

اثر نانوذرات لیپیدی جامد کوئرتستین بر اتوفاژی و بیان پروتئین ATG5 در رده سلولی سرطان انسانی (MCF-7)

فیروزه نیازوند^{۱*} (id)، لعلیا سادات خرسندی^۲ (id)، فروزان آب سالان^۱ (id)، عاطفه اشتری^۳ (id)

۱- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، آبادان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

۳- دکترای تخصصی علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

یافته / دوره ۲۲ / شماره ۲ / تابستان ۹۹ / مسلسل ۸۴

چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۲ پذیرش مقاله: ۹۹/۱۲/۲۶

مقدمه: با وجود اثر اثبات شده ضد توموری برای کوئرتستین بدلیل اثر بخشی پایین آن استفاده از این دارو محدود شده است. در این مطالعه، هدف ارزیابی میزان اثر سمیت نانوذرات لیپیدی جامد کوئرتستین بر مرگ سلولی از نوع اتوفاژی بر رده سلولهای سرطان پستان انسانی می باشد.

مواد و روش ها: رده سلولهای سرطان پستان انسانی MCF-7 و رده سلولهای نرمال MCF-10A به مدت ۴۸ ساعت با ۲۵ میکرومولار کوئرتستین و نانوذرات لیپیدی جامد کوئرتستین تیمار شدند. میزان بقای سلولی و اتوفاژی برای تعیین اثربخشی نانوذرات لیپیدی جامد اندازه گیری شد.

یافته ها: تعیین مشخصات نانوذرات انجام شد. ارزیابی میزان سمیت سلولی نشان داد که نانوذرات لیپیدی جامد باعث مهار رشد سلولها در مقایسه با کوئرتستین آزاد می شوند. نانوذرات لیپیدی جامد باعث افزایش قابل ملاحظه ای در اتوفاژی سلولهای MCF-7 شده و میزان بیان پروتئین ATG5 بطور قابل ملاحظه ای در مقایسه با کوئرتستین آزاد، افزایش نشان داد. علاوه بر این میزان قابلیت حیات و اتوفاژی در رده سلولهای نرمال تفاوت قابل ملاحظه ای نشان نداد.

بحث و نتیجه گیری: طبق این نتایج نانوذرات لیپیدی جامد کوئرتستین باعث افزایش میزان سمیت کوئرتستین روی سلولهای سرطان پستان انسانی می شوند.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، اتوفاژی، نانوذرات لیپیدی جامد، کوئرتستین.

*آدرس مکاتبه: خوزستان، آبادان، دانشکده پزشکی.

پست الکترونیک: niazvandf@gmail.com

مقدمه

بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی سرطان بعد از بیماری‌های قلبی عروقی شایعترین علت مرگ و میر انسان‌ها در کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۱). سرطان پستان با کسب رتبه سوم در بین سرطان‌های زنان، دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و شایعترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان می‌باشد (۲). امروزه از روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود، ولی متاسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می‌باشد. بنابراین، تحقیق در زمینه تولید داروهایی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری است. تاکنون ترکیبات بسیاری شناخته شده اند که سلولهای سرطانی را هدف قرار می‌دهند. اثر این ترکیبات بعنوان یک داروی ضد سرطان تا حد زیادی به توانایی آنها در اثرگذاری بر قابلیت حیات و مرگ سلولهای سرطانی بستگی دارد (۳). کوثرستین از زیر مجموعه فلاونوئیدها می‌باشد که به طور عمده در سبزیجات و میوه‌ها به فرم گلیکوزید (به خصوص در پیاز قرمز، سیب سرخ، چای، کلم بروکلی، انگور قرمز و...) وجود دارد. کوثرستین تجاری پودری زرد رنگ است با قابلیت حلالت اندک در آب گرم، که به طور کامل در الکل و لیپیدها حل می‌شود. نانوذرات لیپیدی جامد یک نوع سیستم دارو رسانی هستند که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده و بعنوان سیستم حامل برای امولسیون‌ها، لیپوزوم‌ها، میکروذرات پلیمری و نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). Pool و همکارانش (۲۰۱۲) موفق به نانو کپسوله کردن کوثرستین و کاتچین توسط پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) شدند. بررسی آنها نشان داد که این فرایند سبب افزایش معنی-داری در فعالیت آنتی اکسیدانی آنها می‌شود (۵). هم سو با این تحقیقات Yuan نشان داد که استفاده از کوثرستین کپسوله به صورت لیپوزوم می‌تواند به صورت قابل

ملاحظه‌ای رشد تومورها در مدل‌های حیوانی را مهار کند (۶). Sun و همکارانش (۲۰۱۴) نشان دادند نانولیپوزوم کوثرستین به میزان بسیار بیشتری نسبت به کوثرستین آزاد جذب سلولهای سرطانی پستان (MDA-MB-231 و MCF-7) می‌شود. آنها با انجام آزمایش آنکسین نشان دادند که نانولیپوزوم کوثرستین به طور قابل ملاحظه‌ای باعث القا فرایند آپوپتوز در این سلولها می‌شود (۷). مساله مقاومت نسبت به آپوپتوز از مشکلات عمده در درمان سرطان‌ها می‌باشد. مکانیسم‌های مولکولی مختلفی برای مهار آپوپتوز در سلولهای توموری وجود دارد، سلولهای توموری با بیان پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک مانند Bcl-2، یا از طریق کاهش بیان یا موتاسیون پروتئین‌های پروآپوپتوتیک مانند Bax نسبت به آپوپتوز مقاوم می‌شوند (۸،۹). اتوفازی فرایندی است که در آن سلول اجزای خود را هضم می‌کند. این خودخوری نه تنها مواد مغذی لازم برای حفظ عملکردهای حیاتی سلول را فراهم می‌کند، بلکه می‌تواند سلول را از اندامک‌های اضافی، زاید یا آسیب‌دیده، پروتئین‌های به اشتباه تاخورد و میکروارگانیسم‌های مضر رهایی بخشد. پیشنهاد شده است که اتوفازی در صورت غیر فعال بودن سیستم آپوپتوز می-تواند به طور مستقیم سلولهای سرطانی را از بین ببرد (۱۰،۱۱). اتوفازی با تمیز کردن سلول از ارگانل‌های آسیب دیده مانند میتوکندری‌های شکسته و حذف پروتئین‌های تغییر شکل یافته، پروتئین‌های تجمع یافته و عوامل بیماری‌زای داخل سلولی، نقش مهمی در تنظیم هموستاز سلول دارد (۱۲). مشخص شده که اتوفازی در شرایطی مانند استرس متابولیک و گرسنگی سلولی به میزان زیادی رخ می‌دهد. اتوفازی همچنین عملکردهای پاتوفیزیولوژیک و فیزیولوژیک چندگانه‌ای در تمایز سلولی، سیستم دفاعی و مرگ سلولی دارد (۱۳). نقش بسیار پیچیده اتوفازی در بیماری‌هایی مانند سرطان، کاردیومیوپاتی و بیماری‌های سیستم عصبی نیز تایید شده است. شواهد محکم و قابل

(Aldrich) به این لیپید مذاب افزوده و هموژن شد (۲۷،۲۸). در ظرف دیگری ۶ گرم آب دیونیزه و ۵/۷۶ گرم توئین ۸۰ (Across, Organics, USA) مخلوط شده و در حمام آب ۷۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. پس از هم دما شدن فاز روغنی و آبی، فاز آبی به فاز روغنی افزوده شده و به کمک حمام اولتراسونیک (Heidolph, Germany) ۷۵ درجه سانتی‌گراد هموژن شد. میکرومولسیون حاصل بلافاصله در ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه ۴ درجه سانتی‌گراد ریخته شده و به کمک استیرر بمدت ۴۰ دقیقه (۱۵۰۰ دور در دقیقه) هموژن شد.

تعیین خصوصیات نانوذرات

اندازه‌گیری اندازه ذرات و پتانسیل زتا: در این بخش میانگین اندازه SLN های حاصل با دستگاه نانوسایزر (Malvern, UK) اندازه‌گیری شده و توزیع اندازه ذره‌ای محصول بدست آمد.

تعیین میزان کوثرستین محصور شده در نانوذرات

لیپیدی

پس از جداسازی نانوذرات لیپیدی جامد کوثرستین (سانتریفیوژ rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه) از کوثرستین آزاد، مقدار کوثرستین محلول جداشده با روش‌های اسپکتروفوتومتریک با طول موج ۲۵۶ نانومتر (UV 1700, Shimadzu, Kyoto, Japan) ارزیابی شد. کارایی انکپسوله شدن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

انکپسوله شدن = مقدار داروی اضافه شده - مقدار داروی محلول رویی × ۱۰۰

برای تعیین میزان بارگذاری دارو، پس از حل شدن ۵۰ میلی گرم پودر کوثرستین در متانول، محلول حاصل تا ۱۰ میلی لیتر رقیق شده سپس محتوای کوثرستین بوسیله اسکترفوتومتر در ۲۵۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد میزان رهاسازی با فرمول زیر محاسبه شد (۲۸).

۱۰۰ × وزن داروی اولیه - وزن داروی آزاد = درصد بارگذاری

وزن لیپید

قبولی وجود دارد که اتوفاژی با مهار عوامل ایجاد شده بوسیله استرس اکسیداتیو (آسیب به DNA، نکروز بافت‌ها و التهاب) در نهایت با حفظ یکپارچگی ژنومی باعث پیشگیری از تومورزایی می‌شود (۱۴). بر اساس این شواهد می‌توان گفت مرگ سلولی از نوع اتوفاژی در برخی شرایط خاص بعنوان یک مهارکننده تومور عمل می‌کند (۱۵). از طرف دیگر، سلولهای تغییر یافته معمولاً سطح بالایی از اتوفاژی را نشان می‌دهند که با افزایش سطح متابولیسم آنها باعث تکثیر و بقای سلولی در شرایط درون تنی و برون تنی می‌شود (۱۶،۱۷). در شرایط کمبود اکسیژن و مواد مغذی سلولهای سرطانی می‌توانند اتوفاژی را به عنوان یک مسیر برای زنده ماندن انتخاب کنند (۱۸،۱۹). ژنوتوکسیک و استرس متابولیک همراه با درمان‌های رایج و معمول ضد سرطان ممکن است فعالیت اتوفاژی سلول‌های سرطانی را افزایش دهد و این اعتقاد وجود دارد که مهار اتوفاژی ممکن است اثربخشی داروهای ضد سرطان را افزایش دهد (۲۰، ۲۱). بنابراین، اتوفاژی بعنوان مهارکننده اولیه تومورزایی می‌تواند در ادامه روند سرطان، باعث ناپایداری سلولهای سرطانی شود (۲۲-۲۴). پروتئین ATG5 (Autophagy related 5) در انسان نقش کلیدی در گسترش غشاهای فاگوفوریک و زیکول‌ها طی فرایند اتوفاژی دارد و افزایش بیان آن موید افزایش میزان اتوفاژی می‌باشد (۲۵). در مطالعه حاضر ضمن بررسی اثر نانوذرات لیپیدی جامد کوثرستین در رده سلولی سرطان پستان انسانی (MCF-7)، بیان پروتئین ATG5 و مارکر اختصاصی تشخیص اتوفاژی (LC3-II) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

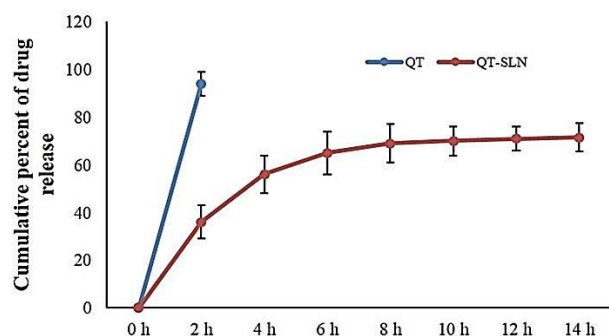
آماده سازی نانو ذرات لیپیدی جامد کوثرستین

برای تهیه نانو ذرات، ۳۸۴ میلی گرم کامپریتل 888ATO (Gattefosse, France) در دمای ۷۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد ذوب شد و ۵۰ میلی گرم کوثرستین (Sigma)

میزان رهاسازی کوئرسستین

اندازه‌گیری بر اساس مطالعات قبلی با استفاده از کیسه دیالیز انجام شد (۲۹). بر اساس فرمول محاسبه وزن دارو، مقداری از امولسیون، حاوی ۳ میلی‌گرم از کوئرسستین وارد کیسه دیالیز (Viskase, Lombard, IL, USA) شد. کیسه دیالیز نانوذرات را درون خود نگه می‌دارد و کوئرسستین‌های آزاد را وارد محیط می‌کند. نمونه جمع‌آوری شده بوسیله اسپکتروفتومتر (LS50B, Waltham, MA, USA) در ۲۵۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. (نمودار ۱)

$$\text{درصد رهاسازی دارو} = (\text{میزان آزاد شده کوئرسستین} - \text{میزان کل کوئرسستین}) \times 100$$



نمودار ۱. درصد رهاسازی دارو

گروه‌های مورد آزمایش

رده‌ی سلولی سرطان پستان انسانی (MCF7) از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شد. گروه کنترل، شامل سلول‌هایی بودند که هیچ دارویی به محیط آنها اضافه نشده بود. گروه‌های آزمایش، به ترتیب با غلظت‌های ۲۵ میکرومولار کوئرسستین و ۲۵ میکرومولار نانوکوئرسستین تیمار شدند. غلظت نانوکوئرسستین براساس مطالعات قبلی و نیز انجام مطالعه پایلوت، انتخاب شد. جهت تعیین بهترین غلظت نانو دارو برای عملکرد ضدسرطانی آن، سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های مختلفی از کوئرسستین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰) μM قرار داده شدند. با تکنیک MTT مشخص شد که درصد سلول‌های زنده، به طور معنی‌داری در غلظت‌های ۲۵ μM و ۵۰ کاهش یافته است. تفاوت

معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده بین غلظت‌های ۲۵ و بالاتر از ۲۵ وجود نداشت. بنابراین، در این تحقیق از دوز ۲۵ μM به‌عنوان دوز موثر QT-SLN استفاده شده است.

کشت سلول‌های MCF-7

رده سلول‌های MCF7 در محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FBS) و محیط کشت حاوی انسولین ۱٪ واحد بر میلی لیتر، L-گلوتامین ۳٪ گرم، پنی‌سیلین (100mg/mL) و استرپتومایسین (100 U/mL) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. در این مطالعه از z-VAD به‌عنوان مهارکننده آپوپتوز و از 3-ma به‌عنوان مهارکننده اتوفاژی استفاده شد.

تکنیک MTT

برای مقایسه اثرات QT-SLN و کوئرسستین بر قابلیت زنده ماندن و تکثیر سلولی، پس از ترپسینه کردن، سانتریفیوژ و تشکیل سوسپانسیون، سلول‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شدند. ۴۸ ساعت پس از افزودن داروها به سوسپانسیون سلولی میزان ۵/۰ mg/ml MTT به هر خانه اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این مرحله، مایع رویی را دور ریخته و ۱۰۰ μL DMSO جهت حل کردن فرمازان‌های تولید شده، به هر کدام از چاهک‌های ظرف کشت اضافه شد. میزان جذب با استفاده از Microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بدلیل اینکه میزان جذب متناسب با تعداد سلول‌های زنده در هر نمونه می‌باشد، تکنیک MTT در واقع منعکس‌کننده‌ی میزان تکثیر سلولی نیز می‌باشد (۳۰-۳۲).

رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت مارکر اختصاصی

تشخیصی اتوفازی (LC3-II)

سلولهای MCF-7 کشت داده شده، پس از تیمار بوسیلهی QT-SLN و کوئرسستین، با قرار دادن درون پارافرمالدهید ۴٪ در PBS به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. سلولها پس از دو بار شستشو با PBS به مدت ۱۵ دقیقه با تریتون X-100 آغشته شدند. اتصالات غیر اختصاصی بوسیلهی محلول ۱٪ BSA و PBS مسدود شدند. پس از شستشو با PBS، سلولها با آنتیبادی اولیهی Anti-LC3-II (sc-16755, Santa Cruz) با غلظت ۱/۱۰۰ به مدت یک شب (در دمای ۴ درجه سانتیگراد) تیمار شدند. پس از دو بار شستشو با PBS، سلولها با آنتیبادی ثانویه (FITC-conjugated anti-mouse secondary) (sc-2356, Santa Cruz) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق آغشته شدند. بعد از شستشو، سلولها با DAPI (۱:۱۰۰۰) در PBS به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. شاخص اتوفازی را با تقسیم نمودن تعداد سلولهای LC3-II مثبت موجود در یک فیلد تصادفی میکروسکوپی، بر تعداد کل سلولهای موجود در آن فیلد و سپس ضرب آن در ۱۰۰ محاسبه شد. درصد اتوفازی ۱۰ فیلد تصادفی محاسبه شده و میانگین آنها برای هر گروه بدست آمد. برای هر گروه حداقل سه اسلاید مورد آزمایش قرار گرفت (۳۳،۳۴).

رنگ آمیزی وسترن بلات

سلولهای تیمار شده پس از شستشو با PBS دارای pH= 7.4) در بافر لیز کننده رادیو ایمونو پرسیپیتیشن و مهار کننده پروتئازها لیز شد. غلظت پروتئین با استفاده از کیت سنجش BCA (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA) تعیین شد.

پروتئین لیز شده با استفاده از (Novex, San Diego, CA, SDS-PAGE USA) ۱۰ درصد جدا سازی شده و به

غشاء PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) منتقل شد.

آنتی بادیهای اولیه و ثانویه از شرکت Santa Cruz Biotechnology خریداری شدند. پروتئین با کمک کیت تشخیص ECL (Millipore, Burlington, MA, USA) شناسایی شد. تراکم باند به کمک نرم افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ارزیابی شد. (شکل ۲)

آنالیز آماری

مقایسه میانگین گروهها با استفاده از آنالیزهای واریانس یکطرفه و روشهای post hoc بر اساس تستهای Newman-Keuls انجام شد. جهت بررسی و مقایسه میانگین دو گروه از روش student's test استفاده شد. شاخص معنی داری p کوچکتر از پنج صدم در نظر گرفته شد.

یافته ها

اندازه گیری اندازه ذرات و مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون برحسب پتانسیل زتا با دستگاه zetasizer nano-zs (Mulvern zen3600) تعیین شد (جدول ۱).

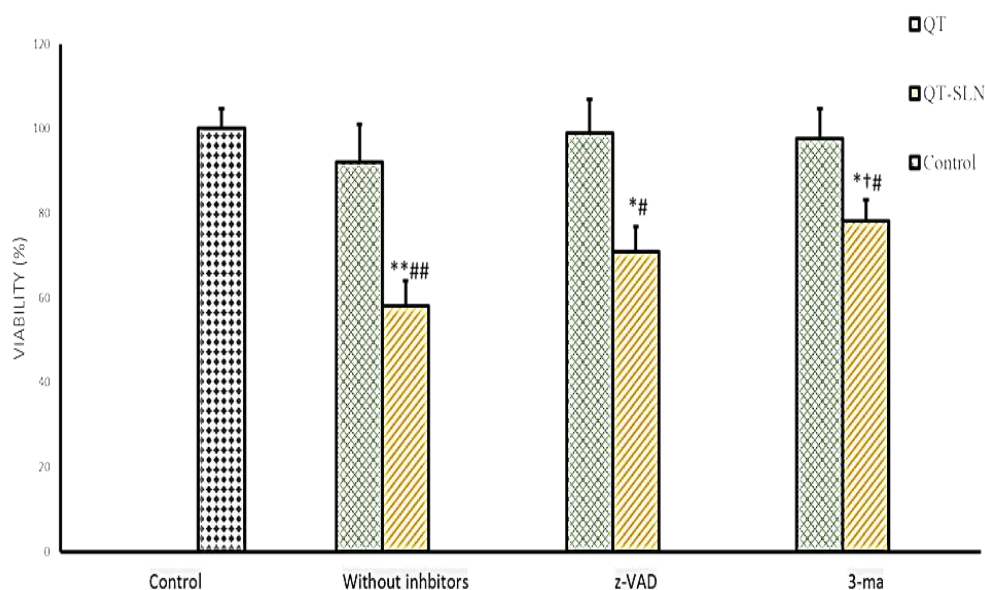
جدول ۱. تعیین خصوصیات نانوذرات لیپیدی جامد کوئرسستین

Formulation	Drug – Lipid Ratio	Particle Size	PDI	Zeta Potential (mv)
QT-SLN1	۱:۱	۴۴/۵±۳/۵	۰/۱۱۲±۰/۰۱	-۱/۸±۰/۲۶
Blank-SLN1	-	۴۵/۱±۳/۲	۰/۱۱۴±۰/۰۲	-۱/۱±۰/۳۵
QT-SLN2	۱:۳	۴۸/۴±۳/۹	۰/۱۱۸±۰/۰۷	-۵/۵±۱/۱۲
Blank-SLN2	-	۴۷/۹±۴/۱	۰/۱۲۳±۰/۰۵	-۸/۹±۱/۳۳
QT-SLN3	۱:۵	۵۸/۳±۴/۸	۰/۱۳۵±۰/۰۷	-۱۲/۶±۲/۳۲
Blank-SLN3	-	۵۵/۱±۴/۶	۰/۱۲۷±۰/۰۵	-۱۳/۹±۱/۸۷
QT-SLN4	۱:۱۰	۸۵/۵±۸/۵	۰/۱۵۲±۰/۰۴	-۲۲/۵±۰/۰۶
Blank-SLN4	-	۸۴/۷±۸/۱	۰/۱۶۱±۰/۰۵	-۲۶/۲±۰/۰۵
QT-SLN5	۱:۱۵	۹۹/۶±۹/۱	۰/۳۴۲±۰/۰۴	-۱۸/۹±۳/۱۳
Blank-SLN5	-	۹۸/۸±۸/۷	۰/۳۱۶±۰/۱۱	-۲۰/۳±۲/۵۸

قابلیت حیات

قابلیت حیات در گروه‌های دریافت کننده کوثرستین به همراه مهارکننده‌های آپوپتوزی و اتوفاژی، و بدون مهار کننده‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$). در گروه QT-SLN کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات سلول‌ها نسبت به گروه کنترل و گروه کوثرستین مشاهده شد ($p < 0.001$). گروه QT-SLN به همراه مهارکننده آپوپتوز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات مشاهده

شد اما نسبت به گروه QT-SLN بدون مهارکننده تغییر معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). در گروه QT-SLN به همراه مهارکننده اتوفاژی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری وجود نداشت در حالیکه نسبت به گروه QT-SLN بدون مهارکننده افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). این نتایج در نمودار ۲ آمده است.

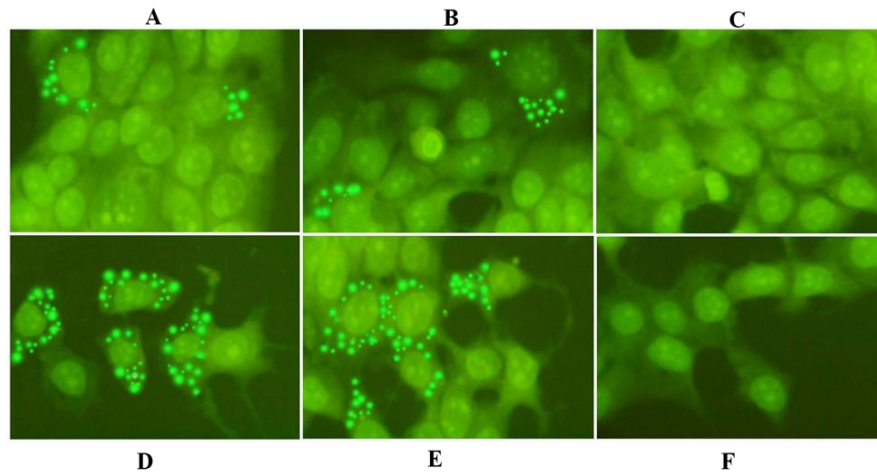


نمودار ۲. قابلیت حیات در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. $p < 0.001$ *، $p < 0.01$ **، $p < 0.05$ *. # به ترتیب مقایسه با گروه کنترل و گروه بدون مهار کننده و QT آزاد می باشد.

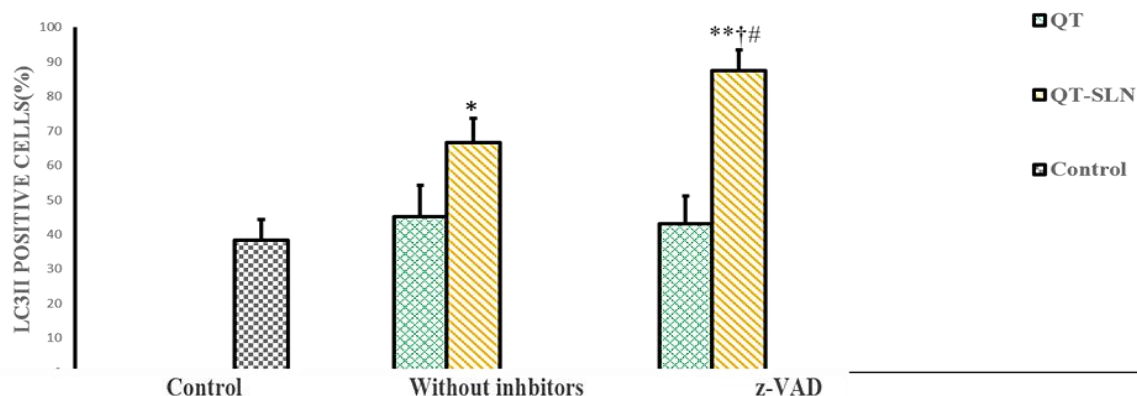
بررسی مرگ سلولی اتوفاژی با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی

جهت شناسایی LC3-II اتوفاگوزوم‌ها، وزیکول‌های دارای (LC3-II) به صورت نقاط سبز درخشان نمایان شدند. تعداد محدودی از سلول‌های LC3 مثبت در گروه کنترل مشاهده شد. درصد سلول‌های LC3-II مثبت در گروه تیمار شده با کوثرستین با مهار کننده و بدون مهارکننده مشابه گروه کنترل بود اما درصد سلول‌های LC3-II مثبت در گروه تحت درمان با QT-SLN در مقایسه با گروه کوثرستین و گروه

کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. در گروهی که مهارکننده اتوفاژی دریافت کرده بودند اتوفاگوزوم‌ها مشاهده نشدند که در واقع LC3-II منفی بودند. در گروهی که QT-SLN با مهار کننده آپوپتوز دریافت کرده بود اتوفاگوزوم‌های بیشتری نسبت به گروه بدون مهارکننده وجود داشت. در تمام گروه‌های دریافت کننده QT-SLN تعداد اتوفاگوزوم‌های بیشتری نسبت به گروه کوثرستین آزاد وجود داشت. نتایج این آزمایشات در شکل ۱ و نمودار ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱. میکروسکوپ ایمنوفلورسنت، رنگ آمیزی سلولهای MCF-7 مربوط به گروه های کنترل و آزمایش. اتوفاگوزوم حاوی LC3-II رنگ سبز روشنی را نشان می دهند.
گروه (A) QT، گروه QT با z-VAD (B)، گروه کوئرسستین با ۳ (C)، گروه ma، گروه QT-SLN (D)، گروه QT-SLN با z-VAD (E)، گروه QT-SLN با ۳ (F).

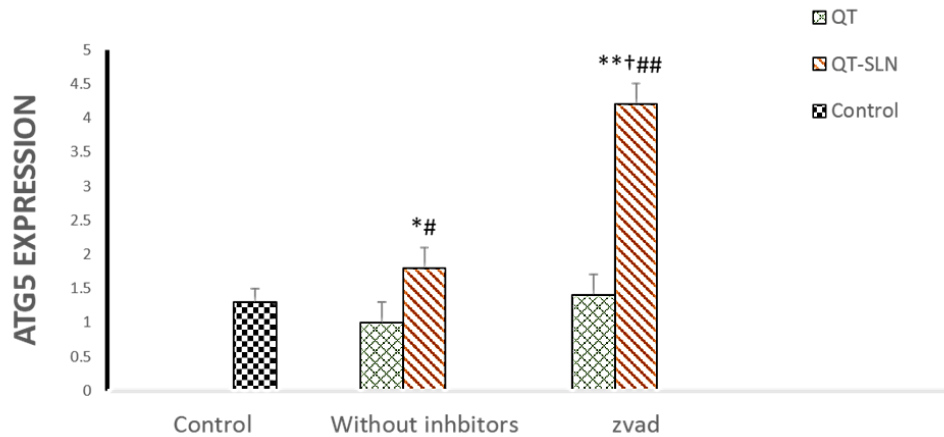


نمودار ۳. درصد سلول های LC3-II مثبت در گروه های مختلف. مقادیر بصورت $MEAN \pm SEM$ بیان شده است.
 $0.01 < p < 0.001$ ، $0.001 < p < 0.001$ ، $0.001 < p < 0.001$ ، $0.001 < p < 0.001$ ، $0.001 < p < 0.001$ و # به ترتیب مقایسه با گروه کنترل و گروه بدون مهار کننده و کوئرسستین آزاد می باشند.

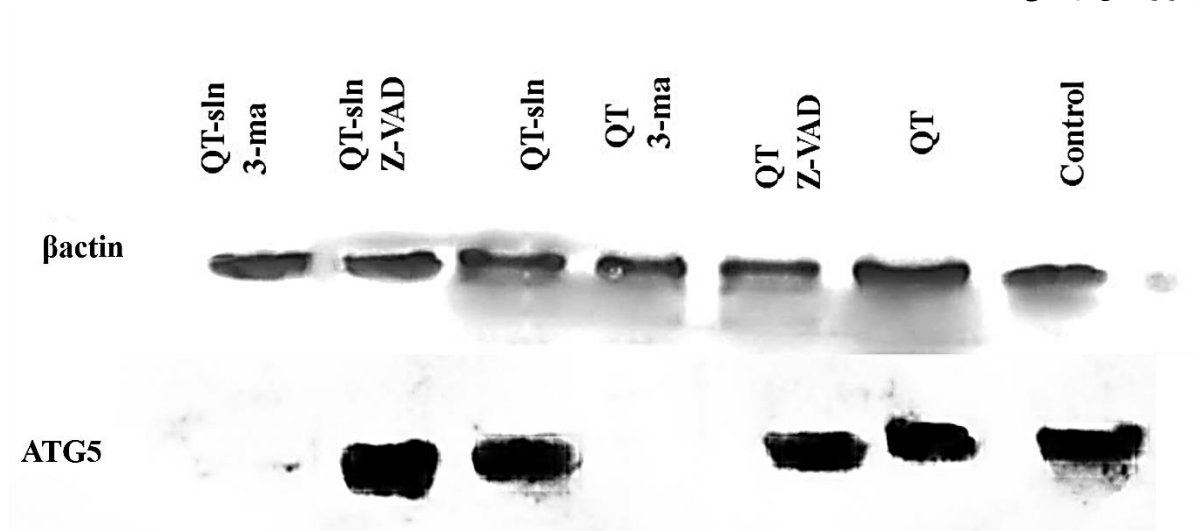
به همراه مهار کننده آپوپتوز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد و نسبت به گروه QT-SLN بدون مهار کننده نیز افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0.01$). بیان ATG5 در گروه های دریافت کننده QT-SLN نسبت به کوئرسستین آزاد افزایش معنی داری یافته بود ($p < 0.01$). این نتایج در نمودار ۴ آمده است.

بررسی بیان پروتئین ATG5 با استفاده از روش وسترن بلات

بیان پروتئین ATG5 در گروه های دریافت کننده کوئرسستین به همراه مهار کننده های آپوپتوز و اتوفاژی تغییر معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p < 0.05$). در گروه QT-SLN بدون مهار کننده افزایش معنی داری در بیان ATG5 نسبت به گروه کنترل و گروه کوئرسستین بدون مهار کننده مشاهده شد ($p < 0.01$). گروه کوئرسستین SLN



نمودار ۴. بررسی میزان بیان پروتئین ATG5 در گروه‌های کنترل و آزمایش. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ و # به ترتیب مقایسه با گروه کنترل و گروه بدون مهار کننده و کوئرتستین آزاد می باشند.



شکل ۲. بررسی میزان بیان پروتئین ATG5 در گروه‌های کنترل و آزمایش.

و همچنین افزایش غلظت کوئرتستین در سلول‌های MCF-7 می‌باشد (۷). در مطالعه آنها، افزایش سایتوتوکسیسیتی موازی با افزایش میزان جذب کوئرتستین توسط سلول‌های MCF-7 بود. در مطالعه Vijayakumar و همکاران (۲۰۱۶) نیز SLN به طور چشمگیری جذب کوئرتستین را در سلول‌های Caco2 (رده سلولی آدنوکارسینومایی کولورکتال) افزایش داده بود. آنها همچنین نشان دادند کوئرتستین انکپسوله شده در SLN به میزان بسیار بیشتری نسبت به کوئرتستین آزاد در آب مقطر به طور یکنواخت توزیع می‌شود (۳۵). مینایی و

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که کپسوله کردن کوئرتستین در SLN به طور موثری اثرات ضد سرطانی آن را در سلول‌های MCF-7 افزایش می‌دهد. این افزایش اثرات ضدسرطانی ممکن است به علت افزایش نفوذ کوئرتستین به درون سلول‌های MCF-7 باشد. Sun و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که انکپسوله کردن کوئرتستین در حامل‌های لیپیدی سبب افزایش خواص ضد سرطانی کوئرتستین می‌شود. آنها گزارش کردند که این افزایش خاصیت ضد سرطانی در ارتباط با افزایش حلالیت و پایداری کوئرتستین

همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که نانوکوئرتستین باعث افزایش توکسیسیتی دوکستروبیسین (یک داروی ضد سرطانی رایج) در سلول‌های MCF-7 می‌شود (۳۶). El-Gogary و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که نانوکپسوله کردن کوئرتستین با پلی اتیلن گلیکول بطور موثری اثرات ضد سرطانی آن را در رده سلولی Hela افزایش می‌دهد (۳۷).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کوئرتستین در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومول دارای اثرات ضد سرطانی است که نتایج مطالعه پایلوت در این تحقیق با مطالعات سایر محققین همسو می‌باشد. در این مطالعه، غلظت ۲۵ میکرومولار کوئرتستین تاثیری در درصد قابلیت حیات سلول‌ها نداشت در حالیکه غلظت ۲۵ میکرومولار QT-SLN به‌طور معنی‌داری قابلیت حیات سلول‌های MCF-7 را کاهش داده بود. به همین دلیل، در این مطالعه غلظت ۲۵ میکرومولار به عنوان دوز موثر در نظر گرفته شد. مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های بالاتر نانوذرات توکسیسیتی کمتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن دارند. به عنوان مثال، pausupulety و همکاران (۳۸) نشان دادند دوزهای بالاتر نانوذره اکسید روی اثرات توکسیک کمتری نسبت به دوزهای پایین‌تر این نانوذره دارد. در مطالعه Orazizadeh و همکاران (۲۰۱۵) نیز دوزهای پایین نانوذره اکسید روی اثرات توکسیکی بر سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی داشت. در حالیکه، دوزهای بالا فاقد اثرات سمی بودند. علت این پدیده را می‌توان به این صورت توجیه کرد که غلظت‌های بالای نانوذرات احتمال تجمع و تشکیل ذرات بزرگ را بیشتر می‌کنند و در نتیجه میزان جذب نانوذره توسط سلول‌ها کاهش می‌یابد (۳۹). لازم به ذکر است که یکی از اهداف استفاده از نانوداروها کاهش دوز دارو می‌باشد. بنابراین، مزیت انتخاب دوز ۲۵ میکرومولار QT-SLN، در این مطالعه، این است که از دوزهای کمتری برای ایجاد اثرات ضد سرطانی بیشتر داروی مورد نظر استفاده شده است. از

طرفی با توجه به عوارض جانبی ایجاد شده در دوزهای بالای داروها و ترکیبات ضد سرطانی استفاده از کوئرتستین در دوز پایین می‌تواند این عوارض را به حداقل برساند.

همانطور که در نتایج ذکر شد QT-SLN باعث کاهش چشمگیری در قابلیت حیات سلول‌های MCF-7 نسبت به کوئرتستین آزاد شد. گروهی که QT-SLN همراه با مهارکننده آپوپتوز دریافت کرده بود نسبت به گروهی که مهارکننده اتوفازی دریافت کرده بود درصد قابلیت حیات بیشتری نشان دادند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت اتوفازی مکانیسم مرگ سلولی غالب در سلول‌های MCF-7 که در معرض QT-SLN قرار گرفته‌اند، می‌باشد.

با اینکه مکانیسم دقیق اثرات QT-SLN بر سلول‌های MCF-7 از این مطالعه بدست نمی‌آید. اما، نتایج ما ثابت کرد که QT-SLN فرآیند سلولی اتوفازی را در سلول‌های MCF-7 فعال می‌کند. به علاوه، قابلیت حیات سلول‌های MCF-7 به وسیله QT-SLN نیز به طور معنی‌داری کاهش یافته است. این یافته‌ها بیان کننده‌ی این است که QT-SLN می‌تواند هر دو نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده‌ی ۱ و ۲ را القاء کند. اخیراً مشخص شده است ترکیب‌های کشنده‌ای مانند Docosahexaenoic acid می‌توانند هم سبب مرگ سلولی آپوپتوزی و هم اتوفازی شوند (۳۷). طی تحقیقی Maso و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند کوئرتستین قادر است همزمان اتوفازی و آپوپتوز را در سلول‌های P39 (یک رده سلولی میلومایی) فعال کند (۳۸). Lou و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند انکپسوله کردن کوئرتستین در پلیمر طلا باعث افزایش همزمان اتوفازی و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی نوروگلیوما می‌شود (۳۹). علاوه بر این، بکارگیری اتوفازی می‌تواند سبب افزایش حساسیت سلول‌های توموری به سایر درمان‌های بعدی شود. در سال ۲۰۰۶ Jing و همکارانش نشان دادند که القاء اتوفازی باعث افزایش حساسیت و تحریک پذیری سلول‌های سرطانی پروستاتی به پرتودرمانی می‌شود (۴۰).

پشتیبان از یکدیگر برای ایفای مرگ سلولی غیر قابل برگشت، فعال شوند (۴۵).

پروتئین Atg5 به صورت کمپلکس با Atg7 در لیپیدی شدن LC3 و تکامل غشای اتوفاگوزوم نقش دارد به عبارتی افزایش بیان این پروتئین نشان‌دهنده افزایش اتوفازی می‌باشد. پژوهش‌ها موید جهش یا حذف‌شدگی در انواعی از تنظیم‌گرهای اتوفازی طی مراحل سرطان بوده است. جهش‌هایی در Atg5، Atg12، و Atg2b در سرطان‌های گاستریک و کلورکتال گزارش شده است (۴۶).

مقاومت به شیمی‌درمانی بواسطه اتوفازی برای داروهای ضد سرطان مانند کاپتوتچین در سلولهای سرطان پستان و برای سیس‌پلاتین در سلولهای سرطان کولون و ریه گزارش شده است (۴۷). برعکس در داروهایی مانند تموزولامید و دگزامتازون، در رادیوتراپی و مهارکننده‌های دارویی القای اتوفازی به‌عنوان اولین قدم برای پیشبرد توقف رشد سلولهای سرطانی موثر بوده است (۴۸). در حالیکه تمام این مطالعات نقش اتوفازی را در سرطان ذکر می‌کنند، اما هنوز مکانیسم دقیق مرگ سلولی با واسطه اتوفازی بخوبی مشخص نشده است. عملکردهای مختلف اتوفازی ممکن است به نوع سلول، ریز محیط و طول درمان بستگی داشته باشد (۴۹). در مراحل اولیه رشد تومور، برخی از ژن‌های ATG به‌عنوان سرکوب‌گر تومور عمل می‌کنند. زمانیکه تومور پایدار شد، استرس اکسیداتیو و ریز محیط سلولهای توموری باعث فعال شدن اتوفازی به‌عنوان یک فرایند پیش‌بقا در سلولهای سرطانی عمل می‌کند (۵۰). اتوفازی یک سیستم هضم درون سلولی می‌باشد که در آن مواد و اجزای درون سلولی از طریق وزیکول‌های دو غشایی (Double-Membraned) که اتوفاگوزوم نامیده می‌شوند، به لیزوزوم‌ها متصل شده و دچار تجزیه و هضم سلولی می‌شوند. مارکر اختصاصی در شناسایی و مانیتورینگ

همچنین، میزان بالای اتوفازی به ناچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۲ (نوع ۱ آن آپوپتوز می‌باشد) را به دنبال خواهد داشت. بدلیل وجود ارتباط بین اختلال در اتوفازی و سرطان، به نظر می‌رسد که این نوع از مرگ سلولی ممکن است به‌عنوان یک بازدارنده در تومورزایی عمل کند. اتوفازی ممکن است نمایانگر یک نوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به نام مرگ سلولی اتوفازیک و یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۲ باشد که به شیوه‌های غیر آپوپتوزی باعث مرگ سلولی می‌شود (۴۱). مرگ سلولی اتوفازیک، توسط تجمع وزیکول‌های اتوفازیک (اتوفاگوزوم‌ها و اتوفاگولیزوزوم‌ها) مشخص می‌شود و اغلب هنگامیکه حذف گسترده سلولها مورد تقاضا است و یا هنگامیکه فاگوسیت‌ها دسترسی آسان به سلولهای در حال مرگ ندارند، مشاهده می‌شود. در گذشته معلوم نبود که آیا اتوفازی به‌طور مستقیم مرگ سلولی را اجرا می‌کند یا اثر ثانویه آپوپتوز است. اما بررسی‌های اخیر نشان داد که مرگ سلولی اتوفازی ناشی از مهارکننده کاسپاز به شدت توسط RNA مداخله‌گر بر علیه بیان Beclin1، ژنی که محصولات آن برای اتوفازی ضروری هستند، تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۴۲).

اطلاعات بدست آمده از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آپوپتوز و اتوفازی ممکن است در برخی از شرایط با هم ارتباط داشته باشند و در برخی موارد حتی به‌طور همزمان توسط شروع‌کننده‌های مشابه تنظیم شوند. تعامل آپوپتوز/ اتوفازی بسته به نوع زمینه‌ها و محرک‌های سلولی متفاوت بوده، ممکن است اتوفازی، بواسطه تغییرات قبلی و اضافی روی آپوپتوز، برای آپوپتوز ضروری باشد. در موقعیت‌های دیگر، اتوفازی ممکن است ترجیحاً آنتاگونیست آپوپتوز باشند و یا آن را به تأخیر بیندازد، مواردی نیز وجود دارد که در آن دو فرایند ممکن است متقابلاً و مستقل از یکدیگر به‌عنوان مکانیسم‌های

اتوفاژی، LC3 یا زنجیره‌ی سبک پروتئین‌های مرتبط با میکروتوبول (Microtubule - associated protein 1-light chain3) می‌باشد. این زنجیره یک پروتئین محلول با وزن مولکولی حدود ۱۷ کیلو دالتون بوده که تقریباً در تمامی بافت‌های پستانداران و سلول‌های کشت داده شده وجود دارد. در حین اتوفاژی، اتوفاگوزوم‌ها بخش‌هایی از اجزای سیتوپلاسمی را احاطه می‌کنند، که شامل پروتئین‌ها و ارگان‌های سیتوزولی می‌باشد. در ادامه مکانیسم اتوفاژی، شکل سیتوزولی پروتئین LC3 طی واکنش با فسفاتیدیل اتانول آمین کونژوگه شده و به شکل دیگری به نام LC3-II تبدیل می‌شود که در غشای اتوفاگوزوم‌ها قرار می‌گیرد. زمانی که اتوفاگوزوم‌ها با لیزوزوم‌ها ادغام می‌شوند، به اتوفاگولیزوزوم تبدیل می‌شوند، و تمامی اجزای درون اتوفاگوزوم‌ها بوسیله‌ی آنزیم‌های هیدرولیزی لیزوزومی تجزیه می‌شوند. در این زمان، LC3-II نیز که در غشای اتولیزوزوم‌ها قرار

دارد هضم می‌شود و مجدداً به حالت اول خود (LC3) تبدیل می‌شود. بنابراین از پروتئین LC3-II یا LC3-B می‌توان به عنوان مارکر شناسایی در تشخیص اتوفاگوزوم‌ها و اتوفاژی استفاده کرد (۲۹). شناسایی این مارکر با روش‌های Immunoblotting یا ایمونوفلوروسنت جهت مانیتورینگ اتوفاژی و فرآیندهای وابسته به اتوفاژی شامل القاء مرگ سلولی اتوفاژی به کار گرفته می‌شود (۳۲).

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دوره دکترای تخصصی علوم تشریحی فیروزه نیازوند در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می باشد. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی افراد شرکت کننده در این تحقیق و دوستان عزیزی که در مرکز سلولی مولکولی این دانشگاه ما را یاری رساندند اعلام می نمایم.

References

1. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol*. 2016; 7(1): 54-86.
2. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Update Surg*. 2017; 69(3): 313-317.
3. Yin SH, Wei W CH, Yang NS. Therapeutic Applications of Herbal Medicines for Cancer Patients. 2013; 15: doi.org/10.1155/2013/302426.
4. Deng XH, Song HY, Zheng FG. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. *Exp Ther Med*. 2013; 6(5): 1155-1158.
5. Pool H. Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. *Journal of nanomaterials*. 2012; 145380(12).
6. Yuan ZP, Chen LJ. Liposomal Quercetin Efficiently Suppresses Growth of Solid Tumors in Murine Models. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(10): 3193-3199.
7. Lu J, Sun D, Gao S, Gao Y, Ye J, and Liu P. Cyclovirobuxine D induce autophagy-associated cell death via the Akt/Mtor pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2014; 125(1): 74-82.
8. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martino L, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 2003; 227(5324): 370-372.
9. Basu A, Halder S. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequence for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 4 (12): 1099-1109.
10. Dokladny K, Zuhl M, Mandell M, Bhattacharya D, Schneider S, Deretic V, et al. Regulatory Coordination between Two Major Intracellular Homeostatic Systems: Heat shock response and autophagy. *J Biol Chem*. 2013; 288(21): 14959.
11. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010; 90 (4): 1383-4.
12. Masini M, Bugliani M, Lupi R, del Guerra S, Boggi U, Filipponi F, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2009; 52 (6): 1083-6.
13. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2009; 16 (1): 3-11.
14. Babaei E, Mowla J, Shariat Torbaghan S, Emadi Baygi M. Detection of surviving gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of human osteosarcoma: its potential usefulness in diagnosis and prognosis of bone tumors. *IBJ* 2006; 10(5), 39-45.
15. Yamashita SI, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, et al. Survivin expression predicts early

- recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27(4c), 2803-8.
16. Ling X, Cao S. A novel small molecule FL118 that selectively inhibits survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-independent manner shows superior antitumor activity. *PLoS One.* 2012; 7(9):3-28.
 17. Shintani T, Klionsky J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004; 306 (5698): 990-5.
 18. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004; 23 (16): 2891-906.
 19. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 2012; 22 (1): 43-61.
 20. Meijer J, Codogno P. Signaling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med.* 2006; 27 (5-6): 411-25.
 21. Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1809-1820.
 22. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006; 10(1):51-64.
 23. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 2012; 19(1):87-95.
 24. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* 2011; 25(7):717- 29.
 25. Wesselborg S, Stork B. "Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks". *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2015; 72 (24): 4721–57.
 26. Masiiwa WL, Gadaga LL. Intestinal permeability of artesunate-loaded solid lipid nanoparticles using the everted gut method. *J Drug Deliv.* 2018; 3021738.
 27. Vijayakumar A, Baskaran R, Jang YS, Oh SH, Yoo BK. Quercetin-loaded solid lipid nanoparticle dispersion with improved physicochemical properties and cellular uptake. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2017; 18:875–883.
 28. Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R. Delivering tamoxifen within solid lipid nanoparticles. *Pharm Technol.* 2017; 35: 74–79.
 29. Park UH, Jeong JC, Jang JS, Sung MR, Youn H, Lee SJ, Kim EJ, Um SJ. Negative regulation of adipogenesis by kaempferol, a component of *Rhizoma Polygonati falcatum* in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35: 1525–153.
 30. Laane E, Tamm P, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (7): 1018–1029.
 31. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies E, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of

- mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004; 36 (6): 585–595.
32. Scholz S, Williamson G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *Int J Vitam Nutr Res.* 2007; 77(3):224-235.
 33. Ryan M. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur J Cancer.* 2011; 47: 44-50.
 34. Kang M, Kim S, Oh J, Kim Y, Song S , Yoo N , et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol.* 2009; 217(5): 702-706.
 35. Vijayakumar A, Baskaran R, Jang Y, Oh SH, Yoo BK. Quercetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Dispersion with Improve Physicochemical Properties and Cellular Uptake. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2016; 10:120-4.
 36. Minaei A, Sabzichi M, Ramezani F, Hamishehkar H, Samadi N. Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells. *Mol Biol Rep.* 2016; 43(2):99-105.
 37. El-Goagary RL, et al. polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2014; 8(2):1384-401.
 38. Pasupuleti S, Alapati S, Ganapathy S, Anumolu G, Pully R, Prakhya M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. *Toxicol Ind Health.* 2012; 28(8):675-86.
 39. Orazizadeh M, Mansouri E, Khorsandi L, Jozi Z. Dose-dependent hepatotoxicity effects of Zinc oxide nanoparticles. *Nanomedicine Journal.* 2015; 2(4):273-282.
 40. Dipranjan L, Arindam P, Jyotirindra M, Ananda M, Panchanan P, Aparna L. Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. *Biochemical and Biophysical.* 2014; 1840(1-9).
 41. Maso V, Calgarotto A, Franchi G, Nowill A, Vassallo J, Latuf Filho P, et al. Quercetin Induces Autophagy, Apoptosis and Cell Cycle Arrest In P39 Cells. *Blood.* 2013; 122:5042.
 42. Lou M, Zhang L, Ji P, Feng F, Liu J. Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: In vitro and in vivo. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2016; 84:1-9.
 43. Ghadiri M, Fatemi S, Vatanara A, Doroud D, Rouholamini Najafabadi A, Darabi M. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. *Int J Pharm.* 2012; 424: 128–137.
 44. Levy M, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol Ther.* 2011; 131(1): 130-141.
 45. Ryan M. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of

- the proteome. *Eur J Cancer*. 2011; 47: 44-50.
46. Kang M, Kim S, Oh J, Kim Y, Song S , Yoo N , et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol*. 2009; 217(5): 702-706.
 47. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*. 2007; 21(13):1621-1635.
 48. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006; 10(1), 51-64.
 49. Liang X, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 2000; 402(6762):672-676.
 50. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol*. 2007; 30(2):429-436.

Effect of Quercetin Solid Lipid Nanoparticles on Autophagy and Atg5 Protein Expression Levels in Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7)

Niazvand F^{1*}, Khorsandi L², Absalan F¹, Ashtari A³

1. Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran. niazvandf@gmail.com

2. Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran,

3. PhD in Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: April. 21, 2020

Accepted: June. 15, 2020

Abstract

Background: Due to proven anti-tumor activity of quercetin (QT), however the low effectiveness of QT has restricted its use. This study aimed to assess the toxic effect of QT encapsulated in solid lipid nanoparticles (QT-SLNs) on the cell death (Autophagy) of MCF-7 human breast cancer cells.

Materials and Methods: MCF-7 and MCF-10A (non-tumorigenic cell line) cell lines treated with 25 µml/mL of QT or QT-SLNs for 48 h. Cell viability and Autophagy were evaluated to determine the toxic effectiveness of the QT-SLNs.

Results: The QT-SLNs with appropriate characteristics were prepared. The QT-SLNs showed sustained QT release until 48 h. Cytotoxicity assessments indicated that QT-SLNs inhibited MCF-7 cells growth with a low IC₅₀ (50% inhibitory concentration) value, compared to the free QT. QT-SLNs induced a significantly increased in Autophagy in the MCF-7 cells. Following QT-SLNs treatment, the expression of the ATG-5 protein significantly increased in comparison with free QT-treated cells. Furthermore, The QT-SLNs significantly increased autophagy indexes in MCF-7 cells. Viability and autophagy of MCF-10A cells were not affected by QT or QT-SLNs.

Conclusions: According to these results, SLN significantly enhanced the toxic effect of QT against human breast cancer cells.

Keywords: Breast cancer, Autophagy, Solid lipid nanoparticles, Quercetin

***Citation:** Niazvand F, Khorsandi L, M, Absalan F, Ashtari A. Effect of Quercetin Solid Lipid Nanoparticles on Autophagy and Atg5 Protein Expression Levels in Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). Yafte. 2020; 22(2):144-159.