DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8
مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی القای اتوفاژی و مرگ سلولی در سلول‌های MCF-7 در حضور کوئرستین

شاهرخ صفریان[1*] و آی سان عرفانی[2]

[1] **ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم سلولی و مولکولی**

[2] **ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی ایران واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۷

چکیده

در این مطالعه، امکان وقوع اتوفاژی مرگ در حضور کوئرستین به روی سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار گرفته است. در ابتدا غلظت موثر از کوئرستین برای نابودی ۵۰ درصد از سلول‌ها (LC_{50}) با استفاده از روش MTT مشخص و معادل ۲۲۰ µM تعیین شد. برای تعیین نوع مرگ سلولی از روش فلوسیتومتری و نشانگرهای ویژه‌ی آن شامل Annexin-FITC و PI استفاده گردید. براین اساس، نوع اصلی مرگ سلولی در تیمار سلول‌ها با کوئرستین، آپوپتوز و درصد آن معادل ۵۴٪ تشخیص داده شد. در روش real time RT-PCR ژن‌های p53، Bax، Bcl-2 و casp-3 در رابطه با مسیر آپوپتوز مورد توجه قرار گرفت. مطالعات ما نشان داد که کاهش معنادار مشاهده شده در بیان Bcl-2، با توجه به نقش ضدآپوپتوزی آن، نمایانگر افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی پستان نسبت به مرگ آپوپتوزی در حضور کوئرستین می‌باشد. افزایش مقدار عددی مربوط به نسبت Bax/Bcl-2 نشان می‌دهد که علی‌رغم ثبات مشاهده شده در بیان ژن Bax، افزایش حساسیت سلول‌ها نسبت به آپوپتوز از طریق کاهش بیان Bcl-2 امکان‌پذیر می‌باشد. بمنظور بررسی اثرات کوئرستین در القای مسیر اتوفاژی، ژن‌های mTOR، LC3، Beclin-1 و DRAM انتخاب شدند و تغییرات بیان آنها در حضور کوئرستین مورد مطالعه قرار گرفت. کاهش سطح بیان ژن mTOR، در کنار افزایش شدیدی که در بیان LC3 مشاهده می‌شود، مجموعا وقوع اتوفاژی را باثبات می‌رساند.این موضوع با استفاده از آنتی‌بادی LC3II و بهره‌گیری از روش ایمونوسیتوشیمی نیز مورد تایید قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که کوئرستین توانایی نابودی سلول‌های سرطانی پستان را از طریق اتوفاژی مرگ دارا می‌باشد.

واژه های کلیدی: کوئرستین، اتوفاژی، آپوپتوز، سرطان پستان، MCF-7

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۳۳۱۲ ۰۲۱، پست الکترونیکی: ssafarian@ut.ac.ir

مقدمه

فلاونوئیدها گروهی از پلی‌فنول‌های گیاهی هستند که اثرات زیستی بسیار متنوعی را از خود به نمایش می‌گذارند. از جمله اثرات مهم فلاونوئیدها می‌توان به اثرات پاداکسایشی، ضدالتهابی، ضدجهش‌زایی و ضدسرطانی آنها اشاره نمود (۲۰، ۲۵، ۲۸، ۲۹، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۹، ۵۹). فلاونوئیدها مهمترین گروه از ترکیبات ضدسرطان با منشا گیاهی هستند که اثرات درمانی خود را از طریق توقف در تکثیر سلولی و یا القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ظاهر می‌سازند (۱۴، ۳۸). کوئرستین نوعی فلاوونوئید با اثرات ضدسرطانی است که به میزان فراوان در چای سبز، چای سیاه، پیاز، اسفناج و بروکلی خام و پوست سیب وجود دارد (۲۳، ۳۷، ۴۴). اثرات ضدسرطانی کوئرستین در سرطان‌های مختلف مانند کولون، سر و گردن، پستان، معده و تخمدان گزارش شده است (۷، ۸، ۱۶، ۴۲، ۵۰، ۵۲، ۶۲). سازوکار کوئرستین در نابودی سلول‌های سرطانی بسیار متنوع است (۱۴). بخشی از اثرات ضدسرطانی کوئرستین با جلوگیری از بروز تنش‌های اکسایشی بانجام می‌رسد (۱۵، ۲۱، ۲۲، ۳۲، ۵۸، ۶۰). کوئرستین با رهاسازی

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

p-گلیکوپروتئین سبب افزایش اثرات ضدسرطانی آدریامایسین در سلول‌های MCF-7 سرطان سینه می‌شود (۴۷). کوئرستین می‌تواند با القای آپوپتوز از گسترش سرطان جلوگیری کند (۲، ۵۵، ۵۷، ۶۴، ۶۵). در رابطه با سرطان مثانه گزارش شده است که کوئرستین قادر است با مهار بیان p53 سبب افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به آپوپتوز شود (۴).

یکی از سازوکارهای سلولی در رابطه با بروز اثرات ضدسرطانی داروها، القا و راه‌اندازی مسیر اتوفاژی می‌باشد (۱۲، ، ۳۵، ۵۴، ۵۶). اتوفاژی یکی از فرایندهای زیستی برای حفظ هموستازی سلولی است که نقش خود را با حذف اندامک‌های آسیب دیده (مانند میتوکندری‌ها) و یا پروتئین‌های بدتاخورده ایفا می‌کند (۳، ۱۷، ۶۳). مطالعات اخیر نشان داده است که اتوفاژی دارای نقشی دوگانه در مورد گسترش سرطان می‌باشد. در سرطان‌های پیشرفته، اتوفاژی با تنظیم سوخت و ساز سلولی و همچنین افزایش مقاومت دارویی سبب گسترش سرطان می‌شود (۳، ۱۳). از سوی دیگر، اتوفاژی بواسطه‌ی نقش مهمی که در مهار تنش‌های اکسیداتیو دارد از بروز آسیب‌های ژنی و ایجاد سرطان جلوگیری می‌کند (۱۳). عزم سلول در گزینش بین نقش دوگانه‌ی اتوفاژی، بستگی کامل به میزان پیشرفت بیماری دارد به شکلی که در مراحل پیش از سرطانی شدن و یا در مراحل اولیه‌ی بروز سرطان، با ممانعت از ایجاد تنش‌های اکسیداتیو، تلاش بیشتری را در جهت جلوگیری از بروز سرطان و یا بدخیمی در سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد در حالی که در مراحل پیشرفته‌ی سرطان، سلول‌های سرطانی تلاش می‌کنند تا با استفاده از اتوفاژی، در جهت گسترش بیشتر بیماری گام بردارند (۱۳). از سوی دیگر، گزارش‌های متعددی در رابطه با توانایی کوئرستین در القای اتوفاژی مرگ در سلول‌های سرطانی، از جمله سرطان کولون وجود دارد که می‌تواند از این طریق سبب مرگ و نابودی سلول‌های سرطانی شود (۳۶).

تاکنون گزارش دقیقی در رابطه با نقش کوئرستین در راه‌اندازی مسیر اتوفاژی مرگ در سلول‌های سرطان پستان ارائه نشده که این موضوع بعنوان محور اصلی مطالعه در این پژوهش مورد توجه ما قرار گرفته است.

مواد و روشها

مواد مورد نیاز: رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه MCF-7 است که از رده‌های سلولی سرطان پستان درانسان می‌باشد.این رده سلولی از انیستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت انتخابی RPMI-1640 (Gibco) همراه با ۱۰ FBS درصد کشت داده شده است.

در این مطالعه از محلول پنی سیلین-استرپتومایسین ۱۰۰x و محلول Trypsin – EDTA(۵x) ساخت شرکت Gibco استفاده شده است. سرم FBS، رنگ PI و کیت سنجش اتوفاژی MAK138Autophagy assay از شرکت Sigma (آمریکا) و کیت آپوپتوز Annexin V از شرکت eBiosciences (آمریکا) تهیه گردید. استخراج total RNA با استفاده از کیت RNX-Plus شرکت سینا کلون (ایران) و ساخت cDNA با استفاده از کیت NG dART RT تولید کمپانی EURx (لهستان) انجام شد. ساخت پرایمرهای لازم برای انجام RT-PCR پس از طراحی در نرم‌افزار Beacon designer توسط شرکت پیشگام (ایران) صورت گرفت. مطالعات real time RT-PCR با استفاده از کیت RealQ PCR 2x Master Mix Green محصول شرکت Ampliqon (دانمارک) و دستگاه Applied Biosystem (آمریکا) انجام شد.

کشت سلولی: برای کشت سلول‌ها از محیط RPMI-1640 حاوی L- گلوتامین، بی‌کربنات سدیم و FBS ۱۰٪ استفاده شده است. سلول‌ها در درون پلیت‌های شش خانه در انکوباتور ۳۷°C و تحت شرایط ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۰٪ کشت داده شد و مورد تیمار دارویی قرار گرفت.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

آماده سازی دارو و تیمار سلول‌ها: ساخت محلول دارویی، با استفاده از محلول کوئرستین شرکت Biocera (کُره جنوبی) با غلظت ۵۰µg/5ml انجام شد. غلظت‌های مورد نظر از دارو در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم ساخته و پس از استریل کردن توسط فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون، به چاهک های پلیت شش خانه افزوده گردید.

تعیین درصد زیستایی سلول‌ها با MTT: برای انجام سنجش مرگ و میر سلولی، تعداد ۷۰۰ هزار سلول به هر چاهک از پلیت شش خانه منتقل و پس از رسیدن به تراکم سلولی ۶۰ درصد، داروی کوئرستین با غلظت‌های مورد نظر به چاهک‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت، چاهک‌ها از محیط کشت تخلیه و به هر چاهک ۴۰۰ µl از محلول MTT (۲۰ µg/µl) افزوده شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، بلورهای فورمازان تولید شده، در ۲ ml حلال DMSO حل گردید. برای خوانش جذب نوری، مقدار ۱۰۰ µl از محلول رنگی بدست آمده، به دستگاه پلیت‌ریدر Rayto (چین) انتقال داده شد.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus Solution For Total RNA Isolation محصول شرکت سینا کلون (ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. بر این اساس، پس از گذشت ۴۸ ساعت، محتویات هر چاهک از پلیت شش خانه پس از جداسازی و شستشوی سلول‌ها، برای استخراج RNA بر روی یخ قرار داده شد.

با توجه به میزان رسوب سلولی، مقدار ۱۰۰–۵۰ µl از محلول RNX-Plus سرد به روی سلول‌ها ریخته و فروپاشی ساختار غشایی به منظور برون‌ریزی محتویات درون سلولی با استفاده از ورتکس انجام شد. برای جداسازی RNA از ۴۰ µl کلروفرم سرد و انجام سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ rpm استفاده شد. این کار موجب جداسازی RNA در فاز رویی می‌شود که می‌توان آن را با افزودن ایزوپروپانول سرد رسوب داد.

رسوب RNA پس از شستشو در اتانول ٪۷۰، در ۲۰ µl آب DEPC حل و بخشی از آن (۲ µl) برای ارزیابی کمی و کیفی RNA در دستگاه نانودراپ مورد استفاده قرار گرفت. باقیمانده محلول استخراج شده‌ی RNA در فریزر ۸۰°C– نگهداری شد.

ارزیابی کمی و کیفی RNA: برای کمی کردن و بررسی خلوص RNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد و نسبت‌های جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ و یا ۲۶۰ به ۲۳۰ در بازه‌ی ۰/۱ ± ۲ تعیین گردید. ارزیابی کیفی RNA همچنین با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ صورت گرفت.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از کیت NG dART RT تولید کمپانی EURx (لهستان) در حجم نهایی ۲۰ µl صورت گرفت. نمونه‌های آماده شده از RNA (۱ µg) در حضور پرایمر رندوم هگزامر (۱ µl) برای انجام یک چرخه‌ی ساخت، تحت برنامه‌ی دمایی معرفی شده در برگه‌ی دستورالعمل کیت قرار گرفتند. این برنامه دمایی شامل مراحل زیر است: ۱۰ min در دمای ۲۵°C ، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C و ۱۰ min در دمای ۷۰°C. در پایان، محصول cDNA تا زمان استفاده در فرایند real time RT-PCR، در فریزر ۲۰°C– نگهداری شد.

واکنش real time RT-PCR: real time RT- PCR با استفاده از کیت RealQ PCR 2x Master Mix Green محصول شرکت Ampliqon (دانمارک) محتوی رنگ سایبر گرین و در حجم نهایی ۱۰ µl انجام شد. برای انجام کار، ۱ µl محلول cDNA بهمراه ۱ µl از مجموع پرایمرهای پیشرو و پسرو توسط ۳ µl آب دیونیزه به حجم ۱۰ µl رسانده و تحت برنامه دمایی زیر در دستگاه رانده شد:

دناتوراسیون اولیه بمدت ۱۵ min در دمای ۹۵°C، ۴۰ چرخه تکثیر شامل مراحل: ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰°C و ۱ min در دمای ۷۲° C می‌باشد. در

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

هر بار رانده شدن، نمونه NTC (No Template Control) که فاقد cDNA می‌باشد برای هر پرایمر در نظر گرفته شد تا از عمل‌کرد صحیح واکنش PCR اطمینان حاصل گردد.

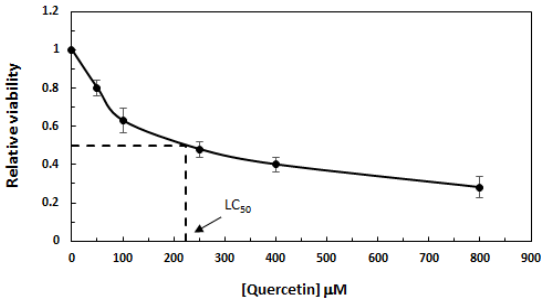
سنجش آپوپتوز و نکروز با بهره‌گیری از روش فلوسایتومتری (رنگ آمیزی Annexin-FITC و PI): بمنظور تعیین تعداد سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی در یک جمعیت سلولی، رنگ‌آمیزی هر چاهک از پلیت شش خانه، با استفاده از ۵ µl از هر کدام از رنگ‌های Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI) انجام گرفت. برای پردازش داده‌های فلوسایتومتری از نرم افزار FlowJo استفاده شد. نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه‌ی Q_1 تا Q_4 تقسیم شد. ناحیه‌ی Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^+، ناحیه‌ی Q_2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده‌ی پیر با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^+، ناحیه‌ی Q_3 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده‌ی جوان با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^- و ناحیه‌ی Q_4 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^- می‌باشد.

سنجش اتوفاژی با انجام مطالعات ایمونوسیتوشیمی: در ابتدا سلول‌ها در ۲ چاهک از یک چمبر اسلاید به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد کشت داده شدند و پس از فراهم شدن لایه‌ی سلولی مناسب، تیمار دارویی با افزودن کوئرستین (۲۲۰ µM) صورت پذیرفت. در اینجا، از کیت MAK138Autophagy برای سنجش اتوفاژی استفاده شد که حاوی آنتی‌بادی نشاندار علیه LC3II بعنوان بهترین شاخص برای تشکیل اتوفاگوزوم‌ها می‌باشد. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با استفاده از ۱۰۰ µl محلول رنگی به ازای هر چاهک و انکوباسیون در دمای ۳۷°C بمدت ۴۵ دقیقه (در تاریکی) صورت گرفت.

چگونگی تحلیل نتایج: نتایج حاصل از آزمون MTT به همراه نتایج real time RT-PCR به کمک نرم‌افزار Microsoft Office Excel مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج فلوسیتومتری با استفاده از نرم افزار Flowju مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لازم به ذکر است که آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده و سطح معنی داری زیر $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج سنجش MTT: نتایج سنجش MTT معمولا براساس نسبت جذب نوری ثبت شده در تیمار دارویی سلول‌ها در قیاس با جذب نوری نمونه‌ی کنترل که معرف زیستایی نسبی است گزارش می‌شود که بر همین اساس، در نمودار شکل ۱ به ازای هر غلظت از دارو نشان داده شده است. بدین ترتیب، با استفاده از نمودار MTT می‌توان غلظت کشنده‌ای از کوئرستین را که باعث مرگ نیمی از سلول‌ها می‌شود تحت عنوان LC_{50} بدست آورد و در انجام مطالعات بعدی در نظر گرفت. مطالعات ما با استفاده از نمودار MTT نشان داد که غلظت LC_{50} برای کوئرستین معادل ۲۲۰ µM می‌باشد که این غلظت در باقی آزمایش‌ها به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است.

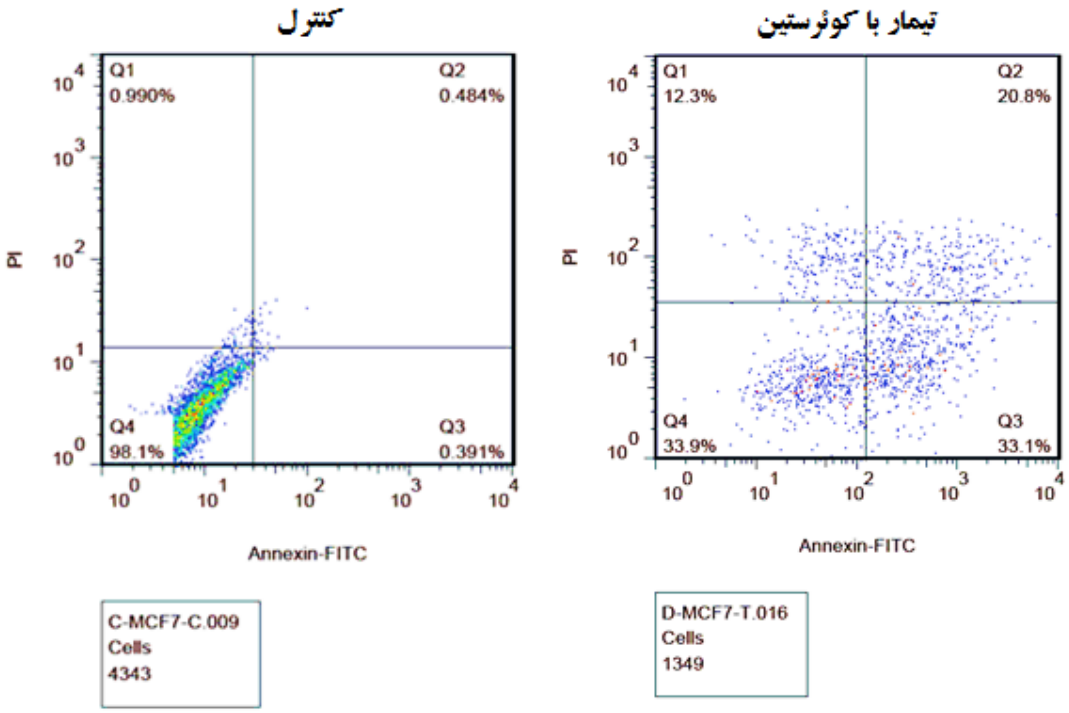


شکل۱- نمودار سنجش MTT در غلظت‌های مختلف از کوئرستین. براساس این نمودار، غلظت ۲۲۰ µM از کوئرستین توانایی کشتن نیمی از سلول‌ها را دارد. LC_{50} برای کوئرستین معادل ۲۲۰ µM می‌باشد.

نتایج حاصل از فلوسیتومتری: برای بررسی و تعیین ساز و کار مربوط به اثر کشندگی کوئرستین به روی سلول‌های MCF-7 از روش فلوسیتومتری استفاده شده است (شکل ۲). نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی در چهار ناحیه Q_1-Q_4 پراکنده می‌باشد. ناحیه‌ی Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی، ناحیه‌ی Q_2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده‌ی

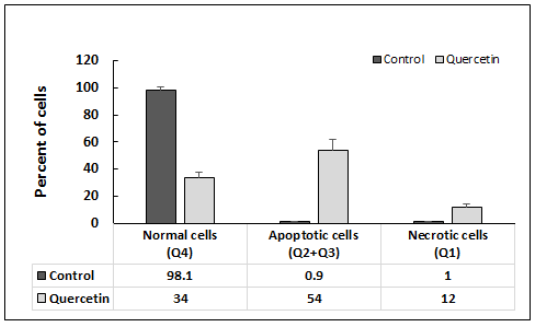
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

پیر، ناحیه‌ی Q_3 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده‌ی جوان و ناحیه‌ی Q_4 نمایانگر سلول‌های سالم است. درصد سلول‌های هر ناحیه در هر بخش از شکل نشان داده شده است. از جمع درصد سلول‌های موجود در نواحی Q_2 و Q_3 می‌توان درصد کل سلول‌های آپوپتوزی را مشخص نمود.



شکل۲- نمودار دوبعدی نتایج فلوسیتومتری مربوط به تیمار سلول های MCF-7 با کوئرستین. درصد سلول‌های مرتبط با هر منطقه در شکل نشان داده شده است. نقاط ثبت شده در مناطق Q_2 و Q_3 نمایانگر تعداد سلول‌هایی است که در آنها آپوپتوز روی داده است. مقدار بروز آپوپتوز برای کنترل تیمار نشده برابر ۰/۹٪ و برای نمونه‌ی تیمارشده با کوئرستین برابر با ۵۴٪ می‌باشد. نقاط موجود در منطقه‌ی Q_3، در نمونه‌های کنترل و تیمار، نمایانگر سلول‌های نکروزی و نقاط موجود در منطقه‌ی Q_1 نشان‌دهنده‌ی سلول‌های سالم می‌باشد.

نمودار ستونی مربوط به درصد مشاهده شده از انواع مرگ سلولی ناشی از تیمار سلول‌ها با کوئرستین در شکل ۳ نشان داده شده است. رسم این نمودار ستونی براساس نتایج حاصل از داده‌های فلوسیتومتری صورت گرفته است. همانگونه که مشاهده می‌شود ستون مربوط به سلول‌های آپوپتوزی در تیمار کوئرستین معرف مجموع درصد سلول‌های موجود در نواحی Q_2+Q_3 است که وقوع مکانسیم آپوپتوز بعنوان سازوکار اصلی مرگ سلولی در آنها ثبت شده است.

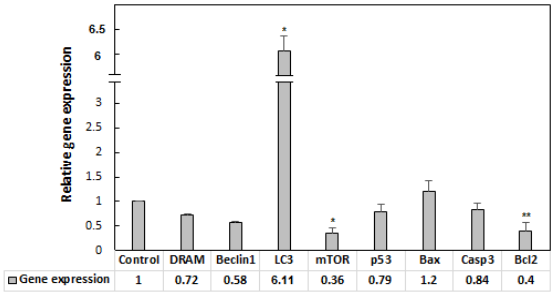


شکل ۳- نمودار ستونی درصد مرگ سلول‌های MCF-7 در تیمار با کوئرستین. ستون Q_2+Q_3 در تیمار کوئرستین که با رنگ خاکستری نشان داده شده است نشان‌دهنده‌ی وقوع مکانسیم آپوپتوز در ۵۴٪ از سلول‌ها می‌باشد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

نتایج حاصل از real time RT-PCR: واکنش real time RT-PCR با حداقل سه بار تکرار برای ژن‌های آپوپتوزی شامل p53, Bax, Casp3 و ژن ضدآپوپتوز Bcl-2 انجام شده است. بمنظور تعیین سطح بیان هر ژن، از GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است. معنادار بودن اختلاف آماری بین تیمار و نمونه‌ی کنترل در سطوح آماری $P<0.05$ و $P<0.01$ به ترتیب با علائم * و ** به روی ستون مربوط به هر ژن نشان داده شده است. براساس نتایج بدست آمده مشاهده می‌شود که سطح بیان ژن‌های p53, Bax, Casp3 تغییر معناداری را نسبت به نمونه‌ی کنترل نداشته و در نقطه مقابل، سطح بیان ژن Bcl-2 کاهش شدیدی یافته است. معمولا افزایش نسبت بیانی $\frac{Bax}{Bcl-2}$ و بزرگتر شدن آن از واحد ($\frac{Bax}{Bcl-2} > 1$) با توجه به نقش مهمی که Bax در بروز آپوپتوز دارد، بعنوان شاخصی برای نشان دادن تمایل سلول‌ها به انجام آپوپتوز در نظر گرفته می‌شود. اما باید در نظر داشت که افزایش $\frac{Bax}{Bcl-2}$ می‌تواند ناشی از کاهش بیان Bcl-2 باشد که با توجه به نقش Bcl-2 در مهار Bax، سبب افزایش توان Bax در القای آپوپتوز می‌شود.این موضوع در زمان عدم بروز تغییر و یا حتی کاهش بیان در ژن Bax نیز قابل بسط دادن می‌باشد. در مطالعات ما نیز افزایش نسبت $\frac{Bax}{Bcl-2}$ بر پایه‌ی کاهش بیان Bcl-2 صورت گرفته است و مقدار عددی بدست آمده برای آن ($\frac{Bax}{Bcl-2} > 3.0$) دلیل مناسبی برای اثبات وقوع آپوپتوز در تیمار سلول‌های MCF-7 با کوئرستین می‌باشد.

در شکل ۳ مشاهده می‌شود که بیان ژن p53 ثابت باقی مانده است که با توجه به نقش تنظیمی آن در کنترل بیان ژن‌های Bax و Casp-3، می‌بایست با ثبات در بیان ژن‌های Bax و Casp-3 همراه باشد. براساس نتایج آورده شده در شکل ۳، سطح بیان ژن‌های Bax و Casp-3 در زمان تیمار سلول‌ها با کوئرستین تغییری را نشان نداده و ثابت باقی مانده است که نمایانگر صحت یافته‌های real time RT-PCR می‌باشد.



	Control	DRAM	Beclin1	LC3	mTOR	p53	Bax	Casp3	Bcl2
Gene expression	1	0.72	0.58	6.11	0.36	0.79	1.2	0.84	0.4

شکل ۴- نمایش نمودار ستونی مربوط به تغییرات نسبی بیان ژن‌های مرتبط با مسیراتوفاژی و آپوپتوز در حضور کوئرستین در رده سلولی MCF-7. تغییرات ثبت شده در بیان ژن‌ها در قیاس با نمونه کنترل آورده شده است. نمادهای * و ** به ترتیب نمایانگر وجود اختلاف آماری بین نمونه‌ی تیمار و کنترل در سطوح آماری $P<0.05$ و $P<0.01$ می‌باشند.

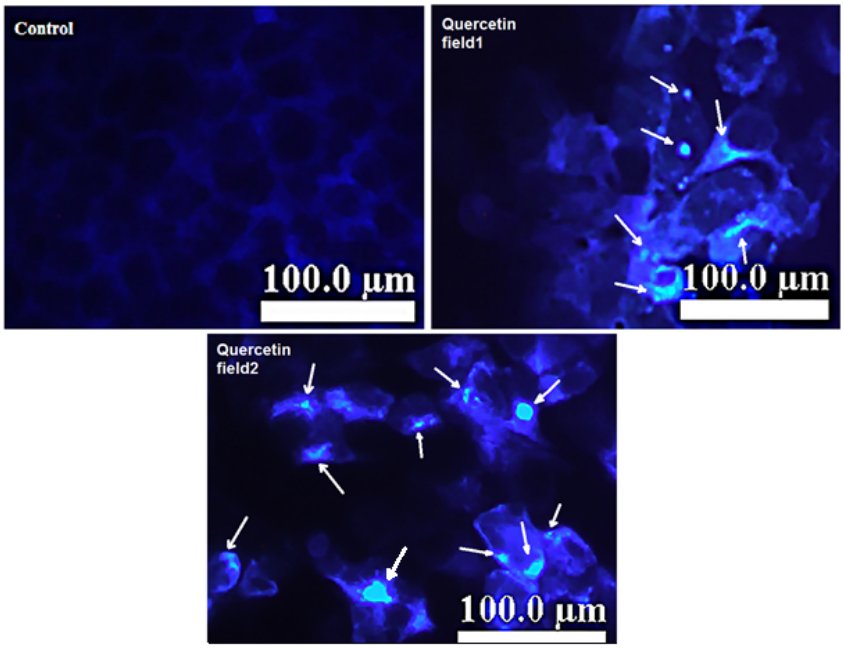
ژن‌های انتخاب شده در ارتباط با اتوفاژی شامل mTOR، LC3، Beclin-1، DRAM و همچنین Bcl-2 می‌باشد که در بین آنها، Bcl-2 در آپوپتوز و اتوفاژی دخالت دارد. کاهش سطح بیان mTOR و Bcl-2 هم‌راستا با افزایش بیان LC3 به‌شکل معناداری در زمان تیمار سلول‌ها با کوئرستین اتفاق افتاده است که موید وقوع اتوفاژی در سلول‌های MCF-7 می‌باشد (شکل ۴).

می‌دانیم که در زمان اتوفاژی، شکل سیتوسلی LC3 به نام LC3-I با فسفاتیدیل اتانول آمین‌های (PEs) موجود در غشا فاگوفورها ترکیب شده و کمپلکس LC3-PE (LC3-II) را می‌سازد که برای شکل‌گیری غشای اتوفاگوزوم‌ها مورد نیاز می‌باشد. از میان ژن‌های اتوفاژی، افزایش شدید و چشمگیری که در LC3 مشاهده می‌شود دلیل روشنی را در وقوع اتوفاژی در سلول‌های تیمار شده با کوئرستین ارائه می‌دهد (شکل۴). عدم بروز تغییر در بیان ژن‌های DRAM و Beclin1 نشان‌دهنده‌ی کافی بودن بیان زمینه‌ای این ژن‌ها در تشکیل اتوفاگوزوم‌ها می‌باشد (شکل ۴).

نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی و میکروسکوپ فلورسانس: برای تایید وقوع اتوفاژی از کیت ویژه‌ای استفاده شد که حاوی آنتی‌بادی علیه LC3II می‌باشد. این کیت می‌تواند تشکیل اتوفاگوزوم‌ها را رصد می‌کند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

همانگونه که در شکل ۵ مشاهده می‌کنیم شکل گیری اتوفاگوزوم‌ها در دو میدان دید مختلف نشان داده شده است. تشکیل اتوفاگوزوم‌ها در زمان تیمار سلول‌ها با کوئرستین بخوبی نتایج حاصل از real time RT-PCR را در خصوص به راه افتادن اتوفاژی تایید می‌کند.



شکل ۵- مطالعه‌ی اتوفاژی در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با کوئرستین با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس. غلظت کوئرستین ۲۲۰ µM و رنگ‌آمیزی با استفاده از کیت اتوفاژی حاوی آنتی‌بادی علیه LC3II انجام شده است. تشکیل اتوفاگوزوم‌ها توسط پیکان‌ها نشان داده شده است.

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های ما نشان داد که ظهور اثرات کشندگی کوئرستین به روی سلول‌های MCF-7 (LC_{50}) در غلظت ۲۲۰ µM ظاهر می‌گردد (شکل ۱). اثرات کشندگی کوئرستین در این غلظت، غالبا از طریق آپوپتوز و اندکی نیز از طریق نکروز اعمال می‌شود. وقوع آپوپتوز و نکروز در مطالعات ما با بهره‌گیری از روش فلوسیتومتری مورد اثبات قرار گرفته است (شکل‌های ۲ و ۳). براین اساس، درصد تام آپوپتوز معادل ۵۴٪ و درصد سلول‌های نکروزی معادل ۱۲٪ بدست آمده است که مجموعا درصد کل مرگ و میر سلولی را تا ۶۶ ٪ نشان می‌دهد. این میزان از مرگ و میر سلولی تقریبا معادل با ۵۰٪ مرگ و میر تعیین شده در سنجش MTT می‌باشد (شکل ۱). توانایی کوئرستین در القای آپوپتوز در رده‌های سلولی مختلف از جمله HL-60 باثبات رسیده است که با فعال‌سازی کاسپازهای ۳ یا ۹ و همچنین حذف اثر مهاری $Bcl\text{-}X_L$ از روی Bax صورت می‌گیرد (۲۶، ۲۷). نقش کوئرستین در بروز آپوپتوز و توقف چرخه‌ی سلولی در سلول‌های سرطان کبد (رده‌ی سلولی HepG2) نیز گزارش شده است (۵۵). مطالعات ما در خصوص سطح بیان ژن‌های مهم آپوپتوزی مشتمل بر p53، Bax و Casp-3 نشاندهنده‌ی عدم بروز تغییرات معنادار در بیان این ژن‌ها در زمان تیمار سلول‌ها با کوئرستین می‌باشد (شکل ۴). p53 مهم‌ترین پروتئین آپوپتوزی است که کنترل بیان ژن‌های آپوپتوزی از جمله Bax و Casp-3 را برعهده دارد (۱۸). بنابراین، بر اساس شکل ۴، عدم بروز تغییر در بیان Bax و Bak که هم‌راستا با عدم بروز تغییر در بیان ژن p53 مشاهده می‌گردد، نشان‌دهنده‌ی تطابق میان یافته‌های ما در real time RT-PCR با گزارش‌های قبلی می‌باشد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

وقوع آپوپتوز در زمانی که تغییری در بیان ژن‌های p53، Bax و Bak مشاهده نمی‌شود، بیشتر از طریق کاهش بیان Bcl-2 اعمال می‌گردد. Bcl-2 یک پروتئین ضدآپوپتوزی است که اثرات خود را در رابطه با افزایش توان زیستی سلول‌ها از طریق اتصال به مولکول‌های پروآپوپتوزی مانند Bak و Bax ظاهر می‌سازد (۴۸). کاهش Bcl-2 موجب افزایش نسبت بیانی و در نتیجه، فراهم شدن زمینه‌ی مناسب برای بروز اثرات آپوپتوزی Bax می‌شود (شکل ۴). کنترل بیان Bcl-2 در تیمارهای انجام شده به روی رده‌ی سلولی HepG2 و زنوگرافت‌های HT-29 نیز در حضور کوئرستین گزارش شده است (۱۸ و ۴۲).

کاهش بیان Bcl-2 همچنین می‌تواند با کاهش نقش مهاری آن به روی Beclin1 همراه شود که به راه‌اندازی اتوفاژی منجر می‌گردد (۲۴ و ۶۱). کاهش بیان Bcl-2 و وقوع اتوفاژی در مطالعات ما نیز مشاهده شده است (شکل ۴). Beclin1 مهم‌ترین پروتئین مسیر اتوفاژی است که مهار آن توسط Bcl-2 سبب مهار اتوفاژی می‌شود (۵۳). بروز اتوفاژی در حضور کوئرستین را می‌توان علاوه بر کاهش بیان Bcl-2، از روی افزایش شدید بیان LC3 نیز تشخیص داد (شکل ۴). LC3 یک پروتئین محلول در سیتوزول است که به شکل LC3-I ساخته می‌شود. این پروتئین پس از اتصال به فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین‌های موجود در غشای فاگوفورها به LC3-II تبدیل می‌گردد که برای شکل‌گیری غشای اتوفاگوزوم‌ها ضروری است (۳۱). مطالعات ما با استفاده از آنتی‌بادی نشاندار شده بر علیه LC3-II، ظهور اتوفاگوزوم‌ها را در تصاویر میکروسکوپ فلورسانس مورد تایید قرار داده است (شکل ۴ و ۵). استفاده از تصاویر میکروسکوپ فلورسانس به منظور مشاهده‌ی اتوفاگوزوم‌ها بهترین شاخص برای اثبات دقیق وقوع اتوفاژی در انواع تنش‌های سلولی می‌باشد (۳۱).

در کنار تمام دلایلی که برای وقوع اتوفاژی در سلول‌های MCF-7 ارائه گردید، کاهش بیان mTOR نیز دلیل دیگری بر اثبات این مدعا می‌باشد (شکل ۴). گزارش‌های موجود در منابع علمی نیز نشان داده است که کاهش فعالیت mTORC2 می‌تواند با راه‌اندازی اتوفاژی همراه گردد (۹، ۱۰، ۴۶، ۵۱).

DRAM یک پروتئین مستقر در غشای لیزوزومی است که در انجام اتوفاژی مهم است. DRAM احتمالاً با عمل‌کرد خود در غشای لیزوزومی، الحاق لیزوزوم‌ها را به اتوفاگوزوم‌ها جهت تبدیل به اتوفاگولیزوزوم‌ها تسهیل می‌کند (۱۱). ژن DRAM تحت کنترل پروتئین p53 قرار دارد (۱۱، ۱۹، ۳۳، ۳۴، ۴۳). نتایج ما عدم بروز تغییر در بیان p53 را هم‌راستا با عدم بروز تغییر در بیان ژن DRAM نشان داده است که با یافته‌های محققین دیگر در رابطه با نقش p53 در کنترل بیان DRAM همخوانی دارد (شکل ۴).

لازم به ذکر است که اگر چه در زمان وقوع مسیرهای کلاسیک آپوپتوز و اتوفاژی، انتظار افزایش بیان ژن‌های Casp3، Beclin1 و DRAM وجود دارد اما عدم بروز تغییر در بیان زمینه‌ای این ژن‌ها مشکلی را در وقوع آپوپتوز و اتوفاژی ایجاد نمی‌کند زیرا تولیدات زمینه‌ای این ژن‌ها می‌تواند مقادیر کافی از پروتئین‌های مربوط را برای انجام آپوپتوز و اتوفاژی تولید کند. در ضمن، آپوپتوز و اتوفاژی پدیده‌هایی هستند که می‌توانند از طریق مسیرهای غیرکلاسیک و به صورت غیروابسته به کاسپاز و یا غیروابسته به Beclin1 و DRAM نیز راه‌اندازی شوند (۱، ۵، ۶، ۴۸، ۶۶).

تقدیر و تشکر

مولفین مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران بابت حمایتی که از انجام پژوهش داشته است تقدیر و تشکر می‌کند. مولفین مقاله همچنین مراتب تشکر خود رااز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی اعلام می‌دارند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

منابع

1- Al Dhaheri Y, Attoub S, Ramadan G, Arafat K, Bajbouj K, Karuvantevida N, AbuQamar S, Eid A and Iratni R (2014) Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. PLoS One, 9, e109630.

2- Avila MA, Cansado J, Harter KW, Velasco JA and Notario V (1996) Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. Adv Exp Med Biol, 401, 101-110.

3- Avila MA, Velasco JA, Cansado J and Notario V (1994). Quercetin mediates the down regulationof mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. Cancer Res, 54, 2424-2428.

4- Balaburski GM, Hontz RD and Murphy ME (2010) p53 and ARF: unexpected players in autophagy. Trends Cell Biol, 20, 363-369.

5- Benítez-Guzmán A, Arriaga-Pizano L, Morán J and Gutiérrez-Pabello JA (2018) Endonuclease G takes part in AIF-mediated caspase-independent apoptosis in Mycobacterium bovis-infected bovine macrophages. Vet Res, 49, 69-77.

6- Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N and Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie, 84, 215-522.

7- Cao HH, Tse AK, Kwan HY, Yu H, Cheng CY, Su T, Fong WF, and Yu zL (2014) Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. Biochem Pharmacol, 87, 424-434.

8- Chen J and Kang JH (2005) Quercetin and trichostatin A cooperatively kill human leukemia cells. Pharmazie, 60, 856-860.

9- Chen N and Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. FEBS Lett. 584, 1427-1435.

10- Chen N and Karantza-Wadsworth V (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim Biophys Acta, 1793, 1516-1523.

11- Crighton D, Wilkinson S and Ryan K (2007) DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. Autophagy, 3, 72-74.

12- Deng S, Shanmugam, MK, Kumar AP, Yap CT, Sethi G, Bishayee A (2019) Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. Cancer, 125, 1228–1246.

13- Di Fazio P, Matrood S (2018) Targeting autophagy in liver cancer. Transl. Gastroenterol. Hepatol, 3, 9–12.

14- Erlund I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutr Res, 24, 851-874.

15- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett, 416, 123-129.

16- Gao X, Wang B, Wei X, Men K, zheng F, zhou Y, zheng Y, Gou M, Huang M, Guo G, et al. (2012) Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. Nanoscale, 4, 7021-7030.

17- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. J. Pathol, 2010, 221, 3–12.

18- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L and Ramos S (2006) Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). J Nutr, 136, 2715-2721.

19- Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V and Trajkovic V (2009) AMPK mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. J Cell Mol Med, 13, 3644-3654.

20- Hashemzaei M, Barani AK, Iranshahi M, Rezaee R, Tsarouhas K, Tsatsakis AM, Wilks MF and Tabrizian K (2016) Effects of resveratrol on carbon monoxide-induced cardiotoxicity in rats. Environ Toxicol Pharmacol, 46, 110-115.

21- Hashemzaei M, Entezari Heravi R, Rezaee R, Roohbakhsh A and Karimi G (2017) Regulation of autophagy by some natural products as a potential therapeutic strategy for cardiovascular disorders. Eur J Pharmacol, 802, 44-51.

22- Hashemzaei M, Karami SP, Delaramifar A, Sheidary A, Tabrizian K, Rezaee R, Shahsavand S, Arsene AL, Tsatsakis AM and Mohammad S (2016) Anticancer effects of co-administration of daunorubicin and resveratrol in MOLT-4, U266 B1 and RAJI cell lines. Farmacia, 64, 36-42.

23- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ and Katan MB (1995) Absorption of

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J Clin Nutr, 62, 1276-1282.

24- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT and Tang D (2011) The beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ, 18, 571–580.

25- Katz DL, Doughty K and Ali A (2011) Cocoa and chocolate in human health and disease. Antioxid Redox Signal, 15, 2779-2811.

26- Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, Ohkawara T, Hagihara K, Yamadori T, Shima Y, et al. (2007) Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. Allergol Int, 56, 113–123.

27- Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, and Dong Z (2008) Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. Cancer research, 68, 946-955.

28- Lin P, Tian XH, Yi YS, Jiang WS, zhou YJ and Cheng WJ (2015) Luteolin-induced protection of H_2O_2-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. Mol Med Rep, 12, 7699-7704.

29- Liskova A, Samec M, Koklesova L, Brockmueller A, Zhai K, Abdellatif B, Siddiqui M, et al. (2021) Flavonoids as an effective sensitizer for anti-cancer therapy: insights into multi-faceted mechanisms and applicability towards individualized patient profiles. EPMA Journal, 12, 155–176

30- Li SJ, Sun SJ, Gao J, Sun FB, (2016) Wogonin induces Beclin-1/PI3K and reactive oxygen species mediated autophagy in human pancreatic cancer cells. Oncol. Lett, 12, 5059–5067.

31- Li W, Li S, Li Y, Lin X, Hu Y, Meng T, Wu B, He R and Feng D (2019) Immunofluorescence Staining Protocols for Major Autophagy Proteins Including LC3, P62, and ULK1 in Mammalian Cells in Response to Normoxia and Hypoxia. Methods Mol Biol. 1854, 175-185.

32- Ma T, Fan A, Lv C, Cao J, Ren K (2018) Screening flavonoids and their synthetic analogs to target liver cancer stem-Like cells. Int J Clin Exp Med, 11, 10614–10622.

33- Mohammadpour R, Safarian S, Ejeian F, Sheikholya-Lavasani Z, Abdolmohammadi MH and Sheinabi N (2014) Acetazolamide triggers death inducing autophagy in T-47D breast cancer cells. Cell Biol Int, 38, 228-238.

34- Mohammadpour R, Safarian S, Sheibani N, Norouzi S and Razazan A (2013) Death inducing and cytoprotective autophagy in T-47D cells by two common antibacterial drugs: sulphathiazole and sulphacetamide. Cell Biol Int, 37, 348-358.

35- Moosavi MA, Haghi A, Rahmati M, Taniguchi H, Mocan A, Echeverría J, Gupta VK, Tzvetkov NT, Atanasov AG (2018) Phytochemicals as potent modulators of autophagy for cancer therapy. Cancer Let, 424, 46–69.

36- Mrakovcic M and Fröhlich LF (2018) p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. Biomolecules, 8, 14-31.

37- Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. Cancer Lett, 269, 315-25.

38- Nikitovic D, Tsatsakis AM, Karamanos NK and Tzanakakis GN (2003) The effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by two osteosarcoma celllines depends on tyrosine kinase and the estrogen receptor density. Anticancer Res, 23, 459-464.

39- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: An overview. J Nutr Sci, 5, e47.

40- Pandey KB and Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev, 2, 270-278.

41- Pietta PG (2000) Flavonoids as Antioxidants. J Nat Prod, 63, 1035–1042.

42- Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, Carretero J, Obrador E, Asensi M and Estrela JM (2008) Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: A Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. Mol Cancer Ther, 7, 3330-3342.

43- Psahoulia FH, Moumtzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A (2007) Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS Transformed human colon cells. Carcinogenesis, 28, 1021–1031.

44- Ren KW, Li YH, Wu G, Ren Jz, Lu HB, Li zM and Han XW (2017) Quercetin nanoparticles display antitumor activity via proliferation inhibition and apoptosis induction in liver cancer cells. Int J Oncol, 50, 1299-1311.

45- Ren MX, Deng XH, Ai F, Yuan GY and Song HY (2015) Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

line SKOV-3 in vitro. Exp Ther Med, 10, 579-583.

46- Roy S and Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. Semin Immunopathol, 32, 383-396.

47- Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Ferrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Cianfriglia M, et al. (1994) Quercetin potentiates the effect of adri amycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. Cancer Chemother Pharmacol, 34, 459-464.

48- Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells Cell Death & Differentiation, 15, 1318–1329.

49- Serafini, M, Peluso I, Raguzzini A (2010) Flavonoids as anti-inflammatory agents. Proc Nutr Soc, 69, 273–278.

50- Sharma H, Sen S and Singh N (2005) Molecular pathways in the chemosensitization of cisplatin by quercetin in human head and neck cancer. Cancer Biol Ther, 4, 949-955.

51- Shuhua W, Chenbo S, Yangyang L, Xiangqian G, Shuang H, Tangyue L and Dong T (2015) Autophagy-related genes Raptor, Rictor, and Beclin1 expression and relationship with multidrug resistance in colorectal carcinoma. Hum Pathol, 46, 1752-1759.

52- Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B and Russo GL (2012) Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. Ann N Y Acad Sci, 1259, 95-103.

53- Stromhaug P and Klionsky D (2001) Approaching the Molecular Mechanism of Autophagy. Traffic, 2, 524-531.

54- Sun, CY, Zhang QY, Zheng GJ, Feng B (2019) Autophagy and its potent modulators from phytochemicals in cancer treatment. Cancer Chemother Pharmacol, 83, 17–26.

55- Tanigawa S, Fujii M and Hou, DX (2008) Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. Biosci Biotechnol Biochem, 72, 797-804.

56- Vidoni C, Ferraresi A, Secomandi E, Vallino L, Dhanasekaran DN, Isidoro C (2019) Epigenetic targeting of autophagy for cancer prevention and treatment by natural compounds. Semin. Cancer Biol, 2, 300–310.

57- Weiskirchen R, Tacke F (2019) Relevance of Autophagy in Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells for Health and Disease. Cells, 8, 16.

58- Wiseman H, Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role ininflammatory disease and progression to cancer. Biochem J, 313, 17-29.

59- Wu TH, Yen FL, Lin LT, Tsai TR, Lin CC and Cham TM: (2008) Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. Int J Pharm, 346, 160-168.

60- Xu D, Hu MJ, Wang YQ and Cui YL (2019) Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. Molecules, 24, 1123-1137.

61- Xu HD and Qin ZH (2019) Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. Adv Exp Med Biol, 1206, 109-126.

62- Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, Chao PD, Chou CC, Wei YH and Chung JG (2006) Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. Drug Metab Dispos 34, 296-304.

63- Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ (2016) Autophagy: Machinery and regulation. Microb Cell, 3, 588–596.

64- Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoike A (1990) the effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. FEBS Lett, 260, 10-13.

65- Yoshida M, Yamamoto M and Nikaido T (1992) Quercetin arrests human leukemic T-cells inlate G1 phase of the cell cycle. Cancer Res, 52, 6676-6681.

66- Zhou C, Zhou J, Sheng F, Zhu H, Deng X, Xia B and Lin J (2012) The heme oxygenase-1 inhibitor ZnPPIX induces non-canonical, Beclin 1-independent, autophagy through p38 MAPK pathway. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 44, 815-822.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.10.8

Study of autophagy and cell death induction in MCF-7 cells in the presence of quercetin

Safarian Sh.[1*] and Erfani A.[2]

[1] Dept. of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

In this study, induction of death autophagy in the presence of quercetin was investigated in MCF-7 cells. At first, the effective dose of quercetin, resulting in 50 percent death in cellular population (LC_{50}), was determined as 220 □M using MTT assay. Ascertaining of the main type of cellular death was carried out using flow cytometry and its usual probes including Annexin-FITC and PI. Accordingly, the main type of cellular death mechanism in quercetin treatment was apoptosis with total percent value of 54%. Determination of effective mechanisms for cell death induction was performed using real time RT-PCR. Selected apoptotic genes in this study were p53, Bax, Bcl-2, Casp-3. Significant decrease in Bcl-2 expression, with respect to its anti-apoptotic effects, showed that the breast cancer cells were being sensitized for apoptosis in the presence of quercetin. Increasing the Bax/Bcl-2 ratio shows that, despite of the constant expression of Bax gene, the increased sensitivity of the cells for apoptosis is occurred via decreasing of the expression level of Bcl-2 gene. Study of quercetin effects for autophagy induction was carried out after nominating of mTOR, LC3, Beclin1 and DRAM genes and analysing their expression variations in the presence of quercetin. Decreased expression of mTOR alongside rigorous increase in LC3 expression totally supports autophagy induction. This notion was also confirmed by LC3II antibody and immunocytochemistry investigations. Our results showed that quercetin is able to induce death autophagy to kill breast cancer cells.

Key words: quercetin, autophagy, apoptosis, breast cancer, MCF-7