

Effect of 6 Weeks of Quercetin Supplementation on Expression of Some Tumor Angiogenesis Markers in Female Mice with Breast Cancer

Jalali Z¹, Shahidi F^{2*}, Ramezani A², Gaeini A³, Alizadeh Sh⁴

¹ Ph.D. Student in Exercise physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

² Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

³ Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Receive: 8/3/2020
Accepted: 5/8/2020

*Corresponding Author:
fereshteh_shahidi98@yahoo.com

Ethics Approval:
IR.SSRI.REC.1398.595

Abstract

Introduction: Slowing down the process of angiogenesis in the tumor tissue is an emerging area in the treatment of breast cancer. The purpose of this study was to investigate the effect of quercetin supplementation on the expression of key angiogenesis factors in the tumor tissue of mice with breast cancer.

Methods: Sixteen female BALB /c mice were injected subcutaneously with estrogen receptor dependent breast cancer cells MC4L2 and divided into two groups of tumor (T) and tumor + quercetin (TQ). The mice in the TQ group were injected subcutaneously with 110 mg/kg quercetin solution for 6 weeks, 3 days a week. Forty-eight hours after the last injection, the animals were killed and their tumors were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -70° C. Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct, fold change and Mann-Whitney test at the significance level of ($P < 0.05$) were calculated with GENEX software.

Results: The results showed that quercetin supplementation significantly decreased the expression of *ANGPT-2* ($P < 0.00$), *TIE-2* ($P < 0.00$) and *VEGF-A* ($P < 0.00$) genes in the TQ group compared with the T group. But *ANGPT-1* expression increased, although this increase was not significant.

Conclusion: Quercetin supplementation may inhibit tumor angiogenesis and breast tumor growth.

Keywords: TIE-2 Receptor, Angiopoietins, Vascular Endothelial Growth Factor, Breast Cancer, Angiogenesis

تأثیر ۶ هفته مکمل سازی کوئرستین بر بیان برخی شاخص‌های آنژیوزنی بافت تومور در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

زهره جلالی^۱، فرشته شهیدی^{۲*}، علیرضا رمضانی^۳، عباسعلی گائینی^۴، شعبان علیزاده^۴

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

^۳ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۴ گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

تاریخ ارسال: ۹۸/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۵

* نویسنده مسئول:

fereshteh_shahidi98@yahoo.com

مقدمه: کند کردن فرآیند آنژیوژنز در بافت تومور، در روش‌های جدید درمان سرطان پستان مورد توجه است. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر مکمل کوئرستین بر بیان عوامل کلیدی آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان است.

روش بررسی: به ۱۶ سر موش بальب سی ماده، سلول‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژن MC4L2 زیر جلدی تزریق شد و سپس به دو گروه تومور (T) و تومور+کوئرستین (TQ) تقسیم شدند. موش‌های گروه TQ، ۶ هفته، ۳ روز در هفته، ۱۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم محلول کوئرستین زیر صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها کشته شدند و بافت تومور آن‌ها برداشته و در نیتروژن مایع فریز شد. و در دمای -۷۰ درجه نگهداری شدند. آنگاه بیان ژن‌های ANGPT-1، ANGPT-2، TIE-2 و VEGF-A به روش REAL TIME-PCR سنجیده شد. $\Delta\Delta Ct$ ، ΔCt و Fold chang و آزمون من ویتنی- در سطح معناداری ($P<0/05$) - با نرم افزار GENEX محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد مکمل سازی کوئرستین باعث کاهش معنادار بیان ژن‌های ANGPT-2 ($P<0/00$)، TIE-2 ($P<0/00$) و VEGF-A ($P<0/00$) در گروه TQ در مقایسه با گروه T شده است. اما بیان ANGPT-1 به رغم افزایش، معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: مکمل سازی کوئرستین احتمالاً باعث مهار آنژیوژنز تومور و در نتیجه رشد تومور پستان می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گیرنده TIE-2، آنژیوپویتین‌ها، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، سرطان پستان، آنژیوژنز

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ در جهان به شمار می رود. در سال ۲۰۱۸، ۱۸/۱ میلیون مورد جدید سرطان و ۹/۶ میلیون مرگ ناشی از بیماری سرطان گزارش شده است. در بین انواع سرطان ها، سرطان پستان (۱۱/۶٪) و ریه (۱۱/۶٪)، بیشترین شیوع را در سراسر جهان داشتند. بیماری سرطان، آثار زیان بار اقتصادی زیادی بر سلامت عمومی و خصوصی داشته است. برای مثال، در ایالات متحده آمریکا، کل هزینه درمان سالانه سرطان در سال ۲۰۱۰، ۱/۱۶ تریلن دلار بوده است (۱). براساس آخرین آمار بروز استاندارد شده سنی^۱ (ASIR) سرطان در ایران، در سال ۱۳۹۴، موارد ابتلا به سرطان ها در مردان و زنان، به ترتیب ۱۶۸ و ۱۳۶ نفر در ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. شایع ترین سرطان در مردان و زنان به ترتیب سرطان معده و سرطان پستان بود (۲۸).

اغلب روش های درمان تومور شامل ترکیبی از جراحی، شیمی درمانی و یا پرتودرمانی است. با وجود این، چالش های گوناگونی در شیمی درمانی کلاسیک وجود دارد که از جمله آن ها عوارض جانبی زیان بار و در نتیجه مرگ ناشی از سرطان اشاره کرد (۲). بنابراین، در دهه گذشته، روش های جدیدی در درمان سرطان پدیدار شده است که از جمله آن ها درمان هایی است که ریشه در زیر گروه بافت شناسی و اعمال نفوذ بر ریز تومورها دارد (۳). یکی از روش های جایگزین درمان تومور، درمان از طریق دستگاه عروقی است که ریشه در این واقعیت دارد که آنژیوژنز^۲ (فرایندی فیزیولوژیکی که در آن رگ های جدید از رگ های موجود ایجاد می شوند)، نقشی حیاتی در توسعه، پیشرفت و متاستاز تومور جامد دارد (۴). آنژیوژنز با تامین اکسیژن، مواد مغذی، عوامل رشدی، آنزیم های پروتئولیزی، عوامل انعقادی و عوامل فیبرینولیزی، از رشد تومور حمایت می کند (۵).

در سال ۱۹۷۱، فولکمن^۳ و همکارانش، عوامل اصلی موثر در آنژیوژنز تومور، را شناسایی کردند و با مهار آن عوامل، توانستند استراتژی گرسنگی تومور و مرگ آن را در درمان بیماری استفاده کنند (۶).

در ۱۰ سال گذشته، بسیاری از هدف های بالقوه آنتی آنژیوژنری با کشف پیایی عواملی مانند عامل رشد فیبروبلاستی، ماتریکس متالوپروتئیناز، سلول های استرومای وابسته به تومور و مولکول های چسبان به سرانجام رسید (۷). در این میان، VEGFs^۴، نقش کلیدی در آنژیوژنز دارد (۸). دانشمندان، تنظیم مقادیر VEGF ناشی از هیپوکسی را نیروی محرک اصلی آنژیوژنز در مسیر پیشرفت تومور بیان کرده اند (۹). VEGF، باعث افزایش نفوذپذیری عروق می شود. افزایش نفوذپذیری عروق، خروج پروتئین های پلاسما می و ورود آن ها به فضای میان بافتی را به دنبال دارد که منجر به مهاجرت و تکثیر سلول های اندوتلیالی و آنژیوژنز شود (۱۰). بنابراین، بسیاری از مهارکننده های رگ زایی VEGFs یا گیرنده آن هدف پژوهش قرار می گیرند (۱۱). بعد از دستگاه VEGF-VEGFR، یکی دیگر از مهم ترین مسیرهای مولکولی درگیر در تنظیم آنژیوژنز و بالیدگی عروق، مسیر Tie2-angiopoietin است که نقش مهمی در تنظیم آنژیوژنز فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد (۱۲). TIE-2^۵ از خانواده گیرنده های تیروزین کینازی (RTK) است (۱۳) و در سلول های اندوتلیال عروقی بیان می شود (۱۴). ANGPT-1^۶ و ANGPT-2^۷ به گیرنده تیروزین کیناز TIE-2 در سطح سلول های اندوتلیال (EC) متصل می شوند. ANGPT-1 که توسط PVC ساخته می شود، به عنوان یک آگونیست TIE-2 عمل می کند. هنگامی که ANGPT-1 به گیرنده TIE-2 متصل می شود، گیرنده TIE-2 از راه فسفوردار شدن خودکار فعال می شود و با تقویت تعامل بین سلول های اندوتلیالی، پریوسیت ها و ماتریکس برون سلولی، پایداری رگ را تضمین می کند (۱۵). برعکس، پیوند خوردن ANGPT-2 به TIE-2، مانع از فسفوریلاسیون آن می شود و جایگاه پیوندی ANGPT-1 را مسدود می کند (۱۶). ANGPT-1 نوعاً در بافت های طبیعی بیان می شود و نقش چشمگیری در حفظ یکپارچگی عروق دارد. برعکس، ANGPT-2 در درجه اول زمانی تولید می شود که آنژیوژنز فعال است یا عروق در حال بازسازی اند. (ANGPT-2) ضمناً در تنظیم توسعه عروق

⁴ Vascular endothelial growth factor

⁵ Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2

⁶ Angiopoietin-1

⁷ Angiopoietin-2

¹ The age-standardized incidence rates

² Angiogenesis

³ Folkman

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی و توسعه‌ای بود که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. همه اصول اخلاقی پژوهش حاضر طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب و مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی به شماره IR.SSRI.REC.1398.595 رعایت شد. در پژوهش حاضر، پس از هماهنگی‌های اولیه، ۱۶ سر موش ماده بلب سی (۳ تا ۵ هفته با میانگین وزن 18 ± 2) از مرکز انستیتو پاستور تهیه شد. این حیوانات پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید به طور تصادفی به ۲ گروه کنترل (T) (ایجاد تومور سرطان سینه) و گروه مکمل کوئرستین (TQ) (ایجاد تومور سرطان سینه و مصرف مکمل کوئرستین) تقسیم شدند. پس از انتقال آزمودنی‌ها به محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته (هفته‌ی اول) جهت تطابق با محیط جدید به صورت گروه‌های ۵ سر موش در قفسه‌های پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد $43 \times 27 \times 25$ سانتی متر در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی دوره پژوهش نیز حیوانات از غذای ساخت شرکت بهپرور به صورت پلت، که به صورت آزاد در دسترس موش‌ها قرار داشت، مصرف می‌کردند. ضمناً آب مورد نیاز حیوان نیز به صورت آزاد و از طریق بطری‌های ویژه در دسترس قرار داده شد. پس از یک هفته آشناسازی با محیط، سلول‌های سرطانی به موش‌ها تزریق شد و پروتکل مصرف مکمل کوئرستین ۱۰ روز پس از تزریق سلول‌های سرطانی آغاز شد. گروه کوئرستین، ۶ هفته، ۳ روز در هفته مکمل کوئرستین را با دوز 110 mg/kg وزن بدن به صورت IP دریافت کردند.

کشت سلول و نحوه ایجاد تومور: توموری که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت از نوع آدنوکارسینومای موشی بود که به وسیله تزریق یک میلیون سلول آدنوکارسینومای گیرنده استروژن مثبت MC4-L2 (ER+) به صورت زیر جلدی در موش‌ها ایجاد شد. سلول‌های MC4L2 در محیط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به میزان معینی از سلول، در فلاسک‌های سایز T75 حاوی محیط کشت FBS، DMEM/F-12، $100 \mu\text{g/ml}$ و پنی‌سیلین $100 \mu\text{g/ml}$ کشت داده شدند و برای

لنفای درگیر می‌شود (۱۷). مطالعات جدید نیز نشان می‌دهد ANGPT-2 می‌تواند مثل میانجی عمل کند که مستقیم باعث مقاومت در برابر تاثیر درمانی ANTI-VEGF در سرطان پستان می‌شود (۱۸). برای ایجاد پایداری طبیعی عروق، در برابر ANGPT-1، VEGF ضروری است (۱۹). افزایش ANGPT-2، این فرایند را مختل می‌کند (۲۰). بنابراین، در تومورهای جامد، کاهش نسبت ANGPT-1 به ANGPT-2 و کاهش فعالیت TIE-2 در مسیر TIE2-angiopoitin، باعث عوامل ناهنجار مهمی در رگ‌های توموری می‌شود. در سال‌های اخیر، تعدادی از داروها با هدف قرار دادن عروق تومور غیرطبیعی ناشی از فعالیت بیش از حد ANGPT-2، به درمان تومور کمک کرده‌اند (۱۲).

یکی از راه‌کارهای اصلی کاهش آنژیوژنز در بافت تومور، استفاده از مواد غذایی و مکمل‌های غذایی است که در این بین مکمل پلی فنولی کوئرستین^۸ به دلیل داشتن ویژگی‌های ضد اکسایشی و فعالیت آنتی توموری، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. کوئرستین، فلاونوئید فعالی با وزن مولکولی 302.24 g/mol ، سال‌ها است که به عنوان ترکیبی مهم در طب سنتی چینی شناخته شده است و در میوه‌ها و سبزیجاتی همچون پیاز قرمز، سیب، چای، کلم بروکلی، انگور قرمز و تعدادی از انواع توت‌ها وجود دارد (۲۱). در این میان، پیاز دارای بالاترین غلظت کوئرستین و فلاونول‌ها است و نشان داده شده است که دارای اثرات مثبتی به منظور کاهش خطر ابتلا به سرطان در معده، روده بزرگ و راست روده است. همچنین گزارش شده است مصرف مواد غذایی غنی از کوئرستین ابتلا به سرطان معده، روده بزرگ، پستان و سرطان ریه را کاهش می‌دهد (۲۲). اثرات آنتی توموری کوئرستین با ایجاد تداخل در فرآیند آنژیوژنز تومور از طریق مهار رشد سلول‌های اندوتلیال اعمال می‌شود (۲۳، ۲۴).

با این حال، عملکرد کوئرستین در توسعه رگ‌های خونی در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی هنوز نامشخص است و نظر به اینکه پژوهشی که آثار مکمل کوئرستین، بر مسیر Tie2_Angiopoitin به همراه VEGF-A در موش‌های مبتلا به سرطان پستان نشان دهد، یافت نشده است، لذا لزوم انجام تحقیقات در این زمینه اجتناب ناپذیر است.

⁸ Quercetin

۷۰- نگهداری شد. پس از آن در آزمایشگاه حدود ۱۰۰ میلی گرم بافت تومور به همراه یک سی سی تریزول در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. سپس مایع رویی برای استخراج RNA به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شد.

مراحل استخراج RNA بر اساس پروتکل تریزول ساخت شرکت Life Technology کشور آمریکا انجام شد. سپس برای رونویسی RNA به cDNA طبق دستور العمل کیت سنتز cDNA، Regent RT، PrimerScript شرکت Takara کشور ژاپن میزان بیان فاکتورهای مورد نظر اندازه گیری شد. مراحل REAL TIME-PCR بر اساس دستورالعمل SYBER-Green شرکت Takara کشور ژاپن انجام شد. از ژن ACTB به عنوان ژن کنترل استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول زیر آمده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن ها

نام ژن	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی
ANGPT-1	CAACACCAACGCTCTGCAAAG	TCTGGGCCATCTCCGACTTC
ANGPT-2	ACTACGACGACTCAGTGCAAAG	TCTGGTTCTGCACCACATTCTG
Tie2	CACCAAGATCCACTGGAGGTTC	GCAGGTAGGAAGGATGCTTGTTG
VEGF-A	GTTTCGGAACCAGACCTCTC	CCAAAGTGCTCCTCGAAGAGTC
ACT-b	CTGTCGAGTCGCGTCCAC	TCATCCATGGCGAACTGGTG

بود، از آزمون ناپارامتریک من ویتنی^{۱۰} استفاده گردید. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل شرح داده شده توسط نرم افزار جنکس^{۱۱} نسخه ۶/۱ (نرم افزار اختصاصی تجزیه و تحلیل داده های Real Time-PCR) صورت گرفت. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

داده های پژوهش نشان می دهد که مکمل سازی کوثرستین موجب کاهش معنادار بیان ANGPT-2، TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش های مبتلا به سرطان پستان می شود. همچنین، مقدار بیان ANGPT-1 افزایش داشته، هر چند که معنادار نبوده است (جدول ۲). در نمودار ۳ دیده می شود که مکمل سازی کوثرستین

شمارش سلول ها از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد (۲۵). پس از شمارش تعداد سلول به هر موش به میزان یک میلیون سلول به صورت زیرجلدی به پهلوی راست موش ها تزریق شد. قبل از تزریق سلول های سرطانی موش ها به وسیله تزریق ترکیب زایلازین و کتامین به صورت زیر جلدی بیهوش شدند.

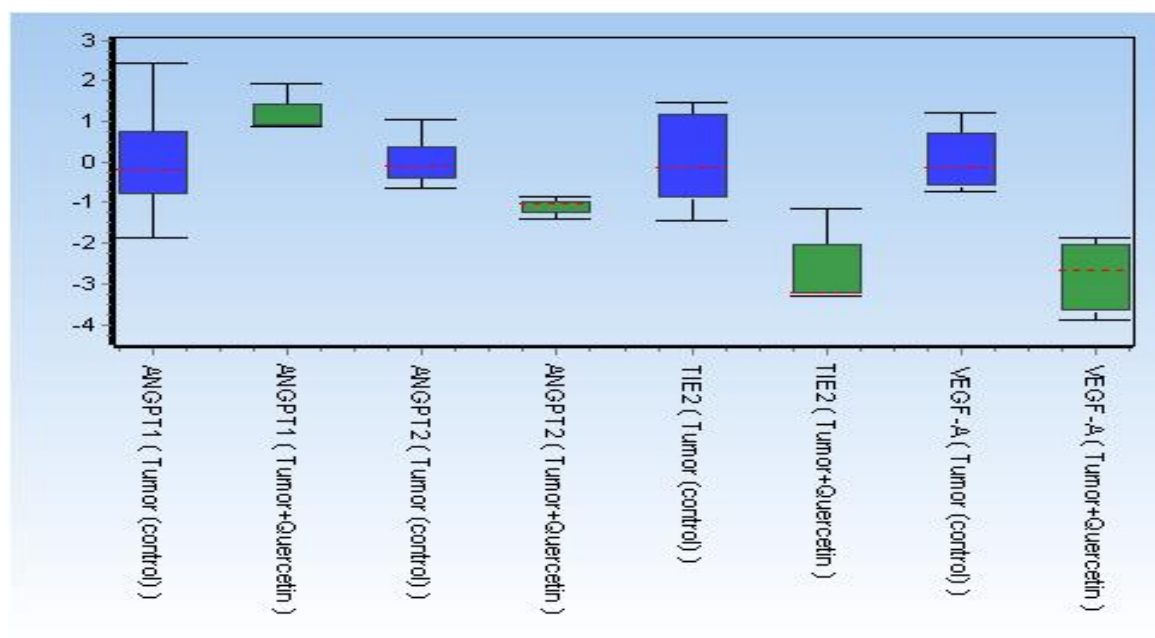
تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی: تمام گروه ها در شرایط کاملاً مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق مکمل کوثرستین) با کتامین و زایلوزین بیهوش شدند و بافت تومور آن ها توسط پنس و قیچی جدا شد و در داخل پلیت دارای PBS استریل قرار گرفت. عروق خونی و بافت چربی اطراف تومور و قسمت مرکزی نکروز شده تومور، حذف شده و تومور به کمک قیچی به قطعات کوچک تر تقسیم شد و در میکروتیوپ های ۰/۵ میلی لیتری قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گشته و در دمای

روش تجزیه و تحلیل داده ها: برای کمی سازی مقادیر بیان ژن، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق CT ژن مربوطه و CT ژن ACT-b (به عنوان ژن رفرنس) محاسبه شد. سپس $\Delta\Delta Ct$ از افتراق ΔCt های به دست آمده و ΔCt گروه کنترل (گروه تومور) محاسبه گردید. (نکته: $\Delta\Delta Ct$ گروه تومور صفر می شود زیرا گروه کنترل است و ΔCt گروه تومور از خودش که گروه کنترل است کم شده است) (نمودار ۱ باکس پلات) و (نمودار ۲) و (جدول ۲). پس از آن Fold Change (به مفهوم چند برابر بیان شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) از فرمول ۲ به توان $-\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد (نمودار ۳) و از آنجایی که پس از بررسی داده های فولد چینج توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف^۹، مشخص گردید که توزیع داده ها غیرطبیعی

¹⁰ Mann-whitney¹¹ GENEX⁹ Kolmogorov-Smirnov Test

معنادر ۶/۹۷ برابری VEGF-A در گروه QT در مقایسه با گروه T ($P<0/00$) شده است. همچنین، بیان ANGPT-1، ۲/۱۸ برابر در گروه QT در مقایسه با گروه T افزایش داشته، اما معنادر نبوده است ($P<0/50$).

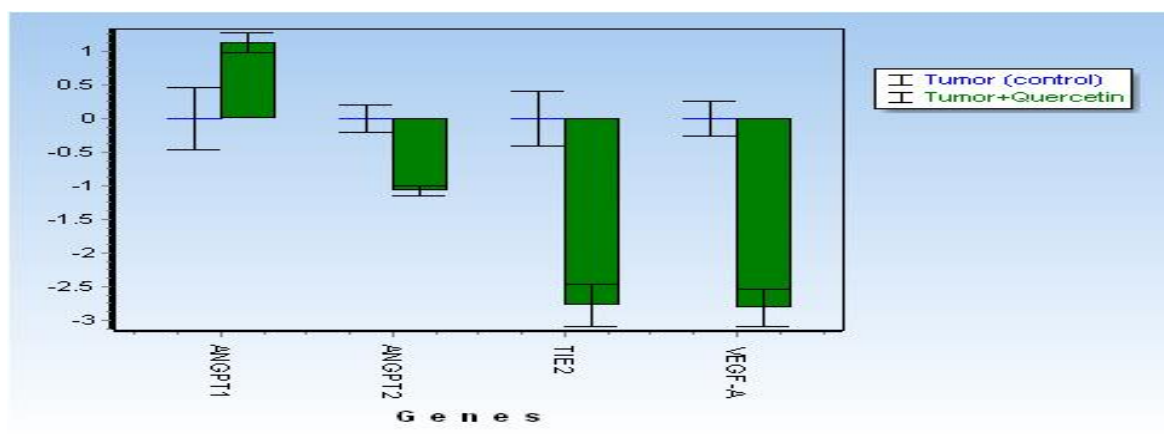
در گروه QT باعث کاهش معنادر در حد ۲/۱۱ برابری (فولد چینج) بیان ANGPT-2 در مقایسه با گروه T ($P<0/00$)، کاهش معنادر ۶/۸۳ برابری بیان TIE-2 در مقایسه با گروه T ($P<0/00$) و کاهش



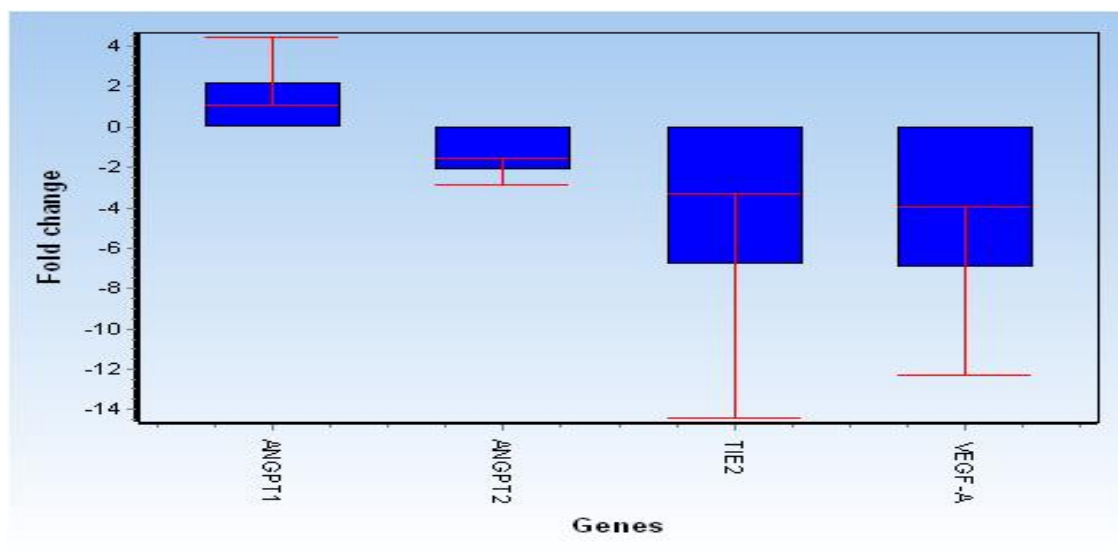
نمودار ۱: Boxplot مقدار بیان متغیرهای پژوهش ($-\Delta\Delta Ct$) بر حسب گروهها

جدول ۲: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد ($-\Delta\Delta Ct$) متغیرهای پژوهش

ANGPT-1	ANGPT-2	TIE-2	VEGF-A	
0.00 ± 1.28	0.00 ± 0.65	0.00 ± 1.12	0.00 ± 0.73	تومور (T)
1.12 ± 0.40	-1.07 ± 0.20	-2.77 ± 0.86	-2.80 ± 0.80	تومور+کوئرستین (TQ)



نمودار ۲: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد ($-\Delta\Delta Ct$) متغیرهای پژوهش



نمودار ۳: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+ کوئرستین (QT) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)

بحث

بیماری سرطان پستان شیوع بالایی دارد و تعدیل آنژیوژنز یکی از راه کارهای مهمی است که در رشد و متاستاز تومور دخیل است، که در این میان، سیستم Tie2-Angiopoietin و VEGF-A از مهم‌ترین مسیرهای آنژیوژنزی است که در تحریک رگ‌زایی و رشد تومور نقش کلیدی دارند. در پژوهش حاضر اثر مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن‌های ANGPT-1، ANGPT-2، TIE-2، VEGF-A، که نقش بسیار موثری در آنژیوژنز تومور دارند، بررسی شد و مشخص گردید که مصرف مکمل کوئرستین باعث کاهش معنادار بیان ژن‌های ANGPT-2 ($P<0/00$)، TIE-2 ($P<0/00$) و VEGF-A ($P<0/00$) و افزایش غیر معنادار ANGPT-1 و در نتیجه کاهش آنژیوژنز در بافت تومور در گروه TQ (تومور-کوئرستین) در مقایسه با گروه T (تومور) شد. اگرچه مکانیسم مرتبط با خواص ضد سرطان کوئرستین کاملاً شناخته نشده است، اما چندین مکانیسم سلولی وجود دارد. این مکانیسم‌های سلولی شامل مهار هسته‌ای عامل-KB (NF-KB) و مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt/IKK/NF-Kb است.

کوئرستین، رونویسی پروتئین شوک حرارتی (HSP) و فاکتور القا شونده هیپوکسی-1 ($HIF-1$) را مهار می‌کند. علاوه بر این، کوئرستین از تهاجم تومور و متاستاز با

سرکوب PKC δ /ERK/AP-1 وابسته به MMP-9 فعال در سلول‌های سرطان پستان جلوگیری می‌کند (۲۲). همچنین مشخص شده است که کوئرستین فعالیت میتوکندری‌ها را در سلول‌های سرطانی کاهش می‌دهد و منجر به کاهش انرژی زیستی و تحریک آپوپتوز درونی می‌شود (۱).

آنژیوژنز تومور یک فرآیند پیچیده است که در رشد و تکثیر سلول‌های تومور نقش مهمی دارد. کوئرستین با مهار رشد رگ‌های خونی می‌تواند نقش ضد توموری ایفا کند. کوئرستین همچنین می‌تواند آنژیوژنز سلول‌های مقاوم به دارو را محدود کرده و اثر داروهای ضد سرطان را افزایش دهد. VEGF_A یک مولکول کلیدی برای رشد و بقای سلول‌های اندوتلیال است که باعث تکثیر سلول‌های اندوتلیال شده و با افزایش نفوذپذیری عروق، فرآیند آنژیوژنز تومور را افزایش می‌دهد (۲۶). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کوئرستین با کاهش ترشح VEGF و سطح MMP از آنژیوژنز و متاستاز جلوگیری می‌کند (۱). همچنین مشخص شده است که کوئرستین در مسیر آنژیوژنزی، VEGF-VEGFR، بیان AKT را سرکوب کرده و رشد تومور را محدود می‌کند (۲۶).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف مکمل کوئرستین باعث کاهش معنادار بیان VEGF-A نسبت به گروه کنترل می‌شود که نتایج پژوهش حاضر با پژوهش داگزیان

مشخص شده است که نسبت به سیگنالینگ VEGF نسبتاً مقاوم تر هستند. از سوی دیگر، ANGPT-2 با ANGPT-1 برای اتصال به TIE-2 رقابت می‌کند و باعث عدم اتصال سلول‌های اندوتلیال به غشاء پایه و پریسیت‌ها و عروق اولیه برای پاسخ به VEGF و پیشرفت آنژیوژنز می‌شود. هیپوکسی نقش مهمی در پیشرفت آنژیوژنز در این مسیر دارد و باعث افزایش بیان ANGPT-2 و کاهش بیان ANGPT-1 می‌شود (۱۰). به علت روابط تنگاتنگ این چهار فاکتور بسیار ضروری است که این عوامل در کنار هم بررسی شوند. اما هیچ پژوهشی که اثر کوثرستین را بر بیان این فاکتورهای آنژیوژنری در بافت تومور در کنار یکدیگر بررسی کرده باشد و هیچ پژوهشی که اثر مکمل کوثرستین را بر بیان فاکتورهای مسیر آنژیوژنری Tie2-angiopoitin (ANGPT-1، ANGPT-2، TIE-2) بررسی کرده باشد یافت نشد. لذا مسیر سیگنالینگ اثرگذاری کوثرستین بر این فاکتورها به طور دقیق مشخص نیست و نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش، مکمل سازی کوثرستین با کاهش بیان ژن‌های آنژیوژنری ANGPT-2، TIE-2 و VEGF-A می‌تواند روند آنژیوژنز بافت تومور را کنترل کند و در نتیجه رشد تومور سرطان پستان را کاهش دهد. از این رو می‌توان مصرف کوثرستین را به عنوان راه‌کاری در کاهش رشد تومور در سرطان پستان پیشنهاد داد. شایان ذکر است که از آجایی‌که هیچ پژوهشی در زمینه بررسی اثر مکمل کوثرستین بر بیان فاکتورهای مسیر آنژیوژنری Tie2-Angiopoietin یافت نشد، تفسیر نتایج در این زمینه دشوار است. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی فاکتورها و دیگر عوامل درگیر در فرآیند آنژیوژنز برای روشن شدن مکانیسم اثر، مورد ارزیابی قرار گیرند. علاوه بر این پیشنهاد می‌گردد تاثیر دوزهای مختلف مکمل کوثرستین بر مقدار بیان این فاکتورها بررسی شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

ژائو^{۱۲} و همکارانش و لینگکوان^{۱۳} و همکارانش همسو بود. داگزیان ژائو^{۱۴} و همکارانش فعالیت‌های آنتی آنژیوژنیک کوثرستین را در جنین گورخرماهی و در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسانی^{۱۵} (HUVECs) بررسی کردند. نتایج نشان داد که کوثرستین، تشکیل عروق اینترسگمنتال^{۱۶}، آئورت پشتی و ورید اصلی خلفی جنین گورخرماهی تراریخته را مختل می‌کند. در HUVECs، کوثرستین حیات سلول را مختل کرده، بیان گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ۲ و تشکیل عروق جدید را مهار می‌کند. این مطالعه نشان داده است که کوثرستین دارای فعالیت آنتی آنژیوژنیک قوی است و ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان برای تحقیقات آینده، گزینه مناسبی باشد (۲۱). همچنین لینگکوان^{۱۷} و همکارانش نیز تاثیر مهاری کوثرستین بر آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان را بررسی کردند و گزارش نمودند که مصرف ۲۸ هفته کوثرستین به میزان ۳٪ وعده غذایی موش‌ها، باعث کاهش بیان فاکتورهای رشد مربوط به آنژیوژنز مانند فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و کاهش تولید پروتئین H-ras و مهار آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود و نتیجه گرفتند که کوثرستین از طریق دو مکانیسم مهار سنتز پروتئین H-ras و مهار بیان فاکتورهای رشد مرتبط با آنژیوژنز از جمله VEGF و bFGF، باعث مهار تکثیر سلول‌های توموری و آنژیوژنز تومور می‌شود (۲۷).

علاوه بر VEGF-A، در پژوهش حاضر تاثیر مکمل کوثرستین بر فاکتورهای آنژیوژنری ANGPT-2، TIE-2، ANGPT-1 و 1 نیز بررسی شد. همانطور که بیان شد TIE-2، توسط دو لیگاند اولیه ANGPT-1 و ANGPT-2 تنظیم می‌شود. ANGPT-1، گیرنده را فعال می‌کند و موجب استحکام و پایداری اتصالات بین سلولی و اتصالات میان سلول‌های اندوتلیال با غشاء پایه و سلول‌های حمایت کننده عروق مانند پریسیت‌ها و سلول‌های عضله صاف عروق می‌شود. در عروقی که سطوح بالای اتصال ANGPT-1 به TIE-2 رخ می‌دهد،

¹² Daxian Zhao

¹³ Lingquan

¹⁴ Daxian Zhao

¹⁵ Embryos and in human umbilical vein endothelial cells

¹⁶ Intersegmental

¹⁷ Lingquan

References

1. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(13):3177.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(1):16-27.
3. Singh SR, Rameshwar P, Siegel P. Targeting tumor microenvironment in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2016; 380(1):203-4.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74
5. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp*. 1991; 22:339-47.
6. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine*. 2008; 358(19): 2039-49.
7. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(7):505-14.
8. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6):669-76.
9. Carmeliet P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*. 2005; 69(3): 4-10.
10. Teicher, Beverly A., Ellis, Lee M, editors. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. 2nd ed. Texas: Humana Press; 2008. 208-12.
11. Blaschuk OW. Discovery and development of N-cadherin antagonists. *Cell Tissue Res*. 2012; 348(2):309-13.
12. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, et al. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(8):575-85.
13. Peters KG, Kontos CD, Lin PC, et al. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res*. 2004; 59:51-71.
14. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*. 1993;119(3):957-68.
15. Pryor JS, Montani JP, Adair TH. Angiogenic growth factor responses to long-term treadmill exercise in mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2010; 54(4):309-17.
16. Gamble JR, Drew J, Trezise L, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res*. 2000; 87(4):603-7.
17. Koh YJ, Kim HZ, Hwang SI, et al. Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage. *Cancer Cell*. 2010;18(2):171-84.
18. Rigamonti N, Kadioglu E, Keklikoglou I, et al. Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. *Cell Rep*. 2014; 8(3):696-706.
19. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*. 2004 ;6(6):553-63.
20. Chae SS, Kamoun WS, Farrar CT, et al. Angiopoietin-2 interferes with anti-VEGFR2-induced vessel normalization and survival benefit in mice bearing gliomas. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(14):3618-27.
21. Zhao D, Qin C, Fan X, et al. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2014; 723: 360-67.
22. Smith AJ, Oertle J, et al. Quercetin: A Promising Flavonoid with a Dynamic Ability to Treat Various Diseases, Infections, and Cancers. *Journal of Cancer Therapy*. 2016; 7: 83-95.
23. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, et al. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett*. 2001;171(1):11-16.
24. Tan WF, Lin LP, Li MH, et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur J Pharmacol*. 2003; 459(2-3):255-62.
25. Amani-Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014; 17(4): 231-6.
26. Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother*. 2020; 121:109604.
27. Lingquan Ko, Kainan Wu, Hu, et al. Inhibitory Effects of Quercetin on Angiogenesis of Experimental Mammary Carcinoma. *Chinese journal of clinical oncology*. 2005; 29(3):631-36.
28. Raeisi A, National Report of the National Cancer Registration Program in 2015, Tehran: Mirmahmeh; 2017.