View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۷، دوره ۷۶، شماره ۳، صفحه‌های ۱۶۲ تا ۱۶۹
مقاله اصیل

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

تاثیرات ضد تکثیری و پروآپوپتوتیک اسیدگالیک بر سلول‌های آدنوکارسینومای پستان رده SKBR3 در مقابل سلول‌های فیبروبلاست نرمال (HU-02)

رقیه لرکی[۱]
لیلا روحی[۲*]
سید حسین حجازی[۱و۳]

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی. تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۰۰
E-mail: lrouhi59@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۳ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۳/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان ریه می‌باشد. اسید گالیک (Gallic acid, GA)، که یک پلی‌فنل می‌باشد، دارای فعالیت ضد رشد در برابر بسیاری از رده‌های سلول‌های سرطانی است. هدف از مطالعه کنونی، تاثیر اسیدگالیک بر میزان تکثیر و آپوپتوز سلول‌های سرطان پستان رده SKBR3 و سلول‌های فیبروبلاست نرمال بود.

روش بررسی: مطالعه به‌صورت تجربی از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹٤ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. با کشت سلول‌های SKBR3 و فیبروبلاست نرمال در محیط کشت Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA) و تیمار با اسیدگالیک در غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با روش رنگ‌سنجی MTS، میزان توان زیستی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. میزان القای آپوپتوز به روش فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی کیت Annexin V-FITC (BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA) در زمان ٤۸ ساعت انکوباسیون بررسی گردید.

یافته‌ها: با افزایش غلظت اسیدگالیک به‌صورت وابسته به دوز و زمان، توان زیستی سلول‌ها به‌طور معناداری کاهش پیدا کرد (P=۰/۰٤). به‌طوری‌که بیشترین تاثیر اسیدگالیک مربوط به غلظت ۲۰۰ µg/ml و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. القای آپوپتوز نیز وابسته به دوز بود و غلظت ۲۰۰ µg/ml اسیدگالیک بیشترین درصد آپوپتوز را در سلول‌ها SKBR3 نشان داد (P=۰/۰۰۲)، درحالی‌که اسیدگالیک در غلظت‌های مختلف تاثیر معناداری بر سلول‌های فیبروبلاست نرمال نداشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت اسیدگالیک می‌تواند سبب کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطان پستان رده SKBR3 گردد بدون اینکه به سلول‌های فیبروبلاست نرمال آسیبی برساند.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، سرطان پستان، فیبروبلاست نرمال، اسیدگالیک، توان زیستی.

مقدمه

سرطان بیماری است که با تغییر شکل طبیعی سلول به وسیله‌ی جهش ژنی در DNA آغاز می‌گردد.[۱] سه نوع عامل به‌تنهایی و یا به‌طور مشترک خطر ایجاد سرطان را در یک فرد افزایش می‌دهند که این سه عامل عبارتند از نحوه زندگی، محیط و وراثت.[۲] سرطان پستان بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم از بافت پستان منشا گرفته به‌طور نامنظم و فزاینده‌ای تکثیر می‌یابند و بدون اینکه موجب واکنش تدافعی و تهاجمی در سیستم ایمنی بدن شوند از سیستم ایمنی و دفاعی بدن عبور می‌کنند. سرطان پستان بیشتر اوقات به‌صورت یک توده‌ی بدون درد و سفتی در قسمت فوقانی و خارجی پستان شروع می‌شود و به‌طور کلی می‌تواند در هر جایی از پستان از جمله نوک آن ایجاد گردد. سرطان‌های پستان ممکن است به غدد لنفاوی ناحیه گودی زیر بغل و پس از آن در سرتاسر بدن گسترش پیدا کنند.[۳] این سرطان، دومین سرطان شایع و پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان‌ها در کشور است.[۴و۵] بهترین روش برای کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان پستان، درمان زودهنگام آن

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

می‌باشد و درمان زودهنگام مستلزم تشخیص به‌موقع بیمار است. تشخیص زودهنگام نیازمند یک روش تشخیصی دقیق و قابل اطمینان می‌باشد.[۶] مکانیسم آپوپتوز یکی از اصلی‌ترین راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته است که در بدن موجودات پرسلولی و حتی تک‌سلولی انجام می‌شود. شکل‌گیری اندام‌ها و بافت‌های بدن انسان در دوره‌ی جنین و کنترل میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن همگی از نتایج این پدیده‌ی زیستی است. به‌عنوان نمونه، وقوع آپوپتوز در سلول‌های جنین انسان باعث جدا شدن انگشتان دست از هم می‌شود. به‌هم‌خوردن سرعت وقوع این پدیده چه به‌صورت افزایشی و چه کاهشی باعث ایجاد سرطان یا بیماری‌های مانند آلزایمر و پارکینسون می‌شود.[۷] در حال حاضر افزون بر جراحی، داروهای شیمیایی رایج، پیشگیری‌های اولیه توسط مواد شیمیایی مختلف و داروهای گیاهی نیز در کنترل انواع سرطان، روش‌های مناسبی هستند.[۸] تری‌هیدروکسی‌بنزوییک اسید که به اسیدگالیک (GA) معروف است، یک اسید پلی‌فنولی می‌باشد، که به وفور در گیاهان، میوه‌ها و مواد غذایی یافت می‌شود، در گیاهان مختلف مانند بلوط، چای‌سبز و سیاه، سماق، دانه انگور و سیب وجود دارد.[۹-۱۱] GA بخش مهمی از طب سنتی در بعضی کشورها می‌باشد و در صنعت داروسازی نیز کاربرد فراوانی دارد. استر موجود در GA با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب‌های سلولی جلوگیری می‌کند. خواص آنتی‌اکسیدانی آن باعث حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌گردد و با اثر ضدتکثیری خود مانع از سرطانی شدن سلول‌ها می‌شود.[۱۲] فعالیت محافظتی آن در سلول‌های طبیعی آن نیز به خوبی شناخته شده که اسیدگالیک را به‌عنوان یک ترکیب موثر برای درمان سرطان معرفی می‌کند.[۱۳] GA دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدان و اثرات ضد توموری است.[۱۴] هدف مطالعه کنونی بررسی تاثیر اسیدگالیک بر روی میزان تکثیر سلول‌های رده SKBR3 بود.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت تجربی از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. رده سلول‌های سرطان پستان (SKBR3) و فیبروبلاست نرمال (HU-02) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در فلاسک کشت با محیط کشت Dulbecco's modified Eaglea s medium, DMEM (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA) غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum, FBS (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA)) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استروپتومایسین با نسبت ۵٪ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) رشد داده شد. سلول‌ها در معرض ۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۵٪ هوای مرطوب و در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. برای اندازه‌گیری توان زیستی، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهکی در تراکم ۵×۱۰^{۳} سلول/چاهک کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف ۲۰۰، ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰µg/ml (گروه I، گروه II، گروه III، گروه IV، گروه V) اسیدگالیک جایگزین و سلول‌ها برای ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت در شرایط کشت نگهداری شدند. از سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان کنترل استفاده شد. برای هر غلظت از اسیدگالیک پنج تکرار صورت می‌گیرد. پس از گذشت زمان‌های موردنظر، محلول MTS به‌میزان ۲۰ µl به هر چاهک اضافه گردید و به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax-2100 microplate reader, Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA) در طول موج ۴۹۲ nm تعیین شد. در پلیت ۶ خانه‌ای در هر چاهک به‌طور متوسط ۵×۱۰^{۵} سلول مورد تیمار قرار گرفتند. از غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ µg/ml برای ۴۸ ساعت جهت بررسی آپوپتوز استفاده شد. سلول‌ها را پس از شستشو با PBS و آنزیم تریپسین (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA) از پلیت جدا نموده و سانتریفوژ شدند. رنگ‌های Annexin-V متصل به FITC (BD-Pharmingen BD) و Propidium iodide (PI), BD Pharmingen) به‌میزان ۵ µl به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند و آماده شمارش توسط دستگاه Flow cytometry (FACStar Plus@, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) شمارش سلولی در واحد $۱۰^{۴}$ صورت گرفت. رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین‌های موجود در غشای سلول آپوپتوز یافته چسبیده و آن‌ها را نشان‌دار می‌نماید. PI در سلول‌های نکروزشده به DNA هسته متصل شده و تعداد سلول‌های نکروزشده را نشان داد. جهت انجام محاسبات آماری SPSS software, version 14 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) استفاده شد. داده‌ها پس از ورود به رایانه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس

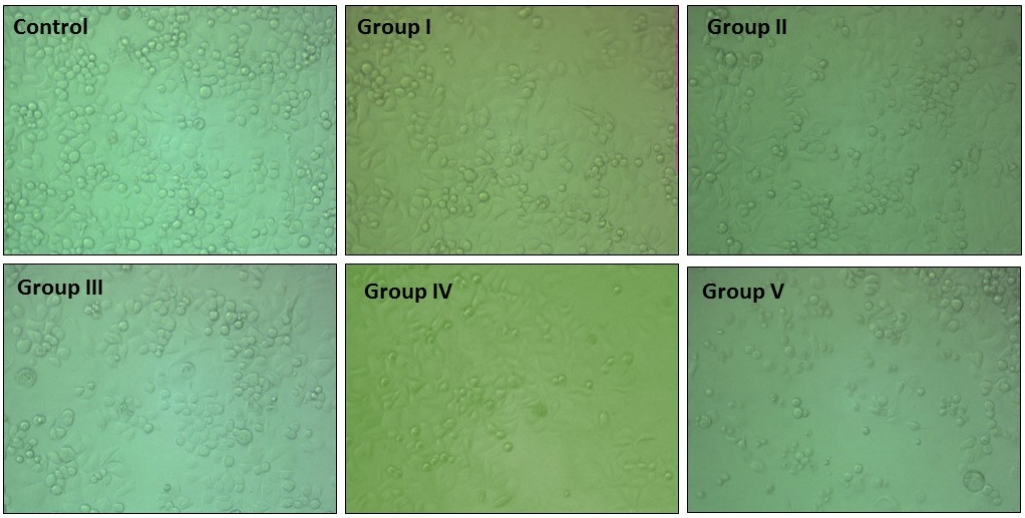
Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey's test) تجزیه و تحلیل شد. اختلاف در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

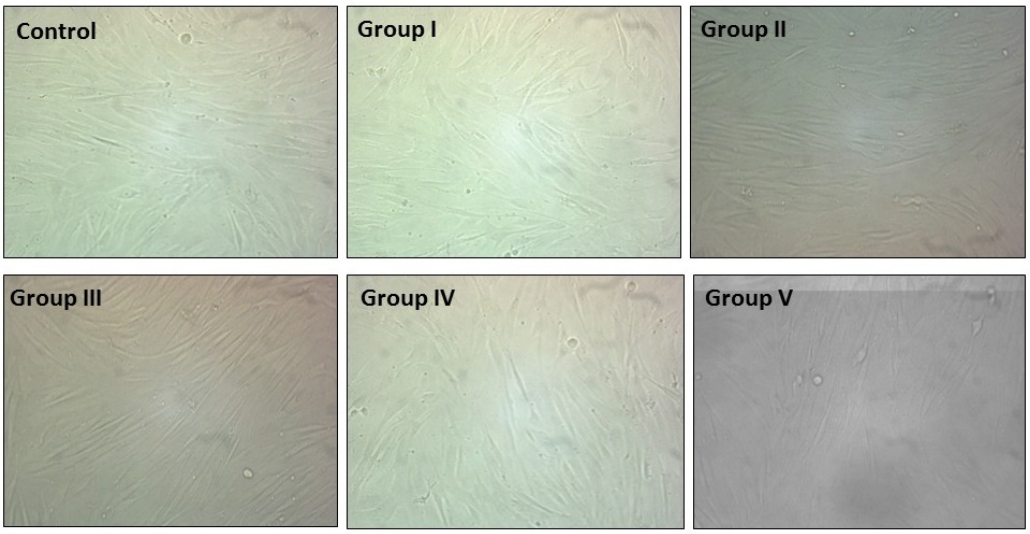
یافته‌ها

سلول‌های رده SKBR3 در غلظت‌های مختلف اسیدگالیک (۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰ µg/ml) در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. مشاهدات میکروسکوپی نشان‌دهنده کاهش تعداد سلول‌های تیمار شده می‌باشد (شکل ۱)، درصورتی‌که سلول‌های HU-02، به استثنای گروه V، تفاوت چشمگیری را نسبت به کنترل نشان ندادند (شکل ۲).

تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدگالیک در رده SKBR3 و HU-02

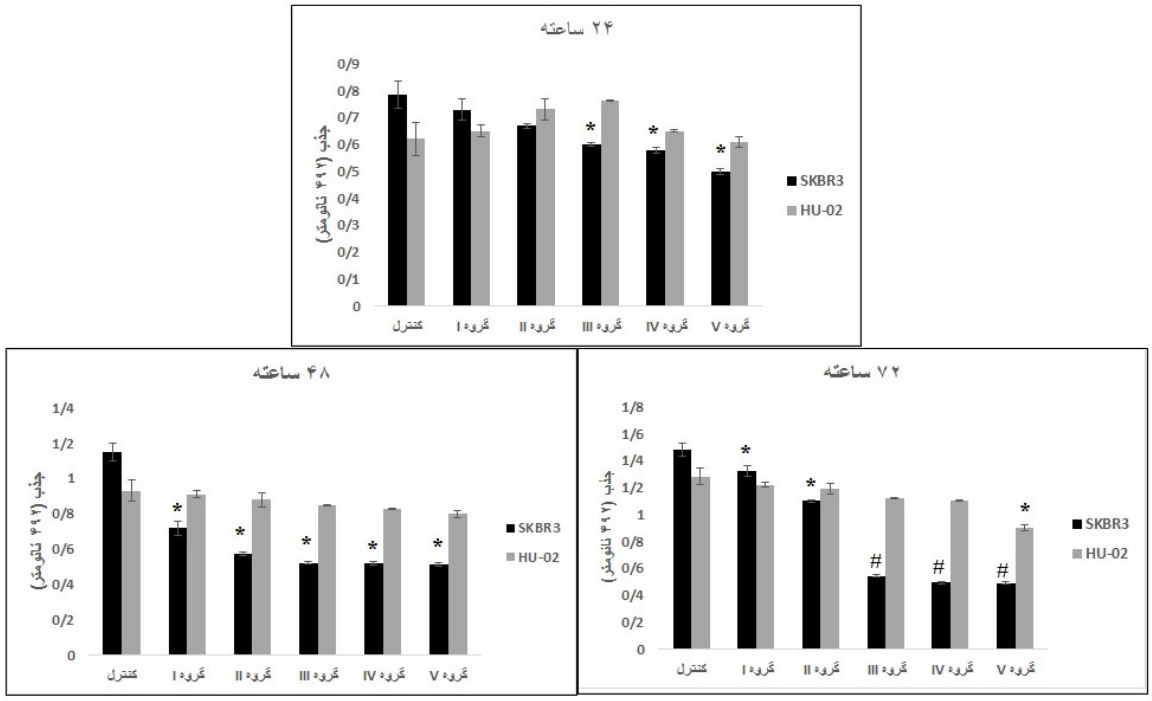


شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدگالیک بر رده سلول‌های SKBR3 در مدت زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون (بزرگ‌نمایی ۱۰×)



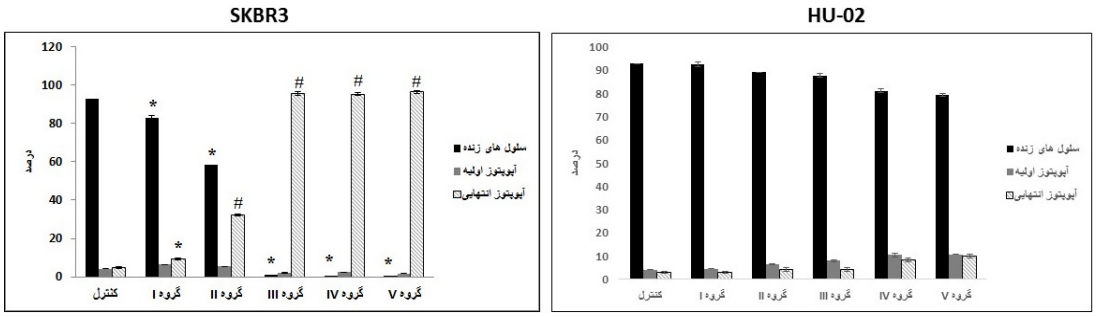
شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدگالیک بر رده سلول‌های HU-02 در مدت زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون (بزرگ‌نمایی ۲۰×)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018



شکل ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدگالیک بر توان زیستی رده‌های SKBR3 و HU-02 در زمان‌های انکوباسیون ۲٤، ٤٨ و ۷۲ توسط تست MTS

* P<۰/۰۵ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل، # P<۰/۰۱ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل

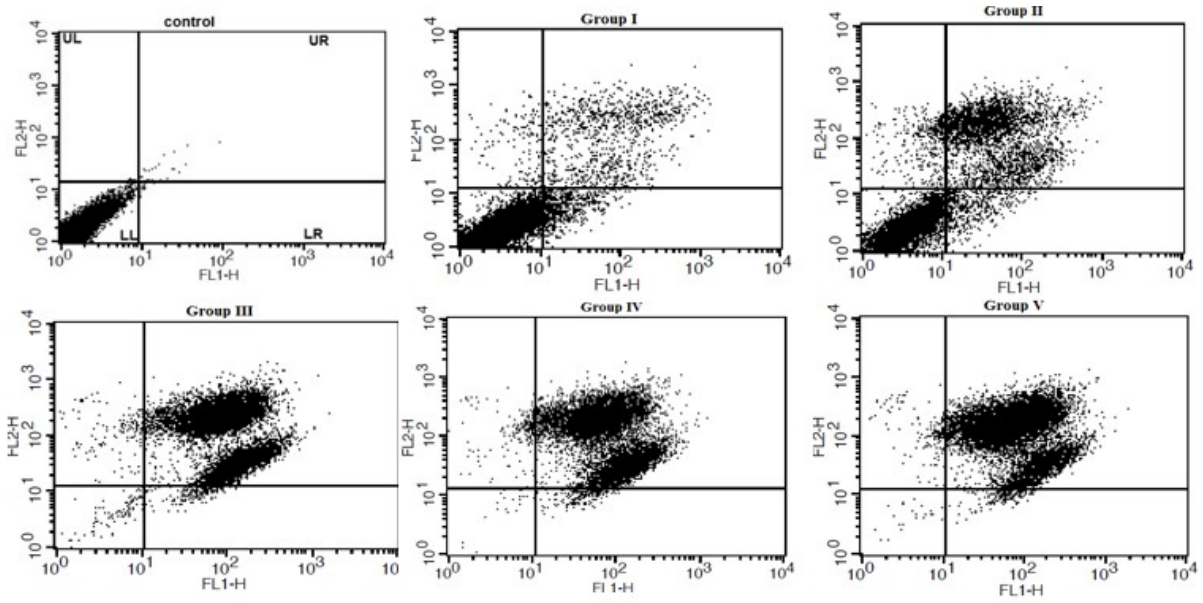


شکل ٤: درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های SKBR3 تحت تیمار با اسیدگالیک به‌مدت ٤٨ ساعت توسط تست Annexin

* P<۰/۰۵، # P<۰/۰۱ در مقابل گروه کنترل

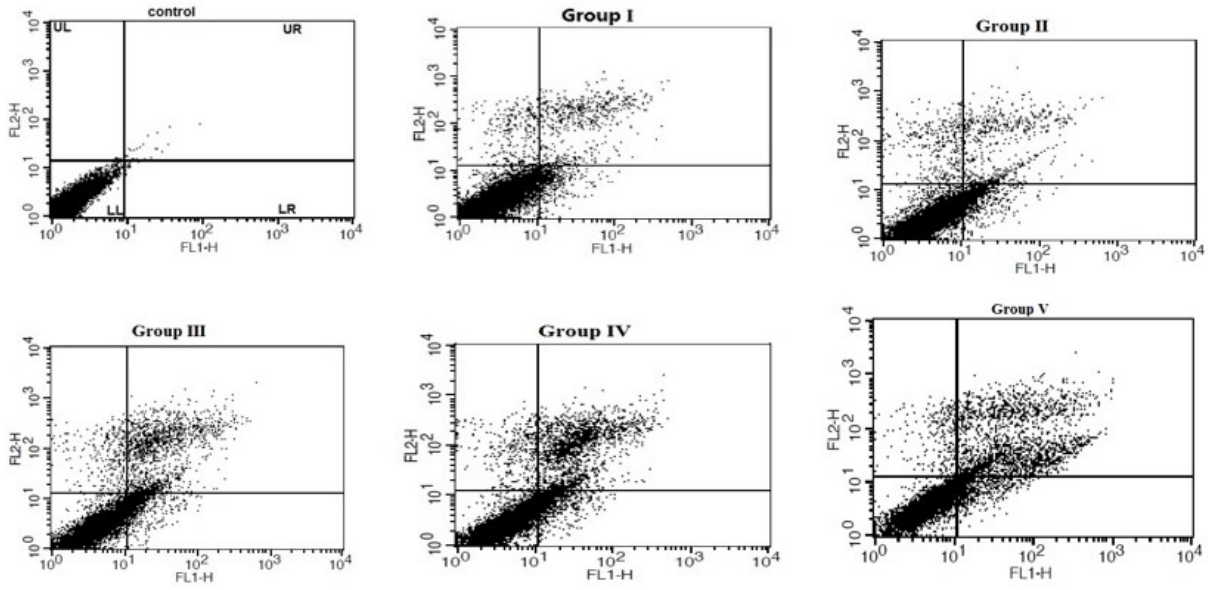
بر میزان توان زیستی سلولی ۷۲، ٤٨، ٢٤ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری شد. در تیمار ٢٤ ساعته، در همه گروه‌ها توان زیستی رده SKBR3 به‌صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد. که گروه II، III، IV، V نسبت به گروه کنترل معنادار بودند. در تیمار ٤٨ ساعته، در همه گروه‌ها توان زیستی به‌صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که این اختلاف نسبت به گروه کنترل معنادار بود. در تیمار ۷۲ ساعته، در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018



شکل ۵: تاثیر اسیدگالیک بر آپوپتوز سلول‌های SKBR3

سلول‌های SKBR3 با µg/ml ۲۰۰–۲۰ از اسیدگالیک به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه و توسط تست Annexin ارزیابی شدند



شکل ٦: تاثیر اسیدگالیک بر آپوپتوز سلول‌های HU-02

سلول‌های HU-02 با µg/ml ۲۰۰–۲۰ از اسیدگالیک به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه Annexin ارزیابی شدند

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

همه گروه‌ها توان زیستی به‌صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که گروه III، IV، V نسبت به گروه کنترل معنادار بودند (P<۰/۰۵). درحالی‌که سلول‌های HU-02 تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد (P=۰/۲۱) (شکل ۳). تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدگالیک در رده‌های SKBR3 و HU-02 بر میزان بروز آپوپتوز و نکروز سلولی ٤٨ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری و در نمودار میله‌ای نشان داده شده‌اند. میزان بروز آپوپتوز در رده SKBR3 در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰ µg/ml به‌صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد که این افزایش درصد آپوپتوز در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار دارد (P=۰/۰۰۲)، درحالی‌که میزان آپوپتوز در رده HU-02 نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد (شکل ٦-٤).

بحث

در پژوهش کنونی اثر ضدسرطانی اسیدگالیک بر تکثیر و آپوپتوز سلول‌های سرطانی پستان (SKBR3) بررسی شد. این مطالعه نشان داد اسیدگالیک می‌تواند باعث کاهش توان زیستی سلول‌های سرطانی و موجب القای آپوپتوز در این سلول‌ها شود. Hsu و همکارانش در پژوهشی نشان دادند که درمان با اسیدگالیک به‌طور چشمگیری رشد سلولی سلول‌های MCF-7 سرطان پستان انسان را به‌صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. تجزیه و تحلیل آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهد که اسیدگالیک باعث توقف چشمگیر فاز G2/M می‌شود اما به‌ندرت روی جمعیت سلول‌های فرعی G1-MCF-7 تاثیر می‌گذارد.[۱۵] در بررسی García-Rivera و همکاران، اثرات ضد توموری بالقوه گلیکوزانتون و اسیدگالیک ایندانون انبه بررسی شد که هر دو در عصاره انبه وجود دارند. اثرات ضد توموری چشمگیری از هر دو ترکیب تشکیل‌دهنده عصاره انبه در سلول سرطانی بسیار تهاجمی و متاستازی پستان نوع MDA-MB231 مشاهده شد.[۱٦] مقایسه نتایج آزمون MTS بر سلول‌های سرطان پستان در مجاورت غلظت‌های مختلف اسیدگالیک، نشان داد که اسیدگالیک به‌صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان اثر بازدارندگی بر رده سلولی SKBR3 دارد. با توجه به نتایج MTS، اسیدگالیک در غلظت‌های نامبرده پس از ٤٨ ساعت بر این رده سلولی اثر مهارکنندگی بر تکثیر سلولی دارد ولی در ٢٤ ساعت اول تاثیر آن چندان نیست به‌طوری‌که در بعضی غلظت‌ها در طی ٢٤ ساعت باعث تکثیر بیشتر سلول‌های رده SKBR3 شد، به‌صورتی‌که بیشترین درصد مرگ سلولی مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومول و زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها می‌باشد. در مطاله Lu و همکاران مشاهده شد که اسیدگالیک یکی از اجزای فعال عمده صفرا یا زردآب چینی است و قادر به ایجاد تمایز و مرگ سلولی در سرطان خون، سرطان ریه، سرکوب رگ‌زایی تومور و متاستاز یا فراگستری سلولی می‌باشد[۱۷] و در مراحل مختلف رشد تومور دخالت دارد، به‌عنوان نمونه، پاسخ دکربوکسیلاز اورنیتین مرتبط با پیشروی تومور پوست را به‌وسیله ۱۲-O-تتراداکانویلنوربویل-۱۳-استات کاهش می‌دهد، رگ‌زایی تومور را سرکوب می‌کند و متاستاز یا فراگستری سلول p815 به کبد و فعالیت رونویسی فعال‌کننده پروتیین ۱ را مهار می‌کند. اسیدگالیک باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پروستات انسان، سلول‌های سرطانی مری و سلول‌های HL-60 لوسمی پرومیلوسیتیک انسان می‌شود.[۱۸] در بررسی Arast و همکاران نشان داده شده که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند باعث تحریک سلول‌های سیستم ایمنی برای مستقر شدن در محل تومور و از بین بردن سلول‌های آن و یا مهار آنژیوژنز شوند.[۱۹] آنالیز فلوسایتومتری نشان داد درصد زیادی از سلول‌ها در اثر تیمار با اسیدگالیک دچار مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول یا آپوپتوز شده‌اند، هر چند که درصد بسیار کمی هم از سلول‌ها دچار نکروز شدند ولی این میزان نسبت به درصد سلول‌های آپوپتوز شده قابل توجه نبود. یافته‌های این مطالعه همچنین، نشان داد که آپوپتوز سلولی به‌صورت وابسته به دوز بود. این یافته‌ها که موافق با سایر مطالعات بود بیانگر این مطلب است که اسیدگالیک می‌تواند سلول‌های سرطانی را به سوی آپوپتوز پیش ببرد و از تکثیر آن‌ها جلوگیری کند. البته با وجود این پژوهش‌ها، جهت مشخص شدن اثرات اسیدگالیک بر روی سلول‌های سالم انسانی، تحقیقات بیشتری نیاز است.

بر اساس یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت اسیدگالیک می‌تواند سبب کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطان پستان رده SKBR3 گردد بدون اینکه به سلول‌های فیبروبلاست نرمال آسیبی برساند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "تاثیرات ضد تکثیری و پروآپوپتوتیک اسیدگالیک بر سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان رده SKBR3 در مقابل سلول‌های فیبروبلاست نرمال (HU-02)" مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در سال ۱۳۹٤ به کد ۱۳۳۳۰۵۰۳۹٤۱۰۱۸ می‌باشد.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

References

1. Gurm BK, Stephen J, MacKenzie G, Doll R, Barroetavena MC, Cadell S. Understanding Canadian Punjabi-speaking South Asian women's experience of breast cancer: a qualitative study. *Int J Nurs Stud* 2008;45(2):266-76.
2. Etebary M, Jahanzadeh I, Mohagheghi MA, Azizi E. Immunohistochemical analysis of P53 and its correlation to the other Prognostic factors in breast cancer. *Acta Med Iran* 2002;40(2):88-94.
3. Akbari A, Razzaghi Z, Homaee F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari ME. Parity and breastfeeding are preventive measures against breast cancer in Iranian women. *Breast Cancer* 2011;18(1):51-5.
4. Akbari ME, Mozaffar M, Heidari A, Zirakzadeh H, Akbari A, Akbari M, et al. Recurrence and Survival Effect in Breast Conserving Surgery: What are the Predictive and/or Prognostic Factors? *Iran J Cancer Prev* 2011; 4(2): 49-54.
5. Akbari ME, Khayamzadeh M, Khoshnevis SJ, Nafisi N, Akbari A. Five and ten years survival in breast cancer patient's mastectomies breast conserving surgeries personal experience. *Iran J Cancer Prev* 2008;1(2):53-6.
6. Chen WM, Chang RF, Kuo SJ, Chang CS, Moon WK, Chen ST, et al. 3-D ultrasound texture classification using run difference matrix. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(6):763-70.
7. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS* 2013;17(3):48-57. [Persian]
8. Takeru O, Yumiko Y, Shigeyuki S, Takuji T. Preclinical assays for identifying cancer chemopreventive phytochemicals. *Scholar Res Exchange* 2009;1-15.
9. Shioi A, Mori K, Jono S, Wakikawa T, Hiura Y, Koyama H, et al. Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:75-9.
10. Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhu L, Zhou F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2014;28(9):387-93.
11. Reynolds LD, Wilson NG. Scribes and Scholars. 3rd ed. *Oxford: Clarendon Press* 1991; p. 193-4.
12. Kurin E, Atanasov AG, Donath O, Heiss EH, Dirsch VM, Nagy M. Synergy study of the inhibitory potential of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell proliferation. *Planta Med* 2012;78(8):772-8.
13. Yumnam PD, Addepally U, Mangamoori LN, Chepuri K. Anticancer activity of gallic acid on cancer cell lines HCT15 and MDA MB 231. *IJRANSS* 2014;2:269-72.
14. Liao CL, Lai KC, Huang AC, Yang JS, Lin JJ, Wu SH, et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food Chem Toxicol* 2012;50(5):1734-40.
15. Hsu JD, Kao SH, Ou TT, Chen YJ, Li YJ, Wang CJ. Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27(Kip1) attributed to disruption of p27(Kip1)/Skp2 complex. *J Agric Food Chem* 2011;59(5):1996-2003.
16. García-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Berghe WV. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of Mangifera indica L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett* 2011;305(1):21-31.
17. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2010;641(2-3):102-7.
18. Zhao B, Hu M. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol Lett* 2013;6(6):1749-1755.
19. Arast Y, Galedari H, Solgui R, Kalantari H, Rezaei M. The effect of α- tocopherol and lovastatin on apoptosis induction in human colorectal carcinoma cell line. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* 2010;13(2):9-16. [Persian]

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:44 IRST on Sunday September 30th 2018

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, June 2018; Vol. 76, No. 3: 162-169 *Original Article*

Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of gallic acid on the breast adenocarcinoma cell lines SKBR3 versus normal fibroblast cells (HU-02)

Roghayeh Larki M.Sc.[1]
Leila Rouhi Ph.D.[2*]
Seyed Hossein Hejazi M.D., Ph.D.[1,3]

1- Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2- Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3- Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[*] Corresponding author: Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Rahmatieh, Shahrekord, Iran.
Tel: +98 38 33361000
E-mail: lrouhi59@gmail.com

Abstract

Received: 29 Nov. 2017 Revised: 06 Dec. 2017 Accepted: 24 May 2018 Available online: 31 May 2018

Background: Breast cancer is a malignant proliferation of epithelial cells that lining the ducts or lobules of the breast. Breast cancer is the second common cancer (after lung cancer) in women. Gallic acid, being a polyphenols, has been reported for its antiproliferative activity against many cancer cell lines. Objective of the present study is effect of gallic acid on proliferation and apoptosis of the human breast adenocarcinoma cell lines SKBR3 and normal fibroblasts cells.

Methods: This experimental study was performed in cellular and developmental biology of Shahrekord Islamic Azad University, Iran from April to August 2015. For anticancer activity, in this study SKBR3 cells and normal fibroblast cells (HU-02) were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA) medium with 10% fetal bovine serum, FBS (Gibco, Life Technologies, Inc., New York, USA). The SKBR3 and normal fibroblast cells were treated in the medium of DMEM medium and gallic acid (20, 40, 80, 100 and 200 µg/ml) for 24, 48 and 72 hours. Cells viability was assessed by MTS (Methyl- Thiazol-) assay. Cells were seeded at 5×10^3 cells/ml in 96 well plates and incubated for 24 hours. Then metabolites of bacteria were added, after indicated times MTS (20µl) was added and the absorbance was measured at 492 nm using ELISA plate reader. The percentage of apoptosis induction was determined by flow cytometry analysis using Annexin-V fluorescein isothiocyanate (FITC) kit (BioVision Products, CA, USA) in 20, 40, 80, 100 and 200 µg/ml concentration of gallic acid at 48 hours incubation.

Results: Gallic acid decreases significantly the viability of SKBR3 cell line in a time and dose dependent manner. So that the most effective concentration of this substance was 200 µg/ml and 72 hours after treatment ($P< 0.05$). According to the data of Annexin-PI, the highest apoptosis induction rate was seen in 200 µg/ml ($P< 0.05$). While gallic acid in various concentrations had no significant effect on normal fibroblast cells.

Conclusion: Objective of the present study is effect of gallic acid on proliferation and apoptosis of the human breast adenocarcinoma cell lines SKBR3 and normal fibroblasts cells.

Keywords: apoptosis, breast cancer, fibroblasts, gallic acid, viability.