

تأثیر ترانس-سینامیک اسید بر شاخص‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7

فائزه زینیوند^۱، محمد رضا تابنده^۲، مریم کلاهی^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: ترانس سینامیک اسید (CA)، محصول دامیناسیون فنیل‌آلانین در تمام بافت‌های گیاهی و جزء اصلی و فعال مواد غذایی گیاهی مورد استفاده انسان است. ترانس سینامیک می‌تواند رشد سلول‌های تومورهای مختلف انسان مانند سرطان روده بزرگ، لوسمی، تومور کبدی و همچنین ملانوم را مهار کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر و مکانیسم عمل ترانس سینامیک بر آپوپتوز سلول MCF-7 سرطان پستان است.

روش بررسی: به منظور بررسی اثر و مکانیسم عمل ترانس سینامیک، سلول‌های سرطان سینه با غلظت‌های مختلف ترانس-سینامیک (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-مولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. شاخص‌های آپوپتوز شامل قطعه قطعه شدن DNA و تظاهر فسفاتیدیل‌سرین در لایه بیرونی غشای پلاسمایی به ترتیب با استفاده از تست‌های TUNEL و فلوسایتومتری و ارزیابی اتصال Annexin V ارزیابی گردید.

یافته‌ها: مقدار LC50 ترانس-سینامیک در سلول‌های MCF-7 بر اساس ارزیابی زنده‌مانی به روش MTT، حدود ۵۰ میلی‌مولار تعیین شد. تیمار سلول‌ها با دوز ۱۰۰ میلی‌مولار ترانس-سینامیک سبب القا معنی‌دار شاخص‌های آپوپتوز گردید. بطوری که سلول‌های TUNEL⁺ و سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز Annexin V⁺ و Propidium Iodide (PI⁺) بطور معنی‌داری افزایش یافتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که ترانس سینامیک اسید با القای آپوپتوز دارای فعالیت ضدتوموری موثری در برابر سلول‌های MCF-7 است. این نتایج می‌تواند در درک بهتر مکانیسم ضدسرطانی ترانس سینامیک و تایید بی‌خطر بودن استفاده آن به عنوان یک داروی جایگزین و مکمل در درمان سرطان مفید باشد.

کلیدواژگان: آپوپتوز، ترانس-سینامیک اسید، سلول‌های سرطان سینه MCF-7.

۱-دانش‌آموخته دامپزشکی.

۲-دانشیار گروه علوم پایه.

۳-استادیار گروه زیست‌شناسی.

۱ و ۲- گروه بیوشیمی و سلولی-ملکولی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران

اهواز، اهواز، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:

مریم کلاهی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده

علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین و بحث برانگیزترین مشکلات سلامتی در زنان سراسر دنیا، سرطان سینه می‌باشد. سرطان سینه یک بیماری چندعاملی است که ژنتیک، عوامل هورمونی و تقابل بین اشخاص و محیط در ایجاد آن نقش دارد (۱). سرطان سینه در دنیا و ایران در بین سرطان‌های زنان رتبه اول ابتلا و مرگ و میر را به خود اختصاص داده است. این بیماری ۲۶ درصد از موارد سرطان تازه تشخیص داده شده را شامل شده است. به طوری که در جهان، میزان بروز آن ۳۸ در صد هزار نفر است و مسئول ۱۵ درصد از مرگ‌های مرتبط با سرطان در زنان می‌باشد. هرچند ایران یکی از کشورهایی است که میزان بروز سرطان سینه کمتری نسبت به سایر کشورها دارد، اما افزایش میزان بروز آن در سال‌های اخیر، این بیماری را به عنوان رایج‌ترین بدخیمی در میان زنان ایرانی تبدیل کرده است (۳). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که ۱۲/۶ درصد تمام موارد سرطان‌ها را در ایران سرطان سینه تشکیل می‌دهد (۴). بروز این بیماری در ایران حدود یک دهه قبل از کشورهای توسعه یافته اتفاق می‌افتد و بیش از ۳۰ درصد بیماران زیر ۳۰ سال سن دارند (۵).

طب گیاهی اغلب به عنوان درمان مکمل یا جایگزین درمان‌های استاندارد استفاده می‌شود. درمان گیاهی قدیمی‌ترین روش درمانی مورداستفاده در جهان با بیش از ۲۰۰۰ سال سابقه است (۶).

ترانس سینامیک اسید محصول دامیناسیون فنیل‌آلانین تحت تأثیر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیوم‌لیاز می‌باشد که از مسیرهای متابولیسمی مؤثر در فیزیولوژی عملکردی گیاهی تولید می‌شود. این ترکیب اولین پیش-ساز بیوستنز هزاران ترکیب فنیل‌پروپانویید گیاهی از جمله فلاونوئیدها، فلوون‌ها و کومارین‌ها است که در تمام بافت‌های گیاهان به وفور یافت می‌شود (۷ و ۸).

اسیدهای سینامیک به عنوان ترکیبات مهمی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و سیتوتوکسیک، ضد باکتری، آنتی‌موتاژنیک و تعدیل‌کننده‌ی ایمنی و همچنین برای اصلاح بیماری‌های دیگر به‌طور گسترده در طب سنتی به کار می‌روند (۷). ترانس سینامیک اسید تکثیر سلول‌های لوسمی (۹)، آدنوکارسینومای روده‌ی بزرگ، گلیوبلاستوما، ملانوم، پروستات، سرطان ریه (۱۰)، سارکوم استخوان (۱۱) و سلول‌های G2 هپاتیت (۱۲) و سلول‌های اپی‌تلایال کلیه (Verda RenO or VERO) را مهار می‌کند (۱۳). ترانس سینامیک اسید دارای اثر بازدارنده بر سلول‌های سرطان گردن رحم (U14) در موش است که منجر به آپوپتوز سلول‌های توموری می‌شود (۱۴).

مشتقات مربوط به ترانس‌سینامیک اسید همچون اسیدها، استرها، آمیدها، هیدرازیدها دارای خواص آنتی-اکسیدان هستند و با به حداقل رساندن اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (Low-Density Lipoprotein or LDL) فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود، شامل از بین بردن مستقیم گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species or ROS) را ارائه می‌دهند (۱۵). سمیت سلولی سینامالدهید در ملانوم، سرطان روده بزرگ و سینه، تومور کبدی، سرطان خون، سرطان دهانه رحم ریه، تخمدان، سیستم عصبی مرکزی، لنفوم، لوسمی موش، سرطان ریه موش، سرطان لنفوسیت‌ها، سلول‌های کبدی، سلول‌های جنینی و سرطان حنجره تأیید شده است. استرها و آمیدهای ترانس سینامیک اسید، سمیت سلولی معنی‌دار و انتخابی در رده‌های سلولی بدخیم را نشان می‌دهند (۷). مشتقاتی چون ۲- هیدروکسی سینامالدهید (2'-Hydroxycinnamaldehyde) و آنالوگ ۲- بنزوئیل سینامالدهید (2'-اوکسی

درصد بقا در محیط کشت DMEM حاوی ده درصد FBS کشت شدند. سلول‌های MCF-7 در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه به تعداد $10^3 \times 4$ سلول در حجم $150 \mu\text{L}$ محیط DMEM کشت داده شدند. پس از پر شدن حداقل ۵۰ درصد فضای فلاسک، غلظت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید (با درجه خلوص ۹۹/۹٪ سیگما، آمریکا) شامل ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-مولار که در حلال مناسب (آب به همراه DMSO با غلظت نهایی ۰/۲ درصد) حل گردیده بود، به محیط کشت فلاسک‌های محتوی این سلول‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. ترانس سینامیک اسید به صورت محلول استوک با غلظت $100 \times$ تهیه گردید و برای هر غلظت میزان مناسب از آن به هر فلاسک اضافه شد.

ارزیابی زنده‌مانی و تعیین LC50 با تست

MTT

به منظور تعیین LC50 از ارزیابی فعالیت حیاتی سلول با استفاده از تست احیا MTT استفاده شد. اساس این تست احیا MTT به رنگ فورمازون در حضور آنزیم‌های دهیدروژناز می‌باشد. میزان فرمازون تولید شده شاخصی از فعالیت حیاتی و زنده مانی سلول می‌باشد بدین منظور پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید (۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-مولار) به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تریپسینه و پس از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. ۵۰ میکرولیتر رسوب سلولی (تست) و ۵۰ میکرولیتر بافر PBS (بلانک) به صورت جداگانه به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (۵mg/ml) $0/005$ گرم MTT در ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS) افزوده و حداقل ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه 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

(Benzoyloxycinnamaldehyde) با تحریک گونه‌های اکسیژن فعال سلولی (ROS) منجر به نفوذپذیری میتوکندریایی و انتشار سیتوکروم C در سلول‌های لوسمی انسانی (Human Leukemia or HL-60) و القای آپوپتوز می‌شوند (۱۶). همچنین سینامالدئید با کاهش گلوپتایون (Glutathione) منجر به القای پراکسیداسیون (Peroxidation) چربی در سلول‌های کبدی جدا شده از رت نر می‌شود. در نتیجه سمیت سلولی القا شده و از تنفس میتوکندریایی ممانعت می‌شود (۱۵).

مطالعه خواص ژنوتوکسیک (Genotoxic) نشان می‌دهد که سینامالدئید باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2/M در سلول‌های HCT 116 و القا تقسیم کاسپاز ۳ و PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) می‌شود (۱۷). در سلول‌های سرطان گردن رحم U14 توقف سیکل سلولی در مرحله G2-M مبین این امر است که ترانس سینامیک اسید چرخه سلولی تومور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴). ترانس سینامیک اسید تکثیر و سنتز DNA سلول‌های Caco-2 (روده بزرگ انسان) را مهار می‌کند (۱۸). همچنین نفوذ سلول‌های ایمنی به بافت کبد توسط مشتقات سینامالدئید منجر به افزایش تولید محرک‌های ایمنی طولانی اثر بر روی سلول‌های T و اثرات بازدارنده‌ی شیمیایی در شکل‌گیری سرطان هپاتوسلولار در موش‌های ترانس ژنیک Hras12V می‌شود (۱۹). سینامالدئید باعث تمایز سلول T از سلول‌های دو مثبت CD4-CD8 به CD4 و یا سلول‌های یک مثبت CD8 می‌شود (۱۸). مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدسرطانی ترانس سینامیک اسید در برابر سلول‌های MCF-7 انجام گردید.

روش بررسی

سلول‌های رده MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و پس از شمارش و تعیین

و PI^+ ناحیه Q_2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا نکروزی با ویژگی: $Annexin-V^+$ و PI^+ . ناحیه Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی: $Annexin-V^-$ و PI^- و ناحیه Q_4 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با ویژگی: $Annexin-V^+$ و PI^- می‌باشد. فلئوروکروم‌های مورد استفاده فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) کنژوگه با $Annexin-V$ بود که در کانال FL_1 و PI و FL_2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور تعیین اثرات ترانس سینامیک اسید در جهت القا آپوپتوز و یا نکروز، درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم‌افزار دستگاه فلوسایتومتر (FCS Express) محاسبه و بر اساس درصد گزارش گردید.

ارزیابی قطعه‌قطعه شدن DNA کروموزومی با

روش TUNEL

بدین منظور از کیت In Situ Cell TUNEL Death Detection Kit, Fluorescein شرکت Roche آمریکا استفاده شد. پس از کشت سلول‌های MCF-7 با تعداد 5×10^7 در هر میلی‌لیتر و مجاورت آنها با غلظت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید به مدت ۲۴ ساعت، ابتدا سلول‌ها تریپسینه و جداسازی شدند. سلول‌ها با استفاده از بافرهای تثبیت-کننده و نفوذپذیر کننده آماده سازی و با $100 \mu l$ PBS شستشو گردیدند. به هر خانه ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش TUNEL حاوی آنزیم داکسی نوکلئوتید ترانسفراز انتهایی و نوکلئوتید نشان‌دار با فلورسین اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس سلول‌ها با PBS دو بار شستشو و در نهایت، ۵۰ میکرولیتر PBS به هر نمونه اضافه گردید. ۲۰ میکرولیتر از نمونه حاوی سلول به منظور ارزیابی و شمارش درصد سلول‌های مثبت ($TUNEL^+$) با استفاده از لام هموسیستمتر مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تعیین درصد سلول‌های مثبت ابتدا تعداد کل سلول‌ها با

۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر اساس مقایسه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. غلظتی از ترانس سینامیک اسید که سبب کاهش میزان تولید فورمازون به میزان ۵۰ درصد گردید به عنوان $LC50$ در نظر گرفته شد.

بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری

به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با دارو و قیاس آن با جمعیت سلولی در کنترل منفی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ $Annexin-V$ و پروپیدیوم یدید (PI) انجام گرفت. به این صورت که بعد از تیمار کردن سلول‌ها با چهار غلظت ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار از ترانس-سینامیک اسید و ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها تریپسینه شدند و با بافر فسفات سالین استریل (PBS) شستشوی سلول‌ها انجام گرفت. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ در میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتر اضافه گردید. به دنبال اضافه کردن بافر بایندینگ، ۱۰ میکرو لیتر از رنگ پروپیدیوم یدید (PI) و ۵ میکرولیتر از رنگ آنکسین ($Annexin-V$) به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شد. سپس تمامی محتویات را به آرامی با حرکت دست و تکان دادن میکروتیوب با یکدیگر مخلوط و یکدست نموده به طوری که رسوب سلول‌ها با مواد موجود به راحتی مخلوط شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت زمان ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند، در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری FACScan شرکت Becton Dickinson کشور امریکا انجام گرفت (۲۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت‌شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه Q_1 تا Q_4 صورت گرفت. به نحوی که ناحیه Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی: $Annexin-V^-$

های MCF-7 ۵۰ میلی مولار تعیین گردید. نتایج ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید در (نمودار A-۱) آمده است. حداکثر سمیت سلولی در غلظت ۲۰۰ میلی مولار ترانس سینامیک اسید دیده شد (نمودار B-۱).

ارزیابی شکست DNA کروموزومی با روش

تانل

نتایج تست TUNEL نشان داد که درمان سلول‌های MCF-7 با ترانس سینامیک اسید در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میلی مولار تأثیری بر شکست DNA کروموزومی در مقایسه با گروه کنترل نداشت ($p < 0/05$)، اما غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار ترانس سینامیک اسید سبب القا معنی‌دار شکست DNA کروموزومی در سلول‌های تیمار شده، شدند ($p < 0/05$). بالاترین سلول‌های TUNEL⁺ در سلول‌های تیمار شده با ترانس سینامیک اسید ۱۰۰ میلی مولار و پس از آن در غلظت ۲۰۰ میلی مولار مشاهده شد (نمودار ۲). تصویر ۱ تصویر میکروسکوپ فلورسنت سلول‌های TUNEL⁺ MCF-7 را نشان می‌دهد (تصویر ۱). سلول‌های سبزرنگ نشان‌دهنده سلول‌های TUNEL⁺ می‌باشند.

ارزیابی میزان آپوپتوز با تست انکسین

تصویر ۲ و ۳ نتایج تست انکسین در سلول‌های تیمار شده با محیط پایه حاوی ۰/۲ درصد DMSO و غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار ترانس سینامیک اسید پس از آنالیز سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با PI و Annexin V با روش فلوسایتمتری و نرم‌افزار FCS express و میکروسکوپ فلورسنت را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه نمایانگر Q صورت گرفت. به نحوی که ناحیه

استفاده از میکروسکوپ اینورت شمارش و سپس دستگاه بر روی حالت فلوروسنت تنظیم و تعداد سلول‌های مثبت فلورسنت سبزرنگ شمارش گردیدند. نتایج به صورت درصد سلول‌های مثبت نسبت به کل سلول‌ها گزارش گردید (۲۱).

تمامی آزمایشات بصورت سه بار تکرار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده در این پژوهش از نرم‌افزار کامپیوتری SPSS version 14 و برای بررسی اختلاف آماری بین میانگین پارامترهای مختلف در گروه‌های مورد آزمایش از Two Way ANOVA and Tukey استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج مورفولوژی

نتایج مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترانس سینامیک اسید نسبت به نمونه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی داشته‌اند. شکل سلول‌ها تحت اثر ترانس سینامیک اسید تفاوت‌های بارز و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند. تغییرات مورفولوژی در سلول‌های MCF-7 در زمان ۲۴ ساعت بیشترین اثرات سایتوتوکسیک را در غلظت ۱۰۰ میلی مولار دارا بود. سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های بالای ترانس سینامیک اسید نشان دهنده تغییرات مورفولوژیکی بارز از جمله تغییرات عمده 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.

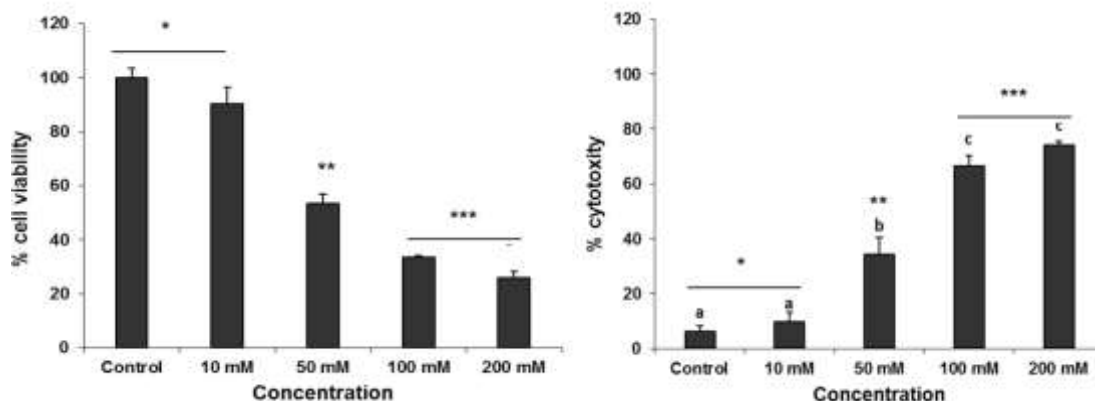
ارزیابی میزان زنده‌مانی و میزان سمیت سلولی

بر اساس نتایج تست MTT، LC50 ترانس سینامیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت در مورد سلول

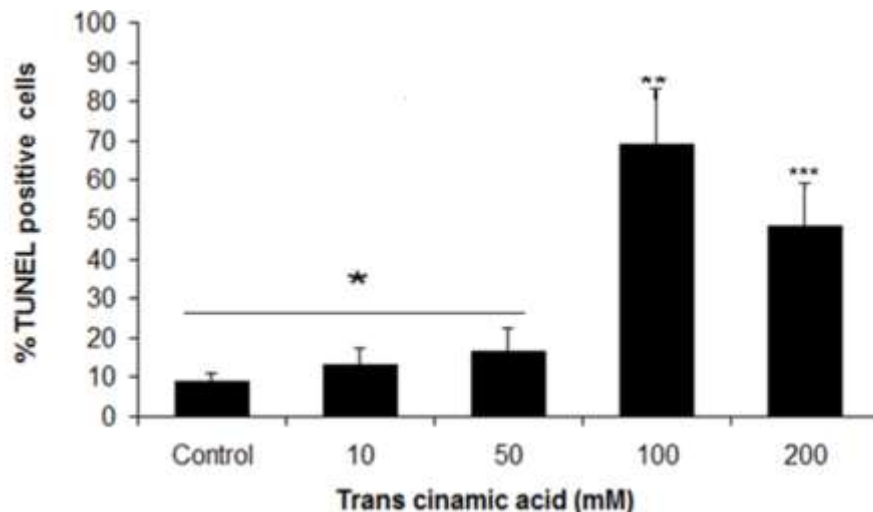
۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. در تمام تیمارها درصد سلول‌های آپوپتوزی زودرس بیش از گروه کنترل بود. درصد سلول‌های آپوپتوزی دیررس در تمام تیمارها بیش از گروه کنترل بود. درصد سلول‌های آپوپتوزی غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار ترانس-سینامیک اسید به ترتیب ۷/۶۳، ۱۰/۴۷، ۲۴/۱۲، ۳۴/۱۲ و ۱۹/۱۹ بود. بیشترین تعداد سلول‌های آپوپتوزی دیررس مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار بود (تصویر ۲ و ۳).

درصد سلول‌های نکروتیک در گروه‌های تیمار شده با ترانس سینامیک 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، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار ترانس سینامیک اسید به ترتیب ۱/۷۸، ۲/۶۹، ۳/۱۹، ۳/۵۷ و ۲/۲۳ بود.

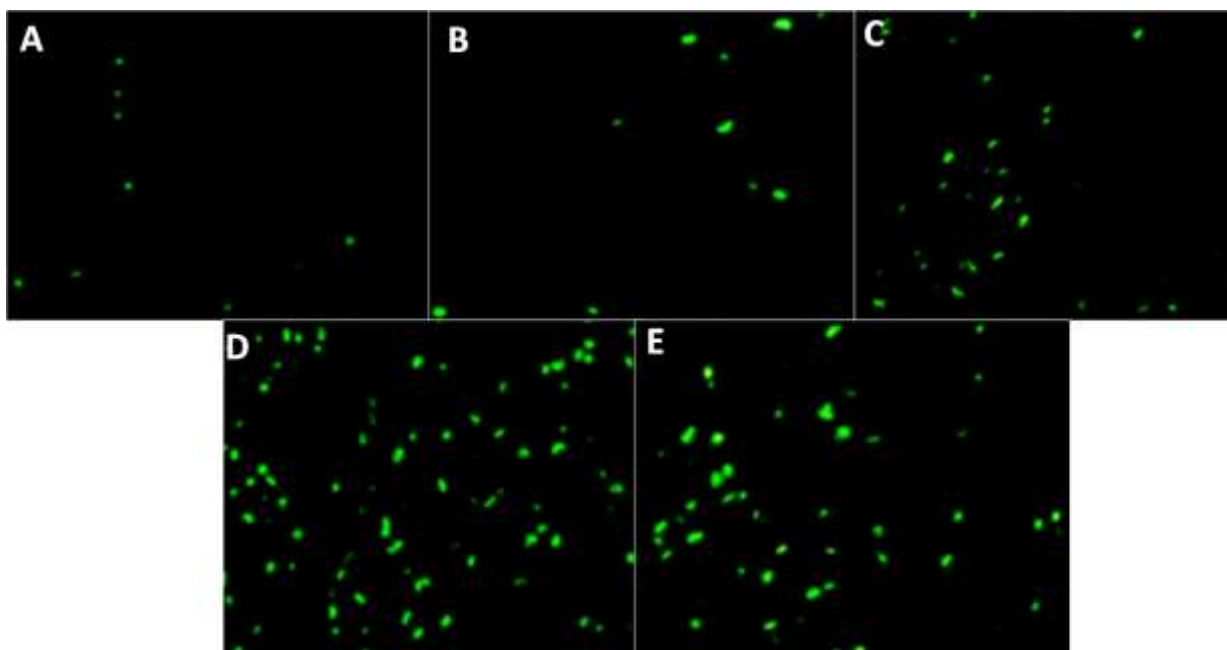
Q1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی PI^+ و $Annexin-V^-$ ناحیه Q2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا ویژگی PI^+ و $Annexin-V^+$ ناحیه Q3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی PI^- و $Annexin-V^-$ ناحیه Q4 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با ویژگی PI^- و $Annexin-V^+$ می‌باشد. در تصاویر میکروسکوپ فلورسنت سلول‌های نکروتیک (PI^+ و $Annexin-V^-$) در صورت وجود به رنگ قرمز، سلول‌های آپوپتوزی زودرس (PI^- و $Annexin-V^+$) به رنگ سبز، سلول‌های آپوپتوزی دیررس (PI^+ و $Annexin-V^-$) به رنگ سبز و قرمز و سلول‌های سالم (PI^- و $Annexin-V^-$) 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، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار ترانس سینامیک اسید به ترتیب ۵/۱۹، ۹/۳۲، ۱۴/۳۷، ۲۰/۰۷ و ۲۴/۱۶ بود که بیشترین درصد سلول‌های آپوپتوزی زودرس به ترتیب در تیمارهای



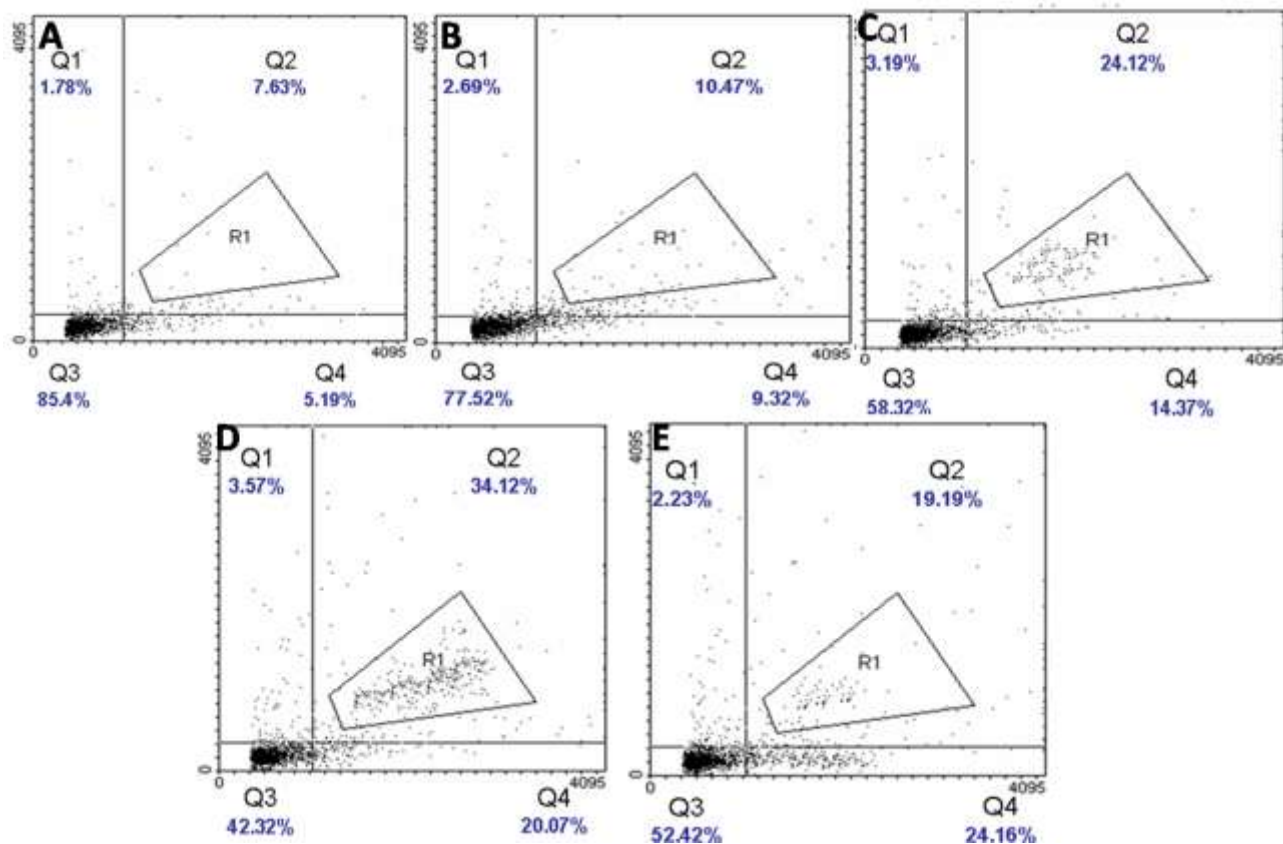
نمودار ۱: میزان زنده مانی (A) و سمیت سلولی (B)، سلول‌های MCF-7 در گروه‌های کنترل و تحت درمان با غلظت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید (۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار). IC50 ترانس سینامیک اسید در حدود ۵۰ میلی‌مولار بدست آمد. تعداد متفاوت ستاره‌ها در روی هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.



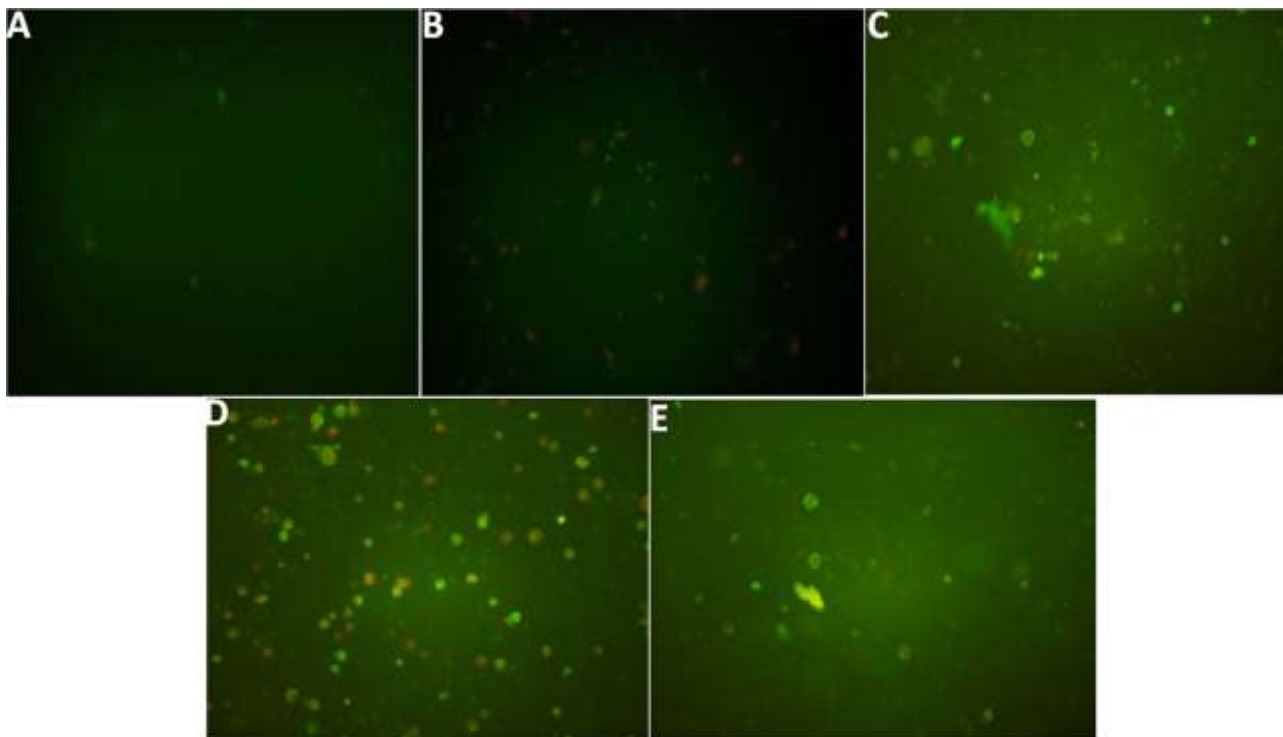
نمودار ۲: درصد سلول‌های $TUNEL^+$ MCF-7 درمان شده با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار ترانس سینامیک اسید به مدت ۲۴ ساعت. تعداد متفاوت ستاره‌ها در روی هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشد.



تصویر ۱: تصویر میکروسکوپ فلورسنت سلول‌های $TUNEL^+$ MCF-7 گروه کنترل ۲۴ ساعت پس از تیمار با محیط پایه حاوی ۰/۲ DMSO (بزرگنمایی $40\times$) (A) و پس از تیمار با ترانس سینامیک اسید ۱۰ میلی مولار (B)، ۵۰ میلی مولار (C)، ۱۰۰ میلی مولار (D) و ۲۰۰ میلی مولار (E) (بزرگنمایی $40\times$). سلول‌های سبزرنگ نشان‌دهنده سلول‌های $TUNEL^+$ می‌باشند.



تصویر ۲: نتایج تست فلوسایتومتری سلول‌های گروه کنترل تیمار شده با محیط پایه حاوی ۰/۲ درصد DMSO و رنگ‌آمیزی شده با PI و Annexin-V (A) و پس از تیمار با ترانس سینامیک اسید ۱۰ میلی مولار (B)، ۵۰ میلی مولار (C)، ۱۰۰ میلی مولار (D) و ۲۰۰ میلی مولار (E). سلول‌های نکروزی (Annexin-V⁻ و PI⁺): Q2، سلول‌های آپوپتوز شده دیررس (Annexin-V⁺ و PI⁺): Q1، سلول‌های آپوپتوز شده جوان (Annexin-V⁻ و PI⁻): Q4 و سلول‌های سالم (Annexin-V⁻ و PI⁻): Q3.



تصویر 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) و پس از تیمار با ترانس سینامیک اسید ۱۰ میلی مولار (B)، ۵۰ میلی مولار (C)، ۱۰۰ میلی مولار (D) و ۲۰۰ میلی مولار (E). سلول‌های نکروتیک (PI⁺ و Annexin-V⁻) قرمز، سلول‌های آپتوزی زودرس (PI⁻ و Annexin-V⁺) سبز، سلول‌های آپتوزی دیررس (PI⁺ و Annexin-V⁺) سبز و قرمز و سلول‌های سالم (PI⁻ و Annexin-V⁻) بدون رنگ.

بحث و نتیجه‌گیری

توسط سازمان FDA (Food and Drug Administration) تأیید شده است، در نتیجه می‌تواند به عنوان یک افزودنی غذایی با اثرات پیشگیری از سرطان و اثرات ضد سرطانی مصرف گردد. با این حال مکانیسم عملکردی ضد سرطانی این ترکیبات در سطح مولکولی تاکنون به خوبی مطالعه نشده است. نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار LC50 ترانس سینامیک سلول‌های MCF-7 بر اساس ارزیابی زنده‌مانی به روش MTT، حدود ۵۰ میلی مولار می‌باشد. ترانس سینامیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی مولار سبب القای شاخص‌های آپتوز در سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 پس از

در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای به منظور شناسایی ترکیبات طبیعی با خواص ضد سرطان انجام شده است. با این حال به دلیل فقدان اطلاعات کافی در خصوص مکانیسم مولکولی عملکردی بسیاری از این ترکیبات، کاربرد گسترده کلینیکی آن‌ها با تردیدهایی مواجه می‌باشد و مطالعات بیشتر به منظور شناسایی مکانیسم مولکولی ضد سرطانی بسیاری از ترکیبات با منشأ طبیعی به ویژه ترکیبات مشتق از گیاهان ضروری می‌باشد (۷).

ترانس سینامیک اسید یکی از پرمصرف‌ترین ترکیبات گیاهی است که به دلیل خواص سمی پایین آن،

مولار گزارش شده است. در حالی که همین غلظت تأثیری بر سلول‌های رده NGM نداشته است. غلظت ۳/۲ میلی-مولار ترانس سینامیک اسید سبب توقف سیکل سلولی در فاز S در رده سلولی HT-144 شده است. اما همین غلظت تأثیری بر سیکل سلولی رده NGM نداشته است (۲۳). در مطالعه حاضر بر روی سلول‌های رده MCF-7 مقدار LC50 برابر ۵۰ میلی‌مولار بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رده‌های سلولی مختلف نسبت به ترانس سینامیک اسید ممکن است حساس یا مقاوم باشند.

همچنین نتایج حاصل از تحقیق Niero و Machado-Santelli نشان‌دهنده القا آپوپتوز در ۲۵ درصد سلول‌های رده HT-144 در پاسخ به درمان با دوز ۳/۲ میلی‌مولار ترانس سینامیک اسید بود. در حالی که تعداد سلول‌های آپوپتوتیک 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 (۲۱). در مطالعه حاضر بر اساس روش فلوسایتومتری با استفاده از Annexin V و پروپیوم دیدید ۳۴/۲ درصد سلول‌های سرطانی تحت درمان با ترانس سینامیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌مولار ویژگی‌های آپوپتوز انتهایی را نشان دادند که نشان‌دهنده مقاومت بالای رده سلولی MCF-7 نسبت به آثار مهار رشد و آپوپتوز ترانس سینامیک اسید در مقایسه با سلول‌های لوسمی می‌باشد.

با وجود اثرات ژنوتوکسیک مشاهده شده در مطالعه Niero و Machado-Santelli و نیز با توجه به فعالیت ضد پرولیفراتیو ترانس سینامیک اسید در غلظت ۳/۲ میکرومولار در سلول‌های ملانوم رده HT-144 استفاده بالقوه از آن به عنوان ادجوانت (Adjuvants) در درمان ملانوم پیشنهاد شده است (۲۱). با این حال با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعه Niero و Machado-Santelli و حساسیت رده‌های مختلف

۲۴ ساعت شد. به طوری که شکست DNA کروموزومی و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک انتهایی در حال مرگ بر اساس بروز پروتئین‌های باند شونده به Annexin به طور وابسته به دوز افزایش یافت.

در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است، اثر ضد توموری ترانس سینامیک اسید بر برخی از رده‌های سلولی سرطانی شناسایی شده است. تاکنون اثر مهاری ترانس سینامیک اسید بر رشد تومورهای کارسینوما رحم و سرویکس (۱۴)، لوکمی (۹)، آدنوکارسینوما کلون (۱۸)، گلیوبلاستوما، ملانوما، پروستات، کارسینوم ریه (۱۰) و سارکومای استخوان (۱۱) در شرایط مدل‌های حیوانی مورد تأیید قرار گرفته است.

Zhang و همکاران در مطالعه خود، اثر و مکانیسم عمل رقت‌های مختلف ترانس سینامیک اسید بر روی تکثیر و آپوپتوز سلول‌های لوسمی K562 را بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داده است که درمان طولانی با رقت پایین ترانس سینامیک منجر به توقف وابسته به دوز فاز G0/G1 چرخه سلولی سلول‌های لوسمی K562 و القای تمایز در کشت سلول‌های لوسمی می‌گردد. همچنین این تحقیق نشان داد که ترانس سینامیک اسید به عنوان یک فاکتور بسیار مهم در کاهش احتمال متاستاز سلولی می‌شود (۲۲). دوز مؤثر ترانس سینامیک اسید در مهار سلول‌های لوسمی K562 نسبت به دوز مؤثر به دست آمده در این تحقیق (۱۰۰ میلی‌مولار)، در سلول‌های سرطانی MCF-7 پایین‌تر بوده است.

در مطالعه Niero و Machado-Santelli مقایسه پتانسیل سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک درمان با طیف وسیعی از رقت‌های ترانس سینامیک اسید در ملانوم انسان (HT-144) و رده سلولی ملانوسیت NGM مورد بررسی قرار گرفته است. LC50 ترانس سینامیک اسید در مورد سلول‌های HT-144 ۲/۴ میلی-

آپوپتوز می‌شود. در این مطالعه در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ترانس سینامیک اسید در مقایسه با سایر غلظت‌ها سبب افزایش سلول‌های $TUNEL^+$ و سلول‌های آپوپتوزی در حال مرگ $ANEXIN^+$ و PI^+ گردید. با این حال مکانیسم دقیق القا آپوپتوز توسط ترانس سینامیک اسید ناشناخته می‌باشد. Pontiki و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که سینامالدئید با کاهش گلوکاتایون منجر به القای پراکسیداسیون (Peroxidation) چربی در سلول‌های کبدی جدا شده از رت نر می‌شود. در نتیجه سمیت سلولی القا شده و از تنفس میتوکندریایی ممانعت می‌شود (۱۵). مشتقاتی چون ۲- هیدروکسی سینامالدئید (Hydroxycinnamaldehyde) و آنالوگ ۲- بنزوئیل اوکسی سینامالدئید (Benzoyloxycinnamaldehyde) با تحریک ROS منجر به نفوذپذیری میتوکندریایی و انتشار سیتوکروم C در سلول‌های لوسمی انسانی (۶۰ Human Leukemia 60 (HL-60)) و القا آپوپتوز می‌شود (۱۶).

Ng و Wu در مطالعه خود فعالیت القا آپوپتوز مشتق فعال سنتزی ترانس سینامیک اسید به نام سینامالدئید را بر سلول هیپاتوما کبدی انسان بررسی و نشان دادند که این ترکیب سبب افزایش بیان فاکتور آپوپتوتیک Bax، مهار فاکتورهای آنتی آپوپتوز Bcl2 و Mcl-1 و شکست Bid و نهایتاً القا بیان کاسپاز ۸ می‌شود. در مطالعه دیگری توسط همین گروه بر روی سلول‌های هیپاتیت کبدی انسان HepG2، درمان این سلول‌ها با سینامالدئید سبب مهار بیان پروتئین‌های Bcl-1 و XI و با فعال کردن کاسپاز ۸ منجر به صدور فرمان آپوپتوز می‌گردد و از طرفی باعث القا پروتئین‌های آپوپتوتیک Bax، P53 و پروتئین سطحی CD95 گردید (۲۴).

سلول‌های سرطانی به ترانس سینامیک اسید نمی‌توان دوز یکسانی را در درمان بالینی جهت درمان کمکی ترانس سینامیک اسید بکار برد.

Liu و همکاران در مطالعه جامعی به بررسی اثرات ضد توموری ترانس سینامیک اسید در رده‌های مختلف سلولی نوروکتودرم (Neuroectodermal) و اپی‌تلیال شامل ملانوما (A375, MEL 1011), کارسینومای پروستات (Du 145, PC3), گلیوبلاستوما (LnCaP, U251, A172) و سرطان ریه (A549) پرداختند. در این مطالعه کمترین IC_{50} ترانس سینامیک اسید (۱۰ میلی‌مولار) مربوط به رده ملانوما و بیشترین IC_{50} مربوط به رده‌های گلیوبلاستوما (۴۸ میلی‌مولار) به دست آمده است. نتایج این تحقیق نشان داد که IC_{50} سلول‌های فیبروبلاست نرمال ۲۰ برابر IC_{50} سلول‌های توموری است که نشان‌دهنده ایمن بودن ترانس سینامیک اسید در درمان سلول‌های توموری می‌باشد (۱۰).

Pontiki و همکاران به روش سنتزی مشتقات متنوعی از ترانس سینامیک اسید را تولید و فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و سیتوتوکسیک را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این مطالعه LC_{50} ترانس سینامیک اسید بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی شامل OAW42 تخمدان، A549 ریه، HT-29 کلون، MDA-MB-231 سرطان سینه کمتر از ۲۴۰ میکرومولار گزارش گردیده است که نشان‌دهنده مقاومت بالای این سلول‌ها به ترانس سینامیک اسید می‌باشد (۱۵).

صرف‌نظر از حساسیت یا مقاومت رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که سبب پاسخ متغیر آن‌ها به مقادیر مختلف ترانس سینامیک اسید می‌شود، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ترانس سینامیک اسید از طریق القا مسیرهای خارجی و داخلی آپوپتوز، سبب بروز

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق و سایر محققین نشان می‌دهد که رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی نسبت به دوزهای مختلف ترانس سینامیک اسید حساس می‌باشد و این ترکیب می‌تواند سبب القا شاخص‌های آپوپتوز و مرگ سلولی شود. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که ترانس سینامیک اسید می‌تواند به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین ترکیبات گیاهی مورد استفاده انسان، در بروز آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 توأم با افزایش سلول‌های $TUNEL^+$ ، PI^+ و $Anexin^+$ نقش داشته‌باشد.

قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره ۹۴/۶/۴/۶۳۶۴۱۰ و ۹۴/۳/۰۲/۸۶۹۱۸) تقدیر و قدردانی می‌نمایند.

Chew و همکاران با استفاده از روش فلوسایتومتری نشان دادند که ۸۰ میکرومولار سینامالید سبب توقف سیکل سلولی در مرحله G2/M و القا بیان کاسپاز ۳ و نهایتاً آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون HCT-116 می‌شود (۱۷). در سلول‌های سرطان گردن رحم U14 توقف سیکل سلولی در مرحله G2-M مبین این امر است که ترانس سینامیک اسید چرخه سلولی تومور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴). ترانس سینامیک-اسید تکثیر و سنتز DNA سلول‌های Caco-2 (روده بزرگ انسان) را مهار می‌کند (۱۸).

در مطالعه Machado-Santelli و Niero درمان سلول‌های ملانوما رده HT-144 با دوز ۳/۲ میلی‌مولار ترانس سینامیک اسید سبب افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوزی انتهایی PI^+ گردید. در حالی که این دوز، تأثیری بر فعال‌سازی پروتئین ضد آپوپتوزی کاسپاز-۹ در این سلول‌ها نداشت. در سلول‌های NGM این دوز هیچ تأثیری بر شاخص‌های آپوپتوز نداشت (۲۱).

منابع

- 1-Johnson K, Pan S and Mao Y. Risk factors for male breast cancer in Canada, 1994-1998. *Eur J Cancer Prev.* 2002; 11(3): 253-63.
- 2-Guinee VF. Epidemiology of breast cancer. In: *Comprehensive management of benign malignant disease.* 1998; PP: 339-40.
- 3-Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M and Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J.* 2007; 13(4): 383-91.
- 4-Azizi F, Hatami H and Janghorbani M. *Epidemiology and control of common diseases in Iran.* 3ed. Tehran: Khosravi publication. 2004; 12-7.
- 5-Fazeli Z, Najafian-Zade M, Eshrati B and Almasi-Hashiani A. Five-year evaluation of epidemiological, geographical distribution and survival analysis of breast cancer in Markazi Province, 2007-11. *AMUJ.* 2014;16(80):72-
- 6-Ma H, Carpenter CL, Sullivan-Halley J and Bernstein L. The roles of herbal remedies in survival and quality of life among long-term breast cancer survivors--results of a prospective study. *BMC Cancer.* 2011; 11: 222.
- 7-Carvalho AA, Andrade LN, de Sousa EBV and de Sousa DP. Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. *Bio Med Res Int.* 2014; 2015: 21-42.
- 8-Liu C, Liu Y and Yan X. Effects of plumbagin on the human breast cancer cell mda-mb-231 in vitro. *West China J Pharmaceut Sci.* 2008; 23: 1044-47.
- 9-Zhang LP and Ji ZZ. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity of cinnamic acids, their derivatives and analogues. *Acta Pharmaceutica Sinica.* 1992; 27(11): 817-23.
- 10-Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ and Samid D. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention, *Int J Cancer.* 1995; 62(3): 345-50.

- 11-Zhang Q, Wang Y and Chai W. Induced-differentiation effects of cinnamic acid on human osteogenic sarcoma cells cultured primarily in vitro. *Zhonghua Zhongliu Fangzhi Zazhi*. 2009; 16(9): 668-72.
- 12-Bemani E, Ghanati F, Boroujeni LY and Khatami F. Antioxidant activity, total phenolics and taxol contents response of hazel (*Corylus avellana* L.) cells to benzoic acid and cinnamic acid. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2012; 40 (1): 69-73.
- 13-Gravina HD, Tafuri NF, Silva Júnior A, Fietto JL, Oliveira TT, Diaz MA and Almeida MR. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Res Vet Sci*. 2011; 91(3): 158-62.
- 14-Zhang, Y.; Yang, XY.; Kunag, ZS. and Xiao, C.). Inhibitory effect of cinnamic acid germanium on growth of uterocervicalcarcinoma (U14) cells in mice. *Linchuang Yu Shiyan Binglixue Zazhi*. 2010; 26: 467-70.
- 15-Pontiki E, Litina DH, Litinas K and Geromichalos G. Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *Molecules* 2014; 19(7): 9655-74.
- 16-Ka H, Park HJ, Jung HJ, Choi JW, Cho KS, Ha J and Lee KT. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *Cancer Letters*. 2003; 196(2): 143-52.
- 17-Chew EH, Nagle AA, Zhang Y, Scarmagnani S, Palaniappan P, Bradshaw TD, Holmgren A and Westwell AD. Cinnamaldehydes inhibit thioredoxin reductase and induce Nrf2: potential candidates for cancer therapy and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48(1): 98-111.
- 18-Ekmekcioglu C, Feyertag J and Marktl W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Letters*. 1998; 128(2): 137-144.
- 19-Moon EY, Lee MR, Wang AG, Lee JH, Kim HC, Kim HM, Kim JM, Kwon BM and Yu DY. Delayed occurrence of H-ras12V-induced hepatocellular carcinoma with long-term treatmentwith cinnamaldehydes. *Eur J Pharmacol*. 2006; 530(3): 270-75.
- 20-Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol*. 2011; 682:3-13.
- 21-Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, Kim EE and Podoloff DA. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using 99mTc-EC-annexin V. *Cancer Biother Radiopharm*. 2001; 16(1):73-83.
- 22-Zhang J, Xiao A, Wang T, Liang X, Gao J, Li P and Shi T. Effect and mechanism of action of cinnamic acid on the proliferation and apoptosis of leukaemia cells. *Biom Res*. 2014; 25(3): 405-8.
- 23-Niero ELO and Machado-Santelli GM. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *J Experim Clin Cancer Res*. 2013; 32: 31.
- 24-Ng LT and Wu SJ. Antiproliferative activity of Cinnamomum cassia constituents and effects of pifithrin-alpha on their apoptotic signaling pathways in Hep G2 cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 492148.

The Effect of Trans-Cinnamic Acid on Apoptotic Indexes in Cancer Cells MCF7

Faezeh Zeinivand¹, Mohammad Reza Tabandeh², Maryam Kolahi^{3*}

1-Graduate of Veterinary Medicine.

2-Associated Professor of Biochemistry and Molecular Biology.

3-Assistance Professor of Biology.

1,2-Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:

Maryam Kolahi; Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Tel: +986133331045

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Trans-cinnamic acid (CA), a deamination product of phenylalanine in all plant tissues, is the main active ingredient used by the human from plant-containing foods. CA can inhibit the growth of various human tumor cell lines such as colorectal, leukemia, hematoma, as well as melanoma. This study aims to investigate the effect and action mechanism of CA on apoptosis of MCF-7 breast cancer cells.

Subjects and Methods: MCF-7 breast cancer cells treated with different concentrations of CA (0, 10, 50, 100 and 200 mM) for 24 h. Cell viability was determined using MTT assay. Apoptosis markers including DNA fragmentation, phosphatidylserine exposure at the outer leaflet of the plasma membrane measured using TUNEL and flow cytometry and Annexin V affinity.

Results: Viability assay showed that the IC₅₀ of CA in MCF-7 cells was about 50 mM. CA at dose of 100 mM significantly induced the apoptosis after 24 h treatment as assessed by TUNEL⁺ cells and evidence of late apoptotic cells with Annexin V⁺ and propidium iodide (PI⁺). [provide data here] [with P values].

Conclusion: The results showed that CA with apoptotic activity is an effective anti tumor against MCF-7 cells. CA can inhibit the growth of MCF-7 cells by inducing cell apoptosis. The results can be helpful in understanding the anticancer mechanism of CA and gain further support for its safe use as an alternative and complementary drug in cancer therapy.

Keywords: Apoptosis, MCF-7 Cancer cell line, Trans cinnamic acid.

► Please cite this paper as:

Zeinivand F, Tabandeh MR, Kolahi M. The Effect of Trans-Cinnamic Acid on Apoptotic Indexes in Cancer Cells MCF7. *Jundishapur Sci Med J* 2016;15(6):663-676.

Received: Dec 13, 2015

Revised: Dec 31, 2016

Accepted: Feb 6, 2017