مقاله پژوهشي

بررسی اثر کیناکرین روی بیان ژن *Wnt3A* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 سرطان پستان

سپیده دربهشتی[1]، عبدالرحیم نیک‌ضمیر[2]، سیامک سلامی[3]، رضا میرفخرایی[4]، مجید سیرتی‌ثابت[5]*

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۵/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی به سلول‌های سرطانی اطلاق می‌شود که ژن گیرنده استروژن، پروژسترون و HER2 را بیان نمی‌کنند. مسیر انتقال پیام Wnt در توسعه و پیشرفت انواع مختلفی از سرطان‌ها مهم است. کیناکرین، که مشتقی از ۹-آمینوآکریدین است، دارای اثری مهاری روی رشد برخی از سلول‌های سرطانی است. در این مطالعه، اثر کیناکرین روی بیان ژن *Wnt3a* که یکی از لیگاندهای مهم مسیر Wnt است در رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 بررسی شد. رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 دارای خصوصیات سلول‌های سه‌گانه منفی است.

مواد و روش کار: سلول‌های سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 با مقدار ۰/۵ میکرومولار کیناکرین به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. مقدار دارو، بر اساس نتایج آزمایش MTT تعیین شد. بیان ژن Wnt3a از طریق Real-time PCR بررسی شد. نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری مناسب ارزیابی شدند و بر مبنای $p<0.05$ تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه داروی کیناکرین با مقدار ۰/۵ میکرومولار در مدت ۷۲ ساعت تغییری در بیان ژن *Wnt3a* در رده سلولی MDA-MB 231 نداشت ($p =$ ۰/۳۴) اما در رده سلولی MCF7 بیان ژن *Wnt3a* به مقدار ۱/۳ کاهش یافت ($p <$ ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: ژن *Wnt3a* نقش مهمی در مسیر انتقال پیام Wnt دارد و مطالعه حاضر نشان داد که کیناکرین در شرایط موردبررسی روی بیان این ژن در رده سلولی MDA-MB 231 که دارای خصوصیات سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی است اثر ندارد اما در رده سلولی MCF7 کاهشی در بیان ژن *Wnt3a* مشاهده شد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، MCF7، MDA-MB 231، کیناکرین، Wnt3a

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره هفتم، ص ۵۳۸-۵۳۰، مهر ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی. تلفن: ۰۹۱۲۲۰۵۰۸۱۷

Email: sirati@sbmu.ac.ir

مقدمه

سرطان درنتیجه مجموعه‌ای از اتفاقات مولکولی پدید می‌آید که درنهایت سبب تغییر در خصوصیات طبیعی سلول‌ها می‌شوند. در سلول‌های سرطانی سازوکارهای کنترلی که در حالت طبیعی از رشد بیش‌ازاندازه سلول‌ها و تهاجم آن‌ها به سایر بافت‌ها جلوگیری می‌کنند دچار اختلال می‌شوند(۱).

سرطان پستان یک بیماری چندعاملی است که تاکنون نقش عوامل خطر مختلفی در بروز آن به اثبات رسیده است(۲). سرطان پستان، یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده سلامت زنان در دنیا است. در سال ۲۰۱۸ میلادی حدود دو میلیون نفر در سراسر دنیا به سرطان پستان مبتلا شدند که حدود ۶۸/۵ درصد این افراد در سن بعد از یائسگی بودند(۳). سرطان پستان ۲۵ درصد از انواع موارد سرطان در زنان را تشکیل می‌دهد و به همین خاطر شایع‌ترین نوع سرطان در زنان به‌حساب می‌آید(۴).

سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) از طریق کمبود بیان گیرنده استروژن، پروژسترون و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی

[1] کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[2] دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[3] دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[4] دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[5] دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

نوع ۲ (Her-2) مشخص می‌شود. شواهد به‌دست‌آمده از مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که تومورهای TNBC در مقایسه با سایر انواع سرطان پستان منجر به بروز پیش‌آگهی ضعیف‌تری می‌شوند. سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی عامل ۲۰-۱۰ درصد از انواع سرطان‌های پستان محسوب می‌شوند(۵). رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان با داشتن الگوی مولکولی خاص، به‌عنوان رده سلولی با ویژگی سه‌گانه منفی شناخته می‌شود(۶). در رده سلولی MCF7، بیان گیرنده‌های استروژنی، پروژسترونی و Her-2 گزارش شده است(۷).

در سرطان، برخی از مسیرهای فیزیولوژیک ازجمله مسیرهای هدایت پیام دستخوش تغییر می‌شوند(۸). در TNBC نیز بعضی از مسیرها ازجمله مسیرهای مرتبط با آپوپتوز و تکثیر دچار اختلال می‌شوند(۹). بنابراین، مطالعه در مورد این مسیرها و تغییرات آن‌ها در ارتباط با سرطان حائز اهمیت است.

مسیر پیام‌رسانی Wnt در تعامل با برخی از مسیرهای پیام‌رسانی دیگر، در کنترل تکامل جنین و هموستاز بافت در موجودات بالغ نقش دارد. این مسیر پیام‌رسانی ازنظر تکاملی محافظت شده است و جنبه‌های حیاتی مرتبط با تمایز نهایی سلول، مهاجرت سلولی، قطبیت، تعیین الگوی عصبی و ارگان‌زایی را در طی تکامل رویان تنظیم می‌کند(۱۰). این مسیر هم‌چنین در برخی از بافت‌ها در تکثیر سلولی و آپوپتوز نقش دارد(۱۱).

برهم‌کنش بین لیگاندهای Wnt و گیرنده‌های آن‌ها در سطح سلول اولین گام در تبدیل پیام خارج سلولی به پاسخ داخل سلولی است. لیگاند Wnt خارج سلولی چندین آبشار انتقالی داخل سلولی را فعال می‌کند که ازجمله آن‌ها می‌توان به مسیر Wnt/β-catenin یا مسیر متعارف اشاره کرد(۱۰). دو خانواده مجزا از گیرنده‌ها برای انتقال پیام Wnt متعارف مورد نیازند که شامل خانواده گیرنده‌های هفت‌بار گذرنده از عرض غشا که گیرنده‌های Frizzled یا FZD نام دارند و پروتئین‌های مرتبط با گیرنده‌های لیپوپروتئین با چگالی کم (گیرنده‌های LRP5/6) هستند(۱۲). در حین پیام‌رسانی، گیرنده‌های FZD با کمک پروتئین Wnt با مولکول‌های LRP5/6 ارتباط برقرار می‌کنند که یک‌بار از عرض غشا عبور کرده‌اند(۱۳).

در غیاب لیگاند Wnt، بتا-کاتنین سیتوپلاسمی جهت پروتئولیز توسط کمپلکس تخریبی بتا-کاتنین مورد هدف قرار می‌گیرد. این کمپلکس مجموعه‌ای پویا متشکل از پروتئین‌های مختلف است که هسته آن علاوه بر بتا-کاتنین شامل گلیکوژن‌سنتاز کیناز ۳ نوع β (GSK-3β)، کازئین کیناز ۱ نوع α (CK1α)، پروتئین داربستی اکسین و پروتئین آدنوماتوز پولیپوزیس‌کولای (APC) است. در این حالت، بتا-کاتنین فسفریله می‌شود و با اتصال یوبی‌کویتین به بتا-کاتنین فسفریله توسط یوبی‌کویتین لیگاز β-TrCP، دستگاه پروتئازوم آن را تخریب می‌کند. با فعال شدن مسیر Wnt عملکرد کمپلکس تخریبی تغییر می‌کند و منجر به تجمع و انتقال پروتئین بتا-کاتنین به درون هسته می‌شود. بتا-کاتنین در داخل هسته به‌عنوان کمک فعال‌کننده رونویسی اثر خود را بر رونویسی ژن‌ها اعمال می‌کند. عوامل متعددی شناسایی شده‌اند که می‌توانند در داخل هسته به بتا-کاتنین متصل شوند ازجمله می‌توان به اعضای خانواده TCF/LEF اشاره کرد که از فاکتورهای رونویسی متصل شونده به DNA هستند(۱۴، ۱۵).

از مهم‌ترین لیگاندهای مسیر انتقال پیام Wnt می‌توان به مولکول Wnt3a اشاره کرد. تغییر مقدار این پروتئین در برخی از سرطان‌ها گزارش شده است(۱۶).

کیناکرین از مشتقات آکریدین است که در اوایل دهه ۱۹۲۰ میلادی کشف شد و در طول جنگ جهانی دوم به‌طور گسترده به‌عنوان داروی ضدمالاریا مورد استفاده قرار گرفت(۱۷). این دارو علاوه بر درمان مالاریا در درمان عفونت‌های انگلی ازجمله عفونت‌های آمیبی، لامبلیا و ژیاردیا نیز مورد استفاده قرار گرفت. با مشاهده فعالیت ضد التهابی کیناکرین در بیماران مبتلا به التهاب مزمن سیستمیک که امروزه تحت عنوان اختلالات خودایمنی شناخته می‌شود موارد مصرف این دارو گسترش یافت و در درمان بیماری‌هایی نظیر لوپوس‌اریتروماتوس، آرتریت‌روماتویید، آسم برونشی و سایر بیماری‌های التهابی نیز مورد استفاده قرار گرفت. در دهه ۱۹۵۰ میلادی به دنبال حضور کورتیزون در بازار جهانی، استفاده از کیناکرین برای درمان این دسته از بیماری‌ها متوقف شد(۱۸). در مطالعات جدید مشخص شده است که این دارو می‌تواند جلوی پیشرفت برخی از تومورهای سرطانی را بگیرد اما، هنوز سازوکار دقیق اثر آن بر روی سلول‌های سرطانی مشخص نشده است. تحریک آپوپتوز یکی از سازوکارهای اصلی این دارو در از بین بردن سلول‌های سرطان پستان است(۱۹).

با توجه به اهمیت مطالعه در مورد سرطان پستان، به خصوص سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی و عدم پاسخ این سلول‌ها به درمان‌های رایج و نقش مسیر انتقال پیام Wnt در تکثیر سلول‌های سرطانی و متاستاز و اثر داروی کیناکرین در مهار پیشرفت برخی از تومورهای سرطانی، مطالعات بیش‌تری برای روشن‌سازی سازوکار اثر داروی کیناکرین بر سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی ضرورت دارد. بر این اساس، هدف این مطالعه بررسی اثر کیناکرین روی بیان ژن Wnt3a در رده سلولی MDA-MB 231 و رده سلولی MCF7 سرطان پستان است.

مواد و روش کار

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

در این مطالعه تجربی از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 استفاده شد که از بانک سلولی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۶ درصد و CO_2 ۵ درصد در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین – استرپتومایسین کشت داده شدند.

برای بررسی اثر سمیت کیناکرین (تهیه شده از شرکت سیگما) روی رده‌های سلولی مورد بررسی از روش MTT استفاده شد. بعد از تثبیت سلول‌ها در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ چاهکی (۵۰۰۰ سلول در هر چاهک)، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت، با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از داروی کیناکرین با سه بار تکرار تیمار شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر محلول mg/ml ۵ از MTT در PBS به هر چاهک اضافه شد. پس از سه ساعت، بعد از تخلیه محلول موجود در هر چاهک و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک، مقدار جذب محتویات هر چاهک و چاهک کنترل در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الیزا ارزیابی شد. مقدار IC_{50} و IC_5 با استفاده از نرم‌افزار Prism Graphpad 6 محاسبه شد.

در این مطالعه از محلول ترایزول (TRIzol) برای استخراج RNA تام استفاده شد. جهت نشان دادن حضور و خلوص RNA و آلودگی احتمالی با DNA از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. نمونه‌های مورد بررسی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ در دامنه ۲ – ۱/۸ بودند. برای از بین بردن ناخالصی DNA از کیت DNaseI treatment استفاده شد. سنتز cDNA توسط کیت شرکت Thermo Scientific مطابق دستورالعمل کیت انجام شد.

پرایمرهای ژن *Wnt3a* و بتادومیکروگلوبولین *(βMG)* توسط نرم‌افزار primer blast سایت NCBI طراحی شدند (جدول ۱). پرایمرها ازنظر امپلیکونی که تکثیر خواهد شد، امکان تکثیر محصولاتی غیرامپلیکون مورد نظر، اندازه محصول، دمای ذوب و خواص ترمودینامیکی پرایمرها ارزیابی شدند. پرایمرها توسط شرکت پیشگام تهیه شدند.

جدول (۱): اطلاعات مربوط به پرایمرها

نام ژن	Reverse primer (5'→3')	Forward primer (5'→3')	اندازه محصول
βMG	TGCTTACATGTCTCGATCCCAC	TGTCTTTCAGCAAGGACTGGT	۱۴۳
Wnt3a	CGACTCCTGGTAGCTTTGTC	GGCCGAGGGCATCAAGATT	۱۳۰

از روش qRT-PCR جهت بررسی تغییر بیان ژن مورد نظر استفاده شد. سایبرگرین برای ارزیابی تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، از ژن رفرنس بتادومیکروگلوبولین *(βMG)* استفاده شد.

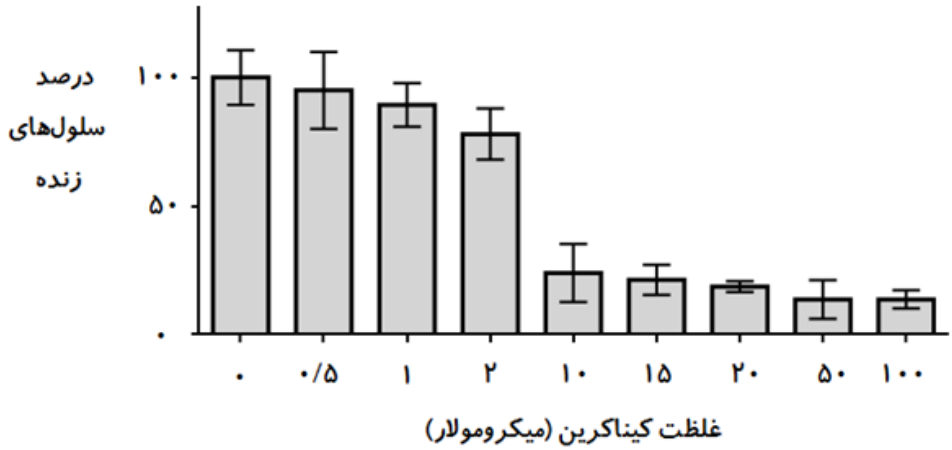
نتایج آمپلیکاسیون بر اساس منحنی ذوب و T_m به دست آمده ازنظر تعداد محصول بررسی شد و سپس مقدار C_t به دست آمده برای هر مورد با توجه به C_t به دست آمده برای ژن بتادومیکروگلوبین که ژن رفرنس در این مطالعه بود ارزیابی شد(۲۰). برای محاسبه C_t و میزان بازده از نرم‌افزار LinReg استفاده شد. میزان بیان نسبی ژن *Wnt3a* بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده توسط نرم‌افزار REST ارزیابی شد. $P < 0.05$ به‌عنوان حد تعیین معنی‌دار انتخاب شد. آزمایشات سه بار تکرار شد.

یافته‌ها

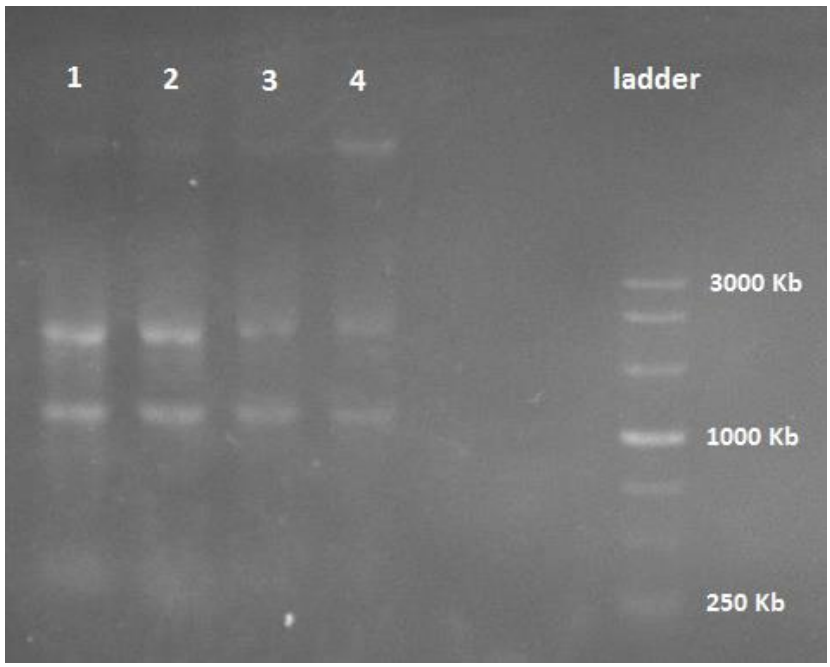
IC_{50} برای رده سلولی MDA-MB 231 (شکل ۱) و MCF7 پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با کیناکرین، به‌ترتیب برابر ۳/۷ و ۳/۲ میکرومولار به دست آمد. با توجه به مقدار IC_5، در ادامه مطالعه جهت بررسی اثر کیناکرین روی بیان ژن مورد بررسی از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین استفاده شد.

پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین، مولکول‌های RNA سلول‌ها استخراج شد و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی شد. در الکتروفورز ژل آگارز، باندهای ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA مربوط به سلول‌های کنترل همراه با سلول‌های تیمار شده با کیناکرین مشاهده شد (شکل ۲).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]



شکل (۱): منحنی مقدار- پاسخ تیمار رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان با غلظت ۰/۵، ۱، ۲، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کیناکرین در مدت ۷۲ ساعت

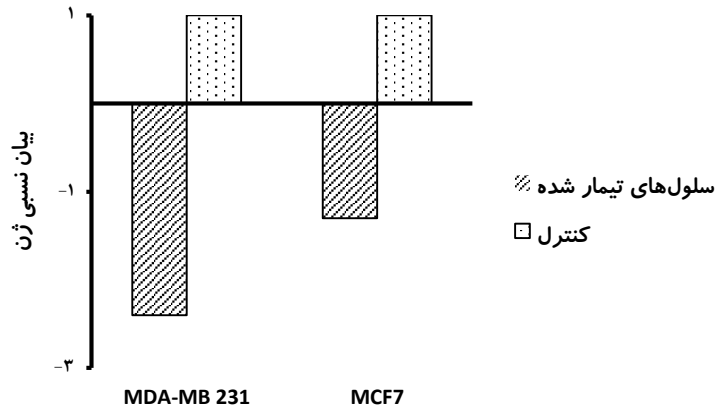


شکل (۲): الکتروفورز ژل آگارز RNA استخراج شده. ستون یک الی چهار مربوط به نمونه‌های رده سلولی MDA-MB-231 است.

در این مطالعه از ژن رفرنس بتادومیکروگلوبولین *(βMG)* استفاده شد و ارزیابی منحنی ذوب آمپلیکون مرتبط با ژن *βMG* و ژن *Wnt3a* بیان‌گر اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای بررسی بیان این ژن‌ها بود.

بیان ژن *Wnt3a* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 تیمار شده با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین در مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل به‌ترتیب ۲/۴ ($p = ۰/۳۴$) و ۱/۳ ($p < ۰/۰۵$) کاهش داشت (شکل ۳) که این تفاوت در مورد رده سلولی MDA-MB 231 معنی‌دار نبود.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]



شکل (۳): بیان ژن Wnt3a در رده سلولی MDA-MB 231 ($p = ۰/۳۴$) و MCF7 ($p < ۰/۰۵$) تیمار شده با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین به مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه تجربی داروی کیناکرین تغییری در بیان ژن *Wnt3a* در رده سلولی MDA-MB 231 نداشت اما در رده سلولی MCF7 سبب کاهش بیان ژن *Wnt3a* شد. رده سلولی MCF-7 سرطان پستان تهاجمی و پیش‌رونده نیست و به‌طور معمول قابلیت متاستازی شدن پایینی دارد و یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان است که بیش‌ترین تحقیقات در ارتباط با آن انجام شده است(۷، ۲۱). رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان رده سلولی با خصوصیات سرطان پستان سه‌گانه منفی و با خاصیت سلول‌های بنیادی سرطان است که قدرت تهاجم بالایی دارد(۶، ۲۲).

نخستین‌بار ارتباط بین سرطان و مسیر Wnt با مشاهده بروز هایپرپلازی و تومور در پستان موش‌ها به دنبال فعال‌سازی ژن *int1* (*Wnt1*) به اثبات رسید(۲۳). اکنون مشخص شده است که طیف وسیعی از سرطان‌ها در انسان در اثر جهش در حداقل یکی از اجزای مسیر Wnt بروز می‌کنند. این جهش‌ها سبب افزایش پیام‌رسانی این مسیر به صورت غیروابسته به لیگاند می‌شوند(۱۵). یکی از مهم‌ترین مثال‌های این دسته از سرطان‌ها، سرطان کولورکتال است که در حدود ۸۵ درصد از موارد آن دارای جهش‌های از بین برنده عملکرد در ژن سرکوب‌گر تومور APC هستند که یکی از پروتئین‌های مسیر انتقال پیام Wnt است. از آن‌جایی که این پروتئین در تخریب بتا-کاتنین در غیاب لیگاند نقش دارد لذا، جهش در آن سبب افزایش غلظت بتا-کاتنین و به دنبال آن پیام‌رسانی غیرطبیعی Wnt می‌شود. یکی دیگر از اجزای مسیر Wnt که به‌طور عمده در سرطان‌های مختلف دچار جهش می‌شود، پروتئین بتا-کاتنین است. این جهش‌ها به‌طور معمول جایگاه‌های فسفریلاسیون واقع در انتهای آمینی بتا-کاتنین را هدف قرار می‌دهند و به این ترتیب مانع از فسفریلاسیون و یوبی‌کویتینه شدن متعاقب آن می‌شوند. چنین جهش‌هایی از مولکول بتا-کاتنین، در طیف وسیعی از سرطان‌ها دیده می‌شوند. علاوه بر جهش‌های ذکر شده، جهش‌های از دست دادن عملکرد در اکسین که یکی از پروتئین‌های مسیر انتقال پیام Wnt است نیز در ۵ تا ۱۰ درصد از کارسینوماهای هپاتوسلولار و تعداد کمی از سرطان‌های کولورکتال یافت می‌شوند که فاقد جهش در APC و بتا-کاتنین هستند(۲۴). در سرطان پستان جهش در اجزای ذکر شده به ندرت رخ می‌دهد، با این وجود تجمع بتا -کاتنین در داخل سیتوپلاسم بسیاری از نمونه‌های سرطان پستان دیده می‌شود. این امر خود شاهدی بر این است که جهش‌های موجود در سرطان پستان بیش‌تر در سایر اجزای این مسیر رخ می‌دهند که اغلب در بالادست مسیر واقع شده‌اند(۲۴). تا به امروز جهش‌های مرتبط با سرطان در مولکول‌های Wnt انسانی گزارش نشده‌اند. با این حال، بر اساس مطالعات متعدد مشخص شده است که بیان برخی از آن‌ها در سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم تغییر می‌کند. گرچه هیچ نظر قطعی در رابطه با ژن‌های Wnt که در بافت پستان بیان می‌شوند وجود ندارد اما بیان حداقل هفت مورد از آن‌ها در غدد پستانی موش گزارش شده است. هم‌چنین، بیان مولکول‌های Wnt نوع ۲، ۳، ۴، ۵A، ۷B، ۱۳ و ۱۴در بافت پستان انسان گزارش شده است. به‌دلیل شباهت‌های ساختاری موجود بین لیگاندهای Wnt مختلف، این پروتئین‌ها به‌طور معمول مسیر انتقال پیام مشابهی را اتخاذ می‌کنند. این مسیر مشترک شامل بتا-کاتنین سیتوپلاسمی است. برای لیگاندهای که مسیر Wnt/β-catenin را تحریک می‌کنند، بیان بیش از حد آن‌ها برای تثبیت بتا-کاتنین

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

پیش‌بینی می‌شود و ممکن است عواقبی مشابه اثرات انکوژنی ژن‌های Wnt در غدد پستان موش را داشته باشند(۲۴). در این میان نقش لیگاند Wnt3a حائز اهمیت است. این لیگاند در سرطان‌های مختلف عملکردهای متفاوتی را از خود نشان می‌دهد. نقش Wnt3a در تقویت رشد و تکثیر با کمک نقش آن در مخالفت با عمل مهاری 8-Bromo-7-methoxychrysin بر خودنوسازی سلول‌های بنیادی کبد و تقویت خودنوسازی سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز در برخی از لوسمی‌های حاد مغز استخوان و رده‌های سلولی حاد لنفوبلاستیک قابل توجیه است(۱۶). به علاوه، مشخص شده است که Wnt3a تکثیر سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان را افزایش می‌دهد. Wnt3a منجر به کاهش غلظت بتا-کاتنین استیله در این سلول‌ها می‌شود و از این طریق تکثیر آن‌ها را افزایش می‌دهد. استیلاسیون بتا-کاتنین، عمل فسفریلاسیون را در آن تقویت می‌کند. شواهد نشان می‌دهند که در سلول‌های سرطانی پستان در حضور لیگاند Wnt3a، آنزیم داستیلاز HDAC6 سبب داستیلاسیون بتا-کاتنین می‌شود. این تنظیم اپی‌ژنتیک منجر به افزایش پایداری بتا-کاتنین و انتقال آن به داخل هسته می‌شود و برهم‌کنش آن با فاکتور رونویسی TCF4 را افزایش می‌دهد و از این طریق سبب تقویت رونویسی ژن‌های پایین‌دست می‌شود(۱۶، ۲۵).

کیناکرین یکی از مشتقات ۹-آمینوآکریدین است که در سال‌های اخیر اثر آن در مقابله با سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان پستان ارزیابی شده است(۲۶). اثر ضدسرطانی این دارو با سازوکار پیچیده‌ای انجام می‌شود. ازجمله این موارد می‌توان به مهار فسفولیپاز A2 و کاهش ساخت آراشیدونیک اسید، افزایش پروتئین Bax، کاهش بازدارنده سلولی پروتئین ۱ آپوپتوز (cIAP-1)، افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳، کاهش عملکرد NF-κB، مهار فعالیت پروتئین AKT، فعال کردن پروتئین P53 در برخی از سرطان‌ها و مهار فعالیت آنزیم توپوایزومراز اشاره کرد(۱۹، ۲۷، ۲۸).

در پژوهش حاضر از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین جهت تیمار سلول‌ها به‌منظور بررسی بیان ژن *Wnt3a* استفاده شد. با توجه به مطالعه Preet و همکارانش این غلظت بسیار کم‌تر از غلظتی است که کیناکرین ۶۰ درصد کاهش رشد را در رده سلولی MCF-10A ایجاد می‌کند که دارای خصوصیات اپی‌تلیال شبه‌طبیعی پستان است(۲۸). بنابراین، می‌توان در نظر گرفت که کیناکرین در غلظتی که در این پژوهش استفاده شد تأثیر ناچیزی روی سلول‌های طبیعی پستان دارد.

در این مطالعه اثر داروی کیناکرین روی بیان ژن *Wnt3a* در دو رده سلولی سرطان پستان ارزیابی شد. در شرایط این مطالعه داروی کیناکرین که تاکنون اثرات ضدسرطانی مختلفی از آن گزارش شده است روی میزان بیان ژن *Wnt3a* در رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان که دارای خصوصیات سرطان پستان سه‌گانه منفی است و خاصیت سلول‌های بنیادی سرطان را نیز دارد اثری نداشت اما روی رده سلولی MCF-7 که تهاجمی و پیش‌رونده نیست و به‌طور معمول قابلیت متاستازی شدن پایینی دارد اثر داشت.

با توجه به این که در این پژوهش از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین استفاده شده است می‌توان برای بررسی جامع‌تر در خصوص اثر کیناکرین روی بیان ژن *Wnt3a* در سرطان پستان از غلظت‌های بیش‌تر دارو استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی خانم سپیده دربهشتی با شماره ثبت ۲۶۵/م در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان مقاله از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند قدردانی می‌کنند.

References:

1. Angahar T. An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction.MOJ Biol Med 2017;1(4):1-5.
2. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. World J Clin Oncol 2014;5(3):283-98.
3. Heer E, Harper A, Escandor N, Sung H, McCormack V, Fidler-Benaoudia MM. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. Lancet Glob Health 2020;8(8):e1027-e37.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA-Cancer J Clin 2018;68(6):394-424.
5. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

recommendations. Ann Oncol 2012;23(suppl 6):7-12.

6. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Breast Dis 2010;32(1-2):1-17.
7. COMŞA Ş, Cimpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. Anticancer Res 2015;35(6):3147-54.
8. Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. Stem Cell Rev 2007;3(1):7-17.
9. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. J Transl Med 2013;11(1):1-12.
10. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis 2008;4(2):68-75.
11. Lindvall C, Bu W, Williams BO, Li Y. Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer. Stem Cell Rev 2007;3(2):157-68.
12. Huang H-C, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. Genome Bio 2004;5(7):1-7.
13. Mikels A, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene 2006;25(57):7461-8.
14. Jung Y-S, Park J-I. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β-catenin and the destruction complex. Exp Mol Med 2020;52:183–91.
15. Jackstadt R, Hodder MC, Sansom OJ. WNT and β-Catenin in Cancer: Genes and Therapy. Annu Rev Cancer Biol 2020;4:177-96.
16. He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian C-N, et al. Wnt3a: functions and implications in cancer. Chin J Cancer 2015;34(3):1-9.
17. Eriksson A, Österroos A, Hassan S, Gullbo J, Rickardson L, Jarvius M, et al. Drug screen in patient cells suggests quinacrine to be repositioned for treatment of acute myeloid leukemia. Blood Cancer J 2015;5(4):1-8.
18. Gurova K. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. Future Oncol 2009;5(10):1-28.
19. Ehsanian R, Van Waes C, Feller SM. Beyond DNA binding-a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. Cell Commun Signal 2011;9(1):1-18.
20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001;29(9):1-6.
21. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. J Natl Cancer Inst 2015;107(7):1-4.
22. Angelucci C, Maulucci G, Colabianchi A, Iacopino F, D'Alessio A, Maiorana A, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 and paracrine diffusible signals have a major role in the promotion of breast cancer cell migration induced by cancer-associated fibroblasts. Br J Cancer 2015;112(10):1675-86.
23. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. Oncogene 2017;36(11):1461-73.
24. Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. Cancer Biol Ther 2004;3(1):36-41.
25. Wang S-H, Li N, Wei Y, Li Q-R, Yu Z-P. β-catenin deacetylation is essential for WNT-induced proliferation of breast cancer cells. Mol Med Rep 2014;9(3):973-8.
26. Satapathy SR, Siddharth S, Das D, Nayak A, Kundu CN. Enhancement of cytotoxicity and inhibition of angiogenesis in oral cancer stem cells by a hybrid nanoparticle of bioactive quinacrine and silver: Implication of base excision repair cascade. Mol Pharm 2015;12(11):4011-25.
27. Gurova KV, Hill JE, Guo C, Prokvolit A, Burdelya LG, Samoylova E, et al. Small molecules that

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

28. Preet R, Mohapatra P, Mohanty S, Sahu SK, Choudhuri T, Wyatt MD, et al. Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity. Int J Oncol 2012;130(7):1660-70.

reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-κB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. P Natl Acad Sci USA 2005;102(48):17448-53.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]

Original Article

THE EFFECT OF QUINACRINE ON THE EXPRESSION OF *WNT3A* GENE IN MDA-MB 231 AND MCF7 BREAST CANCER CELL LINES

Sepideh Darbeheshti [1], Abdolrahim Nikzamir [2], Siamak Salami [3], Reza Mirfakhraie [4], Majid Sirati-Sabet [5]

Received: 20 April, 2020; Accepted: 26 July, 2020

Abstract

Background & Aims: Triple-negative breast cancer cells refer to any breast cancer that does not express the genes for the estrogen, progesterone, and HER2 receptors. The Wnt signaling pathway is important in the development and progression of various types of cancers. Quinacrine, a derivative of 9-aminoacridine, has been shown to inhibit the growth of several types of cancer cells. In this study, we examined the effect of Quinacrine on *Wnt3a* gene of Wnt signaling pathway in breast cancer cell lines MDA-MB 231 and MCF7. MDA-MB 231 cell line has triple-negative breast cancer cell properties.

Materials & Methods: Breast cancer cell lines, MDA-MB 231 and MCF7, were treated with 0.5 µM Quinacrine for 3 days. The dose was selected using the MTT assay. The expression of *Wnt3a* gene was quantified by Real-time PCR. Significance of observations was checked by means of appropriate statistical methods using $p<0.05$ as the level of significance.

Results: Quinacrine did not have a meaningful effect on *Wnt3a* gene expression on the MDA-MB 231 cell line ($p = 0.34$) in 0.5 µM concentration for 72 hours, but a decrease in Wnt3a gene expression of 1.3 times was observed in MCF7 cell line ($p < 0.05$).

***Conclusion*:** The *Wnt3a* gene is important in the Wnt signaling pathway and the present study demonstrated that Quinacrine could not affect the expression of this gene in the MDA-MB 231 cell line, however in the MCF7 cell line, a decrease in the Wnt3a gene expression was observed.

Keywords: Gene expression, MCF7, MDA-MB 231, Quinacrine, *Wnt3a*.

Address: Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: +989122050817
Email: *sirati@sbmu.ac.ir*

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(7): 538 ISSN: 2717-008X

[1] MSc Student in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Associate Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[5] Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-12-22]