

Effects of Quercetin on Signaling Proteins (pSTAT3, pERK1/2, pAKT) and Interleukin-6 Gene Expression in Prostate Cancer PC3 cells

Esfandiar Heidarian¹,
Sayed Asadollah Amini²,
Akram Abbasi-Veldani³,
Keihan Ghatreh-Samani⁴

¹ Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

² Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

³ MSc in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁴ Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received May 9, 2016 ; Accepted September 6, 2016)

Abstract

Background and purpose: Interleukin-6 (IL-6) causes the progression of prostate cancer through pSTAT3, pERK1/2, and pAKT cell signaling proteins. Quercetin, an herbal antioxidant, has anti-tumor effect. The aim of this study was to evaluate the effects of quercetin on IL-6 gene expression, and the above cellular signaling proteins in PC3 prostate cancer cells.

Materials and methods: In this experimental study, PC3 cells were treated with different concentrations of quercetin at 0, 10, 50, and 100 μ M. Then, IL-6 concentration was determined in cell culture media. Also, total RNA and the cellular signaling proteins aforementioned were extracted from PC3 and used for determining IL-6 gene expression by quantitative real-time RT-PCR and western blot analysis, respectively.

Results: The quercetin IC₅₀ for PC3 prostate cancer cells was 100 μ M. Elevation of quercetin concentration in cell culture media increased the IL-6 gene expression and protein synthesis. At 50 and 100 μ M of quercetin, IL-6 protein synthesis increased significantly ($P < 0.05$) to 13.36% and 36.86%, respectively, compared to those in control. Furthermore, quercetin suppressed pSTAT3, pERK1/2, and pAKT cell signaling proteins at dose concentrations more than 150 μ M.

Conclusion: The effects of quercetin on PC3 cells could have resulted from reduction of pSTAT3, pERK1/2, pAKT, induction of the oxidative stress and generation of reactive oxygen species. Therefore, quercetin can be considered as a useful therapeutic agent in treatment of prostate cancer.

Keywords: interleukin-6, cell line PC3, prostate cancer, quercetin, pSTAT3, pERK1/2, pAKT

ارزیابی اثرات کوئرستین بر پروتئین های سیگنالی pSTAT3، pAKT، pERK1/2 و بیان ژن اینترلوکین-۶ (IL-6) در رده سلول های سرطانی پروستات PC3

اسفندیار حیدریان^۱سیداسدالله امینی^۲اکرم عباسی ولدانی^۳کیهان قطره سامانی^۴

چکیده

سابقه و هدف: IL-6 به واسطه پروتئین های سیگنالی مسیره های pSTAT3، pERK1/2 و pAKT باعث پیشرفت سرطان پروستات می گردد. کوئرستین یک آنتی اکسیدان گیاهی با خواص ضد سرطانی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر کوئرستین بر بیان ژن IL-6، پروتئین های سیگنالی فوق الذکر در رده سلول های سرطانی PC3 پروستات می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های PC3 با غلظت های مختلف ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین تیمار شدند. سپس غلظت IL-6 در محیط های کشت اندازه گیری شد. هم چنین Total RNA و پروتئین های سیگنالی فوق الذکر از سلول های PC3 استخراج و به ترتیب مورد استفاده برای بیان ژن IL-6 به وسیله Real time RT PCR و Western blot قرار گرفتند.

یافته ها: IC₅₀ کوئرستین برای سلول های سرطانی PC3 معادل ۱۰۰ میکرومولار بود. افزایش غلظت کوئرستین در محیط کشت سلول ها منجر به افزایش بیان ژن و سنتز پروتئین IL-6 گردید. سنتز پروتئین IL-6 در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوئرستین به ترتیب به میزان ۱۳/۳۶ و ۳۶/۸۶ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت (p < ۰/۰۵). هم چنین، کوئرستین در غلظت بالاتر از IC₅₀ باعث کاهش پروتئین های pSTAT3، pERK1/2 و pAKT مسیره های سیگنالی داخل سلولی شد.

استنتاج: اثرات کوئرستین بر روی سلول های PC3 احتمالاً می تواند ناشی از کاهش پروتئین های pSTAT3، pAKT، pERK1/2، القاء استرس اکسیداتیو و تشکیل گونه های فعال اکسیژن باشد. بنابراین، کوئرستین می تواند به عنوان یک ماده درمانی سودمند در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اینترلوکین-۶، رده سلولی PC3، سرطان پروستات، کوئرستین، pSTAT3، pERK1/2، pAKT

مقدمه

سرطان پروستات (Prostate cancer, PC) به عنوان دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین مردان ایالات متحده آمریکا می باشد. این بیماری افزایش قابل ملاحظه ای در دو دهه گذشته در آسیا نشان داده است (۲،۱).

E-mail: heidarian46@yahoo.com

مؤلف مسئول: اسفندیار حیدریان - شهر کرد: مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۱. استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۳. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۱۶

تأثیرات آندروژنی در طول زمان بر سرطان‌زایی و پیشرفت سرطان پروستات به خوبی شناخته شده است. تکثیر سلول‌های سرطان پروستات در آغاز وابسته به هورمون آندروژن می‌باشد و معمولاً درمان از طریق محروم‌سازی آندروژن می‌باشد و منجر به بهبود نسبی بیماری می‌گردد (۲۱). اما بعد از مدتی سلول‌های سرطانی پروستات نسبت به این روش درمان مقاوم می‌شوند و تومور دوباره رشد خود را آغاز می‌کند، در حالی که دیگر برای تکثیر نیازی به حضور هورمون آندروژن ندارد و در نتیجه روش محروم‌سازی از آندروژن دیگر نمی‌تواند منجر به بهبود نسبی بیماری گردد. در این مرحله از بیماری، رشد غیر قابل کنترل و متاستاز فعال سلول‌های بدخیم شدید می‌باشد (۳-۱). اینترلوکین ۶ (IL-6) یک سایتوکین التهابی چند فنوتیپی با وزن مولکولی ۲۸-۲۱ کیلو دالتون می‌باشد که در رشد سلولی، تمایز سلولی، آپوپتوز، آنژیوژنز و فعالیت گیرنده‌های آندروژنی دخالت دارد. این سایتوکین باعث دامنه‌ای از پاسخ‌های چند عملکردی از مهار تکثیر تا ارتقاء بقای سلولی می‌شود. یافته‌های اخیر اثبات می‌کنند در رده‌های سلولی سرطان پروستات انسانی، PC3 و DU-145 اینترلوکین ۶ به‌عنوان یک فاکتور رشد اتوکراین و پاراکراین عمل می‌کند (۶-۴). از طرف دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان IL-6 باعث افزایش رشد سلول‌های آدنوکارسینوم حساس به آندروژن پروستات مانند LNCap در شرایط *in vivo* و *in vitro* می‌شود. هم‌چنین، IL-6 با افزایش بیان mRNA مربوط به ژن Androgen-regulated prostate-specific antigen باعث افزایش رشد سلول‌های سرطان پروستات و حفاظت این سلول‌های سرطانی در برابر آپوپتوز و مرگ ناشی از توقف سیکل سلولی در بیماران محروم‌سازی شده از آندروژن می‌شود (۷،۶). علاوه بر این اثبات شده که IL-6 در سلول‌های سرطانی پروستات باعث افزایش فعالیت گیرنده آندروژنی و تحریک بیان ژن

Prostate-Specific Antigen (PSA) می‌گردد (۹۸). از سوی دیگر، IL-6 بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های Steroidogenic مانند AKR1C3 و HSD3B2 و فعالیت گیرنده آندروژنی متصل شونده به هسته را در غلظت پایینی از آندروژن افزایش می‌دهد که در نهایت منجر به سنتز آندروژن داخل پروستات می‌شود و به این ترتیب آندروژن مورد نیاز گیرنده آندروژنی تأمین می‌شود (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که IL-6 می‌تواند چندین مسیر سیگنالی مهم درون سلولی از جمله ERK، JAK-STAT، Src، MAPK، β -catenin، erbB1-3 و PI3k-AKT را در سلول‌های سرطان پروستات فعال کند و به این طریق باعث ایفای اثرات خود و باعث پیشرفت این سرطان گردد (۱۱). از طرف دیگر، مهار IL-6 نه تنها باعث افزایش آپوپتوز بلکه باعث مهار تکثیر سلول در تومور پروستات می‌شود و از بیان کوفاکتورهای گیرنده آندروژنی جلوگیری می‌کند (۱۲). بنابراین، تحقیقات بر روی عوامل موثر بر کاهش بیان IL-6 و مهار مسیرهای سیگنالی آن می‌تواند در مهار پیشرفت سرطان پروستات موثر باشد.

کوئرستین (Quercetin) یک محصول پلی‌فنلی و جزء فراوان‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات خانواده فلاونوئیدها محسوب می‌شود. کوئرستین دارای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بین فلاونوئیدها می‌باشد، به طوری که در مقایسه با ویتامین ث نیز در حدود شش برابر قوی‌تر است. کوئرستین در سبزیجات، میوه‌جات، پیاز، سیب، انگور قرمز، مرکبات، کلم بروکلی و گوجه فرنگی، شکلات تیره، چای سبز و سیاه وجود دارد (۱۳). اثرات حفاظتی کوئرستین بر روی کبد، قلب، کلیه‌ها، نورون‌ها و DNA در برابر عوامل آسیب‌زا مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۴، ۱۵). هم‌چنین، این ترکیب اثرات ضدسرطانی، ضدویروسی، ضد میکروبی، ضد آلرژی، ضد فشارخون و محافظت در برابر کاتاراکت دارد (۱۶). تجویز کوئرستین در مردان با عوارض پروستاتی مزمن باعث بهبود نسبی در این افراد شده است. مطالعات نشان

داده که کوئرستین تکثیر سلولی را سرکوب می کند و مرگ برنامه ریزی شده سلول ها را افزایش می دهد (۱۲). علاوه بر این، مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد می کند که کوئرستین و دیگر فلاوونوئیدها باعث کاهش ریسک ابتلا به سرطان های مختلف می شوند (۱۷). با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف کوئرستین بر بیان ژن IL-6، پروتئین های فسفریله STAT3، AKT، ERK مسیرهای سیگنالی در رده سلول های سرطانی پروستات PC3 بود.

مواد و روش ها

در رده سلولی PC3 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط RPMI-1640 (شرکت Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS، شرکت Gibco)، L-glutamine (شرکت Sigma)، penicillin، Streptomycin (شرکت Sigma) و ۱۰^۲ mg/ml از Humidified air و ۵ درصد گاز CO₂ کشت داده شد.

بررسی زیست پذیری (Cell viability assay) رده سلولی PC3 در غلظت های مختلف کوئرستین

برای تعیین زیست پذیری سلول ها در برابر اثرات کوئرستین (شرکت Sigma)، از آزمون MTT استفاده شد (۱۸). در یک پلیت کشت ۹۶ خانه ای در هر چاهک آن سلول های سرطانی PC3 با تراکم ۵×۱۰^۳ در محیط RPMI حاوی ده درصد FBS ریخته و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن محیط کشت با محیط حاوی غلظت های مختلف کوئرستین (۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۸۰ میکرومولار) تعویض گردید و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. حداکثر غلظت DMSO در محیط کشت برای جلوگیری از آسیب سلولی ۰/۱ درصد بود. با استفاده از دستگاه پلیت ریدر

۱۰۰× (جذب نوری گروه شاهد/ جذب نوری گروه درمان شده)

اندازه گیری میزان ترشح IL-6 در محیط کشت رده

سلولی PC3

در هر چاهک، یک پلیت کشت ۶ خانه ای به تعداد ۲×۱۰^۵ عدد سلول های PC3 (محتوی ۲ میلی لیتر از محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS) منتقل و پلیت به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۱۸). سپس سلول ها تحت تأثیر غلظت های ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان مذکور، محیط کشت روی سلول ها جمع آوری شد و با استفاده از کیت IL-6 و طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت (AViBion Human IL-6 ELISA)، میزان پروتئین IL-6 به روش ELISA اندازه گیری شد.

بررسی بیان ژن IL-6 با روش RT-Real Time PCR در

رده سلولی PC3

سلول های PC3 در پلیت ۶ خانه ای با تراکم ۱۰^۵ × ۲ سلول در هر چاهک ریخته شدند. سپس سلول ها بعد از گذشت یک شب، تحت تأثیر غلظت های ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین قرار داده شدند و سلول ها پس از این که به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، به کمک ترپسین جدا شده و یک بار با PBS شستشو داده شدند. جداسازی Total RNA از سلول های PC3 برای هر غلظت از دارو به طور جداگانه توسط BIOZOL

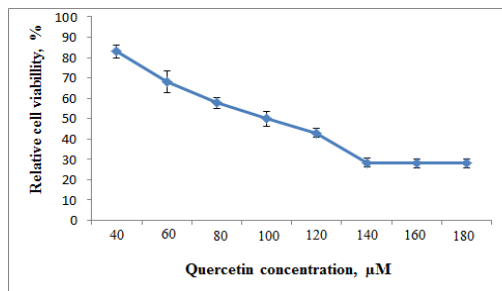
(شرکت Bio Flux) انجام گرفت و غلظت RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و هم چنین در ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه NANODROP 200 Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC) اندازه گیری شد. برای سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده ای استفاده شد که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آن ها بین ۱/۸ تا ۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر آن ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود. ژن GAPDH به عنوان یک سیستم کنترل داخلی (Housekeeping Gene) و ژن IL-6 به عنوان ژن اصلی (Interest gene) در نظر گرفته شدند. توالی Forward پرایمر GAPDH مورد استفاده 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTTG-3' و توالی Reverse آن 3'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-5' بود. توالی Forward پرایمر IL-6 به کار رفته 5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3' و توالی Reverse آن 3'-5-GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC-5' بود. تمام واکنش های RT-Real Time PCR با دستگاه Corbett (Rotor Gene TM 6000) انجام شد. این واکنش ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت تکرار سه تایی در میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری انجام شدند. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Sybergreen PCR Master Mix (2X) (شرکت Gene Network)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت ۹/۱ میکرولیتر آب فاقد RNase و ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود. برنامه زمانی گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول که منجر به واسرشتگی مولکول های cDNA شد، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله دوم ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله: الف) دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ب) دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای جفت شدن و ج) دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه برای گسترش انجام شد. مرحله سوم جهت رسم نمودار

ذوب، در یک بازه دمایی بین ۷۲-۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. بازده واکنش با پرایمر اختصاصی ژن GAPDH در غلظت های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به دست آمد. آنالیز CT های به دست آمده با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ (Fold change) و با در نظر گرفتن بازده ای برابر با ۹۳ درصد انجام شد (۱۸).

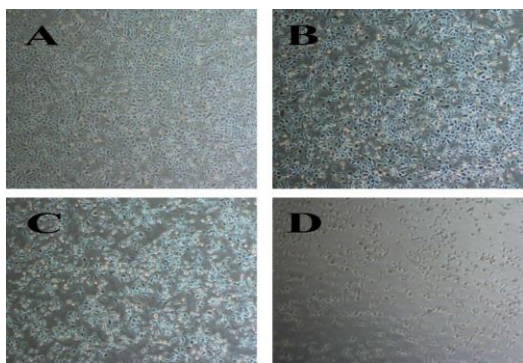
Western blots پروتئین های سیگنالی pERK و pSTAT3

و pAKT

جهت بررسی بیان پروتئین های pERK، pSTAT3، pAKT و B-actin (به عنوان کنترل داخلی) نمونه های کنترل بدون تیمار و نمونه های تیمار شده، پس از ۴۸ ساعت با غلظت های ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین با استفاده از بافر RIPA سرد (۱۵۰ mM Sodium chloride، pH=۸، ۵۰ Mm Tris-HCl، ۰/۵ Triton 100X درصد، Sodium deoxycholate ۱ درصد، SDS ۰/۱ درصد و Sodium azide pH=۷/۴ ۰/۱ درصد) که همراه با مهارکننده های پروتئاز و فسفاتاز می باشد، (۱ mM Sodium orthovanadate، ۵۰ mM NaF، ۸۰ μ M β -glycerophosphate و ۱ mM PMSF) لیز شدند. سپس، با استفاده از دستگاه NANODROP غلظت پروتئین های محلول بر حسب μ g/ μ l خوانده شد و محلول پروتئینی با غلظت ۲۴ μ g/ μ l با لودینگ بافر ۶X به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و با استفاده از ژل ۱۰ درصد به صورت SDS-PAGE الکتروفورز شدند. سپس پروتئین ها از روی ژل بر روی غشاء PVDF (شرکت Roche) انتقال داده شدند. به منظور حذف باندهای غیراختصاصی، غشاء PVDF به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد در شیر خشک بدون چربی ۲/۵ درصد (Tris-Buffered Saline) TBST (non-fat dry milk) همراه با Tween-20 (۰/۱ درصد) و یا با سرم آلبومین گاوی ۲/۵ درصد در TBST (۰/۱ درصد) بلوکه



نمودار شماره ۱: اثر کوئرستین بر زیست‌پذیری و آپوپتوز سلول‌های سرطانی PC3.



تصویر شماره ۱: تاثیر کوئرستین بر بقاء و تغییر در مرفولوژی سلول‌های سرطانی PC3 پس از ۴۸ ساعت. A: سلول کنترل، B: سلول تیمار شده با غلظت ۴۰ میکرومولار، C: سلول تیمار شده با غلظت ۸۰ میکرومولار و D: سلول تیمار شده با غلظت ۱۶۰ میکرومولار.

سلول‌های PC3 به مدت ۴۸ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های ۰ تا ۱۸۰ میکرومولار کوئرستین قرار گرفتند و سپس زیست‌پذیری و آپوپتوز این سلول‌ها توسط آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. میانگین هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و سه تکرار می‌باشد. نتایج برحسب درصد بقاء هر گروه به صورت نمودار رسم گردید.

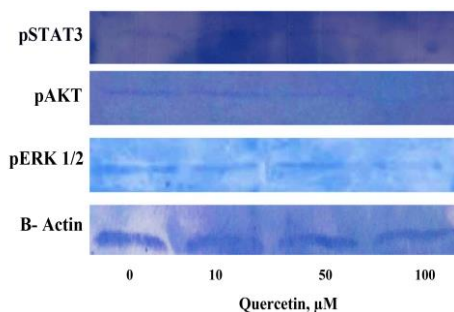
در جدول شماره ۱ تأثیر کوئرستین بر بیان ژن IL-6 در رده سلول‌های سرطانی PC3 مشاهده می‌شود. در غلظت ۱۰ میکرومولار از کوئرستین، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن IL-6 نسبت به کنترل دیده نشد ($p > 0.05$). اما در غلظت‌های بعدی، بیان ژن یک روند افزایشی را نشان داد، به گونه‌ای که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰

گردید. متعاقباً غشاء با آنتی‌بادی اختصاصی خود که شامل Anti p-ERK1+ERK2، Anti p-AKT1 و Anti p-STAT3 (شرکت Abcam آمریکا) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. آنتی‌بادی β اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و با آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) شیکر شدند. سپس پروتئین‌های Immunoreactive با اضافه کردن سوبسترا (BM Blue POD Substrate, Precipitating) (شرکت Roche) و ایجاد Precipitating به صورت باند اختصاصی آشکار شدند (۱۸). برای آنالیز داده‌ها، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس محاسبه شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷) با آزمون ناپارامتریک به صورت Kruskal-Wallis test بررسی شدند. IC_{50} با روش آنالیزی Probit تعیین شد. مقادیر با $p < 0.05$ در بین گروه‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

در نمودار شماره ۱، اثر کوئرستین بر رشد و تکثیر رده سلول‌های سرطانی PC3 در محدوده ۰ تا ۱۸۰ میکرومولار مشاهده می‌گردد. غلظت IC_{50} کوئرستین با فاصله اطمینان ۹۵ درصد معادل ۱۰۰ میکرومولار بود و در این غلظت، ۵۰ درصد از سلول‌های PC3، توانایی زیست‌پذیری خود را حفظ کرده بودند. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کوئرستین، میزان بقاء سلول‌های سرطانی PC3 در محیط کشت کاهش می‌یابد، به طوری که در غلظت ۱۴۰ میکرومولار از کوئرستین، درصد بقاء سلول‌ها در حدود ۲۸ درصد بود. هم‌چنین، تصویر شماره ۱ اثر کوئرستین بر تکثیر و تغییر مرفولوژی سلول‌های سرطانی PC3 را نشان می‌دهد که با استفاده از میکروسکوپ اینورت و سپس انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های ۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت، عکس‌برداری شده‌اند.

توجهی کاهش یافتند. البته، این اثر کاهشی برای pAKT و pSTAT3 نسبت به pERK1/2 بیش تر بود. سلول های سرطانی PC3 با غلظت های مختلف کوئرستین به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و پس از استخراج پروتئین ها، پروتئین های مسیر سیگنالی سلولی IL-6 شامل pSTAT3، pAKT، و pERK 1/2 همراه با کنترل داخلی β -actin با تکنیک Western blot مورد بررسی قرار گرفتند.



تصویر شماره ۲: اثر مهارى کوئرستین بر پروتئین های مسیر سیگنالی IL-6

بحث

امروزه با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و سنتتیک، تحقیقات بسیار زیادی بر روی اثرات آنتی اکسیدان ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی مشتق شده از گیاهان دارویی برای جلوگیری از پیشرفت و درمان انواع مختلفی از بیماری ها صورت گرفته است (۲۰-۲۳). کوئرستین یک فلاوونول با خاصیت آنتی اکسیدانی و توانایی حذف رادیکال های آزاد می باشد. کوئرستین قادر است استرس اکسیداتیو و سایتوتوکسیتی را در سلول های توموری افزایش دهد، به طوری که در غلظت های بالاتر از ۴۰ میکرومولار، به واسطه گونه های فعال اکسیژن، باعث افزایش آسیب و مرگ سلولی می شود (۲۴). در این مطالعه، مقدار IC_{50} مربوط به اثر کوئرستین بر زیست پذیری رده سلولی PC3 برابر ۱۰۰ میکرومولار بود که با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین (که غلظت ۱۰۰ میکرومولار را گزارش کرده اند)

میکرومولار از کوئرستین، بیان ژن به ترتیب به میزان ۱۳/۳۶ و ۳۶/۸۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش معنی دار داشت ($p < 0.05$). هم چنین، در جدول شماره ۱، تأثیر کوئرستین بر سنتز پروتئین IL-6 در رده سلولی PC3 مشاهده می گردد. در شرایطی که سنتز پروتئین IL-6 در نمونه کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد، در غلظت ۱۰ میکرومولار از کوئرستین، سنتز پروتئین IL-6 به میزان ۹/۳ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت که معنی دار نبود ($p > 0.05$). اما با افزایش غلظت کوئرستین در محیط سلول ها، سنتز پروتئین روند افزایشی را نشان داد، به طوری که در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب به میزان ۲۶/۱ و ۸۲/۹ درصد رسید که نسبت به کنترل معنی دار بودند ($p < 0.05$). هم چنین افزایش سنتز پروتئین IL-6 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۵۰ میکرومولار معنی دار بود ($p < 0.05$).

جدول شماره ۱: اثر کوئرستین بر سنتز، ترشح و بیان ژن IL-6 در رده سلول های سرطانی PC3

غلظت کوئرستین (میکرومولار)	میزان IL-6 (pg/mL)	بیان ژن IL-6 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
انحراف معیار \pm میانگین	انحراف معیار \pm میانگین	انحراف معیار \pm میانگین
۰	۱۷/۶۱ \pm ۲۱۷/۳۳	۱
۱۰	۱۸/۲۲ \pm ۲۲۹/۲۱	۱/۴۷ \pm ۰/۱۲
۵۰	۱۷/۴۹ \pm ۲۴۶/۶۶ ^a	۱/۹۱ \pm ۰/۱۴ ^a
۱۰۰	۲۰/۱۲ \pm ۲۹۷/۰۱ ^{abc}	۵/۲۱ \pm ۰/۹۰ ^{abc}

میانگین هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و با سه تکرار می باشد. نتایج بر حسب نسبت به گروه کنترل بیان گردیده است.

^a در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر) $p < 0.05$

^b در مقایسه با غلظت ۱۰ میکرومولار $p < 0.05$

^c در مقایسه با غلظت ۵۰ میکرومولار $p < 0.05$

تصویر شماره ۲، تأثیر کوئرستین بر پروتئین های مسیر سیگنالی IL-6 را نشان می دهد. کوئرستین در غلظت های ۰، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار، یک اثر کاهشی نسبی بر میزان پروتئین های سیگنالی مسیرهای pAKT، pERK1/2 و pSTAT3 داشت. اما، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، هر سه پروتئین فسفریله مذکور به طور قابل

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، در این مطالعه با افزایش غلظت کوئرستین، پروتئین‌های سیگنالی به‌طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کنند، به‌طوری که در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار و خصوصاً ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین، باند پروتئینی STAT3 فسفریله کاهش چشمگیری پیدا کرده است. مطالعات نشان داده که IL-6 به واسطه مسیرهای سیگنالی STAT3، AKT و MAPK و به ویژه مسیر STAT3، اثرات خود را بر پیشرفت سرطان پروستات اعمال می‌کند (۳۲، ۳۵). در این تحقیق مشخص شد که کوئرستین بالاتر از ۱۰ میکرومولار، منجر به کاهش پروتئین‌های سیگنالی فسفریله مربوط به IL-6 شامل ERK1/2، STAT3 و AKT می‌شود (تصویر شماره ۲). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که فرم فسفریله AKT در ممانعت از آپوپتوز نقش دارد و تفاوت چشمگیری در بیان فرم فسفریله AKT (فرم فعال) در بافت توموری پروستات نسبت به بافت نرمال وجود دارد (۳۳، ۳۴). هم‌چنین، اثبات شده که پروتئین‌های pSTAT در رشد و بقای سلول شرکت می‌کنند که این عمل را با ممانعت از آپوپتوز و از طریق افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مثل Bcl-2 و Bcl-XL انجام می‌دهند (۳۵). بنابراین، در این مطالعه، کاهش فرم‌های فسفریله AKT و STAT می‌تواند دلیلی برای تشدید اثرات آپوپتوز و مرگ سلولی توسط کوئرستین در سلول‌های PC3 باشد. علاوه بر این، اثبات شده است که پروتئین‌های فسفریله ERK1/2 نقش اساسی در تکثیر سلولی و تمایز بازی می‌کنند و وقتی کم شوند، تکثیر سلول نیز کاهش پیدا می‌کند (۳۶، ۳۷) که با این مطالعه همخوانی دارد. بنابراین، با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعه ما کوئرستین با کاهش پروتئین‌های مسیرهای سیگنالی pERK1/2، pAKT و pSTAT3، اثرات القایی IL-6 را کاهش داده و منجر به فعال شدن آپوپتوز، کاهش زیست‌پذیری و بقای سلول‌های PC3 می‌شود و افزایش پروتئین IL-6 در این مطالعه نتوانسته باعث تکثیر

همخوانی دارد (۲۵). در این خصوص نشان داده‌اند که کوئرستین آپوپتوز را به واسطه فعالیت Caspase‌ها در سلول‌های LNCap القاء می‌کند (۲۶). مطابق تصویر شماره ۱، از غلظت ۱۰۰ میکرومولار به بالا، سلول‌های PC3 بیش‌تری تغییر شکل و تغییر مرفولوژی پیدا کرده‌اند. در این مطالعه، تاثیر کوئرستین بر سنتز پروتئین و بیان ژن IL-6 در سلول PC3 در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. هرچند در نگاه اول به نظر می‌رسد کوئرستین عاملی برای تحریک سنتز پروتئین و بیان ژن IL-6 شده است، ولی مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های PC3 قادرند با افزایش سنتز پروتئین IL-6 باعث ایجاد مقاومت در برابر برخی داروهای شیمی‌درمانی شوند که می‌تواند این سلول‌ها را در برابر آپوپتوز و مرگ سلولی محافظت کند (۲۷، ۲۸). بنابراین، به نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز افزایش سنتز پروتئین و بیان ژن IL-6 در سلول PC3 عکس‌العملی در برابر اثرات آپوپتوزی و تحریک مرگ سلولی ناشی از کوئرستین باشد. علاوه بر این، مطالعات سایر محققین نشان داده است که هر چند کوئرستین عموماً به عنوان یک عامل ضد التهابی عمل می‌کند، ولی دارای اثرات تنظیمی بر روی بیان ژن و هم‌چنین سنتز پروتئین‌های ضد التهابی و پیش التهابی می‌باشد (۲۹) که با این مطالعه هم‌خوانی دارد. هم‌چنین، مطالعات قبلی اثبات کرده‌اند که کوئرستین دارای یک اثر تنظیم افزایشی بر روی سایتوکین پیش التهابی مشتق از سلول‌های Th1 و اینترفرون گاما می‌باشد (۳۰) که با این مطالعه در خصوص افزایش بیان ژن IL-6 هم‌خوانی دارد. هم‌چنین، Feng و همکارانش نشان دادند که پروتئین IL-6 باعث مقاومت سلول‌های سرطانی پروستات در مقابل Bicalutamide (دارویی جهت درمان سرطان متاستاتیک پروستات) می‌شود (۳۱). بنابراین افزایش بیان ژن، سنتز و ترشح IL-6 توسط سلول‌های PC3 می‌تواند عکس‌العملی برای مقابله با اثرات سیتوتوکسیک کوئرستین باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق مربوط به بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم اکرم عباسی ولدانی به شماره ثبت طرح تحقیقاتی ۱۲۰۲ معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است. همچنین، بدینوسیله پژوهشگران مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، ابراز می‌دارند.

سلول‌ها شود. این مطالب نشان می‌دهند که مهار مسیرهای القایی IL-6 می‌تواند به عنوان یک هدف امیدبخش، در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، کاهش زیست‌پذیری و بقا توسط کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی در سلول‌های PC3، احتمالاً به واسطه خاصیت ضد التهابی، القاء استرس اکسیداتیو به واسطه افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش فرم فسفوریله پروتئین‌های AKT و ERK1/2 می‌باشد. بنابراین، کوئرستین در غلظت‌های موثر خود می‌تواند به عنوان یک ماده درمانی سودمند در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

References

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>.
2. Saraon P, Musrap N, Cretu D, Karagiannis GS, Batruch I, Smith C, et al. Proteomic profiling of androgen-independent prostate cancer cell lines reveals a role for protein S during the development of high grade and castration-resistant prostate cancer. *J Biol Chem* 2012; 287(41): 34019-3431.
3. de Leeuw R, Berman-Booty LD, Schiewer MJ, Ciment SJ, Den RB, Dicker AP, et al. Novel actions of next-generation taxanes benefit advanced stages of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(4): 795-807.
4. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int* 2014; 113(6): 986-992.
5. Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 54-74.
6. Culig Z. Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *Am J Clin Exp Urol* 2014; 2(3): 231-238.
7. Pencik J, Wiebringhaus R, Susani M, Culig Z, Kenner L. IL-6/STAT3/ARF: the guardians of senescence, cancer progression and metastasis in prostate cancer. *Swiss Med Wkly* 2015; 145: w14215.
8. Bishop JL, Davies A, Ketola K, Zoubeidi A. Regulation of tumor cell plasticity by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(3): R165-R182.
9. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, et al. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(1): 155-169.
10. Chun JY, Nadiminty N, Dutt S, Lou W, Yang JC, Kung HJ, et al. Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15(15): 4815-4822.
11. Perner S, Cronauer MV, Schrader AJ, Klocker H, Culig Z, Baniahmad A. Adaptive responses of androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*

- 2015; 6(34): 35542-35555.
12. Jordan BC, Mock CD, Thilagavathi R, Selvam C. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. *Life Sci* 2016; 152: 135-144.
 13. Moradi E, Heidarian E, Gholami-Arjenaki M, Saffari-Chaleshtori J, Mardani G, Karimi-Taghanaki A, et al. Effect of Quercetin on Methotrexate-induced Hepatic and Renal Damages in Male Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(127): 25-37 (Persian).
 14. Abarikwu SO. Protective effect of quercetin on atrazine-induced oxidative stress in the liver, kidney, brain, and heart of adult wistar rats. *Toxicol Int* 2014; 21(2): 148-155.
 15. Zhang Y, Gao Z, Liu J, Xu Z. Protective effects of baicalin and quercetin on an iron-overloaded mouse: comparison of liver, kidney and heart tissues. *Nat Prod Res* 2011; 25(12): 1150-1160.
 16. Del Prete A, Scalera A, Iadevaia MD, Miranda A, Zulli C, Gaeta L, et al. Herbal products: benefits, limits, and applications in chronic liver disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012(6): 837939.
 17. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *J Nutr Rev* 2010; 68(7): 418-428.
 18. Eskandari E, Heidarian E, Amini SA, Saffari-Chaleshtori J. Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. *J Cancer Res Ther.* 2016. Article impress, Available from: <http://www.cancerjournal.net>.
 19. Heidarian E, Saffari J, Jafari-Dehkordi E. Hepatoprotective action of *Echinophora platyloba* DC leaves against acute toxicity of acetaminophen in rats. *J Diet Suppl* 2014; 11(1): 53-63.
 20. Rezaei A, Heidarian E. Co-administration of trientine and flaxseed oil on oxidative stress, serum lipids and heart structure in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2013; 51(8): 646-652.
 21. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M, Khoshdel A, Bakhshesh M. Metabolic effects of berberine on liver phosphatidate phosphohydrolase in rats fed on high lipogenic diet: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(Suppl 1): S429-435.
 22. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Effect of silymarin on liver phosphatidate phosphohydrolase in hyperlipidemic rats. *Biosci Res* 2012; 9(2): 59-67.
 23. Heidarian E, Movahed-Mohammadi G, Saffari J, Ghatreh-Samani K. Protective Effect of Hydroethanolic Extract of *Cress* against Hepatotoxicity due to Acetaminophen in Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(102): 79-90 (Persian).
 24. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev* 2010; 68(7): 418-428.
 25. Senthilkumar K, Arunkumar R, Elumalai P, Sharmila G, Gunadharini DN, Banudevi S, et al. Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC3). *Cell Biochem Funct* 2011; 29(2): 87-95.
 26. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 2006; 136(11): 2715-2721.

27. Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, Codony-Servat J, Bosch M, Filella X, et al. Interleukin 6, a nuclear factor- κ B target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor- κ B inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5578-5586.
28. Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Van Veldhuizen PJ, et al. Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(11): 3028-3034.
29. Yang F, Song L, Wang H, Wang J, Xu Z, Xing N. Quercetin in prostate cancer: Chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential (Review). *Oncol Rep* 2015; 33(6): 2659-2668.
30. Kempuraj D, Castellani ML, Petrarca C, Frydas S, Conti P, Theoharides TC, et al. Inhibitory effect of quercetin on tryptase and interleukin-6 release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line. *Clin Exp Med* 2006; 6(4): 150-156.
31. Feng S, Tang Q, Sun M, Chun JY, Evans CP, Gao AC. Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(3): 665-671.
32. Feng S, Tang Q, Sun M, Chun JY, Evans CP, Gao AC. Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(3): 665-671.
33. Culig Z. Androgen receptor coactivators in regulation of growth and differentiation in prostate cancer. *J Cell Physiol* 2016; 231(2): 270-274.
34. Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122(7): 1521-1529.
35. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 2006; 136(11): 2715-2721.
36. Dai C, Zhang C, Sun X, Pan Q, Peng J, Shen J, et al. LukS-PV induces differentiation by activating the ERK signaling pathway and c-JUN/c-FOS in human acute myeloid leukemia cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 76: 107-114.
37. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* 2015; 89(3): 289-317.