

Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α)'nın Hipoksik ve Normoksik Koşullarda Hepatoma Kanser Hücrelerinde (Hep3B) Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Ayla Solmaz AVCIKURT

Hatice YILDIRIM

Feray KÖÇKAR*

Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ABD, BALIKESİR/TURKEY

*Sorumlu Yazar:

E-mail: *fkockar@balikesir.edu.tr

Geliş Tarihi: 10 Aralık 2013

Kabul Tarihi: 31 Aralık 2013

Özet

Bu çalışmada Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α)'nın insan hepatoma hücrelerindeki normal (normoksik) ve düşük oksijen (hipoksik) koşullarında sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Normal oksijenin yanı sıra, kimyasal indüklenmiş hipoksik koşullarda, TNF- α 'nın sitotoksik etkisi 24, 48, 72 saatlerde 50 ve 500 Ü/ml uygulanarak hücrelerde MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilerek yorumlanmıştır. TNF- α 'nın doza ve zamana spesifik sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Normal oksijen koşullarında, Hep3B hücre hattında 48 ve 72 saatlerde kontrol grubuna göre herhangi bir etki görülmezken, 24 saatte 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml dozlarında proliferasyonda artış görülmüştür. Hipoksik koşullarda da 24 saatte normoksik koşullardaki gibi bir etki gözlenirken, 48 saatte 500 Ü/ml TNF- α uygulanmasında da hücre proliferasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. 72 saatte ise 500 Ü/ml TNF- α uygulaması hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalışa sebep olmuştur.

Anahtar Kelime: TNF- α , anti-tümör etki, Hep3B, MTT

Determination of Cytotoxic effects of the Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) under normoxic and hypoxic conditions in Hepatoma (Hep3B) Cells

Abstract

In the present study, the antitumor effects of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) was investigated in human hepatoma cells, Hep3B under normal oxygen and hypoxic conditions. Cytotoxic effect of two different concentrations, namely 50 U/ml and 500 U/ml, of TNF- α was determined at three time points, 24h, 48h and 72h under normal oxygen and chemically induced hypoxic conditions and followed by MTT test. The results were statistically analyzed by one way ANOVA test. The dose and time-dependent antitumor activity of TNF- α was determined in Hep3B cells. In normoxic conditions, 50 U/ml and 500 U/ml of TNF- α on Hep3B cells exhibited the proliferative effect although no effect was detected at 48 h and 72 h compared to control group. In hypoxic condition, similar to proliferative effect in normoxic conditions, 500 U/ml TNF- α caused the same proliferative effects at 24 h and 48 h. In hypoxic condition, 500 U/ml of TNF- α led to statistically significant cytotoxic effect of Hep3B cells at 72h.

Keywords: TNF- α , anti-tumor effect, Hep3B, MTT

GİRİŞ

Tümör Nekroz Faktör, (TNF) ailesi üzerinde en çok çalışılan protein ailelerinden bir tanesidir ve 19 üyeden oluşan bir süper aile olarak isimlendirilir [1]. Bunlardan TNF- α ve TNF- β üzerinde en çok çalışılanlardır. TNF- α , başta makrofaj ve lenfositler olmak üzere çeşitli immün ve somatik hücrelerde sentezlenen, doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu,

farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip, birbirinden farklı tip hücrelerde birden fazla etkisi olan, polipeptid yapıda proinflatuar bir sitokindir [2]. TNF- α 'nın iki formu vardır, membrana bağımlı transmembran ya da pro TNF formu mTNF- α olarak da isimlendirilir, çözülebilir (solubul) formu sTNF- α veya matür (olgun) TNF olarak adlandırılır. TNF- α 'nın aksine TNF- β sadece solubl formda

bulunur ve sTNF- β olarak adlandırılır [3,4]. Hücre membranında sentezlenen TNF- α ilk olarak 26 kDa olarak sentezlenir, uyarılara yanıt olarak 26 kDa mTNF, TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve 17 kDa'luk olgun (matür) sTNF- α oluşur [5,6,7]. Spesifik olarak TNF- α 'nın bazı etkileri ise şöyledir. Ülseratif kolit, krohn hastalığı, diyabet, multipl sklerozis, aterosklerozis ve inme hastalıklarında TNF- α 'nın fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Ayrıca romatoid artrit ve diğer immün sistem hastalıklarında TNF- α 'nın anahtar rol oynadığı belirlenmiştir [8,9,10,11]. TNF- α bu rolleri oynarken IL-1, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerinde salınımına neden olur [12].

Bütün insan hücrelerinin ATP üretimi için, mitokondri oksidatif fosforilasyonu yürütmek için sabit bir O₂ kaynağı gerekmektedir. Hipoksik koşullara yada düşük oksijen koşullara hücreler çeşitli şekillerde cevap verir. Pek çok kanser, tümör içinde hipoksik alanlar içerirler ve düşük oksijen koşullarına sahip (PO₂ < 10 mmHg) primer tümörlerin yüksek düzeyde metastatik potansiyeli ve hasta ölümünde artış riski gösterdiği bilinmektedir. Hipoksik cevaptan sorumlu HIF-1 α transkripsiyon faktörü çoklu adaptif cevapların regülasyonunu sağlar, bunlar için de hücre çoğalması, metabolizması ve anjiyogenezis cevap bulunmaktadır [13]. Karaciğer karsinomunda HIF-1 α protein ekspresyonu Zhong ve arkadaşları et al. (1999) tarafından bildirilmiştir [14]. Buna göre, HIF-1 α protein ekspresyonu normal dokuda %7 oranında eksprese olmasına rağmen karaciğer karsinomunda % 67-94 artmıştır [15, 16, 17].

TNF- α 'nın hem protümör hem de antitümör etkilerinin olduğu çalışmalar bulunmaktadır. İlk olarak Karaciğer hepatoma hücre tiplerinden HepG2 hücreleri TNF- α 'ya karşı test edilmiştir. Bu çalışmada, Karaciğer kanser hücrelerinin TNF- α 'nın inhibitör etkisinden etkilenmediği herhangi bir cevap vermediğini gösterilmiştir [18,19]. Diğer hücreler yüksek dozlarda TNF- α 'ya karşı duyarlı oldukları rapor edilmiştir. İnsan endothelial hücrelerinde TNF- α 'nın büyümeyi engelleyici etkisini rapor edilmiştir. Manda ve arkadaşları da fare L929 fibroblastlarında TNF- α 'nın hücre sitotoksitesi oluşturduğu rapor etmiştir [20,21]. Oysa insan fibroblastları TNF- α uygulamasından etkilenmemiştir. Bu sonuçlar bize TNF- α 'nın protümör ve antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. TNF- α 'nın hücre büyümesine olan etkisinin her hücre tipinde ve fizyolojik

durumu da test edilmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla, çalışmamızda hipoksik ve normal oksijen koşullarında, TNF- α 'nın farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında insan hepatoma modeli olan Hep3B hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

İnsan hepatoma hücre hattı (Hep3B), Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi'nden temin edildi. Kullanılan bütün hücre kültürü materyalleri Greiner ya da Gibco 'dan satın alındı. TNF- α Peprtech'den temin edilmiştir. TNF- α Steril distile su içerisinde konsantrasyonu U/MI olacak şekilde hazırlanarak, -20°C'de depolanmıştır.

Hücre Kültürü ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion)

İnsan hepatoma hücre hattı (Hep3B), 15 ml medyumda 75cm² flaklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş FCS (Fetal Calf Serum) içeren DMEM medyumunu içerisinde, 37 °C'de % 5 CO₂ atmosferinde büyütüldü.

Toplam hücre sayısını hesaplamak için Thoma lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 μ l hücre süspanasyonu eşit hacimde, Trypan mavisi (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler TNF- α uygulamasından önce 96 kuyulu kültür kaplarına, her kuyu için 5000 hücre olacak şekilde trypan blue uygulanması ile sayılarak konulmuş ve hücrelerin buldukları yüzeye tutunmaları için 24 saat beklenilmiştir.

Hipoksik Ortam Oluşturulması ve Deneilerin Kurulması

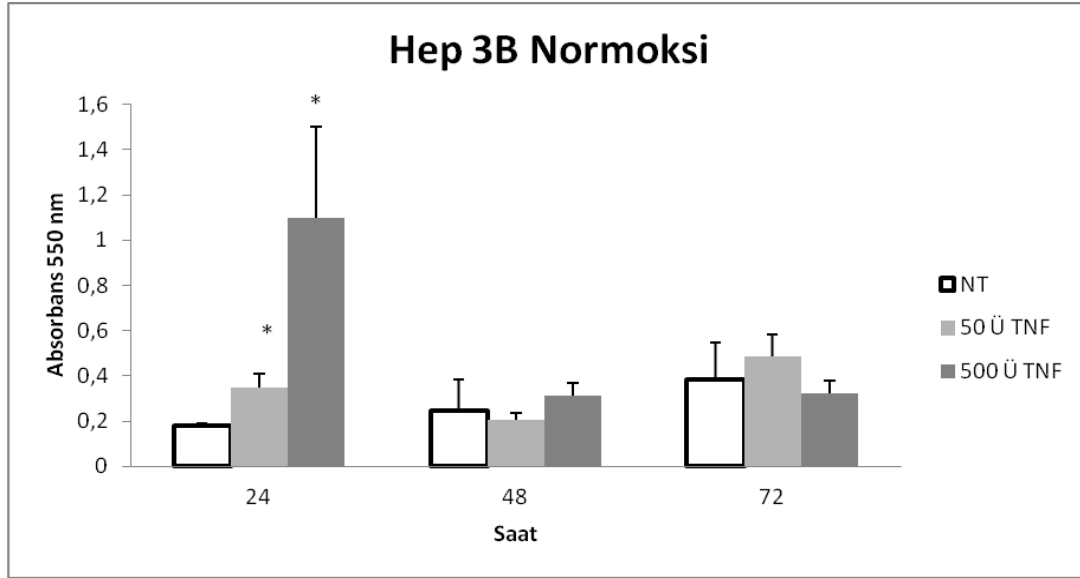
Hep3B hücreleri hücre sayımı yapılarak 96 kuyulu plakalara ekim yapıldı. Bir gece FCS içeren medyumda inkübe edildikten sonra hücre medyumunu % 0,1 BSA içeren medium ile değiştirildi. Hipoksik ortam oluşturulması için hücrelere son konsantrasyon 150 μ M CoCl₂ eklendi. CoCl₂ uygulamasından bir saat sonra sitokin uygulaması yapıldı. 1 saat sonunda hipoksik ve normoksik ortamlarda son konsantrasyon 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml olacak şekilde TNF- α uygulandı. 24, 48 ve 72 saat sonunda MTT testi ile hücre proliferasyonu belirlendi.

MTT Testi

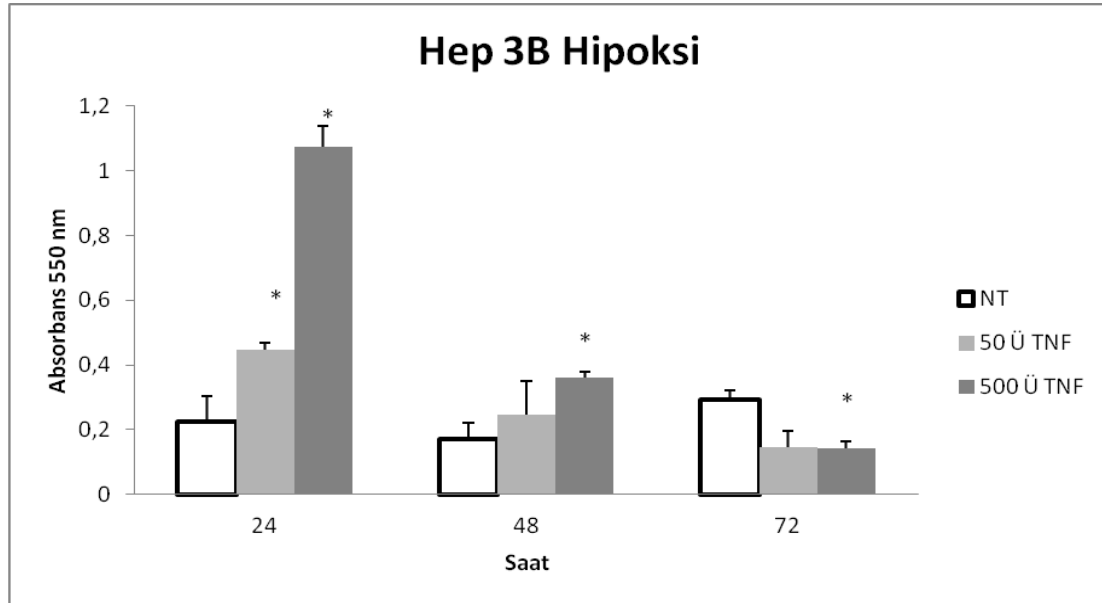
20 µl MTT solüsyonu her bir kuyuya uygulanmış ve hücrelerin MTT'yi metabolize etmeleri için 37 °C'de 2 saat beklenmiştir. Medyum uzaklaştırılmıştır. 0,004 M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan formozan kristalleri çözülmesi için 150 rpm'de 10 dak. çalkalanmıştır. Hücrelerin 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Minitab 15 Program kullanıldı. Önemli olan değerleri ONE WAY ANOVA kullanılarak test edilmiştir. İstatistiksel olarak $p \leq 0,05$ ise anlamlı kabul edildi.



Şekil 1. 24,48,72 saat 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, TNF- α uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3 B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistiksel analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.



Şekil 2. 24, 48 ve 72 saat 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, TNF- α uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistiksel analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

TNF- α sitokininin Hep3B hücrelerinde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında antitümör etkisinin belirlenmesi amacıyla, MTT testi kullanıldı. Hep3B hücrelerine normal oksijen koşulları ve kimyasal olarak hipoksi oluşturan CoCl₂ uygulanmıştır. CoCl₂ ile indüklenmiş hipoksiya pek çok araştırmacı olarak başarılı bir model olarak kullanılmıştır [xxii]. CoCl₂, hipoksik koşullardan sorumlu Hif-1 α 'nın normal oksijen koşullarında degradasyonuna neden Prolin Hidroksilazların spesifik inhibitörü olarak hareket etmektedir. Bu uygulamadan 24 saat sonra normal olarak belirli sayıda farklı miktarda TNF- α ile (50 Ü/ml ve 500 Ü/ml) farklı zaman aralıklarında (24 saat, 48 saat ve 72 saat) inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin canlılık oranlarının belirlenmesi amacıyla MTT yapıldı. Deneyler birbirinden bağımsız 2 deney, kendi içinde 3 tekrarlı olarak dizayn edildi. Alınan absorbans sonuçlarına göre istatistiki analiz yapıldı. Şekil 1 'de normoksik koşullarda Hep3B hücre hattında 48 ve 72 saatlerde kontrol grubuna göre herhangi bir etki görülmezken, 24 saatte 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml dozlarda proliferasyonda artış görülmüştür. Şekil 2'de hipoksik koşullarda da 24 saatte normoksik koşullardaki gibi bir etki gözlenirken, 48saatte 500 Ü/ml TNF- α uygulanmasında da hücre proliferasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. 72 saatte ise 500 Ü/ml TNF- α uygulaması hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalışa sebep olmuştur.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Canlılarda bulunan seçici bazı moleküller bunlar sitokinler/faktörler/moleküller olabilir doğal olarak kanser hücrelerini öldürebilirler ve kanser oluşmasını engelleyici potansiyele sahiptirler [xxiii, xxiv]. TNF- α kanserde iki zıt etki göstermektedir. TNF- α tümör mikroçevresinde endojen tümör arttırıcı etki gösterir çünkü TNF- α kanser hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını, invazyon, metastas ve tümör anjiogenezini uyarır [xxv]. Hepatoselüler (HCC) kanser dünyada en yaygın 10 kanserden birisidir. Geçmişteki çalışmalar göstermiştir ki, TNF- α preneoplastik fazdan önce oval hücre proliferasyonunu sağlayarak karaciğer kanserinin gelişimine katkıda bulunur [xxvi]. Bu yüzden TNF- α ve hepatoselüler kanser arasındaki ilişkinin aydınlatılması önemlidir.

Hem protümör ve hem de antitümör rolü olduğu bilinen TNF- α 'nın Hep3B karaciğer hücrelerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmamız sonucunda özellikle, 24 saatte hem hipoksik hem de normoksik ortamda sitokinin sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Normal oksijen koşullarında 48 ve 72 saatte sitokinin proliferatif etkisi ortadan kalmış, ancak hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisi görülmemiştir. Hipoksiyada ise 48 saatte proliferatif etki devam etmesine rağmen yalnızca 500 U/ml TNF- α uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 72 saatte ise sitokinin bu etkisi tamamen kaybolmuş ve sitotoksik etki göstererek hücrelerin ölümüne sebep olmuştur. Genel olarak kanserli hücrelerin yıkımında görev aldığı bilinen TNF- α , insan karaciğer hücrelerindeki (Hep3B) iki yönlü (protümör ve antitümör) etkisinin gösterildiği çalışmamız, TNF- α farklı hücrelerde, farklı doz ve zaman aralıklarında etkilerinin farklı olabileceğini göstermektedir. Hücre proliferasyonundaki artışın sebebinin, sitokinin protümör özelliği nedeniyle meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. TNF- α 'nın isimlendirilmesi, hücre ölümünü yapmasından kaynaklanmasına rağmen, TNF- α 'nın protümör özelliği, transkripsiyon faktörü NF- κ B'yı aktive ederek gösterilmiştir [xxvii]. Birçok normal hücre NF- κ B transaktivasyona bağlı olarak TNF- α tarafından öldürülmemektedir. NF- κ B inhibe olduğu zaman TNF- α bağlı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Öte yandan TNF- α , NF- κ B'yı aktivasyonunda sırasıyla, I κ B kinaz kompleksi fosforilasyonuna ve sonuç olarak I κ B α 'nın degradasyonuna neden olur ve NF- κ B serbest bırakır ve NF- κ B aktive olur. Mdr2 (p-glyco-protein 2)-eksik farelerde, TNF- α NF- κ B'yı aktive ederek HCC oluşumunu başlattığı görülmüştür [xxviii]. Ayrıca, Kou ve arkadaşları, TNF- α cevabın serum varlığı ve yokluğunun bile değiştiğini, TNF- α , yüksek dozlarda serum açlığı indüklenmiş apoptozu arttırdığı fakat düşük dozlarda, apoptozu yavaşlattığını bulmuşlardır [xxix]. Bizim çalışmamız, TNF- α 'nın özellikle hipoksik koşullarda hücre proliferasyonunu normal oksijen koşullarına göre daha fazla arttırdığını göstermektedir. Hipoksik koşullar hücre proliferasyonunu tetikleyen tümör saldırganlığını ve hasta yaşam süresini kısaltması açısından önemli olduğu düşünüldüğünde, TNF- α 'nın proliferatif etkisinin artması sürpriz değildir.

KAYNAKLAR

- [1] Gaur U, Aggarwal B.B. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 66: 1403–1408
- [2] Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M. 2008. Mechanisms for Cytotoxic Effects of Anti-Tumor Necrosis Factor Agents on Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Expressing Cells Comparison Among Infliximab, Etanercept, and Adalimumab. *Arthritis & Rheumatism*. 58:1248–1257
- [3] Horiuchi T, Mitoma Shin-ichi Harashima H, Tsukamoto and Terufumi Shimoda H. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 49:1215–1228
- [4] Pócsik E, Duda E, Wallach D. 1995. Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *J Inflamm*. 45(3):152-60.
- [5] DasGupta S, R. Murumkar, Pajani Giridhar R, Ram Yadav M. 2009. Current perspective of TACE inhibitors: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 :444–459
- [6] Rana K.V. 2010. Tumor necrosis factor- α converting enzyme: Implications for ocular inflammatory diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42, 7,1076–1079
- [7] Horiuchi K. 2013. A Brief History of Tumor Necrosis Factor α – converting Enzyme: An Overview of Ectodomain Shedding. *The Keio Journal of Medicine*. 62 (1): 29–36
- [8] Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL. 2010. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 45:266–276.
- [9] Vendrell J, Chacón MR. 2013. TWEAK: a new player in obesity and diabetes. *Front. Immunol.*, 30;4:488.
- [10] Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. 2012. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 32, 1677–1698.
- [11] Tolide-ie H, Tabatabaee H R, Kamali-Sarvestani E. 2014. Association between Tumor Necrosis Factor- α -308 G/A Polymorphism and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 39(1): 2–10
- [12] Müllberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S. 2000. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *I. Medical Clinic, Section Pathophysiology*. 11;1-27-38
- [13] Gregg L. Semenza. 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.*;123(9):3664–3671.
- [14] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. 1999. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 15;59(22):5830-5.
- [15] .Ding L., Chen X.P. and Wang H.P. 2004. Expression and clinical significance of HIF-1 α protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12, 656-659
- [16] Huang G.W., Yang L.Y. and Lu W.Q. (2005). Expression of hypoxia inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J. Gastroenterol*. 11, 1705-1708
- [17] N.J. Majeesh, S. Amir. 2007 Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis, *Histol Histopathol* 22: 559-572
- [18] Qesaraku B, Dudas J, Rave-Frank M, Friedrich Hess C, Ramadori G, Saile B, Christiansen H. Effect of tumour necrosis factor- α and irradiation alone or in combination on the viability of hepatocellular and biliary adenocarcinoma cell lines in vitro. *Liver International* ISSN 1478-3223
- [19] Chapekar MS, Huggett AC, Thorgeirsson SS. 1989. Growth modulatory effects of a liver-derived growth inhibitor, transforming growth factor beta 1, and recombinant tumor necrosis factor alpha, in normal and neoplastic cells. *Exp. Cell. Res*. 185(1):247-57
- [20] Mauerhoff T, Belfiore A, Pujol-Borrell R, Bottazzo GF. 1994. Growth inhibition of human endothelial cells by human recombinant tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. *Tumori*. 31;80(4):301-5.
- [21] Manda T, Shimomura K, Mukumoto S, Kobayashi K, Mizota T, Hirai O, Matsumoto S, Oku T, Nishigaki F. 1987. Recombinant human tumor necrosis factor- α : evidence of an indirect mode of antitumor activity. *Journal Cancer Res*. Jul 15;47(14):3707-11.
- [xxii] Aydoğan Türkoğlu S, Köçkar F. 2012. Expression Of Gapdh, B-Actin And B-2-Microglobulin Genes Under Chemically Induced

Hypoxic Conditions In Hep3b And Pc3 Cells.
Journal of Applied Biological Sciences. 6 (3): 1-6

[xxiii] Gaur U, B. Aggarwal B. 2003.
Regulation of proliferation, survival and apoptosis
by members of the TNF superfamily .
Biochemical Pharmacology. 66: 1403–1408

[xxiv] Bradley JR. 2008.
TNFmediated inflammatory disease. *Journal
Pathology*. 214 (2): 149-60.

[xxv] Julia B, Cordero, Juan P, Macagno, Rhoda
K, Stefanatos, Karen E, Strathdee, Ross ., Cagan,
Vidal M .2010. Oncogenic Ras Diverts a Host
TNF Tumor Suppressor Activity into Tumor
Promotor *Dev.Cell*. 15;18(6):999-1011

[xxvi] Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T,
Abraham LJ, Yu C, et al: Impaired preneoplastic
changes and liver tumor formation in tumor
necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J
Exp Med* 2000, 192:1809–1818.

[xxvii] Liu Z, Hsu H, Goeddel D V, Karin
M. 1996. Dissection of TNF Receptor 1 Effector
Functions: JNK Activation Is Not Linked to
Apoptosis While NF- κ B Activation Prevents Cell
Death. 87, 565–576

[xxviii] Pikarsky E, Porat RM, Stein I,
Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al: NF- κ B
functions as a tumour promoter in inflammation-
associated cancer. *Nature* 2004, 431:461–466.

[xxix] Kou X, Jing Y, Deng W, Sun K, Han Z,
Ye F, Yu G, Fan Q, Gao L, Zhao Q, Zhao X, Li
R, Wei L, Wu M. Tumor necrosis factor- α
attenuates starvation-induced apoptosis through
upregulation of ferritin heavy chain in
hepatocellular carcinoma cells. *BMC
Cancer* 2013, 13:438.