Research Paper

Effect of citric acid on bioavailability and apoptosis of the human gastric Adenocarcinoma cell line (AGS)

Marzyeh Jalali[1], Leila Rouhi[1*], Khalil Khashei Varnamkhasti[1,2]

1. Department of Physiology, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. Department of Genetics, School of Medicine, Islamic Azad University of Kazerun Branch, Kazerun, Iran

*Corresponding author email: lrouhi59@gmail.com

Citation: Jalali M, Rouhi L, Khashei Varnamkhasti K, Effect of citric acid on bioavailability and apoptosis of the human gastric Adenocarcinoma cell line (AGS). Daneshvar Medicine 2021;29(1):13-22. **doi: 10.22070/DANESHMED.2021.13637.1022**

Abstract

Background and Objective: Gastric adenocarcinoma is highly invasive and patients have poor response to treatment. In this study, the effect of citric acid on viability and apoptosis of the human gastric adenocarcinoma cell line (AGS) examined. Citric acid as a naturally organic acid that found in citrus is considered as a physiological inhibitor of enzymes involved in glycolysis pathway to remove cancer cells.

Materials and Methods: In this study, 5 × 103 and 5 × 105 cells for bioavailability and apoptosis, respectively, were treated with 400, 800 and 1600 µg/ ml concentrations of citric acid and incubated for 24, 48 and 72 hours. Cell growth was analyzed by MTS kit and apoptosis was analyzed by flowcytometry using an Annexin V-FITC/PI kit according to the manufacturers protocol in both time. Statistical analysis was accomplished by ANOVA and Duncan tests using SPSS 18 softwar.

Results: The results of MTT assay showed that, bioavailability of HT-29 cell line decreased at all concentrations of citric acid in dose and time dependent manner. Also, the results of the Annexin test showed that with increasing concentration of citric acid in dose and time dependent manner, induction of apoptosis in this cell line increases.

Conclusion: Citric acid seems to be helpful as an anticancer agent for the treatment of gastric adenocarcinoma by inducing expression of genes that involved in the apoptosis pathway.

Keywords: Citric Acid, Bioavailability, Apoptosis, Gastric adenocarcinoma, AGS

Received: 22 Dec 2020
Last revised: 01 Mar 2021
Accepted: 10 Mar 2021

مقاله پژوهشی

تأثیر اسید سیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS)

نویسندگان: مرضیه جلالی[1]، لیلا روحی[1*]، خلیل خاشعی ورنامخواستی[2,1]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران

نویسنده مسئول: لیلا روحی **Email: Irouhi59@gmail.com**

دریافت: ۹۹/۱۰/۰۲
آخرین اصلاح‌ها: ۹۹/۱۲/۱۱
پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۰

چکیده

مقدمه و هدف: آدنوکارسینومای معده به شدت تهاجمی بوده و مبتلایان پاسخ به درمان ضعیفی دارند. در این مطالعه اثر اسید سیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) مورد بررسی قرار گرفت. اسید سیتریک یک اسید آلی طبیعی، موجود در مرکبات به عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی مورد توجه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد 5×10^3 و 5×10^5 سلول به ترتیب برای بررسی توان زیستی و آپوپتوز با غلظت‌های ٤٠٠، ٨٠٠ و ١٦٠٠ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسید سیتریک تیمار و در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت، انکوبه شدند. میزان رشد سلولی با روش رنگ سنجی MTS مورد بررسی قرار گرفت. میزان القا آپوپتوز به وسیله دستگاه فلوسیتومتری با کیت آنکسین-پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) طبق دستورالعمل کیت در هر سه زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸، آزمون ANOVA و تست دانکن انجام شد.

نتایج: نتایج تست MTS حاکی از آن است که توان زیستی سلول‌های رده‌ی AGS در تمام غلظت‌های اسید سیتریک به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌یابد. همچنین نتایج تست انکسین نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسید سیتریک به صورت وابسته به دوز و زمان القاء آپوپتوز افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد اسید سیتریک بتواند با القاء بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز، به عنوان یک ماده‌ی ضد سرطان در راستای درمان سرطان معده بکار رود.

کلمات کلیدی: اسید سیتریک، توان زیستی، آپوپتوز، آدنوکارسینومای معده، AGS

مقدمه

سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ می باشد. سرطان معده در جهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود (۱). این سرطان از دسته سرطان‌هایی است که به آرامی و طی سالیان رشد می‌کند، اما قبل از آنکه به معنای واقعی بروز نماید، تغییراتی در لایه‌های معده ظاهر می‌گردد، ولی متأسفانه علائم چندانی را در این مرحله به دنبال نداشته و به همین دلیل این نوع بدخیمی به سختی در مراحل ابتدایی تشخیص داده می‌شود. این در حالی است که اگر بدخیمی-های معده در مراحل اولیه کشف و درمان شوند، روند بهبود برای مبتلایان فراهم می‌گردد (۲،۳). بروز تدریجی چندین جهش در ژن‌های کنترل کننده‌ی مسیرهای حیاتی سلول از جمله رشد، نمو و مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی باعث تولید توده‌های توموری در بافت معده می-شود که از قوانین تکاملی حاکم بر ماهیت پر سلولی یک موجود زنده پیروی نکرده و با کسب ویژگی‌هایی از جمله عدم توجه به فاکتورهای رشد داخلی و خارجی، توانایی تکثیر خود به خودی، فرار از آپوپتوز و متاستاز سرطان معده را ایجاد می‌کنند (٤،٥). در طی سال‌های اخیر، دانش و درک ما از فرآیندهای مولکولی که موجب بروز و پیشرفت سرطان می‌شوند، به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. این امر منجر به توسعه درمان‌های هدفمند شده است که این فرآیندهای مولکولی را مختل می‌نمایند. از جمله‌ی این دستاوردهای علمی برای درمان سرطان معده می‌توان به جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی، ایمنی درمانی و استفاده از داروها اشاره کرد؛ اما با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی و همچنین اثرات منفی بر سایر بافت‌ها و سلول‌های بدن، امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان دارو به دنبال دارا بودن اثرات جانبی کمتر در مقایسه با ترکیبات شیمیایی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (٦،٧). اسید سیتریک یک اسید آلی طبیعی می‌باشد که عموماً در عصاره‌ی برخی از میوه‌جات و سبزیجات، به ویژه مرکبات یافت می‌شود. این اسید آلی هم اکنون به طور گسترده به عنوان یکی از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). علاوه بر آن امروزه اسید سیتریک به عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی از طریق القای مرگ برنامه ریزی شده نیز مورد توجه می‌باشد (۹). ارتباط بین گلیکولیز و آپوپتوز به سطح آنزیم هگزوکیناز II بر می‌گردد. آنزیم هگزوکیناز II گلوکز را به گلوکز ٦ فسفات تبدیل می‌نماید و باعث پیشبرد فرآیند گلیکولیز به وسیله‌ی آبشار آنزیمی می‌شود و زمانی که منافذ غشاء خارجی میتوکندری باز هستند، باعث پایداری یک جزء ساختاری این منافذ تحت عنوان VDAC شده که نقش آن تنظیم نفوذپذیری منافذ می‌باشد. لذا پایداری ایجاد شده در این جزء توسط هگزوکیناز II نفوذپذیری را در غشاء خارجی غیرفعال می‌کند. با حذف هگزوکیناز II از مجموعه، نفوذپذیری در غشاء خارجی میتوکندری القاء می‌گردد که به دنبال آن سیتوکروم C به درن سیتوپلاسم ترشح شده و آبشار کسپازی به راه می‌افتد و آپوپتوز القاء می‌گردد. اسید سیتریک از طریق تأثیرگذاری بر سطح آنزیم هگزوکیناز II و دیگر آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز عملکرد ضد سرطانی خود را اعمال می‌نماید (۱۲– ۱۰). تحقیقات انجام شده توسط محققان نیز این ادعا را اثبات نموده‌اند. برای مثال؛ ارزیابی کارایی درمانی اسید سیتریک در مدل‌های سرطانی مختلف نشان داد که اسید سیتریک قادر است از طریق چندین مکانیسم، رشد سلول سلول‌های سرطانی را مهار نماید (۱۳). همچنین نتایج بررسی اثرات درمانی اسید سیتریک در درمان سرطان، حاکی از حذف ریز محیط تومور توسط این اسید آلی می‌باشد (١٤). از این رو در مطالعه حاضر اثر اسید سیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) مورد بررسی قرار گرفت.

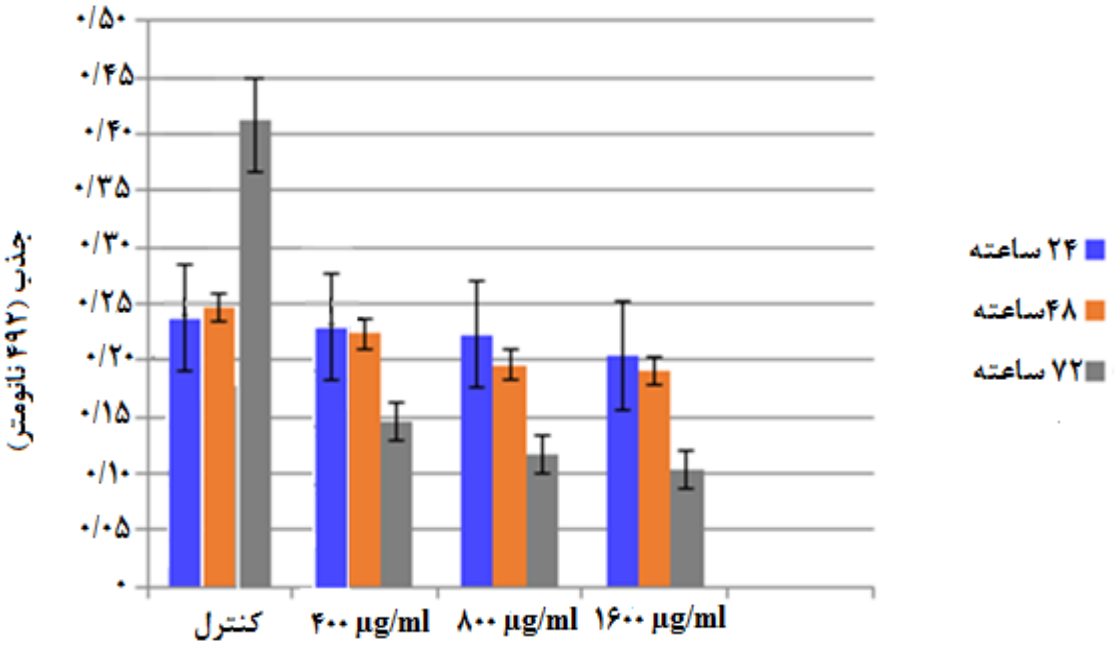
مواد و روش ها

این مطالعه به صورت 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. رده‌ی سلولی AGS از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM-F12

(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 CO2، 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. اسید سیتریک به صورت آماده و به حالت جامد از شرکت SIGMA-ALDRICH با نام تجاری Citric acid- anhydrous, cell culture tested و شماره محصول C۲٤۰٤ تهیه گردید. توان زیستی سلول-های رده‌ی AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک توسط تست MTS، با استفاده از کیت MTS (Promega,USA) با شماره محصول G5421 مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک پلیت ۹٦ چاهکی کشت داده شد و سپس با غلظت‌های ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسید سیتریک برای مدت زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تیمار و انکوبه گردید (۱۵). پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار جمع آوری شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTS به هر چاهک اضافه گردید و انکوباسیون ٤ ساعته صورت گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه ELISA- reader با طول موج ٤۹۲ نانومتر خوانش گردید. القاء آپوپتوز در رده سلولی AGS، از طریق تست Annexin V-FITC/PI، با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، با شماره محصول (۵۵٦۵٤۷)، مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول در پلیت‌های کشت ٦ خانه کشت داده شد و سپس، با غلظت‌های ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسید سیتریک در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفت. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار جمع آوری شد. پس از ترپسینه کردن، رسوب سلولی دو بار با محلول PBS (Phosphate-buffered saline)، (SIGMA-ALDRICH, USA)، سرد شستشو گردید. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر به سلول‌ها اضافه شد و سوسپانس سلول و بافر به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری انتقال یافت. با اضافه کردن ۵ میکرولیتر Annexin و PI به لوله‌ها و به حجم رساندن آنها با بافر به میزان ۲۰۰ میکرولیتر برای سایر لوله-ها و ۵۰۰ میکرولیتر برای لوله‌های کنترل، لوله‌ها به محیط تاریک و در دمای اتاق ظرف مدت زمان ۲۰ دقیقه انتقال داده شدند. پس از گذشت مدت زمان معلوم از دستگاه فلوسیتومتری (BD Facscalibur, USA) جهت خوانش نتایج استفاده گردید. نهایتاً بررسی آماری با تائید نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف، از طریق نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ و با استفاده از آزمون ANOVA، آزمون تعقیبی دانکن و آزمون تی زوجی انجام شد. حدود اطمینان برای همه‌ی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $P < ۰,۰۵$ معنی‌دار محسوب گردید.

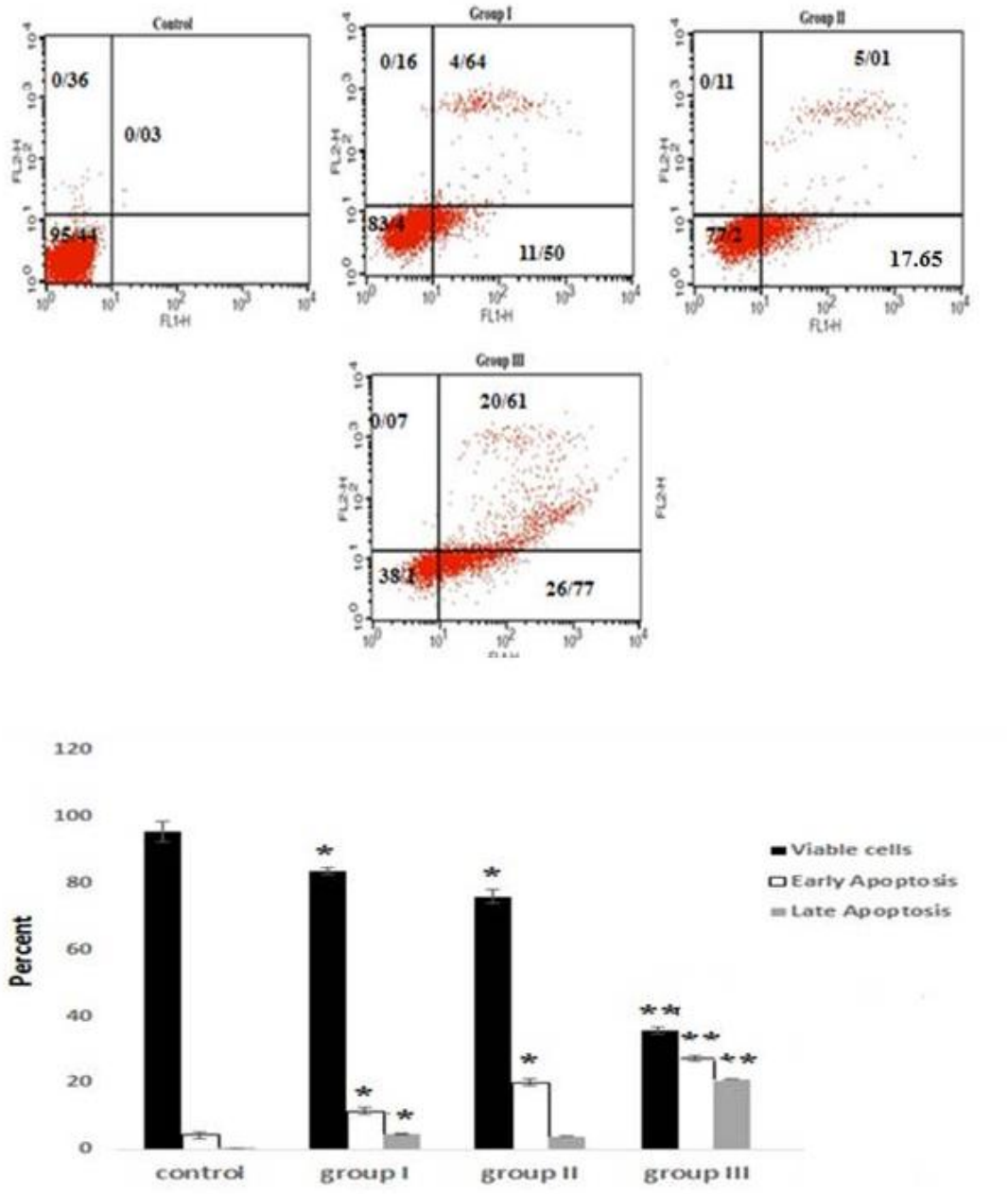
یافته‌ها

توان زیستی سلول‌های رده‌ی AGS تیمار شده با غلظت-های مختلف اسید سیتریک (٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر)، بعد از گذشت زمان‌های سه گانه‌ی انکوباسیون (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست MTS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می‌باشد که اسید سیتریک قادر است رشد سلول‌های آدنوکارسینومای معده 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).



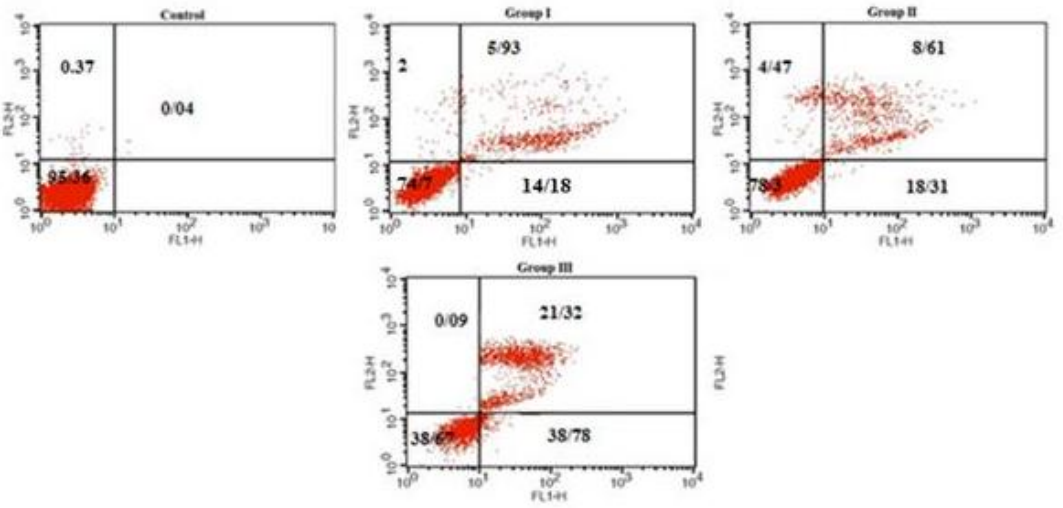
شکل ۱. اثر اسید سیتریک بر توان زیستی رده سلولی **AGS** تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

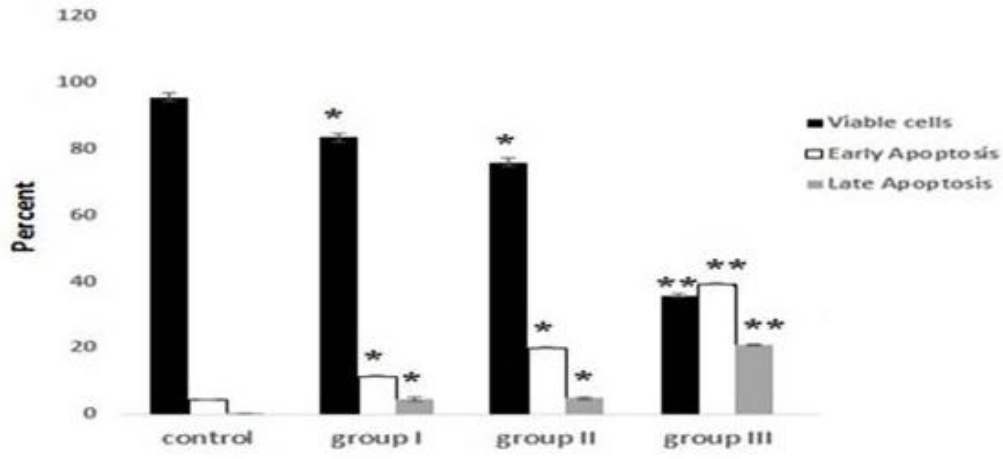
به علاوه وقوع آپوپتوز در رده سلولی AGS تحت تأثیر اسید سیتریک با استفاده از تست Annexin V-FITC مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که سلول‌ها برای مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سیتریک قرار گرفتند. سپس تأثیر این غلظت-ها بر القاء آپوپتوز در رده سلولی AGS اندازه گیری شد و آنالیز آماری صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که درصد مرگ سلولی با افزایش دوز و طول زمان تیمار با اسید سیتریک افزایش یافته است. به طوری که درصد سلول‌های زنده در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل که شامل ۹۵/۴۴ درصد سلول زنده بود، کاهش را نشان داد. این اختلاف در افزایش درصد وقوع آپوپتوز از نظر آماری در همه‌ی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد (اشکال ۲– ٤).



شکل ۲. درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های **AGS** تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ٤٠٠، ٨٠٠ و ١٦٠٠ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت ٢٤ ساعت

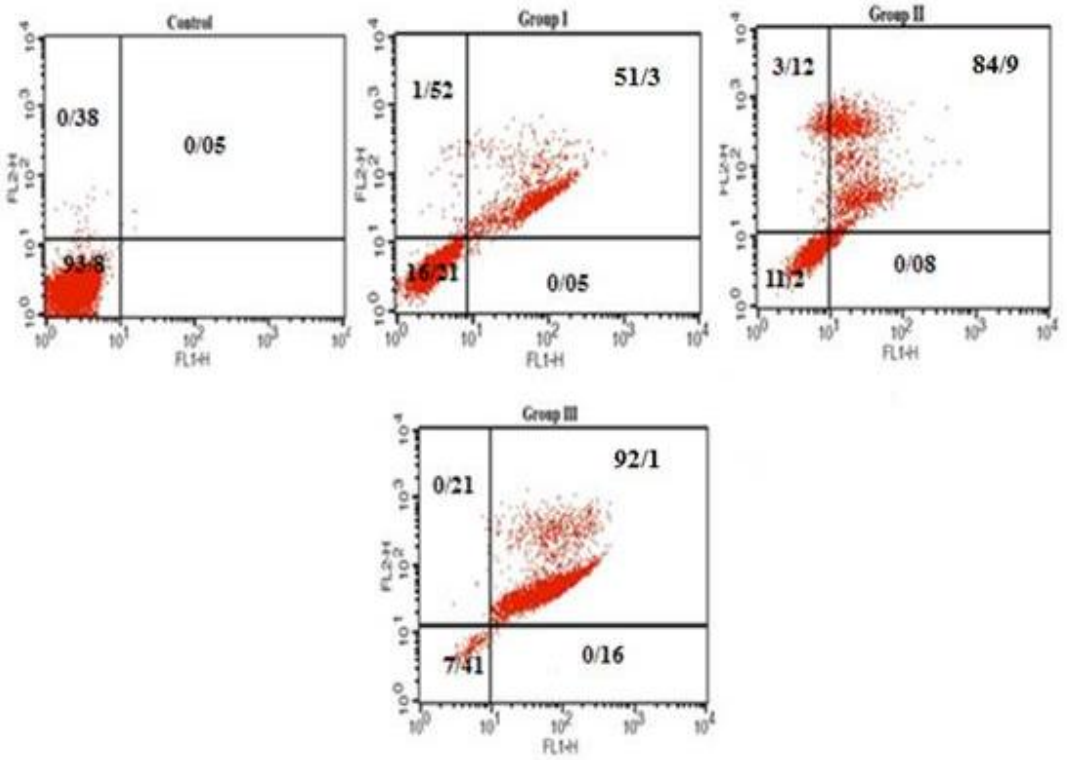
$^{*}P<0.05$؛ $^{**}P<0.01$ در مقابل گروه کنترل

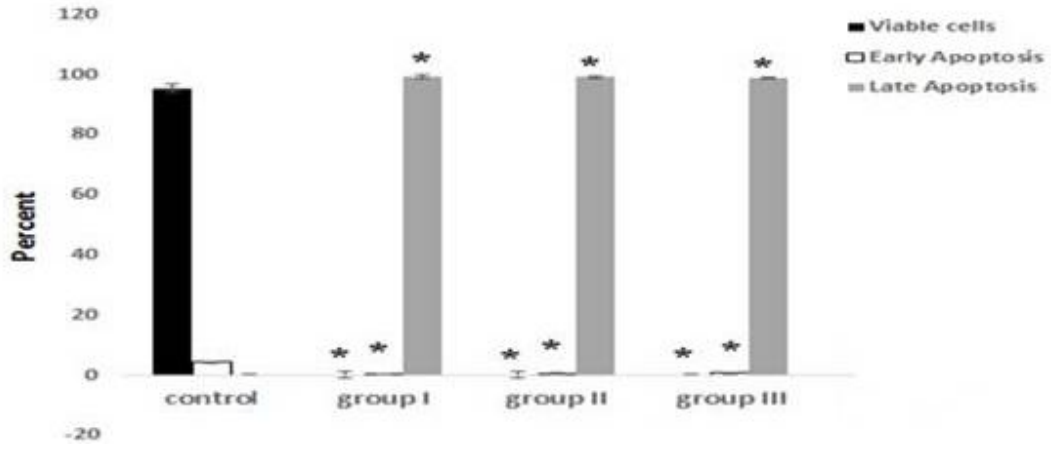




شکل ۳. درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های **AGS** تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ٤٠٠، ٨٠٠ و ١٦٠٠ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت ٤٨ ساعت

P<0.01*؛ ****P<0.001 در مقابل گروه کنترل





شکل ۴. درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های **AGS** تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک ٤٠٠، ٨٠٠ و ١٦٠٠ میکروگرم/ میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت

P<0.001 * در مقابل گروه کنترل

بحث

در تحقیق حاضر توانایی اسید سیتریک در مهار رشد و خاصیت ضد تکثیری آن که از طریق القاء مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی اعمال می‌گردد، در سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل شده حاکی از آن می‌باشد که اسید سیتریک قادر است رشد سلول‌های آدنوکارسینومای معده را به صورت وابسته به دوز و زمان مهار نماید. به طور مشابه بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۰۸ در زمینه‌ی اثر اسید سیتریک بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، نیز نشان می‌دهد که اسید سیتریک با تأثیر روی بیان پروتئین p_{53}، بیان پروتئین p_{21} و آزاد سازی سیتوکروم C آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القاء می‌نماید (۱۱). تحقیقات سال ۲۰۱۱ نیز نشان می‌دهد که اسید سیتریک به عنوان یک آنتی گلیکولیتیک و مهارکننده‌ی آنزیم فسفو فروکتوکیناز قادر است از طریق کاهش بیان ژن *Mcl-1* و افزایش بیان ژن-های پروآپوتوزی p_{53} و p_{21} باعث تخریب سلول‌ها و آپوپتوز در آنها شود (١٦). مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که اسید سیتریک نه تنها مانع از تکثیر سلول-های HaCaT به روش وابسته به دوز می‌شود، بلکه باعث القاء ژن‌های پروآپوپتوزی و توقف چرخه سلولی در مرحله G2 / M می‌شود (۱۷). در سال ۲۰۱۷ بررسی اثر درمانی اسید سیتریک در سلول‌های مختلف سرطان نشان داد که تمایز سلول‌های سرطانی با اثر سیتریک اسید از طریق مهار چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید متوقف می-شد، لذا اسید سیتریک می‌تواند برای درمان سرطان مفید باشد (۱۳).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تست MTS و فلوسیتومتری صورت گرفته در تحقیق حاضر، بیانگر این مسئله می‌باشد که اسید سیتریک احتمالاً قادر است با تأثیرگذاری بر مسیر مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی، آپوپتوز را در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان القاء نماید و از این طریق در درمان سرطان معده مؤثر واقع گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان بررسی اثر اسید سیتریک بر توان زیستی و میزان وقوع آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در سال ۱۳۹۷ با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.028 می‌باشد.

منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2011; 61 (2): 69-90.
2. Sotoudeh M, Mirsamadi MM, Sedghi M. Comparison of the type of intera cellular mucin in patients with.pylori gastritis and normal population. Tehran University Medical Journal 2002; 9(29):245-249.
3. Harrison, Fauci, and Braunwald. Principle of internal medicine. New York, McGraw Hill, 14th ed. 1998;1610-1612.
4. Kitano H. Cancer as a robust system: implicationsfor anticancer therapy. Nature Reviews Cancer 2004; 4(3):227-235.
5. McCormick F. Cancer Gene Therapy: Fringe orcutting edge?. Nature Reviews Cancer 2001;1(2):130-141.
6. Backwith D, G Mantle. Inequalities in health and community-oriented social work lessons from cuba?. International Social Work 2009; 59: 499-511.
7. Cassileth BR. Complementary and alternative therapies for cancer. The oncologist 2004; 9(1): 80-89.
8. An overview of citric acid production. LWT- Food Science and Technology 2013; 50(2): 367-370.
9. Zhang X, Varin E, Allouche S, Lu Y, poulain L, Icard P. Effect of citrate on

malignantpleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin. Anticancer Research 2009; 29(4): 1249-1254.

10. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrialbound type II hexokinase: a key player in the growth andsurvival of many cancers and an ideal prospect for therapeuticintervention. Biochimica et Biophysica Acta 2002; 1-3(1555):14-20.

11. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 2008; 40(3):171-182.

12. Satoaki M, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. Science 2006; 312(5780): 1650-1653.

13. Ren JG, Seth P, Ye H, Guo K, Hanai J, Husain Z, Sukhatme VP. 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.

14. Huang L, Wang C, Xu H, Peng G. Targeting citrate as a novel therapeutic strategy in cancer treatment. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 2020; 1873(1):188332.

15. 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 (Yakhteh) 2017;18(4):493-502.

16. 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.

17. Ying TH, Chen CW, Hsiao YP, Hung SJ, Chung JG, Yang JH, et al. 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):4411-4420.