

مقایسه‌ی روش‌های سنجش (MTT) Thiazolyl Blue و (SRB) Sulforhodamine B در تعیین اثر ضد تکثیری برومیلین بر رده‌ی سلول‌های سرطانی 4T1، AGS و PC3

فرزانه رئیسی^۱، الهام رئیسی^۲، داریوش شهبازی گهرویی^۳، اسفندیار حیدریان^۴، فاطمه امینی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: همه‌ی عوامل طبیعی ضد سرطانی، به طور اساسی سیتوتوکسیک هستند و اغلب به صورت مهار تکثیر سلولی عمل می‌کنند، اما مکانیزم‌های مختلفی دارند. از دو روش سنجش Thiazolyl blue [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazoliumbromide] یا MTT و Sulforhodamine B (SRB) برای ارزیابی رشد سلول‌ها استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی روش‌های سنجش MTT و SRB برای بررسی اثر سیتوتوکسیک دارو بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی بود.

روش‌ها: رده‌ی سلولی سرطان پستان موش (4T1)، سرطان معده‌ی انسانی (AGS) و سرطان پروستات انسانی (PC3) با غلظت‌های متفاوت برومیلین و در زمان‌های متفاوت در انکوباتور نگهداری شدند. به منظور بررسی اثر برومیلین بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، روش‌های سنجش MTT و SRB به کار برده شد. نتایج گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون‌های غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: رشد و بقای سلول‌های 4T1، AGS و PC3 در غلظت‌های مختلف برومیلین و زمان‌های متفاوت انکوباسیون، کاهش یافت. هر دو روش سنجش MTT و SRB، به صورت مشابهی کاهش بقای سلول‌های سرطانی، صرف نظر از نوع و فنوتیپ، را بعد از درمان با برومیلین نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، روش‌های سنجش MTT و SRB به طور قابل قبولی اثرات ضد تکثیری برومیلین بر روی سلول‌های سرطانی مورد مطالعه را نشان دادند.

واژگان کلیدی: برومیلین، سلول سرطانی، تکثیر سلولی، Sulforhodamine B، Thiazolyl blue

ارجاع: رئیسی فرزانه، رئیسی الهام، شهبازی گهرویی داریوش، حیدریان اسفندیار، امینی فاطمه. **مقایسه‌ی روش‌های سنجش (MTT) Thiazolyl Blue و (SRB) Sulforhodamine B در تعیین اثر ضد تکثیری برومیلین بر رده‌ی سلول‌های سرطانی 4T1، AGS و PC3.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۳): ۱۰۶۱-۱۰۵۶

مقدمه

استفراغ هستند (۲). در نتیجه، بخش قابل توجهی از کشف دارو در ۴۰ سال گذشته، بر عوامل پیش‌گیری کننده و یا درمان سرطان متمرکز شده است (۱).

در این راستا، برومیلین یکی از این عوامل طبیعی می‌باشد. برومیلین، نام عمومی خانواده‌ی آنزیم‌های پروتئولیتیک سولفیدریل به دست آمده از آناناس است و در بیماری‌های قلبی، آرتريت روماتوئید،

در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، سرطان یکی از سه علت شایع مرگ و میر است. درمان سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و اغلب ترکیبی از دو یا هر سه می‌باشد (۱). شیمی‌درمانی، عوارض جانبی بسیاری دارد. رایج‌ترین عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی، نوتروپنی، ورم دهان، موکوزیت، اسهال و

- ۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت و گروه فیزیک پزشکی و پرتوشناسی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- ۳- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۴- استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: raeisi.e@skums.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤو: الهام رئیسی

روش‌های سنجش MTT و SRB بود.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، رده‌ی سلول‌های سرطانی AGS، 4T1 و PC3 از انستیتو پاستور ایران و تریپسین ۰/۲۵ درصد، محیط کشت Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)، Fetal bovine serum (FBS) و قرص Phosphate buffer saline (PBS) (Gibco)، Sulforhodamine B (SRB) (Trichloroacetic acid (TCA) و Acid acetic (hydroxymethyl) Aminomethane (Tris) (آمریکا) و برومیلین (Merck, Germany) Dimethyl sulfoxide (DMSO) و MTT (Sigma، آمریکا) از شرکت خریداری شدند.

برومیلین در محیط کشت حل شد تا غلظت‌های مناسب برای مطالعه آماده گردد. محیط مورد نیاز برای سلول‌های سرطانی، با اضافه کردن ۱ درصد محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS به RPMI-1640 تهیه شد. سلول‌های سرطانی، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. اثر برومیلین بر رشد و تکثیر سلول‌های AGS، 4T1 و PC3 با روش‌های سنجش MTT و SRB بررسی شد. در هر دو روش، تعداد سلول در ۵ × ۱۰^۳ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه با غلظت‌های متفاوت برومیلین ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در زمان‌های متفاوت ۲۴ و ۴۸ ساعت درمان شدند.

در روش SRB، بعد از درمان، Trichloroacetic acid (TCA) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، ۵ بار با آب شستشو داده شد. بعد از خشک شدن، محلول Sulforhodamine B ۰/۴ درصد حل شده در Acid acetic ۱ درصد اضافه شد. سپس، ۵ بار با Acid acetic ۱ درصد شستشو داده شد و بعد از خشک شدن و اضافه کردن ۱۰ میلی‌مولار جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA (Stat Fax-2100, Spain) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در روش MTT، بعد از اتمام درمان، ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT (در غلظت ۱۲ میلی‌مولار) اضافه شده به هر چاهک، ۴ ساعت انکوبه شد. آن گاه، ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکساید اضافه شد و بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA (Stat Fax-2100, Spain) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

منحنی درصد بقای سلول‌ها در غلظت‌های متفاوت برومیلین بر اساس محاسبات توسط فرمول ۱۰۰ × (جذب نوری گروه شاهد/جذب نوری گروه درمانی) = درصد بقای سلول‌ها رسم

سینوزیت، صدمات جراحی و دبریدمان زخم مفید است (۳). برومیلین، خواص ضد التهاب، ضد ترموبوز و ضد سرطان دارد (۴). برومیلین، به خوبی در بدن پس از تجویز خوراکی بدون هیچ عوارض جانبی حتی پس از استفاده‌ی طولانی مدت جذب می‌شود (۵).

بر اساس مطالعات سلولی، حیوانی و بالینی متعددی، برومیلین به تنهایی و یا در ترکیب با داروهای دیگر، رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی مختلفی نظیر پستان، ملانوما، سارکوما، معده و کولون را مختل می‌کند (۶-۹).

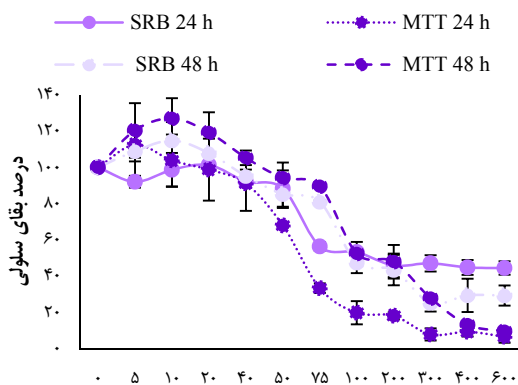
همه‌ی عوامل طبیعی، به خودی خود سمیت سلولی دارند و اغلب به صورت مهار تکثیر سلولی، اما با مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کنند (۱). دو روش معمول ارزیابی فعالیت سمیت سلولی شامل Thiazolyl blue [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazoliumbromide] یا MTT [SRB Sulphorhodamine B] می‌باشد (۱).

روش MTT اولین بار در سال ۱۹۸۶، روش آنزیماتیک به عنوان سوبسترای واکنش از نمک‌های محلول تترازولیوم معرفی شد (۱۰). اساس این روش، شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه‌ی این فعالیت، ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی‌متیل سولفواکساید (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) اندازه‌گیری می‌شود (۱۱). از محدودیت‌های MTT زمان مورد نیاز برای انکوباسیون و رابطه‌ی غیر خطی بین جذب نوری و تعداد سلول می‌باشد (۱۲-۱۳).

روش دوم ارزیابی سمیت سلولی، SRB می‌باشد که حساسیت بالاتر و رابطه‌ی خطی بیشتری با تعداد سلول دارد و میزان رنگ‌آمیزی آن، مستقل از تعداد سلول می‌باشد (۱۴، ۱). SRB متکی به جذب بار منفی رنگ صورتی SRB، Aminoxanthine توسط اسیدهای آمینه‌ی اساسی در سلول است. هر چه تعداد سلول بیشتر باشد، مقدار رنگ ایجاد شده بیشتر است و پس از تثبیت شدن، زمانی که سلول‌ها تجزیه می‌شوند، رنگ منتشر شده شدیدتر می‌شود و بیشتر جذب می‌دهد (۱۴). سنجش SRB حساس، ساده، قابل تکرار و سریع‌تر از سنجش با اساس Formazan و سیگنال به نویز خطی است (۱۵).

با توجه به محدودیت‌های MTT و مزایای SRB، مطالعات بیشتری به منظور مقایسه‌ی بیشتر این دو روش وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد تکثیری برومیلین بر روی سلول‌های سرطانی پستان (4T1)، معده (AGS) و پروستات (PC3) با

مقدار درصد زیست‌پذیری برومیلین بر روی سلول‌های سرطانی 4T1 در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش‌های MTT و SRB به ترتیب ۱۰۰ و ۶۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۱۲۰ و ۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد.

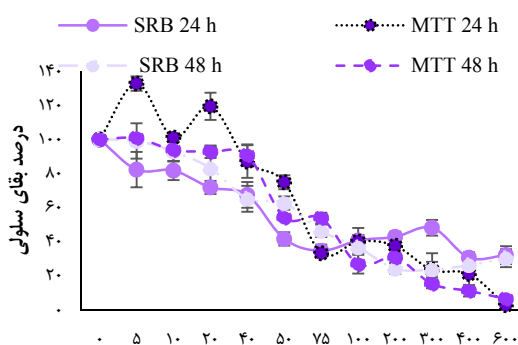


شکل ۲. مقایسه‌ی بین تغییرات درصد بقای سلول‌های AGS بر حسب غلظت‌های متفاوت برومیلین بین روش‌های

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-(SRB) Sulforhodamine B و (MTT) terazoliumbromide

در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت

در سلول‌های سرطانی AGS، میزان درصد زیست‌پذیری برومیلین در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش‌های MTT و SRB به ترتیب ۶۵ و ۶۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۱۶۰ و ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود.



شکل ۳. مقایسه‌ی بین تغییرات درصد بقای سلول‌های PC3 بر حسب غلظت‌های متفاوت برومیلین بین روش‌های

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-(SRB) Sulforhodamine B و (MTT) terazoliumbromide

در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت

شد. درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی (Half-maximal inhibitory concentration یا IC50 معادل غلظت برومیلین منجر به مهار ۵۰ درصد سلول‌های تحت درمانی) بر اساس منحنی رسم شده تعیین گردید.

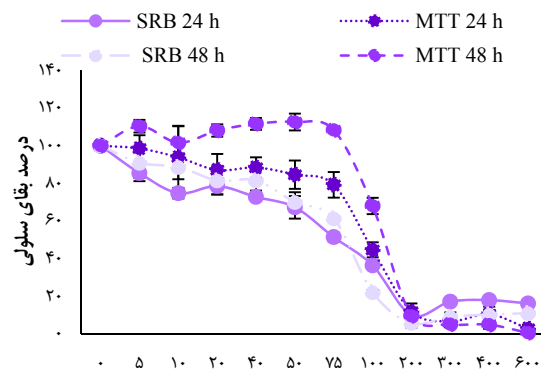
پردازش داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism graphpad (version 5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) بعد از تکرار سه بار تمام آزمایش‌ها انجام شد. نتایج گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون‌های غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn انجام گرفت.

شاخص‌های آماری شامل میانگین داده‌ها و انحراف‌های آن‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار نمایش داده شد و سطح معنی‌داری در $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سلول‌های سرطانی پستان (4T1)، معده (AGS) و پروستات (PC3) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف برومیلین انکوباسیون شدند. مقدار درصد بقای سلول‌ها با استفاده از میزان چگالی نوری خوانده شده بعد از انجام آزمون MTT و SRB اندازه‌گیری شد.

نتایج به صورت درصد بقای سلول‌ها بر حسب غلظت‌های متفاوت برومیلین به صورت میکروگرم/میلی‌لیتر و آزمون‌های مختلف MTT و SRB و زمان‌های متفاوت انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت در سلول‌های مختلف 4T1، AGS و PC3 در شکل‌های ۱-۳ نشان داده شدند.



شکل ۱. مقایسه‌ی بین تغییرات درصد بقای سلول‌های 4T1 بر حسب غلظت‌های متفاوت برومیلین بین روش‌های

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-(SRB) Sulforhodamine B و (MTT) terazoliumbromide

در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت (۹)

روش SRB، همبستگی بهتری بین رنگ‌آمیزی و تعداد سلول نسبت به روش MTT وجود دارد (۱۸). van Tonder و همکاران، در مطالعه‌ای با مقایسه‌ی MTT با سه روش سنجش دیگر از جمله SRB، به این نتیجه رسیدند که روش SRB نسبت به MTT در تعیین اثرات سمیت سلولی اولیه، از لحاظ اقتصادی و زمانی مقرون به صرفه‌تر می‌باشد (۱۳).

در مطالعه‌ی قبلی، اثر برومیلین بر روی سلول‌های سرطانی 4T1 در زمان‌های انکوباسیون ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از آزمون MTT بررسی گردید (۹). مطالعه‌ی حاضر، مقایسه‌ی بین نتایج روش‌های MTT و SRB حاصل از اثر برومیلین در سه رده‌ی سلول سرطانی پستان (4T1)، معده (AGS) و پروستات (PC3) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. با توجه به یافته‌های مطالعات حاضر، نتایج حاصل از MTT و SRB مستقل از نوع سلول، مشابه هستند و اختلاف معنی‌داری بین نتایج MTT و SRB وجود ندارد. همچنین، یافته‌ها نشان دادند که نتایج MTT و SRB مستقل از زمان، مشابه هستند. نتایج حاصل از این مطالعه، با مطالعه‌ی همکاران Banasiak و همکاران (۱۲) در توافق کم، اما با مطالعات Griffon و همکاران (۱۷)، Wu و همکاران (۱۶)، Perez و همکاران (۱۸) و van Tonder و همکاران (۱۳) در توافق بالایی است. در مطالعه‌ی Banasiak و همکاران (۱۲)، به دلیل بالا بودن تعداد سلول‌ها، جذب با روش MTT غیر خطی بوده و این امر، دلیل تفاوت جزئی با نتایج SRB بوده است؛ در صورتی که در مطالعه‌ی حاضر، تعداد سلول‌ها زیاد نبود و در نتیجه، جذب در هر دو روش MTT و SRB به صورت خطی بود و نتایج حاصل از هر دو روش مشابه بودند. با توجه به محدودیت‌های روش MTT و مزایای روش SRB، می‌توان پیش‌بینی کرد که استفاده از روش SRB به منظور بررسی اثر سمیت سلولی و دیگر کاربردها افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از طرح‌های پژوهشی (به شماره‌های ۲۰۷۴ و ۲۲۴۶) مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بود و با حمایت مالی این معاونت انجام شد. همچنین، از خانم فاطمه هیبتی، محقق مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در انجام بخشی از کشت سلول همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

همچنین، در سلول‌های سرطانی PC3، مقدار درصد زیست‌پذیری برومیلین نیز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش‌های MTT و SRB به ترتیب ۶۵ و ۴۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۶۵ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج مقایسه‌ی مقدار درصد زیست‌پذیری برومیلین بر روی سلول‌های 4T1، AGS و PC3 نشان داد که بین نتایج آزمون‌های MTT و SRB در هر سه سلول سرطانی و در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/050$).

بحث

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد تکثیری برومیلین بر روی سلول‌های سرطانی پستان (4T1)، معده (AGS) و پروستات (PC3) با روش‌های سنجش MTT و SRB بود. روش MTT به طور گسترده برای سنجش سمیت سلولی داروها استفاده شده است. این روش، به عملکرد میتوکندریایی فعال نیاز دارد؛ چرا که از فعالیت آنزیم میتوکندریایی، سوکسینات دهیدروژناز بهره‌گیری می‌کند. بنابراین، روش پیش‌گفته، سلول‌های زنده را تشخیص می‌دهد. نتایج آزمون MTT، ممکن است تحت تأثیر pH و غلظت گلوکز قرار گیرد (۱۲). سنجش SRB به تازگی به عنوان یک روش برای اندازه‌گیری سمیت سلولی داروها گزارش شده است. در این روش، رابطه بین جذب نوری و تعداد سلول خطی برقرار است (۱۶).

مقایسه‌ی بین روش‌های MTT و SRB در تعدادی از مطالعات قبلی انجام شده است. در مطالعه‌ی Banasiak و همکاران، با مقایسه‌ی بین روش‌های MTT و SRB بعد از پرتودهی ۶ رده از سلول‌های سرطانی مثانه، دریافتند که نتایج MTT و SRB تفاوت بسیار کمی با هم داشتند. همچنین، هر دو روش برای تعیین حساسیت پرتویی در بازه کشت پایین، پیشنهاد شده‌اند (۱۲). در مطالعه‌ی Wu و همکاران مقایسه‌ی بین روش‌های MTT و SRB به منظور بررسی اثر ضد توموری ویتامین‌های k_1 ، k_2 و k_3 بر ۱۵ رده سلول سرطانی مختلف انجام شد. در این مطالعه، نتایج MTT و SRB مشابه بودند (۱۶). Griffon و همکاران، سنجش‌های MTT و SRB پس از پرتودهی ۶ رده سلول سرطانی تخمدان را مقایسه و بررسی کردند و اختلاف معنی‌داری بین نتایج MTT و SRB مشاهده نکردند (۱۷). Perez و همکاران، اثر سیسپلاتین را بر چندین رده سلولی تخمدان با روش‌های MTT و SRB بررسی و مقایسه کردند. آن‌ها نشان دادند که نتایج حاصل از مقدار درصد زیست‌پذیری سیسپلاتین در روش SRB در همبستگی خوبی با MTT بوده است. با این وجود، در

References

1. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 2007; 42(4): 377-87.
2. Hauner K, Maisch P, Retz M. Side effects of chemotherapy. *Urologe A* 2017; 56(4): 472-9. [In German].
3. Agarwal S, Chaudhary B, Bist R, Bacoside A and bromelain relieve dichlorvos induced changes in oxidative responses in mice serum. *Chem Biol Interact* 2016; 254: 173-8.
4. Ramli AN, Aznan TN, Illias RM. Bromelain: From production to commercialisation. *J Sci Food Agric* 2017; 97(5): 1386-95.
5. Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: A review. *Biotechnol Res Int* 2012; 2012: 976203.
6. Chobotova K, Vernallis AB, Majid FA. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Lett* 2010; 290(2): 148-56.
7. Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian E. Pineapple extract as an efficient anticancer agent in treating human cancer cells. *Front Cancers* 2016; 1(1): e02.
8. Romano B, Fasolino I, Pagano E, Capasso R, Pace S, De Rosa G, et al. The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (*Ananas comosus* L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58(3): 457-65.
9. Raeisi F, Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian E, Amiri M, Gholami M. cytotoxicity effect of pineapple extract on breast cancer cells (4T1). *J Isfahan Med Sch* 2016; 34(394): 946-51. [In Persian].
10. Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005; 110: 39-48.
11. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48(17): 4827-33.
12. Banasiak D, Barnetson AR, Odell RA, Mameghan H, Russell PJ. Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. *Radiat Oncol Investig* 1999; 7(2): 77-85.
13. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 2015; 8: 47.
14. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1112-6.
15. Haselsberger K, Peterson DC, Thomas DG, Darling JL. Assay of anticancer drugs in tissue culture: Comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs* 1996; 7(3): 331-8.
16. Wu FY, Liao WC, Chang HM. Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* 1993; 52(22): 1797-804.
17. Griffon G, Merlin JL, Marchal C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anticancer Drugs* 1995; 6(1): 115-23.
18. Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 1993; 29A(3): 395-9.

A Comparison of Thiazolyl blue (MTT) versus Sulforhodamine B (SRB) Assay in Assessment of Antiproliferative Effect of Bromelain on 4T1, AGS, and PC3 Cancer Cell Lines

Farzaneh Raeisi¹, Elham Raeisi², Daryoush Shahbazi-Gahrouei³, Esfandiar Heidarian⁴, Fatemeh Amini⁵

Original Article

Abstract

Background: All natural anticancer agents are cytotoxic basically and act mainly by the inhibition cell proliferation; but they have different mechanisms. Two assays, thiazolyl blue [3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyl-terazoliumbromide or MTT] and sulforhodamine B (SRB), are used to assess cell growth. This study aimed to compare measurements between MTT and SRB on the cancer cell lines.

Methods: Different concentrations of the bromelain were added to cultured cells including mouse breast cancer (4T1), human gastric carcinoma (AGS), and human prostate carcinoma (PC3) cell lines and incubated at 24 and 48 hours. The growth and proliferation rates of the studied cells were investigated using both MTT and SRB assays after treatment with bromelain. The differences between cells were determined using Kruskal-Wallis and Dunns tests.

Findings: Bromelain significantly decreased growth and proliferation rate of 4T1, AGS and PC3 cancer cells, in a concentration-dependent manner at different times, in both MTT and SRB assays.

Conclusion: Findings showed that both MTT and SRB assays gained similar data regardless of the cell types.

Keywords: Bromelain, Neoplasms, Cell proliferation, Thiazolyl blue, Sulforhodamine B

Citation: Raeisi F, Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian E, Amini F. A Comparison of Thiazolyl blue (MTT) versus Sulforhodamine B (SRB) Assay in Assessment of Antiproliferative Effect of Bromelain on 4T1, AGS, and PC3 Cancer Cell Lines. J Isfahan Med Sch 2017; 35(443): 1056-61.

1- Researcher, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2- Assistant Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute AND Department of Medical Physics and Radiology, School of Allied Medical Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

3- Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

5- MSc Student, Student Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Elham Raeisi, Email: raeisi.e@skums.ac.ir