

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Erianinin HT29 Kolorektal Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu ve Koloni Oluşumu Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Sema SERTER KOÇOĞLU¹, Levent ELMAS², Mücahit SEÇME³

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

² Bakırçay Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

ÖZET

Kolorektal kanser, dünyada kanser ilişkili ölümlerin en yaygın dördüncü sebebidir. Erianin antioksidan ve anti-tümör etkilere sahip Dendrobium ekstraktından elde edilen yeni bir dibenzil bileşiğidir. Bu çalışmada, erianinin HT29 kolorektal kanser hücreleri üzerine olan terapötik etkileri araştırılmıştır. Erianinin HT29 hücre canlılığı üzerine etkileri XTT test ile koloni oluşumu üzerine etkileri ise koloni formasyonu ile değerlendirilmiştir. Erianinin HT29 hücrelerinde IC₅₀ değeri 48. saatte 59.05 µM olarak belirlenmiştir. HT29 hücre dizisinde erianin uygulanan grupta koloni sayısı 67±33 iken kontrol grubunda 350±89 olarak hesaplanmıştır. Erianin, HT29 kolorektal kanser hücrelerinde koloni oluşumunu ise anlamlı derecede azaltmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçları, erianinin kolorektal kanser tedavisinde doğal elde edilen bir bileşik olarak güvenli, kolay ulaşılabilir ve umut veren terapötik bir ilaç olabileceğini destekler niteliktedir. Gelecekte erianinin kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmasını aydınlatacak daha kapsamlı ve çok merkezli desteklenecek ileri düzeyde klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Erianin, HT29, Kolorektal kanser.

Investigation of the Effects of Erianin on Proliferation and Colony Formation of HT29 Colorectal Cancer Cells

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the 4th most common cause of cancer-related death in the global world. Erianin, a novel dibenzyl compound in Dendrobium extract, has antioxidative and antitumor activities. In this study, the therapeutic effects of erianin on HT29 colorectal cancer cells were investigated. Effects of erianin on cell viability were evaluated by XTT test. Effects of erianin on colony formation were evaluated by colony formation analysis. IC₅₀ values of Erianin on HT29 cells were determined as 59.05 µM at 48th hour. While the number of colonies in the HT29 cell line was 67±33 in the erianin treated group, it was calculated as 350±89 in the control group. Erianin significantly reduced colony formation in HT29 colorectal cancer cells. The results of the presented studies support that erianin as a natural product in the treatment of colorectal cancer can be a safe, easily accessible and promising therapeutic drug. In the future, more comprehensive and multi-center supported clinical studies are needed to elucidate the mechanism of action of erianin on colorectal cancer cells.

Key Words: Erianin, HT29, Colorectal cancer.

Geliş Tarihi: 18.Nisan.2021

Kabul Tarihi: 02.Temmuz.2021

Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU
Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Balıkesir, Türkiye.
Tel.: 0537 665 93 19
E-posta: serteser_bio@hotmail.com

Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Sema SERTER KOÇOĞLU: 0000-0002-3180-4007

Levent ELMAS: 0000-0002-6865-6466

Mücahit SEÇME: 0000-0002-2084-760X

2018 yılında, Birleşmiş Milletlerde, 145.600 yetişkine kolorektal kanser (KRK) teşhisi konulmuştur¹. Çevresel ve genetik faktörler, ileri yaş, uzun süreli kronik inflamasyon, kişisel veya ailede kolorektal polip öyküsü, sağlıksız diyetler, obezite ve yaşam tarzı gibi faktörlerin KRK geliştirme olasılığını artırdığı iyi bilinmektedir². Mikrosatellit kararsızlığı (MSI), *BRAF* mutasyonları, *PIK3CA* mutasyonları ve *KRAS* mutasyonları KRK'nın gelişimi ile yakından ilişkili ana faktörlerdir. Daha yakın zamanlarda, *SMAD4* kaybı, kemorezistans ve azalmış immün infiltrasyon ile anlamlı ilişkisi nedeniyle KRK hastaları için umut verici bir prognostik belirteç olarak tanımlanmıştır³.

İç organlarda gelişen bir kanser türü olan KRK hızlı bir şekilde invaze olup vücudun diğer organlarına yayılır. Son 5 yılda hayatta kalma oranı %10'un altın-

dadır^{1,4}. Mevcut tedavi yöntemleri hastalığın derecesine bağlı olarak cerrahi ve kemoterapidir⁵. Floropirimi-din-bazlı kemoterapi KRK hastaları için uygulanan standart kemoterapi yöntemidir. Kemoterapi ile tümör ilerlemesi durdurulabilir. Ancak, çoğu kemoterapi ajanı vücuttaki normal hücreler için toksik etki gösterir⁶. Genellikle, hastalarda hızlı bir şekilde kemoterapi ilaç direnci ve metastaz gerçekleşir ve teşhisi takiben 5 yıl içinde ölüme neden olur⁴. Hastaların ölümüne kanser hücrelerinin metastazı ve yayılması neden olur. Kolorektal kanserin ana tedavisi cerrahi rezeksiyondur. Son yıllarda, cerrahi sonrası kanserin yayılma riskinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Tümör damar yaralanması ve cerrahi, tümör hücrelerinin kan dolaşımına girmesine ve tümörün daha hızlı yayılmasına neden olmaktadır⁷. Kolorektal kanserin teşhis ve belirlenmesindeki zorluktan dolayı, KRK hastaları için daha güvenli, uygun maliyetli, daha az risk taşıyan ve hastaların yaşam konforunu arttıracak yeni tedavi ajanlarına ihtiyaç vardır⁷.

Doğal bileşikler, insanlar için kanser araştırmalarında güvenli bir profil çizmeleri ve tedavideki etkinlikleri dolayısıyla yüzyıllardır kullanılmaktadır⁸. Dendrobium, orkidegiller familyasına ait çeşitli biyolojik ve tıbbi özelliklere sahip çok büyük bir yayılım gösteren orkide cinsidir⁹.

Erianin [2-Methoxy-5-(2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-ethyl)-phenol], *Dendrobium chrysotoxum*'dan elde edilen anti-tümör ve antioksidan özelliklerinden dolayı tercih edilen doğal bir bibenzil bileşiğidir¹⁰. Erianinin antikarsinojenik özellikleri ve etki mekanizmasına ait çalışmalar sınırlıdır. Servikal kanser¹¹, mesane kanser¹², osteosarkoma¹³, akciğer kanseri¹⁴, meme kanseri¹⁵ erianinin antikarsinojen etkilerinin çalışıldığı kanser türleridir. Erianinin HT29 kolorektal hücrelerinin canlılığı ve koloni oluşumu üzerine etkileri daha önce çalışılmamıştır.

Bu çalışmada, erianinin HT29 hücreleri üzerindeki terapötik etkisi ilk kez çalışılmıştır. Erianinin KRK hücreleri üzerindeki terapötik etkisini göstermek için HT29 KRK hücre dizisi kullanılmıştır. Bu bağlamda bu çalışmada, erianinin HT29 KRK hücrelerinin canlılığı ve koloni oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü ve Reaktifler

Bu çalışmada, HT29 KRK hücre dizisi (ATCC, USA) kullanılmıştır. Hücreler 2 mM L-glutamin, penisilin (20 units/mL), streptomisin (20µg/mL) ve %10 fetal sıgır serumu içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür ortamında %95 hava ve %5 CO₂ basıncı altında 37°C'de inkübe edilmiştir. Erianin (Wuhan, China) dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüştür. HT29 hücreleri 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16

µM, 32 µM, 64 µM, 128 µM erianin ile 24, 48 ve 72. saatler için doz ve zaman-bağımlı olarak inkübe edilmiştir.

Hücre Sayımı

Hücre proliferasyonu deneyleri öncesinde, deneyde kullanılacak hücre sayısını belirlemek için hücre sayımı yapılmıştır. HT29 hücrelerinin sayım işlemi Neubauer sayım lamı kullanılarak, tripan mavisi boyama yöntemine göre uygulanmıştır. Temiz ve steril mikro santrifüj tüpü içerisine 50 µl tripan mavisi ve 50 µl hücre süspansiyonundan eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen karışımdan 10 µl alınarak Neubauer hücre sayım lamına aktarılmış invert mikroskopta 10X büyütmede sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesin hücre sayısı, lamın dış kısmında bulunan 4 büyük alandaki toplam hücre sayısının ortalaması alınarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)} = (\text{Toplam Hücre sayısı} / 4) \times 10.000 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

Hücre Canlılığı

Erianinin HT29 hücrelerindeki IC₅₀ dozunun ve hücre canlılığının belirlenmesi için XTT (2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Erianin 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda erianin ile muamele edilmiş ve 24, 48 ve 72 saat için inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı değerlendirmek için XTT karışımı üretici firmanın protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Formazan oluşumu mikropipla okuyucu kullanılarak ve 630nm dalga boyu referans alınarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Hücre canlılığı aşağıdaki formül baz alınarak hesaplanmıştır. Kontrol ve erianin doz grupları her bir plaka için üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

Koloni Formasyonu Analizi

Koloni oluşumunu belirlemek için HT29 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 1000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kontrol ve doz grupları oluşturulmuş ve 48 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri her 2 günde bir değiştirilerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin fikse edilmesi için %10'luk metanol kullanılmış ve -20°C'de 10 dakika bırakılmıştır. Fikse olan koloniler kristal viyole (% 0.5 dilution, Merckmilipor, ABD) boyası ile boyanmış ve PBS ile yıkanmıştır. Doz ve kontrol grupları 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ışık mikroskobu kullanılarak manuel olarak sayılmıştır^{16,17}.

Erianinin HT29 hücreleri üzerine etkileri

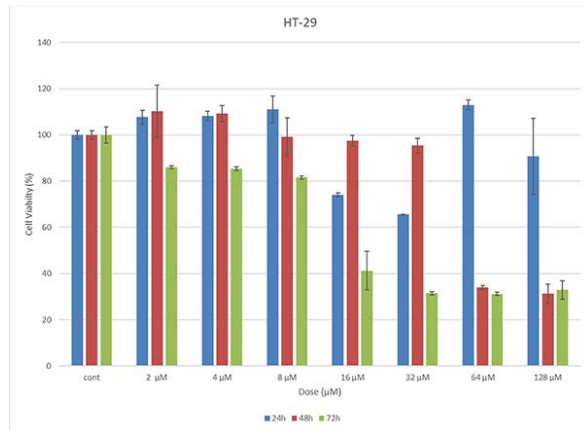
İstatistiksel Analiz

Kontrol ve doz grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık karşılaştırılması 'Student t test' ile yapılmıştır. İstatistiksel analiz değerlendirmesi için SPSS 17.0 istatistik analiz programı kullanılmış ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Erianinin HT29 KRK Hücre Canlılığını Azaltır

Erianinin HT29 KRK hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri XTT yöntemi ile belirlenmiştir. Erianin, HT29 kolon kanseri hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. 24'üncü saatte erianin HT29 KRK hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü bir doz belirlenmemiştir. 48 ve 72'inci saatte erianinin HT29 hücrelerinin canlılığını %50'nin altına düşürdüğü doz sırasıyla, 64 ve 16 μM olarak belirlenmiştir. Erianinin HT29 kolon kanseri hücrelerinde IC_{50} dozu 48'inci saatte 59.05 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

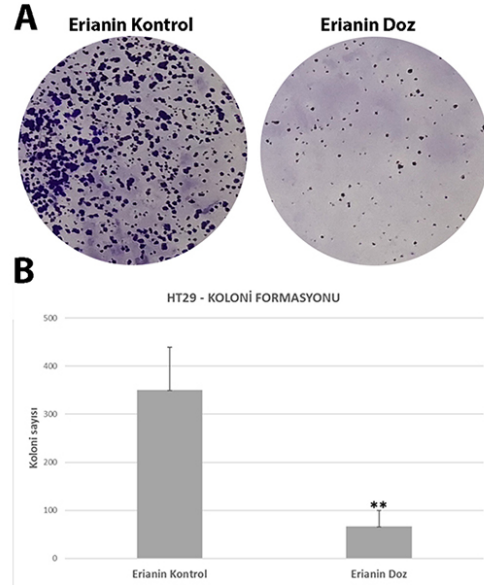


Şekil 1.

Erianinin HT29 KRK hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Data 3 bağımsız deneyin ortalama sonuçlarını göstermektedir. Erianinin IC_{50} değeri HT29 hücrelerinde 48 saat için 59.05 μM olarak bulunmuştur.

Erianin HT29 KRK Hücrelerinde Koloni Formasyonunu Azaltır

Erianinin HT29 KRK hücrelerinde koloni oluşumunu değerlendirmek için koloni formasyonu analizi uygulanmıştır. HT29 hücrelerinde, erianin uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında, koloni oluşumunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2A). HT29 hücre dizisinde erianin uygulanan grupta koloni sayısı 67 \pm 33 iken kontrol grubunda 350 \pm 89 olarak hesaplanmıştır (Şekil 2B). HT29 hücrelerinde koloni sonuçları erianin uygulanan grupta koloni sayısının % 80.85 azaldığını göstermiştir.



Şekil 2.

Erianin HT29 KRK hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkileri. A) Erianin ve kontrol gruplarında kristal viyole ile boyanmış kolonilerin morfolojik görüntüsü. B) Erianin uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında koloni sayısı anlamlı olarak azalmıştır ($\pm\text{SS}$, $n=3$, $p < 0.01$).

Tartışma ve Sonuç

Her yıl 1.2 milyondan fazla hastaya kolorektal kanser teşhisi konmakta ve 600.000'den fazla KRK hastası yaşamını yitirmektedir. Görülme sıklığı küresel olarak büyük ölçüde değişmekle birlikte insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir ve yaşla birlikte görülme sıklığı da artmaktadır¹⁸. Bu nedenle, KRK hastalarının prognozunu iyileştirmek için yeni ve güvenli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Doğal ürünler yeni antikanser ilaçlarının keşfinde verimli kaynaklar haline gelmiştir. Şu anda kullanılmakta olan antikanser ilaçlarının yaklaşık %50'si doğrudan ya da dolaylı olarak doğal ürünlerden elde edilmektedir. Bu doğal ürünler; alkaloidler, polisakkaritler, polifenoller, diterpenoid ve doymamış yağ asitleri yapıdadırlar³. Kahverengi deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarit olan fucoidan'ın HT29 ve HCT116 hücrelerinde apoptozu indüklediğini gösterilmiştir³. *Curcuma Longa*'dan izole edilen bir polifenol olan Curcumin'in *in vitro* ve *in vivo* olarak, çoklu hücre yolaklar yoluyla etki gösteren KRK'ya karşı kanser önleyici özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir¹⁹. Andrographolide bir diterpenoiddir ve Asya'da binlerce yıldır geleneksel bir bitkisel ilaç olarak kullanılan *Andrographis paniculata* bitkisinin başlıca biyoaktif bileşenidir³. Andrographolidin'in insan kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif ve apoptotik özellikleri gösterilmiştir²⁰. Erianin, *Dendrobium chrysotoxum*'dan elde edilen anti-tümör ve anti-

oksidan özelliklerinden dolayı tercih edilen doğal bir bibenzil bileşimidir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında doğal bir ürün olan erianinin KRK kanser hücrelerinde antikanserojen etkileri gösterilmiştir ve doğal ürünler-KRK kanser ilişkisini gösteren diğer çalışmaları destekler niteliktedir.

Son yıllarda, geleneksel Çin tıbbi alternatif tıp konusunda oldukça gelişme kaydetmiş ve birçok kanser türünde etkili tedavi sonuçları elde edilmiştir^{21,22}. Farklı kanser hücrelerinde, doğal bileşiklerin aktif bileşenlerinin antikanserojen etkisinin ve altında yatan temel mekanizmaların aydınlatılması yeni anti-kanser ilaçların keşfinin önünü açacaktır. Bu amaçla erianinin antikanserojen etkisi çeşitli kanser türlerinde çalışılmıştır. Chen ve ark. Dendrobium özündeki yeni bir dibenzil bileşiği olan erianinin kalsiyum/kalmodülün aracılı ferroptoz yoluyla akciğer kanseri hücre büyümesini ve göçünü inhibe ettiğini göstermiştir¹⁴. Zhu ve ark. erianinin mitokondriyal apoptoz ve JNK yolakları yoluyla mesane kanseri hücresi büyümesini inhibe ettiğini ve mesane kanseri tedavisi için ümit veren bir terapi bileşiği olabileceğini önermiştir. Diğer bir çalışmada, erianinin insan nazofarengeal karsinomunda ERK yoluyla hücre apoptozunu indüklediği ve nazofarengeal kanser terapisi için umut vaat eden doğal bir bileşik olabileceği bildirilmiştir²¹. Ancak, erianinin HT29 kolon kanseri hücrelerinin canlılığı ve koloni oluşumu üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada, erianinin HT29 KRK hücrelerinin proliferasyonu ve koloni oluşumu üzerine etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Erianinin kolorektal kanser hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için HT29 hücre hattı kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda erianinin HT29 hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği XTT metodu ile belirlenmiştir. Erianinin IC₅₀ dozu 48'inci saatte HT29 hücrelerinde 59.05 µM olarak belirlenmiştir. Sun ve ark. erianinin T47D hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığını göstermiştir¹⁵. Diğer bir çalışmada, erianinin insan servikal kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi gösterilmiştir¹¹. Aynı zamanda, erianinin osteosarkoma hücre proliferasyonunu baskıladığı da bildirilmiştir¹³.

In vitro koloni oluşturan analizler, kanser tedavilerinin sonucunu tahmin etmek için kullanılabilir ve genellikle antikanser ilaçları test etmek için kullanılır²³. Sunulan çalışmada, erianinin HT29 KRK hücrelerinin koloni oluşumu üzerine etkileri koloni formasyonu analizi ile değerlendirilmiştir. Bizim sonuçlarımız, erianinin HT29 KRK hücrelerinde kontrol grubuyla kıyaslandığında koloni oluşumunu anlamlı olarak azalttığını göstermiştir.

Sonuç olarak, biyoaktif bileşikler, yeni ajanlar ve biyomarkır moleküller kanser tedavisinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda araştırılmıştır. Bu tümörlerin onkogenezinin ve altında yatan temel mekanizmaların aydınlatılması yeni kanser terapilerin geliştirilmesinin

önünü açacaktır. Bu nedenle kolorektal kanser terapisinde yeni biyolojik ve kimyasal reaktiflere ihtiyaç artmaktadır. Bizim sonuçlarımız erianinin HT29 KRK hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu anlamlı olarak azalttığını göstermiştir. Erianin, kolorektal kanser terapisi için tek başına ya da diğer moleküllerle kombine olarak bir aday olabilir. Gelecekte erianinin kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmasını aydınlatacak daha kapsamlı ve çok merkezli desteklenecek ileri düzeyde klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Bu çalışma etik onam alınması gereken çalışmalar kapsamı dışında olan hücre kültürü çalışmasıdır ve 01.06.2020-01.10.2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: S.S.K., M.S., L.E.; Veri toplama ve işleme: L.E., M.S.; Analiz ve verilerin yorumlanması: S.S.K., M.S.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: S.S.K.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Çalışmaya yönelik yaptığı düzenleme katkısından dolayı Öğretim Görevlisi Ercan Koçoğlu'na teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. An BC, Hong S, Park HJ, vd. Anti-Colorectal Cancer Effects of Probiotic-Derived p8 Protein. *Genes* 2019; 10(8). doi:10.3390/genes10080624
2. Weng W, Goel A. Curcumin and colorectal cancer: An update and current perspective on this natural medicine. *Seminars in Cancer Biology* 2020. doi:10.1016/j.semcancer.2020.02.011
3. Huang X mei, Yang Z jie, Xie Q, Zhang Z kang, Zhang H, Ma J ying. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2019; 117: 109142. doi:10.1016/j.biopha.2019.109142
4. Chung SS, Dutta P, Chard N, vd. A novel curcumin analog inhibits canonical and non-canonical functions of telomerase through STAT3 and NF-κB inactivation in colorectal cancer cells. *Oncotarget* 2019; 10(44): 4516-4531. doi:10.18632/oncotarget.27000
5. Gamage CDB, Park SY, Yang Y, vd. Deoxypodophyllotoxin exerts anti-cancer effects on colorectal cancer cells through induction of apoptosis and suppression of tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(11): 2612. doi:10.3390/ijms20112612
6. Wang S, Wang L, Zhou Z, vd. Leucovorin Enhances the Anticancer Effect of Bortezomib in Colorectal Cancer Cells. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 682 doi:10.1038/s41598-017-00839-9
7. Wang X, Li T. Ropivacaine inhibits the proliferation and migration of colorectal cancer cells through ITGB1. *Bioengineered* 2021; 12(1): 44-53. doi: 10.1080/21655979.2020.1857120
8. Hlosrichok A, Sumkhemthong S, Sritularak B, Chanvorachote P, Chaotham C. A bibenzyl from *Dendrobium ellipsophyllum* induces apoptosis in human lung cancer cells. *Journal of Natural Medicines* 2018; 72(3): 615-625. doi:10.1007/s11418-018-1186-x

Erianinin HT29 hücreleri üzerine etkileri

- Guo Z, Zhou Y, Yang J, Shao X. Dendrobium candidum extract inhibits proliferation and induces apoptosis of liver cancer cells by inactivating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2019; 110: 371–379. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.149
- Yang L, Hu Y, Zhou G, Chen Q, Song Z. Erianin suppresses hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of PI3K/AKT, p38 and ERK MAPK signaling pathways. *Bioscience reports* 2020; 40(7): BSR20193137. doi:10.1042/BSR20193137
- Li M, He Y, Peng C, Xie X, Hu G. Erianin inhibits human cervical cancer cell through regulation of tumor protein p53 via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Oncology Letters* 2018; 16(4): 5006–5012. doi:10.3892/ol.2018.9267
- Zhu Q, Sheng Y, Li W, vd. Erianin, a novel dibenzyl compound in Dendrobium extract, inhibits bladder cancer cell growth via the mitochondrial apoptosis and JNK pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2019; 371: 41–54. doi:10.1016/j.taap.2019.03.027
- Wang H, Zhang T, Sun W, vd. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death and Disease* 2016; 7(6): e2247. doi:10.1038/cddis.2016.138
- Chen P, Wu Q, Feng J, vd. Erianin, a novel dibenzyl compound in Dendrobium extract, inhibits lung cancer cell growth and migration via calcium/calmodulin-dependent ferroptosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; 5(1): 51. doi:10.1038/s41392-020-0149-3
- Sun J, Fu X, Wang Y, vd. Erianin inhibits the proliferation of T47D cells by inhibiting cell cycles, inducing apoptosis and suppressing migration. *American journal of translational research*. 2016;8(7):3077–3086.
- Rajendran V, Jain MV. In vitro tumorigenic assay: colony forming assay for cancer stem cells. *Çinde: Methods in Molecular Biology* 2018; 1692: 89–95. doi:10.1007/978-1-4939-7401-6_8
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006; 1(5): 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *The Lancet* 2014; 383: 1490–1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
- Ruiz de Porras V, Layos L, Martínez-Balibrea E. Curcumin: A therapeutic strategy for colorectal cancer? *Seminars in Cancer Biology* 2021; 73: 321–330. doi:10.1016/j.semcancer.2020.09.004
- Khan I, Mahfooz S, Ansari IA. Antiproliferative and Apoptotic Properties of Andrographolide Against Human Colon Cancer DLD1 Cell Line. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2019; 20(6): 930–942. doi:10.2174/1871530319666191125111920
- Liu YT, Hsieh MJ, Lin JT, vd. Erianin induces cell apoptosis through ERK pathway in human nasopharyngeal carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2019; 111: 262–269. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.081
- Zhu Q, Sheng Y, Li W, vd. Erianin, a novel dibenzyl compound in Dendrobium extract, inhibits bladder cancer cell growth via the mitochondrial apoptosis and JNK pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2019; 371: 41–54. doi:10.1016/j.taap.2019.03.027
- Cho JG, Lim KH, Park SG. MED28 increases the colony-forming ability of breast cancer cells by stabilizing the ZNF224 protein upon DNA damage. *Oncology Letters* 2018; 15(3): 3147–3154. doi:10.3892/ol.2017.7718

