

# Pro-inflammatory Cytokine Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) Strengthens the Inhibitory Effect of XAV939 (WNT/ $\beta$ catenin Inhibitor) in Colon Cancer Cell Line CACO2

Razieh Karami\*1, Hedayatollah Shirzad1, Mehdi Qatre Samani1

Cellular and Molecular Research Center, Institute of Basic Health Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received: 2019/05/1

Accept:2019/10/9)

## Abstract

**Background:** The recent studies on BEZ235 (PI3K/AKT inhibitor) and XAV939 (WNT/ $\beta$ catenin inhibitor) have shown promising results in colon cancer treatment. Many studies have suggested the effects of BEZ235 and XAV939 on colon cancer cells in combination with an environmental cytokine, such as IL1- $\beta$ , by analyzing the anti-proliferative effects of tumor cells and cell death. The present study was carried out to comprehend the effect of pro-inflammatory cytokine interleukin1- beta (IL1- $\beta$ ) around the tumor on these two drugs and also the response of colon tumor cells to new therapeutic methods.

**Materials and Methods:** In the current experimental study, cancer cells were treated with IL1- $\beta$ , BEZ235, and XAV939, alone and in combination. The percentage of cell survival was evaluated using MTT method. Flow cytometry was used to detect cell death. All cultures were performed in triplicate. Also, all statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

**Findings:** The results of the present study showed that BEZ235 significantly reduced the proliferation of the large intestine tumor cells, while XAV939 treatment increased the cell death up to 22.5 percent after 72h ( $p < 0.05$ ). The pro-inflammatory IL1- $\beta$  significantly increased the sensitivity of the cancer cells to the XAV939 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that the presence of the pro-inflammatory IL1- $\beta$  improves the inhibitory effect of XAV939 on cancer cells, but it has no significant effect on the inhibitory effect of BEZ235.

**Keywords:** Colon cancer; IL1- $\beta$ ; XAV939; BEZ235

\* Corresponding: M.ghatreh samani  
Email:mahdi.samani.2020@gmail.com

# سایتوکاین پیش التهابی اینترلوکین-۱بتا (IL-1 $\beta$ ) اثر مهارى XAV939 (مهارکننده بتاکاتین) را روی رده سلولی سرطانی کولون CACO2 تقویت می کند

راضیه کرمی<sup>۱</sup>، هدایت الله شیرزاد<sup>۱</sup>، مهدی قطره سامانی<sup>\*۱</sup>

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

## چکیده:

**سابقه و هدف:** مطالعه‌های اخیر روی BEZ235 (مهارکننده مسیر PI3K/AKT) و XAV939 (مهارکننده بتاکاتین)، نتایج امیدبخشی را در درمان سرطان روده بزرگ نشان داده‌اند. مطالعه‌های بسیاری بررسی اثر پاسخ سیتوکین‌های محیطی تومور بر نوع پاسخ سلول‌های سرطانی روده بزرگ به روش‌های درمانی جدید را پیشنهاد می‌دهند. هدف از این تحقیق، بررسی اثر سایتوکاین التهابی محیطی مانند IL-1 $\beta$  اطراف تومور بر کارایی این دو دارو و همچنین بررسی واکنش سلول‌های توموری روده بزرگ به درمان‌های جدید است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های سرطانی با XAV939 و IL-1 $\beta$ ، BEZ235 به صورت تنها و در ترکیب با هم تیمار شدند. درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. از روش فلوسایتومتری برای تشخیص مرگ سلولی استفاده شد. هر گروه سلولی به صورت سه بار تکرار انجام شده است. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از گراف پد پریسم ۶ انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که BEZ235 به طور معناداری تکثیر سلول‌های توموری روده بزرگ را کاهش داد، در حالی که تیمار با XAV939 به مدت ۷۲ ساعت مرگ سلولی را به میزان 22.5 درصد افزایش داد ( $p < 0.05$ ). سیتوکین التهابی IL-1 $\beta$  به طور معناداری حساسیت سلول‌ها را نسبت به XAV939 افزایش داد ( $p < 0.05$ , 31%).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که حضور سایتوکاین پیش التهابی IL-1 $\beta$  اثر مهارى XAV939 روی سلول‌های سرطانی را تقویت می‌کند، در حالی که تاثیری روی افزایش خواص مهارى BEZ235 ندارد.

**واژگان کلیدی:** XAV939، BEZ235، IL-1 $\beta$  و سرطان روده بزرگ

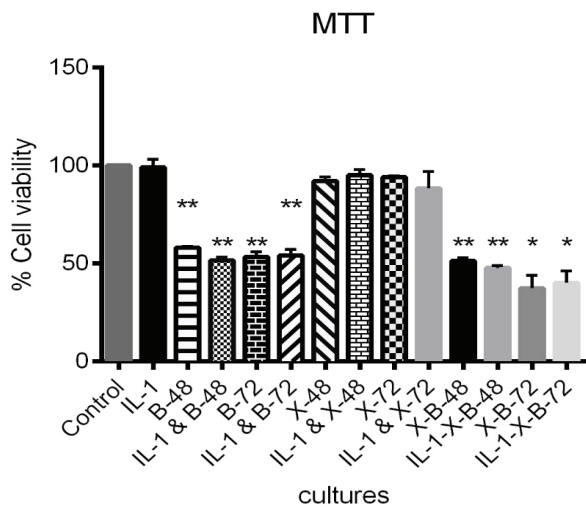
## مقدمه:

به واسطه اینترلوکین-۱بتا بیان مارکرهای مرتبط با بدخیمی‌ها را افزایش می‌دهد (۱،۳،۶). پاسخ محیطی اینترلوکین-۱بتا همچنین قادر است مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی PI3K/Rac و IL1RI/ $\beta$ catenin را فعال کند و منجر به نسخه‌برداری از روی ژن‌های درگیر در پروسه EMT شود (۷). فعال شدن مسیر پیام‌رسانی IL1 $\beta$ / $\beta$ catenin منجر به تجمع بتاکاتین در هسته سلول شده و به دنبال آن منجر به تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی می‌شود (۸). همچنین فعال شدن بیش از حد مسیر پیام‌رسانی بتاکاتین در سرطان روده بزرگ می‌تواند به ایجاد مقاومت دارویی و مقاومت به مهارکننده‌های مسیر PI3K/AKT منجر شود. مسیر PI3K/AKT نه تنها نقش مهمی در تکثیر سلولی و حفظ و بقای سلول‌های بدخیم دارد، بلکه در پیشرفت سرطان روده بزرگ دارای اهمیت ویژه‌ای دارد (۹). از داروهای نوین برای درمان سرطان کولون می‌توان به BEZ235 (مهارکننده

اینترلوکین-۱، سایتوکاین پیش التهابی با چندین اثر بیولوژیک است. خانواده ژن اینترلوکین-۱ روی کروموزوم ۲q۱۳-۱۴ قرار گرفته و سه پروتئین اینترلوکین-۱ الفا، اینترلوکین-۱بتا و رستپور طبیعی اینترلوکین-۱ را کد می‌کند (۱،۲). اینترلوکین-۱بتا به طور عمده توسط منوسیت‌های موجود در جریان خون و ماکروفاژهای قرار گرفته در بافت تولید می‌شود و هر دو التهابات حاد و مزمن را میانجی‌گری می‌کنند. به تازگی این سایتوکاین به دلیل استعداد در تحریک تومورهای محیطی از طریق افزایش در تکثیر سلولی و آنژیوژنز بافتی در شکل‌گیری سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اینترلوکین-۱بتا به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی در ایجاد التهاب و تشکیل تومور روده بزرگ نیز نقش اساسی را ایفا می‌کند. در حقیقت، فنوتیپ Epithelial mesan-chaymal transition (EMT) (فنوتیپی که به پیشبرد تومور منجر می‌شود) القا شده

نویسنده مسئول: مهدی قطره سامانی

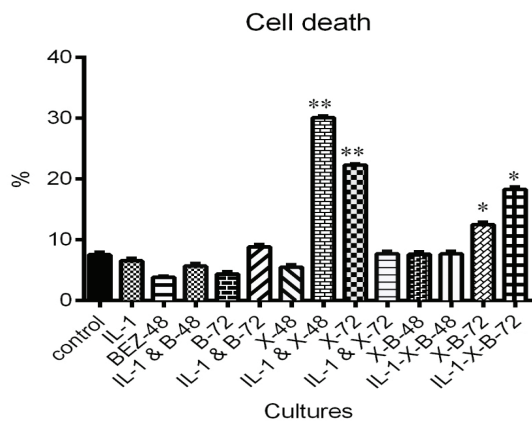
پست الکترونیک: mahdi.samani.2020@gmail.com



نمودار شماره ۱: درصد بقای سلول‌های CACO2. درصد بقای سلول‌های مجاور شده با IL-1β و مجاور نشده با ۲۴۰ و ۲۲۰ نانومولار BEZ235 و ۱۰ هزار نانومولار XAV939 به تنهایی و در ترکیب باهم بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت را به روش MTT نشان می‌دهد. (\*= $P<0.05$ ) و (\*\*= $P<0.01$ ) است. هر آزمایش به صورت مستقل سه بار تکرار شده است (mean  $\pm$  SD).

### اثر اینترلوکین یک بتا بر بقای سلول‌های سرطانی CACO2:

برای بررسی اثر اینترلوکین یک بتا به عنوان یک سایتوکاین محیطی تومور بر بقای سلول‌های سرطانی CACO2، سلول‌ها به مدت ۱۴ روز با این سایتوکاین مجاور شدند، پس از آن سلول‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت با BEZ235 و یا XAV939 تیمار شدند. نتایج نشان داد که IL-1β به تنهایی تغییری در بقای سلولی نمی‌دهد، در حالی که تیمار سلول‌ها با IL-1β و BEZ235 بقای سلولی را پس از مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت به میزان ۵۱ درصد و ۵۴ درصد نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری کاهش داد ( $p<0.01$ ) (نمودار شماره ۱). تیمار سلول‌های مجاور شده با IL-1β با XAV939 تاثیر معناداری روی بقای سلولی نداشت، اما ترکیب دو مهارکننده درصد سلول‌های زنده تیمار شده با IL-1β را پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت به طور معناداری به ترتیب به اندازه ۴۷ درصد و ۴۲ درصد کاهش داد ( $p>0.05$ ) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مرگ سلولی القا شده. نتایج فلوسایتومتری، مرگ سلولی در گروه‌های سلولی مجاور شده با IL-1β و مجاور نشده با (IL-1β, 240h48) و ۲۲۰ (۷۲h) نانومولار BEZ235 و ۱۰ میکرومولار XAV939 به تنهایی و در ترکیب باهم

مسیر PI3K/AKT و XAV939 (مهارکننده بتاکاتینین) اشاره کرد (۹). بنابراین شناسایی اثر سایتوکاین‌های اطراف تومور بر پاسخ‌گویی سلول‌های سرطانی روده بزرگ به درمان با داروهای جدید بسیار حائز اهمیت است. همچنین مکانیسم‌های مولکولی ایجاد مقاومت دارویی به مهارکننده‌های مسیر PI3K/AKT و ارتباط آن با اینترلوکین-۱ بتا و مسیر پیام‌رسانی WNT/β catenin در سرطان روده بزرگ ناشناخته باقی مانده است و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. بنابراین، در این مطالعه اثر ترکیبی مهارکننده‌های مسیر PI3K/AKT و WNT/β catenin در مجاورت اینترلوکین-۱ بتا بر روند درمان سرطان روده بزرگ بررسی شده است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های سرطانی روده بزرگ (CACO2) در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ (Gibco, UK) حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه، CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند. ابتدا سلول‌ها را به دو گروه تقسیم کردیم و یک گروه را بدون تیمار با سایتوکاین و یک گروه را با ۲۰ نانوگرم اینترلوکین-۱ بتا (Ebioscience) (۱۰،۱۱) برای مدت ۱۴ روز کشت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت ۲۴۰ و ۲۲۰ نانومولار BEZ235 (Cayman) و/یا ۱۰ میکرومولار XAV939 (Tocris) (۱۲،۱۳) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند.

میزان بقای سلولی و همچنین میزان IC50 داروی BEZ235 با استفاده از روش MTT (۳-۴،۵-dimethylthiazolium ۲،۵-diphenyl tetrazolium bromide) بررسی شده است. روش MTT بر پایه شکستن آنزیمی نمک تترازولومیوم باشد. واکنش در پلیت سلولی ۹۶ خانه انجام شد. تعداد  $10^3 \times$  سلول در هر چاهک حاوی محیط کشت اضافه شد و سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ۵۰۰-۱۰۰ نانومولار BEZ235 تیمار و انکوبه شدند. نمک MTT با غلظت mg/ml ۲/۵ بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، سپس بعد از سه تا چهار ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، میزان جذب نوری دانه‌های فورمازان حل شده در دی متیل سولفوکساید در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۱۴). هر آزمایش به صورت مستقل سه بار تکرار شده است.

برای بررسی توانایی BEZ235 و XAV939 در القای مرگ سلول‌های سرطانی روده بزرگ، از روش فلوسایتومتری استفاده شد. در این روش از کیت Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) apoptosis kit (BD Biosciences) و از دستگاه فلوسیتومتری (Partec system, Germany) استفاده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، سلول‌های مطالعه شده بعد از تیمار با محلول PBS سرد شست‌وشو داده و جمع‌آوری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر باندینگ بافر با غلظت ۱x با سلول‌ها به تعداد  $10^6 \times$  اضافه شد و سوسپانسیون سلولی مذکور با ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و PI برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محل تاریک انکوبه شدند. در انتها، مرگ سلولی با دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شده است (۱۵). هر آزمایش به صورت مستقل سه بار تکرار شده است.

### یافته‌ها:

#### سایتوتوکسیسیته القا شده به واسطه BEZ235 و XAV939:

میزان IC50 ترکیب BEZ235 به روش MTT بررسی شد. تاثیر BEZ235 به صورت وابسته به دوز و زمان قابل مشاهده بود به طوری که با افزایش زمان و افزایش دوز، مرگ سلولی نیز افزایش یافت. در صورتی که در مورد ترکیب XAV939 تاثیر وابسته به دوز و زمان نبود. میزان IC50 برای ترکیب BEZ235 بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۴۰ و ۲۲۰ نانومولار بود. در درمان ترکیبی BEZ235 با XAV939 به مدت ۴۸ ساعت تغییر چندانی در کاهش بقای سلول‌ها نداشت. در درمان ترکیبی XAV939 به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت با غلظت ۱۰ میکرومولار (۱۲،۱۳)، اثر سایتوتوکسیک معناداری روی سلول‌های CACO2 نداشت. غلظت‌های ۲۴۰ و ۲۲۰ نانومولار از ترکیب BEZ235 به تنهایی اثر مهارکنندگی معناداری روی سلول‌های CACO2 داشت (۵۰- $p<0.01$ ) (نمودار شماره ۱). با این حال، درصد سلول‌های زنده در شرایط ترکیب XAV939 با BEZ235 به مدت ۷۲ ساعت از ۵۲ درصد به ۳۷ درصد، نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد ( $p<0.01$ ) (نمودار شماره ۱).

بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  است. هر نمونه سه بار تکرار شده است (mean  $\pm$  SD).

### القای مرگ سلولی در سلول‌های CACO2:

برای بررسی اثر ضد تکثیری، القای آپوپتوز و مرگ سلولی از کیت Annexin-V/PI apoptosis استفاده شد. نتایج نشان دادند که BEZ۲۳۵ پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت و XAV۹۳۹ پس از ۴۸ ساعت تغییر معناداری را در مرگ سلولی ایجاد نکرد ( $p < 0.05$ ) (نمودار شماره ۲). در حالی که XAV۹۳۹ پس از ۷۲ ساعت به طور معناداری سبب افزایش مرگ سلولی به میزان ۲۲٫۵ درصد ( $p > 0.05$ ) در سلول‌های تیمار نشده با IL-1 $\beta$  شد (نمودار شماره ۲).

### تاثیر اینترلوکین یک بتا روی مرگ سلولی:

سلول‌های تیمار شده با IL-1 $\beta$  پس از مجاورت با میزان غلظت IC50 تعیین شده برای BEZ۲۳۵، در انکوباتور قرار داده شدند و سپس با رنگ‌های Annexin V و PI برای بررسی فلوسایتومتری رنگ‌آمیزی شدند. میزان مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده با IL-1 $\beta$  یا تیمار نشده با این سیتوکین در مجاورت با BEZ۲۳۵ به صورت تکی به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت ( $p > 0.05$ ) (نمودار شماره ۲). همچنین مجاورت سلول‌های تیمار شده IL-1 $\beta$  با XAV۹۳۹ به مدت ۴۸ به میزان ۳۱ درصد افزایش داشت ( $p < 0.01$ ) (نمودار شماره ۲). در شرایط ترکیب دو مهارکننده، مرگ سلولی به مدت ۴۸ ساعت افزایش پیدا کرده بود اما این تغییر معنادار نبود، ولی بعد از ۷۲ ساعت مرگ سلولی هم در سلول‌های از قبل تیمار شده با IL-1 $\beta$  (به میزان ۱۸ درصد) هم در سلول‌های تیمار نشده با IL-1 $\beta$  (به میزان ۱۴ درصد) در حد معناداری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ).

### بحث:

نتایج پژوهش ما نشان داد که BEZ۲۳۵ با یک‌روند وابسته به دوز و زمان باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی CACO2 می‌شود، به طوری که در هر یک از زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت با افزایش غلظت دارو، نسبت سلول‌های زنده کاهش بیشتری داشت. آثار مهارتی این مهارکننده جدید مسیر PI3K/AKT روی چندین رده از سلول‌های سرطانی در بافت‌های مختلف پیشاز این بررسی شده است. در این مطالعه‌ها نیز آثار مهارتی تکثیری این ترکیب‌ها روی سلول‌های سرطانی از جمله سرطان پروستات، معده و ریه دیده شده است (۱۶، ۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ روی سلول‌های سرطان کولورکتال HT۱۱۵ انجام شد، مشاهده شده است که XAV۹۳۹ به کاهش در زیست‌پذیری این سلول‌ها منجر شده است (۱۹). همچنین در مطالعه‌های دیگری نشان داده شده است که این مهارکننده به صورت وابسته به دوز و زمان، قادر به مهار تکثیر و کاهش در زیست‌پذیری سلول‌های OLN-۹۳ سیستم اعصاب مرکزی، SW۱۳ و H۲۹۵R تومورهای آدنوکورتیکال است (۱۳، ۲۰). در پژوهش ما، اثر XAV۹۳۹ بر زیست‌پذیری سلول‌های CACO2 وابسته به دوز و زمان نبود و اثر ضد زیست‌پذیری روی سلول‌های CACO2

نداشت اما پس از ۷۲ ساعت توانست مرگ سلولی را در سطح قابل توجهی افزایش دهد. مطالعه‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که درمان ترکیبی XAV۹۳۹ با Everolimus (مهارکننده mTOR) و Erlotinib (مهارکننده تیروزین کیناز) اثر سائوتوکسیک آن‌ها را افزایش داده و به صورت سینرژیک به افزایش مهار رشد سلول‌ها منجر می‌شود (۲۱). همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شده بود که XAV۹۳۹ به طور ویژه‌ای به افزایش آپوپتوز القا شده توسط 5-fluorouracil منجر شده است (۲۲). در مطالعه ما نیز XAV۹۳۹ مرگ سلولی القا شده را به واسطه BEZ۲۳۵ افزایش داد و در واقع نتایج این طور نشان می‌دهند که XAV۹۳۹ و BEZ۲۳۵ در ترکیب با یکدیگر اثر سائوتوکسیک بیشتری ایجاد می‌کنند. در این مطالعه، IL-1 $\beta$  تأثیری در زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی CACO2 نداشت و در گروه‌های تیمار شده با BEZ۲۳۵ و IL-1 $\beta$  پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش زیست‌پذیری همانند سلول‌های تیمار نشده با IL-1 $\beta$  بود. همچنین ترکیب BEZ۲۳۵ و XAV۹۳۹ همراه با IL-1 $\beta$  به کاهش زیادی در زیست‌پذیری سلول‌ها منجر شد. در مطالعه ما، افزایش مرگ سلولی القا شده در گروه تیمار شده با IL-1 $\beta$  و XAV۹۳۹ پس از گذشت ۴۸ ساعت بسیار قابل توجه بوده که این می‌تواند به دلیل مهار مسیر پیام‌رسانی Wnt/b-catenin توسط XAV۹۳۹ باشد. چراکه مطالعات نشان داده‌اند حضور و سیگنالینگ IL-1 $\beta$  می‌تواند به افزایش فعالیت این مسیر منجر شود (۷، ۹). به تازگی با توجه به مطالعه‌های انجام شده، التهاب سهم مهمی در فیزیوپاتولوژی سرطان دارد و یک ارتباط مولکولی جدید بین التهاب و پیشرفت تومور وجود دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که سائوتوکین پیش التهابی اینترلوکین-۱ بتا تولید شده توسط ماکروفاژهای اطراف تومور از طریق فسفریله و غیر فعال کردن GSK3 $\beta$  به واسطه فعال کردن مسیر PI3K/AKT سبب افزایش بیش از حد فعالیت مسیر Wnt/  $\beta$  catenin و در نهایت به افزایش رشد و تکثیر سلول‌های توموری منجر می‌شود (۲۲، ۲۳). در مطالعه ما تیمار سلول‌ها با NVP-BEZ۲۳۵ و XAV۹۳۹ به صورت ترکیبی به میزان قابل ملاحظه‌ای مرگ سلولی را در سلول‌های مجاور شده با اینترلوکین-۱ بتا افزایش داد که این در واقع به دلیل مهار هر دو مسیر PI3K/AKT و Wnt/  $\beta$  catenin به طور هم‌زمان بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در حضور اینترلوکین-۱ بتا کارایی XAV۹۳۹ به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد، در حالی که اثر NVP-BEZ۲۳۵ به تنهایی در حضور اینترلوکین-۱ بتا نسبت به XAV۹۳۹ از کارایی کمتری برخوردار است و می‌تواند این‌طور نتیجه گرفت که درمان ترکیبی در حضور این سائوتوکین می‌تواند موثرتر واقع شود.

### تشکر و قدردانی:

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد (کد اخلاق IR.SKUMS.REC.۱۳۹۴.۳۰۷) و کد رهگیری ۲۰۸۹) حمایت شد. از کارکنان زحمتکش مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و تمامی کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود.

### منابع:

- Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. De Re V, editor. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63654.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996 Mar 15;87(6):2095-147.
- Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? Immunol Rev. 2008 Apr;222(1):222-41.

- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. Proc Natl Acad Sci. 2003 Mar 4;100(5):2645-50.
- Sanabria-Salas MC, Hernández-Suárez G, Umaña-Pérez A, Rawlik K, Tenesa A, Serrano-López ML, et al. IL1B-CGTC haplotype is associated with colorectal cancer in admixed individuals with increased African ancestry. Sci Rep. 2017;7:41920.
- Mendoza-Rodríguez M, Arévalo Romero H, Fuentes-Panáná EM, Ayala-Sumano J-T, Meza I. IL-1 $\beta$  induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. Cancer Lett. 2017 Apr 1;390:39-44.

7. Perez-Yepe EA, Ayala-Sumuano J-T, Lezama R, Meza I. A novel  $\beta$ -catenin signaling pathway activated by IL-1 $\beta$  leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2014 Nov 1;354(1):164-71.
8. Sun Y, Zhu D, Wang G, Wang D, Zhou H, Liu X, et al. Pro-Inflammatory Cytokine IL-1 $\beta$  Up-Regulates CXC Chemokine Receptor 4 via Notch and ERK Signaling Pathways in Tongue Squamous Cell Carcinoma. Spencer J, editor. *PLoS One.* 2015 Jul 15;10(7):e0132677.
9. Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear  $\beta$ -Catenin depend on active PI3K signaling ABSTRACT : 2014;5(10).
10. Hu M-M, Yang Q, Zhang J, Liu S-M, Zhang Y, Lin H, et al. TRIM38 inhibits TNF- and IL-1-triggered NF- $\kappa$ B activation by mediating lysosome-dependent degradation of TAB2/3. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Jan 28;111(4):1509-14.
11. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol.* 2015 Mar 27;8(2):372-9.
12. Zhu T, Li X, Luo L, Wang X, Li Z, Xie P, et al. Reversion of malignant phenotypes of human glioblastoma cells by  $\beta$ -elemene through  $\beta$ -catenin-mediated regulation of stemness-, differentiation- and epithelial-to-mesenchymal transition-related molecules. *J Transl Med.* 2015 Dec 12;13(1):356.
13. Rubin B, Pezzani R, Cicala MV, Iacobone M, Mantero F. New drugs switching off Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adrenocortical tumor cells. *Endocr Abstr.* 2014 Apr 17;
14. Ghorbani-Anarkooli M, Dabirian S, Moladoust H, Zendedel A, Bahadori MH. Comparison of MTT, trypan blue, and clonogenic assay, to determine the viability in human anaplastic thyroid cancer cell line. *Tehran Univ Med J TUMS Publ.* 2019;77(1):26-32.
15. Studencka M, Schaber J. Senoptosis: Non-lethal DNA cleavage as a route to deep senescence. *Oncotarget.* 2017;8(19):30656-71.
16. Awasthi N, Yen PL, Schwarz MA, Schwarz RE. The efficacy of a novel, dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 to enhance chemotherapy and antiangiogenic response in pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2012 Mar;113(3):784-91.
17. Valentino JD, Li J, Zaytseva YY, Mustain WC, Elliott VA, Kim JT, et al. Cotargeting the PI3K and RAS Pathways for the Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res.* 2014 Mar 1;20(5):1212-22.
18. Zhang C-H, Awasthi N, Schwarz MA, Schwarz RE. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 enhances nab-paclitaxel antitumor response in experimental gastric cancer. *Int J Oncol.* 2013 Nov;43(5):1627-35.
19. Vishnubalaji R, Hamam R, Abdulla M-H, Mohammed MA V, Kassem M, Al-Obeed O, et al. Genome-wide mRNA and miRNA expression profiling reveal multiple regulatory networks in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2015 Jan 22;6(1):e1614-e1614.
20. Chen J, Li J, Miao Z, Xu X, Liu C-F. XAV939, a small molecular inhibitor, provides neuroprotective effects on oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 2014 Oct;92(10):1252-8.
21. Botting GM, Rastogi I, Chhabra G, Nlend M, Puri N. Mechanism of Resistance and Novel Targets Mediating Resistance to EGFR and c-Met Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. Chellappan SP, editor. *PLoS One.* 2015 Aug 24;10(8):e0136155.
22. Wu X, Luo F, Li J, Zhong X, Liu K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *Int J Oncol.* 2016 Apr;48(4):1333-40.
23. Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. The NF- $\kappa$ B/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1 $\beta$ . *Cancer Microenviron.* 2009 Dec 25;2(1):69-80.