ORIGINAL ARTICLE

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

Esfandiar Heidarian[1],
Sayed Asadollah Amini[2],
Akram Abbasi-Veldani[3],
Keihan Ghatreh-Samani[4]

[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 μM. 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 IC_{50} for PC3 prostate cancer cells was 100 μM. Elevation of quercetin concentration in cell culture media increased the IL-6 gene expression and protein synthesis. At 50 and 100 μM 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 μM.

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

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (144): 290-300 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۴ دی سال ۱۳۹۵ (۳۰۰-۲۹۰)

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

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

چکیده

سابقه و هدف: IL-6 به واسطه پروتئین‌های سیگنالی مسیرهای pSTAT3، pERK1/2 و pAKT باعث پیشرفت سرطان پروستات می‌گردد. کوئرستین یک آنتی‌اکسیدان گیاهی با خواص ضد سرطانی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر کوئرستین بر بیان ژن IL-6، پروتئین‌های سیگنالی فوق الذکر در رده سلول‌های سرطانی PC3 پروستات می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های PC3 با غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین تیمار شدند. سپس غلظت IL-6 در محیط‌های کشت اندازه‌گیری شد. هم‌چنین Total RNA و پروتئین‌های سیگنالی فوق‌الذکر از سلول‌های PC3 استخراج و به ترتیب مورد استفاده برای بیان ژن IL-6 به وسیله Real time RT PCR و Western blot قرار گرفتند.

یافته‌ها: IC_{50} کوئرستین برای سلول‌های سرطانی PC3 معادل ۱۰۰ میکرومولار بود. افزایش غلظت کوئرستین در محیط کشت سلول‌ها منجر به افزایش بیان ژن و سنتز پروتئین IL-6 گردید. سنتز پروتئین IL-6 در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوئرستین به ترتیب به میزان ۱۳/۳۶ و ۳۶/۸۶ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت ($p<0/05$). هم چنین، کوئرستین در غلظت بالاتر از IC_{50} باعث کاهش پروتئین‌های pSTAT3، pERK1/2 و pAKT مسیرهای سیگنالی داخل سلولی شد.

استنتاج: اثرات کوئرستین بر روی سلول‌های PC3 احتمالاً می‌تواند ناشی از کاهش پروتئین‌های pSTAT3، pERK1/2، pAKT، القاء استرس اکسیداتیو و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن باشد. بنابراین، کوئرستین می‌تواند 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 می‌باشد. این بیماری افزایش قابل ملاحظه‌ای در دو دهه گذشته درآسیا نشان داده است(۲،۱).

مولف مسئول: اسفندیار حیدریان- شهرکرد: مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد E-mail: heidarian46@yahoo.com
۱. استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۲/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۲/۲۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۶/۱۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

تاثیرات 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 آندروژنی به مقدار قابل توجهی باعث جلوگیری از پیشرفت سرطان پروستات و منجر به بهبود نسبی بیماری می‌گردد(۲،۱). 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 محروم سازی 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 اتوکرین و پاراکرین 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(۹،۸). 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 می شود 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، به‌طوری 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 قرارگرفته است(۱۵،۱۴). هم‌چنین، این ترکیب اثرات ضدسرطانی، ضدویروسی، ضد میکروبی، ضدآلرژی، ضدفشارخون 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

داده که کوئرستین تکثیر سلولی را سرکوب می کند و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را افزایش می‌دهد(۱۲). علاوه بر این، مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد می کند که کوئرستین و دیگر فلاوونوئیدها باعث کاهش ریسک ابتلا به سرطان‌های مختلف می‌شوند(۱۷). با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف کوئرستین بر بیان ژن IL-6، پروتئین‌های فسفریله AKT، STAT3 و ERK مسیرهای سیگنالی در رده سلول‌های سرطانی پروستات PC3 بود.

مواد و روش ها

رده سلولی PC3 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط RPMI-1640 (شرکت Gibco) غنی‌شده با ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS، شرکت Gibco)، L-glutamine (شرکت Sigma) ، U/ml penicillin ۱۰۲ (شرکت Sigma) و ۰/۱mg/ml از Streptomycin (شرکت Sigma) و تحت شرایط استاندارد (۳۷ درجه سانتی گراد و ۹۵ درصد Humidified air و ۵ درصد گاز Co_2) کشت داده شد.

بررسی زیست‌پذیری (Cell viability assay) رده سلولی PC3 در غلظت‌های مختلف کوئرستین

برای تعیین زیست‌پذیری سلول‌ها در برابر اثرات کوئرستین (شرکت Sigma)، از آزمون MTT استفاده شد(۱۸). در یک پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای در هر چاهک آن سلول‌های سرطانی PC3 با تراکم ۱۰۳×۵ 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 غلظت‌های 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 (Stat Fax-2100, Spain) در طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب نوری چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر غلظت از کوئرستین ۳ بار به صورت Triplicates انجام گرفت. درصد زیست‌پذیری (IC_{50}) سلول های تحت درمان در مقایسه با سلول‌های درمان نشده طبق فرمول زیر محاسبه و بررسی شد.

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 خانه‌ای به تعداد ۱۰۵×۲ عدد سلول‌های PC3 (محتوی ۲ میلی‌لیتر 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 سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های 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 سلول‌ها جمع‌آوری 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

سلول‌های PC3 در پلیت ۶ خانه‌ای با تراکم ۱۰۵ ×۲ سلول در هر چاهک ریخته شدند. سپس سلول‌ها بعد از گذشت یک شب، تحت تأثیر غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین قرار داده شدند و سلول‌ها 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 RNAاز سلول‌های PC3 برای هر غلظت از دارو به طور جداگانه توسط BIOZOL

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

(شرکت Bio Flux) انجام گرفت و غلظت RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و هم‌چنین در ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه NANODROP 200 Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC) اندازه‌گیری شد. برای سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده‌ای استفاده شد که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آن‌ها 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 5´- TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3´ بود. توالی Forward پرایمر IL-6 به کار رفته 5´-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3´ و توالی Reverse آن 5´-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3´ بود. تمام واکنش‌های RT-Real Time PCR با دستگاه Corbett (Rotor Gene TM 6000) انجام شد. این واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت تکرار سه تایی در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری 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 مولکول‌های cDNA شد، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله دوم ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله: الف) دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ب) دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای جفت شدن و ج) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه برای گسترش انجام شد. مرحله سوم جهت رسم نمودار ذوب، در یک بازه دمایی بین ۷۲-۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بازده واکنش با پرایمر اختصاصی ژن GAPDH در غلظت‌های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به دست آمد. آنالیز CT های به دست آمده با استفاده از روش (ΔΔCT) Fold change و با در نظر گرفتن بازده ای برابر با ۹۳ درصد انجام شد(۱۸).

Western blots پروتئین‌های سیگنالی pSTAT3، pERK و pAKT

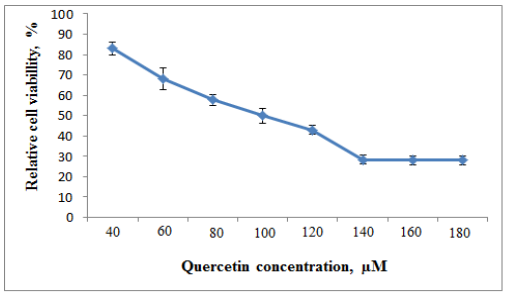
جهت بررسی بیان پروتئین‌های pSTAT3، pERK، pAKT و B-actin (به عنوان کنترل داخلی) نمونه‌های کنترل بدون تیمار و نمونه‌های تیمار شده، پس از ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین با استفاده از بافر RIPA سرد (۱۵۰ mM Sodium chloride ،pH=۸،۵۰ Mm Tris-HCl، ۱ Triton 100X درصد، ۰/۵ Sodium deoxycholate درصد، ۱mM EDTA، ۰/۱ SDS درصد و ۰/۰۱ Sodium azide pH=۷/۴ درصد) که همراه با مهارکننده‌های پروتئاز و فسفاتاز می‌باشد، (۱ mM Sodium orthovanadate ، ۵۰ mM NaF، ۸۰ µM β– glyerophosphate و ۱ mM PMSF) لیز شدند. سپس، با استفاده از دستگاه NANODROP غلظت پروتئین‌های محلول بر حسب µg/µl خوانده شد و محلول پروتئینی با غلظت ۲۴ µg/µl با لودینگ بافر 6X به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و با استفاده از ژل ۱۰ درصد به صورت SDS-PAGE الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌ها 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 سانتی‌گراد در شیر خشک بدون چربی ۲/۵ درصد (non –fat dry milk) در TBST (Tris-Buffered Saline) همراه با ۰/۱ Tween-20 درصد) و یا با سرم آلبومین گاوی ۲/۵ درصد در ۰/۱ TBST درصد بلوکه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

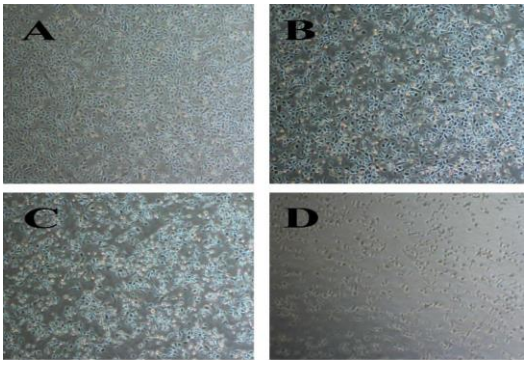
گردید. متعاقباً غشاء با آنتی‌بادی اختصاصی خود که شامل Anti p-AKT1، Anti p-ERK1+ERK2 و Anti p-STAT3 (شرکت Abcam آمریکا) به مدت ۲ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. آنتی‌بادی β اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و با آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-Rabbit IgG(HRP) 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.

یافته ها

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. همان‌طورکه 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.



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



تصویر شماره ۱: تاثیر کوئرستین بر بقاء و تغییر در مرفولوژی سلول های 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 سلول ها 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 گونه ای که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

میکرومولار از کوئرستین، بیان ژن به ترتیب به میزان ۱۳/۳۶ و ۳۶/۸۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). هم‌چنین، در جدول شماره ۱، تأثیر کوئرستین بر سنتز پروتئین IL-6 در رده سلولی PC3 مشاهده می‌گردد. 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 معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). اما با افزایش غلظت کوئرستین در محیط سلول‌ها، سنتز پروتئین روند افزایشی را نشان داد، به طوری که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب به میزان ۲۶/۱ و ۸۲/۹ درصد رسید که نسبت به کنترل معنی دار بودند (p<۰/۰۵). هم‌چنین افزایش سنتز پروتئین IL-6 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۵۰ میکرومولار معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

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

غلظت کوئرستین (میکرومولار)	میزان IL-۶ (pg/mL) انحراف معیار ± میانگین	بیان ژن IL-۶ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) انحراف معیار ± میانگین
۰	۱۷/۶۱±۲۱۷/۳۳	۱
۱۰	۱۸/۲۲±۲۲۹/۲۱	۱/۴۷±۰/۱۲
۵۰	۱۷/۴۹±۲۴۶/۶۶[a]	۱/۹۱±۰/۱۴[a]
۱۰۰	۲۰/۱۲±۲۹۷/۰۱[abc]	۵/۲۱±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.

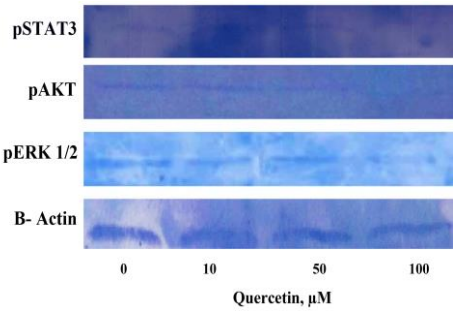
[a] در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر) p <۰/۰۵

[b] در مقایسه با غلظت ۱۰ میکرومولار p<۰/۰۵

[c] در مقایسه با غلظت ۵۰ میکرومولار p<۰/۰۵

تصویر شماره ۲، تأثیرکوئرستین بر پروتئین‌های مسیر سیگنالی IL-6 را نشان می‌دهد. کوئرستین در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار، یک اثر کاهشی نسبی بر میزان پروتئین‌های سیگنالی مسیرهای pAKT، pERK1/2 و pSTAT3 داشت. اما، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، هر سه پروتئین فسفریله مذکور به طور قابل توجهی کاهش یافتند. البته، این اثر کاهشی برای pAKT و pSTAT3 نسبت به pERK1/2 بیش‌تر بود.

سلول‌های سرطانی PC3 با غلظت های مختلف کوئرستین به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و پس از استخراج پروتئین‌ها، پروتئین‌های 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 مهاری 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 آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مشتق شده از گیاهان دارویی برای جلوگیری از پیشرفت و درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها صورت گرفته است(۲۳-۲۰). کوئرستین یک فلاوونول با خاصیت آنتی اکسیدانی و توانایی حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشد. کوئرستین قادر است استرس اکسیداتیو و سایتوتوکسیتی را در سلول‌های توموری افزایش دهد، به طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۴۰ میکرومولار، به واسطه گونه‌های فعال اکسیژن، باعث افزایش آسیب و مرگ سلولی می‌شود(۲۴). در این مطالعه، مقدار IC_{50} مربوط به اثر کوئرستین بر زیست‌پذیری رده سلولی PC3 برابر ۱۰۰ میکرو مولار بود که با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین (که غلظت ۱۰۰ میکرومولار را گزارش کرده‌اند)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

همخوانی دارد(۲۵). در این خصوص نشان داده‌اند که کوئرستین آپوپتوز را به واسطه فعالیت Caspaseها در سلول‌های LNCap القاء می کند(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 شیمی درمانی شوند که می‌تواند این سلول‌ها را در برابر آپوپتوز و مرگ سلولی محافظت کند(۲۸،۲۷). 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 هم خوانی 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.

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، در این مطالعه با افزایش غلظت کوئرستین، پروتئین‌های سیگنالی به طور 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،۶،۵). 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 فسفوریله AKT در ممانعت از آپوپتوز نقش دارد و تفاوت چشمگیری در بیان فرم فسفوریله AKT (فرم فعال) در بافت توموری پروستات نسبت به بافت نرمال وجود دارد(۳۴،۳۳). هم‌چنین، اثبات شده که پروتئین های pSTAT در رشد و بقاء 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 فسفوریله 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(۳۷،۳۶) 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، pSTAT3 وpAKT، اثرات القائی IL-6 را کاهش داده و منجر به فعال شدن آپوپتوز، کاهش زیست پذیری و بقاء سلول‌های PC3 می‌شود و افزایش پروتئین IL-6 در این مطالعه نتوانسته باعث تکثیر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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 بقاء 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 به‌عنوان یک ماده درمانی سودمند در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

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.

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 Wkl 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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 phoshpatidate 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

27. Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, Codony-Servat J, Bosch M, Filella X, et al. Interleukin 6, a nuclear factor-κB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-κB 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]