

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 Scientific Medical Journal*. 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, inhibition 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  $LC_{50}$ ). 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  $LC_{50}$  value for quercetin was determined 220  $\mu$ M. 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

Cancer 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 *BRCAl*, *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 ( $LC_{50}$ ), was determined. The results showed an  $LC_{50}$  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).

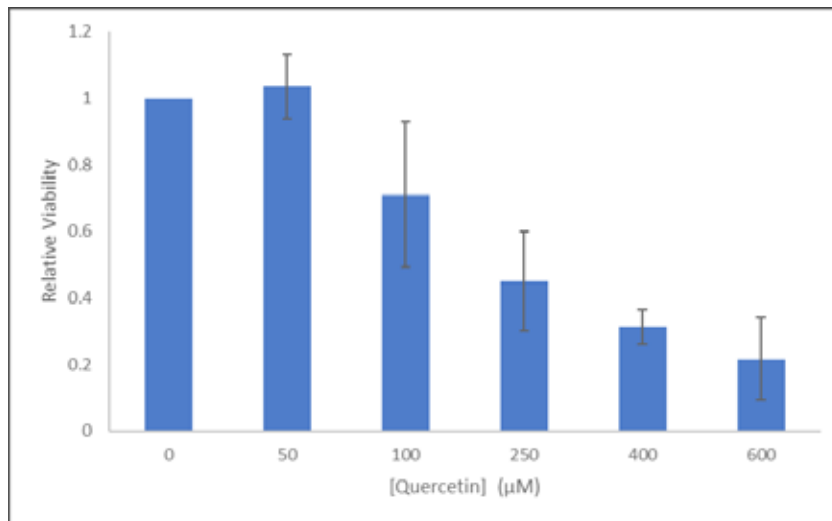


Figure 1. MCF-7 cell treatment in the presence of different concentrations of quercetin incubated for 48 hours

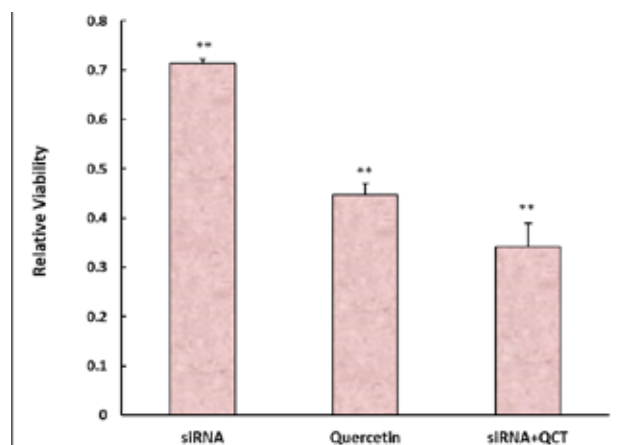


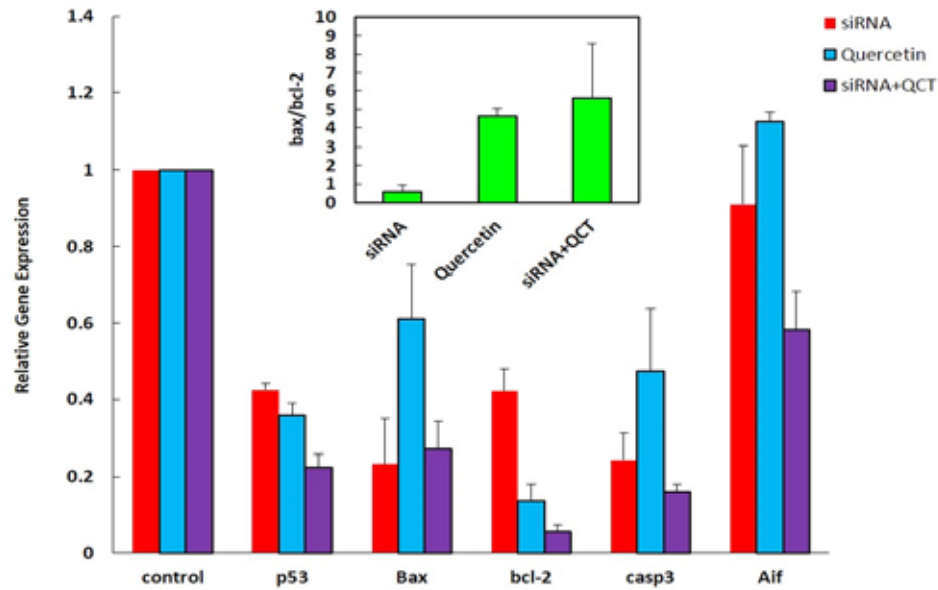
Figure 2. Changes in cell viability after treatment with siRNA, quercetin, and both (siRNA+quercetin)

\*\*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).

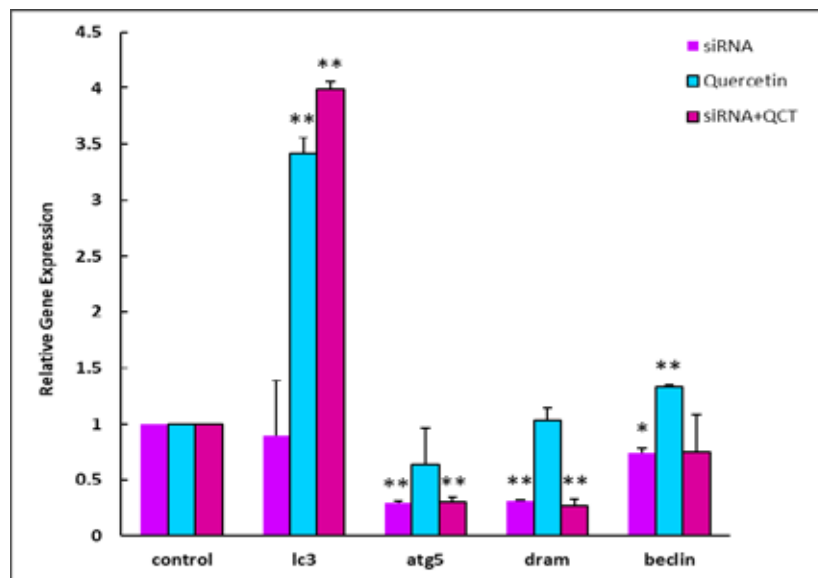
## Conclusion

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-



Jundishapur  
Scientific Medical Journal

**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  
Scientific Medical Journal

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

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.

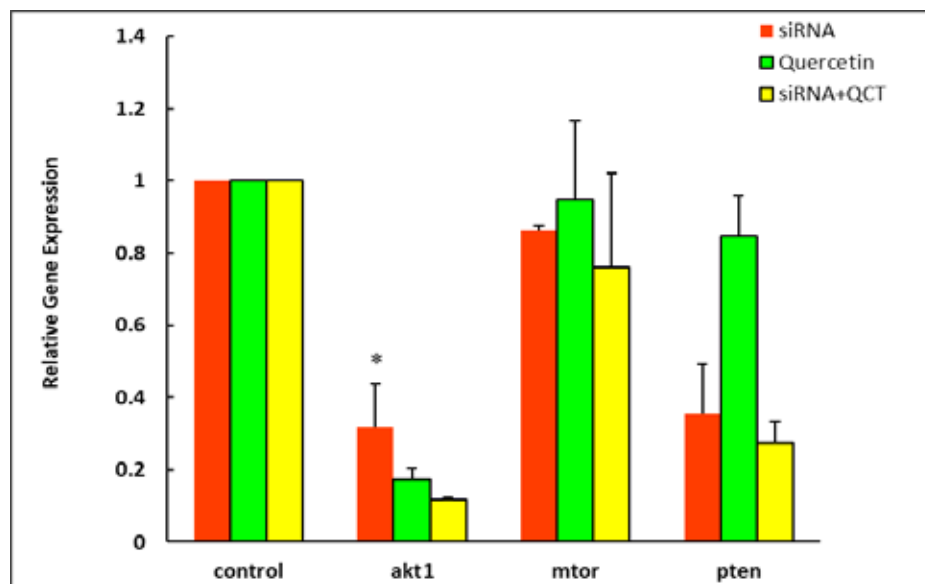
Based on these findings, it can be concluded that the simultaneous use of siRNA-DFF45 with quercetin enhances the cytotoxic effect of quercetin by 10%. Quercetin, as

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

### 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

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

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

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

Use your device to scan  
and read the article online

**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 Scientific Medical Journal*. 2023; 21(6):776-793. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.6.2435>

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

## چکیده



**زمینه و هدف** در سال‌های اخیر فلاونوئیدهایی مانند کوئرستین به‌عنوان 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 حساس‌تر کردن سلول‌های MCF-7 سرطان پستان نسبت به آپوپتوز به‌منظور فراهم آوردن شرایطی برای ظاهر شدن اثرات کشندگی کوئرستین، به‌عنوان داروی انتخابی در درمان سرطان پستان، در غلظت‌های کمتر بود تا از این طریق اثرات جانبی این دارو تا حد امکان کاسته شود.

**روش بررسی** 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, caspase3 و box)، اتوفازی (atg5, lc3, dram و beclin) همراه با ژن‌های محور بقای سلولی (akt1, mtor و pten) در سلول‌های تیمار شده با DFF45 siRNA، کوئرستین و کوئرستین+siRNA با روش Real Time RT-PCR بررسی شد.

**یافته‌ها** باتوجه به نتایج حاصل از آزمون  $IC_{50}$  و MTT داروی کوئرستین برابر با ۲۲۰ میکرومولار تعیین شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده به‌راه افتادن مسیرهای مرگ سلولی از طریق اتوفازی در سلول‌هاست. همچنین تیمار هم‌زمان (siRNA+کوئرستین) در مقایسه با تیمار کوئرستین سبب افزایش سازوکار مرگ القا شده در سلول‌ها می‌شود.

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

**کلیدواژه‌ها** سرطان پستان، کوئرستین، آپوپتوز، اتوفازی

تاریخ دریافت: ۲۹ تیر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۹ آبان ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۰۱ بهمن ۱۴۰۱

\* نویسنده مسئول:

دکتر سید جلال زرگر

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

تلفن: ۶۶۴۹۲۹۹۲ (۲۱) ۹۸+

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

## مقدمه

و گونه‌های فعال نیتروژن<sup>۲</sup> بازی می‌کنند [۱۶]. از مکانیسم‌های مولکولی عمل کوثرستین می‌توان به افزایش پروتئین p53 و توقف چرخه سلولی، تنظیم کاهشی پروتئین p53 جهش‌یافته، 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 به‌عنوان توالی خاموش‌کننده بیان ژن‌ها رشد قابل توجهی داشته است. توالی‌های siRNA دابلکس ۲ رشته‌ای RNA به طول ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتید است که ۲ تا ۳ نوکلئوتید آویخته متقارن در انتهای 3' OH و 5' 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]. به‌علاوه siRNA می‌تواند بیان گیرنده‌های تیروزین کیناز، ژن‌های ضدآپوپتوزی، ژن‌های بقای سلولی، عوامل رشد پیش‌برنده تومور یا ژن‌های 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 به‌عنوان یک استراتژی پیشگیرانه و درمانی جدید برای مدیریت سرطان به کار رود. هدف از این مطالعه حساس‌تر کردن سلول‌های سرطانی پستان نسبت به آپوپتوز به‌منظور فراهم آوردن شرایطی برای ظاهر شدن اثرات کشندگی کوثرستین، به‌عنوان 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>۲</sup> تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) حاوی L-glutamine و فاقد بی‌کربنات سدیم با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی<sup>۴</sup> (انستیتو پاستور ایران-FB ۵۰۰) همراه با ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. جمعیت سلول‌های MCF-7 معمولاً هر ۲۴ تا ۳۲ ساعت ۲ برابر می‌شود [۲۱].

## آماده‌سازی داروی کوثرستین و تیمار سلولی:

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

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 به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان و دومین عامل مرگ در زنان پس از سرطان ریه شناخته شده است [۲]. جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد سرطان پستان ارثی و جهش در ژن 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، اندومتريال، تخمدان 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. علاوه‌براین اتوفازی که یک فعالیت خودتخریبی است نقش مهمی در از بین بردن پروتئین‌هایی با تاخوردگی نابجا و تجمع یافته و حذف ارگانل‌های آسیب‌دیده و همچنین حذف پاتوزن‌های درون‌سلولی دارد. اتوفازی به‌عنوان یک مکانیسم بقای سلولی در نظر گرفته می‌شود که به صورت انتخابی و غیرانتخابی انجام می‌شود [۱۳]. در تخریب پروتئولیتیک اجزای سیتوزول ۳ نوع اتوفازی میکرو، ماکرو و CMA دخالت دارند [۱۳].

نقص در هریک از مسیرهای تخریبی منجر به تجمع مواد مضر در سلول و افزایش تجمعات سلولی می‌شود. از این‌رو استفاده از مواد ضدسرطانی به‌عنوان یک روش درمانی برای مقابله با تکثیر نابجای سلولی ضروری است. یکی از این قبیل مواد کوثرستین است. کوثرستین یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است که در گیاهان مختلف یافت می‌شود و خواص ضدسرطانی آن در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط طبیعی ثابت شده است. کوثرستین نقش مهمی در جلوگیری از سرطان‌های پستان، کلون، تخمدان، اندومتريوم و ریه دارد. کوثرستین به‌دلیل مهار رادیکال‌های آزاد و اتصال به یون‌های فلزی، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته می‌شود [۱۴]. آسیب‌های اکسیداتیو به DNA به‌عنوان یک عامل خطر برای سرطان شناخته شده است [۱۵].

آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند کوثرستین نقش مهمی در محافظت سلول در برابر آسیب‌های وارده به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup>

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

2. Reactive Nitrogen Species (RNS)

3. Iranian Biological Resource Center (IBRC)

4. FBS



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 به‌عنوان 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 محیط کشت حاوی MTT از هر چاهک تخلیه شد و به هریک از چاهک‌ها DMSO اضافه شد تا باعث محلول شدن و خروج بلورهای فورمازان از سلول‌ها شود. در نهایت پلیت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر بر پایه فرانس ۶۳۰ نانومتر بررسی شد.

#### ترانسفکت کردن سلول‌ها با siRNA-DFF45

۵×۱۰<sup>۵</sup> سلول در پلیت ۶ خانه‌ای با محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت محلول آماده‌شده siRNA-DFF45 با لیپوفکتامین 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].

#### استخراج RNA، سنتز cDNA

در این مطالعه استخراج RNA تام به‌وسیله کیت RNX plus Solution for total RNA isolation ساخت شرکت سینا ژن انجام شد که مراحل آن به‌طور خلاصه بیان می‌شود. ابتدا محلول RNX plus به سلول‌ها اضافه شد و سوسپانسیون یکنواخت شد. در مرحله بعد کلروفورم سرد اضافه شد. سپس سوسپانسیون به ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز روئی 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 روئی تخلیه شد و رسوب با اتانل سرد شست‌وشو شد. پس از سانتریفیوژ، آب تیمار شده با دی‌اتیل پیروکربنات<sup>۲</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].

به‌منظور ارزیابی کمی و کیفی RNA، جذب محلول با استفاده از نانودراپ (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 کریپتاز 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 RNAase H

شدند. کوئرستین با وزن مولکولی ۳۰۲/۲۴ گرم/مول تهیه شد [۲۲]. محلول دارویی با غلظت ۱۰<sup>۶</sup>×۰.۳۳۰۸۶۲ میکرومولار تهیه شد. برای تهیه ۶ غلظت ذکر شده، حجم مورد نیاز از محلول دارویی با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد:

$$1. \quad (\mu M) \quad 0.330862 \times 10^6 / \text{غلظت مورد نظر } (\mu M) \\ \times \text{حجم مورد نیاز از محیط کشت } (\mu l) = V$$

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 رنگ‌سنجی 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 میتوکندریایی در سلول‌های زنده به‌منظور احیا و تبدیل حلقه‌های نمک زرد رنگ تترازولیوم (MTT) به بلورهای نامحلول در آب و بنفش‌رنگ فورمازان است که قادر به عبور از غشا نیستند. به همین علت بلورهای فورمازان را با استفاده از حلال‌های آلی به فرم محلول درمی‌آورند و از سلول‌ها بیرون می‌کشند. در این آزمون معمولاً دی‌متیل سولفوکساید<sup>۵</sup> و گاهی سدیم دودسیل سولفات<sup>۶</sup> در اسید هیدروکلریک رقیق به‌عنوان حلال مورد استفاده قرار می‌گیرند.

جذب نوری محلول حاصل را می‌توان با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر با طول موج مینای ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری کرد. با توجه به اینکه واکنش احیای MTT تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد که دارای آنزیم دهیدروژناز فعال هستند، مقدار عددی به‌دست آمده توسط این روش به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده در ارتباط است. در این سنجش میزان فورمازان تولید شده توسط سلول‌های تیمار شده با یک عامل خاص را با میزان فورمازان تولید شده 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 به‌طور خلاصه ابتدا ۱۰<sup>۴</sup> سلول

7. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)

8. RevertAidTM M-MuLV (RT)

5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

6. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)



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

دنا تورا سیون اولیه ۱۵ ثانیه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سپس ۴۰ سیکل تکثیر به این شکل انجام شد: ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۴ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

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 پلیمرز اطمینان حاصل شود.

### یافته‌ها

به‌طور خلاصه، اثرات ضدسرطانی داروی کوئرستین در تیمار هم‌زمان کوئرستین و siRNA-DFF45 بر روی رده سلولی MCF-7 با تأکید بر مسیرهای بقای سلولی، آپوپتوز و اتوفاجی 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 ژن در رده سلولی MCF-7 استفاده شد. سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ترانسفکت شدند و پس از تیمار با کوئرستین، کاهش بیان در سطح mRNA با Real time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل به شرح ذیل است:

### آزمون رنگ‌سنجی MTT

در آزمون رنگ‌سنجی MTT به‌منظور بررسی توان حیاتی سلول‌ها و کاهش ۵۰ درصدی آن، تیمار سلول‌ها با کوئرستین با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار در ۲ زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT در تصاویر شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده است.

باتوجه 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). باتوجه به این منحنی میزان  $LC_{50}$ ، ۲۲۰ میکرومولار به دست آمد که در این پژوهش در تمام مراحل کاری مورد استفاده قرار گرفت.

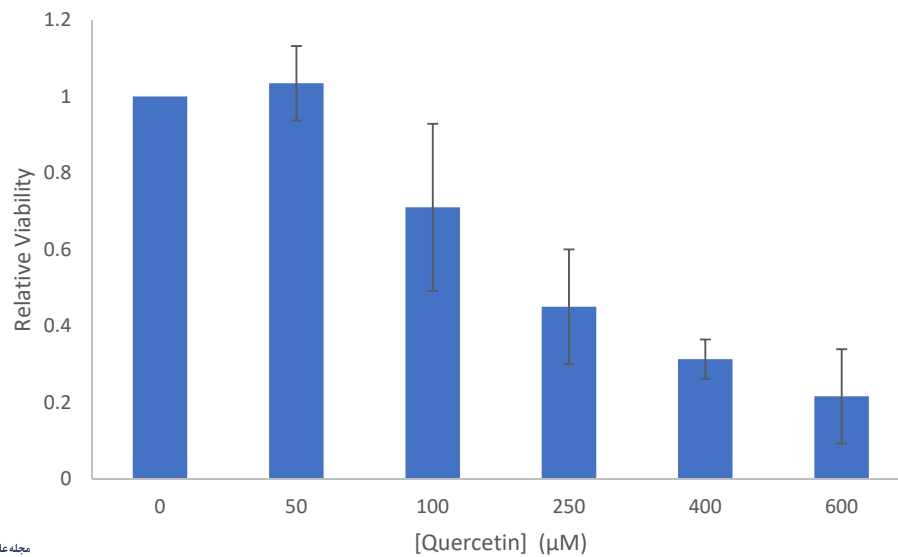
اختصاصی RNA، در هیبرید RNA-DNA است. این آنزیم قادر است به‌طور کارا تا یک cDNA تک‌رشته‌ای به طول ۱۳ کیلوبایت<sup>۱</sup> را سنتز کند. فعالیت بهینه آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد که در انواع مهندسی شده تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است. پرایمرهای رندوم هگزامر، ساخت cDNA را از تمام طول RNA و همچنین از روی RNAهای انتقالی و ریبوزومی انجام می‌دهند [۲۷].

به‌طور 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. آنکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باعث باز شدن ساختارهای دوم RNA و تسهیل اتصال پرایمرها شد. مواد مورد نیاز جهت سنتز شامل ۳/۵ میکرولیتر از Reaction Buffer (5X)، محلول ۵/۰ میکرولیتر از RiboLock RNase inhibitor، ۲ میکرولیتر از dNTP mix و ۱ میکرو لیتر از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLVtase به محلول واکنش اضافه شد و با رسیدن حجم محلول به ۲۰ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (برای فعال‌سازی آنزیم) و سپس ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد (برای سنتز cDNA) آنکوبه شد. سپس با حرارت دادن نمونه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (برای غیرفعال‌سازی آنزیم RT) به واکنش خاتمه داده شد. محصول در ویال‌های مختلف تقسیم و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### بررسی میزان بیان ژن‌های هدف

برای انجام Real Time RT-PCR از کیت SYBR premix Ex Taq TAKARA با شماره خرید RR420 و دستگاه Ap-plied Biosystems Real time PCR استفاده شد. بعد از سنتز cDNA، بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز (aif، caspase-3، bcl-2، p53، bcl-2، bax) و مسیر اتوفاجی (atg5، dram، lc3، beclin) و محور بقای سلولی (mtor و akt1، pten) همراه با بیان ژن dff45 در تیمارهای siRNA-DFF45، کوئرستین و تیمار هم‌زمان (siRNA+کوئرستین) انجام شد. واکنش Real time RT-PCR با حداقل ۲ تکرار برای هر ژن و با استفاده از ژن مرجع gapdh انجام شد و داده‌های Real time RT-PCR با کمک نرم‌افزار ABI STEP ONE به روش  $\Delta\Delta T_c$  تحلیل شد. عدد نهایی  $2^{-CT\Delta\Delta}$  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.

9. Kilobyte (kb)



### جندی 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  $LC_{50}$  کوئرستین در تیمار ۴۸ ساعته است.

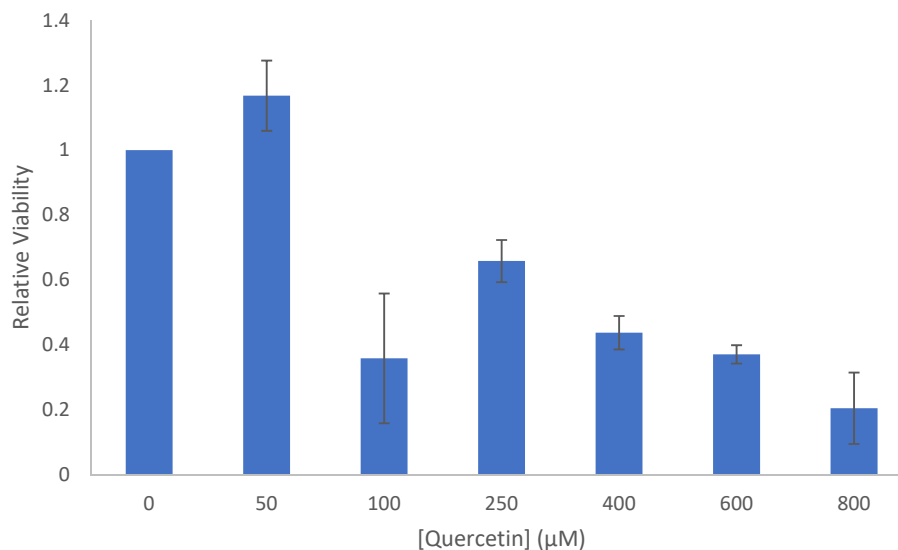
### نتایج به‌دست‌آمده از روش Real time RT-PCR

نتایج حاصل از Real time RT-PCR نشان داد تیمار با siR-NA سبب کاهش بیش از ۸۰ درصدی بیان dff45 و تیمار با کوئرستین نیز سبب کاهش بیان dff45 به میزان ۵۰ درصد در سلول‌ها شده است. در تیمار هم‌زمان (کوئرستین+siRNA)، حضور کوئرستین اثر قابل توجهی در کاهش سطح بیان dff45 در زمان تیمار با siRNA نداشته است (تصویر شماره ۵).

میزان بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز در تیمارهای مختلف به‌منظور بررسی دخالت این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها

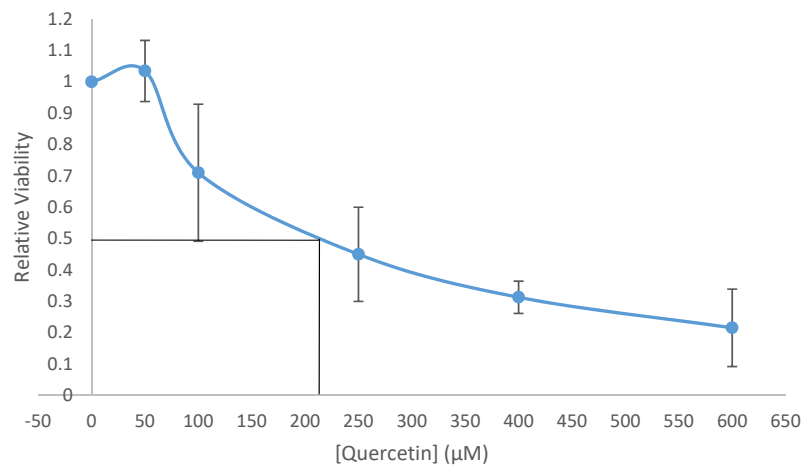
پس از به دست آوردن غلظت مؤثر دارو جهت کاهش ۵۰ درصدی در توان حیاتی سلول‌ها، سلول‌ها تحت تیمارهای siR-NA، کوئرستین و (کوئرستین+siRNA) قرار گرفتند. آزمون MTT جهت سنجش توان حیاتی سلول‌ها انجام شد (تصویر شماره ۴).

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



### جندی شاپور

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

تصویر ۳. نمایش نمودار خطی LC<sub>50</sub> کوئرستین در زمان ۴۸ ساعت

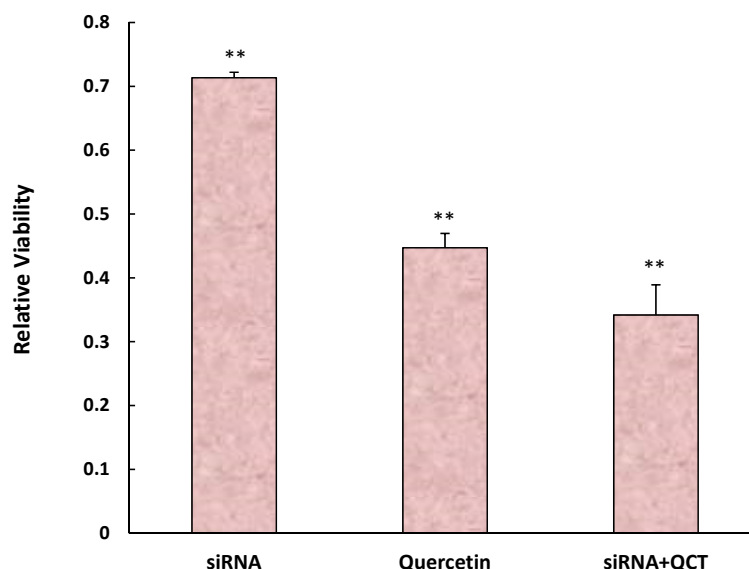
### جندی شاپور

عدم فعال شدن مسیر اتوفاژی در تیمار با siRNA نشان می‌دهد که این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها دخیل نبوده است (تصویر شماره ۴). تیمار با کوئرستین سبب افزایش بیان چشمگیر lc3 و همچنین افزایش بیان beclin شده است، درحالی‌که اثر معناداری بر بیان atg5 و dram نداشته است.

در تیمار هم‌زمان (siRNA + کوئرستین)، حضور siRNA سبب تشدید اثر کوئرستین بر افزایش بیان lc3 می‌شود، درحالی‌که کاهش بیشتری را در بیان atg5 و dram باعث شده است. باتوجه‌به افزایش بیان lc3 در تیمار کوئرستین و تیمار هم‌زمان

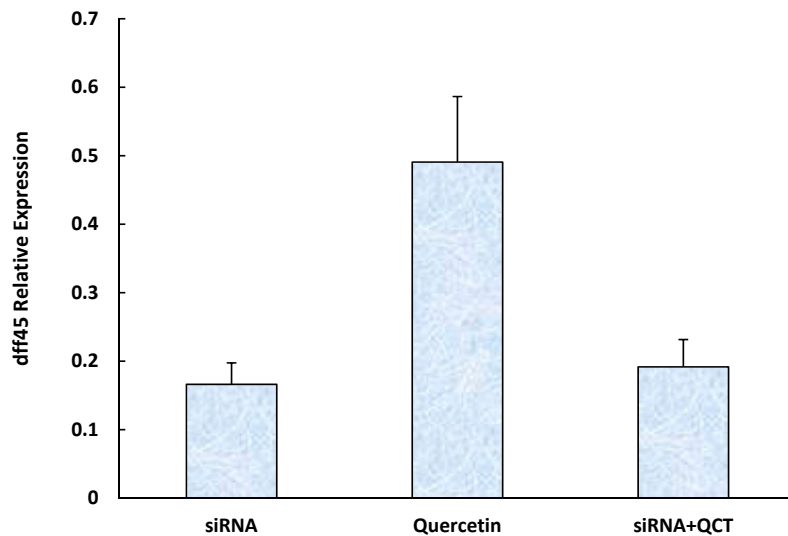
در تیمارهای مختلف بررسی شد و نتایج آن در تصویر شماره ۶ مشاهده می‌شود. تیمار سلول‌ها با siRNA سبب کاهش در سطح بیان ژن‌های bax، bcl-2، p53 و caspase-3 نسبت به کنترل شد، اما تغییر معناداری در سطح بیان ژن aif ملاحظه نشد.

میزان بیان ژن‌های مسیر اتوفاژی به‌منظور بررسی دخالت این مسیر در کاهش توان حیاتی سلول‌ها در تیمارهای مختلف بررسی شد که به‌طور مجتمعه در تصویر شماره ۷ مشاهده می‌شود. تیمار با siRNA سبب کاهش بیان ژن‌های atg5، dram و beclin شده است، درحالی‌که اثر معناداری بر بیان lc3 نداشته است.



### جندی شاپور

تصویر ۴. نمودار ستونی تغییر توان حیاتی سلول‌ها در حضور تیمارهای siRNA، کوئرستین و تیمار هم‌زمان (siRNA + کوئرستین). تیمار سلول‌های کشت‌شده به‌وسیله siRNA سبب کاهش توان حیاتی سلول‌ها به میزان ۳۰ درصد شد. تیمار به‌وسیله 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.



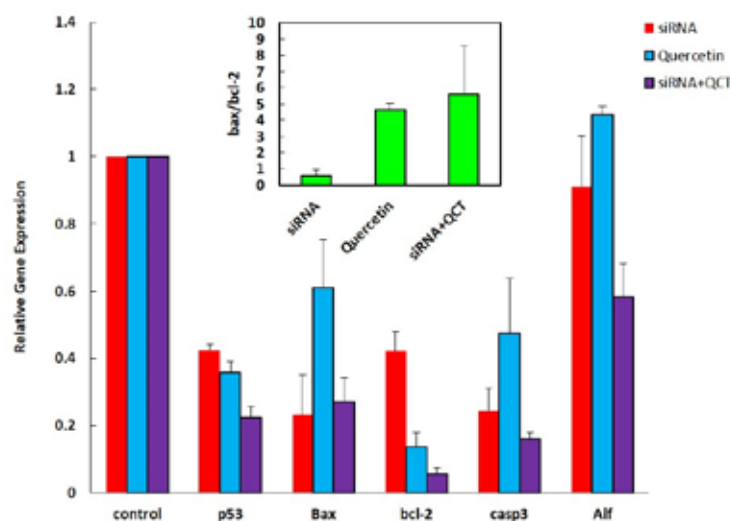
### جندی شاپور

تصویر ۵. نمودار ستونی اثرات تیمار siRNA-DFF45 بر بیان ژن dff45 در سلول‌های تیمار شده 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

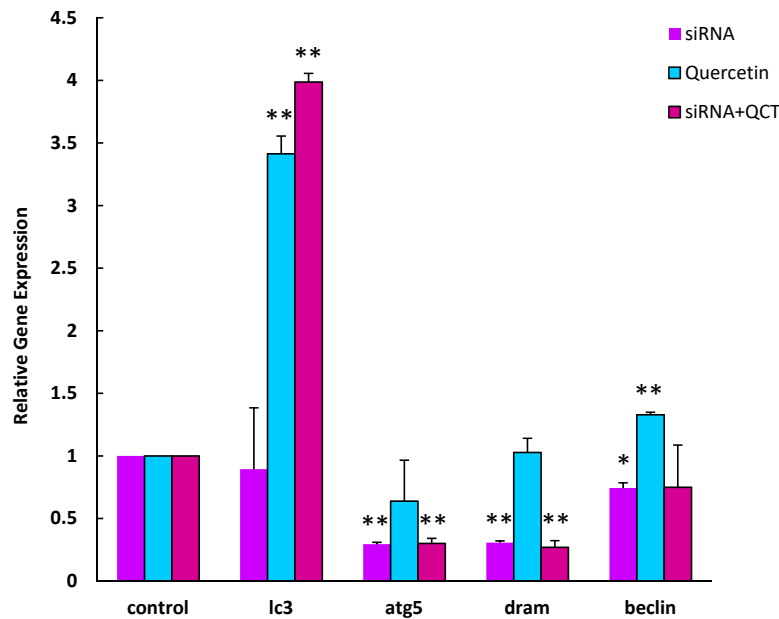
در این مطالعه به منظور القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی MCF-7، از siRNA-DFF45 برای کاهش بیان ژن dff45 هم‌زمان با داروی کوئرستین استفاده شد. توالی‌های siRNA طراحی شده، به بخش کدکننده mRNA متصل می‌شود به نحوی که نوکلئوتیدهای ۳۳۱ تا ۳۵۳ از mRNA ژن dff45 را در ناحیه کدکننده پوشش می‌دهد [۱۱]. اکثر داروهای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

(siRNA + کوئرستین) فعال شدن مسیر اتوفاجی 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 و beclin در تیمارهای انجام شده احتمال بروز اتوفاجی را از مسیرهای معمول و کانونیکال منتفی می‌کند. بنابراین اتوفاجی احتمالاً از مسیرهای غیرمعمول راه‌اندازی شده است که در بخش بحث مورد بررسی قرار خواهد گرفت. میزان بیان ژن‌های مسیر بقای akt/mTOR در تیمارهای مختلف بررسی شد که نتایج آن به‌طور کلی در تصویر شماره ۸ مشاهده می‌شود.



### جندی شاپور

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



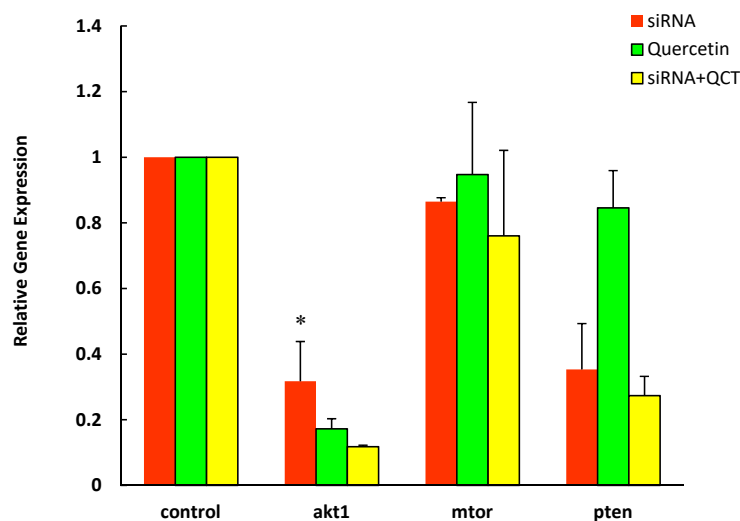
### جندی شاپور

**تصویر ۷.** نمودار ستونی تغییر بیان ژن‌های مسیر اتوفاژی در حضور تیمارهای siRNA، کوئرستین و تیمار هم‌زمان (siRNA + کوئرستین). در تیمار siRNA کاهش بیان ژن‌های atg5، beclin و dram مشاهده شد. افزایش قابل توجه بیان lc3 در تیمار کوئرستین و تیمار هم‌زمان (siRNA + کوئرستین) نشان‌دهنده به راه افتادن مسیر اتوفاژی 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 ۴).

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 siRNA- DFF45 و کاهش بیان DFF45، میزان بیان ژن‌های p53، bax، caspase-3 و bcl-2 کاهش یافت. کاهش بیان p53 بیانگر عدم بروز اثرات سیتوپلاسمی آن و عدم وقوع آپوپتوز است که کاهش مشاهده شده در بیان caspase-3 نیز تأییدکننده آن است [۲۹].



### جندی 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.

lc3 و همچنین افزایش beclin مشاهده شد که نشان‌دهنده راه‌اندازی مسیر اتوفاژی است (تصویر شماره ۷).

در تیمار کوئرتستین کاهش بیان akt1 علیرغم کاهش بیان mTOR و pten با کاستن از توان حیاتی سلول‌ها، اتوفاژی را به سمت مرگ پیش می‌برد (تصویر شماره ۸) [۴۰]. بنابراین در تیمار مستقل کوئرتستین افزایش مشاهده شده در بیان aif هم‌زمان با اتوفاژی سبب القای مرگ سلولی می‌شود که بیانگر علت کاهش ۵۵ درصدی توان حیاتی سلول‌هاست (تصویر شماره ۴).

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

باتوجه به تصویر شماره ۷ در تیمار هم‌زمان (siRNA+کوئرتستین)، حضور siRNA سبب تشدید اثر کوئرتستین بر افزایش بیان lc3 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 می‌بایست از مسیرهای غیر معمول روی داده باشد. این موضوع در پی 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 به‌عنوان یک عامل محدودکننده برای نتایج به‌دست‌آمده باشد. در این مطالعه از روش‌های پیشنهاد شده 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 پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک و تغییر بیان آن‌هاست. همچنین اغلب درمان‌ها در سرطان از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوز اثر کشندگی خود را نشان می‌دهند. در نتیجه دخالت در این مسیر می‌تواند به درمان سرطان کمک کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تیمار دارویی رده سلولی MCF-7 با کوئرتستین، هم‌زمان با کاهش بیان ژن dff45 به کمک siRNA-

در تیمار مستقل کوئرتستین، کاهش بیشتر سطح بیان ژن‌های p53 و bcl-2 نسبت به تیمار siRNA-DFF45 مشاهده شد (تصویر شماره ۶). در تیمار کوئرتستین 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 نشان‌دهنده 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 کوئرتستین بر تحریک مسیر اتوفاژی در سرطان تخمدان بررسی شده است [۳۳]. نتایج این مطالعات نشان داده است که کوئرتستین می‌تواند به‌واسطه 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 به‌طور چشمگیری در تیمارهای کوئرتستین و siRNA+کوئرتستین مشاهده شد را می‌توان به‌واسطه راه‌اندازی مسیر اتوفاژی تفسیر کرد [۳۵].

علاوه بر نقش Bcl-2 در مهار آپوپتوز، Bcl-2 به‌عنوان یک پروتئین کنترلی مهم در فرایند اتوفاژی شناخته شده است [۳۶]. بیان بیش از حد پروتئین کوژن bcl-2 در ۵۰ تا ۷۰ 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، lc3 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-1 در پاسخ به تنش سلولی باعث جدایی Beclin-1 و Bcl-2 شده و اتوفاژی به راه می‌افتد [۳۸]. بنابراین کاهش چشمگیر میزان Bcl-2 در تیمارهای کوئرتستین و siRNA+کوئرتستین می‌تواند سبب کاهش اثر مهارتی Bcl-2 بر Beclin-1 و فعال کردن مسیر اتوفاژی شود. بنابراین می‌توان گفت سازوکار مرگ سلولی اعمال شده توسط کوئرتستین، راه‌اندازی مسیرهایی به غیر از آپوپتوز وابسته به کاسپاز است. افزایش مشاهده شده در سطح بیان aif در تیمار کوئرتستین نسبت به نمونه کنترل، می‌تواند نمایانگر به راه افتادن مسیر آپوپتوز غیروابسته به کاسپاز باشد (تصویر شماره ۶) [۳۹]. aif یک فلاوپروتئین با فعالیت اکسیدوردوکنازی است که در شرایط القای مرگ سلولی، با اتصال به DNA و فعال کردن نوکلئازهای دیگر سبب پیش بردن متراکم شدن کروماتین و شکست DNA می‌شود. به‌علاوه در زمان تیمار مستقل کوئرتستین افزایش چشمگیر بیان



DFF45 سبب القای مرگ سلولی می‌شود. بنابراین باتوجه به نتایج مذکور می‌توان گفت تیمار هم‌زمان siRNA-DFF45 و کوئرستین سبب افزایش اثر کشندگی کوئرستین به میزان ۱۰ درصد می‌شود که سازوکار اصلی در این هم‌افزایی 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 ما می‌دانیم دقیق و معتبر هستند.

#### حامی مالی

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

#### مشارکت نویسندگان

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؛ نوشتن، بررسی و ویرایش: مصطفی صابریان؛ خوانش و تأیید نسخه نهایی: همه نویسندگان.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، 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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [PMID]
- [15] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(15):1475-85. [DOI: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] [PMID] [PMCID]
- [17] Baghel SS, Shrivastava 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] [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] [PMID] [PMCID]
- [20] Shrivastava N, Srivastava A. RNA interference: An emerging generation of biologicals. *Biotechnol J*. 2008; 3(3):339-53. [DOI: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 auptene of *Ferula szowitsiana* root extract. *J Food Meas Charact*. 2019; 13:2644-53. [DOI: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] [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]
- [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] [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] [PMID] [PMCID]
- [27] Samli H, Samli M, Vatanserver B, Ardici 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] [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]

- [29] Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006; 13(6):994-1002. [DOI: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] [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] [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] [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] [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] [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] [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] [PMID] [PMCID]
- [37] Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Deloménie 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/nc.2012.252] [PMID] [PMCID]
- [38] Decuyper JP, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells.* 2012; 1(3):284-312. [DOI: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]
- [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] [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] [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] [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] [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] [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] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank