Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Salehi-Mazdeh, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(1):7-16.
doi:10.34172/mj.025.33608
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Regulation of autophagy-related gene expressions by *Trans*-chalcone in the lungs of adult male rats

Fatemeh Salehi-Mazdeh[1,2], Elnaz Nakhjiri[2], Mohammad Reza Alipour[1], Parviz Shahabi[1], Elham Karimi-Sales[1,2*]

[1]Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 3 Apr 2024
revised:14 May 2024
Accepted: 18 May 2024
ePublished: 29 Jan 2025

Keywords:
- Autophagy
- *Trans*-chalcone
- Beclin-1
- p62
- LC3
- Lung

Abstract

Background. Autophagy is responsible for maintaining cellular homeostasis by degrading and recycling macromolecules and unwanted intracellular components, such as damaged organelles. *Trans*-chalcone is a compound with anti-cancer and anti-inflammatory properties. However, its impact on autophagy in lung tissue has not been investigated yet. Therefore, this study evaluated the effects of *trans*-chalcone on autophagy-related *Gene Expressions* in the lung.

Methods. Twelve male rats were randomly divided into control and chalcone groups. In the control group, rats were orally gavaged with Tween 80(10%), while in the chalcone group, rats were orally gavaged with *trans*-chalcone once a day for six weeks. Blood and lung samples were collected from overnight fasted rats. Serum insulin and glucose levels were used to estimate the fasting glucose-to-insulin ratio. Further, a real-time polymerase chain reaction was performed to assess the levels of *p62*, *LC3*, and *Beclin-1* gene expression in the lungs of rats.

Results. *Trans*-chalcone significantly increased the fasting glucose-to-insulin ratio (insulin sensitivity). In addition, this compound significantly increased Beclin-1 mRNA expression levels and decreased p62 expression levels in the lungs of rats. Nevertheless, the upregulatory effect of this compound on LC3 expression was not statistically significant.

Conclusion. Based on the findings, *trans*-chalcone increases insulin sensitivity and has a regulatory effect on autophagy in the lungs of healthy rats. Changes in Beclin-1 and p62 mRNA levels reflect this issue.

Practical Implications. The ability of *trans*-chalcone to up-regulate Beclin-1, a key marker of autophagy, and down-regulate p62 mRNA expression indicates its regulatory effect on autophagy. Further studies are required to validate the potential of this chalcone as a promising treatment for autophagy-related lung diseases.

How to cite this article: Salehi-Mazdeh F, Nakhjiri E, Alipour M R, Shahabi P, Elham Karimi-Sales E. Regulation of autophagy-related gene expression by trans-chalcone in the lungs of adult male rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*.2025; 47(1): 7-16. doi:10.34172/mj.025.33608. Persian.

*Corresponding author; Email: karimi.sales@gmail.com
© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

Autophagy is responsible for maintaining homeostasis and energy conservation by degrading and reutilizing intracellular endogenous (e.g, damaged organelles) and exogenous (e.g, bacteria) components as a lysosomal catabolic procedure. Lungs are vital organs exposed to the external environment and pathogenic factors. It seems that autophagy regulation can be used to manage various health concerns, such as inflammatory diseases and metabolic disorders. Given the role of microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3), Becline-1, and p62 in autophagy, their expression levels are considered specific markers for autophagy. Chalcones belong to a primary class of flavonoids and have anti-cancer and anti-inflammatory activities. The autophagy-inducing effects of *trans*-chalcone on the human hepatocellular carcinoma cell line have recently been suggested. However, its impact on autophagy-related gene expressions in rats' lungs has not been studied yet. Therefore, the expression levels of *p62*, *LC3*, and *Beclin-1* genes in the lungs of animals were measured in the present study.

Methods

Experimental Protocol

Wistar rats (body weight: 200–250g) were maintained in an environment with a controlled light-dark cycle (12/12 hours) at 22 ± 2°C, with free access to standard rat food and drinking water. Twelve male rats were randomly assigned to the control and chalcone groups (6 rats/group).

In the control group, the rats were orally gavaged with a 10% Tween 80 solution. In the chalcone group, they were orally gavaged with *trans*-chalcone 20 mg/kg, vehicle: 10% Tween 80) once a day for six weeks. Finally, overnight fasted (fasting period: 8 hours) rats were anesthetized, and blood and lung samples were collected from their bodies.

Biochemical Assays

First, the blood samples were centrifuged, and the serum samples were separated. Then, a commercial glucose kit (Pars Azmoun, Iran) and a rat insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden) were used to measure serum glucose and insulin levels, respectively. Eventually, the fasting glucose (mg/dL) to insulin (µU/mL) ratio (FGIR) was calculated as a marker of insulin sensitivity.

Real-time Polymerase Chain Reaction

The RNX-Plus solution kit (Cinagen Company, Iran) was utilized for the extraction of total RNA from homogenized lung samples. Subsequently, complementary DNA was produced using Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. To evaluate mRNA expression levels of p62, LC3, and Beclin-1, RT-PCR was conducted using a SYBR Green PCR Master Mix (Cinagen Company, Iran). In addition, a housekeeping gene (β-actin) was used for data normalization. Gene expression results were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical Analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism 7 software, and related graphs were drawn with the same software. Values are displayed as means± standard error of the mean. The unpaired t-test was employed to assess the difference between groups, and *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

In the present study, FGIR was calculated to investigate the effect of *trans*-chalcone on insulin sensitivity. In this case, the levels of FGIR in the animals treated with *trans*-chalcone were significantly ($P<0.001$) higher than in control rats. The measurement of Beclin-1 and LC3 expression levels is one of the standard methods used for the assessment of the levels of the autophagy process. The present study was undertaken to elucidate whether oral treatment of healthy Wistar rats with *trans*-chalcone for six weeks affects autophagy levels in the lung tissue under physiological conditions.

Therefore, the mRNA expression of autophagy-related genes, including *Beclin-1*, *LC3*, and *p62*, was estimated through the RT-PCR method. The analysis of data obtained from the RT-PCR assay indicated that mRNA expression levels of Beclin-1 were significantly increased ($P<0.05$) in the lungs of rats treated with *trans*-chalcone when compared to the control group. In addition, LC3 showed a non-significant increase in the lungs of animals in the chalcone group compared to the rats in the control group. The administration of this chalcone resulted in a significant ($P<0.01$) decrease in the mRNA expression level of p62 in the chalcone group when compared to the control group.

Conclusion

Trans-chalcone significantly increased Beclin-1 mRNA expression in rats' lungs, indicating the autophagy process's induction. Although this change was insignificant, *trans*-chalcone caused a mild increase in LC3 mRNA expression. Consistent with these results, *trans*-chalcone has recently been introduced as an autophagy inducer under cancer conditions. In addition, the anti-inflammatory properties of this chalcone have recently been confirmed in the lungs of rats fed a high-fat diet. Considering the role of p62 in the production of inflammatory cytokines, the anti-inflammatory effect of *trans*-chalcone may be partially attributed to its ability to decrease the expression of p62 in the lungs of animals. Regarding the role of p62 in autophagy, chalcone reduced the mRNA expression of p62. However, the protein expression levels of p62 were not measured, which is a limitation of this study. Further studies are needed to examine the potential effects of *trans*-chalcone as a promising treatment for autophagy-related lung diseases.

صالحی‌مزده و همکاران. مجله *پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۴؛ ۴۷(۱): ۷-۱۶.
doi:10.34172/mj.025.33608
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی توسط ترانس چالکون در ریه موش‌های صحرایی نر بالغ

فاطمه صالحی‌مزده[۲،۱]، الناز نخجیری[۲]، محمدرضا علیپور[۱]، پرویز شهابی[۱]، الهام کریمی ثالث[۲،۱*]

[۱]مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۱/۵
اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۲/۲۵
پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۹
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

کلیدواژه ها:
- اتوفاژی
- ترانس چالکون
- p62
- Beclin-1
- LC3
- ریه

چکیده

زمینه. اتوفاژی با تخریب و بازیافت ماکرومولکول‌ها و اجزای درون‌سلولی ناخواسته مانند اندامک‌های آسیب‌دیده، هومئوستاز سلولی را حفظ می‌کند. ترانس چالکون یک نوع چالکون ساده با خاصیت ضدالتهابی، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی است. بااین‌حال، تاکنون اثرات ترانس چالکون بر فرآیند اتوفاژی در بافت ریه بررسی نشده بود. بنابراین، این مطالعه باهدف بررسی اثرات ترانس چالکون بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در ریه انجام شد.

روش‌کار. در مطالعه حاضر، ۱۲ سر موش صحرایی نر بالغ به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (دریافت‌کننده توئین ۸۰ ۱۰%)، و گروه چالکون (دریافت‌کننده ترانس چالکون). تجویز توئین ۸۰ در گروه کنترل و ترانس چالکون در گروه چالکون به‌صورت گاواژ دهانی و طی مدت ۶ هفته و روزانه یک مرتبه انجام شد. در پایان آزمایش‌ها، نمونه‌های خون و ریه از حیوانات ناشتا جمع‌آوری گردید. مقادیر سرمی انسولین و گلوکز ناشتا به‌منظور محاسبه نسبت گلوکز به انسولین ناشتا اندازه‌گیری شد. میزان بیان ژن‌های p62، LC3 و Beclin-1 در ریه تمامی موش‌های صحرایی به روش Quantitative real-time PCR سنجش گردید.

یافته‌ها. تیمار خوراکی با ترانس چالکون منجر به افزایش معنی‌دار نسبت گلوکز به انسولین ناشتا (شاخص حساسیت به انسولین) ($P<0/001$) گردید. همچنین، این چالکون به‌طور معنی‌دار باعث افزایش بیان mRNA Beclin-1 ($P<0/05$) و کاهش سطح بیان p62 ($P<0/01$) در بافت ریه موش‌های صحرایی شد. بااین‌حال، اثر تحریکی این ترکیب بر بیان LC3 از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری. ترانس چالکون باعث افزایش حساسیت به انسولین می‌گردد و یک اثر تنظیمی بر اتوفاژی در ریه‌های موش‌های صحرایی سالم دارد که با تغییرات در سطوح mRNA ژن‌های مرتبط با اتوفاژی منعکس می‌شود.

پیامدهای عملی. توانایی ترانس چالکون برای تنظیم افزایشی Beclin-1، یک مارکر کلیدی برای اتوفاژی، و تنظیم کاهشی بیان mRNA p62 نشان‌دهنده اثر تنظیمی آن بر اتوفاژی است. مطالعات بیشتری برای تأیید پتانسیل این چالکون به‌عنوان یک درمان امیدوارکننده برای بیماری‌های ریوی مرتبط با اتوفاژی موردنیاز است.

مقدمه

عملکرد اصلی ریه‌ها تحویل اکسیژن به سیستم شریانی و دفع کربن دی‌اکسید از بدن است.[۱] اجزای ریه‌ها به‌طور مستقیم با محیط بیرون و عوامل پاتوژن از قبیل باکتری‌ها، ویروس‌ها و استرس‌اکسیداتیو مواجه هستند. بر اساس شواهد، اتوفاژی در پاسخ به استرس‌های محیطی و سلولی فعال شده و به‌عنوان یک فرآیند داخل سلولی حیاتی باعث حفظ هومئوستاز ریه‌ها می‌گردد.[۱] در فرآیند اتوفاژی، مواد سیتوپلاسمی مانند پروتئین‌های سیتوپلاسمی ناخواسته، ماکرومولکول‌ها، اندامک‌های آسیب‌دیده، قطرات چربی و عوامل پاتوژن مانند باکتری‌ها و ویروس‌ها در وزیکول‌های تحت عنوان اتوفاگوزوم‌ها پوشانده شده و پس از ترکیب با لیزوزوم‌ها، از طریق عملکرد آنزیم‌های هیدرولیتیک تخریب می‌گردند.[۲-۵] سلول‌ها از طریق اتوفاژی در برابر شرایط محیطی منفی یا عوامل آسیب‌رسان خارجی مانند هیپوکسی، گرسنگی و آسیب DNA از خود محافظت می‌کنند. پدیده اتوفاژی باعث صرفه‌جویی انرژی و مواد مغذی ضروری سلول و حفظ هومئوستاز می‌گردد و به‌طورمعمول زنده ماندن سلول را افزایش می‌دهد.[۶،۷] مهار و یا فعالیت بیش‌ازحد روند

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: karimi.sales@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

اتوفاژی، از طریق مسیرهای متفاوت، می‌تواند باعث بروز و پیشرفت سرطان و سایر بیماری‌های مزمن گردد.[8] ثابت شده است که اختلال در تنظیم اتوفاژی اثرات مخربی بر سلامت و حفظ عملکرد بدن دارد. در این مورد، بیماری کبد چرب غیرالکلی، دیابت، بیماری‌های کلیوی حاد و مزمن، بیماری‌های مزمن التهابی و بیماری‌های نورودژنراتیو با اختلال و در واقع مهار روند اتوفاژی مرتبط هستند.[8] میزان اتوفاژی در سلول‌ها از طریق اندازه‌گیری سطوح بافتی مارکرهای اختصاصی آن شامل microtubular-associated protein 1 light chain 3 (LC3)، Becline-1 و p62 قابل ارزیابی است.[9] چالکون‌ها یک گروه اصلی از فلاونوئیدها و همچنین پیش‌ساز فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها هستند. چالکون‌ها دارای ویژگی‌های درمانی وسیع از قبیل خاصیت ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد دیابتی و محافظت‌کننده ریوی می‌باشند.[10-13] اگرچه مطالعات بالینی در رابطه با اثرات ترانس چالکون در شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک صورت نگرفته است اما بر اساس مطالعات حیوانی انجام شده در سال‌های اخیر، ترانس چالکون دارای اثرات محافظت‌کنندگی در مقابل مشکلات تهدیدکننده سلامت از قبیل مقاومت به انسولین، کبد چرب غیرالکلی، و التهاب ریوی می‌باشد.[10,13,14] اثرات حفاظتی ترانس چالکون بر کبد چرب غیرالکلی به‌واسطه بهبود متابولیسم کبدی، مهار واکنش‌های التهابی و به‌ویژه از طریق تأثیر بر بیان miRNAهای کبدی خاص می‌باشد.[10,14] بااین‌وجود، تاکنون اثرات ترانس چالکون بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در بافت ریه بررسی نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر اثر این ترکیب بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در ریه موش‌های صحرایی بالغ بررسی شد.

روش‌کار

حیوانات و گروه‌بندی

در مطالعه حاضر، ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از حیوان خانه مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تهیه شدند. قبل از شروع مداخلات، حیوانات به مدت یک هفته به‌منظور سازگاری با محیط در آزمایشگاه نگهداری شدند. در این مدت و در طول انجام تحقیق، نگه‌داری موش‌های صحرایی در محیط آزمایشگاه با دمای کنترل‌شده (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد)، سیکل روشنایی-تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت) و با دسترسی آزادانه به آب و غذا صورت گرفت. در این تحقیق، موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به ۲ دو گروه (۶ موش صحرایی در هر گروه) تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (Control): گاواژ توئین ۸۰، ۱۰٪ (۲ میلی‌لیتر) روزانه یک مرتبه و به مدت ۶ هفته.

۲- گروه چالکون (Chalcone): گاواژ ترانس چالکون (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت حل‌شده در توئین ۸۰، ۱۰٪) روزانه یک مرتبه و به مدت ۶ هفته.[15]

بعد از اتمام مدت زمان تیمارها، حیوانات ۸ ساعت (در طول شب) به‌صورت ناشتا نگهداری شدند. صبح روز بعد، حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند.[15] در طی بیهوشی، خونگیری از بزرگ سیاهرگ خلفی (Posterior Vena Cava) تمام حیوانات صورت گرفت. علاوه بر این، جهت سنجش بیان ژن، نمونه‌های بافت ریه از ریه چپ تمام حیوانات جمع‌آوری گردیده و بلافاصله فریز شدند.

سنجش‌های بیوشیمیایی

در ابتدا نمونه‌های خون که از حیوانات ناشتا جمع‌آوری شده بود، سانتریفوژ گشته و سرم آن‌ها جدا شد. سپس، مقادیر گلوکز و انسولین در نمونه‌های سرم به ترتیب توسط کیت تجاری گلوکز (شرکت پارس آزمون، ایران، حداقل میزان قابل سنجش گلوکز ۵ mg/dl) و کیت الایزای انسولین مخصوص رت (Rat insulin Sweden ELISA; Mercodia, Uppsala، حداقل میزان قابل سنجش انسولین ۴۵۰ µg/dl) سنجش شد. در نهایت، نسبت گلوکز (mg/dl) به انسولین (µU/ml) ناشتا به‌عنوان یک شاخص قابل‌اعتماد برای تعیین حساسیت به انسولین محاسبه شد.[16,17]

سنجش میزان بیان ژن‌های p62، LC3 و Beclin-1 به روش Quantitative real-time PCR

استخراج RNA کل از نمونه‌های ریه هموژن شده با استفاده از RNX-Plus solution kit (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده کیت صورت گرفت. به منظور سنتز cDNA از RNA کل، از آنزیم Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (ترموفیشر ساینتیفیک، آمریکا) استفاده شد. مراحل انجام Quantitative real-time PCR به‌منظور سنجش میزان نسبی بیان ژن‌های p62، LC3 و Beclin-1 با استفاده از یک مستر میکس حاوی SYBR Green (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و مطابق یک مطالعه قبلی توسط غلامی و همکاران می‌باشد.[18] پروتکل PCR در دستگاه روتور ژن (real-time PCR machine Rotor-Gene 3000) اجرا شد. ژن بتااکتین به‌عنوان ژن رفرنس برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف استفاده گردید.

داده‌های حاصل از Quantitative real-time PCR شامل مقادیر CT مربوط به ژن رفرنس و ژن هدف تمام نمونه‌های مورد سنجش، با استفاده از متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ به میزان نسبی بیان ژن‌های هدف تبدیل شدند.[۱۸] در ادامه، داده‌های مربوط به میزان نسبی بیان ژن‌های هدف به نرم‌افزار GraphPad Prism 7 منتقل شدند.

جهت تجزیه‌وتحلیل آماری به‌دست‌آمده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7 استفاده شد. ابتدا داده‌ها از نظر توزیع با روش K-S (Kolmogrov-Smirnov) کنترل شدند. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، به‌منظور مقایسه میانگین دو گروه از آزمون تی تست مستقل استفاده شد. در این مطالعه $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (جدول ۱).

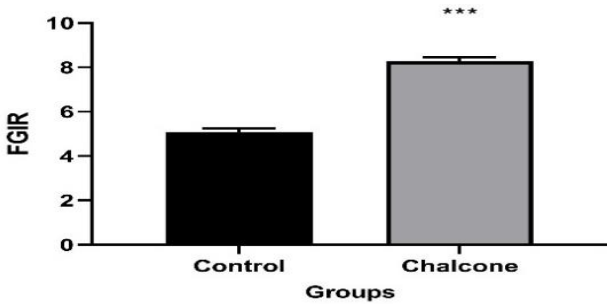
جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در Real-time PCR

Primer name	Gene bank Accession No.	Primer sequence (5´→3')
LC3	NM_022867.2	Forward: ACGGCTTCCTGTACATGGTC Reverse: GTGGGTGCCTACGTTCTG AT
Beclin 1	NM_001034117.1	Forward: TGGCACAGCGGACAATTTGG Reverse: CAGTACAACGGCAACTCCTTA
P62	NM_130405.2	Forward: CAGCTGCTGTCCGTAGAAATTG Reverse: ACCCGCTCTTTCAGCTTCAT
ß-actin	NM_031144.3	Forward: GCGTCCACCTGCTAGTACAAC Reverse: CGACGACTAGCTCAGCGATA

توالی پرایمرها از NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) گرفته شده است.

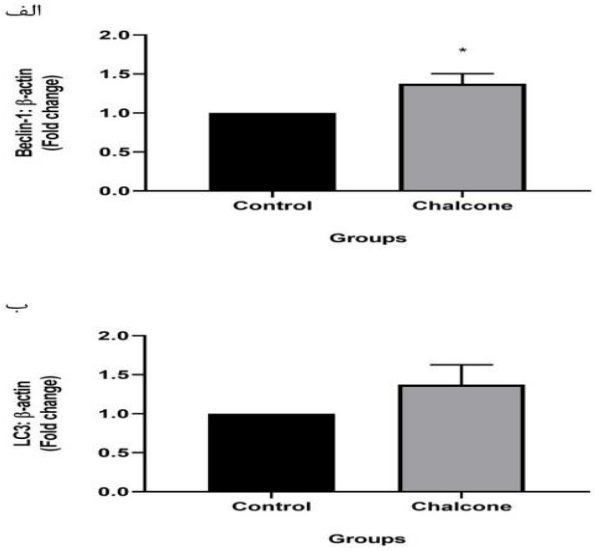
یافته‌ها

در این مطالعه نسبت گلوکز به انسولین ناشتا به‌منظور بررسی اثر ترانس چالکون بر میزان حساسیت به انسولین محاسبه شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان شاخص حساسیت به انسولین در حیوانات دریافت‌کننده ترانس چالکون به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) بیشتر از حیوانات گروه کنترل بود.



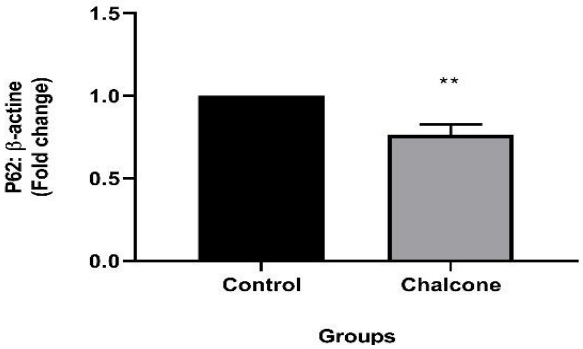
شکل ۱. تأثیر تیمار خوراکی با ترانس چالکون بر شاخص حساسیت به انسولین (FGIR) در حیوانات گروه‌های آزمایشی (Control: دریافت‌کننده توئین ۸۰، ۱۰٪ به مدت ٦ هفته و Chalcone: دریافت‌کننده ترانس چالکون به مدت ٦ هفته). داده‌ها به‌صورت mean±SEM نشان داده شده‌اند (n=٦). *** $P<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل. FGIR، Fasting Glucose to Insulin ratio.

به‌منظور بررسی اثرات احتمالی ترانس چالکون بر میزان اتوفاژی در ریه موش‌های صحرایی بالغ در شرایط فیزیولوژیک، میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در بافت ریه موش‌های صحرایی گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده ترانس چالکون به روش real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های real-time PCR، تیمار خوراکی با ترانس چالکون باعث افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) میزان بیان ژن Beclin-1 نسبت به گروه کنترل شد (شکل ۲ الف). علاوه بر این، تیمار خوراکی با ترانس چالکون به مدت ٦ هفته باعث افزایش مختصر میزان بیان ژن LC3 در حیوانات گروه چالکون نسبت به گروه کنترل شد اما این تغییر معنی‌دار نبود (شکل ۲ ب).



شکل ۲. تأثیر تیمار خوراکی با ترانس چالکون بر میزان بیان ژن (الف) Beclin-1 و (ب) LC3 در حیوانات گروه‌های آزمایشی (Control: دریافت‌کننده توئین ۸۰، ۱۰٪ به مدت ٦ هفته و Chalcone: دریافت‌کننده ترانس چالکون به مدت ٦ هفته). داده‌ها به‌صورت mean±SEM نشان داده شده‌اند. (n=٤، duplicated). * $P<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تیمار خوراکی با ترانس چالکون باعث کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) میزان بیان ژن p62 در ریه حیوانات گروه چالکون نسبت به گروه کنترل شد.



شکل ۳. تأثیر تیمار خوراکی با ترانس چالکون بر میزان بیان ژن p62 در حیوانات گروه‌های آزمایشی (Control: دریافت‌کننده توئین ۸۰، ۱۰٪ و Chalcone: دریافت‌کننده ترانس چالکون به مدت ٦ هفته). داده‌ها به‌صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند (n=۴، duplicated). ** $P<۰/۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل.

بحث

رویکردهای درمانی مبتنی بر تنظیم اتوفاژی می‌تواند در مقابله با بیماری‌های تهدیدکننده از قبیل سرطان، بیماری‌های التهابی و نوردژنراتیو مورد استفاده قرار گیرد.[۵، ۸، ۱۹-۲۰] پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی از قبیل Becline-1وLC3در تشکیل اتوفاگوزم نقش مهمی دارند؛ به‌ویژه Becline-1 یکی از اجزای ضروری برای شروع اتوفاژی است. ازاین‌رو، اندازه‌گیری میزان بیان Becline-1 و LC3 یکی از روش‌های پرکاربرد برای سنجش میزان تشکیل اتوفاگوزوم‌ها می‌باشد.[۲۳،۲۲] بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، تیمار خوراکی با ترانس چالکون به مدت ٦ هفته در شرایط فیزیولوژیک، منجر به افزایش بیان ژن Beclin-1 در بافت ریه موش‌های صحرایی شد. بااین‌وجود، اثر ترانس چالکون در افزایش بیان ژن LC3 در ریه حیوانات دریافت‌کننده ترانس چالکون معنی‌دار نبود. این امکان وجود دارد که با افزایش مدت‌زمان تیمار با ترانس چالکون و یا در شرایط بیماری‌های مرتبط با اتوفاژی، تأثیر این چالکون بر بیان ژن LC3 معنی‌دار گردد.

از طرف دیگر، تجویز خوراکی چالکون، منجر به کاهش بیان ژن p62 در بافت ریه موش‌های صحرایی گردید. در مطالعه حاضر، افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن Beclin-1 در بافت ریه موش‌های صحرایی دریافت‌کننده ترانس چالکون حاکی از اثر پیش برنده اتوفاژی این چالکون می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از یک مطالعه پیشین، در قلب موش‌های سوری مبتلا به sepsis القاءشده توسط لیپوپلی‌ساکارید، بیان بیش‌ازحد Beclin-1 در اثر دستکاری ژنتیکی منجر به تحریک اتوفاژی و میتوفاژی، محافظت میتوکندری‌ها، بهبود عملکرد قلب و کاهش التهاب و فیبروز گشته است.[۲۴] بنابراین، افزایش بیان Becline-1 در اثر عوامل ژنتیکی و فارماکولوژیکی می‌تواند باعث تحریک اتوفاژی و مهار التهاب و فیبروز گردد. همسو با مطالعه حاضر، در یک مطالعه in vitro که اثرات ترانس چالکون بر میزان اتوفاژی در سلول‌های سرطانی بررسی گردیده است، مشاهده شد که ترانس چالکون از طریق القا اتوفاژی باعث القا مرگ سلولی در سلول‌های هپاتوسلولار کارسینومای رده HuH7.5 می‌شود.[۳]

در مجموع، به نظر می‌رسد که در این مطالعه نیز ترانس چالکون منجر به القا فرآیند اتوفاژی در ریه موش‌های صحرایی سالم گردیده است.از طرف دیگر، در تحقیق حاضر، ترانس چالکون میزان بیان ژن p62 را در ریه موش‌های صحرایی بالغ به‌طور قابل توجهی کاهش داد. مشخص شده است که p62 یک پروتئین با عملکردهای چندگانه و پیچیده است.[۲۵] بر اساس دانش فعلی، p62 قادر به تعامل با مسیرهای سیگنالینگ مورد نیاز برای حفظ هومئوستاز، التهاب و بیماری‌هایی از قبیل سرطان است. این پروتئین یک گیرنده انتخابی برای اتوفاژی و میتوفاژی است و باعث مهار فعال‌سازی اینفالاموزوم و التهاب می‌گردد. درعین‌حال، گزارش شده است که پروتئین p62 باعث فعال‌سازی NF-κB می‌گردد.[۲۶،۲۵]

پیشنهاد شده است که در بیماری sepsis، p62 به‌عنوان یک واسطه التهابی عمل می‌کند و منجر به فعال‌سازی NF-κB می‌گردد. در طی این شرایط پاتولوژیک، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها به‌صورت فعال و سلول‌های پیروپتوتیک به‌صورت غیرفعال p62 ترشح می‌کنند و p62 نیز به‌صورت وابسته به NF-κB باعث تولید سایتوکاین‌های التهابی می‌گردد.[۲۷،۲۵]

با توجه به موارد مذکور و نتایج یک مطالعه قبلی در این راستا که تیمار حیوانات سالم با ترانس چالکون دارای اثرات ضد التهابی درکبد می‌باشد، [۱۵] اثر مهاری ترانس چالکون بر بیان p62 در مطالعه حاضر، ممکن است در اثرات ضد التهابی ترانس چالکون دخیل باشد. در مطالعه دیگری اثر تیمار بیماران با Quercetin بر میزان اتوفاژی در بافت ریه سرطانی بررسی شده و نشان داده شد Quercetin بیان LC3-II و Becline-1 را ارتقا داده و بیان p62 را سرکوب می‌کند که در نهایت باعث القای اتوفاژی در سلول‌های سرطانی بافت ریه می‌شود.[۲۸]

به‌طورکلی، طبق یافته‌های حاصل از این مطالعه، افزایش بیان ژن Beclin-1 و کاهش بیان ژن p62 در بافت ریه موش صحرایی که به مدت ٦ هفته با ترانس چالکون تیمار شده‌اند، می‌تواند نشان‌دهنده افزایش فرآیند اتوفاژی در ریه باشد که تأییدی بر موارد ذکر شده است. از طرف دیگر، افزایش شاخص حساسیت به انسولین در حیوانات دریافت‌کننده ترانس چالکون، حاکی از توانایی این چالکون در افزایش حساسیت به انسولین می‌باشد. دیابت، یک بیماری با شیوع جهانی رو به افزایش است و پیشنهاد شده است که مقاومت به انسولین باعث کاهش عملکرد ریه‌ها می‌گردد.[۲۹-۳۰] ازاین‌رو، مداخلات درمانی در راستای کاهش مقاومت به انسولین از جمله ترانس چالکون می‌تواند اثرات مفیدی در راستای بهبود عملکرد تنفسی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار، اثرات ترانس چالکون بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در بافت ریه را ارزیابی نمود. بااین‌وجود، در مطالعه حاضر میزان بیان پروتئین‌های p62، Becline-1 و LC3 سنجش نشد که محدودیت این مطالعه محسوب می‌گردد. بر طبق یافته‌های این مطالعه، تیمار موش‌های صحرایی با ترانس چالکون به مدت ٦ هفته منجر به افزایش بیان ژن Becline-1 مرتبط با اتوفاژی در بافت ریه شد که نشان‌دهنده القا فرآیند اتوفاژی است.

به‌طور مشابه، این چالکون باعث افزایش بیان ژن LC3 گردید. اگرچه، این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. با توجه به اثر کاهنده ترانس چالکون بر میزان بیان ژن p62، ممکن است اثر ضدالتهابی ترانس چالکون حداقل تا حدودی به علت کاهش میزان بیان ژن p62 ریوی در حیوانات تیمار شده با ترانس چالکون باشد. در نتیجه، مطالعه حاضر پیشنهاد کرد که ترانس چالکون فرآیند اتوفاژی را در ریه موش‌های صحرایی القا می‌کند. بااین‌حال، مطالعات بیشتری برای بررسی توانایی ترانس چالکون به‌عنوان یک درمان امیدوارکننده برای بیماری‌های ریه مورد نیاز است.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته است.

مشارکت پدیدآورندان

ایده‌پردازی و طراحی اثر: محمدرضا علیپور و الهام کریمی ثالث، انجام پژوهش و جمع‌آوری داده‌ها: فاطمه صالحی مزده و الهام کریمی ثالث تحلیل و تفسیر داده‌ها و رسم نمودارها: الناز نخجیری و پرویز شهابی؛ تهیه پیش‌نویس مقاله: الناز نخجیری و فاطمه صالحی مزده؛ نقد و بررسی و تأیید نسخه نهایی مقاله: تمام نویسندگان.

منابع مالی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دکترای عمومی خانم فاطمه صالحی مزده با عنوان "تأثیر ترانس چالکون و رژیم غذایی پرچرب بر مسیر Nrf-2/HO-1 و میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در ریه رت‌های نر" می‌باشد. تأمین مالی توسط مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (شماره گرنت: ۷۱۲۰۹) صورت گرفته است.

دسترسی پذیری داده‌ها

مجموعه داده‌ها در صورت درخواست معقول از نویسنده مسؤول در دسترس است.

ملاحظات اخلاقی

کلیه مطالعات انجام‌شده بر روی حیوانات، مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز (کد:IR.TBZMED.AEC.1402.002) قرار گرفته است.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

References

1. Racanelli AC, Choi AM, Choi ME. Autophagy in chronic lung disease. Progress in molecular biology and translational science. 2020;172:135-56. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.02.001
2. Antunes F, Erustes AG, Costa AJ, Nascimento AC, Bincoletto C, Ureshino RP, et al. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy?. Clinics. 2018;73:e814s. doi: 10.6061/clinics/2018/e814s
3. da Silva Siqueira E, Concato VM, Tomiotto-Pellissier F, Silva TF, da Silva Bortoleti BT, et al. Trans-chalcone induces death by autophagy mediated by p53 up-regulation and β-catenin down-regulation on human hepatocellular carcinoma HuH7. 5 cell line. Phytomedicine. 2021;80:153373. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153373
4. Pabon MA, Ma KC, Choi AM. Autophagy and obesity-related lung disease. American Journal of

Respiratory Cell and Molecular Biology. 2016;54(5):636-46. doi: 10.1165/rcmb.2016-0045ps
5. Ramesh J, Ronsard L, Gao A, Venugopal B. Autophagy intertwines with different diseases—recent strategies for therapeutic approaches. Diseases. 2019;7(1):15. doi: 10.3390/diseases7010015
6. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. PloS one. 2012;7(7):e41394. doi: 10.1371/journal.pone.0041394
7. Dong Z, Yin EG, Yang M, Zhao X, Li J, Lei W. Role and mechanism of keap1/nrf2 signaling pathway in the regulation of autophagy in alleviating pulmonary fibrosis. Computational Intelligence and Neuroscience. 2022;2022(1):3564871. doi: 10.1155/2022/3564871.
8. Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, Yokoyama Y, Hayashi Y, Hirayama D, et al. Autophagy and Autophagy-Related Diseases: A Review. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21:8974. doi: 10.3390/ijms21238974.
9. Schmitz KJ, Ademi C, Bertram S, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. World J Surg Oncol. 2016;14(1):189. doi: 10.1186/s12957-016-0946-x
10. Karimi-Sales E , Jeddi S , Ebrahimi-Kalan A , Alipour MR . trans-Chalcone prevents insulin resistance and hepatic inflammation and also promotes hepatic cholesterol efflux in high-fat diet-fed rats: modulation of miR-34a-, miR-451-, and miR-33a-related pathways. Food Funct. 2018;9(8):4292-8. doi: 10.1039/c8fo00923f
11. Karimi-Sales E, Alipour MR. trans-Chalcone protects male rats against high-fat emulsion-induced pancreatic injury by inhibiting TNF-α and MCP-1 expression . Med J Tabriz Uni Med Sci. 2023;45(5):402-10. doi: 10.34172/mj.2023.042
12. Ouyang Y, Li J, Chen X, Fu X, Sun S, Wu Q. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. Biomolecules. 2021;11(6):894. doi: 10.3390/biom11060894
13. Karimi-Sales E, Alipour MR, Naderi R, Hosseinzadeh E, Ghiasi R. Protective Effect of Trans-chalcone Against High-Fat Diet-Induced Pulmonary Inflammation Is Associated with Changes in miR-146a And pro-Inflammatory Cytokines Expression in Male Rats. Inflammation. 2019;42(6):2048-55. doi: 10.1007/s10753-019-01067-1
14. Karimi-Sales E, Ebrahimi-Kalan A, Alipour MR. Preventive effect of trans-chalcone on non-alcoholic steatohepatitis: Improvement of hepatic lipid metabolism. Biomed Pharmacother. 2019;109:1306-12. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.196.
15. Karimi-Sales E, Jeddi S, Ghaffari-Nasab A, Salimi M, Alipour MR. Effect of trans-chalcone on hepatic IL-8 through the regulation of miR-451 in male rats. Endocr Regul. 2018;52(1):1-5. doi: 10.2478/enr-2018-0001.
16. Burgert TS, Vuguin PM, DiMartino-Nardi J, Attie KM, Saenger P. Assessing insulin resistance: application of a fasting glucose to insulin ratio in growth hormone-treated children. Horm Res. 2002;57(1-2):37-42. doi: 10.1159/000057945.
17. Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295(5):E1269-76. doi: 10.1152/ajpendo.90207.2008.
18. Gholami H, Jeddi S, Zadeh-Vakili A, Farrokhfall K, Rouhollah F, Zarkesh M, et al. Transient Congenital Hypothyroidism Alters Gene Expression of Glucose Transporters and Impairs Glucose Sensing Apparatus in Young and Aged Offspring Rats. Cell Physiol Biochem. 2017;43(6):2338-52. doi: 10.1159/000484386.
19. Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. Nat Rev Immunol. 2016;16(11):661-75. doi: 10.1038/nri.2016.100.
20. Lavallard VJ, Meijer AJ, Codogno P, Gual P. Autophagy, signaling and obesity. Pharmacol Res. 2012;66(6):513-25. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.003
21. Min S, Masanovic B, Bu T, Matic RM, Vasiljevic I, Vukotic M, et al. The Association Between Regular Physical Exercise, Sleep Patterns, Fasting, and Autophagy for Healthy Longevity and Well-Being: A Narrative Review. Front Psychol. 2021;12:803421. doi: 10.3389/fpsyg.2021.803421
22. Jung G, Roh J, Lee H, Gil M, Yoon DH, Suh C, et al. Autophagic Markers BECLIN 1 and LC3 are Associated with Prognosis of Multiple Myeloma. Acta Haematol. 2015;134(1):17-24. doi: 10.1159/000368848
23. Nurdinov N, Cinar V, Guler A, Yilmaz SG, Kokcu ND, Hamurcu Z. LC3 and Beclin-1 as Markers of Autophagic Activity in Breast Cancer. Erciyes Med J. 2021;43(4):333–7. doi: 10.14744/etd.2020.99997.
24. Sun Y, Yao X, Zhang QJ, Zhu M, Liu ZP, Ci B, et al. Beclin-1-Dependent Autophagy Protects the Heart During Sepsis. Circulation. 2018;138(20):2247-62. doi: 10.1161/circulationaha.117.032821.
25. Hennig P, Fenini G, Di Filippo M, Karakaya T, Beer HD. The Pathways Underlying the Multiple Roles of p62 in Inflammation and Cancer. Biomedicines. 2021;9(7):707. doi: 10.3390/biomedicines9070707.
26. Zou B, Liu J, Klionsky DJ, Tang D, Kang R. Extracellular SQSTM1 as an inflammatory mediator. Autophagy. 2020;16(12):2313-5. doi: 10.1080/15548627.2020.1843253

27. Zhou B, Liu J, Zeng L, Zhu S, Wang H, Billiar TR, et al. Extracellular SQSTM1 mediates bacterial septic death in mice through insulin receptor signalling. Nat Microbiol. 2020;5(12):1576-87. doi: 10.1038/s41564-020-00795-7
28. Guo H, Ding H, Tang X, Liang M, Li S, Zhang J, et al. Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1/AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 in vitro. Thorac Cancer. 2021;12(9):1415-22. doi: 10.1111/1759-7714.13925
29. Shafiee-Kandjani AR, Hoshyar-Gharamaleki J, Ghafari N, Barzegar H. The comparison of memory and executive functions in adults with type II diabetes and healthy people. Med J Tabriz Uni Med Sci. 2022;44(1):7-14. doi: 10.34172/mj.2022.009
30. Forno E, Han YY, Muzumdar RH, Celedón JC. Insulin resistance, metabolic syndrome, and lung function in US adolescents with and without asthma. J Allergy Clin Immunol. 2015;136(2):304-11.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.010