

**Research Paper**

**Increasing the Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells to Quercetin by Declining DFF45 Expression Level**



Toktam Sadat Koleini<sup>1</sup>, \*Seyed Jalal Zargar<sup>1</sup>, Shahrokh Safarian<sup>1</sup>, Mostafa Saberian<sup>2</sup>

1. Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.  
2. Department of Medical Laboratory Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



**Citation** Koleini TS, Zargar SJ, Safarian SH, Saberian M. [Increasing the Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells to Quercetin by Declining DFF45 Expression Level (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2023; 21(6):776-793. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.6.2435>

<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.6.2435>



**ABSTRACT**

**Background and Objectives** In recent years, flavonoids such as quercetin have been considered as new anticancer drugs. The mechanisms of action of quercetin include cell cycle arrest, inhabitation of cell proliferation, and induction of apoptosis. This study aims to reduce quercetin's side effects by increasing MCF-7 breast cancer cells' sensitivity to this drug and facilitating the cytotoxic effects of quercetin at lower concentrations.

**Subjects and Methods** In this study, the MTT assay was used to determine the concentration that reduced the cell viability by 50% (i.e. lethal concentration 50 or LC<sub>50</sub>). Then, the expression of the DNA fragmentation factor-45 (*DFF45*) and some genes in the apoptosis pathway (caspase3, p53, BAX, BCL-2, AIF), the autophagy pathway (LC3, ATG5, Beclin, DRAM) and the AKT/mTOR pathway (AKT1, mTOR, and PTEN), in cells treated with siRNA, quercetin, and quercetin+siRNA using the real-time PCR.

**Results** According to the results of MTT assay, the LC<sub>50</sub> value for quercetin was determined 220 μM. The results indicated the initiation of cell death through autophagy pathways. The combined treatment (quercetin+siRNA) increased the mechanism of cancer cell death more than the quercetin treatment alone.

**Conclusion** One of the regulating pathways of apoptosis is forcing the inhibitory effect of DFF45 on DFF40/CAD nuclease. Down regulation of *DFF45*, along with quercetin administration, can lead to induction of breast cancer cell death which can be a novel technique for the treatment of breast cancer.

**Keywords** Breast cancer, Quercetin, Apoptosis, Autophagy

Received: 20 Jul 2022

Accepted: 10 Nov 2022

Available Online: 21 Jan 2023

\* Corresponding Author:

Seyed Jalal Zargar, PhD.

Address: Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 61113646

E-Mail: [zargar@Khayam.ut.ac.ir](mailto:zargar@Khayam.ut.ac.ir), [zargar@ut.ac.ir](mailto:zargar@ut.ac.ir)

## Extended Abstract

### Introduction

**C**ancer is defined as a group of diseases characterized by uncontrolled abnormal cell growth and their spread to other parts of the body. Breast cancer is the most prevalent cancer in women and is ranked second in terms of female mortality. Mutations in genes such as *BRCA1*, *BRCA2*, and *p53* are commonly observed in breast cancer. Apoptosis, a process vital for cellular growth and eliminating abnormal cells, plays a significant role in cancer. One of the important proteins in the apoptotic pathway is the DNA fragmentation factor-45 (DFF45) which has a role in inhibiting DFF40. Studies have shown increased expression of *DFF45* in various cancers. Microautophagy, macroautophagy, and chaperone-mediated autophagy are involved in removing harmful substances from cells. Defects in the autophagy pathways can lead to harmful substance accumulation.

Quercetin, a natural antioxidant found in plants, has demonstrated anticancer properties against breast, colon, ovarian, endometrial, and lung cancers. The mechanisms of action of this pigment include regulation of *p53* protein, cell cycle arrest, inhibition of tyrosine kinases, prevention of heat shock protein production, and induction of apoptosis. On the other hand, SiRNA, a gene-silencing sequence, has received attention in cancer treatment. It can suppress the expression of key components involved in cancer progression. Combining siRNA with other treatments enhances therapeutic efficacy while reducing adverse effects. This study aims to sensitize breast cancer cells to apoptosis for facilitating the cytotoxic effects of quercetin at lower concentrations and, thus, minimizing potential side effects.

### Material and Methods

Human MCF-7 cells were obtained from the Iranian Biological Resource Center and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin/streptomycin antibiotics. Six different concentrations of the quercetin were prepared and evaluated. Quercetin, with a molecular weight of 302.24 g/mol, was dissolved to create a drug solution with a concentration of  $0.0330862 \times 10^6$   $\mu\text{M}$ . The MTT assay was used to measure cell proliferation after exposure to various substances and the toxicity of these substances. This assay is based on reducing a yellow tetrazolium salt to an insoluble formazan crystal by the mitochondrial succinate dehydrogenase. The resulting

solution's optical absorption was measured at 570 nm using an ELISA reader.

The cells were cultured in a 6-well plate without antibiotics. After 24 hours, a prepared solution of siRNA-DFF45 was added using lipofectamine. The cells were then incubated, subjected to quercetin after 24 hours. Total cellular RNA was extracted 48 hours later. RNA extraction from the cells was performed using the RNX-plus solution kit. The extracted RNA was isolated and washed with cold isopropyl alcohol, and its absorption was measured. Random hexamer primers and reverse transcriptase enzymes were used for cDNA synthesis. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) was conducted using the SYBR Ex Taq kit and the Applied Biosystems Real-time PCR system to analyze the expression levels of target genes involved in apoptosis, autophagy, and cell survival. *Gapdh* was used as a reference gene for normalization. The data of real-time RT-PCR were analyzed using the ABI Step One software.

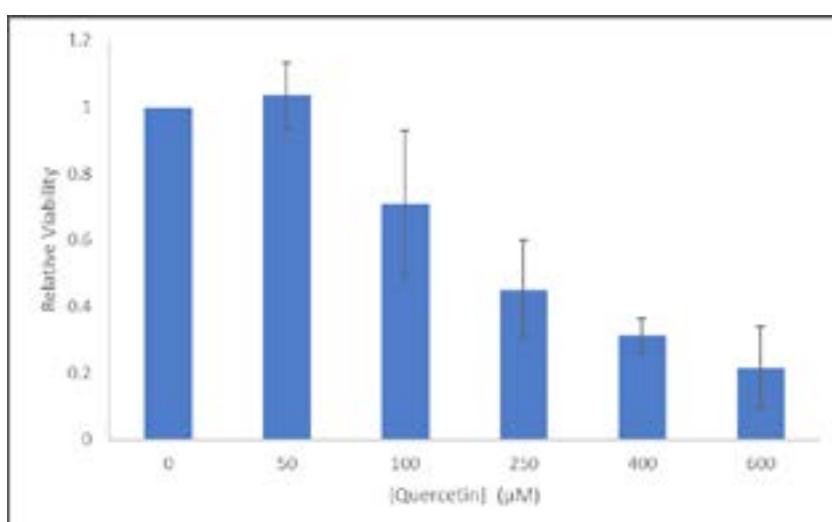
### Results

In the MTT assay, cells were treated with different concentrations of quercetin for 48 and 72 hours, and the concentration that reduced the cell viability by 50%, which is called Lethal Concentration 50 ( $\text{LC}_{50}$ ), was determined. The results showed an  $\text{LC}_{50}$  value of 220  $\mu\text{M}$  for the 48-hour treatment (Figure 1).

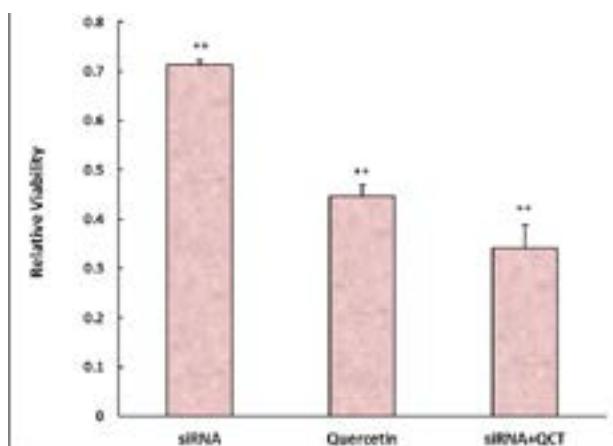
The cells were treated with siRNA, quercetin, and siRNA+quercetin. The findings revealed that siRNA treatment caused a 30% decrease in cell viability; quercetin treatment led to a 55% reduction, and the combined treatment resulted in a 65% decrease (Figure 2). This indicates the higher cytotoxic effect of quercetin on cells when *DFF45* expression was reduced. Statistical analyses revealed significant differences between siRNA treatment and the combined treatment (siRNA+quercetin) ( $P<0.01$ ) and between quercetin treatment and siRNA, ( $P<0.05$ ).

The real-time RT-PCR results demonstrated that siRNA treatment caused more than 80% decrease in *DFF45* expression. Quercetin treatment resulted in a 50% decrease in *DFF45* expression, while the combined treatment did not considerably affect *DFF45* expression.

The analysis of the expression of genes in the apoptosis pathway revealed that siRNA treatment decreased the expression of *p53*, *BAX*, *BCL-2*, and *caspase-3* genes, but no significant change in the expression of *AIF* gene (Figure 3).



**Figure 1.** MCF-7 cell treatment in the presence of different concentrations of quercetin incubated for 48 hours



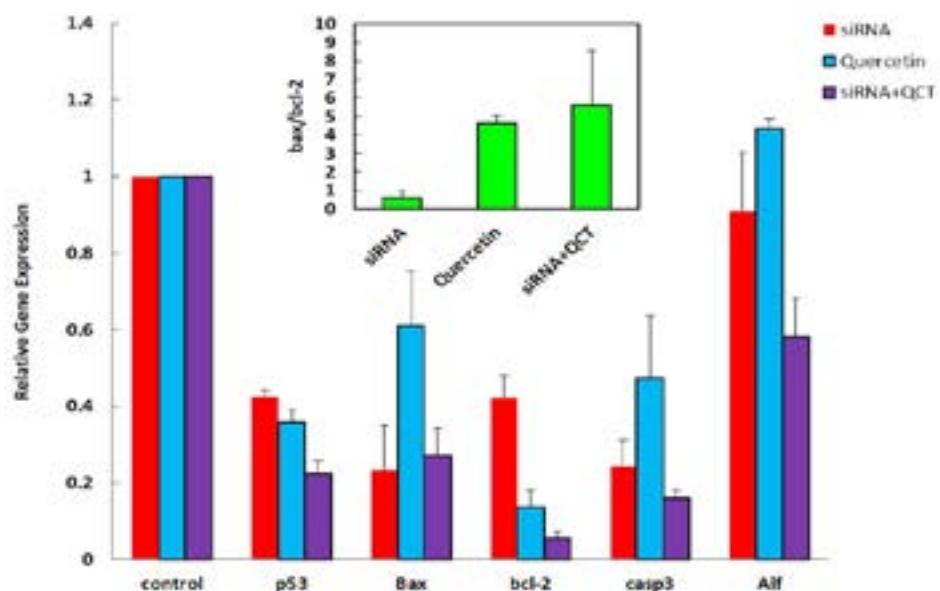
**Figure 2.** Changes in cell viability after treatment with siRNA, quercetin, and both (siRNA+quercetin)

\*\*Significance compared to the controls.

In the autophagy pathway, siRNA treatment reduced the expression of *ATG5*, damage-regulated autophagy modulator (*DRAM*), and *Beclin* genes, while *LC3* gene expression remained unchanged (no significant effect). Quercetin treatment increased the expression of *LC3* and *Beclin* genes, but had no significant effect on *ATG5* and *DRAM* genes. The combined treatment increased *LC3* expression and further reduced the expression of *ATG5* and *DRAM* genes (Figure 4). The results indicate that the activation of autophagy pathway leads to a 55% and 65% decrease in cell viability under quercetin and combined treatment (siRNA+quercetin), respectively. Both siRNA and quercetin treatments generally affected the expression of genes in the AKT/mTOR pathway (Figure 5).

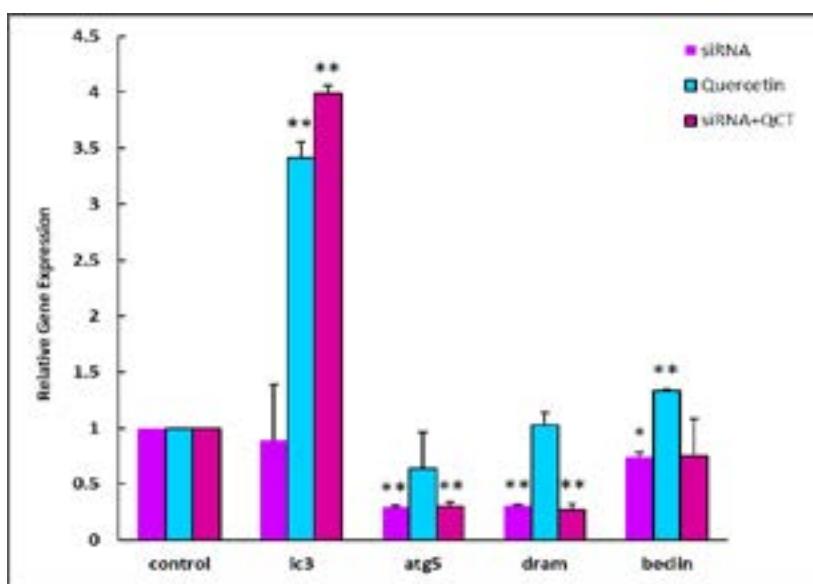
## Conclusion

In this study, siRNA-*DFF45* was used to downregulate the expression of the *DFF45* gene simultaneously with the administration of quercetin to induce cell death in MCF-7 cancer cells. Although most anticancer drugs induce apoptosis leading to the elimination of cancer cells, the cell death induced by these drugs is not always done through the apoptotic pathway, which was confirmed in this study. One of the main characteristics of cancer is resistance to apoptosis due to mutations in pro-apoptotic and anti-apoptotic genes and alterations in their expression. In addition, many cancer therapies demonstrate their cytotoxic effects by activating the apoptosis path-



**Figure 3.** Relative gene expression for p53, BAX, BCL-2, AIF, and caspase-3 genes in the apoptosis pathway after treatment with siRNA, quercetin, and quercetin+siRNA

**Jundishapur**  
Journal of Medical Sciences



**Figure 4.** Relative gene expression for IC3, ATG5, DRAM, and Beclin genes in the autophagy pathway after treatment with siRNA, quercetin, and quercetin+siRNA

**Jundishapur**  
Journal of Medical Sciences

way, making the intervention in this pathway a potential strategy for cancer treatment. The results of this study showed that the treatment of MCF-7 cancer cells with quercetin, along with downregulation of DFF45 gene using siRNA-DFF45 induced cell death.

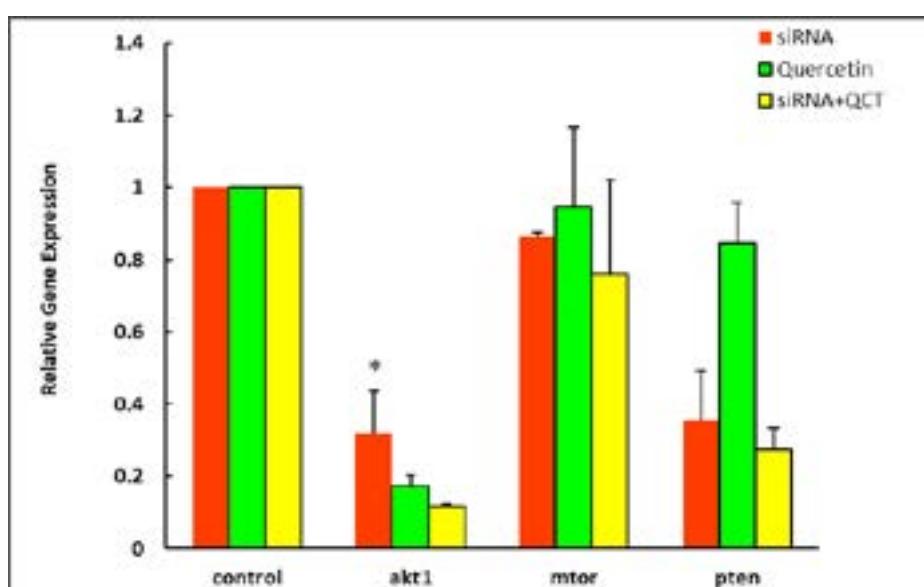
Based on these findings, it can be concluded that the simultaneous use of siRNA-DFF45 with quercetin enhances the cytotoxic effect of quercetin by 10%. Quercetin, as

a natural antioxidant found in various plants, can play a significant role in breast cancer prevention.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

There were no experiments on human or animal samples. Therefore, no ethical considerations were needed.



**Figure 5.** Relative gene expression for KT1, mTOR, and PTEN genes in the AKT/mTOR pathway after treatment with siRNA, quercetin, and quercetin+siRNA

**Jundishapur**  
Journal of Medical Sciences

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Authors contributions

Conceptualization, methodology, software: Seyed Jalal Zargar and Shahrokh Safarian; Supervision and data curation: Seyed Jalal Zargar; Writing, initial draft preparation, and investigation: Toktam Sadat Koleini; Writing, review & editing: Mostafa Saberian; Final approval: All authors.

#### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

## مقاله پژوهشی

## افزایش حساسیت سلول‌های MCF-7 سرطان پستان نسبت به کوئرستین از طریق کاهش بیان DFF45/ICAD

تکمیل سادات کلینی<sup>۱</sup>، سید جلال زرگر<sup>۱</sup>، شاهرخ صفریان<sup>۱</sup>، مصطفی صابریان<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.



**Citation:** Koleini TS, Zargari SJ, Safarian SH, Saberian M. [Increasing the Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells to Quercetin by Declining DFF45 Expression Level (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2023; 21(6):776-793. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.6.2435>

<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.6.2435>

### چکیده



**مینه و هدف** در سال‌های اخیر فلاندونیدهایی مانند کوئرستین به عنوان داروهای جدید ضدسرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. مکانیسم اثرگذاری کوئرستین از طریق توقف چرخه سلولی، مهار تکثیر سلول و القای آپوپتوز گزارش شده است. هدف از این مطالعه حساسیت کردن سلول‌های MCF-7 سرطان پستان نسبت به آپوپتوز به منظور فراهم آوردن شرایطی برای ظاهر شدن اثرات کشندگی کوئرستین، به عنوان داروی انتخابی در درمان سرطان پستان، در غلظت‌های کمتر بود تا این طریق اثرات جانبی این دارو تا حد امکان کاسته شود.

**روش پژوهش** آزمون MTT جهت تعیین زمان و غلظت مناسبی از دارو که توان حیاتی سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد کاهش دهد، انجام شد. سپس بیان ژن dff45 و تعدادی از ژن‌های مسیر آپوپتوز (p53, bcl-2, aif, bcl, caspase3 و atg5)، اتفاقاً (bax) در سلول‌های dram و همراه با ژن‌های محور بقای سلولی (akt1 و mtor) در سلول‌های تیمارشده با siRNA، DFF45 siRNA و کوئرستین و siRNA+کوئرستین (با روش Real Time RT-PCR) بررسی شد.

یافته‌ها با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT داروی کوئرستین برابر با ۲۲۰ میکرومولار تعیین شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده به راه افتادن مسیرهای مرگ سلولی از طریق اتفاقاً در سلول‌های است. همچنین تیمار همزمان (siRNA+کوئرستین) در مقایسه با تیمار کوئرستین سبب افزایش سازوکار مرگ القاشده در سلول‌های شود.

**نتیجه‌گیری** یکی از مسیرهای تنظیم کننده آپوپتوز، ایجاد اثر مهاری DFF45/ICAD بر نوکلئاز CAD DFF40 است. هنگامی که کوئرستین استفاده می‌شود تنظیم ضعیف dff45 به تغییر مسیر به سمت مرگ سلولی منجر می‌شود. این روش می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی جدید برای درمان سرطان پستان باشد.

**کلیدواژه‌ها** سرطان پستان، کوئرستین، آپوپتوز، اتفاقاً

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ تیر ۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱ آبان ۱۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱ بهمن ۱۰

\* نویسنده مسئول:

دکتر سید جلال زرگر

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، دانشکدگان علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی.

تلفن: +۹۸ (۰۲۱) ۶۶۴۹۲۹۹۲

ایمیل: zargar@khayam.ut.ac.ir, zargar@ut.ac.ir

## مقدمه

و گونه‌های فعال نیتروژن<sup>۲</sup> بازی می‌کنند [۱۶]. از مکانیسم‌های مولکولی عمل کوئرستین می‌توان به افزایش پروتئین p53 و توقف چرخه سلولی، تنظیم کاهشی پروتئین p53 چهش‌یافته، مهار تیروزین کینازها، ممانعت از تولید پروتئین‌های شوک حرارتی، ممانعت از بیان پروتئین‌های Ras، قابلیت اتصال به گیرنده‌های استروژن و القای آپوپتوز اشاره کرد [۱۷].

از طرفی امروزه استفاده از siRNA به عنوان توالی خاموش‌کننده بیان زن‌ها رشد قابل توجهی داشته است. توالی‌های siRNA داپلکس ۲ رشته‌ای RNA به طول ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتید است که ۲ تا ۳ نوکلئوتید اویخته متقاضی در انتهای ۳' OH و ۵' P دارد [۱۸]. در تحقیقات گذشته برای درمان سرطان از تزریق مستقیم siRNA در مدل‌های حیوانی استفاده شده است و نقش آن‌ها در جلوگیری از پیشرفت تومورها اثبات شده است [۱۹]. به علاوه siRNA می‌تواند بیان گیرنده‌های تیروزین کیناز، زن‌های ضد آپوپتوزی، زن‌های بقای سلولی، عوامل رشد پیش‌برنده تومور یا زن‌های مسئول در تکثیر سلول مانند سیکلین‌ها را مهار کند. همراهی siRNA با روش‌های درمانی دیگر از جمله داروها می‌تواند با تشدید عملکرد دارویی تا حد زیادی از اثرات جانبی ناشی از مصرف داروها در دُز بالا جلوگیری کند [۲۰]. این روش می‌تواند به عنوان یک استراتژی پیشگیرانه و درمانی جدید برای مدیریت سرطان به کار رود. هدف از این مطالعه حساس‌تر کردن سلول‌های سرطانی پستان نسبت به آپوپتوز به منظور فراهم آوردن شرایطی برای ظاهر شدن اثرات کشنده‌گی کوئرستین، به عنوان داروی انتخابی در درمان سرطان پستان، در غلظت‌های کمتر است تا از این طریق اثرات جانبی این دارو تا حد امکان کاسته شود.

## روش بررسی

## کشت سلول

رده سلولی MCF-7 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران<sup>۳</sup> تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gib-) (RPMI-1640) (CO<sub>2</sub>-L-glutamine ۱۰۰۰-۵۰۰۰-FB) درصد سرم جنین گاوی<sup>۴</sup> (انستیتو پاستور ایران) همراه با ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. جمعیت سلول‌های MCF-7 معمولاً هر ۲۴ تا ۳۲ ساعت ۲ برابر می‌شود [۲۱].

## آماده‌سازی داروی کوئرستین و تیمار سلولی:

برای محاسبه و تعیین غلظت مؤثر داروی کوئرستین جهت کاهش ۵۰ درصدی بقای سلول‌ها (LC50)، ۶ غلظت از این دارو شامل ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار انتخاب

2. Reactive Nitrogen Species (RNS)

3. Iranian Biological Resource Center (IBRC)

4. FBS

سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن‌ها تقسیم و تکثیر سلولی تنظیم‌نشده است. از ویژگی‌های سرطان، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی به نقاط دیگر بدن است [۱]. سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان و دومین عامل مرگ در زنان پس از سرطان ریه شناخته شده است [۲]. چهش در زن‌های BRCA1 و BRCA2 در حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد سرطان پستان ارثی و چهش در زن p53 در ۵۰٪ درصد سرطان‌ها مشاهده شده است [۳]. یکی از فرایندهای مهم در رشد و تمایز سلولی، التهاب، نگهداری و هوموستازی بافت‌ها و پاکسازی سلول‌های غیرطبیعی و زائد، آپوپتوز است [۴-۶]. یکی از پروتئین‌های اصلی در مسیر آپوپتوز DFF45 است که نقش اصلی آن مهار DFF40 است [۷، ۸]. مطالعات نشان داده است بیان DFF45 و DFF35 در برخی سرطان‌ها از جمله کلون، اندومتریال، تخدمان و گلیوبلاستوما افزایش می‌یابد [۹-۱۱].

در مطالعه‌ای که ژانگ و همکاران انجام دادند، مشخص شد یکی از اهداف miR-145 mRNA مربوط به DFF45 است و miR-145 در سلول‌های سرطانی کلون نسبت به سلول‌های نرمال کاهش یافته است [۱۲]. بنابراین کاهش بیان DFF45 می‌تواند در درمان سرطان مفید واقع شود. علاوه بر این اتفاقی که یک فعالیت خودتخریبی است نقش مهمی در از بین بدن پروتئین‌هایی با تاخوردگی نابجا و تجمع یافته و حذف ارگانل‌های آسیب‌دیده و همچنین حذف پاتوزن‌های درون‌سلولی دارد. اتفاقی به عنوان یک مکانیسم بقای سلولی در نظر گرفته می‌شود که به ۲ صورت انتخابی و غیرانتخابی انجام می‌شود [۱۳]. در تخریب پروتئولیتیک اجزای سیتوزول ۳ نوع اتفاقی میکرو، ماکرو و CMA دخالت دارند [۱۴].

نقص در هریک از مسیرهای تخریبی منجر به تجمع مواد مضر در سلول و افزایش تجمعات سلولی می‌شود. از این‌رو استفاده از مواد ضدسرطانی به عنوان یک روش درمانی برای مقابله با تکثیر نابجای سلولی ضروری است. یکی از این قبیل مواد کوئرستین است. کوئرستین یک آنتی‌اسیدان طبیعی است که در گیاهان مختلف یافت می‌شود و خواص ضدسرطانی آن در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط طبیعی ثابت شده است. کوئرستین نقش مهمی در جلوگیری از سرطان‌های پستان، کلون، تخدمان، اندومتریوم و ریه دارد. کوئرستین به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد و اتصال به یون‌های فلزی، به عنوان یک آنتی‌اسیدان قوی شناخته می‌شود [۱۵]. آسیب‌های اکسیداتیو به عنوان یک DNA می‌شود [۱۶]. خطر برای سرطان شناخته شده است [۱۷].

آن‌تی‌اسیدان‌هایی مانند کوئرستین نقش مهمی در محافظت سلول در برابر آسیب‌های وارد به سلول گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup>

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

MCF-7 در پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد، تیمار دارویی با کوئرستین در غلظت‌های مشخص انجام شد. یک چاهک نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت تعویض شد. سپس محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط استاندارد قرار داده شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون محلول محیط کشت حاوی MTT از هر چاهک تخلیه شد و به هریک از چاهک‌ها DMSO اضافه شد تا باعث محلول شدن و خروج بولوهای فورمازان از سلول‌ها شود. درنهایت پلیت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر بر پایه رفانس ۶۳۰ نانومتر بررسی شد.

#### ترانسفکت کردن سلول‌ها با siRNA-DFF45

۱۰<sup>۵</sup> سلول در پلیت ۶ خانه با محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت محلول آماده شده siRNA-DFF45 با لیپوفکتمین در دمای محیط، به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها در انکوباتور قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت تیمار دارویی با کوئرستین انجام شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت RNA تام سلولی استخراج شد [۱۲].

#### cDNA، RNA، سنتز استخراج

در این مطالعه استخراج RNA تام به وسیله کیت RNX plus Solution for total RNA isolation انجام شد که مراحل آن به طور خلاصه بیان می‌شود. ابتدا محلول RNX plus به سلول‌ها اضافه شد و سوسپانسیون یکنواخت شد. در مرحله بعد کلروفرم سرد اضافه شد. سپس سوسپانسیون به ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز راوی که حاوی RNA بود به ویال جدید منتقل شد. سپس معادل حجم محلول حاوی RNA، ایزوپروپیل الکل سرد اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. فاز راوی تخلیه شد و رسوب با اتانول سرد شست و شو شد. پس از سانتریفیوژ، آب تیمار شده با دی‌اتیل پیروکربنات<sup>۷</sup> اضافه شد. RNA استخراج شده ابتدا در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و سپس بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۵].

به منظور ارزیابی کمی و کیفی RNA، جذب محلول با استفاده از نانوردراپ (Thermo Scientific) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۶].

برای سنتز DNA مکمل (cDNA) از پرایمرهای رندوم هگزامر و آنزیم ترانس کرپتاز معکوس<sup>۸</sup> ساخت شرکت Fermentase استفاده شد. آنزیم M-MuLV یک پروتئین منومر است که دارای فعالیت پلیمرازی وابسته به RNA و DNA و فعالیت H RNAase است.

7. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)  
8. RevertAidTM M-MuLV (RT)

شدن. کوئرستین با وزن مولکولی ۳۰۲/۲۴ گرم/مول تهیه شد [۲۲]. محلول دارویی با غلظت  $1 \times 10^{-7} \mu\text{M}$  / غلظت مورد نظر ( $\mu\text{M}$ ) ۱. تهیه شد. برای تهیه ۶ غلظت ذکرشده، حجم موردنیاز از محلول دارویی با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد:

$$\times \text{حجم مورد نیاز از محیط کشت (\mu\text{l})}$$

که به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه میکرولیتر ۱۳۰ محلول دارویی سترون شده با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر و محیط کشت اضافه شد [۲۳].

#### آزمون رنگ‌سننجی MTT

آزمون MTT برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلول‌ها در مواجهه با عوامل مختلف و تعیین میزان سمیت این عوامل هنگامی که بر روی سلول‌ها اثر داده می‌شوند، کاربرد دارد. اساس این روش بر پایه توانایی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریالی در سلول‌های زنده به منظور احیا و تبدیل حلقه‌های نمک زرد رنگ ترازوژلیوم (MTT) به بولوهای نامحلول در آب و بنفش رنگ فورمازان است که قادر به عبور از غشا نیستند. به همین علت بولوهای فورمازان را با استفاده از حللهای آلی به فرم محلول درمی‌آورند و از سلول‌ها بیرون می‌کشند. در این آزمون معمولاً دی‌متیل سولفوكساید<sup>۹</sup> و گاهی سدیم دودسیل سولفات<sup>۱۰</sup> در اسید هیدروکلریک رقیق به عنوان حلول مورد استفاده قرار می‌گیرند.

جذب نوری محلول حاصل را می‌توان با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر با طول موج مبنای MTT تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد که دارای آنزیم دهیدروژناز فعال هستند، مقدار عددی به دست آمده توسط این روش به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده در ارتباط است. در این سنجش میزان فورمازان تولیدشده توسط سلول‌های تیمارشده با یک عامل خاص را با میزان فورمازان تولیدشده توسط سلول‌های کنترل که تیمار خاصی دریافت نکرده‌اند، مقایسه می‌کنند. از این مقایسه، میزان اثر عامل تیماری خاص را به روی مرگ و مهار رشد سلول‌ها تعیین می‌کنند. هرچه میزان جذب نوری خوانده شده نسبت به حالت کنترل کمتر باشد، می‌توان نتیجه گرفت که تعداد سلول‌های زنده کم و مهار رشد سلولی بیشتر صورت گرفته است [۲۴].

آزمون MTT در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار دارویی انجام شد. برای مراحل انجام این آزمون به طور خلاصه ابتدا ۱۰<sup>۳</sup> سلول

5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)  
6. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

برای انجام آزمایش، ویال‌ها در دستگاه قرار داده شد و با برنامه زیر رانده شد:

دناتوراسیون اولیه ۱۵ ثانیه در ۹۰ درجه سانتی گراد انجام شد و سپس ۴ سیکل تکثیر به این شکل انجام شد: ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۴ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد.

در هر بار رانده شدن دستگاه، نمونه NTC که فاقد cDNA بود برای هر پرایمر در نظر گرفته شد تا از عملکرد صحیح واکنش زنجیره ای پلیمراز اطمینان حاصل شود.

### یافته‌ها

به طور خلاصه، اثرات خدسرطانی داروی کوئرستین در تیمار همزمان کوئرستین و siRNA-DFF45 بر روی رده سلولی MCF-7 با تأکید بر مسیرهای بقای سلولی، آپوپتوز و اتوفازی بررسی شد. برای تعیین بهترین غلظت و زمان تیمار دارویی، توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT اندازه‌گیری شد. به این منظور سلول‌ها در غلظت‌های مختلف دارویی در ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و غلظت مؤثری از دارو که توان حیاتی سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد کاهش می‌داد ( $LC_{50}$ )، تعیین شد. همچنین توان حیاتی سلول‌ها در تیمارهای siRNA و دارو+siRNA با آزمون MTT اندازه‌گیری شد. سپس برای بررسی اینکه آیا DFF45 می‌تواند هدف مناسبی در درمان سرطان پستان باشد از siRNA-DFF45 برای کاهش بیان این زن در رده سلولی MCF-7 استفاده شد. سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتمین ۲۰۰۰ ترانسفکت شدند و پس از تیمار با کوئرستین، کاهش بیان در سطح Real time RT-PCR با mRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل به شرح ذیل است:

### آزمون رنگ‌سنگی MTT

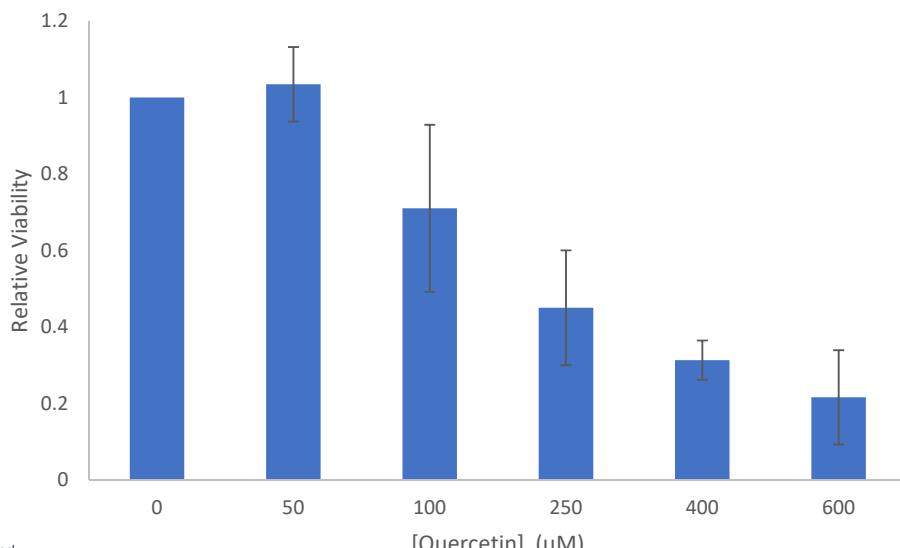
در آزمون رنگ‌سنگی MTT به منظور بررسی توان حیاتی سلول‌ها و کاهش ۵۰ درصدی آن، تیمار سلول‌ها با کوئرستین با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرو مولار در ۲ زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT در تصاویر شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده است. با توجه به نمودارهای مربوط به تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعته، نمودار بقای سلولی در تیمار ۴۸ ساعته برای تعیین  $LC_{50}$  مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۳). با توجه به این منحنی میزان ۲۲۰ میکرومولار به دست آمد که در این پژوهش در تمام مراحل کاری مورد استفاده قرار گرفت.

اختصاصی RNA، در هیبرید RNA-DNA است. این آنزیم قادر است به طور کارا تا یک cDNA تکرشتهای به طول ۱۳ کیلوبایت<sup>۹</sup> را سنتز کند. فعالیت بهینه آن در ۳۷ درجه سانتی گراد که در انواع مهندسی شده تا ۵۵ درجه سانتی گراد افزایش یافته است. پرایمرهای رندوم هگزامر، ساخت cDNA را از تمام طول RNA و همچنین از روی RNAهای انتقالی و ریبوزومی انجام می‌دهند [۲۷].

به طور خلاصه، سنتز cDNA به این ترتیب انجام شد: ابتدا معادل ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده به ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر اضافه شد و با آب دی‌اتیل پیروکربنات به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد باعث باز شدن ساختارهای دوم RNA و تسهیل انصال پرایمرها شد. مواد مورد نیاز جهت سنتز شامل ۳/۵ میکرولیتر از Reaction Buffer(5X)، محلول ۵/۰ میکرولیتر از azo محول Ribolock RNase inhibitor، ۲ میکرولیتر از dNTP mix و ۱ میکرو لیتر از آنزیم کریپتاز مغوكس RevertAidTM M-MuLVtase و با رسیدن حجم محلول به ۲۰ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد (برای سنتز cDNA) انکوبه شد. سپس با حرارت دادن نمونه در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (برای غیرفعال سازی آنزیم RT) به واکنش خاتمه داده شد. محصول در ویال‌های مختلف تقسیم و در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### بررسی میزان بیان ژن‌های هدف

برای انجام SYBR premix از کیت Real Time RT-PCR با شماره خرید RR420 و دستگاه Ex Taq TAKARA با شماره خرید Ap plied Biosystems Real time PCR سنتز cDNA، بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز caspase-3، aif، be-1، bcl-2، bcl-xL، atg5، dram، p53، beclin-1، akt1، mtor، pten، clin و محور بقای سلولی (akt1، mtor، pten) همراه با بیان ژن dff45 در تیمارهای siRNA-DFF45، کوئرستین و تیمار همزمان (کوئرستین+siRNA) انجام شد. واکنش time RT-PCR با حداقل ۲ تکرار برای هر ژن و با استفاده از ژن gapdh مرجع انجام شد و داده‌های Real time RT-PCR با کمک نرم‌افزار ABI STEP ONE به روش  $\Delta\Delta CT$  تحلیل شد. عدد نهایی  $2^{-\Delta\Delta CT}$  حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ تجزیه و تحلیل آماری شد. برای بررسی معنادار بودن داده‌های هر تیمار در مقایسه با کنترل از آزمون تی در سطح معناداری  $P < 0.05$  استفاده شد.



### جندي شاپور

تصویر ۱. نمودار ستونی تیمار سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف کوئرستین در مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. در نمودار مذکور توان حیاتی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف کوئرستین نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت ۲۲۰ میکرو مولار توان حیاتی سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت به میزان ۵۰ درصد کاهش یافته است. این غلظت برابر با  $\text{IC}_{50}$  کوئرستین در تیمار ۴۸ ساعته است.

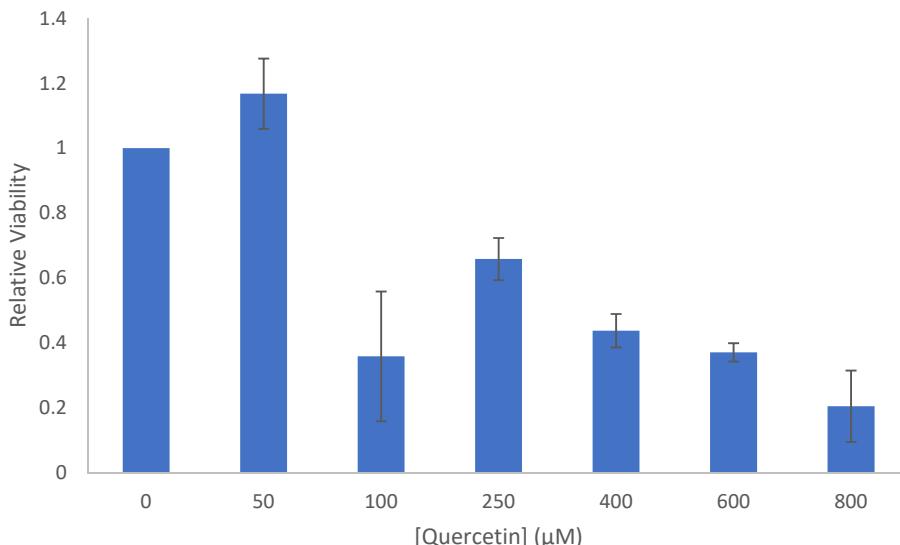
### نتایج پهلو دست‌آمده از روش Real time RT-PCR

نتایج حاصل از Real time RT-PCR نشان داد تیمار با siRNA سبب کاهش بیش از ۸۰ درصدی بیان dff45 و تیمار با NA کوئرستین نیز سبب کاهش بیان dff45 به میزان ۵۰ درصد در سلول‌ها شده است. در تیمار همزمان (NA+siRNA)، حضور کوئرستین اثر قابل توجهی در کاهش سطح بیان dff45 در زمان تیمار با siRNA نداشته است (تصویر شماره ۴).

میزان بیان زن‌های مسیر آپوپتوز در تیمارهای مختلف به منظور بررسی دخالت این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها

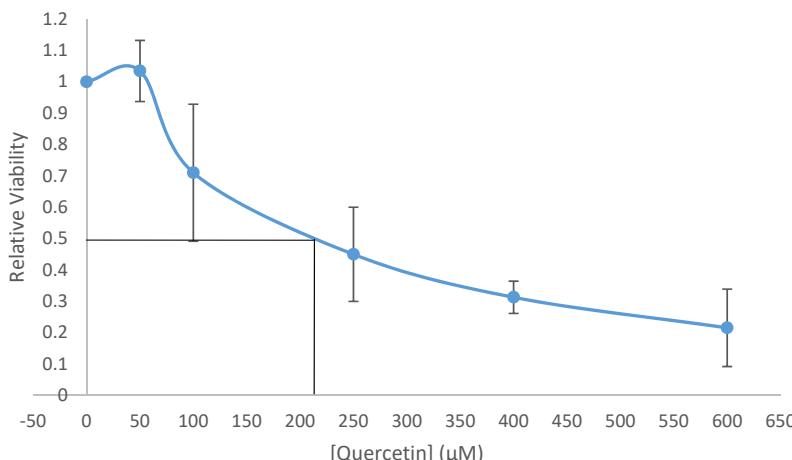
پس از به دست آوردن غلظت مؤثر دارو جهت کاهش درصدی در توان حیاتی سلول‌ها، سلول‌ها تحت تیمارهای siRNA، کوئرستین و (NA+siRNA+کوئرستین) قرار گرفتند. آزمون MTT جهت سنجش توان حیاتی سلول‌ها انجام شد (تصویر شماره ۵).

توان حیاتی در سلول‌های تیمارشده با siRNA به میزان ۳۰ درصد کاهش یافت و تیمار با کوئرستین سبب کاهش ۵۵ درصدی توان حیاتی شد. همچنین تیمار همزمان (NA+siRNA+کوئرستین) سبب کاهش ۶۵ درصدی توان حیاتی سلول‌ها شد که نشان‌دهنده افزایش اثر کشنندگی کوئرستین در زمان کاهش بیان dff45 است.



### جندي شاپور

تصویر ۲. نمودار ستونی تیمار سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف کوئرستین در مدت زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت

تصویر ۳. نمایش نمودار خطی  $LC_{50}$  کوئرستین در زمان ۴۸ ساعت

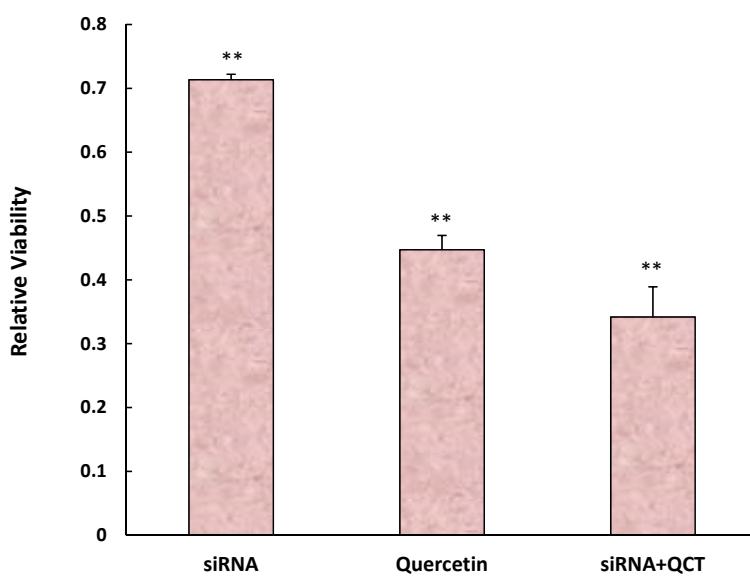
مجله علمی پزشکی  
جندی شاپور

عدم فعال شدن مسیر اتوفازی در تیمار با siRNA نشان می‌دهد که این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها در خیل نبوده است (تصویر شماره ۴). تیمار با کوئرستین سبب افزایش بیان چشمگیر  $IC3$  و همچنین افزایش بیان  $beclin$  شده است، در حالی که اثر معناداری بر بیان  $aif5$  و  $dram$  نداشته است.

در تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین)، حضور siRNA سبب تشدید اثر کوئرستین بر افزایش بیان  $IC3$  می‌شود، در حالی که کاهش بیشتری را در بیان  $aif5$  و  $dram$  باعث شده است. با توجه به افزایش بیان  $IC3$  در تیمار کوئرستین و تیمار همزمان

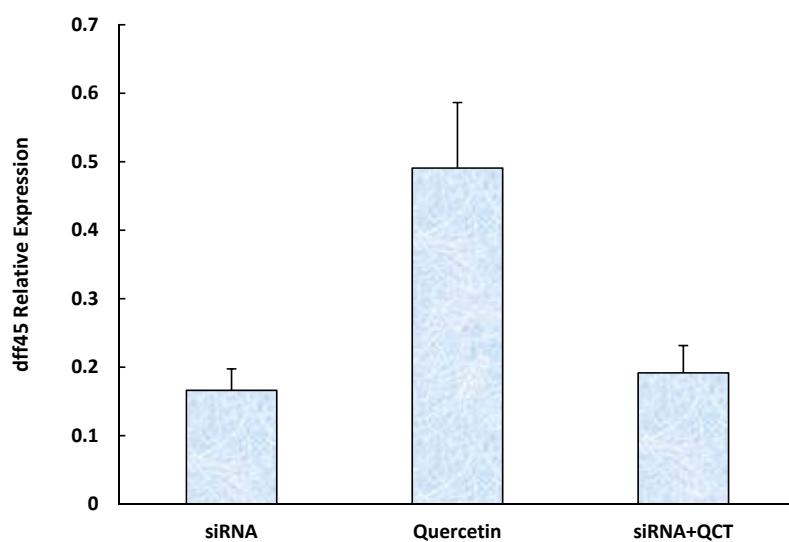
در تیمارهای مختلف بررسی شد و نتایج آن در تصویر شماره ۶ مشاهده می‌شود. تیمار سلول‌ها با siRNA سبب کاهش در سطح بیان ژن‌های  $2$ ,  $bcl$ ,  $p53$ ,  $bax$  و  $caspase-3$  نسبت به کنترل شد، اما تغییر معناداری در سطح بیان ژن  $aif$  ملاحظه نشد.

میزان بیان ژن‌های مسیر اتوفازی به منظور بررسی دخالت این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها در تیمارهای مختلف بررسی شد که به طور مجمع در تصویر شماره ۷ مشاهده می‌شود. تیمار با siRNA سبب کاهش بیان ژن‌های  $beclin$ ,  $aif5$ ,  $dram$  و  $IC3$  نداشته است. در حالی که اثر معناداری بر بیان  $IC3$  نداشته است.



مجله علمی پزشکی  
جندی شاپور

تصویر ۴. نمودار ستونی تغییر توان حیاتی سلول‌ها در حضور تیمارهای siRNA, کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین). تیمار سلول‌های کشت شده به وسیله siRNA سبب کاهش توان حیاتی سلول‌ها به میزان ۳۰ درصد شد. تیمار به وسیله کوئرستین توان حیاتی سلول‌ها را ۵۵ درصد کاهش می‌دهد و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین) سبب کاهش ۶۵ درصدی توان حیاتی سلول‌ها شد. نماد \* نشان‌دهنده معنادار بودن تیمارها نسبت به کنترل است. بررسی‌های آماری نشان دادند اختلاف داده‌های تیمار siRNA نسبت به تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین) و اختلاف داده‌های تیمار کوئرستین نسبت به siRNA در سطح آماری  $P<0.01$  و اختلاف داده‌های تیمار کوئرستین نسبت به تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین) در سطح آماری  $P<0.05$  معنادار است.

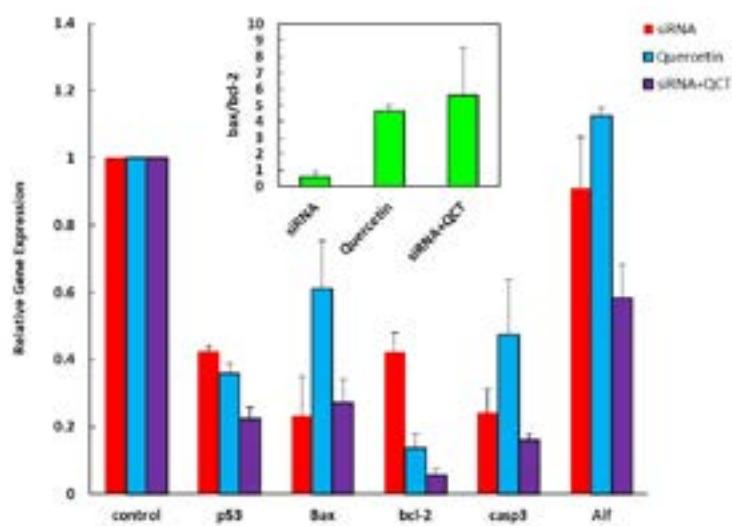

**جندي شاپور**

تصویر ۵. نمودار ستونی اثرات تیمار siRNA-DFF45 بر بیان ژن dff45 در سلول‌های تیمارشده با siRNA، کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA+کوئرستین). تیمار siRNA سبب کاهش بیش از ۸۰ درصدی بیان dff45 و تیمار دارویی ۵۰ درصد از بیان dff45 را کاهش داد. در تیمار همزمان siRNA+کوئرستین، کوئرستین سبب کاهش اندک توان خاموش‌سازی siRNA شد.

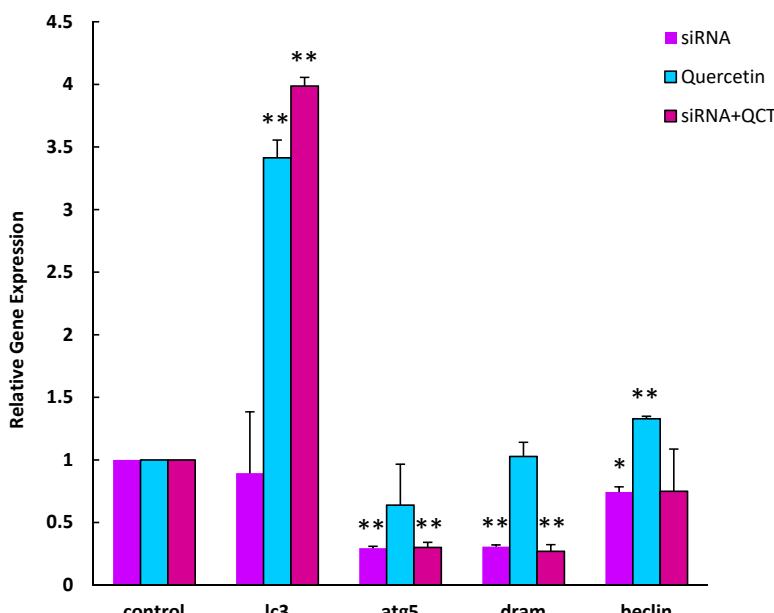
**بحث**

در این مطالعه بهمنظور القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی-7، MCF-7، از siRNA-DFF45، با داروی کوئرستین بیان ژن dff45 همزمان با داروی کوئرستین استفاده شد. توالی‌های siRNA طراحی شده، به بخش کدکننده mRNA متصل می‌شود بهنحوی که نوکلئوتیدهای ۳۳۱ تا ۳۵۳ mRNA ژن dff45 را در ناحیه کدکننده پوشش می‌دهد [۱۱]. اکثر داروهای ضدسرطان از طریق القای آپوپتوز موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شوند، اما همواره مرگ سلولی القاشده توسط داروها

(کوئرستین+siRNA) فعال شدن مسیر اتوفازی سبب کاهش ۵۵ درصدی و ۶۵ درصدی توان حیاتی سلول‌ها در ۲ تیمار ذکر شده است (تصویر شماره ۴). کاهش و یا عدم تغییر معنادار بیان atg5، dram، beclin و کانونیکال منتفی می‌کند. بنابراین اتوفازی احتمالاً از مسیرهای غیرمعمول راهاندازی شده است که در بخش بحث مورد بررسی قرار خواهد گرفت. میزان بیان ژن‌های مسیر akt/mTOR در تیمارهای مختلف بررسی شد که نتایج آن به طور کلی در تصویر شماره ۸ مشاهده می‌شود.


**جندي شاپور**

تصویر ۶. نمودار ستونی تغییر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز در حضور تیمارهای siRNA، کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA+کوئرستین). در تیمار siRNA ژن‌های gp53، bax، bcl-2، caspase-3 کاهش یافت. در تیمار با کوئرستین نیز کاهش بیان ژن‌های bcl-2، caspase-3 و aif مشاهده شد. در تیمار همزمان (siRNA+کوئرستین) کاهش بیشتر در ژن‌های caspase-3، bcl-2، caspase-3، aif و p53 دیده شد.



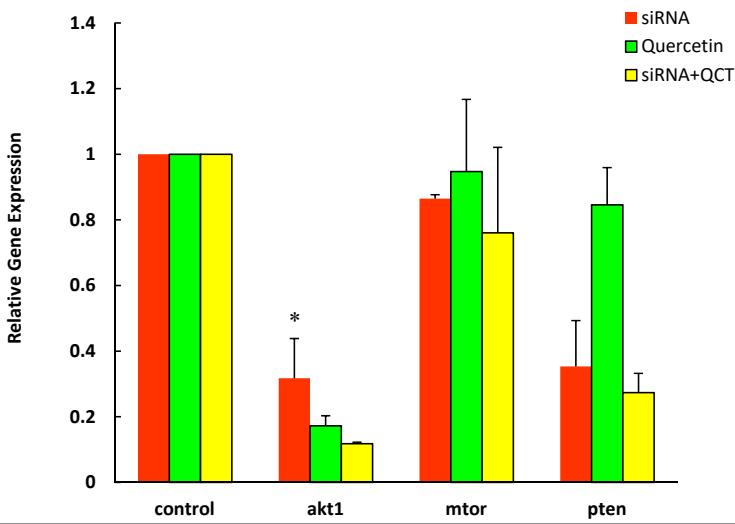
مجله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۷. نمودار ستونی تغییر بیان ژن‌های مسیر اتوفازی در حضور تیمارهای siRNA، کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین). در تیمار siRNA کاهش بیان ژن‌های atg5، dram و beclin مشاهده شد. افزایش قابل توجه بیان lc3 در تیمار کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین) نشان‌دهنده به راه افتادن مسیر اتوفازی است. نماد \* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف با نمونه کنترل در سطح آماری  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  است.

عدم افزایش معنادار در ژن aif نیز وقوع آپوپتوز غیروابسته به کاسپاز را منتفی می‌کند [۳۰]. کاهش بیان akt1 که مهم‌ترین عامل کینازی در حفظ بقای سلولی است با توقف مسیرهای رشد و بقای سلول، می‌تواند دلیل کاهش قدرت بقای سلولی، علی‌رغم کاهش mTOR در تیمار با siRNA باشد (تصویر شماره ۸) [۳۱] و این مطلب می‌تواند بیانگر دلیل کاهش ۳۰ درصدی توان حیاتی سلول‌ها در تیمار با siRNA-DFF45 باشد (تصویر شماره ۹).

از مسیر آپوپتوز سبب مرگ سلولی نمی‌شوند که در این پژوهش نیز مورد تأیید قرار گرفته است [۲۸].

باتوجه به تصویر شماره ۶ در زمان تیمار سلول‌ها با- p53 و کاهش بیان DFF45، میزان بیان ژن‌های bax، caspase-3 و bcl-2 مشاهده شد. کاهش بیان p53 در بیان caspase-3 مشاهده شده در بیان caspase-3 نیز تأیید کننده آن است [۲۹].



مجله علمی پژوهشی  
جندي شاپور

تصویر ۸. نمودار ستونی تغییر بیان ژن‌های مسیر بقا AKT/mTOR در حضور تیمارهای siRNA، کوئرستین و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین). کاهش بیان akt1 در هر ۳ تیمار دیده می‌شود. همچنین کاهش بیان mTOR در تیمار siRNA و کاهش بیان pten در تیمار siRNA و تیمار همزمان (siRNA + کوئرستین) مشاهده می‌شود. نماد \* به ترتیب نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف با نمونه کنترل در سطح آماری  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  است.

IC3 و همچنین افزایش beclin مشاهده شد که نشان دهنده راماندازی مسیر اتوفاژی است (تصویر شماره ۷).

در تیمار کوئرستین کاهش بیان akt1 علیرغم کاهش بیان pten و mTOR با کاستن از توان حیاتی سلول‌ها، اتوفاژی را به سمت مرگ پیش می‌برد (تصویر شماره ۸) [۴۰]. بنابراین در تیمار مستقل کوئرستین افزایش مشاهده شده در بیان aif همزمان با اتوفاژی سبب القای مرگ سلولی می‌شود که بیانگر علت کاهش درصدی توان حیاتی سلول‌هاست (تصویر شماره ۹).

در تیمار سلول‌ها با کوئرستین کاهش مشاهده شده در بیان ژن‌های p53، bcl-2 و caspase-3 از تیمارهای مستقل siRNA و کوئرستین به مراتب بیشتر است که نشان دهنده اثرات هم‌افزاژی مرتبط با حضور siRNA است و باعث افزایش سازوکار مرگ سلولی القا شده توسط کوئرستین است. از آنجاکه گزارش‌های متعددی در رابطه با مهار آپوپتوز توسط اتوفاژی موجود است [۴۱، ۴۲، ۴۳]، بنابراین اتوفاژی مناسب‌ترین انتخاب برای توجیه علت بروز مرگ در تیمارهای کوئرستین و siRNA+siRNA است. کاهش بیان aif نیز وقوع آپوپتوز غیروابسته به کاسپاز را منتفي می‌کند (تصویر شماره ۶).

باتوجه به تصویر شماره ۷ در تیمار همزمان (siRNA+کوئرستین)، حضور siRNA سبب تشدید اثر کوئرستین بر افزایش بیان IC3 می‌شود. این یافته نمایانگر تمایل سلول‌ها به انجام اتوفاژی است، اما کاهش بیان مشاهده شده در atg5 و dram و عدم تغییر معنادار beclin نشان می‌دهد اتوفاژی به راه افتاده در این تیمارها می‌باشد از مسیرهای غیرمعمول روی داده باشد. این موضوع در بی کاهش بیان p53 و کاهش سطح سیتوپلاسمی آن در جهت تقویت اثرات هسته‌ای و روشن شدن ژن‌های اتوفاژی نیز تأیید می‌شود [۴۳].

آزمون MTT روشی بر مبنای میزان تولید NADH در مسیر تنفسی میتوکندریایی است. بنابراین تیمارهایی که مسیرهای تنفسی میتوکندری را تحت تأثیر قرار می‌دهد می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده برای نتایج به دست آمده باشد. در این مطالعه از روش‌های پیشنهادشده در مطالعات گذشته استفاده شده است تا این تداخل اثر به کمترین میزان تقلیل یابد [۴۴، ۴۵].

### نتیجه‌گیری

یکی از ویژگی‌های اصلی سرطان، مقاومت به آپوپتوز بهدلیل جهش در ژن‌های پروآپوپوتیک و آنتی‌آپوپوتیک و تغییر بیان آن‌هاست. همچنین اغلب درمان‌ها در سرطان از طریق فعل کردن مسیر آپوپتوز اثر کشندگی خود را نشان می‌دهند. درنتیجه دخالت در این مسیر می‌تواند به درمان سرطان کمک کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تیمار دارویی رده سلولی MCF-7 با کوئرستین، همزمان با کاهش بیان زن dff45 به کمک siRNA-

در تیمار مستقل کوئرستین، کاهش بیشتر سطح بیان ژن‌های bcl-2 و p53 نسبت به تیمار DFF45 مشاهده شد (تصویر شماره ۶). در تیمار کوئرستین کاهش بیش از حد bcl-2 سبب شده است که علی‌رغم ثبات مشاهده شده در bax، نسبت bax/bcl-2 افزایش معناداری را در قیاس با تیمار siRNA نشان دهد. افزایش این نسبت برخلاف معمول نمی‌تواند نشان دهنده تمایل سلول‌ها نسبت به انجام آپوپتوز باشد، زیرا سطح بیان caspase-3 و p53 برخلاف مسیر آپوپتوز کاهش یافت. کاهش مشاهده شده در سطح بیان p53 می‌تواند اثر مستقیم خود را در خروج آن از هسته و بروز آپوپتوز میتوکندریایی داشته باشد [۳۲]. در مطالعات گذشته، تأثیر کوئرستین بر تحریک مسیر اتوفاژی در سرطان تحمدان بررسی شده است [۳۳]. نتایج این مطالعات نشان داده است که کوئرستین می‌تواند بواسطه p-STAT3/Bcl-2 موجب فعال‌سازی مسیر اتوفاژی شود. همچنین کاهش شکل هسته‌ای p53 می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های آپوپتوزی از جمله caspase-3 همراه شود. کاهش بیان p53 معمولاً با افزایش بیان bcl-2 همراه است، زیرا p53 از بیان bcl-2 جلوگیری می‌کند [۳۴]. در این مطالعه نتایج حاصل از اتوفاژی مورد تأیید قرار گرفته است. بنابراین کاهش بیان bcl-2 که به طور چشمگیری در تیمارهای کوئرستین و (siRNA+کوئرستین) مشاهده شد را می‌توان بواسطه راماندازی مسیر اتوفاژی تفسیر کرد [۳۵].

علاوه بر نقش Bcl-2 در مهار آپوپتوز، Bcl-2 به عنوان یک پروتئین کنترلی مهم در فرایند اتوفاژی شناخته شده است [۳۶]. بیان بیش از حد پروتئونکوزن در bcl-2 در درصد از سرطان‌های پستان دیده می‌شود و سبب مقاومت سلول‌های سرطانی به درمان می‌شود [۳۵]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که خاموش کردن ژن Bcl-2 بهوسیله siRNA در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان سبب القای atg5 و IC3 و Beclin-1 می‌شود که از جمله پروتئین‌های پیش‌برنده اتوفاژی در مسیر کانونیکال هستند [۳۷]. Bcl-2 با اتصال به Beclin-1 سبب مهار اتوفاژی می‌شود. فسفریله شدن Bcl-2 بهوسیله JNK در پاسخ به تشکیل سلولی باعث جدایی Bcl-2 و Beclin-1 شده و اتوفاژی به راه می‌افتد [۳۸]. بنابراین کاهش چشمگیر میزان Bcl-2 در تیمارهای کوئرستین و siRNA+کوئرستین می‌تواند سبب کاهش اثر مهاری Bcl-2 بر Beclin-1 و فعل کردن مسیر اتوفاژی شود. بنابراین می‌توان گفت سازوکار مرگ سلولی اعمال شده توسط کوئرستین، راماندازی مسیرهایی به غیر از آپوپتوز وابسته به کاسپاز است. افزایش مشاهده شده در سطح بیان aif در تیمار کوئرستین نسبت به نمونه کنترل، می‌تواند نمایانگر به راه افتادن مسیر آپوپتوز غیروابسته به کاسپاز باشد (تصویر شماره ۶) [۳۹]. یک فلاووپروتئین با فعالیت اکسیدور دوکتازی است که در شرایط القای مرگ سلولی، با اتصال به DNA و فعل کردن نوکلئازهای دیگر سبب پیش بردن متراکم شدن کروماتین و شکست DNA می‌شود. به علاوه در زمان تیمار مستقل کوئرستین افزایش چشمگیر بیان

DFF45 سبب القای مرگ سلولی می‌شود. بنابراین با توجه به نتایج مذکور می‌توان گفت تیمار همزمان siRNA-DFF45 و کوئرستین سبب افزایش اثر کشنده‌گی کوئرستین به میزان ۱۰ درصد می‌شود که سازوکار اصلی در این همافرازی از طریق اتوفازی مرگ اعمال می‌شود. کوئرستین که یک آنتی‌اکسیدان طبیعی یافته شده در گیاهان مختلف است، دارای خواص ضدسرطانی ثابت شده‌ای است و می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از سرطان پستان داشته باشد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق با رعایت بالاترین استانداردهای اخلاقی انجام شده است. داده‌های ارائه شده در این نسخه خطی تا جایی که می‌دانیم دقیق و معتبر هستند.

#### حامی مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

#### مشارکت‌نویسندها

مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، نرم‌افزار: سید جلال زرگر و شاهرخ صفریان؛ مدیریت داده‌ها و نظارت: سید جلال زرگر؛ نگارش، تهیه پیش‌نویس اصلی و تحقیق: تکتم سادات کلینی؛ نوشتمن، بررسی و ویرایش: مصطفی صابریان؛ خوانش و تأیید نسخه نهایی: همه نویسندها.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندها، این مقاله تعارض منافع ندارد.

## References

- [1] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: A review. *JAMA*. 2019; 321(3):288-300. [\[DOI:10.1001/jama.2018.19323\]](https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323) [PMID]
- [2] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: An epidemiological review. *Breast J*. 2007; 13(4):383-91. [\[DOI:10.1111/j.1524-4741.2007.00446.x\]](https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2007.00446.x) [PMID]
- [3] Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005; 9(1):208-21. [\[DOI:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x\]](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x) [PMID] [PMCID]
- [4] Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*. 2005; 94(6):1078-87. [\[DOI:10.1002/jcb.20409\]](https://doi.org/10.1002/jcb.20409) [PMID]
- [5] Green DR. Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. 2000; 102(1):1-4. [\[DOI:10.1016/0092-8674\(89\)90975-6\]](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90975-6) [PMID]
- [6] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001; 15(22):2922-33. [\[PMID\]](#)
- [7] Gu J, Dong RP, Zhang C, McLaughlin DF, Wu MX, Schlossman SF. Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *J Biol Chem*. 1999; 274(30):20759-62. [\[DOI:10.1074/jbc.274.30.20759\]](https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20759) [PMID]
- [8] Yang HW, Chen YZ, Piao HY, Takita J, Soeda E, Hayashi Y. DNA fragmentation factor 45 (DFF45) gene at 1p36.2 is homozygously deleted and encodes variant transcripts in neuroblastoma cell line. *Neoplasia*. 2001; 3(2):165-9. [\[DOI:10.1038/sj.neo.7900141\]](https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900141) [PMID] [PMCID]
- [9] Masuoka J, Shiraishi T, Ichinose M, Mineta T, Tabuchi K. Expression of ICAD-L and ICAD-S in human brain tumor and its cleavage upon activation of apoptosis by anti-Fas antibody. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92(7):806-12. [\[DOI:10.1111/j.1349-7006.2001.tb01165.x\]](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01165.x) [PMID] [PMCID]
- [10] Charrier L, Jarry A, Toquet C, Bou-Hanna C, Chedorge M, Denis M, et al. Growth phase-dependent expression of ICAD-L/DFF45 modulates the pattern of apoptosis in human colonic cancer cells. *Cancer Res*. 2002; 62(7):2169-74. [\[PMID\]](#)
- [11] Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB, Sheibani N. siRNA-mediated knock-down of DFF45 amplifies doxorubicin therapeutic effects in breast cancer cells. *Cell Oncol*. 2013; 36(6):515-26. [\[DOI:10.1007/s13402-013-0157-1\]](https://doi.org/10.1007/s13402-013-0157-1) [PMID]
- [12] Zhang J, Guo H, Qian G, Ge S, Ji H, Hu X, et al. MiR-145, a new regulator of the DNA fragmentation factor-45 (DFF45)-mediated apoptotic network. *Mol Cancer*. 2010; 9:211. [\[DOI:10.1186/1476-4598-9-211\]](https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-211) [PMID] [PMCID]
- [13] Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008; 4(4):510-2. [\[DOI:10.4161/auto.5724\]](https://doi.org/10.4161/auto.5724) [PMID]
- [14] Castillo MH, Perkins E, Campbell JH, Doerr R, Hassett JM, Kandaswami C, Middleton E Jr. The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *Am J Surg*. 1989; 158(4):351-5. [\[DOI:10.1016/0002-9610\(89\)90132-3\]](https://doi.org/10.1016/0002-9610(89)90132-3) [PMID]
- [15] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(15):1475-85. [\[DOI:10.1056/NEJMra0804615\]](https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615) [PMID]
- [16] Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996; 313(1):17-29. [\[DOI:10.1042/bj3130017\]](https://doi.org/10.1042/bj3130017) [PMID] [PMCID]
- [17] Baghel SS, Srivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharm Sci*. 2012; 1(1):146-60. [\[Link\]](#)
- [18] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(10):850-62. [\[DOI:10.1016/j.addr.2009.04.018\]](https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.018) [PMID]
- [19] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2005; 65(3):967-71. [\[DOI:10.1158/0008-5472.967.65.3\]](https://doi.org/10.1158/0008-5472.967.65.3) [PMID] [PMCID]
- [20] Srivastava N, Srivastava A. RNA interference: An emerging generation of biologicals. *Biotechnol J*. 2008; 3(3):339-53. [\[DOI:10.1002/biot.200700215\]](https://doi.org/10.1002/biot.200700215) [PMID] [PMCID]
- [21] Charmforoshan E, Karimi E, Oskoueian E, Es-Haghi A, Iranshahi M. Inhibition of human breast cancer cells (MCF-7 cell line) growth via cell proliferation, migration, and angiogenesis by auraptene of Ferula szowitsiana root extract. *J Food Meas Charact*. 2019; 13:2644-53. [\[DOI:10.1007/s11694-019-00185-6\]](https://doi.org/10.1007/s11694-019-00185-6)
- [22] Gurney H. How to calculate the dose of chemotherapy. *Br J Cancer*. 2002; 86(8):1297-302. [\[DOI:10.1038/sj.bjc.6600139\]](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600139) [PMID] [PMCID]
- [23] Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*. 2012; 5(6):1453-6. [\[DOI:10.3892/mmr.2012.845\]](https://doi.org/10.3892/mmr.2012.845)
- [24] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63. [\[DOI:10.1016/0022-1759\(83\)90303-4\]](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) [PMID]
- [25] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. [\[Link\]](#)
- [26] Levinson N, Hinman R, Patil A, Stephenson CR, Werner S, Woo GH, et al. Use of transcriptional synergy to augment sensitivity of a splicing reporter assay. *RNA*. 2006; 12(5):925-30. [\[DOI:10.1261/rna.8306\]](https://doi.org/10.1261/rna.8306) [PMID] [PMCID]
- [27] Samli H, Samli M, Vatansever B, Ardicli S, Aztopal N, Dincel D, et al. Paclitaxel resistance and the role of miRNAs in prostate cancer cell lines. *World J Urol*. 2019; 37(6):1117-26. [\[DOI:10.1007/s00345-018-2501-6\]](https://doi.org/10.1007/s00345-018-2501-6) [PMID]
- [28] Kiani F, Rasouli N, Kashkoolinejad T, Safarian S, Zargar SJ, Sheibani N. Methotrexate induced cell death mechanisms in MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells: Enhanced cytotoxicity following dff45-siRNA pre-treatment. *Synergy*. 2018; 7:10-6. [\[DOI:10.1016/j.synres.2018.08.002\]](https://doi.org/10.1016/j.synres.2018.08.002)

- [29] Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006; 13(6):994-1002. [\[DOI:10.1038/sj.cdd.4401908\]](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401908) [\[PMID\]](#)
- [30] Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 2004; 23(16):2785-96. [\[DOI:10.1038/sj.onc.1207517\]](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207517) [\[PMID\]](#)
- [31] Simioni C, Martelli AM, Cani A, Cetin-Atalay R, McCubrey JA, Capitani S, et al. The AKT inhibitor MK-2206 is cytotoxic in hepatocarcinoma cells displaying hyperphosphorylated AKT-1 and synergizes with conventional chemotherapy. *Oncotarget.* 2013; 4(9):1496-506. [\[DOI:10.18632/oncotarget.1236\]](https://doi.org/10.18632/oncotarget.1236) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [32] Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993; 74(6):957-67. [\[DOI:10.1016/0092-8674\(93\)90719-7\]](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90719-7) [\[PMID\]](#)
- [33] Liu Y, Gong W, Yang ZY, Zhou XS, Gong C, Zhang TR, et al. Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer. *Apoptosis.* 2017; 22(4):544-57. [\[DOI:10.1007/s10495-016-1334-2\]](https://doi.org/10.1007/s10495-016-1334-2) [\[PMID\]](#)
- [34] Roy AM, Baliga MS, Elmets CA, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Neoplasia.* 2005; 7(1):24-36. [\[DOI:10.1593/neo.04412\]](https://doi.org/10.1593/neo.04412) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [35] He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature.* 2012; 481(7382):511-5. [\[DOI:10.1038/nature10758\]](https://doi.org/10.1038/nature10758) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [36] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008; 4(5):600-6. [\[DOI:10.4161/auto.6260\]](https://doi.org/10.4161/auto.6260) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [37] Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Deloméne C, Nicolas V, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene.* 2013; 32(18):2261-72. [\[DOI:10.1038/onc.2012.252\]](https://doi.org/10.1038/onc.2012.252) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [38] Decuypere JP, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells.* 2012; 1(3):284-312. [\[DOI:10.3390/cells1030284\]](https://doi.org/10.3390/cells1030284) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [39] Rasouli N. Study of cellular effects of quercetin for non-canonical autophagy induction in dff45 knockdown breast cancer cells (MCF-7 Cell Line). *Multidiscip Cancer Investig.* 2017; 1(1). [\[DOI:10.21859/mci-supp-72\]](https://doi.org/10.21859/mci-supp-72)
- [40] Bruning A. Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013; 13(7):1025-31. [\[DOI:10.2174/18715206113139990114\]](https://doi.org/10.2174/18715206113139990114) [\[PMID\]](#)
- [41] Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? *Cancer Res.* 2006; 66(6):2885-8. [\[DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-4412\]](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4412) [\[PMID\]](#)
- [42] Ku B, Woo JS, Liang C, Lee KH, Hong HS, E X, et al. Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *Plos Pathog.* 2008; 4(2):e25. [\[DOI:10.1371/journal.ppat.0040025\]](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040025) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [43] Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: Variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 13(1):7-12. [\[DOI:10.1038/nrm3249\]](https://doi.org/10.1038/nrm3249) [\[PMID\]](#)
- [44] Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002; 68(5):445-8. [\[DOI:10.1055/s-2002-32073\]](https://doi.org/10.1055/s-2002-32073) [\[PMID\]](#)
- [45] Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *Plos One.* 2010; 5(4):e10202. [\[DOI:10.1371/journal.pone.0010202\]](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)

This Page Intentionally Left Blank