

Anti-cancer Effects of Hesperidin by Induction of Apoptosis

Mina Abroudi¹    , Ghazaleh Dadashizadeh^{* 2}    , Saeide Sadat Shobeiri³    , Azar Hosseini⁴    , Omid Gholami⁵    , Reza Ataee Disfani⁶    , Amir Raoofi^{7*}    , Davood Mahdian^{8 **}    , Maryam Khosrojerdi⁹   

1. Master of Medical Biology, Cell and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
2. Master of Hematology, Cell and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
3. PhD in Immunology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
4. Associate Professor, Department of Pharmacology, Pharmacology Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Associate Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
6. medical students, student research committee, Sabzevar University of Medical Sciences
7. Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Cell and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
8. Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
9. Master of Nursing, Vice President of Research and Technology, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Received: 2024/02/06

Accepted: 2024/05/26

Abstract

Introduction: Hesperidin, a flavonoid found in the citrus family, has been evaluated for its anti-cancer effects on various cell lines, including KYSE30, PC12, SW48, and DU14.

Materials and Methods: The cells were treated with various concentrations of hesperidin (0.75–100 μ M) for 24, 48, or 72 hours, and cell viability was assessed using the MTT assay. The expression of genes, including Bax, Bcl-2, and Caspase-3, was measured by qRT-PCR. Apoptosis was determined using propidium iodide staining followed by flow cytometry.

Results: The results demonstrated that hesperidin inhibited the proliferation of cells with varying potencies. Propidium iodide staining revealed that hesperidin increased the number of apoptotic cells, which was confirmed by the measurement of gene expression. Hesperidin decreased the expression of Bcl-2 while increasing the expression of Bax and Caspase-3.

Conclusion: We conclude that hesperidin, as a natural product, may be used in the treatment of various human cancers in combination with chemical drugs.

***Corresponding Author:** Amir Reofi, Dawood Mahdian

Address: Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Cellular and Molecular Research Center, Department of Pharmacology, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

E-mail: amirrezaraooofi@yahoo.com, Mahdian64@gmail.com

Keywords: Hesperidin, Apoptosis, Flavonoids, Cancer

How to cite this article: Abroudi M., Dadashizadeh GH., Shobeiri SS., Hosseini A., Gholami O., Ataee Disfani R., Raoofi A., Mahdian D., Khosrojerdi. The Effect of Eight Weeks of Anti-cancer effects of Hesperidin by induction of apoptosis, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2024; 31(4):364-377.

Introduction

Cancer is identified as a significant global health problem, affecting more than 12.7 million people worldwide. In cancer, cells grow invasively. Statistics show that the most common cancers include lung, prostate, colorectal, cervical, and breast cancer. Therapeutic strategies for cancer involve radiation therapy, chemotherapy, and surgery. Chemotherapeutic agents include DNA-interactive drugs, antitubulin drugs, antimetabolites, as well as hormonal and molecular-targeting drugs. However, these chemotherapeutic drugs can lead to adverse effects such as bone marrow suppression, hair loss, gastrointestinal lesions, drug resistance, neurologic dysfunction, and cardiac toxicity. Recent studies have highlighted the potential of medicinal herbs and their active ingredients in the treatment of various diseases. Flavonoids, which are important bioactive compounds found in many herbs, have shown beneficial effects in different cancerous tissues. Epidemiological studies have demonstrated an inverse relationship between flavonoid consumption and the risk of cancer. Hesperidin, a flavanone widely found in citrus fruits such as oranges, exhibits various pharmacological properties. In vitro and in vivo studies have reported its anti-carcinogenic, antioxidant, and anti-inflammatory effects. Furthermore, the anti-cancer effects of hesperidin and its aglycone, hesperetin, have been documented. Given the properties of hesperidin, this research evaluates its anti-cancer effects on various cell lines and explores its possible mechanisms of action.

Methodology

Cell Treatment: The cells were treated with various concentrations of hesperidin (0.75–100 μ M) for 24, 48, or 72 hours, and cell viability was assessed using the MTT assay. The expression of genes including Bax, Bcl-2, and Caspase-3 was measured by qRT-PCR. Apoptosis was determined by propidium iodide (PI) staining followed by flow cytometry.

Cell Viability Assay: Cell viability was determined using a modified 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay. Briefly, the cells (PC12, KYSE30, DU145, and SW48) were seeded at 5×10^3 cells per well in flat-bottom 96-well culture plates and exposed to different concentrations of hesperidin for 24, 48, and 72

hours. After the incubation periods, the cells were treated with MTT solution (5 mg/ml in PBS) for 4 hours. The medium was then removed, and formazan was solubilized with DMSO (100 μ l). Absorbance was measured at 570 nm (with 620 nm as a reference) using an ELISA reader. All treatments were performed in triplicate.

Cell Apoptosis Assay: Apoptotic cells were detected using PI staining for small DNA fragments followed by flow cytometry. It has been reported that a sub-G1 peak reflects DNA fragmentation, which can be observed following the incubation of cells with a hypotonic phosphate-citrate buffer containing a quantitative DNA-binding dye, such as PI. Briefly, the cells were seeded in a 24-well plate and treated with hesperidin at a concentration of 79.18 μ M for 48 hours. Floating and adherent cells were then harvested and incubated with 750 μ l of hypotonic buffer (50 mg/ml PI in 0.1% sodium citrate with 0.1% Triton X-100) at 4 °C overnight in the dark. Flow cytometry was conducted using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). A total of 1×10^4 events were acquired with FACS, and data were analyzed using FlowJo V10 software. All treatments were conducted in triplicate.

Gene Expression Analysis: qRT-PCR was performed using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA) in triplicate using SYBR Green PCR master mix (2x, Ampliqon, Denmark). The sequences of primers for Bax, Bcl-2, and Caspase-3 are listed in Table 1. Thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 45 seconds. A final extension was performed at 72 °C for 10 minutes. Real-time data were normalized to β -actin as the internal control. The $\Delta\Delta$ CT method was employed to calculate fold changes.

Statistical Analysis: One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test was used for data analysis. All results are expressed as the mean $\pm$ SEM, and p-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Our results demonstrated that hesperidin is an anti-proliferative compound against different cancer cells. Also, we found that hesperidin was more effective on the KYSE30 cells. The effect of

hesperidin on cell viability was in a dose-dependent manner. KYSE30 cells were incubated with hesperidin (0.75-100 μ M) for 24, 48 and 72h. As shown in figures 1a-c, hesperidin reduced cell viability at doses of 50 and 100 μ M (24h, 50 μ M $p < 0.01$ 100 μ M $p < 0.001$; 48h $p < 0.001$; 72h 50 μ M $p < 0.01$ 100 μ M $p < 0.001$). The PC12 cells were incubated with various concentrations of hesperidin (0.75-100 μ M) for 24, 48, and 72 h. The cell viability was determined by MTT assay. As shown in figure2a, hesperidin reduced cell viability at doses of 0.75, 1.5, 3.125, 25, 50, 100 μ M after 24h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$ respectively). After 48h, hesperidin increased cell death at doses of 12.5, 50 and 100 μ M ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.05$ respectively). Also, hesperidin reduced cell viability at concentrations of 0.75 μ M and 3.125 μ M ($p < 0.001$). SW48 cells were incubated at various concentrations of hesperidin (0.75-100 μ M) for 24, 48 and 72 h. The viability was measured by MTT assay. The findings revealed hesperidin had no significant effect on the viability of SW48 cells after 24h, 48h and 72h. The DU145 cells were treated by various doses of hesperidin (0.75-100 μ M) for 24, 48 and 72 h. MTT assay was applied to evaluate the viability of the cells. Hesperidin reduced cell viability at doses of 0.75 μ M and 25 μ M ($p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively) (figure4a) while hesperidin had not effect on cell viability after 48h (figure4b). As shown in figure4c, hesperidin significantly increased cell death at dose of 1.5 μ M ($p < 0.05$). After exposure time of 48 h, hesperidin's toxic effects were observed against KYSE30 cells at a dose of 79.18. The percentage of the apoptotic cell was evaluated using PI staining. The cells incubated in hesperidin with concentration of 79.18 μ M for 48 h. According to **Error! Reference source not found.**, the sub-G1 peak analysis indicated apoptosis induction in the hesperidin-treated KYSE30 cells. Results showed that hesperidin induced apoptosis on KYSE30 cells. Caspase-3 had significantly increased near about 5-fold at a concentration of 100 μ M ($p < 0.001$) hesperidin compared to control group. Also, hesperidin at dose 75 μ M caused overexpression of Caspase-3 about 4-fold ($p < 0.001$). However, the expression of Bax was remarkably upregulated by hesperidin in a dose-dependent manner with the highest change at dose 100 μ M ($p < 0.001$) and 3.5-fold overexpression at dose 75 μ M ($p < 0.001$). It is while the Bcl-2

expression was downregulated significantly with the lowest expression at dose 50 μ M ($p < 0.001$) and slight downregulation was observed at dose 75 μ M ($p < 0.05$). Furthermore, the highest Bax/Bcl-2 ratio was seen by hesperidin at IC50 concentration (75 μ M) ($p < 0.001$) which indicates the finest concentration to initiate apoptosis cascade.

Discussion

Hesperidin as a subgroup of flavonoids is abundantly found in Citrus species. To date, these natural chemical compounds have shown various effects in human and animals cancers not only for the treatment also for prevention. It has been reported that administration of hesperidin associated with recovering enzymes related to antioxidant activities such as glutathione, catalase, and superoxide dismutase indicated its antioxidant properties in renal tissue. Furthermore, hesperidin found to inhibit the COX-2/PGE pathway to prevent renal carcinoma progression. In breast cancer model, hesperidin treatment resulted in a reduction in ER α expression and also the suppression of EGFR/ERK pathway arresting cell cycle at G0/G1 transition phase in MCF7 and T47D cells. Previously, hesperidin inhibited cellular pathways in relation to cell growth by anti-estrogenic function in endometrial carcinoma (EC) and hence inhibited the proliferation of cancer cells. It was proposed hesperidin initiated apoptosis in EC.

Conclusion

Precise regulation and function of cellular pathways are responsible for cancer prevention but in the setting of cancer abnormalities in these pathways has been observed. Alteration in the PI3K-AKT has been frequently reported in various cancers especially in esophageal cancer. Growth factors transiently activate this pathway but in cancers due to genetic aberrations, even in the absence of stimulating signals are continuously transmitted to the nucleus. Thus, activation of this pathway results in uncontrolled cell growth and proliferation. Increased phosphorylation of AKT has been reported in KYSE30 cell lines. Hesperidin by suppressing the expression of AKT prevents both initiation and progression of colorectal cancer. As a pro-apoptotic drug, hesperidin by disrupting the integrity of the mitochondria membrane leads to apoptosis. Also, AKT pathway by phosphorylating Bad protein prevents the initiation

of apoptosis. Hence, it can be concluded that at molecular resolution, hesperidin by inhibiting AKT and mitochondria damage plays an important role in the induction of apoptosis. Our gene expression analysis also confirmed overexpression of Caspase-3 and Bax alongside downregulation of Bcl-2.

Acknowledgment

Hereby, we appreciate financial supports of Sabzevar University of Medical Sciences and staff of Cellular and Molecular Research Center.

Conflict of Interest: All authors declare they have no conflict of interest.

هسپریدین، یک عامل مهارکننده رشد سلول‌های سرطانی از طریق مسیر آپوپتوز

مینا آبرودی^۱، غزاله داداشی‌زاده^۲، سعیده شبیری^۳، آذر حسینی^۴، امید غلامی^۵، رضا عطائی دیسفانی^۶، امیر رئوفی^۷، داود مهدیان^۸، مریم خسروجردی^۹

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۲. کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۳. دکتری ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۴. دانشیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۶. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار
۷. استادیار گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۸. استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۹. کارشناس ارشد پرستاری داخلی جراحی، معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سرطان به‌عنوان یک مشکل مهم بهداشت جهانی مطرح است. داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده در درمان سرطان، عوارض جانبی نظیر سرکوب مغز استخوان، ریزش مو، ضایعات گوارشی، مقاومت دارویی، اختلال عملکرد عصبی و مسمومیت قلبی دارند. فلاونوئیدها ترکیبات فعال زیستی هستند که در بیشتر گیاهان یافت می‌شوند و تأثیرات مفیدی بر بافت‌های مختلف سرطانی دارند. هسپریدین به‌عنوان یک فلاونوئید در خانواده مرکبات یافت می‌شود. در این تحقیق، تأثیرات ضدسرطانی هسپریدین بر رده‌های سلولی سرطانی مختلف از جمله تومور مدولاری آدرنال (فئوکروموسیتوم) (PC12)، آدنوکارسینوم کولون (SW48)، سرطان پروستات (DU145) و کارسینوم سلول سنگفرشی مری (KYSE30) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ یا ۷۲ ساعت تیمار شدند و بقای سلول‌ها با روش MTT ارزیابی شد. بیان ژن‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز ۳ نیز با استفاده از RT-PCR اندازه‌گیری شد. همچنین، ارزیابی آپوپتوز سلولی نیز با روش فلوسایتومتری انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هسپریدین از تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف جلوگیری می‌کند. همچنین نتایج فلوسایتومتری نشان داد که هسپریدین می‌تواند آپوپتوز سلولی را افزایش دهد که این موضوع با نتایج بیان ژن تأیید شد. هسپریدین به‌طور معناداری بیان ژن bcl-2 را کاهش داد در حالی که موجب افزایش بیان Bax و Caspase-3 گردید.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد هسپریدین به‌عنوان یک فراورده طبیعی می‌تواند در درمان انواع سرطان‌های انسانی در ترکیب با داروهای شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

* نویسنده مسئول: امیر رئوفی، داود مهدیان
نشانی: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
تلفن: ۰۹۳۶۸۶۹۸۹۳۴
رایانامه: amirrezaraooofi@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0001-7402-1726
0000-0002-1026-518X
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-6872-7239

کلیدواژه‌ها:

هسپریدین، آپوپتوز، فلاونوئیدها، سرطان

۱. مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده با تغییرات ژنتیکی متعدد است که با رشد غیرطبیعی سلول‌ها، حمله و انتشار به سایر نقاط بدن همراه است (۱). سرطان دومین علت مرگ بعد از بیماری‌های قلبی شناخته شده است. آمارها نشان می‌دهد شایع‌ترین سرطان‌ها شامل ریه، پروستات، روده بزرگ، دهانه رحم و پستان است (۲). راهبردهای درمانی سرطان شامل پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و جراحی هستند. عوامل شیمی‌درمانی شامل داروهای تعاملی با DNA مانند سیس پلاتین، دوکسوروبیسین، داروهای ضدتوبولین (تاکسان‌ها)، آنتی‌متابولیت‌ها (مانند متوترکسات)، هورمون‌ها و داروهای هدفمند مولکولی هستند (۳). داروهای شیمی‌درمانی منجر به عوارض جانبی مختلف از قبیل سرکوب مغز استخوان، ریزش مو، ضایعات گوارشی، مقاومت دارویی، اختلال عملکرد عصبی و مسمومیت قلبی می‌شوند (۴). مطالعات اخیر نشان داده است که گیاهان دارویی یا مواد مؤثره آنها در درمان بیماری‌های مختلف مؤثر است (۵). فلاونوئیدها به عنوان یک ترکیب فعال زیستی مهم که در بیشتر گیاهان یافت می‌شود، تأثیرات مفیدی در بافت‌های مختلف سرطانی دارند (۶، ۷). مطالعات اپیدمیولوژیک رابطه معکوس بین مصرف فلاونوئیدها و خطر ابتلا به سرطان را نشان داده است (۹). مطالعات مختلف در فاز حیوانی و سلولی تأثیرات ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی را گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۱). طی سال‌های اخیر تأثیرات بیولوژیک و فارماکولوژیک هسپریدین مطالعه شده است. مطالعات، بیانگر نقش مؤثر هسپریدین در بهبود عملکرد سیستم قلبی-عروقی، کاهش سطح لیپیدهای خون و کاهش سطح مارکرهای التهابی هستند. همچنین مطالعات مختلف نقش ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی هسپریدین را تأیید کرده‌اند. تأثیرات ضدسرطانی هسپریدین یا آگلیکون (aglycone) آن نیز هسپرتین نشان داده شده است (۱۱، ۱۲)، از طرفی انتظار می‌رود که پدیده هورمیزس در مورد اثر کشندگی سلولی هسپریدین دیده شود. این بدان معناست که با افزایش دوز دارو پاسخ، برعکس می‌شود و میزان پاسخ کاهش می‌یابد. با توجه به شیوع بالای سرطان در جامعه و تأثیرات ضدسرطانی هسپریدین لازم دانستیم که در این تحقیق اثر کشندگی سلولی (سایتوتوکسیسیته) و آپوپتوز را در غلظت‌های مختلف هسپریدین بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی بررسی کنیم.

۲. مواد و روش

مواد شیمیایی: رده‌های سلولی تومور مدولاری آدرنال (فئوکروموسیتوم) (PC12)، آدنوکارسینوم کولون (SW48)، سرطان پروستات (DU145)، کارسینوم سلول سنگفرشی مری (KYSE30)، از انستیتو پاستور (ایران، تهران) تهیه شد. ۴، ۵-2,2-dimethylimidazole-2-yl 5-diphenyl tetrazolium (MTT) و بافر نمکی فسفات (PBS) از شرکت سیگما (سنت لوئیس، MO، ایالات متحده) خریداری شد. محیط اصلاح‌شده DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و پنی سیلین استرپتومایسین از شرکت Gibco (انگلیس) خریداری شد. دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. همچنین، پروپیدوم یدید (PI)، سیترات سدیم و تریتون X-100 از شرکت سیگما (سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. کیت RNX Plus از Bio Basic (کانادا) خریداری شد.

کشت سلولی و درمان: سلول‌ها در محیط DMEM (high Dulbecco's modified Eagle's medium-Glucose) همراه با ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپریدین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. برای سنجش MTT، 5×10^3 سلول در هر چاهک پلیت کشت ۹۶ خانه کشت شد. برای هر غلظت و دوره زمانی، یک نمونه شاهد وجود داشت که تیمارنشده باقی ماند و حجم مساوی محیط را دریافت کرد. برای سنجش آپوپتوز توسط فلوسایتمتری، 1×10^5 سلول در هر چاهک یک پلیت ۲۴ خانه کشت شد. تمام تیمارهای مختلف در سه تکرار انجام شد.

آماده‌سازی دارو: محلول استوک با حل کردن هسپریدین در DMSO تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف (۷۵/۰ - ۱۰۰ میکرومولار) از این دارو در محیط کشت ساخته شد.

سنجش بقای سلول‌ها با روش MTT: بقای سلولی با استفاده از روش MTT تعیین شد (۱۳). به‌طور خلاصه، 5×10^3 سلول (PC12، KYSE30، DU145 و SW48) در هر چاهک پلیت کشت ۹۶ خانه مسطح ریخته شد و در معرض غلظت‌های مختلف هسپریدین برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های ذکرشده، سلول‌ها با محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شده در PBS) به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محیط رویی خارج شد و

کریستال‌های فورمازان در 100 میکرولیتر DMSO حل شد. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر (۶۲۰ نانومتر به عنوان مرجع) با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. تمامی تیمارها در سه تکرار انجام شدند.

سنجش آپوپتوز سلولی: آپوپتوز سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی PI قطعات کوچک DNA و با روش فلوسایتومتری شناسایی شد. در این بررسی، پیک قبل از ناحیه sub-G1 بازتاب قطعه‌قطعه شدن DNA است که پس از انکوباسیون سلول‌ها با یک بافر فسفات- سیترات هیپوتونیک حاوی یک رنگ کمی متصل‌شونده به DNA، مانند PI، قابل مشاهده است (۱۴). به‌طور خلاصه، سلول‌ها در یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و با غلظت ۷۹/۱۸ میکرومولار از هسپریدین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سلول‌های شناور و چسبنده هر چاهک جدا شدند و سپس با ۷۵۰ میکرولیتر از بافر هیپوتونیک (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر PI در ۰.۱ درصد سیترات سدیم با ۰.۱ درصد تریتون X-100) در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب در تاریکی انکوبه شدند. سپس آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (FACScan (Becton Dickinson) انجام شد. در مجموع ۱×۱۰۴ ذره شمرده شد و داده‌ها از طریق نرم‌افزار flowJo-V10 تجزیه و تحلیل شدند. تمامی تیمارها در سه تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن: سلول‌های KYSE30 در پلیت‌های ۶ خانه کشت شدند و یک شب در انکوباتور Co2 انکوبه شدند. سپس، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در معرض هسپریدین در

غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. پس از این زمان، RNA توسط کیت One Step-RNA Reagent و طبق پروتکل ارائه شده توسط سازندگان، از سلول‌های کشت شده استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA ها توسط نانو دراپ (کانادا، BIO INTELLECTUAL Nano100)، در نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۳۰ ارزیابی شد. همچنین نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ران شدند تا یکپارچگی آنها تأیید شود. ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برای هر واکنش سنتز cDNA استفاده شد و واکنش‌ها توسط کیت معرف Primscript™ RT Fast (تاکارا، ژاپن) طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده انجام شد. برای تعیین بیان ژن BAX، BCL-2 و CASPASE-3 از روش سایبر گرین-RT-PCR با مجموعه‌ای از پرایمرها استفاده شد (جدول ۱). سیکل‌های حرارتی به شرح زیر بود: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، متصل‌شدن پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولی‌شدن رشته به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۴۰ چرخه) و تکمیل نهایی قطعات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. داده‌های RT-PCR توسط β اکتین به عنوان کنترل داخلی نرمال شد. از روش $\Delta\Delta CT$ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. تمام نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM بیان شدند و مقادیر p کمتر از ۰.۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

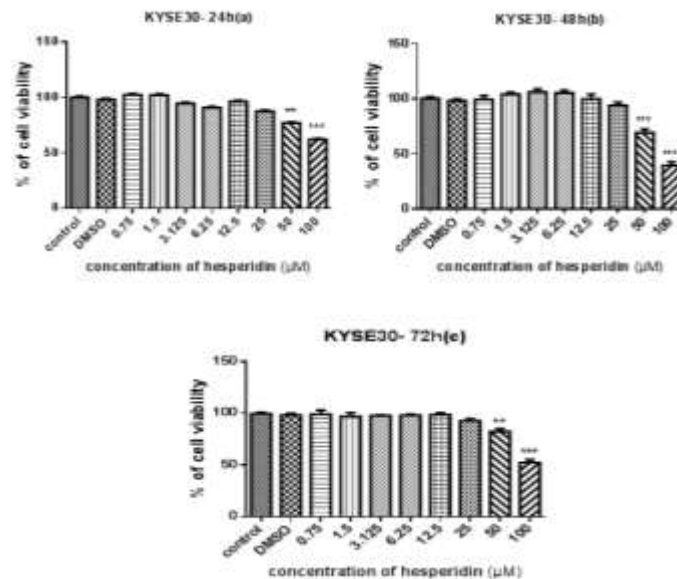
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

Primer	Sequence
Bax Forward	5'-GTGAGGAGGCTTGAGGAGTC3'
Bax Reverse	5'-CGCCCTTTTCTACTTGCCA-3'
Caspase-3 Forward	5'-ACTGGACTGTGGCATTGAGA-3'
Caspase-3 Reverse	5'-GCACAAAGCGACTGGATGAA-3'
Bcl-2 Forward	5'-GCCTTCTTTGAGTTTCGGTGG-3'
Bcl-2 Reverse	5'-GAAATCAAACAGAGGCCGCA-3'
GAPDH Forward	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'
GAPDH Reverse	5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'

۳. یافته‌ها

تأثیر هسپریدین بر سلول‌های KYSE30: سلول‌های KYSE30 با هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. همان‌طور که در شکل‌های ۱a-c نشان داده شده است هسپریدین بقای سلولی را در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<0.05$).

تأثیر هسپریدین بر سمیت سلولی: نتایج ما نشان داد که هسپریدین یک ترکیب مؤثر برای مهار تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف است. همچنین ما دریافتیم که هسپریدین روی سلول‌های KYSE30 مؤثرتر است و اثر هسپریدین بر بقای سلول به‌صورت وابسته به دوز بود.

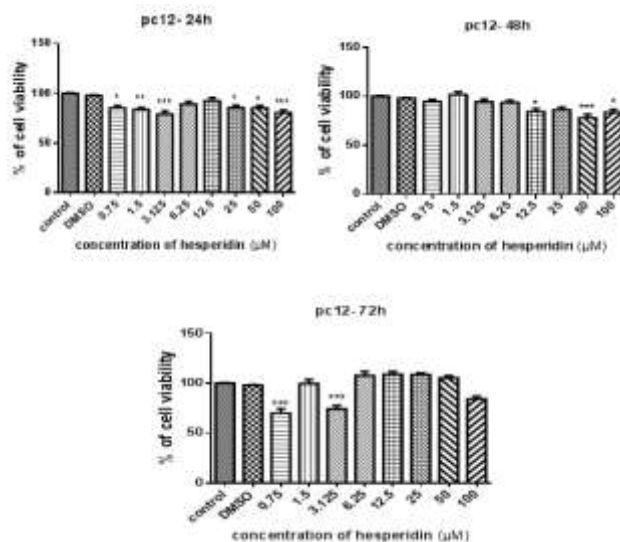


شکل ۱. تأثیر هسپریدین بر بقای سلول‌های KYSE30. سلول‌های KYSE30 با غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت (a)، ۴۸ ساعت (b) و ۷۲ ساعت (c) تحت درمان، نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM (سه تکرار)، $^{**}p < 0.001$ ، $^{***}p < 0.0001$ در مقابل کنترل

داد (به ترتیب $P < 0.05$ ، $P < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ ، $p < 0.001$). همچنین، پس از ۴۸ ساعت، هسپریدین، مرگ سلولی را در دوزهای ۱۲.۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش داد (به ترتیب $P < 0.05$ ، $P < 0.001$ ، $P < 0.05$). هسپریدین در انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز بقای سلولی را در غلظت‌های ۰/۷۵ میکرومولار و ۳/۱۲۵ میکرومولار کاهش داد ($P < 0.001$).

تأثیر هسپریدین بر سلول‌های PC12: سلول‌های PC12

غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. بقای سلول‌ها با روش MTT تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۲a نشان داده شده است، هسپریدین، بقای سلولی را در دوزهای ۰.۷۵، ۱.۵، ۳.۱۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت به طور معناداری کاهش

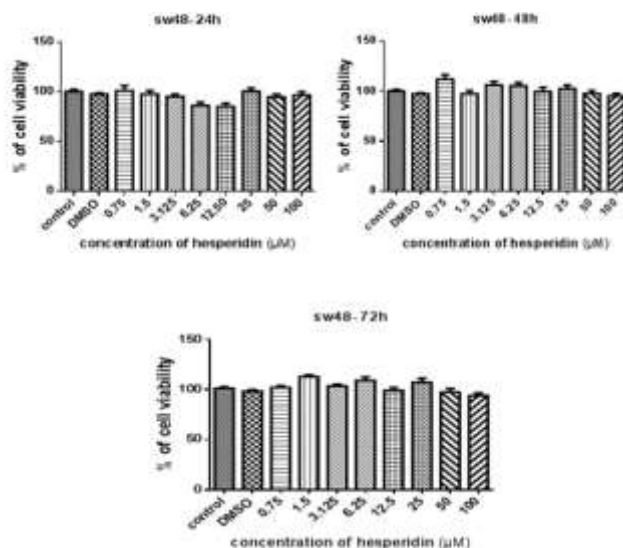


شکل ۲. تأثیر هسپریدین بر سلول‌های PC12. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار، نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM (سه تکرار)، $^{*}p < 0.05$ ، $^{**}p < 0.01$ ، $^{***}p < 0.001$ در مقابل کنترل

تأثیر هسپریدین بر بقای سلول‌های SW48:

SW48 در غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. بقای

سلول با روش MTT اندازه‌گیری شد (شکل ۳). یافته‌ها نشان داد که تیمار با هسپریدین (پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تأثیر معنی‌داری بر مرگ سلول‌های SW48 نداشت.

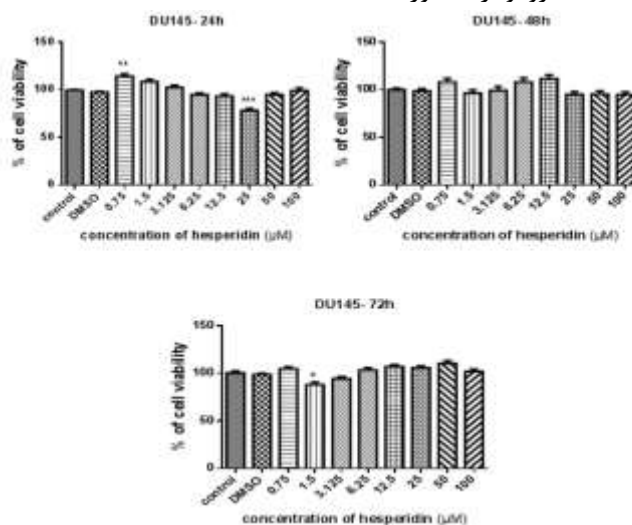


شکل ۳. تأثیر هسپریدین بر سلول‌های SW48. سلول‌های SW48 با غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM (سه تکرار)

تأثیر هسپریدین بر زنده ماندن سلول‌های DU145:

سلول‌های DU145 با دوزهای مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. برای ارزیابی بقای سلول‌ها از روش MTT استفاده شد. هسپریدین بقای سلولی را در دوزهای ۰.۷۵ و ۲۵ میکرومولار به طور

معنی‌داری کاهش داد (به ترتیب $p < 0.01$ ، $p < 0.001$) (شکل ۴a)، در حالی که هسپریدین بعد از ۴۸ ساعت، تأثیری بر مرگ سلول نداشت (شکل ۴b). همان‌طور که در شکل ۴c نشان داده شده است هسپریدین به‌طور قابل توجهی مرگ سلولی را در دوز ۱.۵ میکرومولار افزایش داد ($p < 0.05$).

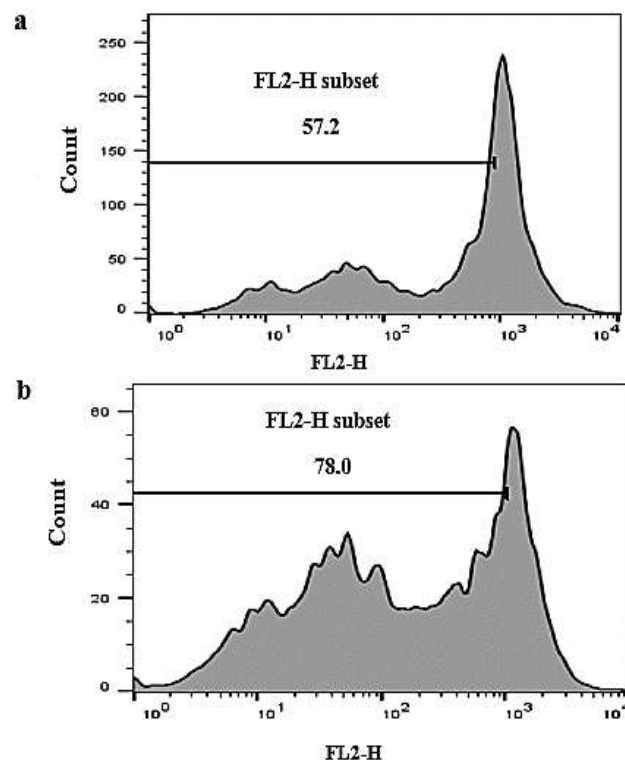


شکل ۴. اثر هسپریدین بر بقای سلول‌های DU145. سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف هسپریدین (۰.۷۵-۱۰۰ میکرومولار)، نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM (سه تکرار)، $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ در مقابل کنترل

تیمار شده با هسپریدین نشان داد و این اختلاف از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.01$). شایان ذکر است که افزایش پیک Sub-G1 به عنوان نشانه‌ای از سلول‌های آپوپتوز شده در گروه تیمار شده با هسپریدین دیده می‌شود. IC_{50} هسپریدین در ۴۸ ساعت تیمار معادل 79.18 میکرومولار بود.

القای آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی PI : پس از ۴۸

ساعت تیمار، تأثیرات سمی هسپریدین بر سلول‌های KYSE30 در دوز ۷۹.۱۸ مشاهده شد. درصد آپوپتوز سلول با استفاده از رنگ‌آمیزی PI ارزیابی شد. سلول‌ها با هسپریدین در غلظت ۷۹.۱۸ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. مطابق شکل ۵، آنالیز پیک Sub-G1 القای آپوپتوز را در سلول‌های KYSE30

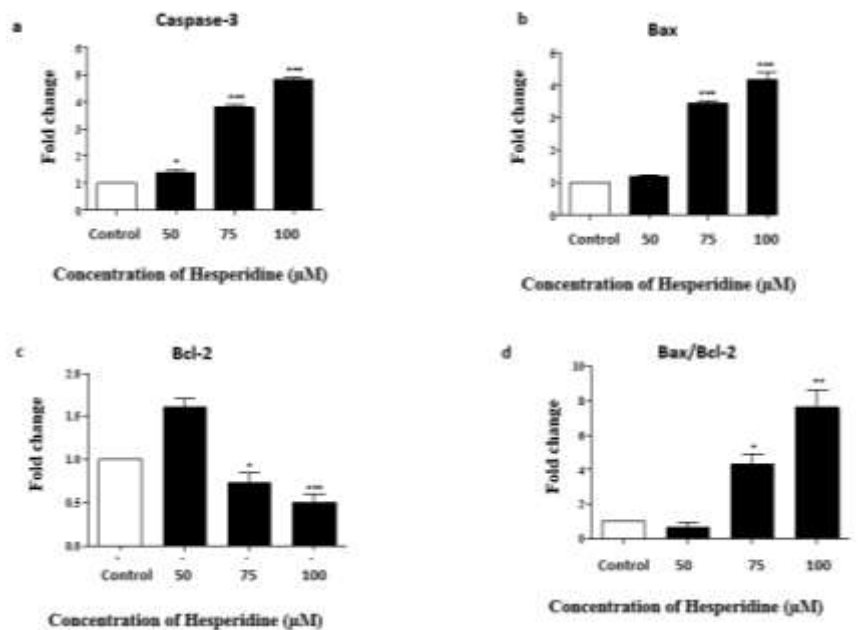


شکل ۵. (الف) هیستوگرام فلوسایتومتری رنگ‌آمیزی PI در سلول‌های KYSE30 در گروه کنترل. (ب) هیستوگرام فلوسایتومتری رنگ‌آمیزی PI در سلول‌های KYSE30 در گروه تیمار شده با غلظت هسپریدین ۷۹.۱۸ به مدت ۴۸ ساعت

در دوز ۱۰۰ میکرومولار ($p < 0.001$)، و بیان بیش از حد ۳.۵ برابری در دوز ۷۵ میکرومولار ($p < 0.001$) توسط هسپریدین تغییر یافت (شکل ۶b). در حالی که بیان Bcl-2 به طور قابل توجهی (کمترین بیان در دوز ۱۰۰ میکرومولار) کاهش یافت ($p < 0.001$)، و کاهش جزئی در دوز ۷۵ میکرومولار ($p < 0.05$) مشاهده شد (شکل ۶c). علاوه بر این، بالاترین نسبت Bax/Bcl-2 توسط هسپریدین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد ($p < 0.001$) (شکل ۶d).

هسپریدین باعث القای آپوپتوز در سلول‌های KYSE30

می‌شود: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هسپریدین باعث القای آپوپتوز در سلول‌های KYSE30 می‌شود. بیان ژن کاسپاز-۳ در غلظت ۱۰۰ میکرومولار هسپریدین نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی (نزدیک به ۵ برابر) یافته بود ($p < 0.001$) (شکل ۶a). هم‌چنین، هسپریدین با دوز ۷۵ میکرومولار باعث بیان بیش از حد کاسپاز-۳ (در حدود ۴ برابر) شد ($p < 0.001$). با این حال، بیان Bax به صورت وابسته به دوز با بالاترین تغییر



شکل ۶. تأثیر هسپریدین بر بیان ژن کاسپاز-۳، Bax، Bcl-2 و Bax/Bcl-2 در سلول‌های KYSE30. سلول‌ها با غلظت IC₅₀، یک دوز بالاتر و یک دوز پایین‌تر، شکل ۶a اثر هسپریدین را بر بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های KYSE30، ۶b بیان ژن Bax را در سلول‌های KYSE30، ۶c بیانگر کاهش بیان ژن Bcl-2 توسط هسپریدین، ۶d نسبت Bax/Bcl-2 در غلظت‌های سه‌گانه هسپریدین، (* $p < 0.01$ ، ** $p < 0.001$ ، *** $p < 0.0001$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

سرطان آندومتر مهار می‌کند و از این‌رو مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داده است که هسپریدین احتمالاً موجب شروع آپوپتوز در سرطان آندومتر می‌گردد (۱۹). تنظیم دقیق و عملکرد مسیرهای سلولی، مسئول پیشگیری از سرطان است اما در بروز سرطان، ناهنجاری‌هایی در تنظیم این مسیرها مشاهده شده است. تغییر در PI3K-AKT اغلب در سرطان‌های مختلف به‌ویژه در سرطان مری گزارش شده است (20). فاکتورهای رشد به‌طور موقت این مسیر را فعال می‌کنند اما در سرطان‌ها به دلیل ناهنجاری‌های ژنتیکی، حتی در صورت نبود سیگنال‌های تحریک‌کننده، پیام فعال‌سازی به‌طور مداوم به هسته منتقل می‌شود. بنابراین، فعال‌شدن این مسیر، منجر به رشد و تکثیر سلولی کنترل‌نشده می‌شود (21). افزایش فسفوریلاسیون AKT در رده‌های سلولی KYSE30 گزارش شده است. هسپریدین با سرکوب بیان AKT از شروع و پیشرفت سرطان کولورکتال جلوگیری می‌کند (۲۲). هسپریدین به‌عنوان یک داروی پیش‌آپوپتوز با برهم‌زدن یکپارچگی غشای میتوکندری، منجر به آپوپتوز می‌شود (23). همچنین مسیر AKT با فسفریله کردن پروتئین Bad از شروع آپوپتوز جلوگیری می‌کند (24) که در این راستا نتایج ما بیان‌بخش از حد کاسپاز-۳ و Bax را در کنار کاهش Bcl-2 تأیید کرد.

در مطالعه حاضر، تأثیرات آپوپتوزی هسپریدین در دوزهای مختلف و زمان‌های مختلف بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی شامل KYSE30، PC12، SW48 و DU145 ارزیابی گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هسپریدین، بقای سلولی را در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی کاهش و بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوز را در سلول‌های KYSE30 افزایش می‌دهد. نتایج ما نشان داد که هسپریدین به‌عنوان ترکیبات شیمیایی طبیعی، بر پیشگیری و درمان انواع مختلف سرطان مؤثر است که نتایج مطالعات قبلی را تأیید می‌کند (۱۵). براساس شواهد موجود، تجویز هسپریدین همراه با آنزیم‌های ترمیم‌کننده مربوط به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکاتایون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن را نشان می‌دهد (۱۵-۱۷). علاوه بر این، هسپریدین برای جلوگیری از پیشرفت کارسینوم کلیوی، مسیر COX-2/PGE را مهار می‌کند (۱۶). در مدل سرطان پستان، درمان هسپریدین منجر به کاهش بیان ER α و همچنین سرکوب چرخه سلولی مسیر EGFR/ERK در مرحله انتقال G0/G1 در سلول‌های MCF7 و T47D شد (۱۸). مطالعات قبلی نشان داده است که هسپریدین مسیرهای سلولی را در رابطه با رشد سلول با عملکرد ضدآستروژن در

کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، این مطالعه را تأیید کرده است (IR.MEDSAB.REC.1396.174).

سهم نویسندگان

همه نویسندگان در ایده‌پردازی، انجام طرح و تهیه و نگارش مقاله سهمیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج آن را می‌پذیرند.

حمایت مالی

این طرح با کمک مالی شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار حمایت شد.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافی را اعلام نمی‌کنند.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، هسپریدین می‌تواند یک القاکننده قوی آپوپتوز با بیشترین اثر بر سلول‌های KYSE30 باشد. هسپریدین با مهار مسیر سلولی میتوزی، PI3K-AKT و آغاز آپوپتوز به‌طور بالقوه، از شروع و توسعه سرطان جلوگیری می‌کند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی هسپریدین نشان می‌دهد که چگونه این ماده طبیعی با نرخ بروز سرطان کمتر مرتبط است. با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی، این دارو می‌تواند به‌عنوان درمان کمکی در کنار رادیوتراپی توصیه شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار انجام شد (۹۶۲۲۷).

ملاحظات اخلاقی

References

- [1]. Devi KP, Rajavel T, Nabavi SF, Setzer WN, Ahmadi A, Mansouri K, et al. Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:582-9. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.07.051
- [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: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49. DOI: 10.3322/caac.21660
- [3]. Hosseini A, Ghorbani A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2015;5(2):84-97. Epub 2015/05/08. DOI: 10.22038/ajp.2015.3872
- [4]. Srivastava N MA, Rastogi S. . Adverse Drug Reactions of Anti-Cancer Drugs and its Management: A Review. *Int J Adv Res Med Chem*. 2019;1(1):19-27 <https://www.medicaljournalshouse.com/index.php/AD R-Medicinal-Chemistry/article/view/338>.
- [5]. Bagherniya M, Nobili V, Blesso CN, Sahebkar A. Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A clinical review. *Pharmacological Research*. 2018;130:213-40. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.020
- [6]. Ghosh N, Ghosh R, Mandal V, Mandal SC. Recent advances in herbal medicine for treatment of liver diseases. *Pharmaceutical biology*. 2011;49(9):970-88. DOI: 10.3109/13880209.2011.558515
- [7]. Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*. 2012;31(3):206-38. DOI: 10.1080/21551197.2012.702534
- [8]. Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutrition and cancer*. 2008;60(4):442-9. DOI: 10.1080/01635580802143836
- [9]. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—a mini-review. *Life sciences*. 2014;113(1-2):1-6. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.029
- [10]. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences*. 2015;124:64-74. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.030
- [11]. Yap KM, Sekar M, Wu YS, Gan SH, Rani NNIM, Seow LJ, et al. Hesperidin and its aglycone hesperetin in breast cancer therapy: A review of recent developments and future prospects. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(12):6730-47. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.07.046
- [12]. Bahador A, Vaezi M. Novel formulations of hesperidin for antitumor, antimicrobial, and neuroprotective effects: A review. *Micro Nano Bio Aspects*. 2023;2(2):13-9. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.07.046
- [13]. Mahdian D, Shafiee-Nick R, Mousavi SH. Different effects of adenylyl cyclase activators and phosphodiesterases inhibitors on cervical cancer (HeLa) and breast cancer (MCF-7) cells proliferation. *Toxicology mechanisms and methods*. 2014;24(4):307-14. DOI: 10.3109/15376516.2014.898354
- [14]. Abroudi M, Fard AG, Dadashzadeh G, Gholami O, Mahdian D. Antiproliferative Effects of Ferula assafoetida's Extract on PC12 and MCF7 Cancer Cells. *International Journal of Biomedical Engineering and Clinical Science*. 2020. DOI:10.11648/j.ijbecs.20200603.12
- [15]. Li Y, Zhang T, Chen G. Flavonoids and Colorectal Cancer Prevention. *Antioxidants*. 2018;7(12):187. DOI: 10.3390/antiox7120187
- [16]. Siddiqi A, Saidullah B, Sultana S. Anti-carcinogenic effect of hesperidin against renal cell carcinoma by targeting COX-2/PGE2 pathway in Wistar rats. *Environmental toxicology*. 2018;33(10):1069-77. DOI: 10.1002/tox.22626
- [17]. Du GY, He SW, Zhang L, Sun CX, Mi LD, Sun ZG. Hesperidin exhibits in vitro and in vivo antitumor effects in human osteosarcoma MG-63 cells and xenograft mice models via inhibition of cell migration and invasion, cell cycle arrest and induction of mitochondrial-mediated apoptosis. *Oncology letters*. 2018;16(5):6299-306. DOI: 10.3892/ol.2018.9439
- [18]. Khamis AA, Ali EM, El-Moneim MAA, Abd-Alhaseeb MM, El-Magd MA, Salim EI. Hesperidin, piperine and bee venom synergistically potentiate the anticancer effect of tamoxifen against breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;105:1335-43. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.105

- [19]. Cincin Z, Kiran B, Baran Y, Cakmakoglu B. Hesperidin promotes programmed cell death by downregulation of nongenomic estrogen receptor signalling pathway in endometrial cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;103:336-45. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.020
- [20]. Li B, Xu WW, Lam AKY, Wang Y, Hu H-F, Guan XY, et al. Significance of PI3K/AKT signaling pathway in metastasis of esophageal squamous cell carcinoma and its potential as a target for anti-metastasis therapy. *Oncotarget*. 2017;8(24):38755. doi: 10.18632/oncotarget.16333
- [21]. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(4):a006098. DOI: 10.1101/cshperspect.a006098
- [22]. Saiprasad G, Chitra P, Manikandan R, Sudhandiran G. Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer*. 2014;50(14):2489-507. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.06.013
- [23]. Deepika MS, Thangam R, Sheena TS, Sasirekha R, Sivasubramanian S, Babu MD, et al. A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1181-95. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.178
- [24]. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*. 2003;22(56):8983. DOI: 10.1038/sj.onc.1207115