Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The effects of epigallocatechin gallate on HER-2 gene expression of the human breast adenocarcinoma cells line (SK-BR-3)

Maryam Mokhtari[1], Leila Rouhi[2*], Noosha Zia-Jahromi[3], Seyed Hossein Hejazi[2,4]

[1]Department of Animal Physiology, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Cellular and Developmental Research center, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[3]Department of Biochemistry, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[4]Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Department of Parasitology & Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
*Corresponding author; E-mail: Lrouhi59@gmail.com

Received: 8 September 2016 Accepted: 27 November 2016 First Published online: 22 September 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 October-November; 40(4):67-72

Abstract

Background: One of the most well-known oncogenes in breast cancer is HER2 (ERBB2 or EGFR2). Natural polyphenols are one of the most effective components for inhibiting cancers due to their high efficiency and fewer side effects. Investigators have shown that green tea and its main catechin epigallocatechin-3 gallate (EGCG) may decrease the risk of cancer. In the current study, we investigated the effect of EGCG on HER-2 gene expression of the human breast adenocarcinoma cells line SK-BR-3.

Methods: SKBR-3 human breast cancer cells were pretreated with different concentrations of EGCG (200 and 400 µg/mL) for 48 and 72 h. mRNA expression of HER-2 was detected by real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in the pretreated SKBR-3 cells.

Results: EGCG treatment in 48 and 72 h caused a dose-dependent decrease in mRNA expression of HER-2 significantly in group I and group II vs. control group ($P<0.05$).

Conclusion: Epigallocatechin-3 gallate has cytotoxic effect on SKBR3 cells. Our findings suggest that EGCG may be useful in treatment of breast cancer.

Keywords: Epigallocatechin-3 Gallate, Breast Cancer, HER-2, Real Time RT-PCR, SKBR3

How to cite this article: Mokhtari M, Rouhi L, Zia-Jahromi N, Hejazi S. H. [The effects of epigallocatechin gallate on HER-2 gene expression of the human breast adenocarcinoma cells line (SK-BR-3)]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 October-November;40(4):67-72. Persian.

© 2018 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

اثر اپی‌گالوکاتچین گالات بر میزان بیان ژن HER2 در رده سلولهای آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3)

مریم مختاری[۱]، لیلا روحی[۲*]، نوشا ضیا، جهرمی[۳]، سیدحسین حجازی[۲و۴]

[۱]گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲]مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی ، شهرکرد، ایران
[۳]گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی ، شهرکرد، ایران
[۴]مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[*]نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Lrouhi59@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۷ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۶/۳۱
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ مهر و آبان؛ ۴۰(۴):۶۷-۷۲

چکیده

زمینه: ژن (EGFR2 یا ERBB2) HER2 از آنکوژن‌های معروف در سرطان پستان است که تقریباً در ۳۰ ٪ از سرطانهای پستان بیان آن افزایش می‌یابد. در مطالعات متعدد آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنول طبیعی، به علت کارایی بالا و اثر جانبی کم یکی از موثرترین ترکیب های مهارکننده سرطان شناسایی شده‌اند. تحقیقات نشان داده است که چای سبز و کاتچین اصلی آن، اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) ممکن است خطر سرطان را کاهش دهند. در مطالعه حاضر، اثر EGCG بر میزان بیان ژن HER2 در رده سلولهای آدنوکارسینومای پستان SKBR3 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: سلولهای سرطان پستان انسان SKBR3 با غلظتهای مختلفی از EGCG (۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. بیان mRNA ژن HER2 بوسیله آنالیز Real Time-RT PCR در سلول‌های SKBR3 تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تیمار سلولها با EGCG به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون سبب کاهش معنی‌دار وابسته به دوز در میزان بیان ژن HER-2 در گروه های I و II نسبت به گروه کنترل گردید ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: اپی‌گالوکاتچین گالات اثر سمیت سلولی بر روی رده سلولهای سرطانی SKBR3 دارد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان می دهند که EGCG می‌تواند برای درمان سرطان پستان مفید باشد.

کلید واژه ها: اپی گالوکاتچین گالات، سرطان پستان، SKBR3، ژن HER-2، Real time RT - PCR

نحوه استناد به این مقاله: مختاری م، روحی ل، ضیا، جهرمی ن، حجازی س ح. اثر اپی‌گالوکاتچین گالات بر میزان بیان ژن HER2 در رده سلولهای آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3). مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۴):۶۷-۷۲

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان زنان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان بعد از سرطان ریه در آمریکا (۱) مسؤول ۲۰٪ مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان است (۲). سالیانه بیش از یک میلیون مورد سرطان پستان در دنیا تشخیص داده شده و بیش از ۵۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری فوت می‌کنند (۳). یکی از آنکوژن های شناخته شده در سرطان سینه (EGFR2 یا ERBB2) HER2 (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی ۲) است که تقریباً در ۳۰ ٪ از سرطان‌های سینه بیان آن افزایش می‌یابد (۴). آثار ضدسرطانی و توان بازدارندگی ترکیب‌های متعددی در درمان سرطان سینه بررسی شده است. هرسپتین (Herceptin) در درمان سرطان پستان متاستازی HER2 مثبت کاربرد دارد که البته تاثیر جانبی آن بر قلب چشم گیر و شامل کاهش عملکرد قلب، آدیتمی قلبی، فشار خون بالا، حمله قلبی و در برخی موارد مرگ است (۵). از طرفی با این که آنتی بادی‌های منوکلونال و مهارکننده‌های کینازی از پیامهای ErbB و در نهایت به طور موثری از پیشرفت تومورهای سینه جلوگیری می کنند، اثر آنها تنها زیرمجموعه خاصی از بیماران را شامل می‌شود (۶). بنابراین در برخی موارد باید به دنبال ترکیب‌هایی بود که معمول‌تر بوده و اثر جانبی کمتری داشته باشند. در این میان آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنول طبیعی، به علت کارایی بالا و تاثیر جانبی کم یکی از موثرترین ترکیب‌های مهارکننده سرطان شناسایی شده‌اند (۷). اپی‌گالوکاتچین-گالات (EGCG) جزئی از خانواده کاتچین‌هاست و پلی‌فنول اصلی چای سبز و سرشار از گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه‌های آروماتیکی‌اش می‌باشد که به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن اشاره دارد (۸). نشان داده شده است که این ترکیب پلی‌فنولی دارای فعالیت پاک-کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد و توانایی برای فعال کردن آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در نتیجه توقف چرخه معیوب ناشی از استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی را دارد (۸). EGCG مهاجرت و چسبندگی چندین نوع سلول را مهار می‌کند و دارای خواص پیشگیری کننده شیمیایی خوبی می‌باشد. EGCG دارای نقش ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی در حذف تخریبات سلولی است (۹). هدف این مطالعه بررسی میزان بیان ژن گیرنده HER 2 توسط EGCG در رده سلولی SKBR 3 سرطان سینه است. این رده نمونه بارزی از یک رده سلولی HER2 مثبت در سرطان سینه می‌باشد.

روش کار

کشت سلولی: مطالعه به صورت تجربی انجام شد. جامعه پژوهش رده سلول‌های سرطان پستان (SKBR3) تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران بود. در فلاسک کشت با محیط کشت DMEM (Gibco، آمریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco، آمریکا) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استروپتومایسین با نسبت ۵ درصد (Sigma Aldrich) رشد داده شد. سلول‌ها در معرض ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد هوای مرطوب و در دمای ۳۷ قرار گرفتند. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. برای بررسی اثر EGCG بر میزان بیان ژن HER2، سلول‌ها به تعداد 10^6 × ۵ در فلاسک T25 کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظتهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از EGCG (گروه I و گروه II به ترتیب) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند (۱۰) و سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سلول‌ها با PBS شسته شده و به هر فلاسک ۱ میلی‌لیتر محلول Biozol (BioFlux) اضافه شد و چندبار بایوزول را سوسپانس کردیم تا سلول‌ها از کف فلاسک کنده و لیز شوند. سلول‌ها درون میکروتیوپ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر ویال اضافه شد و روی یخ قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ فاز تشکیل شد، فاز رویی حاوی RNA، DNA و پروتئین و فاز پایینی حاوی بایوزول است. فاز رویی درون یک میکروتیوپ ریخته و هم حجم آن پروپانول اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس با دور rpm ۱۲۰۰۰ در مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد سانتریفیوژ ۲ فاز تشکیل شده فاز رویی که حاوی DNA و پروتئین است را دور ریختیم و به فاز پایینی که حاوی RNA است ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و تکان داده شد تا رسوب RNA کامل حل شود؛ سپس با دور rpm 1200به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ الکل را دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. بررسی کیفیت RNA با تکنیک اسپکتروفتومتری انجام شد. میکروتیوب حاوی RNA به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال و نگهداری شد. برای سنتز cDNA از dNTP (CinnaGen)، Random Hexamer Primer (Fermentas)، Reverse Transcriptase 10000u,) RiboLock RNase Inhibitor 2500u (Fermentas)، DEPC water (CinnaGen) استفاده شد. در سنتز cDNA به ازای هر واکنش، یک میکرولیتر، Random Hexamer Primer (۶۵ درجه سانتیگراد به مدت هفت دقیقه)، یک میکرولیتر dNTP، Reverse Transcriptase و RiboLock RNase Inhibitor، چهار میکرولیتر Reverse Transcriptase Buffer (5 X) و دو میکرولیتر آب DEPC اضافه می‌شود (پنج دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد). برای بررسی بیان ژنها از روش Real Time PCR استفاده شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. برای هر واکنش، یک میکرولیتر پرایمر، پنج میکرولیتر از

کیت سایبرگرین QuantiFast SYBR Green PCR Kit، یک میکرولیتر cDNA و سه میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. جهت انجام محاسبات آماری SPSS 18 و نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد. اطلاعات پس از ورود به رایانه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شد. اختلاف در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

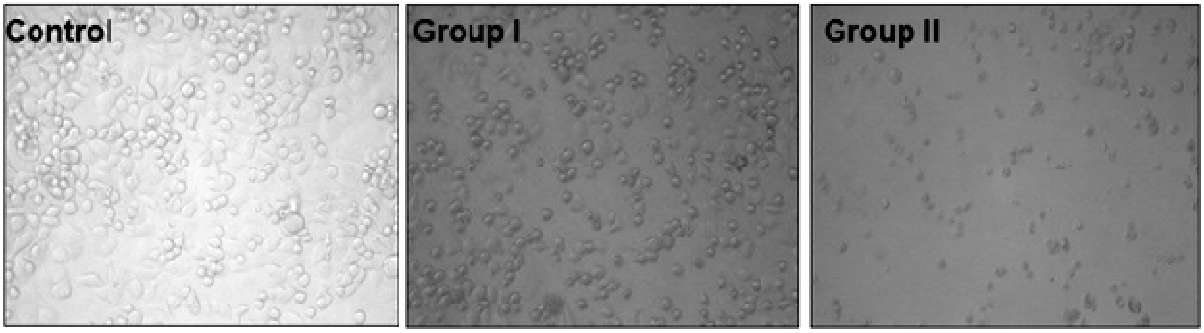
یافته‌ها

سلول‌های رده SKBR-3 در غلظت‌های مختلف EGCG در مدت زمان ۴۸ و۷۲ ساعت کشت داده شدند. مشاهدات میکروسکوپی نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده می‌باشد (شکل ۱).

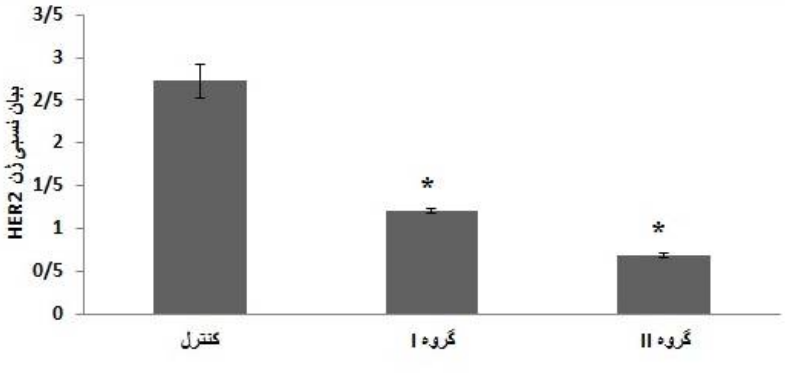
سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر EGCG طی ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و از آن‌ها RNA استخراج شد و سپس سنتز cDNA انجام شد. میزان بیان ژن HER2 با روش Real Time RT-PCR ارزیابی گردید. میزان بیان این ژن با یک ژن مرجع (GAPDH) مقایسه شد. نتایج با کمیت سنجی نسبی به روش ΔΔCT آنالیز و نمودار آنها رسم شد. با توجه به روش $\Delta\Delta C_T$ یا روش C_T مقایسه‌ای (روش کمیت سنجی نسبی) که تغییر نسبی بیان ژن را بین ژن هدف و خانه‌دار تعیین می‌کند، نتایج Real Time RT-PCR محاسبه شد (سطح بیان ژن هدف با ژن خانه‌دار، نرمال شده و وابسته به کنترل ارائه شد). پس از ۴۸ ساعت گروه I و II نسبت به کنترل باعث کاهش بیان ژن HER2 به میزان ۱/۲ و ۰/۶۸ شدند ($P<$ ۰/۰۵). این میزان در ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۹ و ۰/۵ بود ($P<$ ۰/۰۵) (شکل ۲، شکل ۳).

جدول ۱. پرایمر ژن‌های HER2 و GAPDH

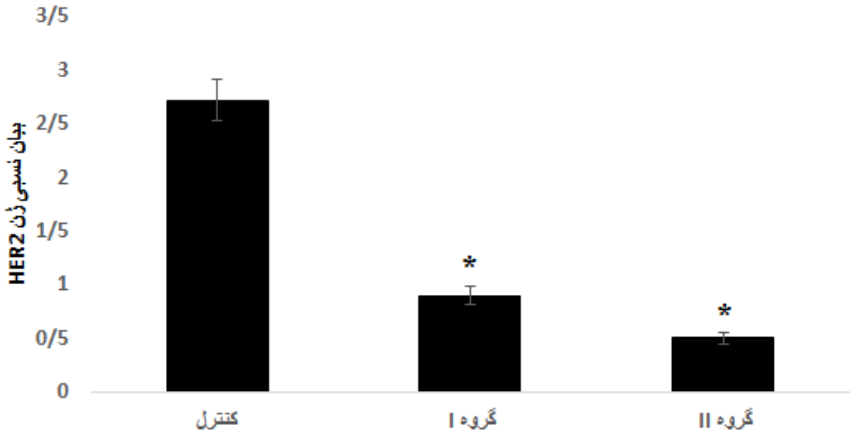
	Official Name (gene)	mRNA accession number		پرایمرها		RNA	DNA
۱	ERBB2	NM_004448.3 & other 4 variants	F	TGTGACTGCCTGTCCCTACAA	۲۱	۱۵۲	Intron-span
			R	CCAGACCATAGCACACTCGG	۲۰		
۲	GAPDH		F	GAA GGT GAA GGT GGG AGT C	۱۹	۲۸۶	۲۸۶
			R	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	۲۰		



شکل ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف EGCG بر رده سلول‌های SKBR-3 در گروه I (۲۰۰mg/ml) و گروه II (۴۰۰mg/ml) در مدت زمان ۷۲ ساعته



شکل ۲. بیان ژن HER2 در سلول‌های SKBR3 در گروه‌های آزمایشی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون



شکل ۳. بیان ژن HER2 در سلول‌های SKBR3 در گروه‌های آزمایشی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون

بحث

در تحقیقات گذشته Gravalos نشان داد که HER-2 به طور فزاینده‌ای به‌عنوان یک مولکول مکرر در سرطان پستان شناخته شده و تکثیر این ژن ما را به سمت نتایج ضعیف و قوی بیماری تهاجمی سرطان پستان هدایت می‌کند. با این حال، بیان HER-2، به عنوان یک نشان‌گر مهم برای شناسایی بیمارانی که می‌توانند با هدف قرار دادن HER-2، پاسخ درمان به استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را بسنجند، تبدیل شده است (۱۱). بررسی‌ها نشان داده که داروهای ضد سرطان جهت درمان سرطان‌ها همیشه کارایی لازم را ندارند. از اولین و معروف ترین داروهای ضدسرطان برای بیماران $HER2^+$ هرسپتین است. با توجه به این که سطح بیان گیرنده HER2 در سلولهای سرطانی از سلولهای طبیعی بسیار بیشتر است، لذا میزان حساسیت آنها به دارو کم بوده و این دارو تنها در بیماران $HER2^+$ تجویز می‌شود که حدود ۲۵-۳۰ درصد سرطانهای سینه را شامل می‌شود. در برخی از بررسی ها نشان داده شد که بعد از مصرف این دارو هیچ تأثیری در کاهش بیان ژن HER2 صورت نگرفت و فقط باعث بلوک گیرنده‌های HER2 شده است (۱۲). مطالعه حاضر در دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر از EGCG و نیز در دو زمان انکوباسیون ۴۸ و۷۲ ساعت بر روی سلول‌های سرطان پستان SK-BR-3 نتایج قابل توجهی را از میزان بیان ژن نشان داد. از آن جایی که در غلظت ۲۰۰، سلول‌ها در معرض کمتری EGCG نسبت به غلظت ۴۰۰ قرار دارند و هم-چنین در انکوباسیون ۴۸ ساعته نسبت به انکوباسیون ۷۲ ساعته مدت زمان کمتری سلول‌ها در معرض EGCG بوده، در نتیجه مشاهده شد هر چه زمان انکوباسیون و غلظت تیمار بیشتر باشد، غلبه بر رشد سلول‌های سرطانی بیشتر و بیان ژن به طور معنی‌داری کمتر خواهد بود ($P<$ ۰/۰۵). یکی از مسائل مطرح در مورد طرح حاضر و مطالعات گذشته این است که آیا EGCG و سایر ترکیبات مرتبط اثرات مهارکنندگی رشد روی سلول‌های سرطانی را از طریق رسپتورهای تیروزین کینازی سطح سلولی اعمال می‌کنند یا از طریق جذب سلولی و اتصال مستقیم به مولکول‌های داخل سلولی ضروری عمل می‌کنند. مطالعات قبلی نشان دادند EGCG اتصال EGF، فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها و فاکتور رشد فیبروبلاستی را به رسپتورهایشان مهار می‌کند (۱۳). بعلاوه EGCG می‌تواند به طور مستقیم فعالیت تیروزین کینازی EGFR را مهار کند (۱۳). این اثرات ممکن است به علت اثر EGCG بر اتوفسفریلاسیون EGFR در حضور لیگاند مربوطه باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که EGCG می‌تواند فعالیت HER2 را در سلول‌های SKBR3 مهار کند. در مطالعات قبلی اثر EGCG بر مهار فعالیت HER2 در سلول‌های تومور پستان در موش نیز گزارش شده است (۱۴).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از تست RT Real Time PCR در تحقیق حاضر، مشخص شد که میزان بیان ژن HER-2 با اثر EGCG، سیر کاهشی داشته و این باعث کاهش یا توقف رده سلول‌های سرطانی SKBR-3 شده که نقش بسیار مهمی در درمان سرطان پستان داشته است.

قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "تاثیر اپی گالوکاتچین گالات بر میزان بیان ژن *Her-2* در رده سلولهای آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3)" مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در سال ۱۳۹۴ به کد ۱۳۳۳۰۵۰۹۹۳۲۰۰۵ می باشد.

References

1. Jemal A, Tiwari R C, Murray T, Chafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2004; **54**(1): 8-29. doi: 10.3322/canjclin.54.1.8
2. Chu K C, Tarone R E, Kessler L G, Ries L A, Hankey B F, Miller B A, et al. Recent trends in US breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**(21): 1571-1579. doi: 10.1093/jnci/88.21. 1571
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D M. Globocan 2002: Cancer Incidence. Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon: IARC Press. *IARC Cancer Base* 2004; **5**(2).
4. Eddy S F, Kane S E, Sonenshein G E. Trastuzumab-resistant HER2-driven breast cancer cells are sensitive to epigallocatechin-3 gallate. *Cancer Res* 2007; **67**(19): 9018-9023. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-1691
5. Romond E H, Perez E A, Bryant J, Suman V J, Geyer C E Jr, Davidson N E. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; **353**(16): 1659-1672. doi: 10.1517/14656566.7.5.631
6. Sibilia M, Zielinsk Ch C, Bartsch R, Grunt TW. Drugs for HER-2-Positive Breast Cancer. Springer. 2011. doi: 10.1007/978-3-0346-0094-1
7. Jafari S, Saeidnia S, Abdollahi M. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. *Curr Pharm Biotechnol* 2014; **15**(4): 409-421. doi: 10.2174/1389201015666140 81 3124832
8. Zeng L, Holly J M, Perks C M. Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; **5**: 61. doi: 10.3389/fendo.2014.00061
9. Karamese M, Karamese S A, Cinar I ,Can S, Erol H S. The protective effects of epigallocatechin gallate on lipopolysa ccharide-induced hepatotoxicity: an in vitro study on Hep3B cells. *Iran J Basic Med Sci* 2016; **19**(5): 483-489.
10. Ramezani S. Effects of epigallocatechin gallate on the proliferaction and apoptosis of the human breast adenocarcinoma cell line SK-BR-3. [Dessertation]. *Islamic Azad University Shahrekord branch*. 2015.
11. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; **19**(9): 1523-1529. doi: 10.1093/annonc/mdn169
12. Nahta R, Hung M C, Hortobagyi G N, Esteva F J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; **3**(5): 269-280. doi: 10.1038/ncponc05 09
13. LiangY C, Chen C F, Lin J K. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 1997; **67**: 55-65. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(19971001)67:1%3C55:
14. Pianetti S, Kavanagh K T, Sonenshein G E. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 62-65.