

بررسی بیان ژن *survivine* در لاین سلولی DU145 سرطان پروستات تیمار شده با قارچ کمبوجا

زهرا نایب شعبانی، سعید ذاکر بستان آباد*، مسعود صالحی پور

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پروستات دومین بدخیمی رایج در مردان است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره کمبوجا بر لاین سلولی DU145 سرطان پروستات و تغییر بیان ژن *Survivine* در سلول‌های سرطانی پرداخته شده است که این ژن یکی از ژن‌های درگیر در مسیر مهار آپوپتوز است.

مواد و روش‌ها: به این منظور عصاره قارچ کمبوجا بر لاین سلولی مذکور اثر داده شد و میزان میرایی سلول با روش MTT و تغییر بیان ژن *Survivine* نیز با استفاده از Real Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: سلول‌های تیمار شده با این عصاره در بررسی MTT کاهش معنادار تعداد سلول پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد و همچنین بر بیان ژن *Survivine* نیز اثر کاهنده داشت که این اثر با افزایش غلظت و زمان بیشتر می‌شد. بیشترین کاهش بیان در غلظت ۷۵٪ از عصاره در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره کمبوجا با تأثیر بر ژن‌ها اصلی مسیر آپوپتوز باعث کاهش میزان تقسیم سلولی می‌کنند و این کاهش باعث عدم توسعه بافت سرطانی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، کمبوجا، DU145

مقدمه

است سرطان پروستات در ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است (۱۵) و هشتمین علت مرگ در اثر سرطان در ایران است (۷). این سرطان در ایران از گذشته تاکنون افزایش چشم‌گیری داشته به طوری که در سال ۱۳۶۵ بر طبق گزارش اداره کل مبارزه با بیماری‌های غیرواگیر مرکز مبارزه با سرطان، جزء سرطان‌های غیرشایع و با ۱/۶٪ کل سرطان‌های کشور در رده ۱۳ بوده است و در سال ۸۴ با شامل شدن ۸/۶ کل سرطان‌های کشور به رده چهارم رسیده است و در حال حاضر در رده سوم سرطان‌های شایع در مردان قرار دارد (۳). این روند رو به افزایش در تمام استان‌های کشور مشاهده می‌شود ولی در برخی از استان‌ها مانند تهران و اصفهان این روند از سرعت بسیار بالاتری نسبت به استان‌های دیگر مانند سیستان و بلوچستان و قم برخوردار است (۸). لذا با توجه به روند افزایشی این سرطان مطالعه در زمینه تشخیص زود هنگام بیماری، استفاده از روش‌های درمانی مؤثر

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌های مردان و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه) در جمعیت مردان است. در ایران شیوع سرطان پروستات در پنج استان ایران، بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰، ۵/۱ در هر صد هزار نفر در سال بیان شده است و این در حالی است که سیستم ثبت سرطان همه موارد را ثبت نکرده و به عبارتی مقادیر گزارش شده از آمارهای واقعی کم‌تر بوده

* نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۹

قارچ به دست می آید دارای دسته ای مواد شیمیایی موسوم به پلی فنول ها است که آنتی اکسیدان هستند یعنی می توانند ریشه های آزاد شیمیایی موجود در سلول ها را که سرطان زا هستند به خود جذب کنند (۲۴) لذا در مطالعه حاضر اثر این عصاره بر لاین سلولی DU145 و بیان *Survivine* در این سلول ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها:

لاین سلولی DU145 از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و قارچ کمبوجا نیز بر اساس پروتوکل ارائه شده توسط Jayabalan و همکارانش تهیه شد (۱۰). جهت انجام MTT ابتدا تعداد مناسبی سلول (بیش تر ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) در هر یک از چاهک ها کشت داده شد و به سلول ها اجازه داده شد که به کف پلیت بچسبند و به حالت پایدار خود در آیند. سپس چاهک های کنترل و آزمایش انتخاب شده و دوزهای ۰.۲۵٪، ۰.۵۰٪، ۰.۷۵٪ از عصاره کمبوجا به چاهک های تست اضافه شد و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تأثیر ماده مورد نظر، انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته شده به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال های فورمازان در آب غیر محلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول در آیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

از طرف دیگر میزان بیان ژن *Survivine* نیز در دوز های ۰.۲۵٪ و ۰.۷۵٪ ارزیابی شد. به این منظور ابتدا با استفاده از کیت تاکارا از سلول ها RNA استخراج گردید و سپس سنتز cDNA انجام شد. کیفیت cDNA با روش اسپکتوفتومتری ارزیابی شد و نمونه های با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه مورد به عنوان نمونه در روش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه Real Time PCR و پرایمرها در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از MTT با استفاده از تست آماری ANOVA و نتایج حاصل از Real Time PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ارزیابی گردید.

بسیار حائز اهمیت است. متأسفانه روش های درمانی مرسوم نظیر هورمون درمانی باعث ابقای سلول های سرطانی غیر وابسته به آندروژن می شود (۴). یکی از مکانیسم های ایجاد کننده تومور برهم خوردن تعادل بین تکثیر و آپوپتوز طبیعی سلولی است. خانواده Bcl-2 و خانواده IAP به عنوان مهم ترین گروه های تنظیمی است (۵). سورویوین یکی از اعضای خانواده IAP ها است که در مهار آپوپتوز و تنظیم تقسیم سلولی نقش دارد (۱). گرچه مکانیسم مهار آپوپتوز توسط این پروتئین هنوز به صورت کامل شناسایی نشده است اما مشاهده شده است که اتصال مستقیم و غیرمستقیم پروتئین سورویوین به افکتور کاسپاز باعث مهار آپوپتوز می شود. برخی از مطالعه ها نشان داده اند که سورویوین به کاسپاز ۹ متصل می شود و فعالیت این کاسپاز را مهار می کند. مکانیسم پیشنهادی در مهار کاسپاز ۹ توسط سورویوین، اتصال پروتئین^۱ HBXIP به کاسپاز ۹ است و تصور می شود که سایر XIAP^۲ هایی که دارای دامین BIR هستند همراه با سورویوین در مهار عملکرد کاسپاز ۹ نقش دارند.

در مکانیسمی پیشنهادی دیگر که سورویوین باعث مهار مسیر داخلی آپوپتوز می شود، سورویوین به پروتئین پرو آپوپتوتیک SMAC/DIABLO^۳ متصل می شود و باعث مهار این مسیر از آپوپتوز می شود (۱۶). این ژن در اکثر بدخیمی های انسان بیان شده اما به ندرت در بافت های نرمال بیان می گردد. بیان سورویوین در سرطان نه تنها باعث مهار آپوپتوز و کاهش مرگ سلولی می شود بلکه باعث مقاومت به شیمی درمانی نیز می شود. از این رو سورویوین یکی از ژن های هدف در درمان سرطان است. این ژن در سلول های بنیادی نیز بیان می شود اما هنوز نقش آن در این سلول ها مشخص نشده است. اما آنچه مسلم است این است که این پروتئین دارای دامنه وسیعی از نقش های متفاوت است (۲). این واقعیت سورویوین را به عنوان مارکر شاخص در درمان هدفمند سرطان مطرح می کند. با این تفکر، جستجو برای عوامل درمانی جدید با خواص ضد بیان ژن سورویوین ممکن است درمان سرطان را با حداقل سمیت در بافت های طبیعی فراهم نماید. یکی از عصاره های طبیعی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است قارچ کمبوجا است. کمبوجا از همزیستی انواعی از مخمرها و باکتری ها است. نوشابه ای که از تخمیر چای توسط

¹ hepatitis B X-interaction protein

² X-linked IAP

^۴ ۰.۲۵٪ عصاره + ۰.۷۵٪ محیط کشت

نتایج

نتایج حاصل از روش MTT در جدول ۳ و شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج مشخص شد که کمترین میزان جذب در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۰.۷۵٪ مشاهده شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نیز نشان داد که تعداد سلول‌ها بعد از ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد اما این کاهش تا ۴۸ ساعت معنادار نبود و کاهش معنادار تعداد سلول از ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره کمبوجا مشاهده شد ($pvalue < 0,05$) (جدول ۳). آزمون TUKEY نیز نشان داد که بین تعداد سلول در غلظت تیماری ۰.۵٪ و ۰.۲۵٪ اختلاف معنادار وجود ندارد اما تعداد سلول‌ها در تیمار ۰.۲۵٪ به صورت معنادار نسبت به کنترل کم‌تر و نسبت به تیمار ۰.۷۵٪ بیش‌تر است و افزایش غلظت داروی تیماری و افزایش غلظت آن می‌تواند باعث افزایش القای مرگ سلولی شود.

نتایج حاصل از Real Time PCR نشان داد که بیان ژن در نمونه‌های تیماری نسبت به نمونه کنترل کاهش داشته است که تغییر زمان و غلظت نیز باعث تغییر بیان ژن می‌شود. کاهش بیان بین ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تفاوت چندانی باهم ندارد اما بعد از ۷۲ ساعت تغییر بیان چشم‌گیر است و بیش‌ترین کاهش بیان در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۰.۷۵٪ از عصاره کمبوجا مشاهده شد (جدول ۴).

بحث

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین علت مرگ و میر در مردان آمریکایی است و شیوع آن رابطه مستقیمی با افزایش سن دارد (۱۵). سرطان پروستات در ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است (۷) عدم تعادی بین تکثیر و آپوپتوز طبیعی سلولی می‌تواند منجر به تکثیر کنترل نشده سلول شده و در نهایت منجر به سرطان شود. چنانچه فعالیت آپوپتوزی کاهش یابد، سلول به سمت سرطانی شدن پیش می‌رود (۷)، لذا پژوهشگران در جهت درمان سرطان و در راستای فعال کردن ساز و کار مرگ برنامه ریزی شده در تلاش هستند.

از طرفی استفاده از درمان‌های جایگزین در طب سنتی از جمله استفاده از گیاهان دارویی در کشورهای مختلف برای درمان بیماری‌های مختلف از گذشته در بین مردم رایج بوده است (۲۳). قارچ *Kombucha* هم‌خانواده انواعی از مخمرها و باکتری‌ها است (۹). محققان بسیاری درباره فواید *Kombucha* به بررسی پرداخته‌اند و فواید بسیاری برای این ترکیب عنوان کرده‌اند که عبارت است از: خاصیت آنتی-

بیوتیکی، ضدسرطانی، بهبود رفلاکس مری به معده، تحریک سیستم ایمنی، افزایش فعالیت و سم‌زدایی و تصفیه خون، کنترل متابولیسم بدن، کلسترول، التیام زخم و ... (۱۸). گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از این قارچ برای از بین بردن سلول‌های سرطانی بسیار مؤثر بوده است (۲۱). مطالعه‌های *in vitro* بر روی لاین‌های سلولی مربوط به سرطان‌های کولون، ریه، ملانوما و سینه و لوکومی انجام شده است و نتایج آن‌ها مکمل یکدیگر بوده‌اند (۶). برخی مطالعه‌ها نیز بر روی حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به سرطان سینه، کولون و ریه انجام شده است و تأیید کننده عملکرد ضدسرطانی این ترکیب بوده است (۱۷). در مطالعه حاضر اثر عصاره کمبوجا بر لاین سلولی DU145 نشان دهنده کاهش معنادار تعداد سلول‌های تیماری نسبت به سلول‌های کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از تیمار بود. *Jaybalan* و همکارانش اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف فراکشن‌های مختلف *Kombucha* را بر روی رده‌های سلولی A549، U2OS و 786-O که به ترتیب رده‌های سلولی سرطان‌های ریه، استخوان و کلیوی هستند مورد بررسی قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد فراکشن‌های مختلف *Kombucha* بر روی این رده‌های سلولی باعث کاهش قدرت تهاجمی سلول‌ها و افزایش میزان مرگ سلول‌ها می‌گردد (۱۱) و در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان دادند که عمل آنتی‌اکسیدانی *Kombucha* وابسته به زمان مواجه است و مصرف بیش از حد آن برای کاهش زمان مواجهه با توجه تجمع ارگانیک اسیدها در آن منجر به آسیب‌های مختلف می‌گردد (۱۲). در مطالعه‌ای مشابه با این مطالعه، میزان زنده بودن، قدرت تهاجمی و بیان بعضی از ژن‌های مربوط به رده سلولی سرطان پروستات بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کاکبوجیا توسط *Srihari* و همکاران مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعه مشابه نتایج این مطالعه بود که نشان داد تیمار با *Kombucha* منجر به کاهش تعداد سلول‌های زنده بعد از تیمار گردید و از طرفی میزان قدرت تهاجمی سلول‌ها بعد از تیمار با *Kombucha* کاهش پیدا کرد. علاوه بر این تیمار با این گیاه دارویی منجر به کاهش بیان ژن‌های MMP و HIF-1 و دیگر ژن‌های کمک‌کننده به متابولیسم سلول سرطانی گردید (۲۰) نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی با استفاده از غلظت‌های مختلف *Kombucha* باعث کاهش بیان ژن *survivin* در گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل بود و بیش‌ترین کاهش بیان ژن در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۰.۷۵٪ از عصاره *Kombucha* مشاهده شد. در مطالعه-

و غیرمستقیم پروتئین *Survivin* به افکتور کاسپاز باعث مهار آپوپتوز می شود (۱۹).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کمبوجا با کاهش بیان ژن *Survivin* باعث افزایش مرگ سلولی در سلول های سرطان پروستات شده است که این اثر می تواند ناشی از کاهش بیان پروتئین *Survivin* و در نتیجه افزایش آپوپتوز در این سلول ها و القای مرگ سلولی در آن ها باشد. بنابراین با تأثیری که از Kombucha بر القای مرگ سلولی در این مطالعه مشاهده شد و هم چنین افزایش بیان ژن *Survivin* در اثر تیمار لاین سلولی سرطان پروستات با عصاره کمبوجا، می توان امیدوار بود که در آینده با مطالعات بیشتر این عصاره را به عنوان یک گیاه دارویی در درمان سرطان و القا مرگ سلولی در سلول های سرطانی مورد استفاده قرار داد.

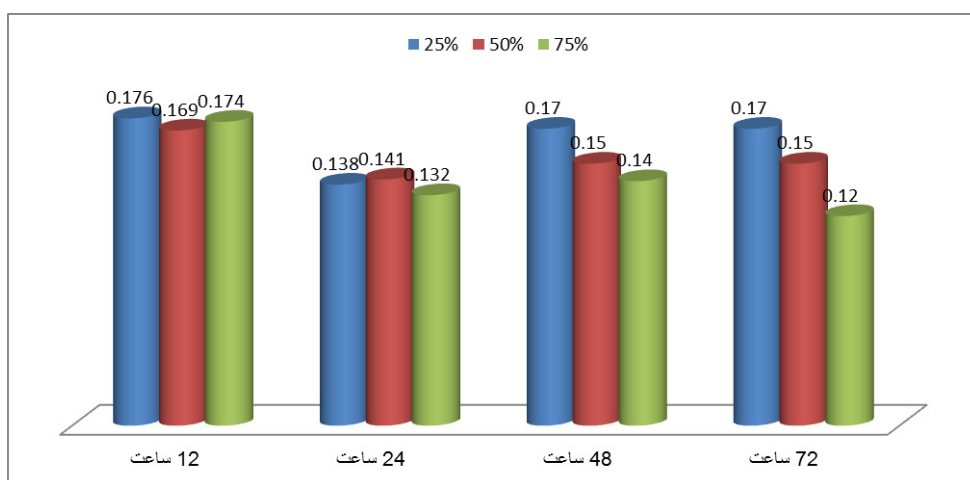
سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

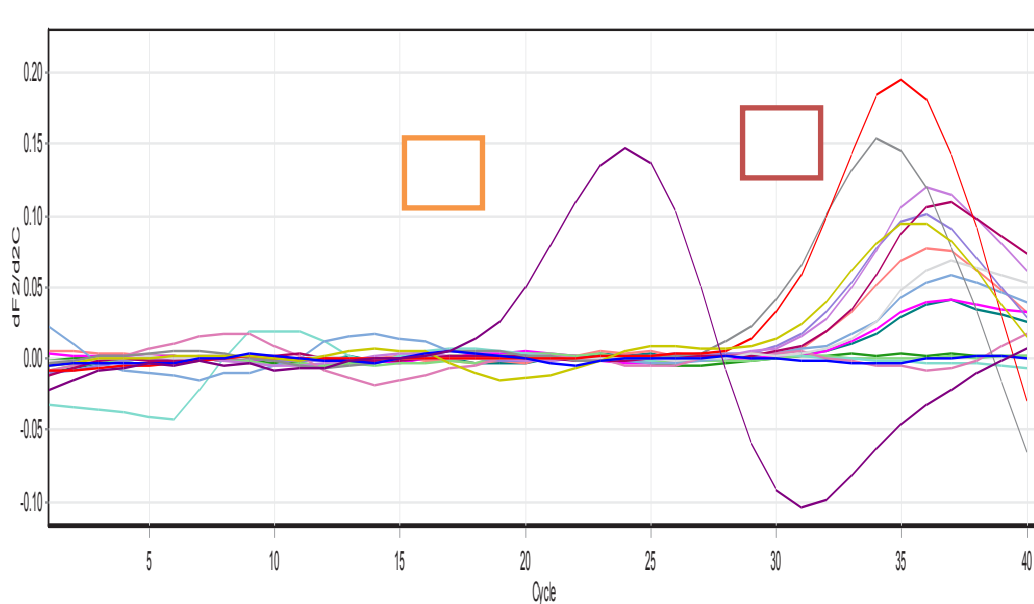
های اخیر گزارش شده است که *survivin* به عنوان یک ژن مؤثر در ایجاد تومور در بسیاری از تومورها افزایش بیان داشته است،

در مطالعه لاریجانی و همکاران ، ارزش بالینی رنگ آمیزی سورواپوین برای تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار تیروئید مورد ارزیابی قرار گرفته است. این مطالعه به روش توصیفی - تحلیلی مقطعی انجام شد. جمعیت آماری نمونه بافت های بیماران جراحی شده به علت آدنوم و کارسینوم فولیکولار در بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بودند که کلیه نمونه ها به روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی سورواپوین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان سورواپوین در بیماران با تشخیص کارسینوم فولیکولار در مقایسه با آدنوم فولیکولار بیش تر بود (۱۴).

در مطالعه ای که توسط Kishi و همکاران انجام شده است، نتایج نشان داد که شدت بیان ژن *Survivin* در سرطان پروستات افزایش یافته و با پیشرفت و هم چنین با قدرت متاستازی و تهاجمی سرطان مرتبط است (۱۳). Chen و همکارانش نیز در مطالعه دیگر نشان دادند که پلی مورفیسم در ژن *Survivin* با افزایش خطر سرطان پروستات مرتبط است (۲۲). افزایش بیان *Survivin* باعث مهار مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز می شود و کاهش بیان این ژن باعث القا مرگ سلولی و کاهش تقسیم های سلولی می شود. با این حال مکانیسم مهار آپوپتوز توسط این پروتئین هنوز به صورت کامل شناسایی نشده است اما مشاهده شده است که اتصال مستقیم



شکل ۱: نتایج حاصل از MTT



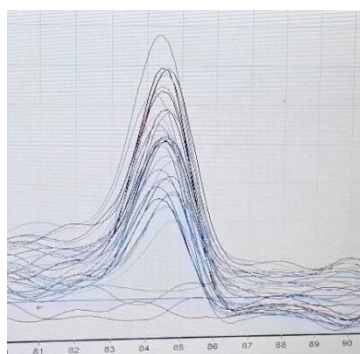
3

شکل ۲- منحنی تکثیر Real Time PCR برای ژن *survivin* و *GAPDH*

۱: بیان ژن *survivin* در لاین سلولی DU-145 تیمار نشده

۲: منحنی تکثیر ژن *survivin* در حالات مختلف تیمار

۳: منحنی تکثیر ژن کنترل داخلی *GAPDH*



شکل ۳- منحنی ذوب

جدول ۱: توالی پرایمرها

پرایمر	توالی پرایمر	طول
Forward-sur	5'- TGAAGTCTGGCGTAAGATG-3'	۱۹۶
Reverse-sur	5'- GGACGACGATGAAAACTG-3'	
Forward-GAPDH	5'-GGTCATCATCTCTGCCCCCT-3'	۲۷۶
Reverse-GAPDH	5'-AGGCAGGGATGATGTTCTGG-3'	

جدول ۲: برنامه زمانی انجام Real Time PCR

تعداد سیکل	زمان انکوباسیون / دمای انکوباسیون	مرحله انجام
۱ سیکل	۹۵ درجه / ۳۰ ثانیه	دنا توریسیون اولیه
۴۰ سیکل	۹۵ درجه / ۵ ثانیه	دنا توریسیون
	۵۶ درجه / ۳۵ ثانیه	اتصال پرایمر و طویل سازی رشته

جدول ۳: نتایج آنالیز آماری ANOVA

12h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.156	.923
Within Groups	.002	8	.000		
24h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	3	.002	1.761	.232
Within Groups	.008	8	.001		
48h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.037	3	.012	20.240	.000
Within Groups	.005	8	.001		
72h	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	3	.003	13.277	.002
Within Groups	.002	8	.000		
Total	.010	11			

جدول ۴: نتایج آنالیز داده های Real Time PCR

	ΔCT_{Target}	$2^{-\Delta ct}$	$2^{-\Delta ct_{target}/2^{-\Delta ct_{control}}}$	Fold change
25%mg/l in 24h	۲/۸	۶/۹۶	۰/۵	کاهش ۲ برابر
25%mg/l in 48h	۰/۲	۱/۱۴	۰/۰۸	کاهش ۱۲,۵ برابر
25%mg/l 72h	۰/۱۸	۱/۱۳	۰/۰۸	کاهش ۱۲,۵ برابر
75%mg/l 24h	-۰/۶	۰/۶۶	۰/۰۴	کاهش ۲۵ برابر
75%mg/l in 48h	-۰/۶	۰/۶۶	۰/۰۴	کاهش ۲۵ برابر
75%mg/l In 72h	-۰/۹	۰/۵۳	۰/۰۳	کاهش ۳۳ برابر
control	-۳/۸	۱۳/۹۲	۱	۱

1. Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Progress in cell cycle research*. 2003;5:447-52.
2. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*. 1997 Aug 1;3(8):917-21.
3. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. *Epidemiology and control of common diseases in Iran*. Tehran: Eshtiagh Publications. 2000:602-16.
4. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nature medicine*. 1999 Mar;5(3):280.
5. Dlamini, Z. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & therapeutics*. 2004, 31;101(1):1-5.
6. Hauser SP. Dr. Sklenar's Kombucha mushroom infusion--a biological cancer therapy. Documentation No. 18. *Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis= Revue suisse de medecine Praxis*. 1990 Feb;79(9):243-6.
7. Hosseini M, Jahani Y, MAHMOUDI M, Eshraghian MR, Yahyapour Y, KESHTKAR AA. The assessment of risk factors for prostate cancer in Mazandaran province, Iran.
8. Hoda S, Aliee A, Shakiba MA, Odi M, Ghasemi Poor M, Poor Rasooli Z. A study of frequency of cancerous organs in Guilan province (1999-2000). *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2003 Jul 15;12(46):84-92.
9. Ichim, G., & Tait, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*. 2016, 16, 539-548.
10. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007 Jan 1;102(1):392-8.
11. Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin.
12. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014 Jul;13(4):538-50.
13. Kishi H, Igawa M, Kikuno N, Yoshino T, Urakami S, Shiina H. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *The Journal of urology*. 2004 May 1;171(5):1855-60.
14. Lariyani, A. Evaluation of the relationship between Survivin expression in adenoma and follicular carcinoma of the thyroid. *J. Sabzevar University of Medical Sciences*, 2005, 14 (1): 32-37.
15. Malekzadeh, R. Incidences of different cancers in Iran. In *The 16th International Congress of Geographic. Medicine Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*. 2003, (pp. 1-4).
16. Marusawa, H., S. i. Matsuzawa, K. Welsh et al. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO journal*, 22 (11), 2729-2740.