




# Tinzaparin Tedavisinin Oral Yassı Hücreli Karsinoma Çıplak Fare Modelinde *BAX* ve *CCNB1* Gen Anlatımları Üzerindeki Etkisi

The Effect of Tinzaparin Treatment on *BAX* and *CCNB1* Gene Expression in an Oral Squamous Cell Carcinoma Nude Mice Model

Feyza TUNCER<sup>1</sup> , Yeliz EKİCİ<sup>1</sup> , Betül AKÇA<sup>2</sup> 

## Öz

**Giriş:** Bu çalışma, oral yassı hücreli karsinom (OYHK) çıplak fare modelinde tinzaparin tedavisinin proapoptotik *BAX* ve hücre döngüsü G2/M faz regülatörü *CCNB1* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisini tespit etmeyi amaçlamıştır.

**Gereçler ve Yöntemler:** Üç gruptan oluşan [tinzaparin tedavisi alan (n=4), pozitif kontrol (n=4), negatif kontrol (n=3)] 4–6 haftalık toplam 11 çıplak farede ortotopik OYHK fare modeli geliştirilmiştir. İnsan dil kanser hücre hattı OSC-19 bu *in vivo* modelin oluşturulmasında kullanılmıştır. Fareler 21 gün sonra sakrifiye edilerek, tümörler *BAX* ve *CCNB1* gen anlatımları açısından kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR) kullanılarak kantifiye edilmiştir. Gen anlatım düzeyleri Livak metodu ile *ACTB housekeeping* geni kullanılarak hesaplanmış ve kontrol örneklerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık non-parametrik Mann-Whitney U test ile hesaplanmış ve p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Pozitif kontrol ile tinzaparin gruplarından ikişer fare tümör geliştirmemiştir. Geri kalan tümörlerde kontrol grubuna kıyasla azalmış *BAX* ve *CCNB1* gen anlatımı düşük istatistiksel anlamla tespit edilmiştir.

**Sonuçlar:** Bu ön bulgular, apoptozun etkilenmediği, düzeni bozulmuş hücre döngü kontrolünü işaret etmektedir. Daha çok fare ile yapılacak çalışmalar tinzaparin tedavisinin OYHK fare modelindeki anlamlı etkisinin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Oral yassı hücreli karsinom, çıplak fare, kRT-PZR, *BAX*, *CCNB1*

## Abstract

**Introduction:** This study aims to evaluate the effect of tinzaparin treatment on the expression of proapoptotic *BAX* and cell cycle G2/M phase regulator *CCNB1* genes in an oral squamous cell carcinoma (OSCC) nude mice model.

**Materials and Methods:** Total of 11 nude mice at 4–6 weeks of age, composed of three groups [tinzaparin treated (n=4), positive control (n=4), negative control (n=3)], were used to create an orthotopic OSCC mice model. Human tongue cancer cell line OSC-19 was utilized to create this *in vivo* model. After 21 days, the mice were sacrificed and tumors were quantified for *BAX* and *CCNB1* expression utilizing quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Livak method normalized for control samples revealed fold-changes utilizing *ACTB housekeeping* gene. Statistical significance was tested by non-parametric Mann-Whitney U test, where  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results:** Two mice in positive control and tinzaparin groups did not develop tumors. Available tumors showed decreased *BAX* and *CCNB1* expressions with low statistical significance, when compared to the control group.

**Conclusion:** These preliminary results indicate a deregulated cell cycle control without an effect on apoptosis. More mice should be included to significantly state the effect of tinzaparin treatment in OSCC mice model.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, nude mice, qRT-PCR, *BAX*, *CCNB1*

<sup>1</sup>Istanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul Aydın University, Faculty of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Istanbul, Turkey

## Correspondence:

Feyza TUNCER, Istanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics, Istanbul, Turkey

E-mail: ftuncer@istanbul.edu.tr

Received: Nov 21, 2018

Accepted: Dec 11, 2018

<https://doi.org/10.25002/tji.2018.977>

©2018 Turkish Journal of Immunology. All rights reserved.

## Giriş

Oral kanserler dünya genelinde meydana gelen kanserler arasında altıncı sırada yer almakta olup, oral yassı hücreli karsinomlar (OYHK) tüm oral kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır.<sup>[1]</sup> Bununla birlikte, her yıl yeni 300,000 vakanın teşhis edildiği ve bunların 145,000'inin ölüm ile sonuçlandığı bilinmektedir.<sup>[2–4]</sup> OYHK'ların tedavisi evrelerine göre; cerrahi müdahale, radyoterapi/kemoterapi ya da bunların kombine uygulamaları olacak şekilde farklı stratejiler

içermektedir.<sup>[5]</sup> Ancak, oral onkogenezlere ilişkin hücre biyolojisinin irdelenmesi yetersiz kalmış ve kemoterapiye karşı ilaç direncinin gelişmesi hala en büyük problem olarak karşımıza çıkmaktadır.<sup>[6]</sup> Bu nedenle, OYHK'lerin tedavisi için yeni ilaçların denemesi ve bunların moleküler etkilerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır.<sup>[7]</sup>

Bu bağlamda, kanser hastalarında ikinci sık ölüm nedeni olan venöz tromboembolizmin tedavisinde kullanılan düşük moleküler ağırlıklı heparin (DMAH) tinzaparinin, aynı zamanda lokal tümör büyümesi ile metastazı engellediği ve kemoterapotiklere yanıtı cevabı arttırdığı gösterilmiştir.<sup>[8,9]</sup> Tinzaparinin anti-tümör etkisi belirli kanser ve hücre tiplerine özgü çalışmalarca vurgulanmış olsa da, oral kanserlerde antikoagülan özelliği dışında bir etkisi henüz bildirilmemiştir. Bu nedenle, çalışmamız kapsamında hedefimiz tinzaparinin OYHK oluşumundaki etkisinin moleküler açıdan irdelenmesidir. Bu kapsamda, OYHK çıplak (*nude*) fare modeli oluşturularak, tinzaparin uygulanmış ve proapoptotik *BAX* ile hücre döngüsü G2/M geçişinde rolü olan *CCNB1* genlerinin anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.<sup>[10]</sup>

## Gereç ve Yöntemler

### Ortotopik OYHK fare modeli oluşturulması

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında hayvanlar üzerine uygulanan tüm deneysel yaklaşımlarda “*Principles of Laboratory Animal Care*” (NIH publication No. 86-23, revised 1985)” takip edilmiş olup, çalışma için etik kurul izni Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 22.02.2018 tarihli toplantısında, 12.01.2018 tarih ve kodlu proje kapsamında alındı. Literatürdeki çalışmalara paralel olarak, OYKH ortotopik fare modeli oluşturmak için 4-6 haftalık erkek çıplak farelerin dillerine, insan kaynaklı dil kanseri hücre hattı OSC-19 (*JCRB0198*, *JCRB hücre bankası*, *Japonya*) üreticinin talimatlarına uygun şekilde çoğaltılarak  $1 \times 10^6$  hücre/fare olacak şekilde enjekte edildi.<sup>[11]</sup> Toplamda 11 çıplak fare üç gruba ayrıldı:

- Tinzaparin uygulanacak (n=4)
- Pozitif kontrol (n=4)
- Negatif kontrol (n=3)

Bunlardan yalnızca C grubuna OSC-19 hücresi barındırmayan kültür medyumunu verildi ve OYHK ortotopik model oluşumunun negatif kontrolü olarak kullanıldı. Literatür bulgularına benzer şekilde, A ve B

grubundaki farelerde modelleme gerçekleştirildikten sonra sırasıyla tinzaparin (*Innohep*) ve salin 5 mg/kg olacak şekilde günde bir defa subkutan olarak enjekte edildi.<sup>[12]</sup> Tüm fareler 21 günün sonunda sakrifiye edilerek dilde oluşan tümör dokuları kesilip genetik inceleme için toplanmıştır.

### Moleküler analizler

Dil tümör dokularından RNA eldesi RNeasy Plus Mini Kit (*Qiagen, Inc., Hilden, Almanya*) kullanılarak elde edilmiş. İzole edilen RNA konsantrasyonu ve kalitesi sırasıyla, spektrofotometre (*NanoDrop ND-1000*) ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile teyid edildi. RNA'dan ters transkriptaz yöntemi ile cDNA sentezi, SensiFAST cDNA Synthesis Kit (*Bioline Inc., Almanya*) protokolüne göre gerçekleştirildi ve kalite tayini *housekeeping* gen *ACTB*'nin amplifikasyonu ile yapıldı. *ACTB*, *BAX* ve *CCNB1* gen anlatım düzeylerinin tespiti için genlere özgü primerler internet-tabanlı NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı ile tasarlandı. SensiFAST SYBR No-ROX Kiti (*Bioline Inc., Almanya*) ile kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (kRT-PZR) gerçekleştirildi. Her kRT-PZR sonrası erime eğrisi analizi ile spesifik gen amplifikasyonu kontrol edildi. kRT-PZR etkinliği, 1:1, 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranında sulandırıldı cDNA örneklerinin tüm genlerdeki amplifikasyon eğrilerinin eğimlerinin hesaplanmasıyla tespit edildi.<sup>[13]</sup>

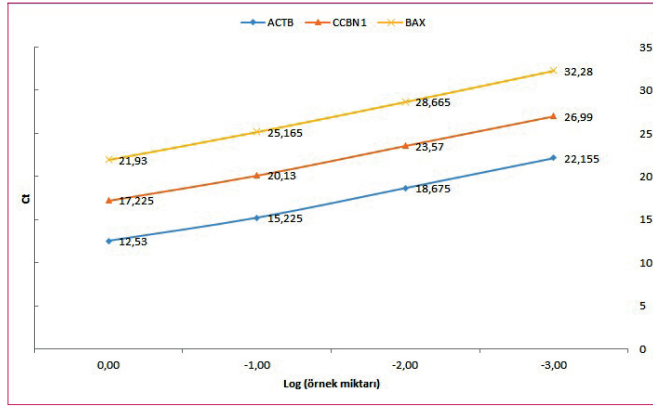
### İstatistiksel analizler

Gen anlatım düzeyleri Livak metodu ile PZR etkinliğini birleştiren matematiksel yöntem ile hesaplandı.<sup>[14]</sup> Bu yöntem ile tinzaparin tedavisi altındaki tümörlerde gen anlatım düzeyleri pozitif kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Her bir örnekte genler 3 deneysel replika halinde çalışılmış ve ortalama Ct değerleri hesaplamaya dahil edildi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için non-parametrik Mann-Whitney U testi SPSS programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve p değerinin 0.05'in altında olması istatistiksel anlamlılık olarak addedilmiştir.

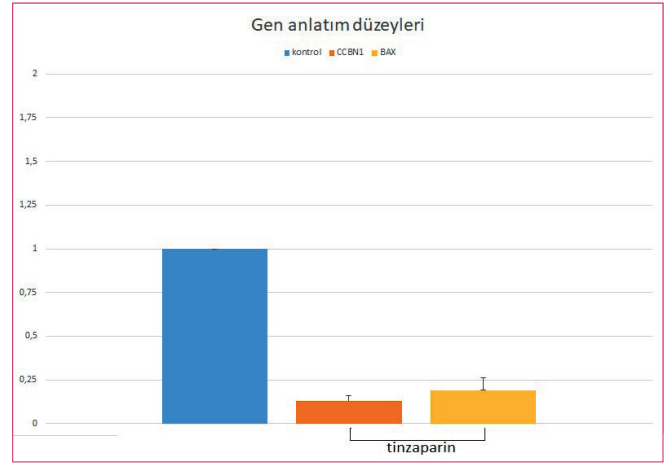
## Bulgular

### Ortotopik OYHK fare gruplarının oluşturulması

OSC-19 tümör hücre hattı verilen toplamda 8 çıplak farenin [A. tinzaparin (n=4); B. pozitif kontrol (n=4)] her iki gruptan da yalnızca ikişer tanesinde olmak üzere toplam 4 farede tümör gelişimi gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubundaki 3 farede ise tümör gelişimi gerçekleşmemiştir.



**Şekil 1.** kRT-PZR etkinliği: *ACTB*, *CCNB1* ve *BAX* genlerinin Ct değerlerinin, örnek dilüsyonlarının logaritmik değerlerine karşı çizilen grafik ile kRT-PZR etkinlikleri gösterilmektedir. Genler arası eğimlerin birbirine paralel olması, bu genlerin benzer PZR etkinliklerine sahip olduğunu göstermekte ve bu nedenle karşılaştırılabilir olduklarını belirtmektedir.



**Şekil 2.** Gen anlatım düzeyleri: *CCNB1* ve *BAX* genlerinin tinzaparin uygulanmış tümörlerde pozitif kontrol örneklerine kıyasla azalmış anlatım düzeylerine sahip olduğu gösterilmektedir. Hesaplamalar kontrol örneklerine normalize edilerek yapıldı.

**Tablo 1.** Tinzaparin tedavisi alan tümörlerde gen anlatım düzeyleri

|                       | Kontrol | Tinzaparin |       |
|-----------------------|---------|------------|-------|
|                       |         | CCNB1      | BAX   |
| Gen anlatım düzeyleri | 1       | 0,130      | 0,192 |
| Standart sapma        | -       | 0,030      | 0,068 |
| P değeri              | -       | 0,06       | 0,06  |

### Gen anlatım düzeylerinin tespiti

Tümör oluşan 4 çıplak farede [A. tinzaparin (n=2); B. pozitif kontrol (n=2)] moleküler çalışmalar gerçekleştirildi. *ACTB*, *BAX* ve *CCNB1* genleri için kRT-PZR etkinlikleri Şekil 1'de gösterilmekte olup, eğimleri ve kRT-PZR etkinlikleri sırasıyla-3,23 (%103), 3,46 (%95) ve-3,27 (%102) olarak hesaplandı Bu genlerin anlatım düzeyleri ise kontrol örneklerine normalize edilerek Şekil 2'de gösterilmektedir. Toplamda 21 gün süren tinzaparin tedavisinin *CCNB1* ve *BAX* gen anlatım düzeylerini baskıladı ve bunun istatistiksel anlamlılık sınırında olduğu tespit edildi (Tablo 1).

### Tartışma

Çalışmamızın ana amacı, yerleşmiş venöz tromboembolizm bulunan kanser hastalarında güncel tedavi kılavuzları doğrultusunda uygulanması önerilen tinzaparinin, OYHK'lardaki moleküler etkisinin tespit edilmesidir.<sup>[9]</sup> Bu bağlamda ön fikir oluşturmak amacıyla sırasıyla hücre döngüsü ile apoptotik yolda rolleri olan *CCNB1* ve *BAX* genlerinin anlatım düzeylerinin irdelenmesi seçilmiştir.

Hücre döngüsü, ökaryot hücrelerin büyümesi ve çoğalması için sırasıyla gereken sinyallerin, sikline bağımlı kinazlar (CDK) ile onların kofaktörleri siklinlerin aktivasyonlarıyla gerçekleşmektedir ve bunların bozuluma uğramaları hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyebilmektedir.<sup>[15]</sup> Bu kapsamda, hücre döngüsü bloklayıcılarının kullanımları kanser tedavisi için uygulanabilir bir yöntemdir.<sup>[16,17]</sup> Hücre döngüsünün G2/M faz geçişinde rol oynayan G2/mitotik spesifik cyclin-B1 proteinini sentezleyen *CCNB1* geninin anlatım düzeyinin tinzaparin tedavisi uygulanan farelerdeki azalışı, bu geçiş fazının bozulmasına neden olmuş olabileceğini ve dolayısıyla hücrenin proliferasyon kabiliyetinin azalmasına yol açabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, kesin bir kaniye varmak için protein düzeylerinin tespitine de ihtiyaç duyulmaktadır. Benzer bir çalışmada, *CCNB1* geninin yanında G2/M fazında görev alan *CDC25C*, *CDC2*, *P53* ve fosforilize *CDC2* genlerinin de anlatım düzeyleri tespit edilerek hücre döngüsünün aktive olma durumu açıklanmıştır.<sup>[11]</sup> Gelecek çalışmalarımıza bu genlerin dahil edilmesi, sunduğumuz bu ön bulguları netleştirecek sonuçların çıkartılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Apoptoz, normal hücre gelişiminde, hücre savunması ve onkogenin baskılanmasında çok önemli bir role sahip, yüksek derecede korunmuş programlanmış hücre ölümüdür.<sup>[17,18]</sup> Apoptozun deregüasyonu tüm kanser hücrelerinin ortak bir mekanizması olup, anti-kanser tedavilerinde apoptoz indükleyici ajanlar önemli bir yer tutmaktadır.<sup>[19]</sup> Çalışmamızda proapoptotik *BAX*'ın anlatım düzeyindeki azalma, tümör hücrelerinin apoptoza gitmediğini işaret etmektedir. Ancak apoptoz

oluşumunun tespitinde antiapoptotik *BCL-2* anlatım düzeyinin etkisine de bakmak gerekmektedir. Öyle ki; proapoptotik *BCL-2* ailesi üyelerinden proapoptotik genlerin antiapoptotiklere oranı arttığında, dış mitokondriyel membran üzerinde delikler açılmakta ve apoptotik mitokondriyel proteinlerin kaspazları aktive etmesiyle apoptoz indüklenmektedir.<sup>[20,21]</sup> Bu bağlamda, gelecek çalışmalarımız kapsamında, apoptozun aktive olduğunu göstermek adına *BAX/BCL-2* anlatım düzeylerinin oranlanmasının daha net sonuç çıkartmak açısından destekleyici olacağını düşünmekteyiz.

Literatürde farklı tümör tiplerinde tinzaparin uygulaması ile gerçekleştirilen çalışmalarda, tinzaparinin *in vitro* insan meme kanser hücresinde proliferasyon baskılamasını sağlayamadığı gösterilmiş, B16F10 metastatik modelde ise primer tümör büyümesi üzerinde bir etki göstermediği bildirilmiştir.<sup>[22,23]</sup> Buna karşın, insan meme kanseri fare modelinde, tinzaparinin akciğer kanseri metastazını anlamlı şekilde engellediği raporlanmıştır.<sup>[22]</sup> Tinzaparinin benzer antimetastatik etkisi B16 melanoma hücresi akciğer metastaz fare modeli çalışmasında da gösterilmiştir.<sup>[24]</sup> Bu farklı ve birbiri ile çelişen çalışmalar haricinde, OYHK modelinde tinzaparinin antitümöral etkisi henüz irdelenmemiştir. Bu bağlamda, çalışmamız *in vivo* OYHK modelinde uygulanan tinzaparin etkisinin hücre döngüsü ve apoptozda görevli *CCNB1* ve *BAX* genlerinin anlatımını raporlayan ilk ön çalışma niteliğindedir. Bu genlerde kuvvetli istatistiksel anlamlılık görülemediği olması, tümör modeli oluştururken gerçekleştirilen uygulama hatasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu nedenle iki farede, üçlü replikalarla gerçekleştirilen kRT-PZR sonuçlarında *CCNB1* ve *BAX* anlatım düzeylerindeki istatistiksel anlamlılık sınırında tespit edilen azalmanın, gelecek çalışmalarımızda fare sayısının arttırılmasıyla anlamlı sonuçlar ortaya çıkaracağını düşünmekteyiz. Öte yandan hücre döngüsünde ve apoptozda rol alan ek genlerin ilavesi ve dil tümörlerinde patolojik incelemelerin tamamlanması ile bu ön bulgularımızı aydınlatacak ve tinzaparinin oluşturduğumuz bu OYHK modelindeki etkisini netleştirecek sonuçlara erişeceğimizi düşünmekteyiz.

**Etik Komite Onayı:** Hayvanlar üzerindeki tüm deneysel yaklaşımlarda "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985)" takip edilmiş olup, çalışma için etik kurul izni Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 22.02.2018 tarihli toplantısında, 12.01.2018 tarih ve kodlu proje kapsamında alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız

**Çıkar Çakışması:** Yazarlar çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje numarası TKD-2018-29724) ile İstanbul Aydın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje Numarası 27.06.2018/10) tarafından desteklenmiştir.

**Yazar Katkıları:** F.T.: Çalışmanın tasarımı, Moleküler ve istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi, yayının yazılması, literatür taraması, Y.E.: OYHK fare modelinin oluşturulması, şekillerin çizilmesi, yayının okunup geri bildirim verilmesi, B.A.: OYHK fare modelinin oluşturulması, çalışma fikrinin sahibi, yayının okunup geri bildirim verilmesi

**Ethics Committee Approval:** "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985)" were followed in all experiments on animals. This work was approved by Boğaziçi University Institutional Animal Experiments Local Ethics Committee meeting in 22.02.2018 with project number and code of 12.01.2018.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial Disclosure:** This work was supported by the funds of Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project number TKD-2018-29724) and Istanbul Aydın University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number 27.06.2018/10).

**Author Contributions:** F.T.: Study design, conduction of molecular and statistical analyses, writing the original draft of the manuscript, literature search, Y.E.: Development of OSCC mice model, construction of the figures, reading and commenting on the manuscript, B.A.: Development of OSCC mice model, owner of the study concept, provided critical review of the draft

## Kaynaklar

- Shigeyama H, Wang T, Ichinose M, Ansai T, Lee SW. Identification of volatile metabolites in human saliva from patients with oral squamous cell carcinoma via zeolite-based thin-film microextraction coupled with GC-MS. *J Chromatogr B* 2019;1104:49–58. [CrossRef]
- Nagata M, Kurita H, Uematsu K, Ogawa S, Takahashi K, Hoshina H, Takagi R. Diagnostic value of cyclin-dependent kinase/cyclin-dependent kinase inhibitor expression ratios as biomarkers of locoregional and hematogenous dissemination risks in oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2015;3:1007–13. [CrossRef]
- Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45:722–30. [CrossRef]
- Bouza M, Gonzalez-Soto J, Pereiro R, de Vicente JC, Sanz-Medel A. Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients. *J Breath Res* 2017;11:016015. [CrossRef]
- Nakakaji R, Umemura M, Mitsudo K, Kim JH, Hoshino Y, Sato I, et al. Treatment of oral cancer using magnetized paclitaxel. *Oncotarget* 2018;9:15591–605. [CrossRef]
- Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, Laurenzana I, Perrone D, Tataranni T, et al. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: A metabolic perspective of treatment. *Oncotarget* 2015;6:1217–30. [CrossRef]
- Wang X, Sun C, He S, Guo X, Xu H, Zeng X, et al. Apoptotic effects of diosgeninlactoside on oral squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull* 2014;37:1450–9. [CrossRef]
- Demir AM, Ümit EG. Kanserle ilişkili tromboz. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Özel Dergisi* 2015;8:66–74.
- Dimakakos EP, Vathiotis I, Syrigos K. The Role of Tinzaparin in Oncology. *Clin Appl Thromb Hemost* 2018;24:697–707. [CrossRef]
- Wang H, Zhu L, Feng X, Zhang H, Luo Q, Chen F. Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 2017;815:282–9. [CrossRef]

11. Chung TK, Warram J, Day KE, Hartman Y, Rosenthal EL. Time-dependent pretreatment with bevacuzimab increases tumor specific uptake of cetuximab in preclinical oral cavity cancer studies. *Cancer Biol Ther* 2015;16:790–8. [CrossRef]
12. Sudha T, Yalcin M, Lin HY, Elmetwally AM, Nazeer T, Arumugam T, et al. Suppression of pancreatic cancer by sulfated non-anticoagulant low molecular weight heparin. *Cancer Lett* 2014;350:25–33. [CrossRef]
13. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e45. [CrossRef]
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Nucleic Acids Res* 2001;29:402–8. [CrossRef]
15. Gerard C, Goldbeter A. From quiescence to proliferation: Cdk oscillations drive the mammalian cell cycle. *Front Physiol* 2012;3:413. [CrossRef]
16. Alabsi, AM, Ali R, Ali AM, Al-Dubai S. A, Harun H, Abu Kasim NH, Alsalahi A. Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of gonothalamin in a cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5131–6. [CrossRef]
17. Huang XJ, Ren W, Li J, Chen LY, Mei ZN. Anti-inflammatory and anticancer activities of ethanol extract of pendulous monkshood root in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:3569–73. [CrossRef]
18. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995;147:267–77.
19. Debatin KM. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol Lett* 2000;112-113:41–8. [CrossRef]
20. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322–6. [CrossRef]
21. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001;29:696–702. [CrossRef]
22. Harvey JR, Mellor P, Eldaly H, Lennard TW, Kirby JA, Ali S. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin Cancer Res* 2007;13:1562–70. [CrossRef]
23. Kragh M, Binderup L, Vig Hjarnaa PJ, Bramm E, Johansen KB, Frimundt Petersen C. Non-anti-coagulant heparin inhibits metastasis but not primary tumor growth. *Oncol Rep* 2005;14:99–104.
24. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 2003;1:1972–6. [CrossRef]