Iranian Journal of Breast Diseases. 2020; 13(3):43-51.

Original Article

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

Jalali Z[1], Shahidi F[2*], Ramezani A[2], Gaeini A[3], Alizadeh Sh[4]

[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. ΔCt, ΔΔCt, 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

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۵۱-٤٤ :(۳)۱۳ ؛۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

تاثیر ۶ هفته مکمل سازی کوئرستین بر بیان برخـــی شـــاخص‌هـــای آنژیوژنزی بافت تومور در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

زهره جلالی[۱]، فرشته شهیدی[۲*]، علیرضا رمضانی[۲]، عباسعلی گائینی[۳]، 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

تاریخ ارسال: ۹۸/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۵

* **نویسنده مسئول:**
fereshteh_shahidi98@yahoo.com

چکیده

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

روش بررسی: به ۱۶ سر موش بالب 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. ΔCt، ΔΔCt، 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 احتمالا باعث مهار آنژیوژنز تومور و در نتیجه رشد تومور پستان می‌شود.

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

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ در جهان به شمار می‌رود. در سال ۲۰۱۸، ۱۸/۱ میلیون مورد جدید سرطان و ۹/۶ میلیون مرگ ناشی از بیماری سرطان گزارش شده است. در بین انواع سرطان‌ها، سرطان پستان (۱۱/۶٪) و ریه (۱۱/۶٪)، بیشترین شیوع را در سراسر جهان داشتند. بیماری سرطان، آثار زیان‌بار 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 تریلون دلار بوده است (۱). براساس آخرین آمار بروز استاندارد شده سنی[1] (ASIR) سرطان در ایران، در سال ۱۳۹۴، موارد ابتلا به سرطان‌ها در مردان و زنان، به ترتیب ۱۶۸ و ۱۳۶ نفر در ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. شایع‌ترین سرطان در مردان و زنان به ترتیب سرطان معده و سرطان پستان بود (۲۸).

اغلب روش‌های درمان تومور شامل ترکیبی از جراحی، شیمی‌درمانی و یا پرتودرمانی است. با وجود این، چالش‌های گوناگونی در شیمی‌درمانی کلاسیک وجود دارد که از جمله آن‌ها عوارض جانبی زیان‌بار و در نتیجه مرگ ناشی از سرطان اشاره کرد (۲). بنابراین، در دهه گذشته، روش‌های جدیدی در درمان سرطان پدیدار شده است که از جمله آن‌ها درمان‌هایی است که ریشه در زیر گروه بافت شناسی و اعمال نفوذ بر ریز تومورها دارد (۳). یکی از روش‌های جایگزین درمان تومور، درمان از طریق دستگاه عروقی است که ریشه در این واقعیت دارد که آنژیوژنز[2] (فرایندی فیزیولوژیکی که در آن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود ایجاد می‌شوند)، نقشی حیاتی در توسعه، پیشرفت و متاستاز تومور جامد دارد (۴). آنژیوژنز با تامین اکسیژن، مواد مغذی، عوامل رشدی، آنزیم‌های پروتئولیزی، عوامل انعقادی و عوامل فیبرینولیزی، از رشد تومور حمایت می‌کند (۵).

در سال ۱۹۷۱، فولکمن[3] 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 هدف‌های بالقوه آنتی آنژیوژنزی با کشف پیاپی عواملی مانند عامل رشد فیبروبلاستی، ماتریکس متالوپروتئیناز، سلول‌های استرومای وابسته به تومور و مولکول‌های چسبان به سرانجام رسید (۷). در این میان، VEGFs[4]، نقش کلیدی در آنژیوژنز دارد (۸). دانشمندان، تنظیم مقادیر VEGFناشی از هیپوکسی را نیروی محرک اصلی آنژیوژنز در مسیر پیشرفت تومور بیان کرده‌اند (۹). VEGF، باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود. افزایش نفوذپذیری عروق، خروج پروتئین‌های پلاسمایی و ورود آن‌ها به فضای میان بافتی را به‌دنبال دارد که منجر به مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی و آنژیوژنز شود (۱۰). بنابراین، بسیاری از مهارکننده‌های رگ‌زایی VEGFs یا گیرنده آن هدف پژوهش قرار می‌گیرند (۱۱). بعد از دستگاه VEGF-VEGFR، یکی دیگر از مهم‌ترین مسیرهای مولکولی درگیر در تنظیم آنژیوژنز و بالیدگی عروق، مسیر Tie2-angiopoitin است که نقش مهمی در تنظیم آنژیوژنز فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد (۱۲). TIE-2[5] از خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی (RTK) است (۱۳) و در سلول‌های اندوتلیال عروقی بیان می‌شود (۱۴). ANGPT-1[6] و ANGPT-2[7] به گیرنده تیروزین کیناز TIE-2 در سطح سلول‌های اندوتلیال (EC) متصل می‌شوند. ANGPT-1 که توسط PVCها ساخته می‌شود، به‌عنوان یک آگونیست TIE-2 عمل می‌کند. هنگامی که ANGPT-1 به گیرنده TIE-2 متصل می‌شود، گیرنده TIE-2 از راه فسفوردار شدن خودکار فعال می‌شود و با تقویت تعامل بین سلول‌های اندوتلیالی، پریوسیت‌ها و ماتریکس برون سلولی، پایداری رگ را تضمین می‌کند (۱۵). برعکس، پیوند خوردن ANGPT-2 به TIE-2، مانع از فسفوریلاسیون آن می‌شود و جایگاه پیوندی ANGPT-1 را مسدود می‌کند (۱۶). ANGPT-1 نوعاً در بافت‌های طبیعی بیان می‌شود و نقش چشمگیری در حفظ یکپارچگی عروق دارد. برعکس، ANGPT-2 در درجه اول زمانی تولید می‌شود که آنژیوژنز فعال است یا عروق در حال بازسازی‌اند. (ANGPT-2 ضمنا در تنظیم توسعه عروق

[1] The age-standardized incidence rates
[2] Angiogenesis
[3] Folkman

[4] Vascular endothelial growth factor
[5] Tyrosine kinase whit immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
[6] Angiopoietin-1
[7] Angiopoietin-2

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

لنفاوی 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 VEGF، ANGPT-1 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[8] 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 فلاونول ها 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 کورستین 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

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 بالب سی (۳ تا ۵ هفته با میانگین وزن ۲±۱۸) 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 ۲۵×۲۷×۴۳ 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. ضمنا 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 ۱۱۰ 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 (ER+) MC4-L2 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 DMEM/F-12، FBS ۱۰٪ و پنی‌سیلین 100 µg/ml، کشت داده شدند و برای

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

شمارش سلول‌ها 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 موش‌ها تزریق شد. قبل از تزریق سلول‌های سرطانی موش‌ها به وسیله تزریق ترکیب زایلازین و کتامین به صورت زیر جلدی بیهوش شدند.

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی: تمام گروه‌ها در شرایط کاملا مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق مکمل کوئرستین) با کتامین و زایلوزین بیهوش شدند و بافت تومور آن‌ها 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 کوچک‌تر تقسیم شد و در میکروتیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گشته و در دمای ۷۰- نگهداری شد. پس از آن در آزمایشگاه حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تومور به همراه یک سی‌سی ترایزول در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. سپس مایع رویی برای استخراج RNA به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شد.

مراحل استخراج RNA بر اساس پروتکل ترایزول ساخت شرکتLife 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 اندازه‌گیری 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.

جدول۱: توالی پرایمرهای ژن‌ها

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

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای کمی‌سازی 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 ΔΔCt از افتراق ΔCtهای به دست آمده و ΔCt گروه کنترل (گروه تومور) محاسبه گردید. (نکته: ΔΔCt گروه تومور صفر می‌شود 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 ΔΔCt- محاسبه شد (نمودار ۳) و از آنجایی که پس از بررسی داده‌های فولد چینج توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف[9]، مشخص گردید که توزیع داده‌ها غیرطبیعی بود، از آزمون ناپارامتریک من ویتنی[10] استفاده گردید. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل شرح داده شده توسط نرم‌افزار جنکس[11] نسخه ۶/۱ (نرم‌افزار اختصاصی تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time- PCR) صورت گرفت. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

داده‌های پژوهش نشان می‌دهد که مکمل سازی کوئرستین موجب کاهش معنادار بیان ANGPT-2، TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود. همچنین، مقدار بیان ANGPT-1 افزایش داشته، هر چند که معنادار نبوده است (جدول ۲). در نمودار ۳ دیده می‌شود که مکمل سازی کوئرستین

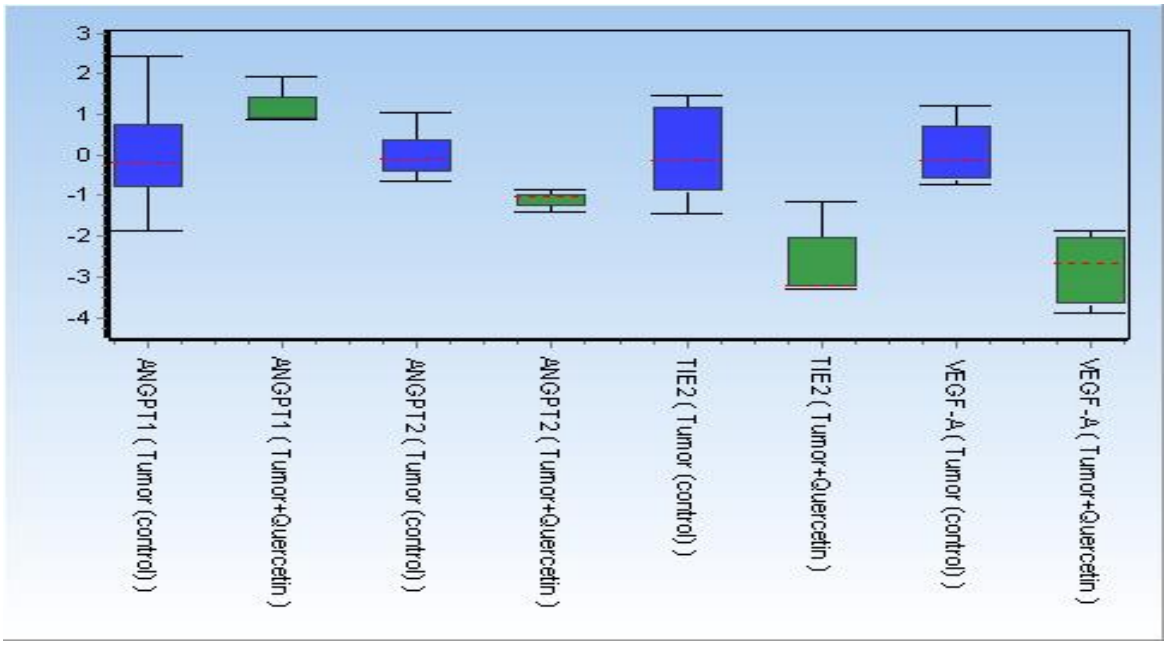
[9] Kolmogorov-Smirnov Test

[10] Mann-whitney

[11] GENEX

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

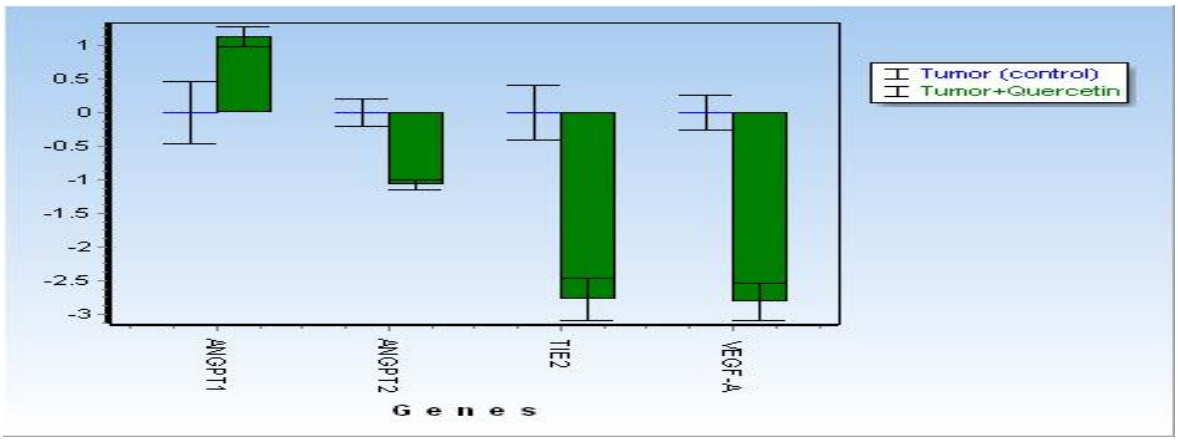
در گروه QT باعث کاهش معنادار در حد ۲/۱۱ برابری (فولد چینج) بیان ANGPT-2 در مقایسه با گروه T (P<0/00)، کاهش معنادار ۶/۸۳ برابری بیان TIE-2 در گروه QT در مقایسه با گروه T (P<0/00) و کاهش معنادار ۶/۹۷ برابری VEGF-A در گروه QT در مقایسه با گروه T(P<0/00) شده است. همچنین، بیان ANGPT-1، ۲/۱۸ برابر در گروه QT در مقایسه با گروه T افزایش داشته، اما معنادار نبوده است (P<0/50).



نمودار۱: Boxplot مقدار بیان متغییرهای پژوهش (ΔΔCt-) برحسب گروه‌ها

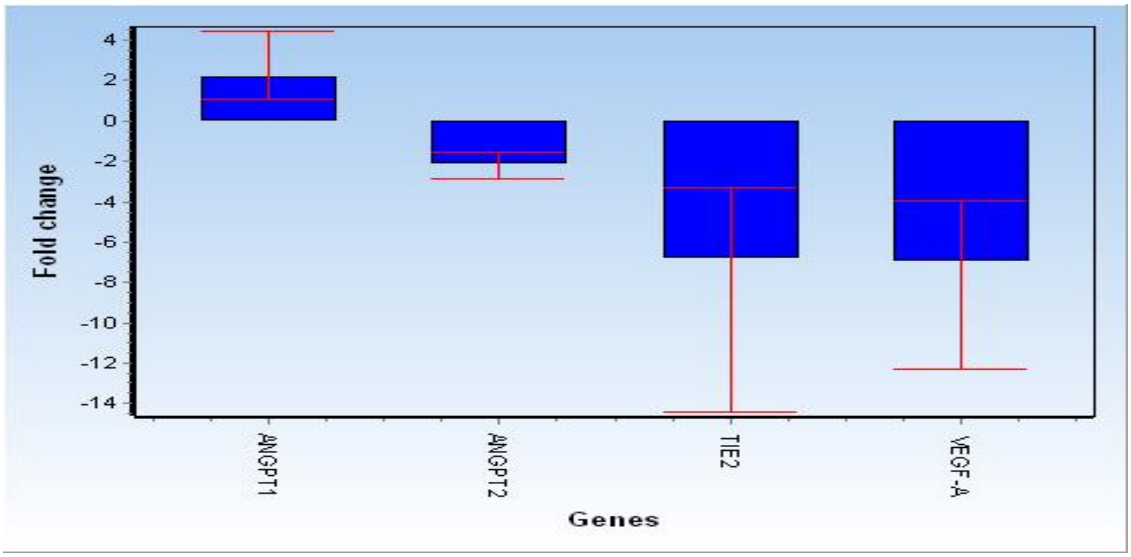
جدول۲: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (ΔΔCt-) متغییرهای پژوهش

	VEGF-A	TIE-2	ANGPT-2	ANGPT-1
تومور (T)	۰/۰۰±۰/۷۳	۰/۰۰±۱/۱۲	۰/۰۰±۰/۶۵	۰/۰۰±۱/۲۸
تومور+کوئرستین(TQ)	-۲/۸۰±۰/۸۰	-۲/۷۷±۰/۸۶	-۱/۰۷±۰/۲۰	۱/۱۲±۰/۴۰



نمودار۲: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (ΔΔCt-) متغییرهای پژوهش

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]



نمودار ۳: نسبت بیان متغییرها 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 متاستار 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 کاملا 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-۱ (HIF-1) را مهار می‌کند. علاوه بر این، کوئرستین از تهاجم تومور و متاستاز با سرکوب PKCδ/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، فرآیندآنژیوژنز 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

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

ژائو[12]و همکارانش و لینگکوان[13] و همکارانش همسو بود. داگزیان ژائو[14]و همکارانش فعالیت‌های آنتی آنژیوژنیک کوئرستین را در جنین گورخرماهی و در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسانی[15] (HUVECs) بررسی کردند. نتایج نشان داد که کوئرستین، تشکیل عروق اینترسگمنتال[16]، آئورت پشتی و ورید اصلی خلفی جنین گورخرماهی تراریخته را مختل می‌کند. در HUVECs، کوئرستین 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 کوئرستین دارای فعالیت آنتی‌آنژیوژنیک قوی است و ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان برای تحقیقات آینده، گزینه مناسبی باشد (۲۱). همچنین لینگکوان[17] و همکارانش نیز تاثیر مهاری کوئرستین بر آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان را بررسی کردند و گزارش نمودند که مصرف ۲۸ هفته کوئرستین 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 کوئرستین 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 کوئرستین بر فاکتورهای آنژیوژنزی TIE-2، ANGPT-1 و ANGPT-2 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 غشا 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، مشخص شده است که نسبت به سیگنالینگ VEGF نسبتا 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 کوئرستین را بر بیان این فاکتورهای آنژیوژنزی در بافت تومور در کنار یکدیگر بررسی کرده باشد و هیچ پژوهشی که اثر مکمل کوئرستین را بر بیان فاکتورهای مسیر آنژیوژنزی Tie2-angiopoitin (TIE-2، ANGPT-1، ANGPT-2) بررسی کرده باشد یافت نشد. لذا مسیر سیگنالینگ اثرگذاری کوئرستین بر این فاکتورها به طور دقیق مشخص نیست و نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش، مکمل سازی کوئرستین با کاهش بیان ژن‌های آنژیوژنزی TIE-2،ANGPT-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 کوئرستین را به عنوان راه‌کاری در کاهش رشد تومور در سرطان پستان پیشنهاد داد. شایان ذکر است که از آنجایی‌که هیچ پژوهشی در زمینه بررسی اثر مکمل کوئرستین بر بیان فاکتورهای مسیر آنژیوژنزی 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 کوئرستین بر مقدار بیان این فاکتورها بررسی شود.

تعارض منافع

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

[12] Daxian Zhao
[13] Lingquan
[14] Daxian Zhao
[15] Embryos and in human umbilical vein endothelial cells
[16] Intersegmental
[17] Lingquan

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]

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.

[Downloaded from ijbd.ir on 2028-01-08]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.3.1.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.13.3.43]