌ها اضافه شد و پلیت کشت سلول‌ها برای مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد؛ بعد از گذشت این مدت، مایع رویی سلول‌ها خارج شد و مقدار ۸۰ میکرولیتر؛ دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد؛ در نهایت پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفتومتر EPOCH منتقل شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد [۲۲]. درصد سلول‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$= 100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار}}$$

درصد سلول‌های زنده

و گردن، ریه، تخمدان، لنفوم، مری و غیره کاربرد دارد [۹۸]. فرآیند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در تنظیم میزان رشد و تکثیر سلول‌ها بسیار مهم بوده، بروز بسیاری از بیماری‌ها، مانند انواع سرطان‌ها؛ نتیجه عملکرد ضعیف یا مهارشدن فرآیند آپوپتوز است [۱۱، ۱۰]. سلول‌های سرطانی اغلب با بیان بیش از حد یا تثبیت پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک از آپوپتوز فرار می‌کنند؛ مکانیسم مشترک دیگری که به بقای سلول‌های سرطانی کمک می‌کند، غیرفعال کردن عوامل رونویسی محرک آپوپتوز است [۱۲]. فرآورده‌های طبیعی نقش بسیار مهمی در کشف داروهای ضدسرطان دارند [۱۳]. برخی از مطالعات نشان‌دهنده اثرات ضدسرطانی فرآورده‌های طبیعی؛ در شرایط آزمایشگاهی در برابر دودمان‌های مختلف سرطانی می‌باشد [۱۴]. گیاهان منبع برجسته‌ای از عوامل درمانی هستند؛ خواص درمانی گیاهان مربوط به پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی قوی آن‌ها می‌باشد؛ گیاهان طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی را تولید می‌کنند که به این ترکیبات، متابولیت ثانویه گفته می‌شود، این ترکیبات دارای اثرات ضدالتهابی و ضدسرطانی می‌باشند [۱۵]. آلکالوئیدها، متابولیت‌های ثانویه مهمی هستند که به دلیل خواص درمانی بسیار زیاد می‌توانند به‌عنوان یک متابولیت ارزشمند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مثل سرطان در نظر گرفته شوند [۱۶]. بربرین یک آلکالوئید ایزوکوئینولین گیاهی با تاریخ درمانی بسیار طولانی است که در طب سنتی ایران، چین و هند به کار رفته است؛ این آلکالوئید در ریشه، ریزوم، پوست و ساقه بسیاری از گیاهان خانواده‌ی *Coptis chinensis* و زرشک *Berberis Vulgaris* وجود دارد؛ این ترکیب دارای چندین فعالیت فارماکولوژیک آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضدسرطانی و ضدتوموری است؛ اخیراً مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که بربرین از تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده، باعث آپوپتوز در انواع مختلف رده‌های سرطانی می‌شود [۱۷]. در این راستا؛ Park و همکاران در سال ۲۰۱۲؛ اثر بربرین را بر رده‌های سلولی 8505C و TPC1 بررسی کردند و دریافتند که بربرین به‌صورت وابسته به غلظت می‌تواند باعث کاهش تکثیر این سلول‌ها شود [۱۸]. Lin و همکاران در سال ۲۰۱۷؛ اثر سیس‌پلاتین را روی سلول‌های سرطانی مثانه بررسی کردند و نشان دادند که سیس‌پلاتین باعث کاهش تکثیر و القای آپوپتوز در این سلول‌ها به‌صورت وابسته به غلظت و زمان می‌شود [۱۹]. در سال ۲۰۲۰ Liu و همکاران؛ در پژوهشی به بررسی تأثیر بربرین بر رده‌های سلولی SiHa و Ca Ski (سرطان دهانه رحم انسانی) پرداختند؛ نتایج نشان داد که بربرین باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، همچنین بربرین با افزایش سطح بیان ژن‌های Bax و کاسپاز-۳ و کاهش سطح بیان ژن Bcl-2 باعث

رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI

برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها، بررسی مورفولوژی آپوپتوز، بررسی میزان تراکم و یا قطعه‌قطعه شدن کروماتین در هسته سلول‌های تیمار شده و مقایسه آن با گروه کنترل از روش رنگ‌آمیزی Sigma-Aldrich DAPI استفاده شد؛ برای این کار، در ابتدا یک کاور اسلیپ استریل در کف هر چاهک پلیت ۶ خانه قرار داده شد، سپس تعداد 5×10^4 عدد از سلول‌های Calu-6 بر روی کاور اسلیپ‌ها کشت داده شدند؛ بعد از گذشت زمان مناسب از کشت و چسبیدن سلول‌ها به کاور اسلیپ‌ها به آرامی از گوشه هر چاهک پلیت؛ محیط کشت کامل برای گروه کنترل و محیط‌های تیماری (بربرین با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیس‌پلاتین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بربرین با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه سیس‌پلاتین با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای گروه‌های تیماری اضافه شد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ محیط رویی تمامی گروه‌ها برداشته شد و مقدار یک میلی‌لیتر متانول، به‌عنوان فیکساتور سلولی به پلیت اضافه شد و در نهایت سلول‌ها تحت اثر رنگ DAPI قرار گرفتند و تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد [۲۳].

آزمون Annexin V-FITC

از این آزمون به‌منظور تعیین نوع مرگ سلولی استفاده شد؛ جهت انجام این آزمون از کیت Abcam; UKAnnexin V-

FITC Apoptosis استفاده شد؛ به این صورت که ابتدا تعداد 5×10^4 عدد از سلول‌های Calu-6 در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، گروه سلول‌های تیمار شده با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین، گروه سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین و گروه سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیس‌پلاتین تیمار شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ براساس پروتکل کیت آماده شدند و در نهایت نمونه‌های به‌دست‌آمده جهت بررسی نوع مرگ سلولی با دستگاه فلوسایتمتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند [۲۴].

تکنیک Real-time PCR

مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت استخراج Pars tous; Iran RNA صورت گرفت و برای اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج شده، میزان غلظت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر EPOCH سنجیده شد؛ در ادامه سنتز cDNA طبق پروتکل کیت Pars tous; Iran صورت گرفت و در نهایت تغییرات در سطح بیان نسخه رونوشت ژن‌های BAX, Caspase 3,9, p53 در سلول‌های Calu-6 براساس پرایمرهای طراحی شده (مطابق با جدول شماره ۱) توسط دستگاه Bio-Rad CFX Manager و نرم‌افزار CFX96 RT-PCRs و نرم‌افزار Bio-Rad CFX Manager برحسب $\Delta\Delta Cq$ بررسی شد [۲۴، ۲۵].

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real-time PCR.

Gene	Reverse	Forward
GAPDH	TGA CTT CAA CAG CGA CAC C	TTG CTG TAG CCA AAT TCG TT
BAX	TTT GCT TCA GGG TTT CAT CCA	CTC CAT GTT ACT GTC CAG TTC GT
Caspase 3	AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG	GTT CAT CCA GTC GCT TTG TGC
Caspase 9	CCA GAG ATT CGC AAA CCA GAG	CAA TGT GAA CTT CTG CCG TGA
p53	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GA	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG

نتایج

نتایج حاصل از آزمون MTT

نتایج آزمون MTT نشان داد که میزان زنده‌بودن سلول‌ها به‌صورت وابسته به غلظت و زمان در گروه‌های تیماری کاهش می‌یابد، به این صورت که با افزایش غلظت بربرین و سیس‌پلاتین و گذشت زمان بیشتر از تیمار سلول‌ها درصد زیست‌پذیری سلول‌ها کاهش می‌یابد؛ همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که، استفاده توأم از بربرین و سیس‌پلاتین اثر بیشتری بر روند کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی رده Calu-6 نسبت به زمانی که از هر کدام

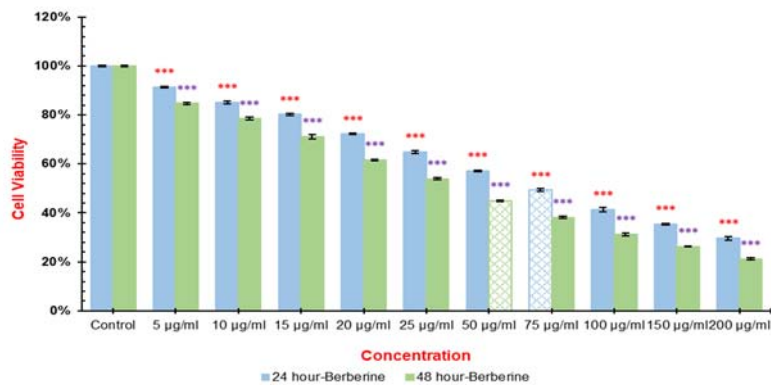
روش تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آماری حاصل از این مطالعه، در نرم‌افزار SPSS (Version 26) و به کمک آزمون آماری واریانس یک‌طرفه ANOVA در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند و با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شده‌اند. برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی؛ تمام آزمایشات به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند.

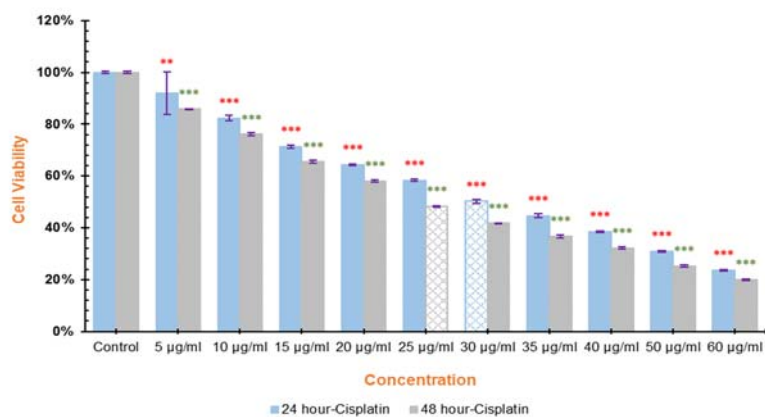
بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در...

همچنین میزان IC_{50} در زمان ۴۸ ساعت برای بربرین غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای سیس‌پلاتین غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین برای کاربرد توأم بود.

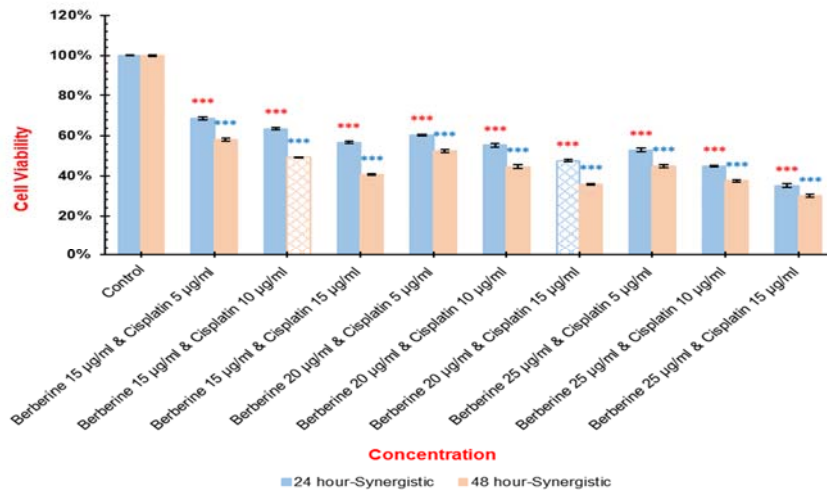
به‌تنهایی استفاده کردیم؛ دارد. با تعیین غلظت مهاری IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت مشخص شد که این میزان برای بربرین غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای سیس‌پلاتین غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین برای کاربرد توأم، می‌باشد:



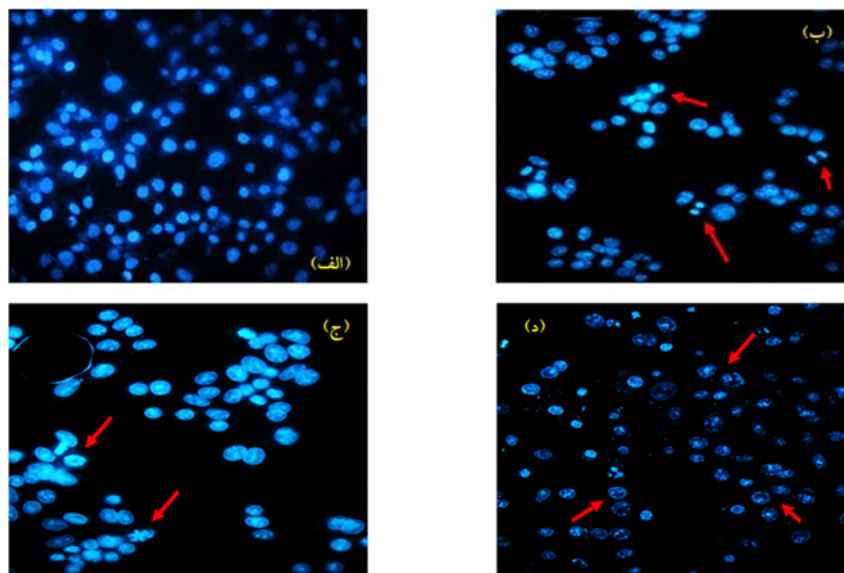
نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین درصد زنده‌ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با بربرین در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. ($P < 0.001$ (***)).



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین درصد زنده‌ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با سیس‌پلاتین در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. ($P < 0.001$ (***) ($P < 0.01$ (**)).



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار توأم بربرین به همراه سیس‌پلاتین در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. ($P < 0.001$ (***)



شکل شماره ۱- مشاهده هسته سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی DAPI بعد از گذشت ۲۴ ساعت.

(الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین؛ (ج) تیمار با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین؛ (د) تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین. نوک پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌هایی می‌باشد که دچار آپوپتوز شده‌اند. درشت‌نمایی تصاویر: ۴۰۰ X

با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه سیس‌پلاتین با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر؛ در زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند؛ نسبت به هسته سلول‌های گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکرده‌اند، تغییرات مورفولوژیکی دیده می‌شود. در گروه‌های تیماری هسته‌ها قطعه‌قطعه شده‌اند و شکل هسته‌ها از حالت نرمال خارج شده که می‌تواند نشانه‌ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها باشد.

نتایج رنگ‌آمیزی DAPI

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، نتایج مورفولوژی حاصل از روش رنگ‌آمیزی DAPI نشان می‌دهد که در هسته سلول‌های Calu-6 که تحت تیمار با غلظت‌های IC_{50} از بربرین (غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سیس‌پلاتین (غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیب توأم بربرین و سیس‌پلاتین (بربرین

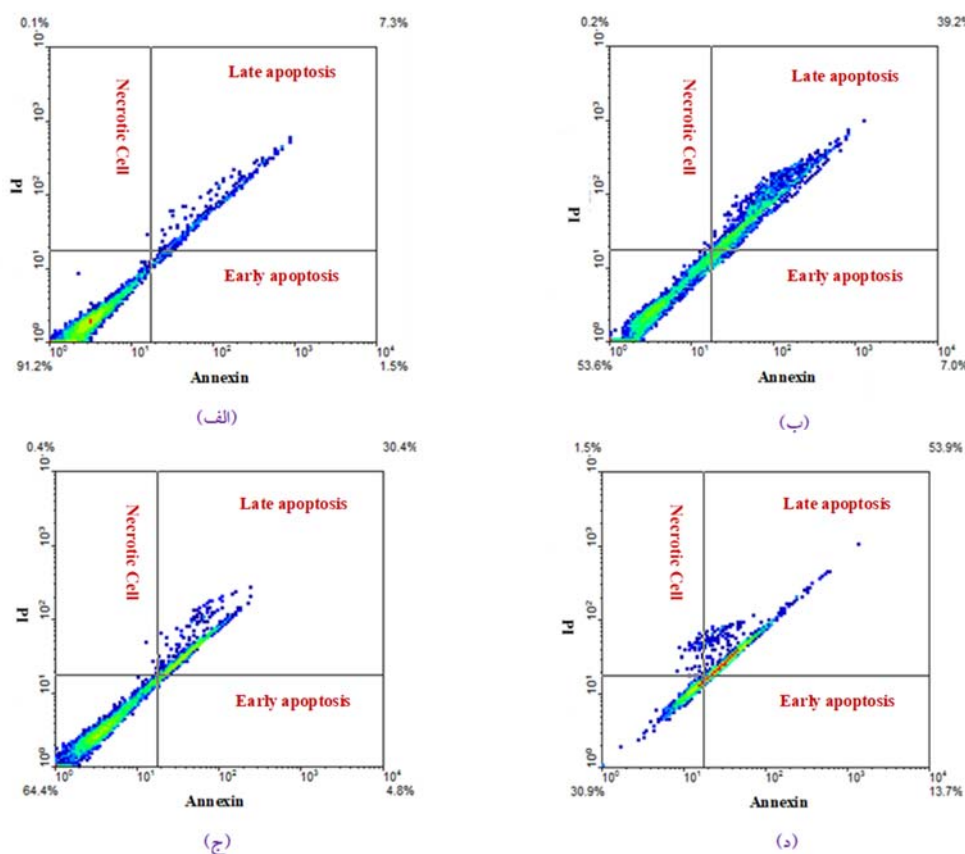
بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در...

می‌باشند، در گروه تیمار شده با بربرین ۳۹/۲ درصد از سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه و ۰/۲ درصد از سلول‌ها دچار نکروز شده‌اند؛ همچنین در گروه تیماری سیس‌پلاتین درصد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند، ۳۰/۴ درصد می‌باشد و در گروه تیماری کاربرد توأم بربرین به همراه سیس‌پلاتین شاهد بیشترین مرگ سلولی به صورت آپوپتوز ثانویه هستیم، به طوری که در این گروه، در ۵۳/۹ درصد از سلول‌های Calu-6 آپوپتوز ثانویه رخ داده است و در ۰/۴ درصد از سلول‌ها نکروز اتفاق افتاده است.

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین آسیب سلولی و تغییرات مورفولوژیک در هفته‌ها زمانی اتفاق افتاده است که سلول‌ها با ترکیبی از بربرین و سیس‌پلاتین تیمار شده‌اند.

نتایج تست Annexin V-FITC

برای انجام این تست، سلول‌های Calu-6؛ با غلظت‌های IC_{50} ؛ در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند؛ همان‌طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود؛ نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان می‌دهد، درحالی‌که در گروه کنترل ۹۱/۲ درصد از سلول‌های Calu-6 زنده



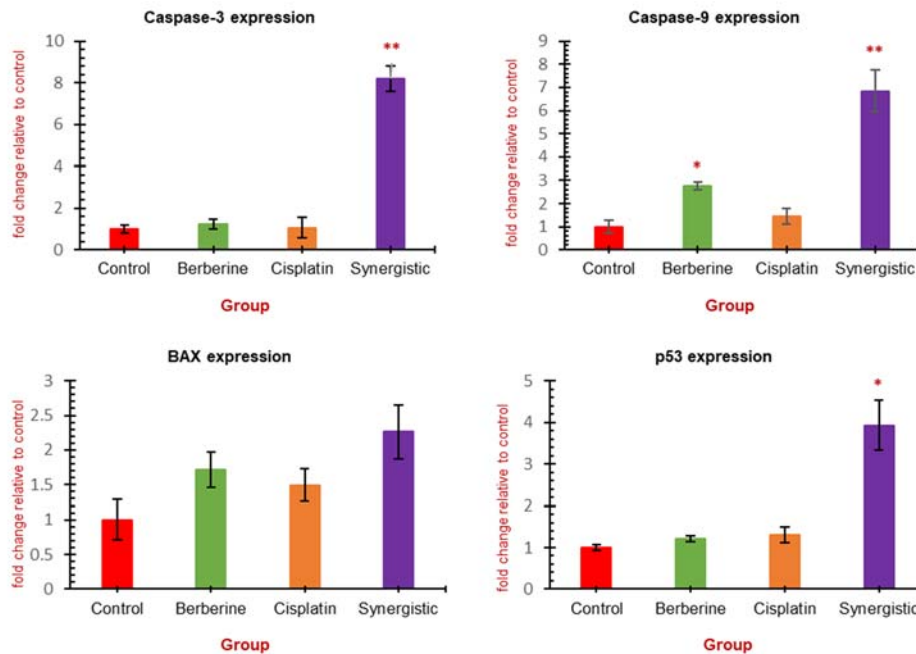
شکل شماره ۲: آنالیز فلوسایتومتری

(الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین؛ (ج) تیمار با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیس‌پلاتین؛ (د) تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بربرین به همراه غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیس‌پلاتین

القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده Calu-6 تحت تیمار نسبت به گروه کنترل بوده است. به‌طورکلی نتایج به‌دست‌آمده از Real-time PCR نشان داد که استفاده از ترکیب توأم بربرین و سیس‌پلاتین می‌تواند باعث افزایش قابل‌توجهی در سطح بیان ژن‌های BAX, p53, Caspase 3,9 در سلول‌های سرطانی ریه رده Calu-6 شود؛ که این امر می‌تواند نشان‌دهنده توانایی این ترکیب در القای آپوپتوز در سلول‌های رده Calu-6 باشد.

نتایج بررسی بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real-time PCR

همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود؛ میزان بیان ژن‌های BAX, p53, Caspase 3,9 در تمام گروه‌های تیماری (بربرین با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیس‌پلاتین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بربرین با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه سیس‌پلاتین با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است؛ که این امر نشان‌دهنده



شکل شماره ۳: بررسی میزان تغییرات در بیان ژن‌های آپوپتوزی Caspase 3,9, p53, BAX توسط تکنیک Real-time PCR (** $p < 0.01$) (* $p < 0.05$)

متوترکسات به صورت وابسته به غلظت و زمان تکثیر سلول‌های سرطانی Hela را کاهش می‌دهند، ولی استفاده از ترکیب توأم بربرین و متوترکسات اثر بسیار قوی‌تری در مهار تکثیر سلول‌های رده Hela داشت [۲۸]: نتایج مربوط به آزمون MTT این بررسی با نتایج مطالعه حاضر همسو می‌باشد و نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیک قوی‌تر فرآورده‌های گیاهی در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی در برابر رده‌های مختلف سرطانی است. بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی دیده می‌شود؛ همان‌طور که در شکل شماره ۱ هم مشخص می‌باشد، در گروه‌های تیماری هسته‌ها قطعه‌قطعه و از حالت نرمال خارج شده‌اند، که این امر می‌تواند نشانه‌ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها باشد؛ بیشترین آسیب سلولی و تغییرات در هسته‌ها زمانی اتفاق افتاده است که سلول‌ها با ترکیبی از بربرین و سیس‌پلاتین تیمار شده‌اند؛ در سال ۲۰۱۹ Liu و همکاران؛ به بررسی اثر بربرین به تنهایی و در ترکیب با سیس‌پلاتین بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان پرداختند، بررسی‌های مورفولوژی توسط میکروسکوپ نشان داد که سلول‌های سرطانی تخمدان در گروه‌های تیماری دچار تغییرات مورفولوژیک شده‌اند و تعداد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند، به طور قابل توجهی افزایش یافته است [۲۹]: که با نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده توانایی ترکیب بربرین همراه با سیس‌پلاتین در افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در

بحث

در این پژوهش تجربی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در رده سلولی Calu-6 (سرطان ریه انسانی) و ارزیابی تغییرات در سطح بیان نسخه رونوشت ژن‌های BAX, Caspase 3,9, p53 بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که بربرین و سیس‌پلاتین می‌توانند به صورت وابسته به غلظت و زمان منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی رده Calu-6 شوند. بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که از کاربرد توأم بربرین و سیس‌پلاتین جهت تیمار سلول‌ها استفاده شد؛ به این صورت که در این محیط تیماری تکثیر سلول‌ها به طور قابل توجهی مهار شد. این نتایج بیانگر این است که ترکیب بربرین با سیس‌پلاتین اثر بیشتری بر مهار تکثیر سلول‌ها دارد؛ که این امر با توجه به کاهش میزان غلظت IC_{50} نسبت به زمانی که از بربرین و سیس‌پلاتین به تنهایی استفاده کردیم، قابل اثبات است؛ در سال ۲۰۲۰ Wang و همکاران؛ در تحقیقی به مطالعه توانایی بربرین بر روی القای آپوپتوز در رده سلولی SNU-1 (سرطان معده انسانی) پرداختند و نشان دادند که بربرین به صورت وابسته به غلظت میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی معده را کاهش می‌دهد [۲۷]: که با نتایج حاصل از آزمون MTT مطالعه حاضر همسو می‌باشد. در سال ۲۰۲۱ مجیدزاده و همکاران؛ به بررسی اثر بربرین به تنهایی و در ترکیب با داروی شیمی‌درمانی متوترکسات بر روی رده سلولی Hela پرداختند، نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که بربرین و

بررسی اثر هم‌افزایی بربرین و سیس‌پلاتین بر القای آپوپتوز در...

همکاران؛ در تحقیقی به بررسی ترکیب بربرین و سیس‌پلاتین بر روی سلول‌های سرطان معده انسانی پرداختند و نشان دادند که استفاده از این ترکیب به‌طور قابل‌توجهی میزان آپوپتوز را در سلول‌های رده SGC-7901 و BGC-823 افزایش می‌دهد، همچنین این ترکیب باعث افزایش قابل‌توجه در فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی معده می‌شود [۳۳]؛ نتایج حاصل از تحقیقات انجام‌شده در این پژوهش، با نتایج حاصل از آزمایش حاضر هم‌خوانی دارد. در سال ۲۰۲۰ Li و همکاران؛ در پژوهشی به مطالعه اثر بربرین بر روی چندین رده سلولی سرطانی (رده‌های Tca8113, CNE2, MCF-7, HeLa, HT29) پرداختند و نشان دادند که بربرین در برابر تمامی این رده‌ها دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشد، نتایج بررسی بیان ژن‌ها در تمامی سلول‌های تحت تیمار با بربرین نشان‌دهنده افزایش قابل‌توجه در بیان ژن آپوپتوزی BAX بود [۳۴]؛ که با نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده اثر بربرین در تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های Calu-6 بود، هم‌خوانی دارد؛ در سال ۲۰۱۶ Wang و همکاران اثر بربرین را روی تکثیر و آپوپتوز سلول‌های رده HeLa229 بررسی کردند و نشان دادند که بربرین تکثیر سلول‌های سرطانی HeLa229 را به‌صورت وابسته به غلظت مهار می‌کند، همچنین نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیماری بود، بررسی تغییرات در میزان فعالیت p53 در رده سلولی HeLa229 تحت تیمار با بربرین نشان‌دهنده افزایش فعالیت p53 بود [۳۵]؛ که با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر هم‌راستا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که کاربرد توأم سیس‌پلاتین با بربرین، تکثیر سلول‌های سرطانی ریه رده Calu-6 را به‌طور قابل‌توجهی مهار نموده، باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود؛ در آینده با تحقیقات بیشتر، این ترکیب می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان ریه مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه اساتید و کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح همکاری داشتند، تشکر می‌شود.

سلول‌های سرطانی رده Calu-6 می‌باشد، همخوانی دارد. در سال ۲۰۲۱ Mohiuddin و همکاران؛ اثر سیس‌پلاتین را در برابر رده سلولی PC9 (سرطان ریه انسانی) توسط روش رنگ‌آمیزی DAPI بررسی کردند و نشان دادند که در هسته سلول‌های تحت درمان با سیس‌پلاتین علائم مورفولوژیکی آپوپتوز از قبیل قطعه‌قطعه شدن و انقباض هسته‌ها مشاهده می‌شود [۳۰]؛ این نتایج هم‌راستا با نتایج حاصل از روش رنگ‌آمیزی DAPI پژوهش حاضر می‌باشد. نتایج تست Annexin V-FITC نشان داد، درحالی‌که درصد زنده بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۱/۲ درصد می‌باشد؛ این میزان در سلول‌های تیمار شده با بربرین، سیس‌پلاتین و ترکیب توأم بربرین با سیس‌پلاتین، به‌ترتیب به ۵۳/۶، ۶۴/۴ و ۳۰/۹ درصد کاهش داشته است؛ در سال ۲۰۱۵ Zhu و همکاران؛ در پژوهشی به بررسی اثر ترکیب بربرین همراه با دوکسوروبیسین بر روی رده‌های H460 و H1975 (سرطان ریه انسانی) پرداختند، نتایج حاصل از آزمون Annexin V-FITC نیز نشان داد که استفاده از ترکیب توأم بربرین و دوکسوروبیسین برای تیمار سلول‌های H460 و H1975 باعث افزایش قابل‌توجه در میزان سلول‌های آپوپتوتیک در مقایسه با استفاده از هرکدام از این ترکیبات به‌تهایی می‌شود [۳۱]؛ نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده از آزمون Annexin V-FITC انجام‌گرفته در این پژوهش تجربی همسو می‌باشد. در سال ۲۰۲۰ Chen و همکاران؛ به بررسی توانایی بربرین در مهار تکثیر و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه پرداختند، یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که بربرین به‌صورت وابسته به غلظت و زمان باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان ریه انسانی (رده‌های NCI-H1299, NCI-H460, A549) می‌شود، همچنین نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری این پژوهش نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های تحت تیمار با بربرین بود [۳۲]؛ که با نتایج مطالعه تجربی حاضر که نشان‌دهنده توانایی بربرین در مهار تکثیر و افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های رده Calu-6 تحت تیمار با بربرین بود، هم‌راستا می‌باشد. نتایج بررسی میزان تغییرات در سطح بیان ژن‌های BAX, Caspase 3,9, p53 نشان‌دهنده اختلاف معنادار در افزایش سطح بیان این ژن‌ها در گروه تیماری با ترکیب توأم بربرین با سیس‌پلاتین بود؛ در نتیجه می‌توان بیان کرد که ترکیب بربرین همراه با سیس‌پلاتین توانایی خوبی برای القای آپوپتوز و بالابردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی ریه انسانی رده Calu-6 دارد. در سال ۲۰۲۰ Kou و

References:

- [1] Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. *Oncotarget* 2016; 7(26): 40800–15.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209–49.
- [3] Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: A review article. *Iran J Public Health* 2018; 47(3): 309–16.
- [4] Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016 a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2018; 4(11): 1553–68.
- [5] Carvalho Â, Ferreira G, Seixas D, Guimarães-Teixeira C, Henrique R, Monteiro FJ, et al. Emerging lab-on-a-chip approaches for liquid biopsy in lung cancer: Status in ctcs and ctDNA research and clinical validation. *Cancers* 2021; 13(9): 1-23.
- [6] Hirsch FR, Scagliotti G V., Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet* 2017; 389(10066): 299–311.
- [7] Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OUI, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2015; 1856(2): 189–210.
- [8] Huang CY, Ju DT, Chang CF, Muralidhar Reddy P, Velmurugan BK. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomed* 2017; 7(4): 12–23.
- [9] Fennell DA, Summers Y, Cadranel J, Benepal T, Christoph DC, Lal R, et al. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2016; 44: 42–50.
- [10] Baharara J, Amini E, Nikdel N, Salek-Abdollahi F. The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis induction. *Avicenna J Med Biotechnol* 2016; 8(3): 112–9.
- [11] Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(6): 2129–44.
- [12] Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018; 8(5): 1–11.
- [13] Khalid EB, Ayman ELMELK, Rahman H, Abdelkarim G, Najda A. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumour Biol* 2016; 37(11): 14513–36.
- [14] Ziyad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou MA, Mouse HA. More insights into the pharmacological effects of artemisinin. *Phytother Res* 2018; 32(2): 216–29.
- [15] Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2017; 22(4): 982–95.
- [16] Kaur R, Arora S. Alkaloids- Important Therapeutic Secondary Metabolites of Plant Origin. *J Crit Rev* 2015; 2(3): 1–8.
- [17] Ortiz LMG, Lombardi P, Tillhon M, Scovassi AI. Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules* 2014; 19(8): 12349–67.
- [18] Park KS, Kim J Bin, Bae J, Park SY, Jee HG, Lee KE, et al. Berberine inhibited the growth of thyroid cancer cell lines 8505C and TPC1. *Yonsei Med J* 2012; 53(2): 346–51.
- [19] Lin JF, Lin YC, Tsai TF, Chen HE, Chou KY, Hwang TIS. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 1517–33.
- [20] Liu L, Sun L, Zheng J, Cui L. Berberine modulates Keratin 17 to inhibit cervical cancer cell viability and metastasis. *J Recept Signal Transduct Res* 2020; 0(0): 1–11.
- [21] Sani TA, Mohammadpour E, Mohammadi A, Memariani T, Yazdi MV, Rezaee R, et al. Cytotoxic and apoptogenic properties of Dracocephalum Kotschy aerial part different fractions on calu-6 and mehr-80 lung cancer cell lines. *Farmacologia* 2017; 65(2): 189–99.
- [22] Baharara J, Amini E, Afzali M, Nikdel N, Mostafapour A, Kerachian MA. Apoptosis inducing capacity of holothuria arenicola in CT26 colon carcinoma cells in vitro and in vivo. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(4): 358–65.
- [23] Yu XJ, Sun K, Tang XH, Zhou CJ, Sun H, Yan Z, et al. Harmine combined with paclitaxel inhibits tumor proliferation and induces apoptosis through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *Oncol Lett* 2016; 12(2): 983–8.
- [24] Kumar S, Agnihotri N. Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 1462–77.
- [25] Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia turcomanica leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(Sup1): 499–510.

- [26] Wu LW, Zhang JK, Rao M, Zhang ZY, Zhu HJ, Zhang C. Harmine suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine treatment. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 4585–93.
- [27] Wang Y, Zhou M, Shang D. Berberine inhibits human gastric cancer cell growth via deactivation of p38/JNK pathway, induction of mitochondrial-mediated apoptosis, caspase activation and NF- κ B inhibition. *J BUON* 2020; 25(1): 314–8.
- [28] Majidzadeh H, Araj-Khodaei M, Ghaffari M, Jafari A, Shanebandi D, Torbati M, et al. The combination of berberine and methotrexate enhances anti-cancer effects in HeLa cancer cell line: A morphological study. *Pharm Sci* 2021; 27(4): 536-42.
- [29] Liu L, Fan J, Ai G, Liu J, Luo N, Li C, et al. Berberine in combination with cisplatin induces necroptosis and apoptosis in ovarian cancer cells. *Biol Res* 2019; 52(1): 1-14.
- [30] Mohiuddin M, Kasahara K. Cisplatin Activates the Growth Inhibitory Signaling Pathways by Enhancing the Production of Reactive Oxygen Species in Non-small Cell Lung Cancer Carrying an EGFR Exon 19 Deletion. *Cancer Genomics* *Proteomics* 2021; 18(3 Suppl): 471–86.
- [31] Zhu T, Li LL, Xiao GF, Luo QZ, Liu QZ, Yao KT, et al. Berberine Increases Doxorubicin Sensitivity by Suppressing STAT3 in Lung Cancer. *Am J Chin Med* 2015; 43(7):1487–502.
- [32] Chen J, Huang X, Tao C, Wang L, Chen Z, Li X, et al. Berberine chloride suppresses non-small cell lung cancer by deregulating Sin3A/TOP2B pathway in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2020; 86(1): 151–61.
- [33] Kou Y, Tong B, Wu W, Liao X, Zhao M. Berberine Improves Chemo-Sensitivity to Cisplatin by Enhancing Cell Apoptosis and Repressing PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Gastric Cancer. *Front Pharmacol* 2020; 11(December):1–10.
- [34] Li Q, Zhao H, Chen W, Huang P. Berberine Induces Apoptosis and Arrests Cell Cycle in Multiple Cancer Cell lines. *Arch Med Sci* 2021; Articles in press.
- [35] Wang HY, Yu HZ, Huang SM, Zheng YL. P53, Bcl-2 and cox-2 are involved in berberine hydrochloride-induced apoptosis of HeLa229 cells. *Mol Med Rep* 2016; 14(4): 3855–61.