

## Original Article

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

Ganjhanlou Z<sup>1</sup>, Sirati-Sabet M<sup>1\*</sup>, Salami S<sup>2</sup>, Mirfakhraie R<sup>2</sup>

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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: Ganjhanlou 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 231 MCF7 و MDA-MB سرطان پستان

زهرا گنج خانلو<sup>۱</sup>، مجید سیرتی ثابت<sup>۲</sup>، سیامک سلامی<sup>۳</sup>، رضا میرفخرابی<sup>\*</sup>

## خلاصه:

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

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطان پستان 231 MCF7 و MDA-MB با مقدار ۰/۵ میکرومولاو 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 میکرومولاو در مدت ۷۲ ساعت روی بیان ژن *MMP1* در رده سلولی سرطان پستان 231 MDA-MB و MCF7 اثر معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: زن *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.

وازگان کلیدی: بیان ژن *MMP1*, MCF7, MDA-MB 231, کیناکرین

دو ماہنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۱، فوروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، صفحات ۴۵-۴۸

## مقدمه

### این نوع از سرطان پستان بسیار تهاجمی است و با پیش‌آگهی

ضعیفی همراه می‌باشد و به طور معمول نسبت به سایر زیرگروه‌ها با عود بیشتری ظاهر می‌کند [۵]. رده سلولی 231 MDA-MB سرطان پستان با داشتن الگوی مولکولی خاص، به عنوان رده سلولی MCF7 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 متالوپروتئیناز (MMP) که ماتریکسین نیز نامیده می‌شوند، از لحاظ ساختاری و عملکردی، خانواده‌ای از اندوپروتئینازها هستند که در تجزیه ماتریکس خارج سلولی دخالت دارند. به طور فیزیولوژیک، این آنزیم‌ها در وقایعی از قبیل تکوین جنین، رگ‌زایی، تخمک‌گذاری، توان‌یابی غده‌ی پستان و التیام زخم نقش ایفا می‌کنند. به نظر می‌رسد بیان غیرعادی این آنزیم‌ها در فرآیندهای پاتوفیزیک از جمله آرتیت روماتوئید و استئوآرتیت، آمفیزم روی، رشد تومور، تهاجم و متاستاز دخیل باشد [۸]. به طور

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 به حساب می‌آید [۲، ۳]. سرطان پستان شایع‌ترین نوع بدخیمی غیرپوستی 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 مسؤول\*

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

دوانویس؛ ۰۲۱۲۴۳۹۹۷۴

تلفن: ۰۹۱۲۲۰۵۰۸۱۰

پست الکترونیک: sirati@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۲/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۹

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

### مواد و روش‌ها

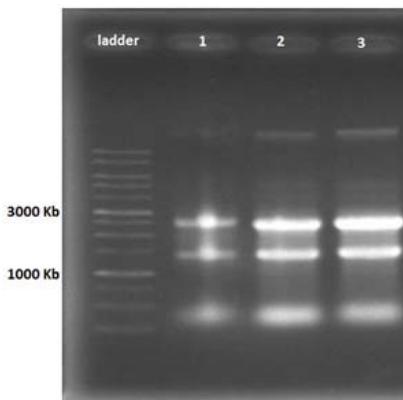
در این مطالعه تجربی از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB 231 و MCF7 استفاده شد که از بانک سلولی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۶ درصد  $\text{CO}_2$  ۵ درصد کشت داده شدند. برای بررسی اثر سمیت کیناکرین (تهیه شده 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 ۲۴ سلول اضافه شد. پلیت در انکوباتور قرار گرفت و ساعت زمان داده شد تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها بچسبند. سپس، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف داروی کیناکرین (در محدوده ۰/۵ تا ۱۰۰ میکرومولا) تیمار شدند. محلول اصلی کیناکرین در PBS تهیه شد؛ بنابراین از PBS به جای کیناکرین به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت به محتويات داخل هر چاهک ۵ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ mg/ml در PBS) اضافه شد. پس از ۴ ساعت، محتويات 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 رفانس ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا قرائت شد. با استفاده از Prism یافه‌های به دست آمده مقدار IC<sub>50</sub> و IC<sub>5</sub> با کمک نرم‌افزار Graphpad 6 محاسبه شدند. در این مطالعه، بعد از استخراج RNA تام، توسط محلول ترایازول (TRIzol) جهت نشان‌دادن حضور و خلوص RNA و آلدگی احتمالی با DNA از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد استفاده شد. ستر cDNA توسط کیت شرکت Thermo Scientific مطابق دستورالعمل کیت پس از برطرف کردن ناخالصی DNA توسط کیت DNaseI treatment انجام شد. پرایمرهای ژن *MMPI* و primer بتا دومیکروگلوبولین ( $\beta\text{MG}$ ) طراحی شده توسط نرم‌افزار blast سایت NCBI (جدول شماره ۱) از شرکت پیشگام تهیه شدند. پرایمرها از نظر امپلیکوئنی که تکثیر خواهد شد و نیز امکان تکثیر محصولاتی غیر امپلیکوئن موردنظر، اندازه محصول، دمای ذوب و خواص ترمودینامیکی پرایمرها ارزیابی شدند.

raig، دست کم 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، پروتین-۱ MMP است. ژن آن حاوی ده اگزون می‌شود، به هنگام بازسازی بافت تولید می‌گردد [۹]. برخی از مطالعات، نقش این پروتین‌ها در ارتباط با بعضی از سرطان‌ها مطرح می‌کنند [۱۰-۱۲]. داروی کیناکرین از مشتقات ۹-آمینوآکریدین است. از دهه 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 آرتربیت 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. کیناکرین 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 پروتین پیام‌رسان مهمی است که در سرکوب فعالیت P53 مشارکت دارد. به نظر می‌رسد که آکریدین‌هایی مثل کیناکرین می‌توانند با مهار ارتباط AKT و mTOR باعث مهار AKT شوند [۱۳]. مشخص شده است که کیناکرین می‌تواند سبب کاهش عملکرد NF-κB از طریق پروتین P53 در سلول‌های سرطانی کلیه شود [۱۴]. در رده سلولی سرطان روده بزرگ، کیناکرین در کاهش عملکرد فاکتور رونویسی-NF-κB بدون دخالت پروتین P53 نقش دارد [۱۵]. کیناکرین می‌تواند روی آپوپتوز از طریق کاهش بازدارنده سلولی پروتین ۱ آپوپتوز (cIAP-1)، افزایش Bax و کاسپار ۳ مستقل از P53 نقش داشته باشد [۱۶]. یکی دیگر از اثرات کیناکرین نقش بازدارنده آن روی آنزیم توپوایزو مراز است [۱۷]. با توجه به اهمیت نقش پروتین‌های ماتریکس متالوپروتئیناز در گسترش سلول‌های سرطانی و اثر داروی کیناکرین در مهار پیشرفت برخی از تومورهای سرطانی، برای روشن‌سازی سازوکار اثر داروی کیناکرین بر سلول‌های سرطان پستان به خصوص سرطان پستان سه‌گانه منفی مطالعات پیشتری 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	TGTCTTCAGCAAGGACTGGT	TGCTTACATGTCTCGATCCCAC	$\beta MG$
۱۰۰	CAAACCCCAAAAGCGTGTGA	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 ۲۸S rRNA و S ۱۸rRNA نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌ها مشاهده شد (شکل شماره ۱). نمونه‌های مورد بررسی دارای نسبت جذب (شکل شماره ۱). نسبت جذب در دامنه ۲ - ۱/۸ بودند.



شکل شماره ۱- الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های MDA-MB 231 (ستون ۱ و ۳) و MCF7 (ستون ۲) مراحله قبلی از DNA بین بردن ناخالصی

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

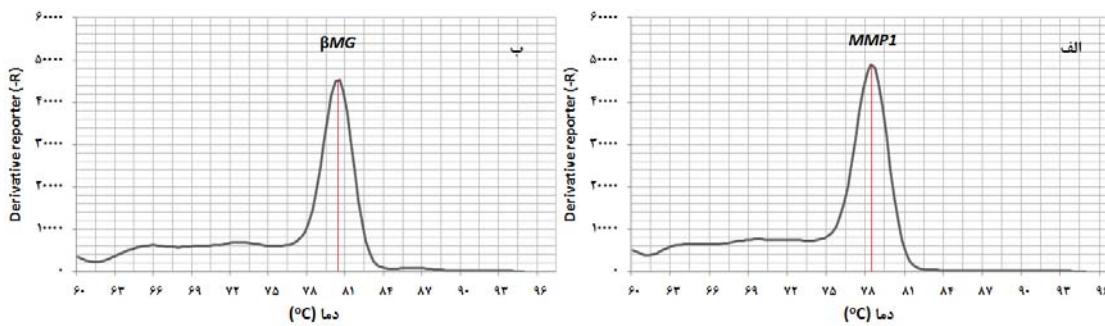
از روش qRT-PCR جهت بررسی تغییر بیان ژن موردنظر استفاده شد. سایبرگرین برای ارزیابی تکثیر، مورد استفاده قرار گرفت. از ژن رفرنس بتادومیکروگلوبولین ( $\beta MG$ ) استفاده شد. نتایج آمپلیکاسیون بر اساس بررسی منحنی ذوب و  $T_m$  به دست آمده از نظر تعداد محصول بررسی گردید و سپس مقدار  $C_t$  به دست آمده برای 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 نرم‌افزار LinReg استفاده شد. میزان بیان نسبی هر ژن در هر رده سلولی بین دو گروه تیمارشده و تیمارنشده با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 ارزیابی شد. آزمایشات سه‌بار تکرار شدند و  $P < 0.05$  به عنوان حد تعیین معنی‌دار 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  $IC_{50}$  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  $IC_5$  محاسبه شده، غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین اثر سمی بر رده‌های سلولی مورد بررسی ندارد.

جدول شماره ۲- مقدار  $IC_{50}$  برای رده سلولی MDA-MB 231 و  $IC_5$  برای رده سلولی MCF7 پس از ۷۲ ساعت تیمار با کیناکرین

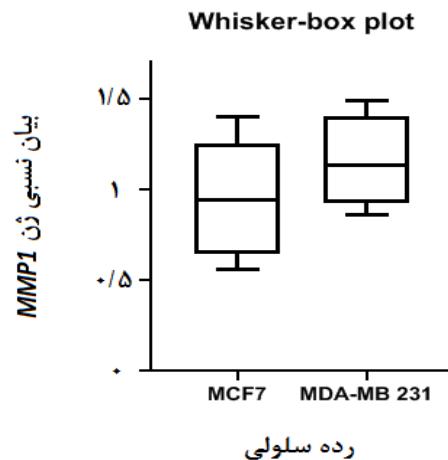
$IC_5$ (μM)	$IC_{50}$ (μM)	رده سلولی
۰/۷	۳/۷	MDA-MB 231
۱/۱	۳/۲	MCF7



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 ( $\beta MG$ ) 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 آتابیرین، مولکولی کوچک و یکی از مشتقات ۹-آمینوآکریدین است. این دارو در سال ۱۹۶۰ میلادی کشف شد و برای امراضی مانند مalaria، عفونت‌های انگلی، آمیبی و ژیارديا به کار می‌رفت [۲۲]. در سال‌های اخیر این دارو پیامدهای موافقیت‌آمیزی 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 MCF-10A، MCF-7 و MDA-MB 231 رده‌های سلولی (رده سلولی اپی‌تلیال شبکه‌ای) 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  $IC_{50}$  به ترتیب برابر با ۷/۵ و ۸/۵ میکرومولار در مدت ۲۴ ساعت گزارش شد [۱۷]. در پژوهش حاضر، رده سلولی MCF-7 و MDA-MB 231 در 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 نتیجه  $IC_{50}$  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 مطالعه حاضر ۷۲ ساعت بود. در پژوهش حاضر، از غلظت ۰/۵ میکرومولار کیناکرین جهت تیمار سلول‌ها بهمنظر

بیان ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 تیمارشده 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 معنی دار نبود (شکل شماره ۳).



رده سلولی

شکل شماره ۳- بیان نسبی ژن *MMP1* در رده سلولی MDA-MB 231 و MCF7 تیمارشده 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، رده سلولی با خصوصیات سرطان پستان سه‌گانه منفی و با خاصیت سلول‌های بنیادی سرطان است که قدرت تهاجم بالایی دارد و به صورت MCF-7 چسیبده به کف فلاسک رشد می‌کند [۱۹,۶]. رده سلولی به زیرگروه مولکولی لومنال A تعلق دارد، تهاجمی و پیش‌رونده نیست و به طور معمول قابلیت متابستازی شدن پایینی دارد [۲۰].

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ میلادی توسط Liu و همکارانش روی رده سلولی 231 MDA-MB 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 *MMPI* در رده سلولی MiaPaCa-2 سرطان لوزالمعده در سال ۲۰۱۰ میلادی بررسی شد. این عصاره سبب کاهش پنج برابری بیان ژن *MMPI* در این رده سلولی شد [۳۰]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ میلادی MDA-MB توسط Noratto و همکارانش روی رده سلولی 435 صورت گرفت که بیانگر اثر پلی‌فلل‌های استخراج شده از هلو روی بیان ژن تعدادی از متالوپروتئینازها در این رده سلولی سرطان پستان بود. در این مطالعه پلی‌فلل‌های استخراج شده از هلو اثری روی بیان ژن *MMPI* نداشت [۳۱]. در بررسی اثر عصاره میکروجلبک Chlorella minutissima روی بیان ژن *MMPI* در سلول‌های MDA-MB 231 مشخص شد که این عصاره با غلظت ۲۰ µg/ml توانایی کاهش بیان ژن *MMPI* را به میزان ۳/۸ برابر داشت [۳۲]. اسید سیرینجیک سبب مهار بیان ژن *MMPI* در سلول‌های کراتینوسيت انساني (HaCaT) می‌شود که تحت تأثیر اشعه UVB قرار می‌گیرد. اسید سیرینجیک دارای اثر ضد سرطان، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانی است. این اسید با غلظت ۱۰ میکرومولار سبب کاهش ۷۰ درصدی در بیان ژن *MMPI* در این سلول‌ها می‌شود [۳۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ میلادی در مرور عصاره آبی تهیه شده از چای Fuzhuan-brick روی سلول‌های کراتینوسيت انساني (HaCaT) مشخص شد که این عصاره وقتی این سلول‌ها تحت تأثیر اشعه UVB قرار می‌گیرد، می‌تواند سبب مهار بیان ژن *MMPI* در این سلول‌ها شود [۳۴]. در مطالعه روی سلول‌های ATDC5 (رده سلولی کندروروژنیک موشی) که توسط IL-1 $\beta$  تحریک شدند، بیان ژن *MMPI* افزایش یافت. مجاورت این سلول‌ها با سربزیذ سویا سبب مهار اثر IL-1 $\beta$  در بیان ژن *MMPI* در این سلول‌ها شد [۳۵]. در مطالعه حاضر، اثر دارویی کیناکرین روی بیان ژن *MMPI* در دو رده سلولی سرطان پستان ارزیابی شد. در شرایط این مطالعه دارویی کیناکرین که تاکنون اثرات ضد سرطانی مختلفی از آن گزارش شده است، روی میزان بیان ژن *MMPI* 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 به طور 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 غلطت بسیار کمتر از غلطتی است که کیناکرین ۶۰ درصد کاهش رشد را در رده سلولی MCF-10A ایجاد می‌کند که دارای خصوصیات اپی‌تیال شبکه‌ای پستان است. بنابراین، می‌توان در نظر گرفت که کیناکرین در غلطتی که در این پژوهش استفاده شد، تأثیر ناچیزی روی سلول‌های طبیعی پستان داشته باشد. به طور کلی، مولکول‌های MMP در مراحل اولیه 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 به صورت یک پلی‌پپتید منفرد تولید و به صورت یک پرو‌آنزیم ترشح می‌شود. به طور عمده شامل یک فرم غیر‌گلیکوزیله با وزن تقریبی ۵۷ کیلو Dalton و یک فرم فرعی گلیکوزیله با وزن ۶۱ کیلو Dalton است. در بافت‌های بالغ، مقدار MMP-1 به طور معمول کم است. بیان آن زمانی که بدن با اختلالی از جمله التام زخم و ترمیم یا فرآیندهای بازسازی که در شرایط پاتولوژیک اتفاق می‌افتد، مواجه می‌شود، بالا می‌رود. بیان ۱۰۰ توسط فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و سایتوکاین‌ها تنظیم می‌شود و فعالیت پروتولیتیکی آن از طریق فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌هایی از قبیل آلفاماکروگلوبولین‌ها و مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها به دقت کنترل می‌شود [۹]. مشخص شده است که برخی از سایتوکاین‌های التهابی، فعال‌سازی ژن *MMPI* را از طریق مسیر پیام‌رسانی MAPK با افزایش مقادیر پروتئین‌های AP-1 از جمله c-fos و c-jun و jun-B افزایش می‌دهند. تنوع سوبسترهای MMP آن را به عنوان یکی از متالوپروتئینازهای مهم مطرح می‌کند [۲۵]. MMP-9 می‌تواند به طور غیر مستقیم بیان ژن *MMPI*-9 را در ماکروفازها با آزادسازی TNF- $\alpha$  تحریک کند [۲۶]. در سال ۲۰۱۵ میلادی گزارش شد که 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 در خصوص اثر ترکیبات مختلف، روی MMP1 انجام شده است. مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۷ میلادی توسط Teronen و همکارانش صورت گرفت که بیانگر اثر کلودرونوت (دی‌کلرومتیلن‌بی‌فسفات)، روی MMP1 بود. در این مطالعه مشخص شد کلودرونوت در محدوده غلطتی ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرومولار سبب مهار MMP1 می‌شود [۲۸]. در

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

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی خانم زهرا گنج خانلو با شماره ثبت ۲۶۸/م در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسنده‌گان 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, Topcu 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-κB-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-κB 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. *Cancer 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. Stearyl-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, Konttinen 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-κB, 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 $\beta$ -induced MMP-1 production in chondrocytes and inhibits cartilage degradation: implications for the treatment of osteoarthritis. *Food Agr Immunol* 2019; 30(1): 620-32.