فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۲ ص. ۴۳-۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطان سینه MCF-7 با آزمون‌های MTT و تریپان بلو

فاطمه زهره[۱]، کاظم پریور[۱*]، نسیم حیاتی رودباری[۱]، پریچهر یغمایی[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): Kazem_parivar@yahoo.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.5.9 DOI: 10.30495/jdb.2022.1959827.1307

چکیده

در این مطالعه، اثر کوئرستین بر زنده مانی سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون‌های MTT و تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. کوئرستین فلاونولی می‌باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و در میوه‌ها، سبزیجات و بویژه دانه‌های رنگی یافت می‌شود. سلول‌های سرطانی سینه (رده MCF-7) و سلول‌های سالم (رده HEK-293) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ µM از کوئرستین قرار گرفتند. برای بررسی میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی آزمایش‌های MTT و تریپان بلو انجام شدند. بر اساس نتایج، میزان بقای سلول‌های سرطانی تحت تیمار دارو با دوز Q50 µM در ۴۸ ساعت به طور قابل توجهی کاهش یافت ($P<0.01$) . همچنین کاهش قابل توجهی در دوز Q100 µM در ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. این کاهش در ۲۴ ساعت در $P<0.05$ و در ۴۸ ساعت در $P<0.01$ معنی‌دار بود. نتایج آزمایشات اثرات مثبت ضد سرطانی کوئرستین را نشان داد. بر اساس نتایج این پژوهش، کوئرستین میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی را کاهش داد و بهترین نتیجه در ۴۸ ساعت مشاهده شد. با توجه به اینکه تاثیرات ضد سرطانی داروی کوئرستین پس از ۴۸ ساعت بیشتر بود، استفاده طولانی مدت این دارو برای دستیابی به اثرات درمانی آن توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کوئرستین، سرطان سینه، MCF-7، HEK، آزمون MTT.

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع ترین سرطان‌ها در زنان است و دومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و بالاترین علت مرگ در سنین ۴۰ تا ۶۰ سالگی است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی(WHO)، از هر ده زن یک نفر با این بیماری درگیر است. این سرطان که از بافت پستان شروع می‌شود، در زنان ۱۰۰ برابر بیشتر از مردان شایع است. متأسفانه در نیم قرن گذشته، شیوع آن در زنان بسیار افزایش یافته است، البته با پیشرفت تشخیص و درمان زودهنگام این بیماری میزان مرگ و میر ناشی از سرطان سینه کاهش یافته است. در منطقه خاورمیانه نیز میزان ابتلا به سرطان سینه در هردو جنس بالا بوده و نزدیک به ۱۰ درصد کل مبتلایان به سرطان را تشکیل می‌دهند [۱].

بیماری سرطان به دلیل رشد و نمو کنترل نشده و تکثیر سلول‌های غیر طبیعی بوجود آمده و گسترش می‌یابد. سلول‌های توده سرطانی بدون تاثیر پذیری ازپیام‌های سلولی و تنظیمات فاکتورهای رشد بصورت مهار نشده تکثیر پیدا می‌نمایند. شیوه زندگی پرخطر از عوامل اصلی ابتلا و شیوع آن می‌باشد. مصرف دخانیات، رژیم غذایی پرکالری و چاقی، مصرف الکل، داروهای هورمونی بویژه ضد بارداری از عوامل افزایش دهنده سرطان پستان می‌باشند [۲]. هر عاملی که موجب بوجود آمدن بیماری سرطان شود در نهایت منجر به تکثیر توده ای از سلول‌های غیر طبیعی که قابل انتقال به سایر نواحی بدن نیز می‌باشند می‌شود که به این پدیده متاستاز گفته می‌شود. این عوامل موجب اختلال در فعالیت سلول‌ها از طریق آسیب رساندن به هسته سلول و فاکتورهای وراثتی آن یعنی ژن‌ها می‌شوند تا آنجا که برخی بیماری سرطان را بیماری ژنتیکی قلمداد کرده اند. بسیاری از عوامل آلوده کننده محیطی مانند سموم، مواد شیمیایی، امواج و پرتوها مانند اشعه ماورای بنفش نور خورشید از این دست موارد می‌باشند [۳].

از کارکردهای‌های اصلی سلول‌های سرطانی می‌توان به تغییر در ساختار و عملکرد غشا سلول، دگرگونی در ترکیبات درون و سطح سلول، پیدایش آنتی‌ژن‌های تومورزا، افزایش جذب اسیدهای آمینه و نوکلئوزیدها، اختلال در مکانیسم‌های هدایت سیگنالی مانند عملکرد گیرنده‌های فاکتورهای رشد وآبشارهای فسفریلاسیون می‌باشد [۴]. سلول‌های سرطانی تمایز سلولی را که دارای مراحلی چون برهم کنش سلول‌ها با یکدیگر و یا با ماتریکس خارج سلولی می‌باشند را از دست می‌دهند. مقاومت به اپوپتوزیس، از دست دادن اتصال و نیاز به بستر پایه برای رشد و تکثیر، نامیرایی و امکان تکثیر نامحدود آنها، از دست رفتن کنترل بر چرخه سلولی، کاهش وابستگی به دانسیته یا مهار تماسی از جمله ویژگی‌های ثانویه سلول‌های سرطانی می‌باشد [۵].

تمامی مواد سرطان زا و کارسینوژن دارای رادیکال‌های آزاد می‌باشند. بسیاری از رادیکالهای آزاد پایدار مانند NO و O_2 در بدن انسان وجود دارند که نقش حیاتی و مثبتی در چرخه‌های بیولوژیکی ایفا می‌کنند. اما تحت شرایط خاص، مانند قرار گرفتن در معرض اشعه‌های مضر یا استرس ناشی از سموم مانند تنباکو می‌تواند به سلول‌ها و DNA آسیب برساند [۶].

فرآیند دریافت الکترون از سایر اتم‌ها و مولکول‌ها منجر به استرس اکسیداتیو در بدن می‌شود که نتیجه آن پیری و ایجاد بیماری‌هایی همچون سرطان می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که به رادیکال‌های آزاد الکترونی می‌دهند و از واکنش پذیری آنها می‌کاهند. ویژگی مهم آنتی‌اکسیدان‌ها این است که بدون آنکه خود تبدیل به رادیکالی آزاد شوند الکترونی را به رادیکال‌های آزاد می‌دهند و بدین شکل جلوی استرس اکسیداتیو را می‌گیرند [۷].

ماده کوئرستین که از اعضای مهم فلاوونوئیدها بشمار می‌رود در بسیاری از مواد غذایی مانند سبزیجات و میوه‌ها یافت می‌شود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کوئرستین بسیار زیاد می‌باشد. علاوه بر این کوئرستین دارای خاصیت پراکسیدازی نیز می‌باشد. این فلاونوئید طبیعی در رنگدانه‌های گیاهی فراوان یافت می‌شود. فرمول شیمیایی آن $C_{15}H_{10}O_7$ می‌باشد. این ماده دارای توانایی مهار انتخابی آنزیم مونوآمینواکسیداز نیز می‌باشد که موجب بسیاری از خواص مفید آن می‌شود.

رده سلولی MCF-7 در سال ۱۹۷۰ از بافت سینه یک زن ۶۹ ساله قفقازی استخراج شد. این رده سلولی مشتق از اپیتلیوم پستان بوده که دارای ویژگی‌های مناسبی برای مطالعات آزمایشگاهی سرطان پستان است. MCF-7 مخفف Michigan Cancer Foundation-7 است که به موسسه کشت دهنده اولیه آن اشاره دارد. [۸]. رده سلولی HEK-293 از کلیه جنین دختری که در سال ۱۹۷۳سقط غیر عمدی شده استخراج شده اند. سلول‌های HEK-293 به دلیل عدم وجود بیماری و رشد قابل قبول، سال‌ها به طور گسترده در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در پژوهش‌های سلولی مربوط به درمان سرطان از این رده برای مقایسه با رده‌های سلولی سرطانی استفاده فراوانی می‌شود [۹].

امروزه داروها و روش‌های گوناگونی برای درمان سرطان ارائه شده اند. اما تاکنون روشی کم عارضه برای کاهش اثرات این بیماری شناخته نشده است. متاسفانه با توجه به افزایش روزافزون این بیماری ضرورت دستیابی به این امر بیش از پیش می‌باشد. در سال‌های اخیر دوباره شاهد رویکرد به درمان‌ها و داروهای با منشا طبیعی برای کاهش اثرات بیماری‌ها و درمان آنها می‌باشیم که یکی از دلایل آنها نیز کم بودن عوارض جانبی این ترکیبات

می‌باشد. درباره اثرات سودمند کوئرستین بعنوان یک فلاونوئید طبیعی در درمان سرطان مطالعات فراوانی صورت گرفته است ولی تاکنون درباره اثر این ماده بر سرطان پستان با در نظر گرفتن تاثیر آن بر میزان زنده مانی و فعالیت‌های زیستی سلول‌های سرطانی از طریق آزمون‌های MTT و تریپان بلو تحقیقی انجام نشده است بنابراین در این پژوهش اثر کوئرستین بر بیماری سرطان پستان از طریق دو آزمون‌های MTT و تریپان بلو مورد بررسی گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی بوده که در ادامه روش‌ها ی آن شرح داده می‌شود.

کوئرستین و آماده سازی آن

در این پژوهش از پودر کوئرستین (آلمان، مرک) استفاده گردیده شد. حلالیت این ماده بسیار کم بوده بدین جهت میزان مورد نظر از ماده کوئرستین برای تهیه دوز مناسب تیمار، در حجم مناسبی از حلال آب مقطرو با استفاده از توین ۲۰ % حل شد.

رده سلولی، کشت و پاساژ سلولی

در این پژوهش دو رده سلولی سرطان پستان MCF-7 (ایران، انستیتو پاستور) و رده سلول‌های نرمال HEK-293 (ایران، انستیتو پاستور) مورد استفاده قرار گرفته شدند. برای کشت و پاساژ سلولی، محیط‌کشت RPMI 1640 (ایران، ژنیران)استفاده گردید. ابتدا سلول‌ها به فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی انتقال داده شدند. برای پاساژ سلول‌ها ابتدا محیط کشت از فلاسک خارج شده و سلول‌ها را با ۱۰ میلی لیتر محلول PBS (ایران، تماد کالا) شست و شو داده شدند. برای جدا شدن سلول‌ها از انتهای فلاسک یک میلی لیتر محلول تریپسین ۰/۵۰ درصد (ایران، تماد کالا)به آن افزوده و فلاسک دورانی گردش داده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر محیط کشت به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (ایران، تماد کالا) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین (ایران، سها) و استرپتومایسین (ایران، سها) به آن افزوده شد. مخلوط حاصله در دور rpm1500 به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس محیط‌کشت رویی خارج گشته و توده سلولی ته فالکون نگه داشته شد. در نهایت سلول‌ها دوباره به فلاسک‌های جدید انتقال داده شدند [۱۰]. برای تیمار سلول‌ها با کوئرستین، سلول‌های مورد نظر را در نه فلاسک جداگانه کشت داده، پس از گذشت ۲۴ ساعت از نه فلاسک، سه عدد بعنوان گروه کنترل انتخاب، سه فلاسک با کوئرستین غلظت ۵۰ میکرومولار و سه فلاسک دیگربا کوئرستین غلظت ۱۰۰ میکرو مولار تیمار گردیده شدند [۱۱].

تست MTT

برای آزمایش MTT که یکی از روش‌های تعیین تعداد سلول‌های زنده بر پایه فعالیت‌های متابولیکی آنها می‌باشد از نمک زرد تترازیلیوم (dimethylthiazol diphenyltetrazolium) استفاده می‌شود. این ترکیب توسط یاخته‌های زنده جذب و احیا می‌شود. بعلت فعالیت آنزیم ردوکتاز میتوکندری سلول‌های زنده، Bromide محلول به بلورهای نامحلول بنفش رنگ Formazan تبدیل می‌شوند. برای انجام این تست ابتدا محلول MTT با غلظت 0/5 mg/ml تهیه شد. بدین منظور ۵ mg پودر MTT(ایران، تماد کالا) در ۱۰ ml PBS (ایران، ژنیران) حل شد.

پس از تهیه محلول MTT تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول را در پلیت‌های مربوطه قرار داده، سپس میزان مورد نظر از کوئرستین بر پایه دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اضافه گردیده و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت به چاهک‌های پلیت محلول رنگی MTT افزوده و چهار ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شده و با توجه به فرمول مربوطه میزان درصد زنده مانی سلول‌های مورد نظر محاسبه شد. برای هر تست سه چاهک اختصاص داده شد و سه بار این آزمون تکرار شد [۱۲].

درصد زنده مانی = (میانگین جذب گروه تجربی/ میانگین جذب گروه کنترل) ×۱۰۰

تست تریپان بلو

یکی از روش‌ها برای ارزیابی میزان فعالیت زیستی و رشد سلول‌ها تست تریپان بلو می‌باشد. در این روش عملکرد بهینه و پیوستگی

غشاء سلول‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد که مشخص کننده میزان تکثیر یا مرگ یاخته‌ها می‌باشد. اساس این آزمون بر پایه فعالیت پمپ‌های اگزوسیتوز و پیوستگی غشاء سلول می‌باشد که در یاخته سالم و زنده رنگ‌های غیر الکترولیت توانایی ورود و ماندگاری درون سیتوپلاسم سلول را نداشته در نتیجه یاخته زنده بعلت فعالیت حیاتی با این گونه مواد رنگ پذیری ندارد در حالی که سلول‌های مرده یا ناسالم بعلت عدم عملکرد مناسب پمپ‌ها و همچنین گسستگی نسبی غشاء سلول با رنگ‌های غیر الکترولیت بخوبی رنگ می‌گیرند. در این روش برای مشخص کردن فعالیت‌های زیستی سلول ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی با ۰/۱ میلی لیتر از محلول تریپان بلو (آمریکا، سیگما) مخلوط شد . سپس این مخلوط در یک چاهک پلیتی ۹۶ خانه ای قرار داده شد. سپس با استفاده از یک لام نئوبار تعداد یاخته‌های رنگ گرفته (سلول‌های مرده) و رنگ نشده (سلول‌های زنده) شمارش گردید. سپس با فرمول‌های زیر درصد زنده مانی و فعالیت‌های زیستی اندازه گیری شدند [۱۲].

۱۰۰× (تعداد کل سلول ها/ تعداد سلول‌های زنده) = درصد فعالیت زیستی

آنالیز آماری

در نهایت میانگین همه نتایج با نرم افزار SPSS با محاسبه انحراف معیار در سطح معنی داری $P<0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه با تست تکمیلی توکی انجام و نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار اکسل رسم گردید [۱۳].

نتایج

برای بررسی اثر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی (MCF-7) از دو آزمون MTT و تریپان بلو استفاده گردید. اثر دوزهای مختلف کوئرستین در۲ زمان پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال (Hek-293) سنجیده شد.

نتایج جذب نوری قرائت شده توسط الایزا ریدر بدست آمده از تست MTT جمع آوری شده سپس میزان زنده مانی سلول‌ها و در نهایت درصد زنده مانی آنها محاسبه شد. در این آزمون بر پایه فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها درصد بقای آنها تحت تأثیر مواد دارویی تعیین می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در دوز Q50 µM در ۴۸ ساعت به طور قابل توجهی کاهش یافت($P<0.01$). همچنین کاهش چشمگیری در دوز Q100 µM در ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. این کاهش از لحاظ آماری در ساعت ۲۴ در سطح $P<0.05$ و در ساعت ۴۸ در سطح $P<0.01$ معنی‌دار بود (نمودار ۱ و ۲).

همچنین در این مطالعه برای ارزیابی و مقایسه اثرات ضد سرطانی کوئرستین، در زمان‌ها و دوزهای مشابه، اثرات این ماده بر سلول‌های نرمال HEK نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت میزان بقای این سلول‌ها سنجیده و پس از تجزیه و تحلیل آماری، نتایج مربوطه به دست آمد. هیچ یک ازنتایج گروه‌های سلول‌های نرمال تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشتند، اگرچه از نظر عددی متفاوت بودند.

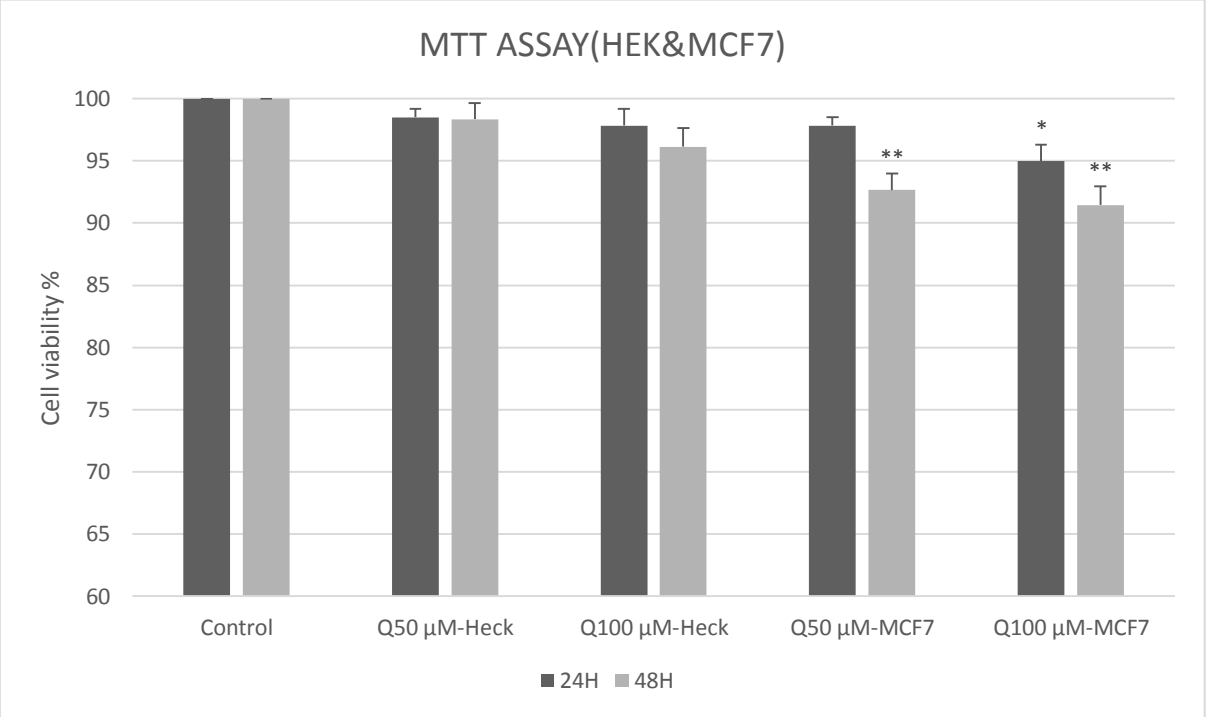
در ادامه بررسی نتایج اثرات کوئرستین بر سلول‌های سرطانی و تایید فرضیه اثر بازدارندگی و مهار سلول‌های سرطانی توسط این دارودر آزمون MTT، نتایج آزمون تریپان بلو نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این تست توان فعالیت‌های زیستی مورد ارزیابی قرار گرفته شد.

در این آزمون نیز هیچ تفاوت معنی داری در نتایج بدست آمده گروه سلولی نرمال HEK با گروه کنترل دیده نشد اگرچه از لحاظ عددی کاهش دیده شد ولی از لحاظ آماری مورد تایید نبود (نمودار ۳ و ۴). تیمار با دوز Q50 µM در ساعت ۲۴ موجب تغییر چشمگیری در نتایج نشد اما پس از گذشت ۴۸ ساعت کاهش معنی داری در میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی دیده شد($P<0.05$). اما تیمار با دوز Q100 µM در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت موجب کاهش معنی دار فعالیت‌های زیستی سلول‌های سرطانی شد. این کاهش در ساعت ۴۸ بیشتر و معنی داری آن در سطح $P<0.01$ مورد تایید قرار گرفته شد (نمودار ۳ و ۴).

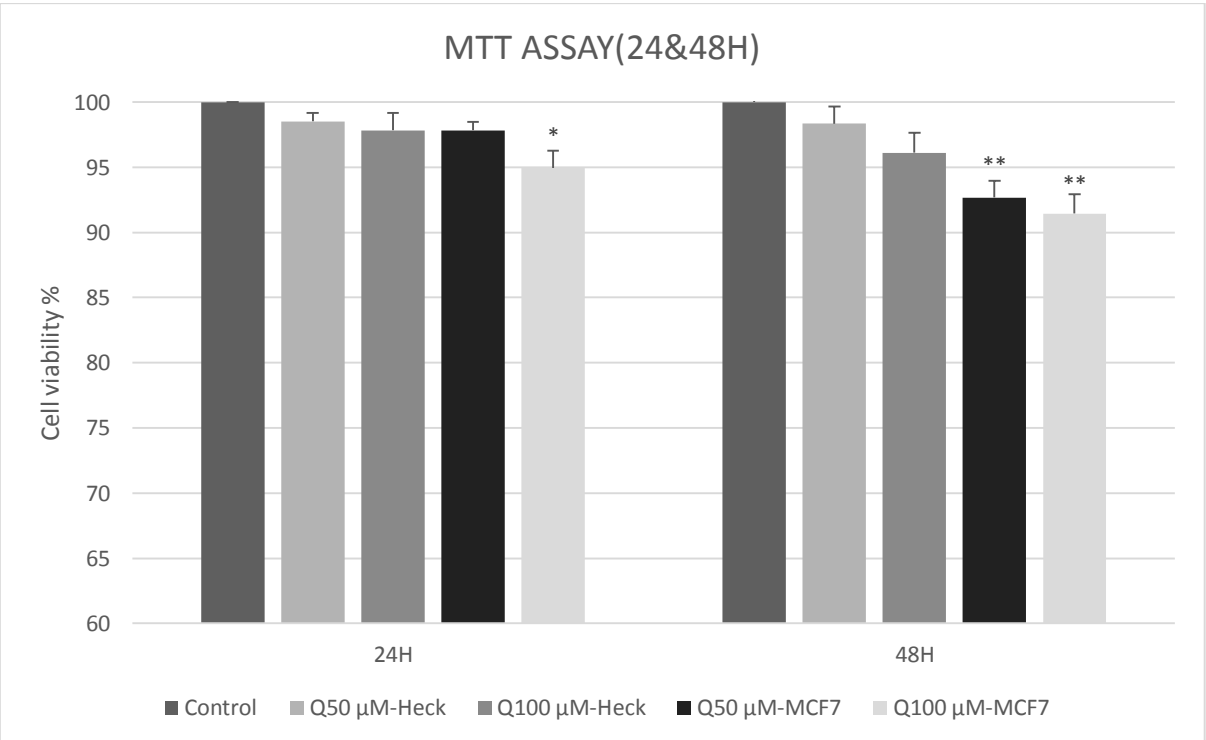
نکته مهم در نتایج بدست آمده در هر دو آزمون عدم تاثیر معنی دار کوئرستین بر فعالیت‌های زیستی سلول‌های نرمال بود که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نمایان می‌باشد.

با توجه به جمع بندی دیتاها می‌توان چنین نتیجه گرفت که دوز کمتر دارو یعنی ۵۰ میکرومولار در ۴۸ساعت دارای اثر قابل

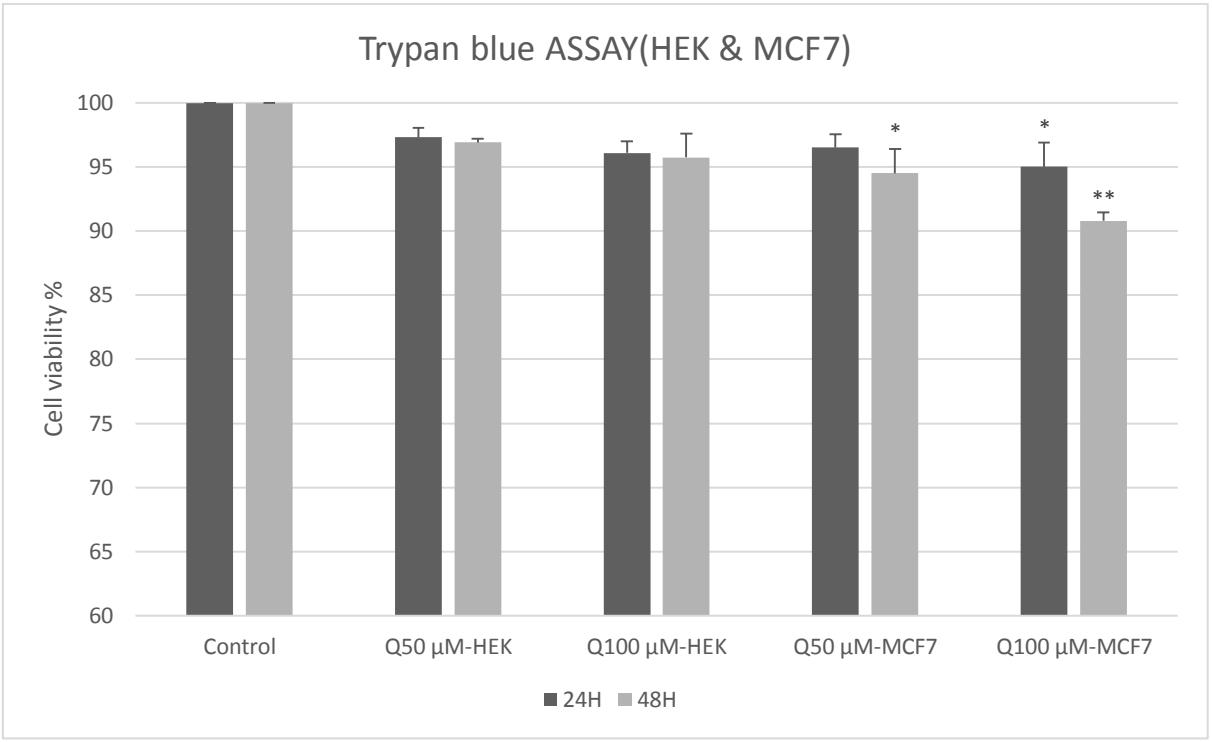
قبول در مهار سلول‌های سرطانی می‌باشد اما دوز ۱۰۰ میکرومولار کوئرستین از نظر سرعت تاثیر گذاری، عملکرد مؤثرتری داشته و در ساعت ۲۴ نیز تاثیرات معنی دار بازدارندگی نشان داد و همچنین در ساعت ۴۸ اثر بازدارندگی دارو همسو با دوز مصرفی افزایش یافت (نمودار ۲ و۴).



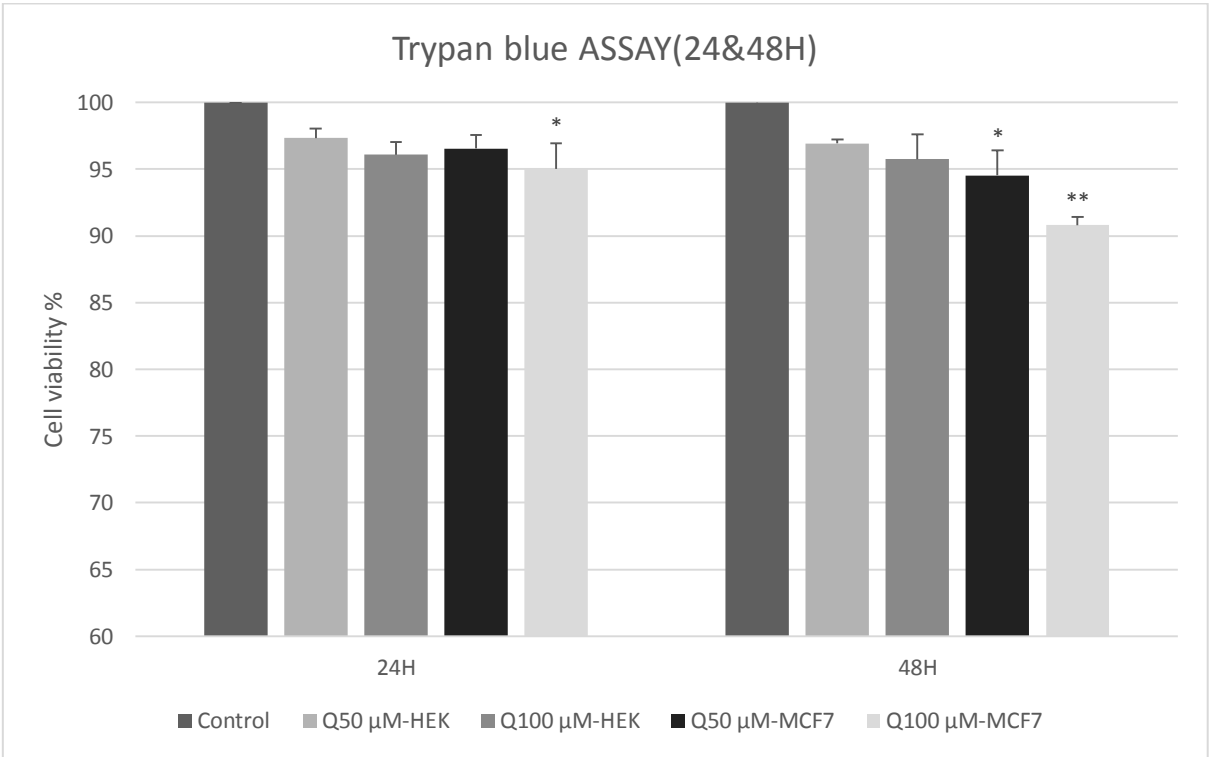
نمودار ۱: تاثیر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در رده سلولی MCF-7 سرطان سینه و رده سلولی نرمال HEK-293، (**: P <0.01), (*: P <0.05)



نمودار ۲: تاثیر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در رده سلولی MCF-7 سرطان سینه و رده سلولی نرمال HEK-293، (**: P <0.01), (*: P <0.05)



نمودار ۳: تاثیر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در رده سلولی MCF-7 سرطان سینه و رده سلولی نرمال HEK-293، (**: P <0.01), (*: P <0.05)



نمودار ٤: تاثیر کوئرستین بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در رده سلولی MCF-7 سرطان سینه و رده سلولی نرمال HEK-293، (**: P <0.01), (*: P <0.05)

بحث

برپایه نتایج به دست آمده در این پژوهش، میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی تحت تاثیر کوئرستین کاهش می‌یابد. کوئرستین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است که به نوبه خود باعث اثرات درمانی می‌شود. اثرات این ماده بر درمان سرطان و کاهش رشد تومور در مطالعات مختلف مشاهده شده است. این

فلاونوئید دارای ویژگی‌های مهمی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضدسرطانی و ضد ویروسی می‌باشد بدین جهت محققان تغذیه و ایمنی آن را در جمله یکی از مهمترین ترکیبات گیاهی و تغذیه ای انسان قرار داده اند [۱۴،۱۵].

کوئرستین دارای توانایی مهار انتخابی آنزیم مونوآمینواکسیداز می‌باشد که موجب بسیاری از اثرات درمانی این ماده شده است [۱۶]. تاثیر مثبت این ترکیب بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد و پارامترهای بیضه در موش‌های صحرایی نر نیز مشاهده شده است. در این پژوهش کوئرستین موجب افزایش ترشح تستوسترون و افزایش کمی کیفی سلول‌های جنسی در بیضه شد [۱۳].

اثرات این ماده بر درمان سرطان و کاهش رشد تومور در پژوهش‌های گوناگونی مشاهده شده است. در یک پژوهش بمدت ۸سال در افراد سیگاری میزان ریسک ابتلا به سرطان لوزالمعده ۲۳% کاهش یافت [۱۵]. اثر کوئرستین موجب افزایش ژن‌های دخیل در مسیرهای انتقال مانند بتاکاتنین شده و از این طریق مکانیسم عمل ضدسرطانی دارد [۱۷]. همچنین در پژوهشی مشاهده شد که فلاونوییدهایی مانند کوئرستین موجب کاهش بیان ژن سایتوکین قبل از التهاب در مونوسیت‌ها شده است[۱۸]. در تحقیقی مشاهده شد که کوئرستین بعد از ۴۸ ساعت موجب مهار بیان ژن P53 شده و سیکل سلولی را در مرحله S متوقف می‌کند. همچنین ثابت شده که این ماده باعث کاهش بیان ژن BCL2 شده و موجب القای آپوپتوز می‌شود [۱۹]. در پژوهشی مشاهده شد که ژن APOBEC3B که با بیان بیش از حد خود در سرطان پستان موثر است تحت تاثیر کوئرستین بیان آن کاهش یافته است[۱۷]. در پژوهشی دیگر مشخص شد که در رده سلولی OMDA-MB0231که با کوئرستین تیمار شده بودند میزان سیتوزولی یون کلسیم افزایش و پتانسیل غشا میتوکندری کاهش یافت که در نهایت منجر به افزایش بیان ژن‌های کاسپاز۳ ،۸ و ۹ گردید. در رده سلولی U937 نیز کوئرستین با القا آپوپتوز از طریق مسیرهای گوناگون موجب انتشار سیتوکروم C در سیتوپلاسم و بیان ژن‌های کاسپاز۳ و ۷ می‌شود [۲۰].

کوئرستین رشد سلول و آپوپتوز را از طریق کاهش بیان مسیر سیگنالینگ بتاکاتنین TCF موجب می‌شود و باعث کاهش بیان سایکلین D1 می‌شود [۲۱]. همچنین کوئرستین از طریق ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود موجب تحریک آپوپتوز و افزایش بیان AMPKα1 شده و با افزایش بیان ASK1 به همراه P53 موجب بکار گیری کاسپازها می‌شود [۲۲]. اثرات دیگر کوئرستین برای درمان سرطان مربوط به پروآپوپتوتیک و ضد تکثیری آن می‌باشد که از طریق اتصال به توبولین صورت می‌پذیرد. این فرآیند از طریق دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌های داخل سلول انجام می‌شود [۲۳]. کوئرستین همچنین از طریق افزایش بیان رسپتور DR-5 با واسطهTRAIL (لیگاند القاکننده آپوپتوز با میانجیگری TNF) موجب افزایش قابل توجه آپوپتوز بویژه در سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین با کاهش بیان Survivine در مسیر سیگنالینگ ERK-MSK1 نیز موجب افزایش آپوپتوز می‌شود [۲۴].

تحقیقات و مکانیسم‌های ذکر شده مربوطه، همگی گواه اثرات ضد سرطانی کوئرستین می‌باشند که با نتایج تحقیقات ما مطابقت دارد. بر اساس نتایج آزمایش MTT، میزان بقای سلول‌های سرطانی در ساعت ۲۴ و ۴۸ برای دوز ۱۰۰ µM کاهش می‌یابد، اما برای دوز ۵۰ µM تنها در زمان ۴۸ ساعت، اثرات مهار کنندگی کوئرستین بر سلول‌های سرطانی دیده شد. با بررسی نتایج آزمون فعالیت‌های زیستی تریپان بلو نیز اثر مهارکنندگی کوئرستین در ساعت ۴۸ در هر دوز دیده شد. میزان اثر این دارو در ساعت ۲۴ تنها برای دوز ۱۰۰ میکرو مولار معنی دار بود. با بررسی نتایج هر دو تست، کوئرستین بر سلول‌های نرمال هک اثر بازدارندگی زیستی نداشت. با توجه به فعالیت‌های زیستی سلول‌های نرمال تحت تاثیر تیمار کوئرستین در هردو دوز و عدم مشاهده اثرات منفی می‌توان بی خطر بودن و عدم وجود عارضه جانبی داروی کوئرستین در درمان سرطان را نتیجه گرفت.

بررسی کلی نتایج آزمایش نشان داد که اثرات ضد سرطانی کوئرستین مثبت است. بهترین نتایج برای دو دوز ۵۰ و ۱۰۰ µM در ساعت ۴۸ بدست آمد. بدین جهت، استفاده طولانی مدت از داروی کوئرستین برای مشاهده اثرات ضد سرطانی توصیه می‌شود. همچنین داروی کوئرستین در دوزهای مصرفی این پژوهش بدون عوارض جانبی تشخیص داده شد.

ملاحظات اخلاقی

رعایت دستورالعمل‌های اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاقی IR.IAU.SRB.REC.1398.105 : مورد تایید کمیته ملی اخلاق در تحقیقات زیست پزشکی قرار گرفت. تمام مراحل آزمایشی بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی کمیته محلی انجام شد.

منابع مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی از سازمان‌های مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان به طور یکسان در تهیه این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان عدم تعارض منافع با نتایج این مقاله را اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Mousavi, S.M., Gouya, M.M., Ramazani, R., Davanlou, M., Hajsadeghi, N. and Seddighi, Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of oncology 2009; 20(3), pp.556-563.

[2] Harirchi, I., Karbakhsh, M., Kashefi, A. and Momtahen, A.J. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian pacific journal of cancer prevention 2004; 5(1), pp.24-27.

[3] Taplin, S.H., Ichikawa, L., Yood, M.U., Manos, M.M., Geiger, A.M., Weinmann, S., Gilbert, J., Mouchawar, J., Leyden, W.A., Altaras, R. and Beverly, R.K. Reason for late-stage breast cancer: absence of screening or detection, or breakdown in follow-up? Journal of the National Cancer Institute 2004; 96(20), pp.1518-1527.

[4] Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B. and Srivatsan, E.S. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. Molecular cancer 2011; 10(1), pp.1-19.

[5] Verkooijen, H.M., Fioretta, G., Pache, J.C., Franceschi, S., Raymond, L., Schubert, H. and Bouchardy, C. Diagnostic changes as a reason for the increase in papillary thyroid cancer incidence in Geneva, Switzerland. Cancer Causes & Control 2003; 14(1), pp.13-17.

[6] Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ferrari, P., van Duijnhoven, F.J., Norat, T., Pischon, T., Jansen, E.H., Slimani, N., Byrnes, G., Rinaldi, S. and Tjønneland, A. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. Bmj 2010; 340.

[7] Pelicano, H., Carney, D. and Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug resistance updates 2004; 7(2), pp.97-110.

[8] Hsieh, T.C., Wijeratne, E.K., Liang, J.Y., Gunatilaka, A.L. and Wu, J.M. Differential control of growth, cell cycle progression, and expression of NF-κB in human breast cancer cells MCF-7, MCF-10A, and MDA-MB-231 by ponicidin and oridonin, diterpenoids from the chinese herb Rabdosia rubescens. Biochemical and biophysical research communications 2005; 337(1), pp.224-231.

[9] Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2005 May 1;51(3):187-200.

[10] Dhiman, H.K., Ray, A.R. and Panda, A.K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. Biomaterials 2005; 26(9), pp.979-986.

[11] Mohammadain, Shahrbabaki F., M. Mahmoudi, M. Mirzaee, A. Khoshdel, M. Sheikhfathollahi, N. Zinodini, Mr Hajizadeh. "Expression of some genes involved in epigenetic in breast cancer cell lines: The effect of quercetin."2015; 413-424.

[12] Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. Current pharmaceutical biotechnology. 2016 Nov 1;17(14):1213-21.

[13] Zohreh, F., Nasri, S. and Karishchi, P. The effect of Quercetin on pituitary–gonadal axis, sperm parameters and testis tissue in

male rats. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2017; 22(2), pp.377-386.

[14] Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. World J Pharm Pharmaceutical Sci. 2012 May 1;1(1):146-60.

[15] Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G. and Lee, Y.J. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. Journal of cellular biochemistry 2009;106(1), pp.73-82.

[16] Saaby, L., Rasmussen, H.B. and Jäger, A.K. MAO-A inhibitory activity of quercetin from Calluna vulgaris (L.) Hull. Journal of Ethnopharmacology 2009; 121(1), pp.178-181.

[17] van Erk, M.J., Roepman, P., van der Lende, T.R., Stierum, R.H., Aarts, J.M.M.J.G., van Bladeren, P.J. and van Ommen, B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer–related mechanisms in colon cancer cells in vitro. European journal of nutrition, 2005; 44(3), pp.143-156.

[18] Nair, M.P., Mahajan, S., Reynolds, J.L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S.A. and Kandaswami, C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-κβ system. Clinical and vaccine immunology 2006; 13(3), pp.319-328.

[19] Xiang, T.X., Tao, X.H., Jiang, Z. and Wang, P.L. Effects of quercetin on proliferation of gastric cancer lines BGC823 and the expression of p53, Bcl-2/Bax and PCNA. Laser J, 2006; 27, pp.95-96.

[20] Mouria, M., Gukovskaya, A.S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O.J., Reber, H.A. and Pandol, S.J. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. International Journal of Cancer 2002; 98(5), pp.761-769.

[21] Shan, B.E., Wang, M.X. and Li, R.Q. Quercetin inhibits human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/β-catenin signaling pathway. Cancer investigation, 27(6) 2009; pp.604-612.

[22] Lee, Y.K., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Surh, Y.J. and Park, O.J. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPKα1/ASK1/p38 pathway. Cancer letters 2010; 292(2) pp.228-236.

[23] Gupta, K. and Panda, D. Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. Biochemistry 2002; 41(43), pp.13029-13038.

[24] Kim, J.Y., Kim, E.H., Park, S.S., Lim, J.H., Kwon, T.K. and Choi, K.S. Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation. Journal of cellular biochemistry 2008; 105(6), pp.1386-1398.

Investigation of the effect of quercetin on the survival rate of MCF-7 breast cancer cells by MTT and Trypan blue assays

Zohreh F.[1], Parivar K.[1*], Hayati Roodbari N.[1], Yaghmaei P.[1]

[1] Department of biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): Kazem_parivar@yahoo.com

DOI: 10.30495/jdb.2022.1959827.1307 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.5.9

Received: May.2022 Accepted: July.2022

Abstract

In this study, the effect of quercetin on the survival of cancer cells was investigated using MTT and trypan blue tests. Quercetin is a flavonol that has antioxidant properties and is found in fruits, vegetables, and especially colored seeds. Breast cancer cells (MCF-7 cell line) and healthy cells (HEK-293 cell line) were exposed to 50 and 100 micromolar doses of quercetin for 24 and 48 hours. To check the viability of cancer cells, MTT and trypan blue tests were performed. According to the results, the survival rate of cancer cells with Q50 µM dose in 48 hours was significantly decreased in the surface ($P < 0.01$). Also, a significant decrease was observed in Q100 µM dose at 24 and 48 hours. This decrease was significant at 24 hours at $P < 0.05$ and at 48 hours at $P < 0.01$. The results of tests showed the positive anti-cancer effects of quercetin. Based on the results of this research, quercetin reduced the survival rate of cancer cells and the best result was observed in 48 hours. Considering that the anti-cancer effects of quercetin were greater after 48 hours, long-term use of this drug is recommended to achieve its therapeutic effects.

Keywords: Quercetin, Breast cancer, MCF-7, HEK, MTT assay.