

## بررسی اثر آپوپتوزی پی-کوماریک اسید بر رده سلولی سرطان سینه MCF-7

مریم کلاھی<sup>۱</sup>، محمد رضا تابنده<sup>۲\*</sup>، صادق صارمی<sup>۳</sup>، سید احمد حسینی<sup>۴</sup>، محمود هاشمی تبار<sup>۵</sup>

### چکیده

**مقدمه:** ترکیبات پلی فنلی دارای اثر ضد تکثیر(آنٹی پرولیفراتیو) و محرك آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هستند. پی-کوماریک اسید به طور گسترده‌ای در میوه‌ها، سبزی‌ها، محصولات گیاهی و عسل یافت می‌شود. از طرفی دیگر سرطان پستان، در دنیا شایع‌ترین سرطان در زنان است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد سرطانی پی-کوماریک اسید بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 بود.

**روش بررسی:** به منظور بررسی اثر آپوپتوزی پی-کوماریک اسید، رده سلولی سرطان سینه MCF-7 با غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید(۱۰، ۳۷، ۷۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولا) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در ادامه زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. شاخص‌های آپوپتوز از جمله تظاهر فسفاتیدیل‌سرین در لایه بیرونی غشای پلاسمایی با استفاده از فلوسایتمتری و ارزیابی اتصال Annexin V ارزیابی گردید.

**نتایج:** با افزایش غلظت پی-کوماریک اسید به صورت واپسی به دوز، توان زیستی سلول‌های سرطانی کاهش پیدا کرد. به طوری که بیشترین تأثیر پی-کوماریک اسید مربوط به غلظت ۳۰۰ میلی‌مولا در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. IC50 پی-کوماریک اسید در سلول‌های MCF-7 بر اساس ارزیابی زنده‌مانی به روش MTT، حدود ۴۰ میلی‌مولا تعیین شد. تیمار سلول‌ها با دوز ۳۰۰ میلی‌مولا پی-کوماریک اسید سبب افزایش معنی‌دار شاخص‌های آپوپتوز مورد مطالعه گردید. به طوری که میزان سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز V<sup>+</sup> Propium Iodide (PI<sup>+</sup>) بعد از ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که پی-کوماریک اسید دارای فعالیت القاء آپوپتوز مؤثر در برابر سلول‌های MCF-7 است. این نتایج می‌تواند در درک بهتر مکانیسم ضدسرطانی پی-کوماریک اسید و پیشنهاد استفاده از آن به صورت داروی جایگزین و یا در ترکیب با داروهای شیمیایی متداول در درمان سرطان مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، پی-کوماریک اسید، سلول‌های سرطان سینه MCF-7

- 
- ۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
  - ۲- دانشیار، گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
  - ۳- مرbi، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
  - ۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
  - ۵- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
- \* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۷۳۰۴۹۶۰۶، پست الکترونیکی: m.tabandeh@scu.ac.ir
- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۹
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳

## مقدمه

پی-کوماریک اسید همچنین دارای فعالیت ضد توموری و ضد جهش‌زاوی است (۸، ۱۰).

سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان و اولین علت مرگ زنان در سن ۴۴ سال به بالا در جهان است (۱۱، ۱۳). این بدخیمی، ۳۳-۴۰٪ سرطان‌های زنان بالای ۴۰ سال را تشکیل داده و مسئول ۱۹ درصد از مرگ‌های وابسته به سرطان است. آمار و شواهد حاکی از افزایش مداوم شیوع سرطان پستان از اواسط دهه ۱۹۴۰ هستند. تحقیقات مختلفی جهت بررسی رژیم غذایی جدید غنی از ترکیبات فنلی به منظور پاکسازی این بدخیمی صورت گرفته است (۱۱-۱۴).

این بیماری علی‌رغم پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان، از معضلات شایع زنان است. گرچه وجود داروهای مؤثری مانند تاموکسیفن و رالوکسیفن و یا داروهای ضد توموری آنساسترازول ۳۰ که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانات‌های درمانی در طی ۳۰ سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است (۱۵)، با این وجود، معایب مختلفی از جمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متabolیسم گلوكورونیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است (۱۶، ۱۷).

یکی از بزرگ‌ترین محدودیت‌های داروهای ضد سرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است که می‌تواند ناشی از مقاومت ذاتی تومور نسبت به دارو باشد یا در طول شیمی درمانی کسب شود و به گونه‌ای عمل می‌کند که سلول‌های مقاوم از بین سلول‌های هتروژن انتخاب می‌شوند، در نتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم روند درمان مشکل‌تر می‌شود. امروزه داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. بالغ بر ۳۵۰۰ سال است که از گیاهان در درمان سرطان استفاده می‌شود (۷). یکی از ساز و کارهای عملکردی داروهای ضد سرطانی القاء آپوپتوز است که موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۸). با توجه به وسعت مطالعات درمان‌های گیاهی و اهمیت ترکیبات فنلی در

ترکیبات پلی فنلی متعددی به عنوان عوامل ضد سرطان شناسایی شده‌اند. حضور ترکیبات فنلی در رژیم غذایی مختلف موجب کاهش خطر ابتلا به بیماری‌هایی از جمله سرطان، دیابت و اختلالات قلبی برای مصرف کنندگان این رژیم‌ها می‌گردد. باور قوی بر نوع رژیم غذایی و تأثیر آن در توضیح ابتلا به سرطان وجود دارد. از این رو رژیم غذایی فاکتور خطر مهمی در بروز سرطان است (۱۲). در این میان مطالعه بر روی فلاونوئیدها به دلیل فعالیت‌های بیولوژیک مختلف این مولکول‌ها در سال‌های اخیر به طور فزاینده‌ای رو به رشد بوده است. فلاونوئیدها فعالیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد جهشی دارند و سرکوب کننده رشد تومور چندین نوع سلول سرطانی شناخته شده‌اند (۳-۶). ترکیبات پلی فنلی دارای اثر ضدتکثیر (آنتی پرولیفراتیو) و محرك آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هستند. بر اساس مطالعات مولکولی انجام شده روی ترکیبات فنلی استخراج شده از گیاهان و سلول‌های سرطانی (سرطان پستان)، مشخص شد که این ترکیبات با افزایش کلسیم داخل سلول می‌توانند باعث تحریک مرگ از پیش برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی شوند که این امر کاهش حجم توده و افزایش امکان بهبود در این بیماران را موجب می‌شود (۷).

کوماریک اسید از گروه پلی فنل‌ها یکی از مشتقات سینامیک اسید که دارای سه ایزومر ۰ - کوماریک اسید، m-کوماریک اسید و پی-کوماریک اسید است و از اولین ترکیبات واکنش‌های بیوسنتز پلی فنل‌ها است. پی-کوماریک اسید فراوان ترین ایزومر در طبیعت است و از سینامیک اسید توسط آنزیم ۴ - سینامیک اسید هیدروکسیلаз به واسطه P450 سنتز می‌شود. پی-کوماریک اسید به طور گستره‌ای در میوه‌ها، سبزی‌ها و محصولات گیاهی، از جمله سیب، گلابی، لوبیا، بادام زمینی، سیب زمینی، گوجه فرنگی، هویج، انگور، توت، تمشک، جو و چای یافت می‌شود. پی-کوماریک اسید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است که خطر سرطان معده را با سرکوب نیتروز آمین‌های سرطان‌زا کاهش می‌دهد (۸، ۹).

گزارش گردید. غلظتی که سبب حذف ۵۰ درصد از سلول‌های زنده گردید، به عنوان IC50 تعیین گردید.

بررسی آپوپتوز به روش فلوسایوتومتری به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در سلول‌های تیمار شده با دارو و مقایسه آن با جمعیت سلولی کنترل منفی، نگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ Annexin-V و پروپیدیوم یدید(PI) Annexin-V- FLOUS Staining Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) با استفاده از کیت تجاری (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) انجام گرفت. به این صورت که بعد از تیمار کردن سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۴ ساعت، سلول‌ها را تریپسینه کرده و با بافر فسفات سالین استریل(PBS) شستشوی سلول‌ها انجام گرفت. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها، ۱۰۰ میکرو لیتر بافر اتصال در میکروتیوب ۱/۵ میکرو لیتر اضافه گردید. به دنبال اضافه کردن بافر اتصال، ۱۰ میکرو لیتر از رنگ پروپیدیوم یدید(PI) و ۵ میکرو لیتر از رنگ آنکسین(Annexin-V) به محتويات موجود در میکروتیوب اضافه شد. سپس، محتويات هر لوله به آرامی مخلوط گردیدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایوتومتری FACScan (Becton Dickinson) آمریکا) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه Q1 تا Q4 صورت گرفت. به نحوی که ناحیه Q1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی: Annexin-V<sup>-</sup> و PI<sup>+</sup>، ناحیه Q2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا نکروزی با ویژگی: سلول‌های Annexin-V<sup>+</sup> و PI<sup>+</sup>، ناحیه Q3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی: Annexin-V<sup>-</sup> و PI<sup>-</sup> و ناحیه Q4 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با ویژگی: Annexin-V<sup>+</sup> و PI<sup>-</sup> است. فلوروکروم‌های مورد استفاده فلورئسین ایزوتوپیسانات (FITC) کنژوگه با Annexin-V بود که در کanal<sub>1</sub> و PI بود که در کanal<sub>2</sub> مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تعیین اثرات پی-کوماریک اسید در جهت القاء آپوپتوز و یا نکروز، درصد سلول‌های به دست آمده در هر ناحیه توسط نرم‌افزار FCS Express محاسبه و بر اساس درصد گزارش گردید(۲۷).

درمان و پیشگیری از سرطان، درک مکانیسم‌های مولکولی ترکیبات طبیعی در زمینه درمان سرطان پستان ضروری به نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد سرطانی پی-کوماریک اسید بر سلول‌های سرطان پستان، MCF-7 بود.

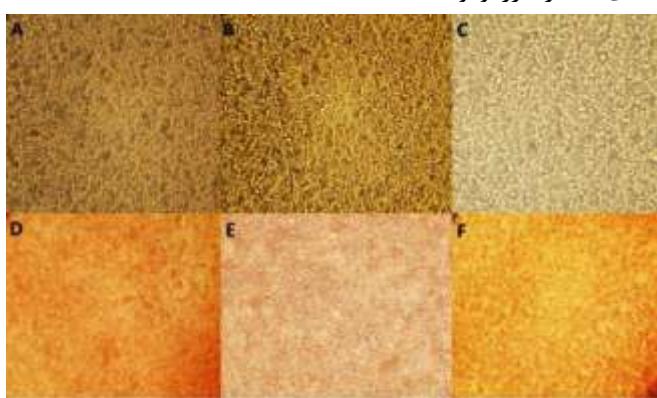
### روش بررسی

سلول‌های رده MCF-7 از بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران خریداری گردید و پس از شمارش و تعیین درصد بقا در محیط کشت DMEM حاوی ده درصد FBS کشت شدند. پس از کشت سلول‌های MCF-7 با تعداد  $5 \times 10^7$  در هر میلی‌لیتر در فلاسک‌های ۴۰ میلی‌لیتری و پر شدن حداقل ۵۰ درصد فضای فلاسک، غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید(با درجه خلوص ۹۹/۹٪ امریکا، آمریکا) شامل ۱۰، ۱۵۰، ۳۷ و ۳۰۰ میلی‌مolar که در حلال مناسب(آب به همراه DMSO با غلظت نهایی ۰/۲ درصد) حل گردیده بود، به محیط کشت فلاسک‌های محتوى این سلول‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه نمودیم. تغییرات مرفلوژی و خصوصیات عمومی سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت از نظر قابلیت اتصال به سطح پلیت (Anchorage dependent) و میزان گرانوله شدن(Granulation) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از دوربین دیجیتال ثبت گردید.

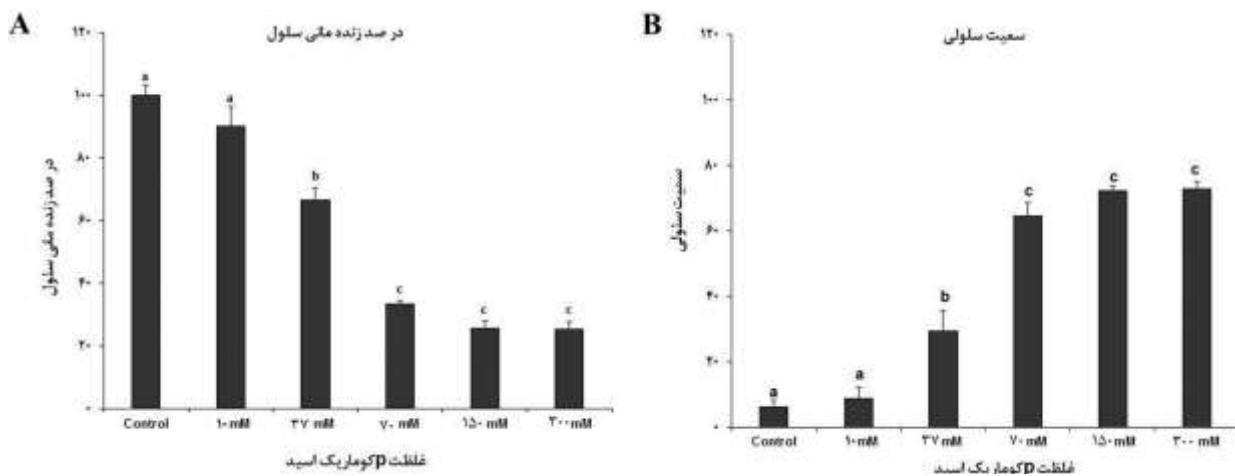
### ارزیابی زنده مانی و تعیین IC50 با تست MTT

به منظور تعیین IC50 از میزان زنده مانی با تست MTT استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تریپسینه و پس از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. ۵۰ میکرو لیتر رسوب سلولی(تست) و ۵۰ میکرو لیتر بافر(PBS) به صورت جداگانه به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و سپس ۱۰ میکرو لیتر افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکسید افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و پس از آن جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر اساس مقایسه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل

دوزی با یکدیگر نشان دادند. با افزایش دوز تغییر شکل سلولی بسیار واضح بود. تغییرات مورفولوژی در سلول‌های MCF7 در زمان ۲۴ ساعت بیشترین اثرات سایتوتوکسیک را در غلظت ۱۵۰ میلی‌مolar دارا بود. سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های بالای پی-کوماریک اسید نشان دهنده تغییرات مورفولوژیکی بارز از جمله تغییرات عمدی در حالت طبیعی غشای سلولی و گرانوله شدن سلول‌ها، چروکیده شدن غشای هسته و کاهش حجم سلول را نشان دادند. در ضمن تعدادی از سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و شناور بودند(شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات مورفولوژیک سلول‌های گروه کنترل(A) و پس از تیمار با پی-کوماریک اسید ۱۰ میلی‌مolar(B)، ۳۷ میلی‌مolar(C)، ۷۰ میلی‌مolar(D)، ۱۵۰ میلی‌مolar(E) و ۳۰۰ میلی‌مolar(F). کاهش حجم سلول، گرانوله شدن سلول‌ها و چروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر، قابل مشاهده است.



نمودار ۱: در صد میزان زنده مانی(A) و سمعیت سلولی(B)، سلول‌های MCF-7 در گروه‌های کنترل و تحت درمان با غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید (۱۰، ۳۷، ۷۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مolar). IC50 برای پی-کوماریک اسید در حدود ۴۰ میلی‌مolar به دست آمد. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده در این پژوهش از نرمافزار 14 SPSS و برای بررسی اختلاف آماری بین میانگین پارامترهای مختلف در گروه‌های مورد آزمایش از تست ANOVA دوطرفه و پسا آزمون توکی استفاده شد.

## نتایج

### نتایج مورفولوژی

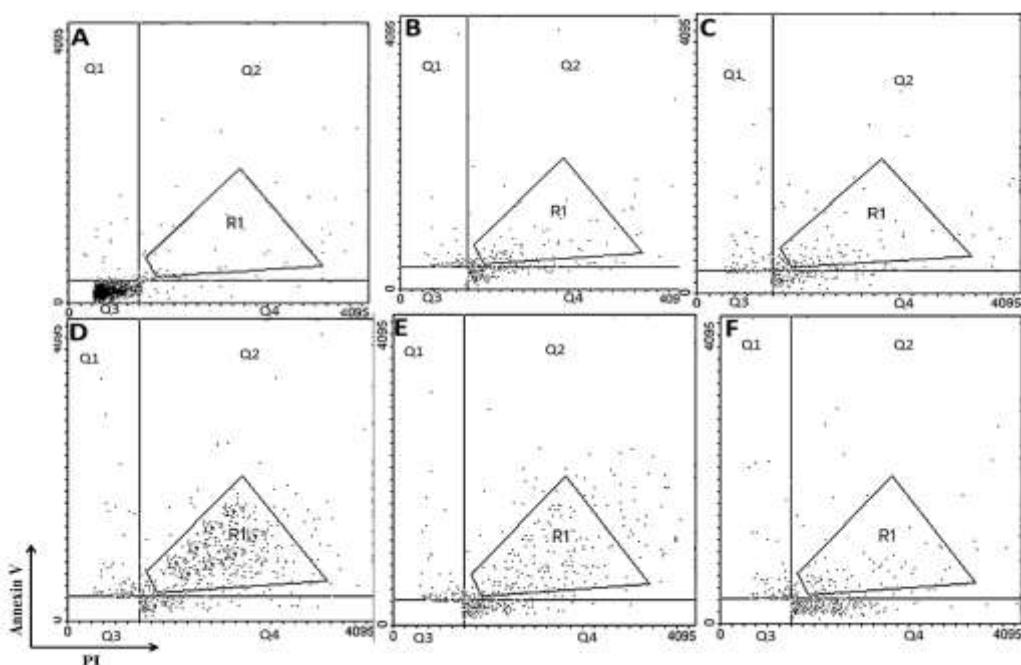
نتایج مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که سلول‌های سرطانی تیمار شده با پی-کوماریک اسید نسبت به نمونه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی داشت. شکل سلول‌های تحت اثر پی-کوماریک اسید تفاوت‌های بسیار بارز و وابسته به

رنگ سبز و قرمز و سلول‌های سالم (Annexin-V<sup>-</sup> و PI<sup>-</sup>) بدون رنگ مشاهده شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوزی ابتدایی در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۷، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولاو پی-کوماریک اسید به ترتیب ۶۵/۸۵ ± ۰/۸، ۲۵/۸۵ ± ۱/۵۱، ۳۰/۹۲ ± ۱/۸، ۷۰، ۱۵۰ و ۲۰/۹۲ ± ۱/۳۲ بود که بیشترین درصد سلول‌های آپوپتوزی زودرس به ترتیب در تیمارهای ۷۰ و ۱۵۰ میلی‌مولاو مشاهده شد. در تمام تیمارها درصد سلول‌های آپوپتوزی زودرس بیش از گروه کنترل بود (شکل ۲، ۳).

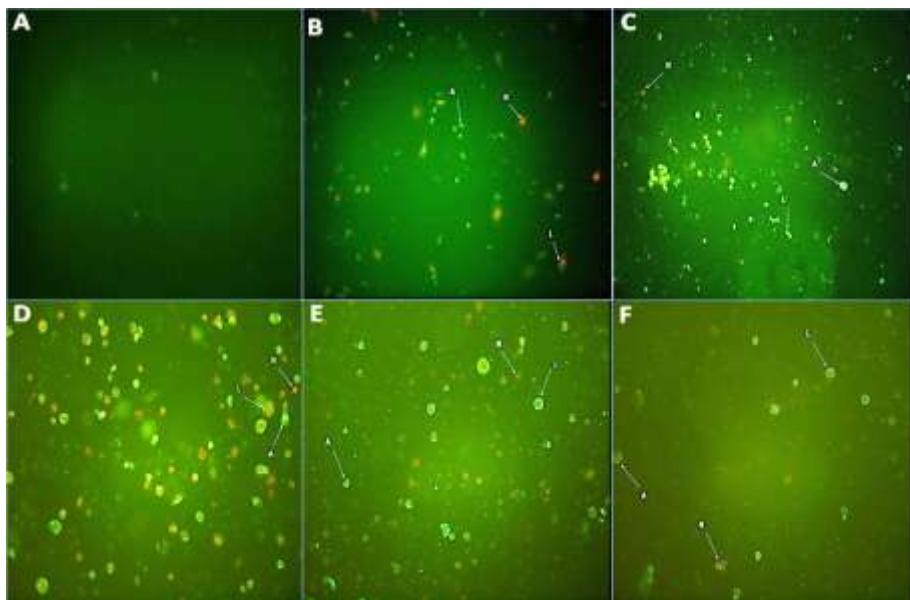
درصد سلول‌های آپوپتوزی دیررس در تمام تیمارها بیش از گروه کنترل بود. درصد سلول‌های آپوپتوزی دیررس در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۷، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۷۰ میلی‌مولاو پی-کوماریک اسید به ترتیب ۲۵/۱۵ ± ۰/۱، ۶۰/۱۹ ± ۰/۱۳، ۶۰/۴۵ ± ۱/۳۱، ۵/۵۱ ± ۰/۱، ۵/۱۵ ± ۰/۱۳ و ۳۰۰ میلی‌مولاو بود. بیشترین تعداد سلول‌های آپوپتوزی دیررس مربوط به تیمار ۳۰۰ میلی‌مولاو بود (شکل ۲، ۳). درصد سلول‌های نکروتیک در گروه‌های تیمار شده با پی-کوماریک اسید در تمام غلظت‌های مورد استفاده نزدیک به گروه کنترل بود. درصد سلول‌های نکروتیک در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۳۷، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولاو پی-کوماریک اسید به ترتیب ۱۰/۰۳ ± ۰/۰۵، ۱۰/۹۸ ± ۰/۰۵، ۱۵/۱۳ ± ۰/۲۱ و ۱۰/۱۵ ± ۰/۱ بود. بیشترین تعداد سلول‌های نکروتیک مربوط به تیمار ۳۷ میلی‌مولاو بود (شکل ۲، ۳).

ارزیابی میزان زنده‌مانی و میزان سمیت سلولی بر اساس نتایج تست MTT، مقدار IC50 برای پی-کوماریک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت در مورد سلول‌های چهل میلی‌مولاو برآورد شد. نتایج ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید در (نمودار A-۱) آمده است. حداکثر سمیت سلولی در رقت ۳۰۰ میلی‌مولاو پی-کوماریک اسید دیده شد (نمودار B-۱).

ارزیابی میزان آپوپتوز با تست انکسین شکل ۲ و ۳ نتایج تست انکسین در سلول‌های تیمار شده با محیط پایه حاوی ۰/۲ درصد DMSO و غلظت‌های ۱۰، ۳۷، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولاو پی-کوماریک اسید پس از آنالیز سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با PI و Anexin V با روش فلوسایتومتری و نرمافزار express FCS و میکروسکوپ فلورستن را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرمافزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه نمایانگر Q صورت گرفت. به نحوی که ناحیه ۱ Q نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی PI<sup>+</sup> و Annexin-V<sup>-</sup> نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا ویژگی ناحیه ۲ نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا ویژگی PI<sup>+</sup> و Annexin-V<sup>+</sup>، ناحیه ۳ نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی PI<sup>-</sup> و Annexin-V<sup>-</sup> و ناحیه ۴ نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با ویژگی PI<sup>-</sup> و Annexin-V<sup>+</sup> است. در تصاویر میکروسکوپ فلورستن سلول‌های نکروتیک، سلول‌های آپوپتوزی زودرس (Annexin-V<sup>+</sup> و PI<sup>+</sup>) به رنگ سبز، سلول‌های آپوپتوزی دیررس (Annexin-V<sup>-</sup> و PI<sup>+</sup>) به



شکل ۲: نتایج تست فلوسایتوometری سلول‌های گروه کنترل تیمار شده با محیط پایه حاوی ۰/۲ درصد DMSO و رنگ‌آمیزی شده با PI و Annexin-V (A) پس از تیمار با پی-کوماریک اسید ۱۰ میلی مولار (B)، ۳۷ میلی مولار (C)، ۱۵۰ میلی مولار (D)، ۷۰ میلی مولار (E) و ۳۰۰ میلی مولار (F). Q1: سلول‌های نکروزی (Annexin-V- و PI-). Q2: سلول‌های آپوپتوز شده دیررس (Annexin-V+ و PI-). Q3: سلول‌های سالم (Annexin-V- و PI+) و Q4: سلول‌های آپوپتوز شده جوان (Annexin-V+ و PI+). R1: محدوده مربوط ببیشترین تجمع سلولی (حدوده حدود ۱ R).



شکل ۳: نتایج میکروسکوپ فلورسنت سلول‌های گروه تیمار شده با محیط پایه حاوی ۰/۲ درصد DMSO و رنگ‌آمیزی شده با PI و Annexin-V (A) پس از تیمار با پی-کوماریک اسید ۱۰ میلی مولار (B)، ۳۷ میلی مولار (C)، ۱۵۰ میلی مولار (D)، ۷۰ میلی مولار (E) و ۳۰۰ میلی مولار (F). سلول‌های نکروتیک (Annexin-V- و PI+) قرمز، سلول‌های آپوپتوزی زودرس (Annexin-V+ و PI-) سبز، سلول‌های آپوپتوزی دیررس (Annexin-V+ و PI+) سبز و قرمز و سلول‌های سالم (Annexin-V- و PI-) بدون رنگ.

## بحث

آپوپتوز شدند که البته بیشترین میزان آپوپتوز در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار دیده شد و مطالعات میکروسکوپی نیز نتایج فلوسایتومتری را تائید کرد. همچنین نتایج حاصل از تحقیق Niero و Machado-Santelli نشان دهنده القا آپوپتوز در ۲۵ درصد سلول‌های رده HT-144 در پاسخ به درمان با دوز ۳/۲ میلی مولار ترانس سینامیک اسید بود. در حالی که تعداد سلول‌های آپوپتوزیک در پاسخ به بالاترین دوز ترانس سینامیک اسید در زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل در رده NGM (۵/۸ درصد) نداشته است (۲۶). در نتایج به دست آمده از این پژوهش مشاهده شد که سلول‌ها نسبت به پی-کوماریک اسید خاصیت واپسیه به غلظت دارند. یعنی با افزایش غلظت، اثر سایتو توکسیسیتی پی-کوماریک اسید بیشتر قابل مشاهده است. به طوری که در بالاترین غلظت‌ها اثر سیتو توکسیسیتی کامل و در مقادیر پایین‌تر اثر ممانعت کنندگی بر رشد سلول‌ها دارد.

مطالعات مختلف اثر پیشگیری عسل در برابر سرطان کولون را تائید کرده است. عسل به واسطه محتوای فنلی بالا از جمله حضور پی-کوماریک اسید منتقل شده از دانه‌های گردد گیاهان اثر ممانعتی بر تکثیر سلول‌های سرطانی دارد. همچنین عسل به طور قابل توجهی باعث القاء آپوپتوز می‌شود (۲۷). تحقیقات نشان می‌دهد که پی-کوماریک اسید از رشد سلول‌های سرطان روده به واسطه القاء آپوپتوز از طریق مسیر ROS میتوکندری ممانعت می‌کند (۲۸). کونگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که پی-کوماریک اسید از رشد اندوتیالی سلول‌های روده و همچنین شکل‌گیری و مهاجرت سلول‌های سرطانی در مدل موش جلوگیری می‌کند. در این بررسی مشخص شد که پی-کوماریک اسید هر دو مسیر سیگنال AKT و ERK را ممانعت می‌کند (۲۹). تحقیقات اخیر نشان داده است که پی-کوماریک اسید از طریق کاهش هموگلوبین به طور مؤثر مانع رشد تومور در *In vivo* می‌شود و به واسطه توانایی ممانعت در رگ زایی خصوصیت ضد سرطانی بالاتری دارد (۸). فرولیک اسید و پی-کوماریک اسید از طریق تأثیر بر تأخیر سیکل سلولی مانع

پلی فنل‌های موجود در میوه‌ها و سبزی‌ها و فراورده‌های آن‌ها به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی همواره مورد توجه بوده‌اند. علاوه بر این تحقیقات زیادی نشان می‌دهد که برخی از این ترکیبات به طور ویژه در درمان برخی سرطان‌های خاص کاربرد دارند. همچنین بسیاری از این ترکیبات از طریق مکانیسم‌هایی از جمله ممانعت از سنتز DNA، تعديل تولید ROS، تنظیم چرخه سلولی و تغییر مسیرهای آپوپتوز می‌توانند در فرایندهای کلی درمان سرطان مؤثر باشند (۲۱-۲۲). از این جهت مطالعات بیشتر به منظور شناسایی مکانیسم مولکولی ضد سرطانی ترکیبات با منشأ طبیعی به ویژه ترکیبات مشتق از گیاهان ضروری است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر پی-کوماریک اسید بر رشد و آپوپتوز سلول‌های سرطانی MCF-7 است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده اثر مهاری این ترکیب بر رشد و میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی MCF-7 است.

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، به واسطه برخی ویژگی‌های مشخص شامل تراکم و شکستگی کروماتین، شکستگی DNA، برآمدگی غشایی، فعالیت کاسپاز و انتقال فسفاتیدیل سرین از داخل به لایه خارجی غشای پلاسمایی تعریف می‌گردد. القاء آپوپتوز یکی از ابزارهای مفید برای درمان سرطان است. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی آنتی‌تومور در ترکیبات فنلی مکانیسم آپوپتوزیس و یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. در فعل شدن مکانیسم آپوپتوزیس چند عامل مؤثر است، که مهم‌ترین فعل شدن آنزیم اندونئوکلئاز، القاء P53 و فعل شدن آنزیم پروتئاز کاسپاز ۳ است (۲۲-۲۴). در بررسی حاضر بر اساس بررسی‌های آنکسین V/PI و مطالعات فلوسایتومتری مشخص شد که ممانعت سلولی در تیمار پی-کوماریک اسید بر سلول‌های سرطانی MCF-7 به واسطه القاء آپوپتوز است. پژوهشی در سال ۲۰۰۵ اثر پی-کوماریک اسید در ممانعت تکثیر سلول‌های اپی تلیال روده بزرگ را تائید کرد (۲۵). تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پی-کوماریک اسید نشان می‌دهد که در تمام غلظت‌های بکار رفته سلول‌ها دچار

ریه و گلیوبلاستوما شده است (۳۲، ۳۳).

### نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که پی-کوماریک اسید دارای فعالیت القاء آپوپتوزی مؤثری در برابر سلول‌های MCF-7 است. این نتایج می‌تواند در درک بهتر مکانیسم ضد سرطانی پی-کوماریک اسید و پیشنهاد استفاده آن به صورت داروی جایگزین و یا مکمل داروهای شیمیایی در درمان سرطان مفید باشد.

### سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (پژوهانه شماره ۳۱۵۸۰/۹۴/۳/۲) و مرکز تحقیقات سلوی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور (طرح CMRC-115) به لحاظ تأمین هزینه‌های این پژوهش و همکاری در اجرای این تحقیق تقدیر و قدردانی می‌نمایند.

تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند و مطالعه بیان ۵۱۷ ژن بروش میکروواری بیانگر تغییرات بیان این ژن‌ها به واسطه تیمار سلول‌ها به وسیله این ترکیبات فنلی بود (۲۵).

پی-کوماریک اسید همراه با هیدروکافئیک اسید موجب کاهش اثرات تخریب اکسیداسیون UV-B سلول‌های ملتجمه و قرنیه انسان در *in vitro* و آسیب سلول‌های صلبیه خرگوش در *in vivo* شده است (۳۰). همچنین توانائی پی-کوماریک اسید در حفاظت قلب رت در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از دوکسوروبیسین مطالعه شده است (۳۱).

مشتقهای هیدروکسیله و متیله ترانس سینامیک اسید اثر مهاری بر القا تومور پیش مده ناشی از بنزو پیرن داشته است و تهاجم و متاستاز ملانوما رده‌های C8161 و A375 را مهار نموده است. همچنین ترانس سینامیک اسید سبب توقف سیکل سلولی در ادنوکارسینوم وابسته به هورمون پروستات، سرطان

### References:

- 1- Johnson IT. *Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa*. Food Chem Toxicol 2002; 40(8): 1171-78.
- 2- Yang CS, Landau JM , Huang MT, Newmark HL. *Inhibition of arcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*. Ann Rev Nutr 2001; 21(1): 381-406.
- 3- Matsukawa Y, Marui N Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, et al. *Genistein arrests cell cycle progression at G2-M*. Cancer Res 1993; 53(6): 1328-31.
- 4- Romero I, Paez A, Ferruelo A, Luján M, Berenguer A. *Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells*. BJU Int 2002; 89(9): 950-54.
- 5- Lee H, Yeom H, Kim YG, Yoon CN, Jin C, Choi JS, et al. *Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids*. Biochem Pharmacol 1998; 55(9): 1369-75.
- 6- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacol Rev 2000; 52(4): 673-751.
- 7- Dai J, Mumper RJ. *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules 2010; 15(10): 7313-52.

- 8- Ferguson LR, Zhu ST, Harris PJ. *Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29*. Mol Nut Food Res 2005; 49(6): 585-693.
- 9- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. *Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation*. Am J Physiol Cell Physiol 2000; 279(4): C954-960.
- 10- Kroon PA, Williamson G. *Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives*. J Sci Food Agri 1999; 79(3): 355-61.
- 11- Sakorafas GH, Tsiotou AG. *Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective*. Brit J Sur 2000; 87(2): 149-62.
- 12- Rodríguez ML, Estrela JM, Ortega AL. *Natural Polyphenols and Apoptosis Induction in Cancer Therapy*. J Carcinogene Mutagene 2013; S6: 004. 1-10.
- 13- Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS,, Mukhtar H. *Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer*. FASEB J 2011; 25(4): 1198-207.
- 14- Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, et al. *The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites*. Eur J Nutr 2006; 45(2): 88-96.
- 15- Baum L, Ng A. *Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models*. J Alz Dis 2004; 6(4): 367-77.
- 16- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. *Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study*. J Natl Cancer Inst 2005; 97(22):1652-62.
- 17- Rubino C, de Vathaire F, Diallo I, Shamsaldin A, Grimaud E, Labbe M, et al. *Radiation dose, chemotherapy and risk of lung cancer after breast cancer treatment*. Breast Cancer Res Treat 2002; 75(1): 15-24.
- 18- Park EJ, Pezzuto JM. *Botanicals in cancer chemoprevention*. Cancer Metastasis Rev 2002; 21(3-4): 231-55.
- 19- Basnet P, Skalko-Basnet N. *Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment*. Molecules 2011; 16(6): 4567-98.
- 20- Cherniack EP. *Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome*. Nutrition 2011; 27(6): 617-23.
- 21- Gao S, Hu M. *Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics*. Mini Rev Med Chem 2010; 10(6): 550-67.

- 22- Zaki MM, Mahmoud SA. *Biochemical activities of bacterial population in the rhizosphere and soil of Hyoscyamus muticus and Citrullus colocynthis*. Ann Agri Sci 1984; 29: 167-74.
- 23- Nadkarni KM. *Indian Plants and Drugs with their Medical Properties and Uses*. Asiatic Publishing House; New Delhi 1998: 78-120.
- 24- Goldfain D, Lavergne A, Galian A, Chauveinc L, Prudhomme F. *Peculiar acute toxic colitis after ingestion of colocynth: a clinicopathological study of three cases*. Gut 1989; 30(10): 1412-18.
- 25- Janicke B, Hegardt C, Krogh M Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, et al. *The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells*. Nutr Cancer 2011; 63(4): 611-22.
- 26- Niero EL, Machado-Santelli GM. *Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells*. J Exp Clin Cancer Res 2013; 32(1): 1756-9966.
- 27- Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. *Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells*. W J G 2013; 19(43): 7726-34.
- 28- Jaganathan SK, Mandal M. *Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: Rev*. J Bio Biotech 2009; 1-13.
- 29- Kong, CS, Jeong CH, Choi JS, Kim KJ, Jeong JW. *Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells*. Phytother Res 2013; 27(3): 317-23.
- 30- Larrosa M, Lodovici M, Morbidelli L, Dolara P. *Hydrocaffeic and p-coumaric acids, natural phenolic compounds, inhibit UV-B damage in WKD human conjunctival cells in vitro and rabbit eye in vivo*. Free Radic Res 2008; 42(10): 903-10.
- 31- Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. *Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart*. Pharmacol Res 2003; 48(5): 461-65.
- 32- Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. *Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention*. In t J Cancer 1995; 62(3): 345-50.
- 33- Sova M, Žižak Ž, Stanković JA, Prijatelj M, Turk S, Juranić ZD, et al. *Cinnamic acid derivatives induce cell cycle arrest in carcinoma cell lines*. Med Chem 2013; 9: 633-41.

## ***The Study of Apoptotic Effect of p-Coumaric Acid on Breast Cancer Cells MCF-7***

**Maryam Kolahi (PhD)<sup>1</sup>, Mohammad Reza Tabandeh (PhD)<sup>\*2</sup>  
Sadegh Saremy (MS)<sup>3</sup>, Seyyed Ahmad Hosseini (PhD)<sup>4</sup>, Mahmoud Hashemitabar (PhD)<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

<sup>3,5</sup> Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

<sup>4</sup> Nutrition and Metabolic Diseases Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

**Received:** 13 Jan 2016

**Accepted:** 28 Apr 2016

### **Abstract**

**Introduction:** Polyphenolic compounds have anti proliferative and induced apoptotic features on cancer cells. p-Coumaric acid can be abundantly found in fruits, vegetables, plant production and honey.. Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among women in the world. This study aimed to investigate the effect and mechanism of p- coumaric acid on apoptosis of MCF-7 breast cancer cells.

**Methods:** In order to study apoptotic effect of p- coumaric acid, MCF-7 breast cancer cells were treated with different concentrations of p- coumaric acid (10, 37, 70, 150 and 300 mM) for 24 h. Cell viability was determined using MTT assay. Apoptosis markers including phosphatidylserine exposure at the outer leaflet of the plasma membrane were measured using flow cytometry for Annexin V affinity.

**Results:** Cell viability of MCF-7 cells was decreased with increasing of p- coumaric acid concentration. Maximal effect of p- coumaric acid was observed in cells that treated with 300 mM for 24h ( $p < 0.05$ ). Viability assay showed that the IC<sub>50</sub> of p- coumaric acid in MCF-7 cells was about 40 mM. p- coumaric acid at dose of 300 mM significantly increased the late apoptotic cells with Annexin V<sup>+</sup> and propium iodide (PI<sup>+</sup>) features after 24 h treatment.

**Conclusion:** The results of this study showed that p- coumaric acid had effective apoptotic activity against MCF-7 cells. The results can be helpful in understanding the anticancer mechanism of p- coumaric acid and using it was suggested as an alternative or complementary drug in cancer chemotherapy.

**Keywords:** Apoptosis; p- Coumaric acid; MCF-7 Cancer Cell Line

**This paper should be cited as:**

Maryam Kolahi, Mohammad Reza Tabandeh, Sadegh Saremy, Seyyed Ahmad Hosseini, Mahmoud Hashemitabar. ***The study of apoptotic effect of p-coumaric acid on breast cancer cells mcf-7.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(3): 211-21.

---

\*Corresponding author: Tel: 09173049606, email: m.tabandeh@scu.ac.ir