



اثر کوئرستین بر بیان برخی از ژن‌های درگیر در اپی ژنتیک در سل‌های سرطان سینه

فهیمة محمدیان شهرباکی^۱، مهدی محمودی^۱، محمدرضا میرزایی^۱، علیرضا خوشدل^۲، محمود شیخ فتح الهی^۳، ناهید زین الدینی^۴، محمدرضا حاجی زاده^{*۱}

۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

۲- گروه آموزشی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ایران.

۳- گروه آموزشی پزشکی اجتماعی و مرکز تحقیقات محیط کار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

۴- مرکز تحقیقات ایمنولوژی بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۰۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است. الگوی نادرست بیان ژن‌های درگیر در اپی ژنتیک، مثل APOBEC3B و DNMT-1 می‌تواند باعث پیشرفت سرطان سینه شود. کوئرستین جزو فلاوونوئیدهای طبیعی است که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی آن در مطالعات دیگر گزارش شده است. در این مطالعه تأثیر ماده کوئرستین بر بیان ژن‌های مورد اشاره، در دو سل‌های سرطان سینه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌های دو رده سلولی شامل MCF-7 و MDA-MB-453 در فلاسک‌های جداگانه شامل: گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ماده کوئرستین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس RNA استخراج و پس از تبدیل به cDNA بیان ژن‌های APOBEC3B، DNMT-1 و TET-1 توسط تکنیک Real time مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که کوئرستین پس از ۲۴ ساعت موجب کاهش بیان ژن APOBEC3B و افزایش بیان DNMT-1 در رده سلولی MCF-7 شد، در مقابل در رده سلولی MDA-MB-453 بیان هر دو ژن افزایش یافت. در حالی که نتایج ۴۸ ساعته نشان داد که کوئرستین موجب کاهش بیان ژن APOBEC3B و DNMT-1 و افزایش بیان TET-1 در هر دو رده می‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات رضایت بخش ماده کوئرستین پس از ۴۸ ساعت تیمار روی سلول‌های سرطان سینه، احتمالاً اثرات ضد سرطانی آن از طریق تغییرات اپی ژنتیک اعمال می‌شود. البته جهت نظر قطعی بررسی‌های بیشتری لازم است.

کلمات کلیدی: کوئرستین، بیان ژن، اپی ژنتیک، سل‌های سرطان سینه

مقدمه

سرطان یکی از مسائل مهم بهداشت و درمان در سراسر دنیا است (۱). این بیماری به عنوان دومین دسته از بیماری‌های غیر قابل انتقال و سومین علت مرگ و میر بشر شناخته شده است (۱). سرطان سینه، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است (۲). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی از هر ۸ تا ۱۰ زن، ۱ نفر مبتلا به سرطان سینه می‌باشد (۳). آمار به دست آمده در سال‌های اخیر در ایران نشان می‌دهد که در حدود ۲۴/۴۱ درصد از سرطان‌ها در بین زنان ایرانی از نوع سرطان سینه می‌باشد (۲). عادات‌های غلط زندگی و مصرف دخانیات بروز سرطان سینه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل دیگری مثل رژیم غذایی پرکالری و پرچربی، مصرف الکل، مصرف داروهای ضدبارداری، خطر سرطان سینه را افزایش می‌دهد. روش‌های درمان سرطان شامل درمان

سرطان یکی از مسائل مهم بهداشت و درمان در سراسر دنیا است (۱). این بیماری به عنوان دومین دسته از بیماری‌های غیر قابل انتقال و سومین علت مرگ و میر بشر شناخته شده است (۱). سرطان سینه، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است (۲). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی از هر ۸ تا ۱۰ زن، ۱ نفر مبتلا به سرطان سینه می‌باشد (۳). آمار به دست آمده در سال‌های اخیر در ایران نشان می‌دهد که در حدود ۲۴/۴۱ درصد از سرطان‌ها در بین زنان ایرانی از نوع سرطان سینه می‌باشد (۲). عادات‌های غلط زندگی و مصرف دخانیات بروز سرطان سینه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل دیگری مثل رژیم غذایی پرکالری و پرچربی، مصرف الکل، مصرف داروهای ضدبارداری، خطر سرطان سینه را افزایش می‌دهد. روش‌های درمان سرطان شامل درمان

* نویسنده مسئول: محمدرضا حاجی زاده، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
Email: hajizadehus@yahoo.com

مجدد را انجام می‌دهند. ناحیه N ترمینال DNMT_1 شامل یک ناحیه غنی از باز آلی سیتوزین است و همچنین توالی تکراری دو اسید آمینه لیزین و گلیسین را دارا می‌باشد (۱۳). DNMT_1 یک عملکرد حفاظتی در طی تقسیم سلولی دارد در حالی که DNMT3A و DNMT3B بعد از رونویسی DNA، گروه متیل را به سینوزین ناحیه CPG اضافه می‌کنند (۵، ۱۱).

خانواده TET (ten-eleven translocation) در پستانداران شامل سه عضو TET-1، TET-2 و TET-3 است. آنزیم TET-1 با دخالت چند آنزیم دیگر سیتوزین متیله را دمتیله می‌کند (۱۴)، این پروتئین‌ها می‌توانند اکسیداسیون ۵-متیل سیتوزین (5mC: 5 methyl cytosine) را کاتالیز کرده و مشتقات آن را مانند ۵-هیدروکسی متیل سیتوزین (5hmC: hydroxy methyl cytosine) تولید کنند، که در نهایت به دمتیلاسیون DNA منجر می‌شود (۶). تحقیقات جدید کاهش چشمگیر بیان ژن‌های TET-1 و متعاقباً 5mC را در سرطان‌های سینه، کبد، ریه، پانکراس و پروستات گزارش کرده است (۱۶). متیلاسیون DNA در طی تکامل ضروری است اما متیلاسیون نا به جای آن (هایپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون) با افزایش ابتلاء به سرطان در ارتباط است (۱۷). به هر حال، نقش دقیق این ژن‌ها در سرطان روشن نیست و نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۶).

ماده کوئرستین (QUERCETIN) با فرمول (3.3'.4'.5.7-pentahydroxyflavone) یکی از اعضای مهم خانواده فلاوونوئید هاست که در بسیاری از غذاها شامل سبزیجات و میوه یافت می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (۱۸، ۱۹). کوئرستین علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای خاصیت پراکسیدازی است که با این خاصیت می‌تواند در شیمی درمانی و مهار رشد تومور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰). این ترکیب باعث مهار سلول‌های سرطانی انسانی از قبیل دهان، حلق، حنجره، مری، معده، ریه و سینه می‌شود (۲۰، ۲۱)، اما اثر سمیت بر روی سلول‌های نرمال ندارد (۲۲).

با توجه به گزارشات موجود افزایش بیان ژن APOBEC3B در سل‌ل‌ها و بافت‌های سرطانی مشخص شد، اما دلیل و مکانیسم این افزایش در پاره‌ای از ابهام است (۸) و از آن جایی که یکی از مکانیسم‌هایی که در افزایش و کاهش بیان ژن اثر دارد مسئله اپی ژنتیک است، این پژوهش در مرحله اول با هدف تعیین

دارویی، هورمونی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی می‌باشد (۴).

اپی ژنتیک بیانگر تغییر در کروماتین و DNA است که بدون این که در توالی ژنی تغییری ایجاد کند، بیان ژن و محصول پروتئینی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد، این گونه واکنش‌ها توسط برخی از آنزیم‌ها مثل APOBEC3B، DNMT_1 و TET-1 کاتالیز می‌شوند (۵-۷).

APOBEC3B (APO Lipoprotein b editing) یکی از اعضای مهم خانواده دامینازهاست که در هسته جایگاه مشخص و ثابتی دارد. A3B قادر به تبدیل سیتوزین دمتیله به یوراسیل است که این تبدیل پتانسیل خطرناکی است که موجب موتاسیون انتقالی C/G به T/A و جایگزینی دیگر بازها و شکستگی‌های DNA می‌شود (۸). مطالعات اولیه نشان داد که A3B نقش مهمی در ایجاد ایمنی ذاتی در انسان ایفا می‌کند. این آنزیم به کمک A3H می‌تواند رترو ویروس‌هایی مثل HIV و HTLV (human T-Lymphotropic Virus Type 1) را با درجات مختلفی مهار کند (۹). A3B یک عامل ضد ویروس قوی تلقی می‌شود. گفته می‌شود که این آنزیم باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری مالاریا نیز می‌باشد (۱۰). A3B یک منبع موتاسیون مهم در ایجاد سرطان سینه است که عامل ایجاد آن جهش C به T می‌باشد. پردازش اضافی بازها توسط A3B باعث نقل و انتقال نسخه‌ها و ایجاد شکست در DNA می‌شود. مطالعه بیان ژن نشان داد که این آنزیم در برخی از بافت‌های توموری به ویژه سرطان سینه بیش از حد بیان می‌شود (۵).

در میان تغییرات اپی ژنتیک می‌توان به متیلاسیون اشاره کرد. این واکنش توسط آنزیم DNMT (DNA Methyltransferase) کاتالیز می‌شود که سیتوزین موجود در جزایر CPG ناحیه پرموتور را به ۵-متیل سیتوزین تبدیل می‌کند (۵، ۱۱). این آنزیم‌ها قادرند درجه متیلاسیون ژنوم را کنترل نمایند و به ۴ گروه شامل DNMT_1، DNMT_2، DNMT_3A و DNMT_3B طبقه بندی می‌شوند. الگوی متیلاسیون DNA، به طور دینامیکی به وسیله حداقل سه آنزیم DNMT (متیل ترانسفراز مستقل DNMTS) که شامل DNMT_1، DNMT3A و DNMT_3B می‌باشد، صورت می‌گیرد (۱۲). DNMT_1 باعث حفظ متیلاسیون می‌شود و DNMT3A و DNMT3B متیلاسیون



هر ژن (معکوس) برداشته و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه انکوبه شد. سپس این مخلوط به تیوب لیوفیلیزه که حاوی مسترمیکس cDNA است، منتقل شد. مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه قرار داده شد تا cDNA سنتز شود. سپس در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه گذاشته شد تا آنزیم رونویسی معکوس غیر فعال شود. در این مرحله از cDNA سنتز شده به مقدار لازم برداشته و با مسترمیکس که حاوی DNA Taq پلیماز و بقیه‌ی مواد مورد نیاز است، مخلوط شد و اجازه داده شد RT-PCR در ۴۰ سیکل انجام شود. از دمای ۹۶ درجه به مدت ۱۰ ثانیه برای دناتوره کردن cDNA استفاده شد. برای ژن‌های APOBEC3B، DNMT_1 و TET_1 به ترتیب از دماهای ۵۸، ۵۸/۸ و ۶۱ درجه سانتی گراد برای انیلینگ و سنتز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده پرایمرهای فوروارد و ریورس اختصاصی هر ژن بودند که توالی آن‌ها توسط نرم افزار طراحی پرایمر Oligo طراحی شد. برای پایش هر مرحله از سایبر گرین که یک مولکول گزارشگر فلورسانت است، استفاده شد. این ماده وضعیت تکثیر را در هر مرحله نشان می‌دهد. غلظت تارگت نسبت به غلظت ژن خانه گرین بتا-اکتین گزارش شد. بتا-اکتین به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت (۲۴، ۲۵).

در این مطالعه سلول‌های مورد نظر در ۹ فلاسک جداگانه کشت داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت ۳ فلاسک به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد، همچنین ۳ فلاسک با غلظت ۵۰ میکرومولار و ۳ فلاسک دیگر را با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد سلول از هر فلاسک کشت سلولی جدا و RNA از سلول‌ها استخراج و cDNA ساخته شد (۲۴، ۲۶). لازم به ذکر است که این آزمایش برای هر نمونه ۶ بار تکرار و اطلاعات به دست آمده از این مطالعه وارد چک لیست شدند.

اطلاعات چک لیست‌ها پس از جمع آوری توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان بیان ژن APOBEC3B، DNMT_1 و TET-1 در سل‌لاین‌های MCF-7 و MDA-MB-453 به صورت «انحراف معیار ± میانگین» در قالب نمودار گزارش شد. به منظور مقایسه میزان بیان ژن APOBEC3B، DNMT_1 و TET-1 در سل‌لاین‌های MCF-7 و MDA-MB-453 سرطان سینه در حضور و عدم حضور

میزان بیان ژن APOBEC3B در cell line‌های سرطان سینه در حضور و عدم حضور ماده کوئرستین انجام شد و در قدم بعدی بیان برخی دیگر از ژن‌های دخیل در اپی ژنتیک شامل DNMT_1 و TET-1 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌های مورد مطالعه:

در این مطالعه از دو رده سلولی تومور پستان شامل MCF-7 (حساس به استروژن) و MDA-MB-453 (مقاوم به استروژن که فاقد گیرنده استروژن است) استفاده شد (۲۳). سل‌لاین‌های مورد نظر از شرکت انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سپس هر کدام از سل‌لاین‌ها به طور جداگانه به فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی انتقال و پس از رشد در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ پاساژ داده شدند. برای پاساژ سلول‌ها، ابتدا محیط کشت تخلیه شد و سلول‌ها با ۱۰ میلی لیتر از محلول PBS شست و شو داده شدند. سپس به منظور جداسدن سلول‌ها از ته فلاسک یک میلی لیتر تریپسین ۰/۰۵ درصد اضافه شد. پس از اطمینان از جداسازی سلول‌ها، مقدار ۱۰ میلی لیتر محیط کشت که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتوماسین Pen/Strep بود، اضافه گردید و در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ و توده سلولی در ته فالكون جمع و محیط کشت رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها، به فلاسک‌های ۲۵ سانتی متری جدید برای پاساژ انتقال یافتند (۱۹، ۲۳).

استخراج RNA و سنتز cDNA:

Total RNA سلولی با استفاده از کیت تخلیص RNA (Pars tous) ساخت کشور ایران تخلیص شد، تمام مراحل استخراج RNA بر روی یخ انجام شد. صحت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز در آگاروز یک درصد و رنگ آمیزی با Green Viewer DNA و مشاهده سه باند RNA با دستگاه ژل داک بررسی شد (۲۴). الگوی RNA پس از تبدیل به cDNA توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به عنوان هدف در تکنیک RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور سنتز cDNA از دستگاه Biorad ساخت کمپانی هک آمریکا استفاده شد. برای این کار مقدار ۷ میکرولیتر RNA تام و ۳۰-۱۰ پیکومولار پرایمرهای اختصاصی

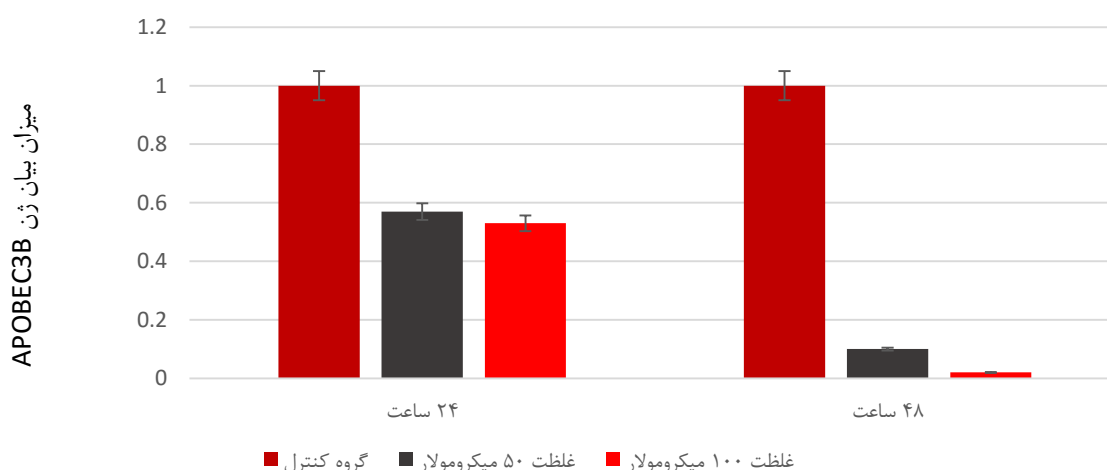
پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین کاهش معنا دار پیدا کرده است و بیشترین کاهش مربوط غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین می‌باشد ($P=0/016$). پس از ۴۸ ساعت تیمار نیز در هر دو غلظت کاهش چشمگیری در بیان این ژن مشاهده شد که بیشترین اختلاف مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین می‌باشد ($P=0/001$). (نمودار و جدول ۱)

میانگین بیان ژن APOBEC3B در سل لاین سرطانی MDA-MB-453 در دوز ۵۰ میکرومولار از ماده کوئرستین پس از ۲۴ ساعت افزایش معناداری پیدا کرده است ($P=0/02$). اما

۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین از آزمون Independent two-sample t-test استفاده شد. سطح معنی داری در این آزمون‌ها ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج

در این مطالعه بیان سه ژن DNMT-1، APOBEC3B و TET-1 در دو رده سلولی سرطان پستان که به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض ماده کوئرستین قرار گرفتند مورد بررسی قرار گرفت. آزمون Independent two-sample t-test نشان داد که میانگین بیان ژن APOBEC3B در سل لاین سرطانی MCF-7



نمودار ۱. مقایسه میانگین بیان ژن APOBEC3B در غلظت‌های مختلف ماده کوئرستین در سل لاین MCF-7

جدول ۱. مقدار P_Value مربوط به ژن APOBEC3B پس از دوره‌های مختلف تیمار با ماده کوئرستین

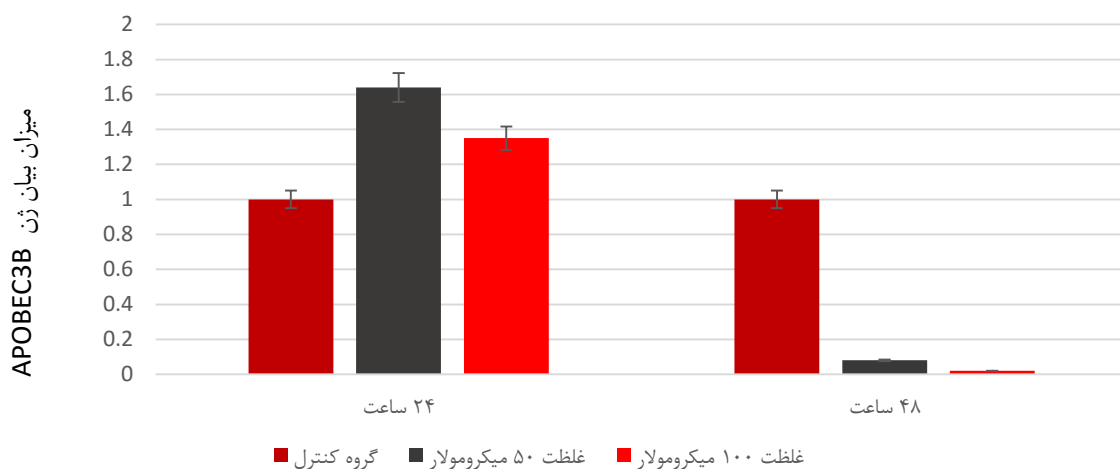
مقدار P_Value	پس از ۴۸ ساعت تیمار با کوئرستین	مقدار P_Value	پس از ۲۴ ساعت تیمار با کوئرستین	مقدار P_Value	پس از ۴۸ ساعت تیمار با کوئرستین	مقدار P_Value	پس از ۲۴ ساعت تیمار با کوئرستین	رده‌های سلولی
	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	غلظت ۵۰ میکرومولار	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	غلظت ۵۰ میکرومولار	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	غلظت ۵۰ میکرومولار	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	
۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۶	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	MCF_7
۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۶۵	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	MDA-MB-453

مقدار معناداری در این جدول P کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد.



این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکرومولار از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد. میانگین بیان ژن APOBEC3B در این سل لاین سرطانی پس از ۴۸ ساعت تیمار با ماده کوئرستین به طور معناداری کاهش پیدا کرد که بیشترین سطح معناداری مربوط به ۱۰۰ میکرومولار (P=۰/۰۱۱) (جدول ۲) است. اما میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل لاین سرطانی MCF-7 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین، پس از ۴۸ ساعت کاهش پیدا کرده است که از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (نمودار ۳ و جدول ۲).

این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکرومولار از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد. میانگین بیان ژن APOBEC3B در این سل لاین سرطانی پس از ۴۸ ساعت تیمار با ماده کوئرستین به طور معناداری کاهش پیدا کرد که بیشترین سطح معناداری مربوط به ۱۰۰ میکرومولار (P=۰/۰۱۱) (جدول ۲) است. اما میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل لاین سرطانی MCF-7 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین، پس از ۴۸ ساعت کاهش پیدا کرده است که از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (نمودار ۳ و جدول ۲).



نمودار ۲. مقایسه میانگین بیان ژن APOBEC3B در غلظت‌های مختلف ماده کوئرستین در سل لاین MDA-MB

جدول ۲. مقدار P-Value مربوط به ژن DNMT_1 پس از دوره‌های مختلف تیمار با ماده کوئرستین

P-Value مقدار	پس از ۲۴ ساعت تیمار با کوئرستین		پس از ۴۸ ساعت تیمار با کوئرستین		مقدار P-Value
	غلظت ۵۰ میکرومولار	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	غلظت ۵۰ میکرومولار	غلظت ۱۰۰ میکرومولار	
MCF_7	۰/۰۴۱	۰/۰۱۱	۰/۰۷۵	۰/۰۶۱	
MDA-MB-453	۰/۰۱۵	۰/۰۰۲	۰/۱۰	۰/۰۷	

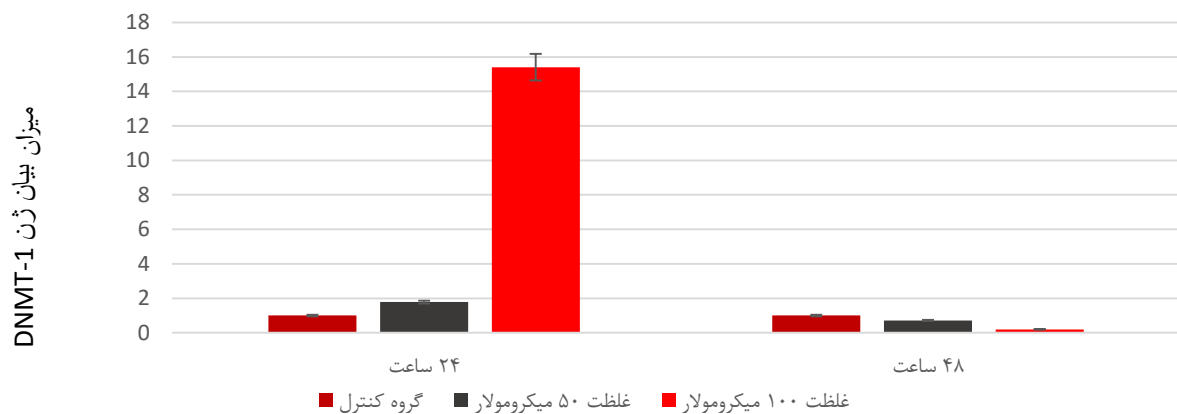
مقدار معناداری در این جدول P کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد.

میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل لاین سرطانی MDA-MB-453 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین پس از ۲۴ ساعت به طور معناداری افزایش پیدا کرده است که بیشترین تغییر مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین می‌باشد (P= ۰/۰۰۲). میزان بیان ژن DNMT-1 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف ماده کوئرستین کاهش یافته

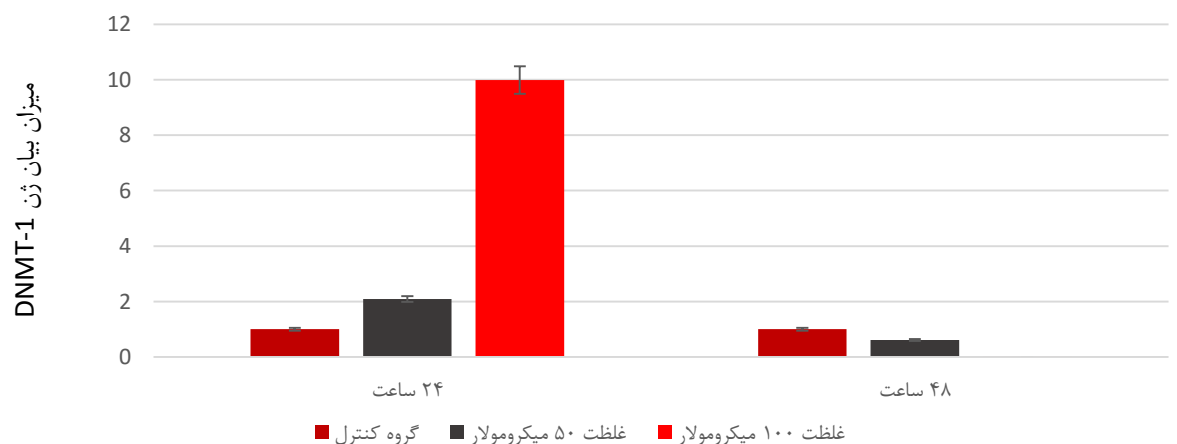
غلظت ۱۰۰ میکرومولار از این ماده می‌باشد (P=۰/۰۱) (نمودار ۲ و جدول ۱).

میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل لاین سرطانی MCF-7 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین پس از ۲۴ ساعت به طور معناداری افزایش پیدا کرده است که بیشترین تغییر مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین می‌باشد (P=۰/۰۱۱)

است که این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبود (نمودار ۴ و جدول ۲). تغییرات اندکی پیدا کرده است که این تغییرات از نظر آماری معنادار نمی‌باشد. همچنین این ژن در تیمار ۴۸ ساعت افزایش



نمودار ۳. مقایسه میانگین بیان ژن DNMT-1 در غلظت‌های مختلف ماده کوئرستین در سل لاین MCF-7



نمودار ۴. مقایسه میانگین بیان ژن DNMT-1 در غلظت‌های مختلف ماده کوئرستین در سل لاین MDA-MB-453

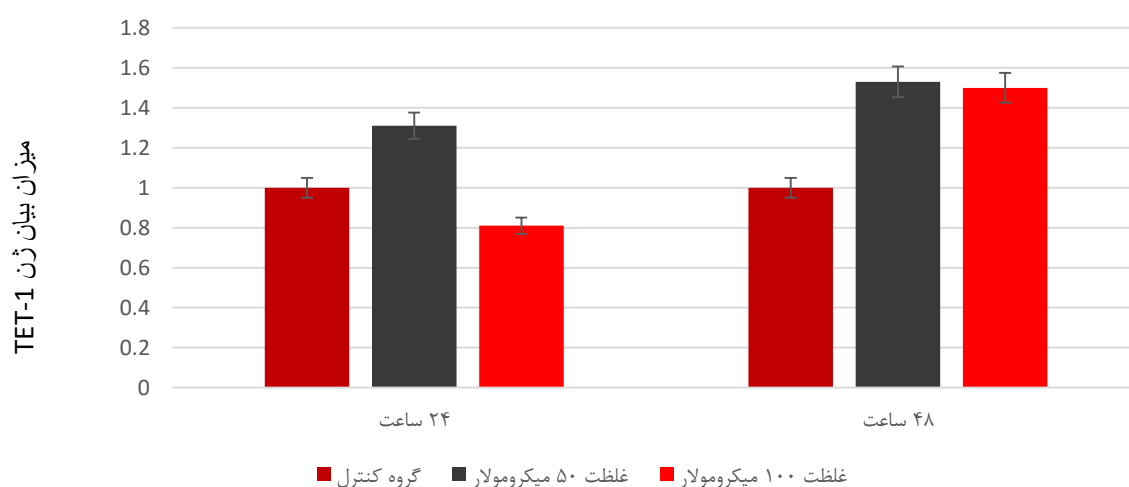
بیان اندکی نشان داده است که از نظر آماری معنادار نمی‌باشد ($P \geq 0.05$) (نمودار ۵ و جدول ۳).

میانگین بیان ژن TET-1 در سل لاین سرطانی MCF-7 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرستین پس ۲۴ ساعت

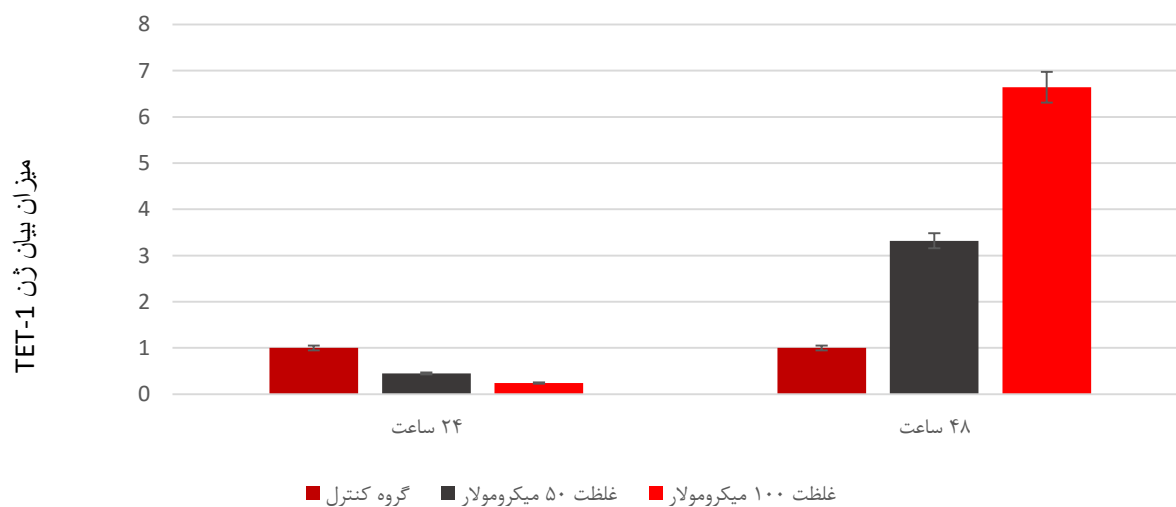


کوئرتستین افزایش معنی داری نشان داده است. بیشترین معناداری در این مقایسه مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد ($P = 0/01$) (نمودار ۶ و جدول ۳).

میانگین بیان ژن TET-1 در سل لاین سرطانی MDA-MB-453 در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ماده کوئرتستین پس از ۲۴ ساعت کاهش معنادار پیدا کرده است ($P = 0/001$). بیان ژن TET-1 پس ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف ماده



نمودار ۵. مقایسه میانگین بیان ژن TET-1 در غلظت‌های مختلف ماده کوئرتستین در سل لاین MCF-7



نمودار ۶. مقایسه میانگین بیان ژن TET-1 در غلظت‌های مختلف ماده کوئرتستین در سل لاین MDA-MB-453

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر کوئرتستین بر چندین ژن درگیر در اپی ژنتیک مانند DNMT-1، APOBEC3B و TET-1 در سلول‌های سرطان سینه با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که کوئرتستین پس از ۲۴ ساعت موجب کاهش بیان ژن APOBEC3B در رده سلولی MCF-7 و افزایش بیان آن در رده MDA-MB-453 شد. همچنین میزان بیان ژن DNMT-1 پس از ۲۴ ساعت در هر دو رده به طور معناداری افزایش یافته است. بررسی‌های ۲۴ ساعته نشان داد که بیان ژن TET-1 در رده MCF-7 تغییر معنی داری نداشت، اما در رده MDA-MB-453 کاهش معنادار نشان داد. نتایج ۴۸ ساعته نیز نشان داد که کوئرتستین موجب کاهش بیان ژن APOBEC3B و DNMT-1 در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-453 در مقابل باعث افزایش بیان TET-1 در هر دو رده شد.

تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با فواید ماده کوئرتستین بر سرطان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است که برخی از این اثرات مثبت از طریق تغییر در بیان ژن‌های مختلف اعمال می‌شود. van و همکاران اثر کوئرتستین را بر بیان چندین ژن سرکوبگر تومور مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این ماده باعث افزایش بیان این ژن‌ها، همچنین ژن‌های دخیل در مسیرهای انتقال سیگنال مانند پتا کاتنین، می‌شود و با این مکانیسم پتانسیل ضد سرطانی دارد (۲۷). نتایج حاصل از مطالعات Shan و همکاران نشان داد که کوئرتستین با مهار بیان ژن‌های درگیر در تومور مثل cyclin D و survivin اثر ضد توموری القاء می‌کند (۲۸). Nair و همکاران در مطالعات خود مشاهده کردند که فلاونوئیدهایی مثل کوئرتستین باعث مهار بیان ژن سایتوکین پیش از التهاب در منوسیت‌ها می‌شود (۲۹). Xiang و همکاران در تحقیقات خود مشاهده کردند که ماده کوئرتستین پس از ۴۸ ساعت باعث کاهش در بیان ژن‌های P53 می‌شود و سیکل سلولی را در فاز S مهار می‌کند. همچنین این محققان دریافتند که این ماده قادر است بیان ژن BCL2 را مهار کند و باعث القای آپوپتوز شود (۳۰). ما نیز در این مطالعه شاهد اثرات مفید ماده کوئرتستین پس از ۴۸ ساعت بودیم.

Burns و همکاران با بررسی بیان ژن APOBEC3B به این نتیجه رسیدند که این ژن در بسیاری از سلول‌های سرطانی به

ویژه سرطان سینه بیش از اندازه بیان می‌شود و منبع احتمالی جهش‌های سوماتیک درگیر در سرطان می‌باشد (۵). در مطالعه Sieuwerts و همکاران مشخص شد که افزایش سطح بیان ژن APOBEC3B در افراد مبتلا به سرطان سینه که از نظر گیرنده استروژنی مثبت هستند با پیش آگهی بد همراه است در نتیجه کنترل بیان آن احتمالاً به کاهش جهش‌های سیتوزین به تیمین و متعاقباً کاهش ابتلا به سرطان کمک می‌کند (۳۱). تاکنون مطالعه‌ای پیرامون اثر مفید ماده مؤثره گیاهان بر بیان ژن‌های هیچ کدام از اعضای خانواده دامینازها صورت نگرفته است اما بر اساس یافته‌های ما در مطالعه حاضر، کوئرتستین بیان ژن این آنزیم را در رده سلولی MCF-7 پس از ۲۴ ساعت و در هر دو رده MCF-7 و MDA-MB-453 پس از ۴۸ ساعت کاهش داد، که این موضوع متعاقباً می‌تواند نوید بخش کاهش جهش‌های ژنتیکی در این سلول‌های سرطانی باشد. اما بیان این ژن در رده سلولی MDA-MB-453 پس از ۲۴ ساعت کاهش نشان نداد.

Rhee و همکاران در پژوهشی نشان دادند که DNMT_1 ژن دیگری است که در اپی ژنتیک دخیل است و به عنوان مسئول اکثر متیلاسیون ژنوم انسانی و متیلاسیون غیر عادی در سرطان‌ها در نظر گرفته می‌شود (۳۲). Won و همکاران در تحقیقی مشاهده کردند که بیوفلاونوئیدها باعث مهار آنزیم DNMT می‌شوند. این محققان دریافتند که فلاونوئیدها می‌توانند درجه متیلاسیون ژنوم را تغییر دهند (۳۳). Link و همکاران پیرامون اثرات مفید پلی فنول‌ها بر تغییرات اپی ژنتیک شامل متیلاسیون DNA و هیستون‌ها مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که فلاونوئیدها باعث کاهش متیلاسیون و بیان DNMT_1 و در نتیجه کاهش پیشرفت سرطان می‌شود (۳۴). Priyadarsini و همکاران در ارتباط با اثرات کوئرتستین بر بیان ژن DNMT_1 نتیجه گرفتند که این ماده قادر به کاهش بیان این ژن می‌شود و از این طریق نقش ضد سرطانی قابل توجهی ایفا می‌کند (۳۵). در راستای مطالعات گذشته مبنی بر اثر مفید فلاونوئیدها بر بیان ژن DNMT در مطالعه حاضر نیز تیمار ۴۸ ساعته با کوئرتستین منجر به کاهش بیان ژن DNMT_1 در هر دو رده سلول MCF-7 و MDA-MB-453 شد. در این مطالعه پس از ۴۸ ساعت شاهد اثر مهارکنندگی ماده‌ی کوئرتستین بر بیان ژن DNMT_1 بودیم که احتمالاً این موضوع می‌تواند نوید بخش کاهش متیلاسیون و



پیشنهاد کننده این موضوع است که این فلاونوئید طبیعی قادر است بیان ژن‌های دآمیناز و متیل ترانسفراز را دست خوش تغییر کند. با توجه به نقش بالای آنزیم‌های APOBEC3B و DNMT_1 در پیشرفت سرطان سینه و کاهش بیان ژن این آنزیم‌ها پس از ۴۸ ساعت تیمار با کوئرستین، می‌توان پیشنهاد داد که این ماده ممکن است دارای خواص پیشگیری کننده یا درمان کننده (از طریق کاهش جهش‌های سوماتیک و متیلاسیون) علیه این نوع سرطان باشد. همچنین افزایش بیان ژن TET_1 پس از ۴۸ ساعت نیز نقش احتمالی ماده کوئرستین در بهبود سرطان را تأیید می‌کند. به هر حال، مطالعات بیشتر آزمایشگاهی بر روی رده‌های سلولی مختلف، مطالعات فاز حیوانی و استفاده از تکنیک‌های دیگر (مانند تعیین سطح بیان پروتئین) اطلاعات بیشتری در زمینه اثر کوئرستین بر بیان این ژن‌ها و فرآیندهای تحت تأثیر آن‌ها، خواهند داد.

تشکر و قدردانی

مقاله فوق نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و هم چنین از اساتید محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان که در انجام این طرح ما را یاری کردند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

کاهش پیشرفت سلول‌های سرطانی مورد مطالعه شود. اما برخلاف نتایج رضایت بخش ۴۸ ساعته، نتایج ۲۴ ساعته تیمار با کوئرستین، کاهش بیان در ژن DNMT_1 نشان نداد.

TET آنزیم دیگری است که در اپی ژنتیک نقش دارد و باعث دمتیلاسیون ژنوم می‌شود. بنابر مطالعات انجام شده توسط Tahiliani و همکاران تمامی اعضای خانواده TET دارای توانایی ساختن 5hmC هستند، اما تنها بیان بیش از حد TET_1 و TET_2 سبب کاهش میزان متیلاسیون می‌شود (۳۶، ۳۷). هر چند که مطالعات زیادی در رابطه با بیان این ژن‌ها در سرطان انجام نشده است، یک تحقیق جدید که توسط Yang و همکاران صورت گرفت، کاهش چشمگیر بیان ژن‌های TET-1 و 5mhc را در سرطان‌های سینه، کبد، ریه، پانکراس و پروستات گزارش کرده است. با توجه به مطالعات صورت گرفته احتمالاً تحریک بیان این ژن می‌تواند به کاهش متیلاسیون و متعاقباً به کاهش رشد سرطان کمک کند (۱۶). تاکنون مطالعه‌ای پیرامون اثر ماده مؤثره گیاهان بر بیان این ژن صورت نگرفته است. طبق یافته‌های ما، کوئرستین پس از ۴۸ ساعت، بیان ژن TET-1 را در هر دو رده سلولی افزایش داد. در نتیجه تیمار با کوئرستین پس از ۴۸ ساعت احتمالاً می‌تواند باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی شود. برخلاف نتایج رضایت بخش ۴۸ ساعته، نتایج ۲۴ ساعته تیمار با کوئرستین افزایش بیان در ژن TET_1 نشان نداد.

روی هم رفته، با توجه به اثبات پتانسیل ضد سرطان کوئرستین در رده‌های سلولی سرطانی متفاوت، نتایج این مطالعه

References

1. Rajaei fard A, Tabatabaee H, Moghimi B, Zeighami B, Safaeii A, Tabei Z. Checking Cases of esophageal cancer in Fars Province (2001-2006). Journal of Kermanshah Medical Sciences university. 2009; 13(1): 65-73. [persian]
2. Gordanian B, Behbahani M, Karaptian J, Fazilati M. Assay toxic affect of L. Artemisia absinthium grown at two different heights in the Human Breast Cancer CellLine

- MCF-7. Journal of Research in Medicine. 2012;36(3): 31-124. [persian]

3. Noori Daloooyii M, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis, and treatment of breast cancer (review). Journal of Medical Sciences and Health Care in Sabzevar university. 2010; 2(17): 74-87. [persian]

4. Abadi AR, Dehghani-Arani M2, Yavari P1, Alavi-Majd

- H, Bajik K. Application of the competing risk models for the analysis of risk factors in patients with breast cancer. *Journal of Kashan University of Medical Sciences* January. 2013; 16(9): 546- 552. [persian]
5. Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, Rathore A, Land AM, Leonard B, et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*. 2013;494(7437):366-70.
 6. Tan L, Shi YG. TET-1 family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*. 2012;139(11):1895-902.
 7. Chahwan R, Wontakal SN, Roa S. Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination. *Trends in genetics*. 2010;26(10):443-8.
 8. Lackey L, Demorest ZL, Land AM, Hultquist JF, Brown WL, Harris RS. APOBEC3B and AID have similar nuclear import mechanisms. *Journal of molecular biology*. 2012;419(5):301-14.
 9. Ooms M, Krikoni A, Kress AK, Simon V, Münk C. APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of virology*. 2012;86(11):6097-108.
 10. JhaP, Sinha S, Kanchan K, Qidwai T, Narang A, Singh PK, et al. Deletion of the APOBEC3B gene strongly impacts susceptibility to falciparum malaria. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(1):142-8.
 11. Almeida L, Custodio A, Pinto G, Santos M, Almeida J, Clara C, et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res*. 2009;8(1):8-18.
 12. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo S-W. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 2007;87(1):24-32.
 13. Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science*. 2012; 709(6069): 12- 709.
 14. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET-11 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011;145(3):423-34.
 15. Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, et al. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*. 2010;463(7284):1101-5.
 16. Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J, Ma S, Liu J, et al. Tumor development is associated with decrease of TET-1 gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*. 2013;32(5):663-9.
 17. Yang AS, Estéicio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research*. 2004; 32(3): 20- 38.
 18. Tabaczar S, Pieniżek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyla A. Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *General physiology and biophysics*. 2013; 32(4):535-543.
 19. Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB-453468. *Cancer research*. 1994;54(9):2424-8.
 20. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453-453 cells. *Archives of pharmacal research*. 2008; 31(10): 1281- 5.
 21. Woo HD, Kim J. Dietary Flavonoid Intake and Smoking-Related Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS one*. 2013; 8(9):e75604.
 22. Russo GL, Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Iannitti R, et al. Quercetin: A Pleiotropic Kinase Inhibitor Against Cancer. *Advances in Nutrition and Cancer: Springer*. 2014. 19(7):185-205.
 23. Choi EJ, Kim G-H. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. *Phytomedicine*. 2008;15(9):683-90.
 24. Abolhassani A, Riazi GH, Azizi E, Amanpour S, Muhammadnejad S, Haddadi M, et al. FGF10: Type III Epithelial Mesenchymal Transition and Invasion in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Cancer*. 2014;5(7):537.
 25. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic acids*. 2012; 40 (15): e115.
 26. Kordi Tamandani DM, Hemati S, Davani SK, Arbabi F. Association between promoter methylation and expression of thyroid hormone receptor beta (THRβ) gene in patients with gastric cancer in an Iranian population. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(3):485-9.
 27. van Erk MJ, Roepman P, van der Lende TR, Stierum RH, Aarts J, van Bladeren PJ, et al. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *European journal of nutrition*. 2005;44(3):143-56.
 28. Shan B-E, Wang M-X, Li R-q. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/β-catenin signaling pathway. *Cancer investigation*. 2009;27(6):12- 64.
 29. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, et al. The flavonoid quercetin inhibits



proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(3):319-28.

30. Xiang T, Tao X, Jiang Z, Wang P. Effects of quercetin on proliferation of gastric cancer lines BGC823 and the expression of p53, Bcl-2/Bax and PCNA [J]. *Laser Journal*. 2006; 1:048.

31. Sieuwerts A, Burns M, Look M, Meijer-Van Gelder M, Schlicker A, Heidemann M, et al. Abstract S6-05: High levels of APOBEC3B, a DNA deaminase and an enzymatic source of C-to-T transitions, are a validated marker of poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Research*. 2013;73(24); 60- 8.

32. Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT_1. *Nature*. 2000;404(6781):1003-7.

33. Lee WJ, Shim J-Y, Zhu BT. Mechanisms for the

inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Molecular pharmacology*. 2005;68(4):1018-30.

34. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(12):1771-92.

35. Priyadarsini RV, Vinothini G, Murugan RS, Manikandan P, Nagini S. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr Cancer*. 2011;63(2):218-26.

36. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.

37. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.



Original Article

Expression of Some Genes Involved in Epigenetic in Breast Cancer Cell Lines: The Effect of Quercetin

Mohammadain Shahrababaki F¹, Mahmoudi M¹, Mirzaee M¹, Khoshdel A², SHEikhFathollahi M³, Zinodini N⁴, Hajizadeh MR^{1*}

1- Molecular medicine research center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

2- Department of Clinical Biochemical, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

3- Department of Social Medicine and Occupational Environment Research Center, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

4- Immunology of infectious diseases research center, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Received: 06 Aug 2015

Accepted: 27 Sep 2015

Abstract

Background & Objectives: Breast cancer is one of the most common cancers among women. Incorrect pattern of gene expression involved in epigenetic including APOBEC3B, DNMT-1, and TET-1 can develop breast cancer. Quercetin is a natural flavonoid with antioxidant and anti-cancer properties which have been reported in other studies. To investigate the effect mechanism of quercetin, this study examined the effect of quercetin on the expression of genes which were referred to in two classes of breast cancer cell lines.

Materials & Methods: Cell lines including MCF-7 and MDA-MB-453 in separate boxes in the control group and the treated groups with two dosages of 50 and 100 mm of quercetin were cultured for 24 and 48 hours, respectively. RNA was extracted from the cells and then was converted to cDNA. Real-time PCR was used for APOBEC3B, DNMT_1, and TET-1 expression.

Results: The results showed that quercetin had conflicting results after 24 hours in two cell lines as there was a decrease in the gene expression of APOBEC3B and an increase in that of DNMT-1 in MCF-7 cell line. In contrast, the cell line of MDA-MB-453, APOBEC3B, and DNMT-1 gene expression increased. While the 48-hour results showed that quercetin reduced the gene expression of APOBEC3B and DNMT-1 and increased that of the TET-1 in both cell lines.

Conclusion: Due to the satisfactory effects of quercetin on breast cancer cells after 48 hours, these effects can be probably applied through epigenetic mechanisms. However, the final decision needs further investigation.

KeyWords: Quercetin, Gene expression, Epigenetics, Cell lines, Breast cancer

*Corresponding author: Mohammad Reza Hajizadeh, Molecular medicine research center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Email: hajizadehus@yahoo.com