

The effect of Quinacrine on *MMP1* Gene Expression in MDA-MB 231 and MCF7 cell lines of breast cancer

Ganjkhanelou Z¹, Sirati-Sabet M^{1*}, Salami S², Mirfakhraie R²

1- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

2- Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2019/07/27 | Accepted: 2020/02/10

Abstract:

Background: Breast cancer is the most frequent malignancy in women worldwide and occurs when cells in the breast begin to grow out of control. Matrix metalloproteinases (MMP), including MMP1 protein, are important in the progression of various types of cancer. 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 *MMP1* gene expression in breast cancer cell lines MDA-MB 231 and MCF7. MDA-MB 231 cell line has triple negative breast cancer cells properties.

Materials and Methods: Breast cancer cell lines, MDA-MB 231 and MCF7, were treated with 0.5 μ M Quinacrine for 3 days. The dose was selected using MTT assay. Expression of *MMP1* gene was quantified by Real-time PCR. Significance of observations were statistically checked by t-test using $P < 0.05$ as the level of significance.

Results: Quinacrine did not have meaningful effect on *MMP1* gene expression on MDA-MB 231 and MCF7 cell lines in 0.5 μ M concentration for 72 hours.

Conclusion: *MMP1* gene is important in metastasis and the present study showed that Quinacrine could not affect the expression of this gene on these breast cancer cell lines.

Keywords: Gene expression, MCF7, MDA-MB 231, *MMP1*, Quinacrine

*Corresponding Author:

Email: sirati@sbmu.ac.ir

Tel: 0098 912 205 0817

Fax: 0098 212 243 9974

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2020; Vol. 24, No 1, Pages 48-55

Please cite this article as: Ganjkhanelou Z, Sirati-Sabet M, Salami S, Mirfakhraie R. The effect of Quinacrine on *MMP1* Gene Expression in MDA-MB 231 and MCF7 cell lines of breast cancer. *Feyz* 2020; 24(1): 48-55.

بررسی اثر کیناکرین بر بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 سرطان پستان

زهرا گنج‌خانلو^۱، مجید سیرتی‌نابت^{۲*}، سیامک سلامی^۲، رضا میرفخرایی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان سراسر جهان است که به‌هنگام رشد خارج از کنترل سلول‌های پستان اتفاق می‌افتد. ماتریکس متالوپروتینازها (MMP)، از جمله پروتئین *MMP1*، در گسترش انواع مختلفی از سرطان‌ها نقش دارند. کیناکرین که مشتقی از ۹-آمینوآکریدین است، دارای اثری مهار روی رشد برخی از سلول‌های سرطانی است. در این مطالعه، اثر کیناکرین روی بیان ژن *MMP1* در رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 بررسی شده است. رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 دارای خصوصیات سلول‌های سه‌گانه منفی است.

مواد و روش‌ها: 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 و بیان ژن *MMP1* از طریق Real-time PCR بررسی شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری t بررسی و بر مبنای $P < 0/05$ تحلیل شدند.

نتایج: کیناکرین در مقدار ۰/۵ میکرومولار در مدت ۷۲ ساعت روی بیان ژن *MMP1* در رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 اثر معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: ژن *MMP1* نقش مهمی در متاستاز دارد و مطالعه حاضر نشان داد که کیناکرین در شرایط مورد بررسی، اثری روی بیان این ژن در رده‌های سلولی مورد بررسی ندارد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، MCF7، MDA-MB 231، *MMP1*، کیناکرین

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، صفحات ۵۵-۴۸

مقدمه

این نوع از سرطان پستان بسیار تهاجمی است و با پیش‌آگهی ضعیفی همراه می‌باشد و به‌طور معمول نسبت به سایر زیرگروه‌ها با عود بیشتری تظاهر می‌کند [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. در سرطان، برخی از مسیرهای فیزیولوژیکی دستخوش تغییر می‌شوند. مهاجرت و تهاجم سلول، مراحل ضروری در بسیاری از وقایع فیزیولوژیک از قبیل جایگزینی جنین، تشکیل جنین، ریخت‌زایی، تشکیل سلول عصبی، رگ‌زایی، التیام زخم و التهاب هستند. مهاجرت و تهاجم سلول در پاتوفیزیولوژی برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان دخیل است [۷]. پروتئین‌های ماتریکس متالوپروتیناز (*MMP*) که ماتریکسین نیز نامیده می‌شوند، از لحاظ ساختاری و عملکردی، خانواده‌ای از اندوپروتینازها هستند که در تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی دخالت دارند. به‌طور فیزیولوژیک، این آنزیم‌ها در وقایعی از قبیل تکوین جنین، رگ‌زایی، تخمک‌گذاری، توان‌یابی غده‌ی پستان و التیام زخم نقش ایفا می‌کنند. به‌نظر می‌رسد بیان غیرعادی این آنزیم‌ها در فرآیندهای پاتولوژیک از جمله آرتروز روماتوئید و استئوآرتریت، آمفیوزم ریوی، رشد تومور، تهاجم و متاستاز دخیل باشد [۸]. به‌طور

سرطان، رشد و تقسیم غیرطبیعی سلول‌ها است که اکنون به یکی از بزرگ‌ترین مشکلات جهان در زمینه سلامتی تبدیل شده است [۱]. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان تهاجمی در بانوان سراسر جهان است و بعد از سرطان ریه بیشترین دلیل مرگ در زنان به‌حساب می‌آید [۲،۳]. سرطان پستان شایع‌ترین نوع بدخیمی غریبوستی در زنان محسوب می‌شود و بسیار با نحوه زندگی افراد در ارتباط است [۳]. سلول‌های سرطانی پستان که بیان گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و Her-2 در آن‌ها بسیار کم است، سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) نامیده می‌شوند و درمان آن‌ها بسیار محدود است [۴].

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

دوره‌نویس: ۰۲۱۲۲۴۳۹۹۷۴

تلفن: ۰۹۱۲۲۰۵۰۸۱۷

پست الکترونیک: sirati@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۲/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۹

این مطالعه بررسی اثر کینازکیناز روی بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و رده سلولی MCF7 سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها

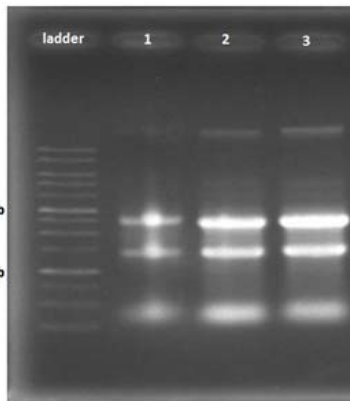
در این مطالعه تجربی از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 استفاده شد که از بانک سلولی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۶ درصد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. برای بررسی اثر سمیت کینازکیناز (تهیه‌شده از شرکت سیگما) روی رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 سرطان پستان از روش MTT استفاده شد. برای انجام بررسی اثر سمیت سلولی به روش MTT در هر چاهک، پلیت ۹۶ چاهکی ۵۰۰۰ سلول اضافه شد. پلیت در انکوباتور قرار گرفت و ۲۴ ساعت زمان داده شد تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها بچسبند. سپس، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف داروی کینازکیناز (در محدوده ۰/۵ تا ۱۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. محلول اصلی کینازکیناز در PBS تهیه شد؛ بنابراین از PBS به جای کینازکیناز به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت به محتویات داخل هر چاهک ۵ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ mg/ml در PBS) اضافه شد. پس از ۴ ساعت، محتویات چاهک‌ها تخلیه شدند و بعد به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از حلال آلی DMSO اضافه شد. جذب محلول هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش الیزا قرائت شد. با استفاده از یافته‌های به دست آمده مقدار IC_{50} و IC_{25} با کمک نرم‌افزار Prism 6 Graphpad محاسبه شدند. در این مطالعه، بعد از استخراج RNA تام، توسط محلول تریزول (TRIzol) جهت نشان‌دادن حضور و خلوص RNA و آلودگی احتمالی با DNA از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد استفاده شد. سنتز cDNA توسط کیت شرکت Thermo Scientific مطابق دستورالعمل کیت پس از برطرف کردن ناخالصی DNA توسط کیت DNaseI treatment انجام شد. پرایمرهای ژن *MMP1* و بتا‌دومیکروگلوبولین (β MG) طراحی شده توسط نرم‌افزار primer blast سایت NCBI (جدول شماره ۱) از شرکت پیشگام تهیه شدند. پرایمرها از نظر امپلیکونی که تکثیر خواهد شد و نیز امکان تکثیر محصولاتی غیر امپلیکون مورد نظر، اندازه محصول، دمای ذوب و خواص ترمودینامیکی پرایمرها ارزیابی شدند.

رایج، دست‌کم نوزده نوع مختلف از مولکول‌های MMP در پستانداران وجود دارد. همه‌ی مولکول‌های MMP دارای نواحی اختصاصی هستند که بین همه‌ی اعضای مختلف حفظ شده است. فعالیت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها به حضور کاتیون روی در جایگاه فعال کاتالیتیک بستگی دارد. یکی از اعضای مهم ماتریکس متالوپروتئینازها، پروتئین MMP-1 است. ژن آن حاوی ده اگزون است و بر روی کروموزوم شماره‌ی یازده قرار دارد. این پروتئین که کلاژناز-۱، کلاژناز فیبروبلاست و کلاژناز بینابینی نیز نامیده می‌شود، به هنگام بازسازی بافت تولید می‌گردد [۹]. برخی از مطالعات، نقش این پروتئین را در ارتباط با بعضی از سرطان‌ها مطرح می‌کنند [۱۰-۱۲]. داروی کینازکیناز از مشتقات ۹-آمینوآکریدین است. از دهه‌ی ۱۹۴۰ تا امروز آکریدین‌ها به عنوان داروی ضد مالاریا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. خواص درمانی مؤثر این ترکیبات نشان داد که می‌توانند به عنوان دارویی در خصوص لوپوس و آرتریت روماتوئید نیز استفاده شوند [۱۳]. در مطالعات جدید مشخص شده است که این ترکیبات می‌توانند جلوی پیشرفت برخی از تومورهای سرطانی را بگیرند، اما هنوز سازوکار دقیق اثر آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی مشخص نشده است. در زمینه اثر ضد تکثیری مشتقات ۹-آمینوآکریدین سازوکارهای مختلفی مطرح شده است. کینازکیناز سبب کاهش آراشیدونیک اسید از طریق مهار فسفولیپاز A2 می‌شود. این ترکیب موجب فعال شدن P53 در سرطان‌های پروستات، ریه، کولون و پستان می‌شود. AKT پروتئین پیام‌رسان مهمی است که در سرکوب فعالیت P53 مشارکت دارد. به نظر می‌رسد که آکریدین‌هایی مثل کینازکیناز می‌توانند با مهار ارتباط AKT و mTOR باعث مهار AKT شوند [۱۳]. مشخص شده است که کینازکیناز می‌تواند سبب کاهش عملکرد NF- κ B از طریق پروتئین P53 در سلول‌های سرطانی کلیه شود [۱۴]. در رده سلولی سرطان روده بزرگ، کینازکیناز در کاهش عملکرد فاکتور رونویسی NF- κ B بدون دخالت پروتئین P53 نقش دارد [۱۵]. کینازکیناز می‌تواند روی آپوپتوز از طریق کاهش بازدارنده سلولی پروتئین ۱ آپوپتوز (cIAP-1)، افزایش Bax و کاسپاز ۳ مستقل از P53 نقش داشته باشد [۱۶]. یکی دیگر از اثرات کینازکیناز نقش بازدارندگی آن روی آنزیم توپوایزومراز است [۱۷]. با توجه به اهمیت نقش پروتئین‌های ماتریکس متالوپروتئیناز در گسترش سلول‌های سرطانی و اثر داروی کینازکیناز در مهار پیشرفت برخی از تومورهای سرطانی، برای روشن‌سازی سازوکار اثر داروی کینازکیناز بر سلول‌های سرطان پستان به خصوص سرطان پستان سه‌گانه منفی مطالعات بیشتری ضرورت دارد. بر این اساس، هدف

جدول شماره ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرها

اندازه محصول	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	نام ژن
۱۴۳	TGTCCTTTCAGCAAGGACTGGT	TGCTTACATGTCTCGATCCCAC	<i>βMG</i>
۱۰۰	CAAACCCAAAAGCGTGTGA	TTGTGCGCATGTAGAATCTGTC	<i>MMP1</i>

RNA سلول‌ها پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین استخراج گردید و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی شد. در الکتروفورز ژل آگارز، باندهای rRNA ۲۸S و S (شکل شماره ۱). نمونه‌های مورد بررسی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ در دامنه ۲ - ۱/۸ بودند.



شکل شماره ۱- الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های MDA-MB 231 (ستون ۱، ۲ و ۳) مرحله قبلی از بین بردن ناخالصی DNA

در این مطالعه از ژن رفرنس بتادومیکروگلوبولین (*βMG*) استفاده شد و ارزیابی منحنی ذوب آمپلیکون مرتبط با ژن *βMG* و ژن *MMP1* بیانگر اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای بررسی بیان این ژن‌ها بود (شکل ۲). منحنی ذوب آمپلیکون ژن *MMP1* دارای T_m برابر ۷۸/۵ درجه سانتیگراد و منحنی ذوب آمپلیکون ژن بتادومیکروگلوبولین (*βMG*) دارای T_m برابر ۸۰/۴ درجه سانتیگراد بود.

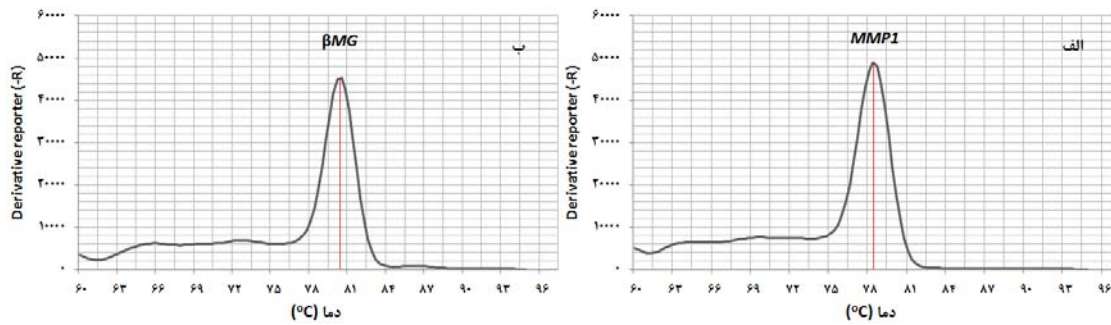
از روش qRT-PCR جهت بررسی تغییر بیان ژن مورد نظر استفاده شد. سایبرگرین برای ارزیابی تکثیر، مورد استفاده قرار گرفت. از ژن رفرنس بتادومیکروگلوبولین (*βMG*) استفاده شد. نتایج آمپلیکاسیون بر اساس بررسی منحنی ذوب و T_m به دست آمده از نظر تعداد محصول بررسی گردید و سپس مقدار C_t به دست آمده برای هر مورد با توجه به C_t به دست آمده برای ژن بتادومیکروگلوبولین که ژن رفرنس در این مطالعه بود، ارزیابی شد [۱۸]. برای محاسبه C_t و میزان بازده از نرم افزار LinReg استفاده شد. میزان بیان نسبی هر ژن در هر رده سلولی بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از نرم افزار REST 2009 ارزیابی شد. آزمایشات سه بار تکرار شدند و $P < 0/05$ به عنوان حد تعیین معنی دار انتخاب شد. این مطالعه با کد اخلاق MSP.REC.1396.26 ثبت شده است.

نتایج

پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین، مقدار IC_{50} و IC_{50} برای رده سلولی MDA-MB 231 به ترتیب ۳/۷ و ۰/۷ میکرومولار و برای رده سلولی MCF7 به ترتیب ۳/۲ و ۱/۱ میکرومولار به دست آمد (جدول شماره ۲). در ادامه مطالعه، جهت بررسی اثر کیناکرین روی بیان ژن *MMP1* از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین استفاده شد. با توجه به مقدار IC_{50} محاسبه شده، غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین اثر سمی بر رده‌های سلولی مورد بررسی ندارد.

جدول شماره ۲- مقدار IC_{50} و IC_{50} برای رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 پس از ۷۲ ساعت تیمار با کیناکرین

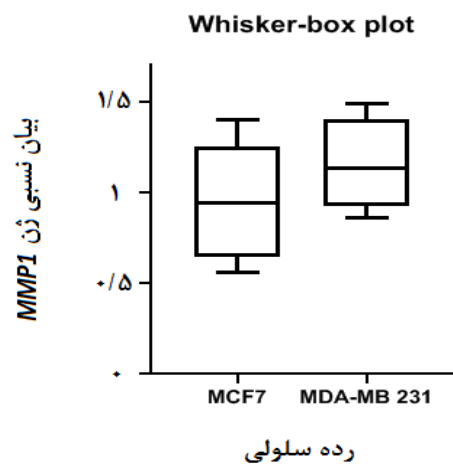
رده سلولی	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
MDA-MB 231	۳/۷	۰/۷
MCF7	۳/۲	۱/۱



شکل ۲- منحنی ذوب آمپلیکون‌ها. الف) منحنی ذوب آمپلیکون ژن *MMP1* با T_m برابر ۷۸/۵ درجه سانتیگراد؛ ب) منحنی ذوب آمپلیکون ژن بتادومیکروگلوبولین (*βMG*) با T_m برابر ۸۰/۴ درجه سانتیگراد

مطالعات متعددی در ارتباط با این رده سلولی وجود دارد و یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان است که بیشترین تحقیقات در ارتباط با آن انجام شده است [۲۱]. کیناکرین با نام تجاری آتابراین، مولکولی کوچک و یکی از مشتقات ۹-آمینوآکریدین است. این دارو در سال ۱۹۲۰ میلادی کشف شد و برای امراضی مانند مالاریا، عفونت‌های انگلی، آمیبی و ژیاوردیا به کار می‌رفت [۲۲]. در سال‌های اخیر این دارو پیامدهای موفقیت‌آمیزی در مقابله با سرطان‌هایی از جمله سرطان‌های پستان، کولون، لوزالمعده، ریه و کارسینومای سلول کلیوی داشته است [۲۳]. سازوکار ضدسرطانی کیناکرین پیچیده است و تاکنون مشخص شده است که به صورت‌های مختلف توانایی دارد روی سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارد [۱۳]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ میلادی توسط Preet و همکارانش صورت گرفت که بیانگر اثر داروی کیناکرین روی رده‌های سلولی MCF-7، MDA-MB 231 و MCF-10A (رده سلولی اپی‌تلیال شبه‌طبیعی) سرطان پستان بود. در این مطالعه، برای سلول‌های MCF-10A حتی پس از در معرض قرار گرفتن با غلظت ۲۰۰ میکرومولار دارو (غلظتی که باعث کاهش رشد تا ۶۰ درصد می‌شد) IC_{50} به دست نیامد. در این مطالعه، برای رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB 231 به ترتیب برابر با ۷/۵ و ۸/۵ میکرومولار در مدت ۲۴ ساعت گزارش شد [۱۷]. در پژوهش حاضر، رده سلولی MDA-MB 231 و MCF-7 مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج IC_{50} به دست آمده از روش MTT برای این رده‌های سلولی با تیمار ۷۲ ساعت با داروی کیناکرین به ترتیب برابر با ۳/۷ و ۳/۲ میکرومولار بود. یکی از دلایل تفاوت در نتیجه‌ی IC_{50} این رده‌های سلولی در مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ میلادی توسط Preet و همکارانش را می‌توان زمان تیمار داروی کیناکرین برای سلول‌ها به حساب آورد که در مطالعه‌ی حاضر ۷۲ ساعت بود. در پژوهش حاضر، از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین جهت تیمار سلول‌ها به منظور

بیان ژن *MMP1* 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 به ترتیب ۱/۱۳ و ۰/۹۴ بود که با توجه به میزان *P* (به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۸۳) این تفاوت معنی‌دار نبود (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- بیان نسبی ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 تیمار شده با غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین به مدت ۷۲ ساعت (میزان *P* به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۸۳). مقادیر بر اساس میانه (نمودار Whisker-box) گزارش شده است.

بحث

در این مطالعه داروی کیناکرین تغییری در بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 نداشت. رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان سه‌گانه منفی و با خاصیت سلول‌های بنیادی سرطان است که قدرت تهاجم بالایی دارد و به صورت چسبیده به کف فلاسک رشد می‌کند [۱۹،۶]. رده سلولی MCF-7 به زیرگروه مولکولی لومینال A تعلق دارد، تهاجمی و پیش‌رونده نیست و به‌طور معمول قابلیت متاستازی شدن پایینی دارد [۲۰].

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ میلادی توسط Liu و همکارانش روی رده سلولی MDA-MB 231 صورت گرفت، اثر کورکومین روی بیان پروتئین *MMP1* در این رده سلولی سرطان پستان بررسی شد. در این مطالعه، غلظت ۱۳/۶ میکرومولار کورکومین سبب کاهش بیان پروتئین *MMP1* شد [۲۹]. اثر عصاره متانولی برگ *Achyranthes aspera* روی بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MiaPaCa-2 سرطان لوزالمعده در سال ۲۰۱۰ میلادی بررسی شد. این عصاره سبب کاهش پنج برابری بیان ژن *MMP1* در این رده سلولی شد [۳۰]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ میلادی توسط Noratto و همکارانش روی رده سلولی MDA-MB 435 صورت گرفت که بیانگر اثر پلی‌فنل‌های استخراج‌شده از هلو روی بیان ژن تعدادی از متالوپروتینازها در این رده سلولی سرطان پستان بود. در این مطالعه پلی‌فنل‌های استخراج‌شده از هلو اثری روی بیان ژن *MMP1* نداشت [۳۱]. در بررسی اثر عصاره میکروجلبک *Chlorella minutissima* روی بیان ژن *MMP1* در سلول‌های MDA-MB 231 مشخص شد که این عصاره با غلظت ۲۰ $\mu\text{g/ml}$ توانایی کاهش بیان ژن *MMP1* را به میزان ۳/۸ برابر داشت [۳۲]. اسید سیرینجیک سبب مهار بیان ژن *MMP1* در سلول‌های کراتینوسیت انسانی (HaCaT) می‌شود که تحت تأثیر اشعه UVB قرار می‌گیرند. اسید سیرینجیک دارای اثر ضد سرطان، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانی است. این اسید با غلظت ۱۰ میکرومولار سبب کاهش ۷۰ درصدی در بیان ژن *MMP1* در این سلول‌ها می‌شود [۳۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ میلادی در مورد عصاره آبی تهیه‌شده از چای Fuzhuan-brick روی سلول‌های کراتینوسیت انسانی (HaCaT) مشخص شد که این عصاره وقتی این سلول‌ها تحت تأثیر اشعه UVB قرار می‌گیرند، می‌تواند سبب مهار بیان ژن *MMP1* در این سلول‌ها شود [۳۴]. در مطالعه روی سلول‌های ATDC5 (رده سلولی کندروژنیک موشی) که توسط IL-1 β تحریک شدند، بیان ژن *MMP1* افزایش یافت. مجاورت این سلول‌ها با سربروزید سویا سبب مهار اثر IL-1 β در بیان ژن *MMP1* در این سلول‌ها شد [۳۵]. در مطالعه حاضر، اثر داروی کیناکرین روی بیان ژن *MMP1* در دو رده سلولی سرطان پستان ارزیابی شد. در شرایط این مطالعه داروی کیناکرین که تاکنون اثرات ضد سرطانی مختلفی از آن گزارش شده است، روی میزان بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 سرطان پستان که دارای خصوصیات سرطان پستان سه‌گانه منفی است و خاصیت سلول‌های بنیادی سرطان را نیز دارد و رده سلولی MCF-7 که تهاجمی و پیش‌رونده نیست و به‌طور معمول قابلیت متاستازی شدن پایینی دارد، اثری نداشت. با توجه به این که در این

بررسی بیان ژن آن‌ها 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. بنابراین، می‌توان در نظر گرفت که کیناکرین در غلظتی که در این پژوهش استفاده شد، تأثیر ناچیزی روی سلول‌های طبیعی پستان داشته باشد. به‌طور کلی، مولکول‌های MMP در مراحل اولیه‌ی پیش‌روی تومور درگیر هستند. این مولکول‌ها ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه را تجزیه می‌کنند و در شکل‌گیری محیط ایده‌آل برای پیش‌روی بیشتر تومور دخیل هستند [۲۴]. مولکول MMP-1 به‌صورت یک پلی‌پپتید منفرد تولید و به‌صورت یک پروآنزیم ترشح می‌شود. به‌طور عمده شامل یک فرم غیرگلیکوزیله با وزن تقریبی ۵۷ کیلودالتون و یک فرم فرعی گلیکوزیله با وزن ۶۱ کیلودالتون است. در بافت‌های بالغ، مقدار MMP-1 به‌طور معمول کم است. بیان آن، زمانی که بدن با اختلالی از جمله التیام زخم و ترمیم یا فرآیندهای بازسازی که در شرایط پاتولوژیک اتفاق می‌افتند، مواجه می‌شود، بالا می‌رود. بیان MMP-1 توسط فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و سایتوکاین‌ها تنظیم می‌شود و فعالیت پروتئولیتیکی آن از طریق فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌هایی از قبیل آلفاماکروگلوبولین‌ها و مهارکننده‌های بافتی متالوپروتینازها به‌دقت کنترل می‌شود [۹]. مشخص شده است که برخی از سایتوکاین‌های التهابی، فعال‌سازی ژن *MMP1* را از طریق مسیر پیام‌رسانی MAPK با افزایش مقادیر پروتئین‌های AP-1 از جمله c-jun، c-fos و jun-B افزایش می‌دهند. تنوع سوبستراهای *MMP1* آن را به‌عنوان یکی از متالوپروتینازهای مهم مطرح می‌کند [۲۵]. *MMP1* می‌تواند به‌طور غیرمستقیم بیان ژن *MMP-9* را در ماکروفاژها با آزادسازی TNF- α القا کند [۲۴]. در سال ۲۰۱۵ میلادی گزارش شد که *MMP1* می‌تواند در ایجاد سرطان پستان نقش داشته باشد [۱۰]. بیان بالای mRNA پروتئین *MMP1* عامل خطر برای بقای بیماران مبتلا به سرطان پستان مهاجم است [۲۶]. این پروتئین می‌تواند در ایجاد متاستاز در ارتباط با سرطان پستان سه‌گانه منفی نقش داشته باشد [۲۷]. همچنین، مشارکت *MMP1* در ایجاد مقاومت دارویی در سرطان پستان گزارش شده است [۱۱]. مطالعات متعددی درخصوص اثر ترکیبات مختلف، روی *MMP1* انجام شده است. مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۷ میلادی توسط Teronen و همکارانش صورت گرفت که بیانگر اثر کلودرونیت (دی‌کلرومتیلن‌بی‌فسفات)، روی *MMP1* بود. در این مطالعه مشخص شد کلودرونیت در محدوده غلظتی ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرومولار سبب مهار *MMP1* می‌شود [۲۸]. در

سلول‌های MDA-MB-231 و MCF7 سرطان پستان نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی خانم زهرا گنج‌خانلو با شماره ثبت ۲۶۸/م در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان مقاله از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌کنند.

پژوهش از غلظت ۰/۵ میکرومولار دارو استفاده شده است، می‌توان برای بررسی جامع‌تر در خصوص اثر کیناکرین روی بیان ژن *MMP-1* در سرطان پستان از غلظت‌های بیشتر دارو استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که داروی کیناکرین سبب تغییر بیان ژن *MMP1* در غلظت ۰/۵ میکرومولار طی تیمار سه‌روزه

References:

- [1] Azizi MH, Bahadori M, Azizi F. History of cancer in Iran. *Arch Iran Med* 2013; 16(10): 613-22.
- [2] Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2014; 23(3): 409-22.
- [3] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 66-96.
- [4] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama* 2019; 321(3): 288-300.
- [5] Cetin I, Topcul M. Triple negative breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(6): 2427-31.
- [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] Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanita* 2010; 46: 66-80.
- [8] Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 2(4): 252-8.
- [9] Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell B* 2005; 37(2):283-8.
- [10] Farooqui M, Bohrer LR, Brady NJ, Chuntova P, Kemp SE, Wardwell CT, et al. Epiregulin contributes to breast tumorigenesis through regulating matrix metalloproteinase 1 and promoting cell survival. *Mol Cancer* 2015; 14(1): 138-51.
- [11] Shen CJ, Kuo YL, Chen CC, Chen MJ, Cheng YM. MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer. *PloS one* 2017; 12(3): 1-13.
- [12] Liu H, Kato Y, Erzinger SA, Kiriakova GM, Qian Y, Palmieri D, et al. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC cancer* 2012; 12(1): 583-95.
- [13] 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. *J Cell Commun Signal* 2011; 9(13): 1-18.
- [14] Gurova KV, Hill JE, Guo C, Prokvolit A, Burdelya LG, Samoylova E, et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF- κ B-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(48): 17448-53.
- [15] Jani TS, DeVecchio J, Mazumdar T, Agyeman A, Houghton JA. Inhibition of NF- κ B signaling by quinacrine is cytotoxic to human colon carcinoma cell lines and is synergistic in combination with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or oxaliplatin. *J Biol Chem* 2010; 285(25): 19162-72.
- [16] Wang Y, Bi Q, Dong L, Li X, Ge X, Zhang X, et al. Quinacrine enhances cisplatin-induced cytotoxicity in four cancer cell lines. *Chemotherapy* 2010; 56(2): 127-34.
- [17] 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 Cancer* 2012; 130(7): 1660-70.
- [18] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 1-6.
- [19] 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.
- [20] Comşa Şe, 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.
- [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] Gallant J-N, Allen JE, Smith CD, Dicker DT, Wang W, Dolloff NG, et al. Quinacrine synergizes with 5-fluorouracil and other therapies in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 12(3): 239-51.
- [23] 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.

[24] Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol* 2013; 48(3): 222-72.

[25] Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *BBA - Mol Cell Res* 2010; 1803(1): 3-19.

[26] Cheng S, Tada M, Hida Y, Asano T, Kuramae T, Takemoto N, et al. High MMP-1 mRNA expression is a risk factor for disease-free and overall survivals in patients with invasive breast carcinoma. *J Surg Res* 2008; 146(1): 104-9.

[27] Rattanasinchai C, Llewellyn B, Conrad SE, Gallo KA. Mixed-Lineage Kinase 3 signals through the FRA1-MMP1 axis to drive triple-negative breast cancer invasion and transendothelial migration. *Cancer Res* 2017; 77(13 Suppl): 2374-5.

[28] Teronen O, Kontinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (clodronate). *Calcified Tissue Int* 1997; 61(1): 59-61.

[29] Liu Q, Loo WTY, Sze SCW, Tong Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NF- κ B, cyclinD and MMP-1

transcription. *Phytomedicine* 2009; 16(10): 916-22.

[30] Subbarayan PR, Sarkar M, Impellizzeri S, Raymo F, Lokeshwar BL, Kumar P, et al. Anti-proliferative and anti-cancer properties of *Achyranthes aspera*: specific inhibitory activity against pancreatic cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2010; 131(1): 78-82.

[31] Noratto G, Porter W, Byrne D, Cisneros-Zevallos L. Polyphenolics from peach (*Prunus persica* var. Rich Lady) inhibit tumor growth and metastasis of MDA-MB-435 breast cancer cells in vivo. *J Nutr Biochem* 2014; 25(7): 796-800.

[32] Kunte M, Desai K. The protein extract of *chlorella minutissima* inhibits the expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in cancer cells through upregulation of TIMP-3 and down regulation of c-Jun. *Cell J (Yakhteh)* 2018; 20(2): 211-9.

[33] Ryu JY, Na EJ. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. *Biomedical Dermatol* 2018; 2(1): 15-24.

[34] Zhao P, Alam M, Lee SH. Protection of UVB-induced photoaging by Fuzhuan-Brick tea aqueous extract via MAPKs/Nrf2-mediated down-regulation of MMP-1. *Nutrients* 2019; 11(1): 60-75.

[35] Liu SC, Tsai C-H, Wu TY, Tsai CH, Tsai FJ, Chung JG, et al. Soya-cerebroside reduces IL-1 β -induced MMP-1 production in chondrocytes and inhibits cartilage degradation: implications for the treatment of osteoarthritis. *Food Agr Immunol* 2019; 30(1): 620-32.