

## اثر اسیدستریک بر توان زیستی و القای آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینوما کولورکتال انسان (HT-29)

خلیل خاشعی<sup>۱</sup> و رنامخواستی<sup>۱</sup>، لایلا روحی<sup>۲\*</sup>، مهدی آل مومن<sup>۳</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** آدنوکارسینوما کولورکتال به علت پاسخ ضعیف مبتلایان به درمان‌های رایج، یکی از علل شایع مرگ و میر می‌باشد. در این مطالعه اثر اسیدستریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینوما کولورکتال انسان (HT-29) بررسی شده است. اسیدستریک یک اسید آلی طبیعی است که عموماً در عصاره‌ی مرکبات یافت می‌شود و به‌عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی مورد توجه می‌باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه سلول‌های سرطانی کولورکتال رده‌ی HT-29 در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سلول‌ها در غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اسیدستریک تیمار شدند و برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. میزان رشد سلولی با روش رنگ‌سنجی MTS بررسی شد، میزان القا آپوپتوز به وسیله‌ی دستگاه فلوسیتومتری با کیت آنکسین-پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) طبق دستورالعمل کیت در هر سه زمان انکوباسیون بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج بررسی توان زیستی سلول‌های رده‌ی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدستریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر)، بعد از گذشت زمان‌های سه‌گانه‌ی انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست MTS حاکی از آن است که توان زیستی سلول‌های رده‌ی HT-29 در تمام غلظت‌های اسیدستریک به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌یابد. همچنین نتایج القای آپوپتوز در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدستریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر)، بعد از گذشت زمان‌های سه‌گانه‌ی انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست Annexin V-FITC، نشان می‌دهد که درصد سلول‌هایی که در مرحله‌ی ابتدایی و انتهایی آپوپتوز هستند با افزایش غلظت اسیدستریک و طول زمان انکوباسیون افزایش یافته‌اند، که این افزایش درصد آپوپتوز نیز نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قابل ملاحظه می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج بیان می‌کنند که اسیدستریک قادر است از طریق القای مسیر آپوپتوزی توان زیستی سلول‌های آدنوکارسینوما کولورکتال را کاهش دهد.

**واژه‌های کلیدی:** اسیدستریک، آدنوکارسینوما کولورکتال، توان زیستی، آپوپتوز

دریافت مقاله: آبان ۱۳۹۹

پذیرش مقاله: اردیبهشت ۱۴۰۰

\*نویسنده مسئول:

لایلا روحی؛

دانشکده علوم پایه واحد شهرکرد دانشگاه آزاد اسلامی

Email:

lrrouhi59@gmail.com

۱ مربی مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳ کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

سرطان دومین عامل مرگومیر پس از بیماری‌های قلبی-عروقی در جهان است که بروز آن از گذشته تا به امروز همچنان روبه افزایش بوده است و توانسته هزینه‌های زیادی را به نظام سلامت تمام جوامع تحمیل کند (۱ و ۲). در بین انواع سرطان‌ها، آدنوکارسینومای کولورکتال به عنوان سومین سرطان شایع در دنیا و چهارمین عامل مرگ در اثر سرطان از شایع‌ترین بدخیمی‌های دستگاه گوارش به حساب می‌آید. این بدخیمی ۱۰ درصد کل سرطان‌های مردان و ۹/۴ درصد را در بین زنان شامل می‌شود (۳ و ۴). اگرچه تغییر عادات تغذیه‌ای و پیشرفت روش‌های تشخیصی توانسته است پیش‌آگهی سرطان کولورکتال را در طول سال‌های اخیر افزایش دهد، اما ناکارآمدی راهکارهای درمانی مرسوم نظیر جراحی باعث شده است که طول عمر برخی از مبتلایان تحت درمان به ۵ سال هم نرسد (۵ و ۶). بنابراین یک نیاز فوری برای ایجاد راهکارهای درمانی موثرتر، به منظور بهبود طول بقای مبتلایان وجود دارد. از این رو تحقیق در راستای یافتن ترکیباتی با خواص ضدتوموری که توانایی جلوگیری از گسترش و رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشند و در عین حال فاقد عوارض جانبی ترکیبات صنعتی و داروهای فارماکولوژیک ضد سرطان باشند، پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است (۷). در این میان استفاده از ترکیبات طبیعی که از گذشته منبع منحصر به فردی برای تامین داروهای مصرفی جامعه بشری بوده‌اند، بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند (۸). اسیدسیتریک یک اسید آلی طبیعی است که عموماً در عصاره‌ی برخی از میوه‌ها و سبزی‌ها، به‌ویژه مرکبات یافت می‌شود. این اسید آلی هم اکنون به‌طور گسترده به‌عنوان یکی از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی در صنعت استفاده می‌شود (۹). علاوه بر آن امروزه اسیدسیتریک به‌عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده نیز مورد توجه می‌باشد (۱۰). ارتباط بین گلیکولیز و آپوپتوز به سطح آنزیم هگزوکیناز II برمی‌گردد. آنزیم هگزوکیناز II گلوکز را به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌نماید و باعث پیشبرد فرآیند گلیکولیز به‌وسیله‌ی آبشار آنزیمی می‌شود و زمانی که منافذ غشای خارجی میتوکندری باز هستند، باعث پایداری یک جزء ساختاری این منافذ با عنوان VDAC (voltage-dependent anion channel) شده که نقش آن تنظیم نفوذپذیری منافذ می‌باشد. لذا پایداری ایجاد شده در این جز توسط هگزوکیناز II نفوذپذیری را در غشای خارجی غیرفعال می‌کند. با حذف هگزوکیناز II از مجموعه، نفوذپذیری در غشای خارجی میتوکندری

القا می‌گردد که به دنبال آن سیتوکروم C به درون سیتوپلاسم ترشح شده و آبشار کسپازی به راه می‌افتد و آپوپتوز القا می‌گردد. اسید سیتریک از طریق تاثیرگذاری بر سطح آنزیم هگزوکیناز II و دیگر آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز عملکرد ضدسرطانی خود را اعمال می‌نماید (۱۱-۱۳). با توجه به نیاز به تحقیقات هر چه بیشتر جهت تایید اثرات ضدسرطانی اسیدسیتریک، در مطالعه‌ی حاضر نیز اثر اسیدسیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان (HT-29) بررسی گردید.

## روش بررسی

این مطالعه به‌صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. بررسی آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA از طریق نرم‌افزارهای SPSS و FlowJo انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایش‌ها ۹۹٪ در نظر گرفته شد و  $(P < 0/05)$  معنی‌دار محسوب گردید.

### • تهیه و کشت رده سلول سرطانی HT-29

رده‌ی سلولی HT-29 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub>، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین / EDTA استفاده شد.

### • تهیه اسیدسیتریک

اسیدسیتریک به‌صورت آماده و به حالت جامد از شرکت SIGMA-ALDRICH با نام تجاری Citric acid-anhydrous, cell culture tested و شماره محصول C2404 تهیه گردید.

### • روش MTS

توان زیستی سلول‌های رده‌ی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک توسط تست MTS، با استفاده از کیت MTS (Promega, USA) با شماره محصول G5421 مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد  $5 \times 10^3$  سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی

کشت دانه شد و سپس با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسیدسیتریک برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار و انکوبه گردید (۱۴). پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار جمع‌آوری شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTS به هر چاهک اضافه گردید و انکوباسیون ۴ ساعته صورت گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه ELISA-reader با طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانش گردید.

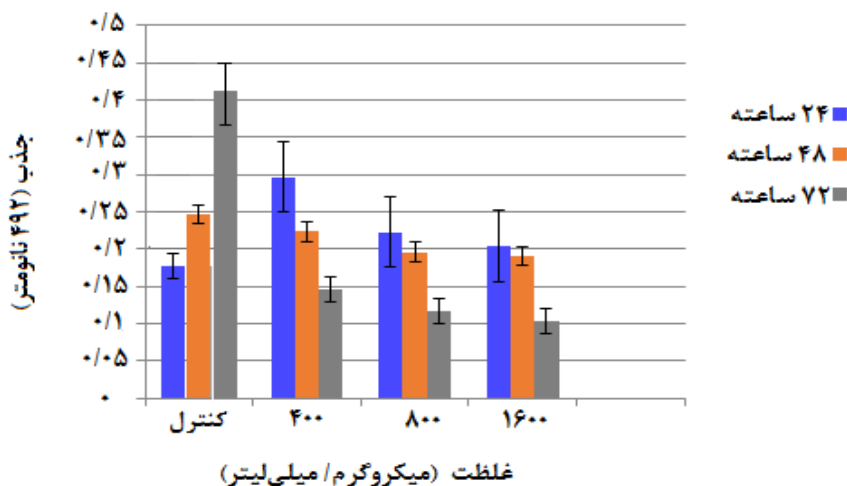
• روش فلوسیتومتری

القای آپپتوز در رده سلولی HT-29، از طریق تست Annexin V-FITC/PI، با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، با شماره محصول (۵۵۶۵۴۷)، مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد  $5 \times 10^6$  سلول در پلیت‌های کشت ۶ خانه کشت داده شد، و سپس با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اسیدسیتریک در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار جمع‌آوری شد. پس از ترپسینه‌کردن، رسوب سلولی دو بار با محلول PBS (Phosphate-buffered saline)،

## یافته‌ها

### • نتایج سنجش توان زیستی

توان زیستی سلول‌های رده‌ی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر)، بعد از گذشت زمان‌های سه‌گانه‌ی انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست MTS بررسی گردید.



\* داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{sd}$  نمایش داده شده‌اند.

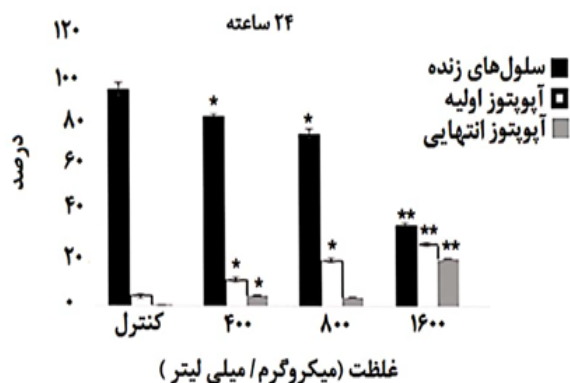
شکل ۱: اثر اسیدسیتریک بر توان زیستی رده سلولی HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت).

### • نتایج سنجش القای آپپتوز

القای آپپتوز در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر)، بعد از گذشت زمان‌های سه‌گانه‌ی انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست Annexin V-FITC، خبر از افزایش درصد مرگ سلولی در

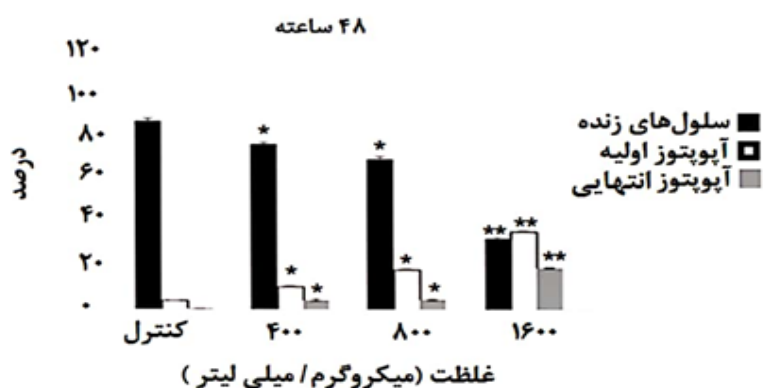
نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن است که اسید سیتریک قادر است رشد سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. به طوری که با افزایش دوز تیمار و افزایش زمان تیمار از درصد سلول‌های زنده در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاسته می‌شود (شکل ۱).

گروه‌های آزمایشی تحت تیمار می‌دهد. به طوری که با افزایش دوز و طول زمان تیمار درصد سلول‌های زنده در گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با



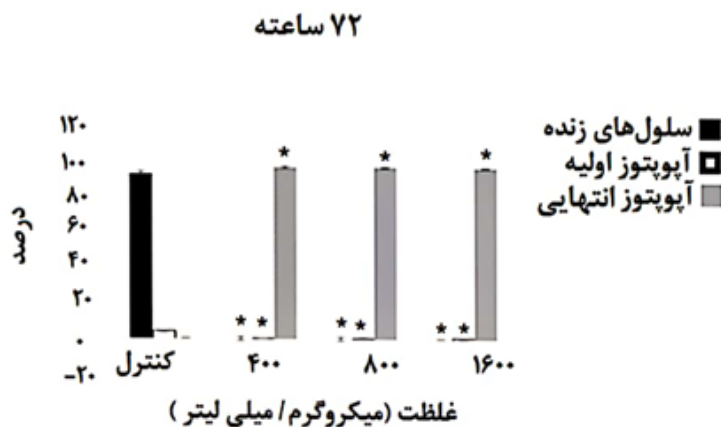
\* داده‌ها به صورت mean±sd نمایش داده شده‌اند.

شکل ۲: درصد سلول‌های زنده، آپوتوز اولیه و آپوتوز انتهایی در سلول‌های HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت.  $P < 0.05$ ؛  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل



\* داده‌ها به صورت mean±sd نمایش داده شده‌اند.

شکل ۳: درصد سلول‌های زنده، آپوتوز اولیه و آپوتوز انتهایی در سلول‌های HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت.  $P < 0.05$ ؛  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل



\* داده‌ها به صورت mean±sd نمایش داده شده‌اند.

شکل ۴: درصد سلول‌های زنده، آپوتوز اولیه و آپوتوز انتهایی در سلول‌های HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت.  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل

کربوکسیلیک اسید متوقف می‌شود، از این رو اسیدسیتریک می‌تواند برای درمان سرطان مفید باشد (۱۷). در سال ۲۰۱۸ بررسی اثرات سایتوتوکسیک سدیم سترات بر سلول‌های اپیتلیال معده انسان نشان داد که تیمار طولانی مدت سلول‌های اپیتلیالی معده با غلظت‌های بالای سدیم سترات باعث القای آپوپتوز و تغییر سطح سیتوکاین‌های مشخصی در این سلول می‌شود (۱۸). در سال ۲۰۲۰ نیز طی پژوهشی مشخص شد که هیدروکسی سیتریک اسید می‌تواند اثر سایتوتوکسیک تاموکسیفن را در سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) تقویت نماید (۱۹). در سال ۲۰۲۱ نتایج مطالعه‌ی اثر اسیدسیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS)، خاصیت ضد تکثیری اسیدسیتریک را نمایان ساخت (۲۰). محققان در این مطالعه با محدودیت در جمع‌آوری نمونه‌های بیوپسی بافتی کولورکتال رو به رو بوده‌اند، از این رو بررسی تنها در سطح سلول صورت گرفته است.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تست MTS و فلوسیتومتری صورت گرفته در تحقیق حاضر، بیانگر این مسئله است که اسیدسیتریک احتمالاً قادر است با تاثیرگذاری بر مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی، آپوپتوز را در سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال انسان القا نماید و از این طریق در درمان سرطان کولورکتال موثر واقع گردد. پیشنهاد می‌گردد که سایر محققان تاثیر اسیدسیتریک را در سطح بافت روی نمونه‌های بیوپسی کولورکتال نیز سنجش نمایند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد با عنوان «بررسی اثر اسیدسیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان (HT-29)» مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.028 در سال ۱۳۹۷ می‌باشد.

## References

- Garzon R, Marcucci G & Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. Nature Reviews, Drug Discovery 2010; 9(10): 775-89.
- Tabari F, Zakeri Moghadam M, Bahrani N & Monjamed Z. Evaluation of the quality of life in newly recognized cancer patients. Journal of Hayat 2007; 13(2): 5-12 [Article in Persian].

همان‌طور که در اشکال ۲، ۳ و ۴ دیده می‌شود، درصد سلول‌های زنده در سایر گروه‌ها در هر سه زمان انکوباسیون نسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می‌دهد که این اختلاف از نظر آماری نسبت به گروه کنترل قابل ملاحظه است ( $P < 0.05$ ). همچنین درصد سلول‌هایی که در مرحله‌ی ابتدایی و انتهایی آپوپتوز هستند با افزایش غلظت اسیدسیتریک و طول زمان انکوباسیون افزایش یافته‌اند، که این افزایش درصد آپوپتوز نیز نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قابل ملاحظه می‌باشد.

## بحث

در تحقیق حاضر توانایی اسیدسیتریک در مهار رشد و خاصیت ضد تکثیری آن که از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی اعمال می‌گردد، در سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان (HT-29)، بررسی گردید. نتایج حاصل شده از تست MTS حاکی از آن است که اسیدسیتریک قادر است از درصد سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال زنده در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل بکاهد. به علاوه در این تحقیق، نتایج القای آپوپتوز نشان داد که درصد مرگ سلولی با افزایش دوز و طول زمان تیمار با اسیدسیتریک افزایش یافته است. این اختلاف در افزایش درصد وقوع آپوپتوز از نظر آماری در همه‌ی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل قابل ملاحظه می‌باشد. بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۱۱ نیز نشان می‌دهد که اسیدسیتریک به‌عنوان یک آنتی گلیکولیتیک و مهارکننده‌ی آنزیم فسفو فروکتوکیناز قادر است از طریق کاهش بیان ژن *Mcl-1* و افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی *p53* و *p21* باعث تخریب سلول‌ها و آپوپتوز در آنها شود (۱۵). مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که اسیدسیتریک نه تنها مانع از تکثیر سلول‌های HaCaT به روش وابسته به دوز می‌شود، بلکه باعث القای ژن‌های پروآپوپتوزی و توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M می‌شود (۱۶). در سال ۲۰۱۷ بررسی اثر درمانی اسیدسیتریک در سلول‌های مختلف سرطانی نشان داد که تمایز سلول‌های سرطانی با اثر سیتریک اسید از طریق مهار چرخه‌ی تری

3. Akhoond MR, Kazemnejad A, Hajizadeh A, Ganbary Motlagh A & Zali MR. Comparison of influential factors affecting survival of patients with colon and rectum cancer using competing risks model. (Koomesh) Journal of Semnan University of Medical Sciences 2011; 12(2): 119-28[Article in Persian].
4. Boyle P & Lanqman JS. ABC of colorectal cancer epidemiology. British Medical Journal 2000; 321(7264): 805-8.
5. Yost KJ, Hahn EA, Zaslavsky AM, Ayanian JZ & West DW. Predictors of health-related quality of life in patients with colorectal cancer. Health and Quality of Life Outcomes 2008; 6(66): 1-10.
6. Pisani P, Bray F & Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. International Journal of Cancer 2002; 97(1): 72-81.
7. Romanos MTV, Andrada Serpa MJ, Goncalves Matos SM, Ribeiro ACF, Yoneshigue Valentin Y, Soares Costa S, et al. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro. Cancer Investigation 2002; 20(1): 46-54.
8. Zhu L, Li L, Li Y, Wang J & Wang Q. Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine 2016; 2016(18 S): 1-17.
9. Angumeena AR & Venkappayya D. An overview of citric acid production. LWT-Food Science and Technology 2013; 50(2): 367-70.
10. Zhang X, Varin E, Allouche S, Lu Y, Poulain L & Icard P. Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: A synergistic effect with cisplatin. Anticancer Research 2009; 29(4): 1249-54.
11. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF & Ko YH. Mitochondrial bound type II hexokinase: A key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 2002; 1555(1-3): 14-20.
12. Pastorino JG & Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 2008; 40(3): 171-82.
13. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. P53 regulates mitochondrial respiration. Science 2006; 312(5780): 1650-3.
14. Chen X, Lv Q, Liu Y & Deng W. Effect of food additive citric acid on the growth of human esophageal carcinoma cell line EC109. Cell Journal 2017; 18(4): 493-502.
15. Lu Y, Zhang X, Zhang H, Lan J, Huang G, Varin E, et al. Citrate induces apoptotic cell death: A promising way to treat gastric carcinoma? Anticancer Research 2011; 31(3): 797-805.
16. Ying TH, Chen CW, Hsiao YP, Hung SJ, Chung JG & Yang JH. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase-and mitochondrial-dependent signaling pathways. Anticancer Research 2013; 33(10): 4411-20.
17. Ren JG, Seth P, Ye H, Guo K, Hanai JI, Husain Z, et al. Citrate suppresses tumor growth in multiple models through inhibition of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and the IGF-1R pathway. Scientific Reports 2017; 7(1): 4537.
18. Xia Y, Zhang X, Bo A, Sun J & Li M. Sodium citrate inhibits the proliferation of human gastric adenocarcinoma epithelia cells. Oncology Letters 2018; 15(5): 6622-8.
19. Ismail A, Doghish AS, Elsadek BEM, Salama SA & Mariee AD. Hydroxycitric acid potentiates the cytotoxic effect of tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells through inhibition of ATP citrate lyase. Steroids 2020; 160(1): 108656.
20. Jalali M, Rouhi L & Khashei K. Effect of citric acid on bioavailability and apoptosis of the human gastric Adenocarcinoma cell line (AGS). Daneshvar Medicine 2021; 29(1): 13-22[Article in Persian].

## Effect of Citric Acid on Bioavailability and Apoptosis Induction in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (HT29)

Khalil Khashei Varnamkhasti<sup>1</sup> (Ph.D.), Leila Rouhi<sup>2\*</sup> (Ph.D.), Mehdi Aalmomen<sup>3</sup> (M.S.)

<sup>1</sup> Instructor, Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> Master of Science in Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Received: Oct 2020

Accepted: Apr 2021

**Background and Aim:** Colorectal adenocarcinoma is one of the common causes of death due to weak response to common therapies. In this study, the effect of citric acid on bioavailability and apoptosis of the human colorectal adenocarcinoma cell line (HT29) was examined. Citric acid is a naturally organic acid that commonly found in citrus and is considered as a physiological inhibitor of enzymes involved in glycolysis pathway to remove cancer cells.

**Materials and Methods:** In this study, HT-29 colorectal adenocarcinoma cancer cells were cultured in DMEM medium with 10% bovine serum. The cells were treated in 400, 800 and 1600 µg/ml concentrations of citric acid and incubated at 24, 48 and 72 hours respectively. Cell growth was analyzed by MTS kit and apoptosis was analyzed three times by flow-cytometry using an Annexin V-FITC/PI kit according to the manufacturers protocol.

**Results:** The results of bioavailability of treated HT-29 cells with different concentrations (400, 800 and 1600 µg/ml) of citric acid, after trinary incubation time (24, 48 and 72 hours) using the MTS assay showed that, bioavailability of HT-29 cell line decreased at all concentrations of citric acid in a time dependent manner. Also, the results of the apoptosis induction in treated HT-29 cell line with different concentrations (400, 800 and 1600 µg/ml) of citric acid, after trinary incubation time (24, 48 and 72 hours) using Annexin V-FITC/PI test showed that the percentage of the early and late apoptosis cells increased with increasing citric acid concentration and incubation time, which increased the percentage of apoptosis compared to the control group is significant in all three times of 24, 48 and 72 hours.

**Conclusion:** The results indicate that citric acid can reduce the bioavailability of colorectal adenocarcinoma cells by inducing apoptosis pathway.

**Keywords:** Citric Acid, Colorectal Adenocarcinoma, Bioavailability, Apoptosis

\* Corresponding Author:

Rouhi L

Email:

lrouhi59@gmail.com