Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 3, Autumn 2023 ORIGINAL ARTICLE

Investigating the synergistic effects of tannic acid and tamoxifen in SKBR3 cells with the approach of HER2, EGFR expression and apoptosis induction by real time PCR and flow cytometry methods

Mohamad Shourmij[1], Javad Khalili fard[2], Parvaneh Najafizadeh[3], Zahra Mousavi[4]

[1] PhD, Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4]Professor, Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: HER2-positive breast cancer is one of the most aggressive subtypes of breast cancer, accounting for approximately 30% of all diagnosed cases. These cases of cancer are associated with decreased survival, tumor invasion, and overall poor prognosis. Unfortunately, a large number of patients are resistant to conventional treatments. Various reports have shown that tamoxifen has a response rate of 10-15% in estrogen-negative and HER2-positive tumors. The use of natural chemical sensitizers in combination with chemotherapy drugs can provide promising help in cancer treatment by increasing the effectiveness of chemotherapy drugs.

Materials and methods: In this study, the chemical sensitization effect of tannic acid with tamoxifen was investigated in SKBR3 cells using real time PCR and flowcytometry tests.

Results: According to the obtained results, it was found that tamoxifen and tannic acid alone cannot significantly reduce the expression level of HER2, but their combination causes a significant decrease in the expression level of EGFR and HER2. Also, the results of flow cytometry showed that the combination of tannic acid with tamoxifen caused a significant increase in the percentage of apoptosis compared to the control group, tamoxifen and tannic acid alone.

Conclusion: In general, it can be concluded that tannic acid can act as a chemical sensitizing polyphenol in combination with tamoxifen and is a promising option for clinical use.

Keywords: *Tamoxifen, Tannic acid, HER2, EGFR, Chemical sensitizer, Apoptosis.*

Cited as: Shourmij M, Khalili fard J, Najafizadeh P, Mousavi Z. Investigating the synergistic effects of tannic acid and tamoxifen in SKBR3 cells with the approach of HER2, EGFR expression and apoptosis induction by real time PCR and flow cytometry methods. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(3): **240-247.**

Correspondence to: Zahra Mousavi
Tel: *+98 9125081304*
E-mail: mosavi50@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0001-6524-491X
Received: 18 Jan 2023; **Accepted:** 29 Apr 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲، صفحات ۲۴۰ تا ۲۴۷

Original Article

اثرات هم افزایی تانیک اسید و تا موکسیفن در سلول های SKBR3 با رویکرد به بیان HER2 ،EGFR و القای آپوپتوز به روش real time PCR و فلوسیتومتری

محمد شورمیج[۱]، جواد خلیلی فرد[۲]، پروانه نجفی زاده[۳]، زهرا موسوی[۴]

[۱] دانش آموخته دکتری تخصصی فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] استادیار سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳] استادیار دارو شناسی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۴]استاد سم شناسی، گروه فارماکولوژی- سم شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *سرطان پستان با افزایش بیان HER2 (HER2 مثبت) یکی از تهاجمی‌ترین زیرشاخه‌های سرطان پستان است که تقریباً ۳۰ درصد از موارد تشخیص داده شده را تشکیل می‌دهد. این موارد از سرطان با کاهش بقا، افزایش تهاجم تومور و پیش آگهی کلی ضعیف همراه است. متأسفانه، تعداد زیادی از بیماران به درمان‌های مرسوم مقاومت نشان می‌دهند. گزارشات مختلف نشان داده اند تاموکسیفن نرخ پاسخ دهی ۱۰ تا ۱۵ درصدی را در تومورهای استروژن منفی و HER2 مثبت نشان می دهند. استفاده از حساس کننده های شیمیایی طبیعی در ترکیب با داروی شیمی درمانی می تواند کمک امیدوار کننده ای را در درمان سرطان با افزایش اثر بخشی داروهای شیمی درمانی ارائه دهد.*

روش بررسی: *در این مطالعه اثر حساس کنندگی شیمیایی تانیک اسید با داروی تاموکسیفن در سلولهای SKBR3 با استفاده از آزمایشات real time PCR و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که تاموکسیفن و تانیک اسید هر کدام به تنهایی نمی توانند از لحاظ آماری میزان بیان HER2 را به طور معناداری کاهش دهند و در مورد EGFR تانیک اسید برخلاف تاموکسیفن توانست میزان بیان را به طور معناداری کاهش دهد. اما ترکیب آنها موجب کاهش معناداری در سطح بیان EGFR و HER2 می شود. همچنین نتایج فلوسیتومتری نشان داد ترکیب تانیک اسید با تاموکسیفن موجب افزایش معناداری در درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل، تاموکسیفن و تانیک اسید به تنهایی شد.*

نتیجه‌گیری: *به طور کلی می توان گفت که تانیک اسید می تواند به عنوان یک پلی فنول در ترکیب با تاموکسیفن بر روی سلول‌های سرطانی با بیان میزان بالای HER2، به عنوان حساس کننده شیمیایی عمل کند.*

واژگان کلیدی: *تاموکسیفن، تانیک اسید، HER2، EGFR، حساس کننده شیمیایی، آپوپتوز.*

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین بدخیمی در زنان و عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. در سال‌های اخیر، سرطان پستان در بین زنان ایرانی شایع‌تر شده است و به ششمین عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان تبدیل شده است. آمارهای موجود در ایران حاکی از آن است که سالانه ۶۱۶۰ بدخیمی پستان در کشور تشخیص داده می شود که از این تعداد ۱۰۶۳ مورد منجر به مرگ می‌شود (۱). با توجه به وجود نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی، مانند گیرنده استروژن، گیرنده پروژسترون یا نشانگرهای مولکولی فاکتور رشد اپیدرمی۲ (HER2)، سرطان پستان را می توان به سه زیر گروه اصلی: گیرنده هورمونی مثبت

آدرس نویسنده مسئول: تهران، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده داروسازی، زهرا موسوی (**email**: mosavi50@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-6524-491X
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۹

(استروژن مثبت، پروژسترون مثبت، HER2 منفی)، HER2 مثبت (استروژن و پروژسترون منفی)، و سرطان پستان سه گانه منفی (استروژن و پروژسترون منفی، HER2 منفی) طبقه بندی کرد. در میان آنها، سرطان پستان با گیرنده استروژن مثبت تقریباً ۶۰٪ تا ۷۵٪ از تمام بیماران مبتلا به سرطان پستان را تشکیل می‌دهد. در میان همه سرطان‌های پستان، تومورهایی با بیان استروژن منفی که ۲۵ تا ۳۰ درصد سرطان پستان را تشکیل می‌دهند به دلیل ماهیت تهاجمی و پتانسیل متاستاتیک بالا خطرناک شناخته می‌شوند. به جز برای بیماران با زیرگروه سرطان پستان تقویت کننده HER2، درمان اصلی برای بیماران مبتلا به سرطان پستان استروژن منفی، شیمی درمانی است. با این حال، نتایج بالینی رضایت بخشی در این زمینه وجود ندارد. بنابراین، کشف رویکردهای درمانی جدید برای پیشبرد نتایج درمانی بیماران مبتلا به سرطان پستان استروژن منفی مورد نیاز است (۲, ۳).

تاموکسیفن (TAM) تعدیل کننده انتخابی گیرنده استروژن است که به عنوان آنتاگونیست استروژن در بافت پستان عمل می‌کند، در حالی که به عنوان آگونیست استروژن در بافت رحم عمل می‌کند. تاموکسیفن به گیرنده استروژن متصل می‌شود تا یک مجتمع هسته‌ای تشکیل دهد که فعالیت رونویسی گیرنده استروژن را مسدود می‌کند، در نتیجه سنتز DNA را کاهش می‌دهد و اثر استروژن را مهار می‌کند (۴). تاموکسیفن اثرات بالینی قابل توجهی را در کاهش میزان عود سرطان پستان به میزان ۴۰ تا ۵۰ درصد نشان داده است و می‌تواند مرگ و میر و میزان بهبودی موقت پس از درمان را کاهش دهد با این حال، علاوه بر نگرانی برای بقا و رشد سلول های متحمل به تاموکسیفن، عوارض جانبی مرتبط با درمان تاموکسیفن وجود دارد که می‌توان به گرگرفتگی، افزایش خطر سرطان آندومتر، و در موارد نادر، ناهنجاری‌های کبدی اشاره کرد. فعالیت ضد استروژنی تاموکسیفن، با رقابت با استروژن برای اتصال به گیرنده در بافت تومور، مکانیسم اصلی اثر آن در نظر گرفته می‌شود و استفاده کمکی تاموکسیفن پس از برداشتن اولیه تومور استروژن مثبت پستان، خطر عود را کاهش می‌دهد (۵, ۶). جالب توجه است که در آزمایشات بالینی، تاموکسیفن نرخ پاسخ دهی ۱۰ تا ۱۵ درصدی را در تومورهای بدون بیان استروژن نشان می‌دهد. علاوه بر این، گزارش شده است که درمان کمکی تاموکسیفن پس از برداشتن کارسینوم مجرای پستان در محل (DCIS: Ductal carcinoma in situ)، شکلی از کارسینوم غیرتهاجمی پستان، خطر عود را حتی در ضایعات بدون بیان استروژن کاهش می‌دهد. این یافته‌های بالینی نشان می دهد که تاموکسیفن دارای خاصیت ضد سرطانی مستقل از استروژن نیز است (۷).

اسید تانیک متعلق به کلاس تانن‌های قابل هیدرولیز است و از یک هسته پنتاگالویل گلوکز استری شده در تمام گروه‌های هیدروکسیل عملکردی با مولکول های اسید گالیک تشکیل شده است. تانیک اسید یک عامل بالقوه ضد سرطان است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که فعالیت آپوپتوز در سرطان پستان و سلول‌های سرطانی پروستات در پاسخ به قرار گرفتن در معرض عصاره های تانن افزایش می‌یابد. چندین مطالعه نشان داده‌اند که درمان‌های ترکیبی با محصولات طبیعی و تاموکسیفن می‌تواند حساسیت و سمیت سلولی سلول‌های سرطان پستان در پاسخ به تاموکسیفن را بهبود بخشند (۸). لذا این مطالعه با هدف بررسی اثرات هم افزایی داروی تاموکسیفن و تانیک اسید بر میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها، میزان بیان EGFR،HER2 و القای آپوپتوز در رده سلولی SKBR3 (یک رده سلولی سرطان پستان انسان با بیان بیش از حد HER2) انجام شد.

مواد و روشها

بخش سلولی

رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی SKBR3 از مرکز منابع ژنتیکی و بیولوژیکی ایران تهیه و در محیط کشت (DMEM, Biowest) حاوی ۵۰ واحد پنی سیلین، ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵ درصد اتمسفر نگهداری شدند.

تست MTT

درصد زنده ماندن سلول های SKBR3 بعد از تیمار با غلظت‌های

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برایReal Time-PCR

Primer sequence	Genes
5’-GCTTTGTGGTCATCCAGAA-3’	HER2-F
5’-CTCCAGCCCTAGTGTCAG-3’	HER2-R
5’-CTCACGCAGTTGGGCACTTT-3’	EGFR-F
5’-TCATGGGCAGCTCCTTCAGT-3’	EGFR-R
5’-CTCACGCAGTTGGGCACTTT-3’	GAPDH- F
5’-GATGACAAGCTTCCCGTTCTC-3’	GAPDH- R

مختلف از تاموکسیفن و تانیک اسید با استفاده از روش کاهش تترازولیوم بروماید (MTT) ارزیابی شد و جذب آنها در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از یک میکروپلیت خوان (Synergy H1، BioTek، ایالات متحده آمریکا) تعیین شد. سپس، مقدار IC50 برای تاموکسیفن و تانیک اسید با تجزیه و تحلیل رگرسیون غیر خطی (درصد مهار در برابر غلظت) تعیین شد و در آزمایش‌های بعدی استفاده شد (۹).

تست Real time PCR

محیط کشت سلول‌های سرطانی ۴۸ ساعت پس از تیمار در ۱ میلی لیتر RNAX-PLUS خراش داده شد (سیناژن، ایران). طبق دستورالعمل سازنده، RNA کل از نمونه ها با کیت سیناژن (محلول RNX-Plus، سیناکلون، ایران) استخراج شد. باقیمانده DNA ژنومی حذف شد و RNA حاصل برای تیمار DNase با DNase بدون RNase (فرمنتاس، ایالات متحده آمریکا) انتخاب شد. چگالی نوری RNA پس از خالص‌سازی و کمی‌سازی با نانو قطرات در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Nano Drop-ND-1000,آمریکا). یک کیت سنتاز cDNA (کیاژن، ایران) برای سنتزcDNA استفاده شد. سپس، یک RT-PCR کمی (qRT-PCR) برای تعیین اثر QBG بر سطوح بیان ژن انجام شد. در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، مخلوط RT-PCR حاوی ۳ میکرولیتر از نمونه cDNA، 10 میکرولیتر MasterMix و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ pmol) بود. پروتکل زیر برای qPCR استفاده شد. پس از یک مرحله دناتوراسیون ۲ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۲۵ چرخه (به ترتیب ۹۴ و ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۱۵ و ۳۰ ثانیه) وجود داشت. GAPDH به عنوان ژن خانه داری برای عادی سازی داده ها استفاده شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای اعمال شده را نشان می دهد. هر آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد و یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد (۱۰).

تست فلوسیتومتری

آپوپتوز در سلول های SKBR3 با استفاده از روش Annexin-V-FLUOS در آزمایشگاه شرکت زیست پژوه افرا اندازه گیری شد. رنگ‌آمیزی PI برای تمایز سلول‌های نکروزه در نظر گرفته شد. برای بررسی سلول‌ها از یک سیتومتر کالیبر FACS Becton (Dickinson، San Diego، CA) استفاده شد (۱۱).

تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار به دست آمد. برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. معنی‌داری آماری با P<۰/۰۵ نشان داده شد. برای تحلیل و تهیه نمودار از نرم افزار Prism 6 استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق منتج از پایان نامه دوره دکترای تخصصی دکتر محمد شورمیج دانش آموخته دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی آزاد اسلامی با کد اخلاق به شماره IR.IAU.TMU.REC.1398.206 است.

یافته‌ها

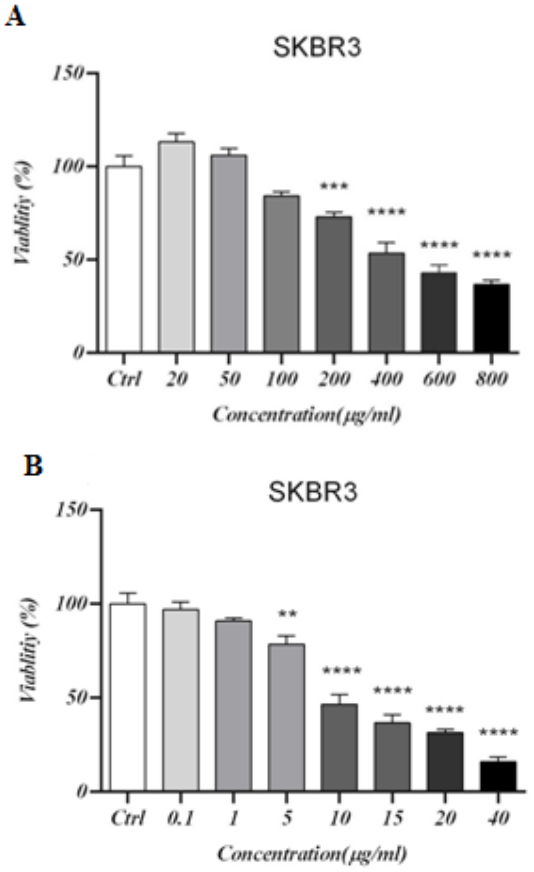
اثرات تانیک اسید، تاموکسیفن بر تکثیر و زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه رده SKBR3

شکل 1A تاثیر غلظت‌های مختلف از تانیک اسید را در تکثیر و زنده ماندن سلول‌های سرطانی SKBR3 نشان می-دهد. همان طور که مشاهده می‌شود تانیک در غلظت ۲۰۰میکروگرم در میلی لیتر و بیشتر از آن، موجب کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) در زیست پذیری (viability) سلول-های سرطانی شد، به طوری که مقدار IC50 برای تانیک اسید ۱۵±۵۱۶ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. همچنین شکل 1B تاثیر تاموکسیفن را در غلظت‌های مختلف بر میزان زیست پذیری سلول‌های SKBR3 نشان می‌دهد. تاموکسیفن نیز در غلظت‌های ۵ میکروگرم در میلی لیتر و بالاتر موجب کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) در زیست پذیری سلول‌های سرطانی SKBR3 شد، به طوری که میزان IC50 برای آن ۰/۸±۹/۹۹۵ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

بیان HER2 و EGFR پس از تیمار رده‌های سلولی SKBR3 با تانیک اسید و تاموکسیفن

بیان هر دو HER2 و EGFR در سلول های سرطان پستان با پیشرفت و توسعه آنها مرتبط هستند. بیان بیش از حد HER2 معمولاً با بیان EGFR در سرطانهای پستان همراه است و بیان EGFR پاسخ به سرکوب HER2 را تعدیل می-کند. برای تعیین تأثیر تانیک اسید، تاموکسیفن و تاثیر همزمان آنها بر بیان HER2 و EGFR در سلول‌های SKBR3 از آزمون Real timePCR استفاده شد. این آزمون در غلظت IC50 تانیک اسید و تاموکسیفن و ترکیب آنها انجام شد و نتیجه آن با گروه کنترل مقایسه شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود. تیمار هم زمان با تانیک اسید و تاموکسیفن به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) می‌تواند سطح بیان HER2 را در مقایسه با گروه کنترل،

تاموکسیفن و تانیک اسید تنها کاهش دهد (P<۰/۰۱). اما تانیک اسید و تاموکسیفن هیچ کدام به تنهایی نتوانستند موجب کاهش سطح بیان HER2 شوند.

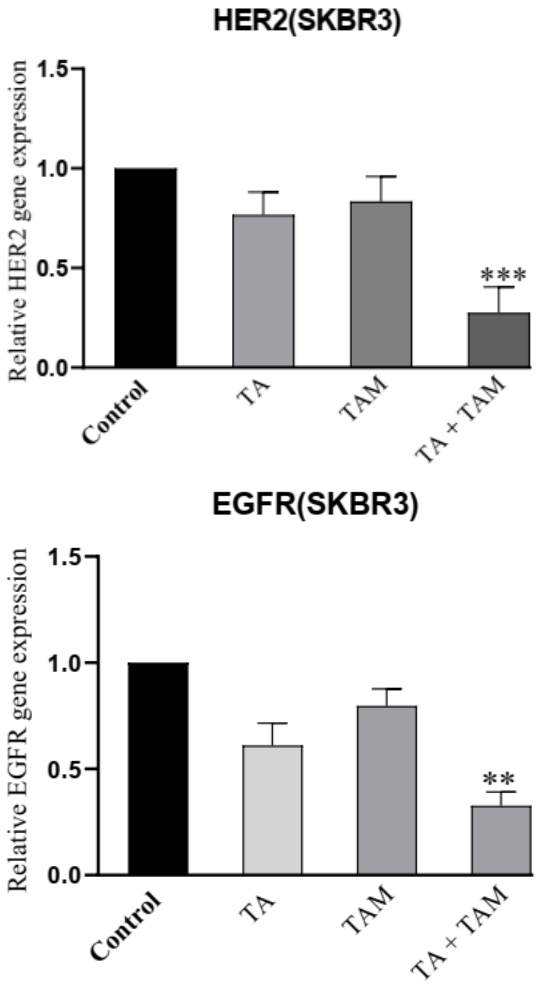


شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف از تانیک اسید (A) و تاموکسیفن(B) بر درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی SKBR3 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

همچنین در سلول‌های SKBR3 تانیک اسید به تنهایی نیز موجب کاهش معنی‌داری در سطح بیان EGFR شد، ولی تاموکسیفن در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری در سطح بیان EGFR ایجاد نکرد، اگرچه ترکیب تاموکسیفن و تانیک اسید به طور معنی‌داری سطح EGFR را کاهش دادند (P<۰/۰۰۱).

اثر تانیک اسید و تاموکسیفن بر میزان آپوپتوز کل سلولهای سرطان پستان رده‌SKBR3

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تیمار با تانیک اسید و تاموکسیفن هیچ کدام افزایش قابل توجهی را در درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل ایجاد نکردند، اما ترکیب تانیک اسید با تاموکسیفن موجب افزایش قابل توجهی در درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۰۰۱).

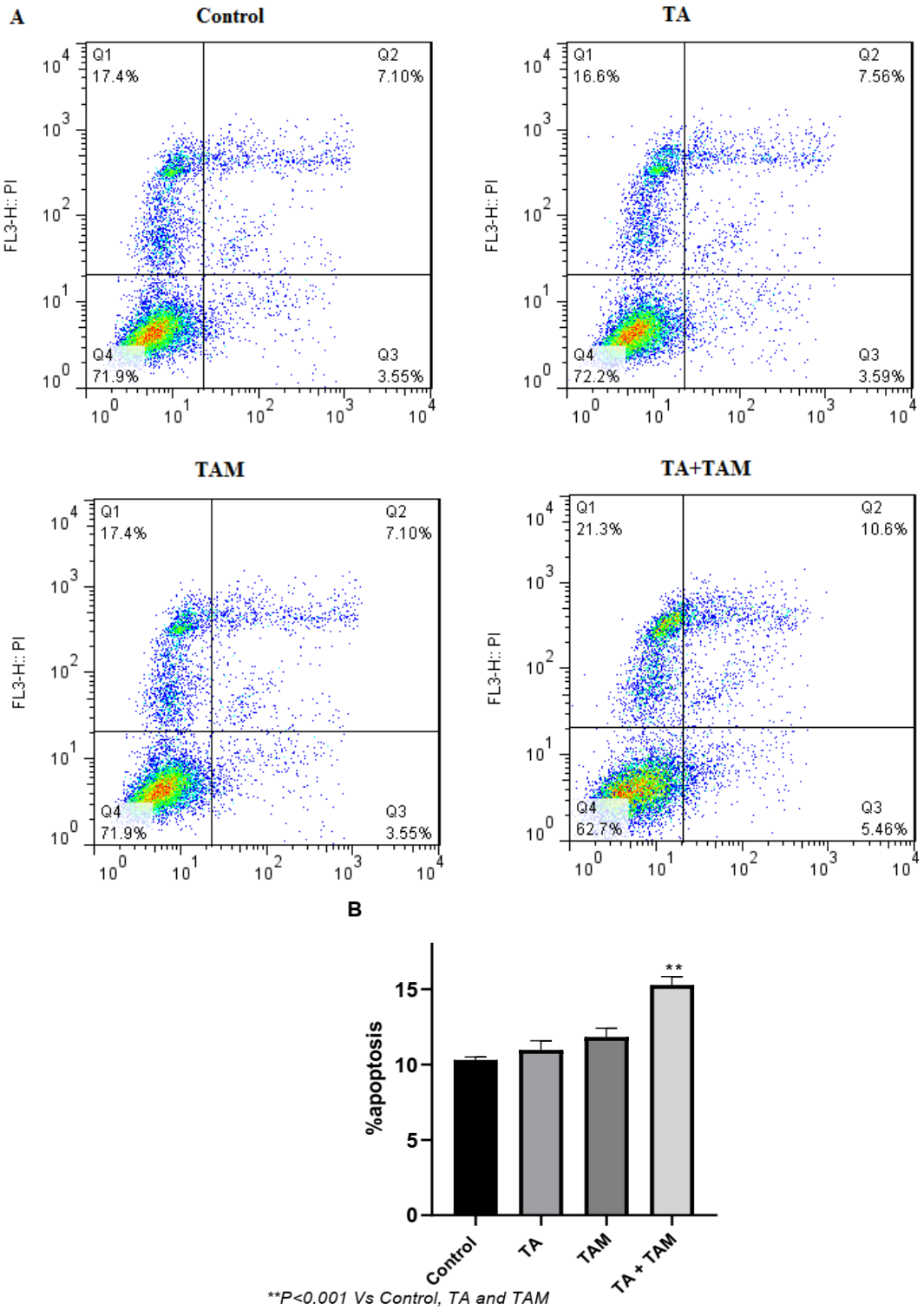


شکل ۲. اثر تانیک اسید و تاموکسیفن بر میزان بیان HER2 و EGFRدر سلول‌های SKBR3. تاموکسیفن: TA ، تانیک اسید: TA، تانیک اسید + تاموکسیفن: TA+TAM. ** p<۰/۰۰۱، *** p <۰/۰۰۰۱

بحث

بر اساس گزارشات انجمن تحقیقات سرطان آمریکا، سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در بین زنان در سراسر کشور تشخیص داده شده است. علاوه بر این، میزان مرگ و میر و بروز سرطان به طور پیوسته در کشورهای در حال توسعه نسبت به گذشته افزایش یافته است.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که پلی فنول تانیک اسید به صورت ترکیب با تاموکسیفن می‌تواند اثر حساس کننده شیمیایی مناسبی را از خود نشان دهد، در صورتی که تاموکسیفن به تنهایی اثر معنی‌داری در نابود کردن سلول‌های سرطانی نداشت. در سلول‌های SKBR3 که میزان بیان HER2



شکل ۳. اثر تانیک اسید و تاموکسیفن بر القا آپوپتوز در سلول‌های SKBR3. تاموکسیفن: TA، تانیک اسید: TA، تانیک اسید + تاموکسیفن: TA+TAM. ** p<۰/۰۰۱

بالا بود تاموکسیفن و تانیک اسید هیچکدام به تنهایی نتوانستند از لحاظ آماری به صورت معنی‌داری موجب کاهش سطح بیان HER2 شوند، اما ترکیبشان در غلظت IC50 آنها موجب کاهش معنی‌داری در سطح بیانHER2 شد. همچنین

تانیک اسید خودش به تنهایی نیز موجب کاهش معنی‌داری در بیان EGFR نسبت به گروه کنترل شد، اما تاموکسیفن هیچ اثری در کاهش سطح بیان EGFR نداشت، ولی ترکیب آن با تانیک اسید موجب کاهش معنی‌داری در سطح بیان EGFR نسبت به گروه کنترل، تاموکسیفن و تانیک اسید تنها شد. این اثر می‌تواند به دلیل فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ جدید در حضور هم زمان تاموکسیفن و تانیک اسید باشد.

در این مطالعه بررسی درصد آپوپتوزیس با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری نیز مشخص کرد تانیک اسید و تاموکسیفن هیچ کدام به تنهایی موجب افزایش سطح آپوپتوز در سلول‌های SKBR3 نمی‌شوند، اما در ترکیب با هم از لحاظ آماری موجب افزایش درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل، تانیک اسید و تاموکسیفن به تنهایی شده است. مطالعه ما با تحقیق مای و همکاران مطابقت داشت که در آن اثر درمان ترکیبی جنیستئین به همراه تاموکسیفن را در سرطان پستان BT-474 با بیان بالای HER2 بررسی کردند و نشان دادند که جنیستئین به عنوان یک حساس کننده شیمیایی در غلظت (۲۵ میکرومولار برای ۷۲ ساعت) مقاومت به تاموکسیفن مربوط به EGFR و بیان بیش از حد HER2 هنگامی که با تاموکسیفن (۵ میکرومولار) ترکیب می‌شود کاهش می‌دهد. نتایج آنها نشان داد که توقف چرخه سلولی ناشی از درمان، مسدود کردن سلول‌ها در فاز G1 با کاهش تعداد سلول‌ها در فازهایS و G2,M، آپوپتوز، از طریق قطعه قطعه شدن DNA و کاهش مولفه‌های بازمانده طرفدار آپوپتوز و خانواده HER (EGFR HER1، HER2 و HER3) از جمله مکانیسم‌هایی بود که در نهایت منجر به مهار قابل توجه رشد سلول‌های سرطانی شد (۱۵). در مطالعه‌ای توسط صدیقی و همکارانش اثر ترکیبی کورکومین و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) روی سلول‌های SKBR3 مثبت HER2 (۱۲ میکرومولار کورکومین + ۱۸ میکرومولار DHA) به مدت ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهدات مطالعات برون تنی مهار رشد سلولی و تکثیر و مهار فعالیت متاستاتیک همراه با یک القاء فنوتیپ " شبیه طبیعی (normal-like)" و نرخ آپوپتوز قابل توجهی را در سلول‌های SKBR3 نشان دادند. به همین ترتیب، مطالعات درون تنی نشان داد که درمان موش‌های حامل HER2 مثبت با کورکومین ۰/۲درصد، روغن ذرت ۳درصد و دوکوزاهگزانوئیک اسید ۱۵درصد برای ۳هفته پیشرفت، بروز و شروع تومور را کاهش می‌دهد. مطالعه ای که توسط داروین و همکاران انجام شده بود مشخص کرد که تانیک اسید به گیرنده EGF متصل می‌شود و فسفوریلاسیون تیروزین هر دو STAT1 و STAT3 را مهار می‌کند. این مهار منجر به مهار فعالیت اتصال به DNA STAT3/BCL-2 می‌شود. نتایج آنها نشان داد که تانیک اسید مسیرهای EGF-R/Jak2/STAT1/3 و P38/STAT1/p21Waf1/Cip1 را PI3K/AKT تعدیل می‌کند و باعث توقف G1 و آپوپتوز ذاتی در کارسینوم‌های پستان می‌شود (۱۶). مطالعه دیگری که توسط جردان و همکاران انجام شد مشخص کرد که تانیک اسید از طریق القای آپوپتوز از مسیر کاسپاز، اثر شیمی درمانی در مقابل انواع سرطان‌های پستان دارد (۱۷). عدم بررسی آزمون قطعه قطعه شدن DNA (Fragmentation) ، عدم بررسی تعداد سلول‌ها در فاز G1 و S و عدم بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر PI3K/AKT از محدودیت‌های این مطالعه بود. به طور کلی در مطالعه حاضر مشخص شد که تاموکسیفن به تنهایی اثر معنی‌داری در کاهش بیان HER2 و EGFR در سلول‌های SKBR3 ندارد، اما ترکیب آن با تانیک اسید موجب ایجاد اثرات سینرژیک در القای آپوپتوز و کاهش سطح بیان EGFR و HER2 می‌شود.

طبق آزمایشات انجام شده در این مطالعه مشخص شد که تانیک اسید اثر حساس کنندگی شیمیایی مناسبی را در ترکیب با تاموکسیفن در کاهش سطح HER2 و القای آپوپتوز در سلول‌های SKBR3 را از خود نشان می‌دهد. به این ترتیب احتمالا استفاده از حساس کننده های شیمیایی طبیعی در ترکیب با داروی شیمی درمانی می‌تواند کمک امیدوار کننده‌ای را در درمان سرطان با افزایش اثر بخشی داروهای شیمی درمانی ارائه دهد که به مطالعات تکمیلی از جنبه‌های مختلف جهت حصول مقصود نیاز است.

REFERENCES

1. Haghighat S, Omidi Z, Ghanbari-Motlagh A. Trend of Breast Cancer Incidence in Iran During A Fifteen-Year Interval According To National Cancer Registry Reports. Iranian Journal of Breast Diseases. 2022;15:4-17.

2. Bacus SS, Altomare DA, Lyass L ,Chin DM, Farrell MP, Gurova K, et al. AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. Oncogene 2002;21:3532-40.

3. Kim S, Lee J, Oh SJ, Nam SJ, Lee JE. Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells. Oncol Rep 2015;34:1613-9.

4. Fan P, Wang J, Santen RJ, Yue W. Long-term Treatment with Tamoxifen Facilitates Translocation of Estrogen Receptor α out of the Nucleus and Enhances its Interaction with EGFR in MCF-7 Breast Cancer Cells. Cancer Res 2007;67:1352-60.

5. Yu F, Bender W. The mechanism of tamoxifen in breast cancer prevention. Breast Cancer Res 2001;3:A74.

6. Hu R, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer. Oncol Lett 2015;9:1495-501.

7. Liu CY, Hung MH, Wang DS, Chu PY, Su JC, Teng TH, et al. Tamoxifeninduces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. Breast Cancer Res 2014;16:431.

8. A Youness R, Kamel R, A Elkasabgy N, Shao P, A Farag M. Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement; A Comprehensive Review. Molecules 2021;26:1486.

9. Hosseinimehr SJ, Najafi SH, Shafiee F, Hassanzadeh S, Farzipour S, Ghasemi A, et al. Fluoxetine as an antidepressant medicine improves the effects of ionizing radiation for the treatment of glioma. J Bioenerg Biomembr 2020;52:165-74.

10. Guo P, Pu T, Chen S, Qiu Y, Zhong X, Zheng H, et al. Breast cancers with EGFR and HER2 co-amplification favor distant metastasis and poor clinical outcome Oncol Lett 2017;14:6562-70.

11. Asghari M, Shaghaghi Z, Farzipour S, Ghasemi A, Hosseinimehr SJ. Radioprotective effect of olanzapine as an anti-psychotic drug against genotoxicity and apoptosis induced by ionizing radiation on human lymphocytes. Mol Biol Rep 2019;46:5909-17.

12. Zhang Y, Li H, Zhang J, Zhao C, Lu S, Qiao J, et al. The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. Phytochemistry Reviews 2020;19:1179-97.

13. Lattrich C, Lubig J, Springwald A, Goerse R, Ortmann O ,Treeck O. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells. Anticancer Drugs 2011;22:253-61.

14. Blancafort A, Giró-Perafita A, Oliveras G, Palomeras S, Turrado C, CampuzanoÒ, et al. Dual fatty acid synthase and HER2 signaling blockade shows marked antitumor activity against breast cancer models resistant to anti-HER2 drugs. PloS One 2015;10:e0131241.

15. Mai Z, Blackburn GL, Zhou J-R. Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. Mol Carcinog 2007;46:534-42.

16. Darvin P, JoungYH, Kang DY, Sp N, Byun HJ, Hwang TS, et al. Tannic acid inhibits EGFR/STAT1/3 and enhances p38/STAT1 signalling axis in breast cancer cells. J Cell Mol Med 2017;21:720-34.

17. Jordan LG, Booth BW. HER2(+) breast cancer cells undergo apoptosis upon exposure to tannic acid released from remodeled cross-linked collagen type I. J Biomed Mater Res A 2018;106:26-32.