

GLİOBLASTOMA'da 5-FU ve CELASTROL'un SİTOTOKSİK ETKİSİ

THE CYTOTOXIC EFFECT of 5-FU AND CELASTROL on GLIOBLASTOMA

Mehmet TAŞPINAR¹, Farika Nur DENİZLER¹, Mustafa GÜVEN² Veysel YÜKSEK³, Sedat ÇETİN⁴, Semiha DEDE⁴¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Van, Türkiye.² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van, Türkiye.³ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, Türkiye⁴ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Van, Türkiye.

Geliş Tarihi: 10.11.2018, Kabul Tarihi: 12.12.2018

ÖZET

Glioblastoma (GB), en malign ve en agresif beyin tümörüdür. Fenotipik ve genotipik açıdan yüksek heterojeniteye sahip Glioblastomanın kesin bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Glioblastomada kemoterapi uygulamaları tedavide önemli bir yer tutmaktadır. Ancak kemoterapötik direnç tedavi başarısını düşürmektedir. Kemoterapötik direnci azaltmak ve etkili bir kemoterapi için bitkisel kökenli antikanserijenik moleküller elıştırılmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda, önemli bir tedavi yaklaşımı olarak, bu moleküllerin tek uygulamalarının yanında kemoterapötik ajanlarla kombine uygulamaları artmaktadır. Bu çalışmada, kemoterapötik ajan 5-Fluorouracil ile doğal bir bileşik olan Celastrol kombinasyonunun Glioblastomadaki sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. MTT sitotoksikite testi sonucunda 2 µM Celastrolün, 50 µM 5-Fluorouracilin sitotoksik etkisini %19 oranında arttırdığı, 0,5 ve 2 µM'lık Celastrolün 100 µM'lık 5-Fluorouracilin sitotoksik etkisini sırasıyla %25 ve %37 oranında arttırdığı saptanmıştır. Bu çalışma, tüm kanser tiplerinde 5-Fluorouracilin ile Celastrolün kombine etkisinin gösterildiği ilk çalışmadır. Celastrolün 5-Fluorouracil ile birlikte kullanımının önemini ilk kez gösteren bu çalışma, yeni bir tedavi protokülünün geliştirilmesi amacıyla daha ileri düzey araştırmalara temel bir dayanak oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler:

5-Fluorouracil, Celastrol, Glioblastoma, Sitotoksikite

ABSTRACT

Glioblastoma is the most malignant and aggressive brain tumor. Glioblastoma has heterogeneity in terms of genotypically and phenotypically and also there is no precise treatment model. Chemotherapy has a big role in the treatment of glioblastoma but chemotherapeutic resistance decrease the effectiveness of treatment. Anticancerogenic molecules which derived from plants are developing with the purpose of decreasing chemotherapeutic resistance and effective treatment. In recent years, as an important treatment approach, the combination of these molecules with chemotherapeutic agents as well as single administration increases. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic effect of the combination of chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil and a natural compound Celastrol in glioblastoma. As a result of the MTT cytotoxicity test, it was determined that Celastrol (2µM) has increased the cytotoxic effect of 5-Fluorouracil (50 µM) by 19%, the cytotoxic effect of 5-Fluorouracil (100 µM) has increased by celastrol (0.5 and 2 µM) in ratio of 25% and 37%, respectively. This is the first study to show the effects of 5-Fluorouracil and celastrol combination in all types of cancer. This study, which demonstrated the importance of the use of celastrol with 5-Fluorouracil for the first time, may provide a basis for further research in order to develop a new treatment protocol.

Key words:

5-Fluorouracil, Celastrol, Glioblastoma, Cytotoxicity

GİRİŞ

Glioblastoma (GB), çoğunlukla yetişkinlerde görülen en malign beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Evre IV astositom olarak sınıflandırılmıştır. GB, tüm primer beyin tümörlerinin %30' unu oluşturmaktadır (Sander ve ark., 2017). GB her yaşta görülebilir, genellikle 55-60 yaş aralığındaki erişkinlerde görülmektedir (Hanif ve ark., 2017). GB gelişimine neden olan risk faktörü veya faktörleri radyasyon haricinde tam olarak belli değildir. Genel olarak GB etkenleri sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon (Krex ve ark., 2007) ve genetik yatkınlık (Blumenthal ve Schulman, 2005) şeklinde sıralanabilir.

GB, yüksek proliferasyon ve infiltrasyon yeteneği, genetik açıdan kararsız yapısı, tedavilere gösterdiği direnç ve ortalama 14,6 ay yaşam süresi ile en kötü prognoza sahip tümör tiplerinden biridir. Temel tedavi şekilleri cerrahi sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulamasıdır. Ancak kemoterapi uygulamalarına karşı sıklıkla primer veya sekonder terapötik direnç gelişmektedir (Haar ve ark., 2012; Messaoudi ve ark., 2015). Bu nedenle, GB'de etkin kemoterapi yaklaşımları geliştirme çalışmalarına şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, sentetik kemoterapötiklerin neden olduğu yüksek toksisite ve yan etkiler nedeniyle günümüzde bitkilerden elde edilen doğal moleküllerin kullanımını barındıran yeni tedavi protokolleri geliştirme çalışmaları artmaktadır (Boridy ve ark., 2015; Kang ve ark., 2015; Di Cesare Manelli ve ark., 2018).

Celastrol (CEL), *Tripterygium wilfordii* bitkisinden elde edilen bir triterpendir (Wang ve ark., 2017). CEL'in tek başına, birçok kanserde Protein Kinaz B (Akt), Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR) ve c-Met gibi hücre içi sinyal yolları üzerinden antihipertansif, antiinflamatuvar ve antitümör özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Hu ve ark., 2013; Li ve ark., 2018). Son yıllarda, CEL'in antikanser etki gösterebilecek moleküllerle birlikte kullanımına ilişkin yaklaşımlar önem kazanmıştır (Boridy ve ark., 2014; Zheng ve ark., 2014; Kim ve ark., 2017). GB tedavisinde kullanılabilen kemoterapötiklerden biri de pirimidin analogu olan 5-Fluorouracil (5-FU)'dir. Literatürde 5-FU-CEL kombinasyonunun GB hücrelerindeki antikanser etkilerine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, GB hücresi üzerinde 5-FU CEL kombinasyonunun sitotoksik etkisinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM, [4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose, Sodium Pyruvate], FBS (Föetal Bovin Serum), L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin ve Tripsin-EDTA Capricorn markası kullanılmıştır. Flasklar ve 96 kuyucuklu plaklar Corning ve Biologix markalarından (sırayla) ve 5-FU (F-6627) ve CEL (C0869) sigma marka kullanılmıştır.

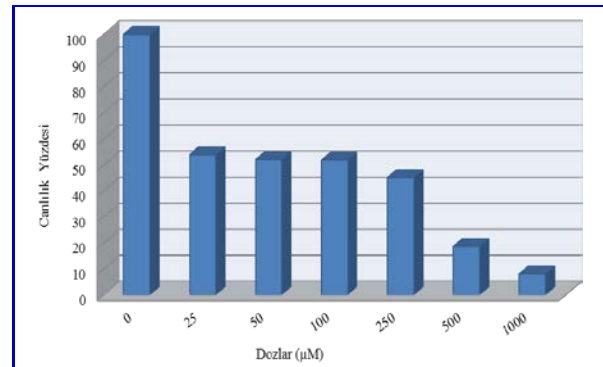
Sitotoksikite Testi

5-FU ve CEL'in LN-405 hücreleri üzerindeki sitotoksikite düzeylerini (IC_{50} =İnhibitör doz) saptamak amacıyla MTT ([3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]) yöntemi kullanılmıştır. LN-405 hücre dizilerine ait hücrelerden 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 8000 hücre ekim yapılmıştır. Bu hücrelerin plağa yapışması için 37 °C'de, % 5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin hücre döngülerinin eşitlenmesi amacıyla 8 saat serum açlığına bırakılmıştır. Serum açlığı sonunda hücrelere farklı konsantrasyonlarda 5-FU ve CEL eklenmiştir. 5-FU ve CEL DMSO'da çözdrülü ve final konsantrasyonunda DMSO oranı % 0,05'in altında tutuldu. 5-FU için 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 μ M, CEL için ise, 0,1, 0,5, 2, 4, 6, 8 ve 10 μ M konsantrasyonları hazırlanarak hücrelere sunulmuştur. 72 saat inkübasyondan sonra her bir kuyucuğa MTT (5 mg/1 ml) eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. 3 saatin sonunda her bir kuyucuğa lizis solüsyonu (1% Triton-X, 10% 0,1 mol/l HCl, 89% Isopropanol) eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Lizis solüsyonu eklenmesinden sonra her bir kuyucuğun 570 nm'deki absorbanı değeri ölçüldü ve Graphpad Prism programı kullanılarak IC_{50} değeri saptanmıştır. Her bir doz 4 kez tekrar edildi.

BULGULAR

5-FU'nun Sitotoksik Etkisi

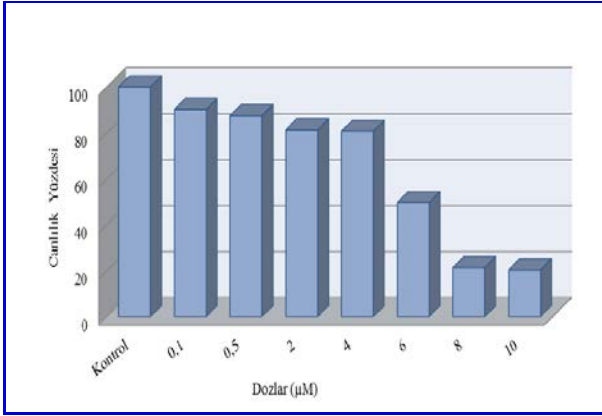
MTT testi sonrasında 5-FU'nun IC_{50} değeri 229 μ M olarak saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. 5-FU'nun LN-405 hücre dizisindeki sitotoksik etkisi

CEL'in Sitotoksik Etkisi

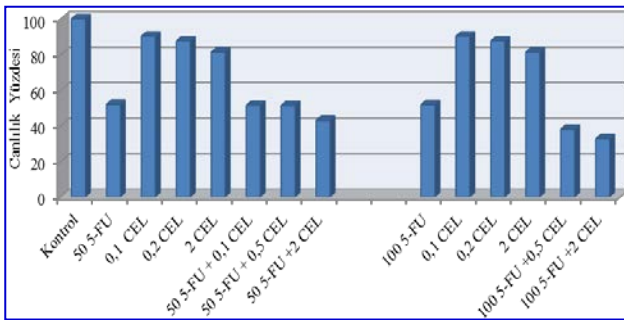
MTT testine göre CEL'in LN-405 hücre dizisindeki IC₅₀ değeri 5,89 µM olarak saptandı (Şekil 2).



Şekil 2. CEL'in LN-405 hücre dizisindeki sitotoksik etkisi

5-FU ile CEL Kombinasyonunun Sitotoksik Etkisi

50 µM 5-FU uygulandığında hücrelerin %52'si, 2µM CEL uygulandığında ise hücrelerin %82'si yaşamaktadır. 50 µM 5-FU ile 2 µM CEL birlikte uygulandığında ise hücrelerin %42'si yaşamaktadır. Buna göre 2 µM CEL 50 µM 5-FU'nun etkisini %19 oranında arttırmaktadır. Benzer bir durum 100 µM 5-FU uygulamasında da saptanmıştır. 100 µM 5-FU uygulamasında hücrelerin %51'i yaşarken 100 µM 5-FU 0,5 µM CEL ile birlikte uygulandığında hücrelerin %38'i, 2 µM CEL ile uygulandığında ise hücrelerin %32'si yaşamaktadır. Buna göre 100 µM'lık 5-FU'nun sitotoksik etkisi 0,5 µM CEL ile birlikte uygulandığında %25, 2 µM CEL ise uygulandığında ise %37 oranında arttırmıştır (Şekil III).



Şekil 3.5-FU, CEL Kombinasyonunun 5-FU ve CEL'e göre Sitotoksik Etkisi

TARTIŞMA

GB, en agresif beyin tümörlerinden biridir. Kesin bir tedavi protokolü olmayan GB'de cerrahi sonrası uygulanan kemoterapinin sağ kalma etkisi ortalama % 10 olarak belirtilmektedir (Sathornsumetee ve Rich, 2008). GB'nin kararsız genotipik yapısı ve yüksek genetik heterojeniteye (Haar ve ark., 2012) sahip olması GB için net bir tedavi protokolünün belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ancak son yıllarda doğal bileşiklerin gerek tek başına gerekse

kemoterapötiklerle kombine uygulama seçenekleri üzerinden yeni tedavi protokolleri geliştirme çalışmaları artmaktadır (Boridy ve ark., 2015; Kang ve ark., 2015). Bunun temel nedeni, kemoterapi uygulamalarından kaynaklanan kemik iliği toksisitesi (Messouadi ve ark. 2015) ve beraberinde gelen sistemik yan etkilerdir.

5-FU, bir primidin analogudur ve GB tedavi protokolleri içerisinde yer almaktadır (Menei ve ark., 2004; Cloughesy ve ark., 2016; Paolillo ve ark., 2018). Miller ve ark. (2002), tarafından yapılan çalışmada GB'nin 5-FU'ya daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir. Acra ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada GB'nin doğası gereği, 5-FU'ya dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da 5-FU'nun IC₅₀ değeri diğer kanser türlerine göre daha yüksek bulunmuştur (Uchibori ve ark., 2012; Nutthasirikul ve ark., 2015; Tolba ve Abdel-Rahman, 2015). Bu durum GB'nin antimetabolit tedavisine daha dirençli olduğunu ve bu direncin üstesinden gelinmesi ve/veya yumuşatılması için alternatif yaklaşımlarının geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

5-FU'nun GB'deki terapötik indeksi diğer kemoterapötik ajanlara göre düşük olduğundan bu etkinin artırılması için çeşitli viral yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Cloughesy ve ark. 2016). Bu çalışmaların amacı da kemoterapötik açıdan etkili bir antimetabolitin düşük toksisiteyle en fazla terapötik indeksine ulaşmaktadır. Bu çalışmada bu amaç doğrultusunda 5-FU'nun CEL ile kullanımının olası sitotoksik etkisi araştırılmıştır.

CEL, triptain olarak ta bilinen, Çin'de yetişen *Tripterygium wilfordii* isimli bitkiden elde edilen, çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla antikanserojenik ve antienflamatuar özellikleri gösterilmiş önemli bir kinin metid triterpenoiddir (Zhu ve ark., 2012). CEL'in antikanserojenik özelliğini apoptotik, hücre döngüsü, anjiyogenez ve metastaz yolları üzerinden gösterebildiği bildirilmektedir (Hu ve ark., 2013). CEL'in yeni bir Hsp90 inhibitörü olduğu ve kullanıldığında hücreyi bu yolla endoplazmik retikulum strese sürükleyebildiği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2012). Tanımlanan bu özellikleriyle CEL'in diğer moleküllerle ve kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımı (Chen ve ark., 2009, Zheng ve ark., 2014) oldukça ilgi çekici bir konudur. Biz de bu çalışmada 5-FU ile CEL'in birlikte kullanımı araştırıldı.

Farklı kanser türlerinin içeren hücre dizileri kullanılarak yapılan çalışmalarda CEL'in IC₅₀ değeri birbirlerinden farklı saptanmıştır. Wang ve ark.(2017) tarafından yapılan çalışmada ovaryum kanseri hücrelerinde CEL'in IC₅₀ değerini 96.saatte ortalama 1 µM olarak, Kim ve ark.(2017)

tarafından yapılan çalışmada anaplastik troid karsinoma hücrelerinde 48.saatte 0,94 ve 1,08 μM olarak ve Zhu ve ark.(2012) tarafından yapılan çalışmada hepatoselüler karsinomada 72 saatte 1,25 μM olarak saptandığı bildirilmiştir. Zheng ve ark.(2014), tarafından yapılan çalışmada, CEL'in ortalama IC₅₀ değerini (72.saat) ovaryum, akciğer ve prostat kanserlerinde sırasıyla ortalama 1, 0,8 ve 0,6 μM olarak saptandığı belirtilmektedir. Bu çalışmada ise CEL'in IC₅₀ değeri 5,89 μM olarak saptanmıştır. Bu farklılığın temel nedeni, kullanılan yöntem, maddelerin inkübasyon süreleri ve elbette kanser hücre tiplerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Wang ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada CEL'in 48.saatte U87MG ve LN229 gibi Temozolomid (TMZ) duyarlı hücre dizilerinde IC₅₀ değerleri ortalama 1 μM olarak saptanırken T989G ve LN18 gibi TMZ dirençli hücrelerde ortalama 5 μM olarak saptanmıştır. Bu çalışmada TMZ'ye duyarlı olarak bilinen LN-405 hücre dizisi kullanılmıştır ve bu hücrelerde CEL'in IC₅₀ değeri 5,89 μM olarak saptanmıştır. Bu değer Wang ve ark. (2018) çalışması ile uyumlu bulunmasına rağmen IC₅₀ değerinin diğer GB hücre dizilerine göre biraz yüksek bulunması, a) CEL ile TMZ'nin farklı mekanizmalar üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini işaret etmesi dışında, b) GB'de CEL duyarlılığında, TMZ duyarlılığında yer alan genlerin dışında genlerin rol aldığını göstermektedir.

Boridy ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise 3 farklı GB hücre dizisinde CEL IC₅₀ değeri, hücreler arasında fark olmasına rağmen 24. saat için 5-7 μM arasında saptandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, GB'de CEL'in IC₅₀ değerinin yüksek olduğunu ve bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kim ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada anaplastik troid karsinoma hücrelerinde CEL'in paklitaksel ile; Zheng ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ovaryum, akciğer ve prostat hücrelerinde HDAC inhibitörü SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid) ile ve Chen ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise melanoma hücrelerinde TMZ ile sinerjistik etki gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada 5-FU ile kombine uygulanan CEL'in 5-FU'nun sitotoksik etkisini arttırdığı saptanmıştır. Literatürde ne GB'de ne de diğer kanser türlerinde CEL'in 5-FU'nun sitotoksitesine etkisine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile literatürde CEL'in 5-FU sitotoksik etkisine katkısı ilk defa gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Acra AM, Sakagami H, Matsuta T, Adachi K, Otsuki S, Nakajima H ve ark. Effect of three fluoride compounds on the growth of oral normal and tumor cells. *In Vivo*. 2012; 26(4):657-64.
- Blumenthal DT, Schulman SF. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother*. 2005;5(5):683-90.
- Boridy S, Le PU, Petrecca K, Maysinger D. Celastrol targets proteostasis and acts synergistically with a heat-shock protein 90 inhibitor to kill human glioblastoma cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1216.
- Chen M, Rose AE, Doudican N, Osman I, Orlov SJ. Celastrol synergistically enhances temozolomide cytotoxicity in melanoma cells. *Mol Cancer Res*. 2009;7(12):1946-53.
- Cloughesy TF, Landolfi J, Hogan DJ, Bloomfield S, Carter B, Chen CC, ve ark. Phase 1 trial of vocimagene amiretorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma. *Sci Transl Med*. 2016;8(341):341ra75.
- Di Cesare Mannelli L, Piccolo M, Maione F, Ferraro MG, Irace C, De Feo V, ve ark. Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge revert chemotherapy-induced neuropathic pain and reduce glioblastoma cells malignancy. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:1042-1049.
- Haar CP, Hebbar P, Wallace GC 4th, Das A, Vandergrift WA 3rd, Smith JA ve ark. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem Res*. 2012;37(6):1192-200.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(1):3-9.
- Hu Y, Wang S, Wu X, Zhang J, Chen R, Chen M. ve ark. Chinese herbal medicine derived compounds for cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):601-12.
- Kang CW, Park MS, Kim NH, Lee JH, Oh CW, Kim HR, ve ark. Hexane extract from *Sargassum serratifolium* inhibits the cell proliferation and metastatic ability of human glioblastoma U87MG cells. *Oncol Rep*. 2015;34(5):2602-8.
- Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, ve ark. Cytotoxic effect of celastrol alone or in combination with paclitaxel on anaplastic thyroid carcinoma cells. *Tumour Biol*. 2017;39(5):1010428317698369.
- Krex D, Klunk B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, ve ark. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: A J Neurol*. 2007;130:2596-606.
- Li N, Xu M, Bao N, Shi W, Li Q, Zhang X ve ark. Discovery of novel NO-releasing celastrol derivatives with Hsp90 inhibition and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem*. 2018;160:1-8.
- Menei P, Jadaud E, Faisant N, Boisdron-Celle M, Michalak S, Fournier D, ve ark. Stereotaxic implantation of 5-fluorouracil-releasing microspheres in malignant glioma. *Cancer*. 2004;100(2):405-10.
- Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discov Today*. 2015;20(7):899-905.
- Miller CR, Williams CR, Buchsbaum DJ, Gillespie GY. Intratumoral 5-fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(3):773-80.
- Nutthasirikul N, Hahnvajanawong C, Techasen A, Limpiboon T, Leelayuwat C, Chau-In S. ve ark. Targeting the $\Delta 133\text{p}53$ isoform can restore chemosensitivity in 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 2015;47(6):2153-64.
- Paolillo M, Boselli C, Schinelli S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sci*. 2018;8(1).
- Sander P, Mostafa H, Soboh A, Schneider JM, Pala A, Baron AK ve ark. Vacuinol-1 inducible cell death in glioblastoma multiforme is counter regulated by TRPM7 activity induced by exogenous ATP. *Oncotarget*. 2017; (21):35124-35137.

- Sathornsumetee S, Rich JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1142:108-32.
- Tolba MF, Abdel-Rahman SZ. Pterostilbine, an active component of blueberries, sensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil cytotoxicity. *Sci Rep.* 2015;5:15239.
- Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1457-1472.
- Uchibori K, Kasamatsu A, Sunaga M, Yokota S, Sakurada T, Kobayashi E. ve ark. Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1005-10.
- Wang F, Zheng Z, Guan J, Qi D, Zhou S, Shen X ve ark. Identification of a panel of genes as a prognostic biomarker for glioblastoma. *EBioMedicine.* 2018;37:68-77.
- Wang Z, Zhai Z, Du X. Celastrol inhibits migration and invasion through blocking the NF- κ B pathway in ovarian cancer cells. *Exp Ther Med.* 2017;14(1):819-824.
- Zheng L, Fu Y, Zhuang L, Gai R, Ma J, Lou J. et. al. Simultaneous NF- κ B inhibition and E-cadherin upregulation mediate mutually synergistic anticancer activity of celastrol and SAHA in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2014;135(7):1721-32.
- Zhu H, Yang W, He LJ, Ding WJ, Zheng L, Liao SD. et al. Upregulating Noxa by ER stress, celastrol exerts synergistic anti-cancer activity in combination with ABT-737 in human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 2012;7(12):e52333.