مقاله پژوهشی

بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه *Amaranthus Cruentus* بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 در سلول‌های سرطان سینه (MDA-MB-231)

مهسا بهجتی مقدم، علی نعمتی*، پوران اردلان

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: سرطان نوعی بیماری ژنتیکی ناشی از جهش در DNA است که باعث برهم خوردن الگوی تقسیم و تمایز سلول‌ها و درنهایت تشکیل نئوپلاسم می‌شود. سرطان سینه یک بدخیمی شایع و به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان ۳۵ تا ۵۵ سال است. به دلیل مشکلات درمان‌های رایج مثل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی و همچنین عدم دستیابی به نتایج مثبت در تومورهای متاستازی باعث شده تا به دنبال یافتن روش‌های جدید درمان باشیم. امروزه نانوتکنولوژی به ما در پیدا کردن و گسترش راه‌های درمانی نوین کمک کرده است. لذا، در این تحقیق به بررسی اثر آپوپتوزی نانوذره اکسیدروی سنتز شده به روش سبز توسط گیاه تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*) بر روی سلول‌های سرطان سینه (MDA-MB-231) پرداخته‌شده است.

مواد و روش‌ها: نانوذرات اکسیدروی به روش سبز و توسط عصاره آبی برگ گیاه *Amaranthus cruentus* سنتز شد. اندازه و ویژگی‌های مورفولوژیکی آن به‌وسیله آزمایش DLS و روش‌های FESEM و TEM مشخص گردید. به‌منظور بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی در القاء آپوپتوز، سلول‌ها پس از کشت در فلاسک‌های T25 با غلظت‌های مختلف نانوذرات (۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار و پس از گذشت ۴۸ ساعت، تغییرات بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax به کمک تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد. جهت آنالیز داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS و روش one-way ANOVA استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با روش least significant diffrences (LSD) انجام گرفت.

نتایج: آزمایش DLS میزان متوسط اندازه نانوذرات اکسیدروی سنتز شده را حدود ۳۸-۳۰ نانومتر نشان داد. نتایج حاصل از بیان ژن به کمک تکنیک Real-time PCR نشان داد نانوذرات اکسیدروی سنتز شده از طریق کاهش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های MDA شده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر نانوذره در القاء آپوپتوز می‌توان ادعا کرد که نانوذره بکار گرفته‌شده دارای خصوصیت ضد سرطانی بوده و می‌تواند پس از مطالعات تکمیلی به‌عنوان کاندیدایی جهت درمان سرطان درزمینهٔ پزشکی و داروسازی معرفی گردد.

کلمات کلیدی: اکسیدروی، نانوذره، بیان ژن، آپوپتوز، سرطان سینه

مقدمه

امروزه سرطان یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامت عمومی در جهان است. سرطان به دنبال اختلال در فرایند طبیعی تکثیر سلولی ایجاد می‌شود و اغلب در اثر موتاسیون و یا فعال شدن غیرطبیعی ژن‌هایی که در کنترل میتوز سلولی نقش دارند به وجود می‌آید. به عبارتی، هنگامی‌که سلول دچار این تغییر ژنتیکی شود در زمان و مکان نامناسب شروع به تکثیر و ایجاد کلونی می‌کند تا تومور تشکیل شود (۱). این سرطان در کشورهای توسعه‌یافته حدود ۱۰ درصد کل سرطان‌ها و ۳۰ درصد سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد (۲). امروزه از هر ۸ نفر زن، ۱ نفر به سرطان سینه مبتلا می‌شود که بیش از ۴۰٪ آن‌ها بالای ۶۵ سال سن دارند و ۶۵٪ مرگ‌ومیرها نیز در این گروه اتفاق می‌افتد. میزان گسترش سرطان سینه پیش از ۴۰ سالگی ۱ نفر از هر ۵۳ نفر تخمین زده می‌شود و ریسک ابتلا به این سرطان

*نویسنده مسئول: **علی نعمتی**، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
Email: neamati.ali@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-3571-197X

با افزایش سن بیشتر می‌گردد (۳). افزایش تعداد بیماران مبتلابه سرطان سینه در سراسر جهان به‌عنوان یک مشکل مهم تهدیدکننده سلامتی مطرح‌شده است (۴). ازجمله مشکلات درمان این بیماری، مقاومت دارویی است به‌طوری‌که بیماران نسبت به داروهای مختلف که دارای مکانیسم‌های اثر متفاوتی هستند مقاوم می‌شوند (۵). برخی از این مکانیسم‌ها شامل: خروج دارو از سلول به کمک پمپ‌های وابسته به ATP، تغییر در ژن‌ها و پروتئین‌های کنترل‌کننده آپوپتوز مثل p53، Bcl-2، فعال شدن مسیرهای دخیل درترمیم DNA، خنثی شدن داروها در سلول و تغییر در توبولین و میکروتوبول‌ها است (۶). متأسفانه باوجود تلاش‌های فراوانی که در حوزه پیشگیری و درمان سرطان صورت گرفته است، این بیماری رشد زیادی داشته و همچنان به‌عنوان یک عامل اصلی مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود (۷). جراحی به همراه رادیوتراپی و یا شیمی‌درمانی از راه‌هایی است که امروزه برای درمان سرطان مورداستفاده قرار می‌گیرد. برخی از مشکلات استفاده از این روش‌ها، ایجاد سمیت، اثرات جانبی و مقاومت دارویی است که باعث کاهش تأثیر آن‌ها در درمان می‌شود (۸). یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل پیشرفت سرطان و هدف‌دار کردن داروهای ضد سرطانی به‌شدت موردنیاز است (۹). چنین داروهایی فقط روی سلول‌های سرطانی اثرگذار بوده و همچنین استفاده از کمترین غلظت داروها مدنظر است به‌طوری‌که اثرات سمی دارو روی سلول‌های سالم و طبیعی کاهش یابد (۱۰). اخیراً پیشرفت‌های نانوذرات اختصاصی برای تومورهای سرطانی به‌عنوان حامل‌هایی برای تحویل دارو به موضوعی جذاب برای تحقیقات و همچنین راه‌حلی برای درمان سرطان تبدیل‌شده است. نانوتکنولوژی تحویل داروهایی با حلالیت پایین در آب، امکان تحویل هدفمند دارو به بافت‌ها و سلول‌های ویژه، تحویل هم‌زمان دو یا تعداد بیشتری دارو و پیش‌بینی مکان تحویل دارو به کمک ترکیب عوامل درمانی و عکس‌برداری را فراهم کرده است (۱۱). مواد نانو دارای نسبت سطح به حجم بیش‌تری در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر با ترکیب شیمیایی یکسان هستند و همین امر باعث فعال‌تر بودن آن‌ها ازنظر بیولوژیکی است. مطالعات حاکی از آن است که هرچه اندازه نانوذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متنوع‌تری از خود نشان می‌دهند، بنابراین می‌توان گفت کاهش اندازه ذرات مواد در ابعاد نانو می‌تواند سبب بهبود ویژگی‌های بیولوژیکی گردد (۱۲). در میان انواع متنوع نانوذرات، نانوذره اکسیدروی دارای چندین ویژگی منحصربه‌فرد بوده که آن را برای کاربردهای زیست پزشکی متمایز کرده است. ازجمله: خصوصیات منحصربه‌فرد نوری، کاتالیکی، نیمه‌هادی، پیزوالکتریک و مغناطیسی (۱۳). از دیگر ویژگی‌های بارز نانوذرات اکسیدروی فرایندی است که اجازه کنترل اندازه و توزیع اندازه را می‌دهد. مطالعات نشان داده است که ویژگی سمیت سلولی نانوذرات اکسیدروی در برابر سلول‌های سرطانی به‌طور مستقیم وابسته به‌اندازه است و نانوذرات با اندازه کوچک‌تر سمیت بیشتری را نشان می‌دهند (۱۴، ۱۵). فعالیت نوری نانوذره اکسیدروی موجب آزادسازی بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که اگر به طرز مناسبی سلول‌های سرطانی هدف‌گیری شوند منجر به نابودی انتخابی آن‌ها می‌شود (۱۶). در حال حاضر استفاده از مواد غیر سمی برای تولید نانوذرات به‌منظور جلوگیری از آسیب‌های زیستی بسیار موردتوجه است. استفاده از عصاره بخش‌های مختلف گیاهان علاوه بر سازگاری با محیط‌زیست، ازلحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و در کوتاه‌ترین زمان باعث تولید مقدار زیادی نانوذره با خلوص بالا می‌شود (۱۷). تحقیقات نشان داده است که سمیت نانوذرات اکسیدروی موجب مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شود و یون Zn^{2+} آزادشده از اکسیدروی دارای خاصیت سایتوتوکسیک و فعالیت آپوپتوزی در سلول است (۱۸). از عواملی که در القاء آپوپتوز نقش دارند می‌توان توکسین‌ها، هورمون‌ها، عفونت، کمبود اکسیژن، پرتوها و محرومیت غذایی را نام برد. Bak ، Bad، Bcl2، Bax و p53 ازجمله ژن‌هایی هستند که در فرایند آپوپتوز نقش ایفا می‌کنند (۱۹). پروتئین Bcl-2 یک پروتئین غشایی است که در پوشش هسته و غشای خارجی میتوکندری قرارگرفته و یک مولکول pro-survival است (۲۰). Bcl-2 پروتئین تنظیم‌کننده فعالیت کاسپاز است که در پیشبرد و ممانعت از آپوپتوز نقش دارد. پروتئین‌های Bad و Bax پیش برنده‌ی آپوپتوز هستند (۱۹) پروتئین Bax، ازنظر ساختاری هومولوگ Bcl-2 و راه‌انداز آپوپتوز بوده که در سیتوپلاسم یا غشای سلولی قرار می‌گیرد. بنابراین ازنظر عملکردی این پروتئین آنتاگونسیت نقش حفاظتی Bcl-2 است (۲۱). نانوذرات به‌واسطه‌ی گونه‌های فعال اکسیژن باعث تخریب DNA می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن پتانسیل غشایی میتوکندری را کاهش داده و نسبت Bax/Bcl-2 را افزایش می‌دهد که منجر به القاء آپوپتوز به‌واسطه میتوکندری می‌شود (۲۲). به دنبال پاسخ به استرس‌هایی مثل اشعه، افزایش دما، کمبود

اکسیژن و مواد غذایی و عفونت‌های ویروسی سیگنالینگ آپوپتوز در سلول آغاز می‌گردد (۲۳). سیگنال‌های مرگ سبب راه‌اندازی پروتئین‌های آپوپتوزی Bax می‌شوند (۲۴). این پروتئین‌ها باعث آزاد شدن سیتوکروم C از غشاء میتوکندری می‌گردند. سیتوکروم C آزادشده به همراه فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوزی (Apaf-1) به کاسپاز ۹ متصل شده و آبشار کاسپازی (Caspase Cascade) را فعال می‌کند که منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲۵). در این تحقیق به بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus Cruentus* بر روی تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 به‌منظور مهار رشد سلول‌های سرطان سینه (MDA-MB-231) پرداخته‌شده است.

مواد و روش‌ها

- **تهیه نانوذره اکسیدروی توسط گیاه *Amaranthus Cruentus***

به‌منظور سنتز نانوذره اکسیدروی ابتدا عصاره آبی برگ گیاه تاج‌خروس (با کد هرباریوم: ۱۰۳۱۶) تهیه شد. سپس ۱۰ cc از عصاره گیاه به همراه ۱۰۰cc محلول استات روی ($ZnC_4H_6O_4$) به مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سود ۱ مولار قطره‌قطره اضافه گردید تا زمانی که pH محلول به ۱۲ رسید. ذرات کلوئیدی حاصل سانتریفیوژ و رسوب به‌دست‌آمده خشک شد. جهت بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری از روش‌های FESEM, TEM و آزمایش DLS استفاده گردید.

- **کشت سلول**

رده سلولی *MDA-MB-231* از مرکز تحقیقات بوعلی مشهد تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت کامل ۱۰٪ DMEM (GIBCO, USA) حاوی FBS۱۰ml (GIBCO, USA) و ۱ml آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (GIBCO, USA) درون فلاسک‌های T25 مخصوص کشت سلولی کشت داده شد و در انکوباتور CO_2 دار (دما ۳۷ درجه سلسیوس، رطوبت ۸۰٪، فشار کربن دی‌اکسید ۵٪) نگهداری گردید. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ داده شد. برای این منظور محیط رویی فلاسک‌ها خارج گردید. در مرحله بعد کف فلاسک با PBS (Merck) دو بار شستشو داده شد تا اثرات تغییر pH از بین برود بافر نیز از فلاسک خارج و برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک، آنزیم trypsin – EDTA (۰/۲۵٪) (Sigma, France) به میزان ۱ml به فلاسک اضافه شد. بعدازآن فلاسک جهت تسریع عملکرد تریپسین ۲ الی ۳ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از انکوباسیون و با استفاده از میکروسکوپ معکوس، جدا شدن سلول‌ها از کف پلیت بررسی شد. برای خنثی کردن اثر تریپسین، دو برابر حجم آن محیط کشت کامل به فلاسک اضافه گردید. تمام سوسپانسیون سلولی به فالکون ۱۵ منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۸۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوب سلولی به‌دست‌آمده در ۱ ml محیط کشت کامل حل شد. سلول‌ها قبل از انتقال به فلاسک‌های جدید به کمک رنگ تریپان بلو شمارش شد و درنهایت به فلاسک‌های جدید دارای ۵ ml محیط کشت انتقال یافتند و در انکوباتور گذاشته شدند.

- استخراج RNA

برای بررسی اثر نانوذره بر بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 در رده سلولی سرطان سینه (MDA-MB-231)، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذره (۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در فلاسک‌های T25 تیمار و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌ها برای استخراج RNA از کف فلاسک جدا شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت High pure کمپانی Roche و طبق پروتکل انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ بررسی شد. ابتدا یک میکرولیتر از RNAاستخراج‌شده، برداشته و غلظت آن برحسب نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت طول‌موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ با نانودراپ سنجیده شد.

- تکنیک Real-time PCR

به علت حساسیت بیشتر و پایداری کمتر RNA نسبت به DNA، پس از استخراج RNA باید به‌سرعت از روی آن DNA سنتز شود. پس از انجام بررسی‌های کمی و کیفی RNA، ۲ میکرولیتر از آن برای ساخت cDNA مورداستفاده قرار گرفت. جهت ساخت cDNA از کیت Fermentase استفاده شد. از PCR Real-time به‌منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به‌عنوان ژن‌های هدف استفاده گردید. در این روش، حین انجام PCR با افزایش تعداد کپی‌های ژن هدف، نور فلوئورسنت ساطع‌شده از نشانگرهای فلوئورسنت افزایش می‌یابد که توسط دتکتور اندازه‌گیری و محاسبه‌شده و به یک مقدار عددی تبدیل می‌شود. ژن GAPDH (Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase) ازآنجایی‌که دارای بیان ثابت در غلظت‌های

مختلف نانوذرات است، به‌عنوان ژن کنترل در نظر گرفته شد. جدول ۱ نشان‌دهنده توالی پرایمرهای ژن کنترل و ژن‌های هدف است.

جدول ۱- توالی پرایمر

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5' TGCTGGTGCTGAGTATGTCG 3'	5' GCATGTCAGATCCACAACGG 3'
BAX	5' TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA 3'	5'CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT3
Bcl-2	5'CATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC3'	5'CAGATAGGCACCCAGGGTGAT3'

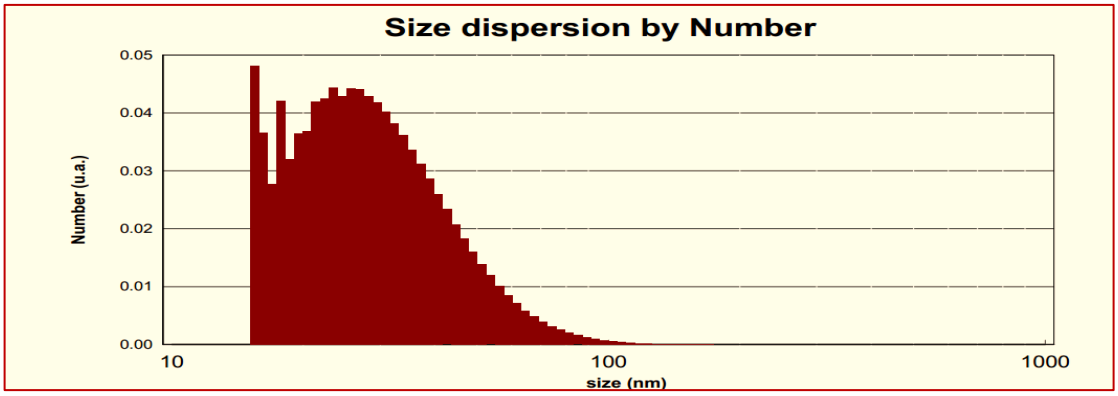
▪ روش آنالیز آماری داده‌ها

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با نانوذره اکسیدروی سنتز شده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus Cruentus* در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده و بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در یافته‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA استفاده گردید. بعدازآن مقایسه میانگین‌ها با روش LSD (least significant diffrences) انجام گرفت و سطح اطمینان ۰/۰۵ برای محاسبات در نظر گرفته شد. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ ترسیم شد.

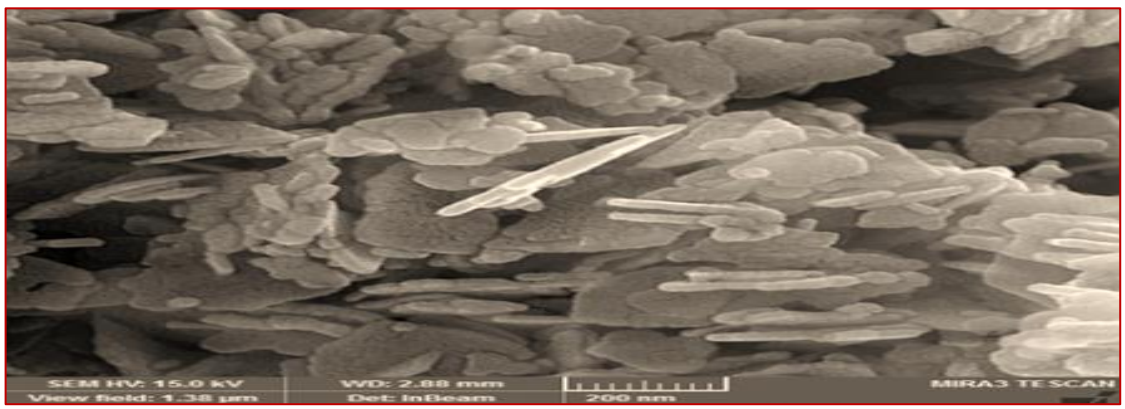
نتایج

▪ نتایج بررسی سنتز نانوذرات اکسیدروی

بر اساس نمودار ۱، اندازه نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus Cruentus* حدود ۳۸- ۳۰



نمودار ۱- پراکنش نانوذرات اکسیدروی بر اساس اندازه. بر اساس این نمودار اندازه نانوذرات در محدوده ۳۰ تا ۳۸ نانومتراست.



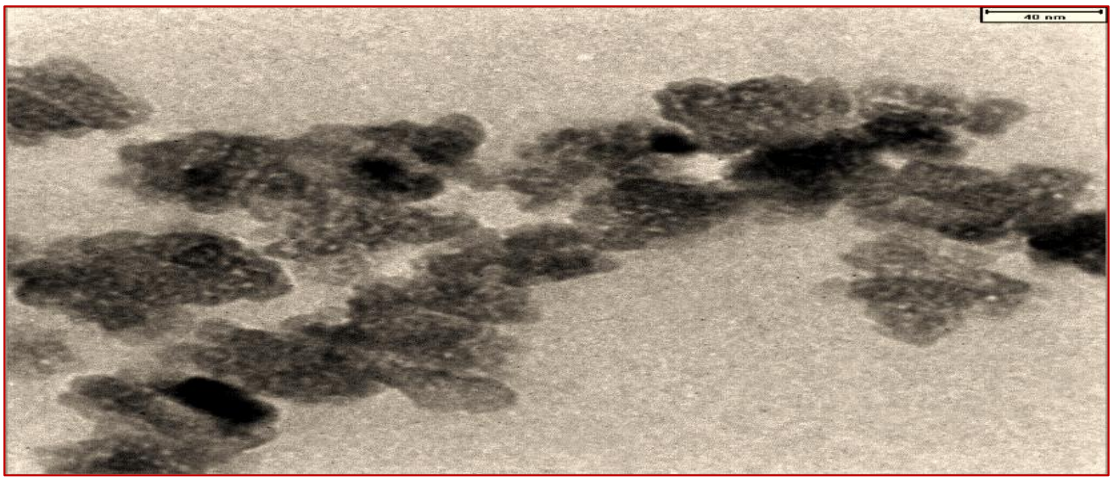
شکل ۱- تصویر حاصل از FESEM

نانومتراست. نتایج حاصل از تصویربرداری با استفاده از FESEM و TEM نشان داد که نانوذرات فوق دارای ظاهری کروی هستند (شکل ۱ و ۲).

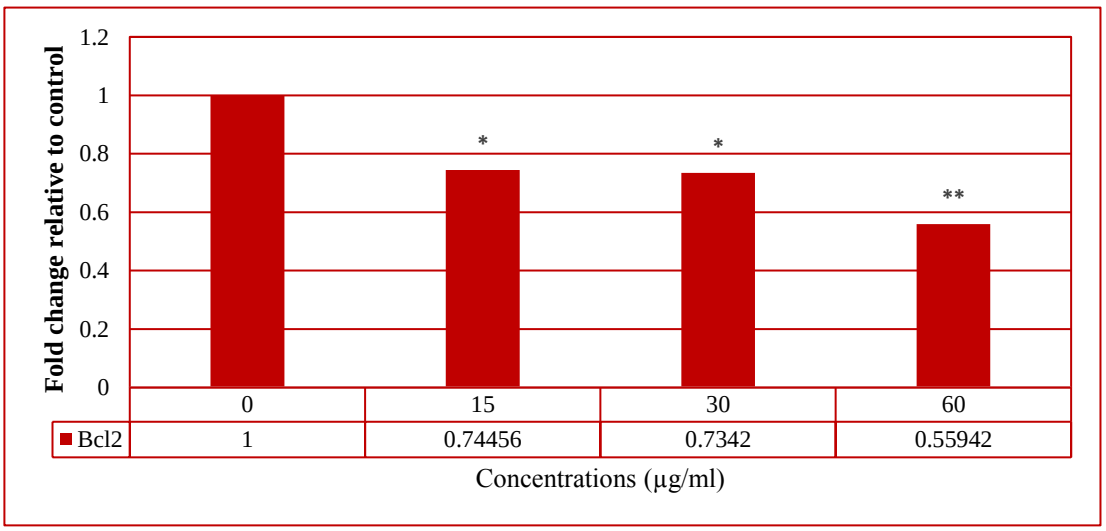
- **نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی Bcl-2 و Bax**

نتایج حاصل از Real-time PCR کاهش معنی‌دار بیان ژن Bcl-2 را نشان داد (نمودار ۲) به‌طوری‌که با افزایش غلظت نانوذره، بیان این ژن نیز کاهش داشت. میزان بیان ژن Bcl-2 در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره حدود ۵۰٪ نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داده است. تأثیر نانوذره اکسید روی سنتز شده بر القاء آپوپتوز با کاهش بیان ژن مهارکننده Bcl-2 اعمال می‌شود.

تغییرات بیان ژن Bax در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با نانوذره اکسیدروی نشان داد که بیان ژن Bax با افزایش غلظت نانوذره اکسیدروی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش‌یافته است (نمودار ۳). بیان ژن Bax در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره نسبت به گروه کنترل با افزایش چشمگیری همراه بود؛ بنابراین، تأثیر نانوذره اکسیدروی بر القاء آپوپتوز با افزایش بیان ژن پیش برنده آپوپتوز Bax اعمال می‌گردد.

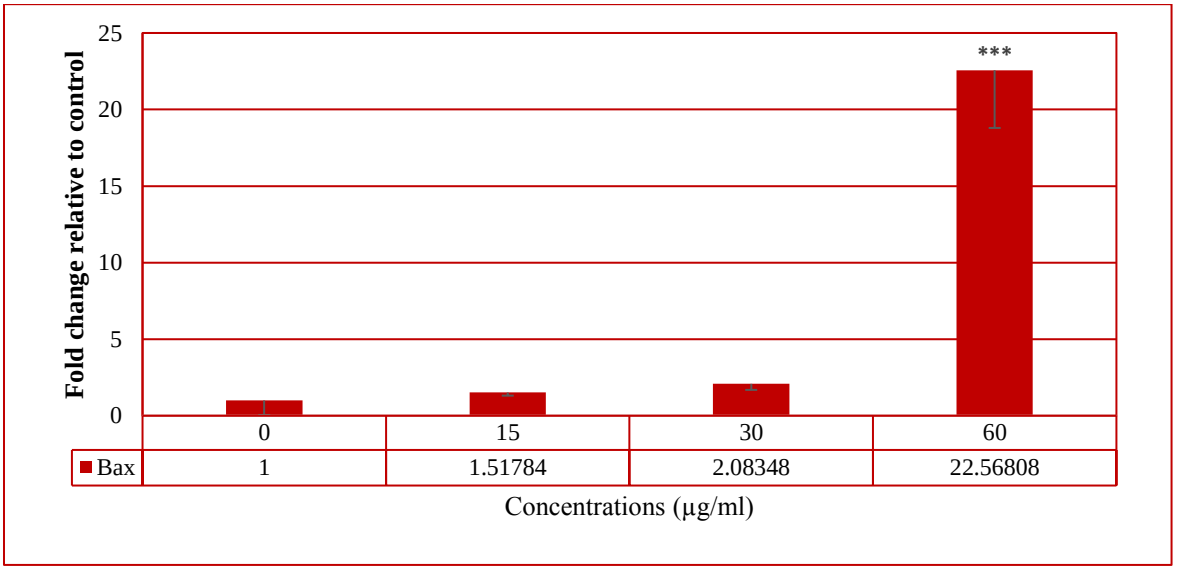


شکل ۲- تصویر حاصل از TEM (مقیاس ۴۰ نانومتر)



نمودار ۲- تغییرات بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با نانوذره اکسیدروی سنتز شده به روش سبز از گیاه *Amaranthus Cruentus* کاهش میزان بیان ژن Bcl-2 به دنبال افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی نشان‌دهنده القاء آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231است.

* معرف اختلاف معنادار در حد ۰/۰۵ بین گروه تیمار شده با نانوذره اکسیدروی و گروه کنترل و ** معرف اختلاف معنادار در حد ۰/۰۱ بین گروه تیمار شده با نانوذره اکسیدروی و گروه کنترل



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن Bax در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با نانوذره اکسیدروی سنتز شده به روش سبز از گیاه *Amaranthus Cruentus*. افزایش مشاهده‌شده در میزان بیان ژن Bax به دنبال افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی تأییدی بر القاء آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 است.

*** معرف اختلاف معنادار در حد ۰/۰۰۱ بین گروه تیمار شده با نانوذره اکسید روی و گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقش اصلی را در تفسیر بهتر نتایج دارند. پارامترهایی مانند شکل، سایز، ساختار کریستالی، درصد خلوص، تراکم و میزان پایداری ازجمله این ویژگی‌ها هستند (۲۶). سنتز نانوذرات با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی، باعث آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌شود. استفاده از حلال‌های سمی، هزینه‌های بالا و توزیع نامناسب اندازه ذرات، تولید موادی ناکارآمد را به دنبال دارد (۲۷). سنتز سبز نانوذرات فلزی در سال‌های اخیر به موضوع موردعلاقه‌ی علم نانو تبدیل‌شده است. توجه ویژه‌ای به بیوسنتز نانوذرات فلزی با استفاده از ارگانیسم‌ها وجود دارد. در میان این ارگانیسم‌ها، گیاهان بیشتر موردتوجه قرارگرفته‌اند زیرا این روش منجر به تولید مقدار زیادی نانوذره با پایداری بالا می‌شود (۲۸، ۲۹). مطالعات فراوانی بر روی نانوذرات اکسیدروی به‌منظور درمان سرطان‌ها صورت گرفته است. اکسیدروی با توجه به نوع سلول سبب مرگ سلولی می‌شود به این صورت که این نانوذرات بر روی سلول‌های سرطانی بیشترین تأثیر را دارند. بسیاری از سندرم‌های پاتولوژیک مانند نارسایی کبد و یا سکته قلبی و مغزی در اثر آپوپتوز بوده که منجر به از بین رفتن ناگهانی بافت و یا اندام می‌شود. علاوه براین عدم آپوپتوز در سلول‌های سرطانی باعث تشکیل تومور می‌گردد (۳۰، ۳۱). از مهم‌ترین ژن‌هایی که نقش اصلی را در ایجاد سرطان بر عهده دارند، ژن‌های آپوپتوتیک (Bak، Bad، Bcl-2، Bax، p53) هستند. این ژن‌ها آخرین سد دفاعی در مقابل سرطان بوده و باعث مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌شوند (۱۹). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که سلول‌های MDA تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی (۱۵، ۳۰، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث افزایش آپوپتوز می‌شوند. بدین‌صورت که با افزایش غلظت نانوذرات بیان ژن پیش برنده آپوپتوز Bax افزایش می‌یابد و همچنین بیان ژن مهارکننده آپوپتوز Bcl-2 کاهش می‌یابد لذا سلول به سمت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی پیش می‌رود. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی در سه نوع سلول سرطانی شامل سلول‌های سرطان کبدی انسان ($HepG_2$)، آدنوکارسینوما ریه انسانی (A549)، سلول‌های اپیتلیال شش‌های انسانی (BEAS-2B) و سلول‌های نرمال استروسیت و هپاتوسیت‌های رت پرداخته شد. نانوذرات اکسید‌روی با تکنیک ته‌نشینی سنتز و آزمون western blot و Real Time PCR برای تعیین سطوح mRNA و پروتئین p53، Bax، Bcl-2، کاسپاز-۳ انجام شد. نتایج Real Time PCR در سلول‌های $HepG_2$ تیمار شده با نانوذرات اکسیدروی در غلظت

۱۵µg/ml در ۲۴ ساعت نشان داد که بیان mRNA ژن سرکوب‌کننده تومور p53 و ژن پیش برنده آپوپتوز Bax افزایش‌یافته درحالی‌که ژن ضدآپوپتوزی Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل کاهش‌یافته است. نتایج حاصل از آزمون وسترن بلات نیز داده‌های Real Time PCR را تائید کرده است (۱۸). در تحقیقی نیز القاء آپوپتوز در رده سلولی سرطانی پستان (MCF-7) تیمار شده با نانوذرات نقره تولیدشده از عصاره گل *Achillea biebersteinii* موردبررسی قرار گرفت. القاء آپوپتوز طی رنگ‌آمیزی‌های اکریدین اورنج و DAPI مشهود بود. در این مطالعه بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز خانواده Bcl-2 کاهش یافت و بیان ژن پیش برنده آپوپتوز Bax به طرز چشمگیری افزایش پیدا کرد (۳۲). تأثیرات نانوذرات اکسیدروی در سلول‌های سرطان کبدی انسان $HepG_2$ و سرطان پستان MCF-7 موردبررسی قرار گرفت. نانوذرات اکسیدروی با اندازه‌ای حدود ۲±۱۳ نانومتر از طریق شیمیایی غیر پروتونه با استفاده از زینک استات دی هیدراته و P-Xylene سنتز شدند. سلول‌های HepG2 تیمار شده با غلظت ۱۰۰µg/M در پلیت‌های ۶ خانه‌ای برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند و در آخر کل RNA از طریق کیت استخراج RNA به دست آمد. غلظت RNA از طریق اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA با استفاده از پرایمر و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام شد. از پرایمرهای ویژه برای p53، Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ استفاده شد. برای نرمالیزه کردن سلول‌ها از ژن HPRT استفاده شدReal time PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین انجام شد. نتایج نشان داد که سطوح mRNA ژن سرکوب‌کننده تومور p53 ، ۱/۹ فولد بیشتر شده و بیان mRNA ژن پیش برنده آپوپتوز Bax افزایش می‌یابد. علاوه بر این بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 کاهش داشته و سطح mRNA کاسپاز-۳ ۱/۸ فولد نسبت به سلول‌های کنترل افزایش‌یافته بود (۳۳). در پژوهشی اثر دوکسوروبیسین کونژوگه با نانوذرات اکسیدروی (DOX- ZnONP) سنتز شده به روش سبز از عصاره میوه Borassus flabellifer بر سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و سرطان کلون HT-29 بررسی شد. القاء آپوپتوز از طریق رنگ‌آمیزی Hoechst 33258 مشخص شد. Hoechst 33258 یک رنگ فلورسنت آبی است که سمیت سلولی اندکی روی سلول‌ها دارد و به وضعیت کروماتین حساس بوده و قادر است تغییرات هسته‌ای را در سلول‌های آپوپتوتیک نشان دهد. در انتها نتایج از طریق میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. برای تعیین بیان ژن ضدآپوپتوزی و ژن‌های آپوپتوزی آزمون وسترن بلات انجام شد که نتایج نشان داد سطح پروتئین Bax به‌طور چشمگیری افزایش‌یافته درحالی‌که بیان Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده با اکسیدروی، دوکسوروبیسین و کونژوگه‌های اکسیدروی دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های نرمال کاهش‌یافته است و همچنین DOX- ZnONPs سمیت سلولی پایینی در سلول‌های نرمال ایجاد می‌کند (۳۴). Gopinath و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که افزایش ژن Bax توسط پروتئین p53 تنظیم می‌شود. افزایش بیان ژن Bax در این مطالعه مشاهده شد و می‌توان ادعا کرد که پروتئین p53 باعث تنظیم Bax در سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات اکسیدروی شده است (۳۵). همچنین در مطالعه‌ای که به بررسی مکانیسم مولکولی سمیت القاء شده توسط نانوذرات ZnO بر روی سلول‌های سرطان کبدی انسان ($HepG_2$) پرداخته شد، مشاهده گردید که میزان mRNA ژن‌های آپوپتوزی Bax، کاسپاز ۳ و ژن سرکوب‌کننده تومور p53 افزایش یافت درحالی‌که بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات اکسیدروی کاهش داشته است (۱۸). نتایج حاصل از تحقیقات ذکرشده مشاهدات مرتبط با القاء آپوپتوز توسط نانوذرات اکسیدروی سنتز شده را اثبات می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق ضمن هم‌راستایی با تحقیقات ذکرشده تغییرات بیان ژن Bax و Bcl-2 را با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی نشان داد به‌گونه‌ای که میزان بیان ژن مهارکننده آپوپتوزی Bcl-2 کاهش و بیان ژن پیش برنده آپوپتوزی Bax افزایش داشت و تأییدی بر پیشروی سلول به سمت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی بود. با در نظر گرفتن اهمیت یافتن شیوه‌های نوین درمان سرطان با عوارض کمتر و بازدهی بیشتر به‌ویژه درمان سرطان سینه که امروزه به‌عنوان یک معضل تهدیدکننده سلامتی در جهان و ایران مطرح است، می‌توان پس از آزمایش‌های گسترده‌تر و مطالعات تکمیلی، نانوذرات اکسیدروی به کار گرفته‌شده را به‌عنوان کاندیدایی جهت درمان سرطان درزمینه‌ی پزشکی و داروسازی مطرح کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم مهسا بهجتی مقدم است. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از کارکنان گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد کمال تشکر و قدردانی را دارند. در کلیه مراحل آزمایش معیارهای

اخلاقی پژوهش رعایت شده و کد اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC. 1397.073 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی مشهد اخذشده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Saunders FR, Wallace HM. On the natural chemoprevention of cancer. Plant Physiology and Biochemistry. 2010;48(7):621-6.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. CA: a cancer journal for clinicians. Cancer stat. 2016;66:7-30.
3. McGuire A, Brown JA, Malone C, McLaughlin R, Kerin MJ. Effects of age on the detection and management of breast cancer. Cancers. 2015;7(2):908-29.
4. Mousavi SM, Harirchi I, Ebrahimi M, Mohagheghi MA, Montazeri A, Jarrahi AM, et al. Screening for breast cancer in Iran: a challenge for health policy makers. The breast journal. 2008;14(6):605-6.
5. Atalay C, Gurhan ID, Irkkan C, Gunduz U. Multidrug resistance in locally advanced breast cancer. Tumor Biology. 2006;27(6):309-18.
6. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. Nature Reviews Cancer. 2002;2(1):48.
7. Prabhu V, Uzzaman S, Grace VMB, Guruvayoorappan C. Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy: the giant rats tail. J Cancer Ther. 2011;2(3):325-34.
8. Olov N, Bagheri-Khoulenjani S, Mirzadeh H. Combinational drug delivery using nanocarriers for breast cancer treatments: A review. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2018;106(8):2272-83.
9. Szymanski MS, Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. Journal of immunological methods. 2013;387(1-2):262-9.
10. Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013;105:342-52.
11. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS nano. 2009;3(1):16-20.
12. Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development–a food industry perspective. Trends in Food Science & Technology. 2006;17(10):547-56.
13. Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Hosseini SD, Salabat A. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin-induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. Iranian journal of reproductive medicine. 2013;11(5):355.
14. Guo D, Wu C, Jiang H, Li Q, Wang X, Chen B. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2008;93(3):119-26.
15. Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang J, Wingett DG. The influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction. Nanoscale research letters. 2009;4(12):1409.
16. Zhang Y, Chen W, Wang S, Liu Y, Pope C. Phototoxicity of zinc oxide nanoparticle conjugatesin human ovarian cancer NIH: OVCAR-3 cells. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2008;4(4):432-8.
17. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. Chemosphere. 2008;71(7):1308-16.
18. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. International journal of nanomedicine. 2012;7:845.
19. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2011;711(1-2):167-73.
20. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. Food Research International. 2011;44(1):217-24.
21. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS letters. 2000;466(1):6-10.
22. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). Apoptosis. 2012;17(8):852-70.
23. Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. Nature cell biology. 2003;5(12):1041.
24. Melka M, Rings F, Hölker M, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, et al. Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of in vitro-produced bovine pre-implantation embryos. Reproduction in domestic animals. 2010;45(5):915-21.
25. Loureiro B, Brad AM, Hansen PJ. Heat shock and tumor necrosis factor-α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. Reproduction. 2007;133(6):1129-37.

26. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. science. 2006;311(5761):622-7.
27. Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International nano letters. 2012;2(1):32.
28. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloevera plant extract. Biotechnology progress. 2006;22(2):577-83.
29. Korbekandi H, Iravani S, Abbasi S. Production of nanoparticles using organisms. Critical reviews in biotechnology. 2009;29(4):279-306.
30. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. Journal of Investigative Surgery. 2005;18(6):335-50.
31. Zörnig M, Hueber A-O, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. 2001;1551(2):F1-F37.
32. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver nanoparticles biosynthesized using Achillea biebersteinii flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. Molecules. 2015;20(2):2693-706.
33. Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, et al. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2014;117:267-76.
34. Vimala K, Sundarraj S, Paulpandi M, Vengatesan S, Kannan S. Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bcl-2 expression in breast and colon carcinoma. Process biochemistry. 2014;49(1):160-72.
35. Gopinath P, Gogoi SK, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;77(2):240-5.

Original Article

Evaluation of the ZnO Nanoparticles Biosynthesized by Amaranthus Ruentus on the Expression of Apoptotic Genes (Bax and Bcl-2) in Breast Cancer Cells (MDA-MB-231)

Behjati Moghaddam M, Nemati A*, Ardalan P

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 24 Des 2018 Accepted: 28 May 2019

Abstract

Background & Objective: Cancer is a kind of genetic disease caused by DNA mutation which makes disorder in normal pattern of division and differentiation of cells and eventually formation of a neoplasm. Breast cancer is the most common malignancy and the second leading cause of death in women aged 35-55 years. Surgery, radiotherapy and chemotherapy are the common methods of controlling cancer, but the side effects and lack of positive results especially in metastatic tumors has led us discover new treatments. Nowadays, nanotechnology has helped us to find and develop new therapies. The purpose of this study was to characterize the antioxidant and apoptotic properties of zinc oxide nanoparticles biosynthesized by *Amaranthus cruentus* plant on breast cancer cells (MDA-MB-231).

Materials & Methods: The Zinc oxide nanoparticles were green-synthesized by the extract of *Amaranthus cruentus* leaves. Size and morphological characteristics of ZnO NPs determined by DLS tests, FESEM and TEM. To investigate the effect of ZnO nanoparticles on induction apoptosis, cancer cells were seeded in T25 flasks and treated with different concentrations of nanoparticles (15, 30 and 60 µg/ml). After 48 hours, gene expression changes of Bax and Bcl-2 was investigated by Real time PCR technique. SPSS software and one-way ANOVA test were used to analyze the data. At the end, comparison of means did by least significant differences (LSD) method.

Results: The DLS test showed the average size of the synthesized ZnO NPs is about 30 to 38 nm. The results of gene expression by Real time PCR technique showed that ZnO nanoparticles reduced anti-apoptosis gene expression Bcl-2 and increases pro-apoptotic gene expression in MDA cell line.

Conclusion: In general, the results obtained from this study can claim that ZnO nanoparticles have anti-cancer properties and can be introduced after further studies as candidates for cancer treatment in the field of medicine and pharmacy.

Keywords: Zinc oxide ،Nanoparticle, Gene expression, Apoptosis, Breast Cancer

***Corresponding Author: Nemati Ali,** Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Email: neamati.ali@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-3571-197X