

بررسی بیان ژن‌های گلوکاتینون پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز بر روی رده‌ی سلولی سرطان پستان (MCF-7) تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی

ماهرخ افشاری.M.Sc، سید عطا اله سادات شانديز *Ph.D، سید محمد مهدی حمدي.Ph.D

- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۳

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق، ارزیابی اثرات ضدسرطانی نانو ذرات اکسید روی با کمک ارزیابی بیان ژن‌های گلوکاتینون پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز در رده سلولی سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه رده‌های سلولی سرطانی پستان (MCF-7) و نرمال (HEK293) تحت تیمار نانو ذرات اکسید روی تحت غلظت‌های مختلف طی زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی نانو ذرات بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نرمال با کمک روش رنگ سنجی (MTT(3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) ارزیابی شد. بیان کمی ژن‌ها نسبت به ژن کنترل داخلی *GAPDH* با کمک تکنیک *real time PCR* بررسی شد.

نتایج: نتایج تست MTT نشان داد که نانو ذرات اکسید روی میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال به طور معنی داری کاهش می‌دهد. همچنین، بیان ژن‌های گلوکاتینون پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز بعد از تیمار با نانو ذرات به ترتیب به میزان $2/13 \pm 0/70$ ($p < 0/100$) و $1/22 \pm 0/05$ ($p < 0/50$) برابر نسبت به ژن کنترل داخلی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: داده‌های این تحقیق نشان داد افزایش بیان ژن‌های گلوکاتینون پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز به عنوان عوامل کلیدی سیستم گلوکاتینون علیه رده‌ی سلولی سرطانی پستان MCF-7 در حذف گونه‌های فعال اکسیژن با تیمار نانو ذرات اکسید روی افزایش می‌یابد. **واژگان کلیدی:** نانو ذرات اکسید روی، سرطان پستان، گلوکاتینون پراکسیداز، گلوکاتینون ردوکتاز

مقدمه

سرطان پستان یکی از فراوان‌ترین سرطان‌های بدخیم غیرپوستی در میان زنان تشخیص داده شده است. براساس گزارشات در سال ۲۰۱۸، ۱۸/۱ میلیون مورد جدید و ۹/۶ میلیون مرگ مرتبط با سرطان پستان مشاهده شده است که انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۰، تقریباً تا ۲۶ میلیون مورد جدید ابتلا به این بیماری افزایش پیدا کند (۱).

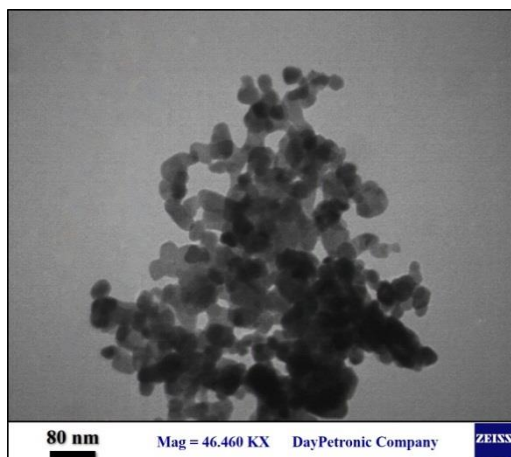
جراحی، یک راه پیش‌گیری برای پیشرفت سرطان پستان در زنان است. در بیمارانی که تومور پستان شناسایی می‌شود، از استراتژی‌های مختلفی مانند درمان هدفمند، هورمون درمانی، پرتودرمانی، جراحی و شیمی درمانی استفاده می‌شود. عواض جانبی نامطلوب درمان سرطان پستان یکی از فاکتورهای موثر در یافتن روش‌های جایگزین است (۲). با توجه به بالا بودن میزان زنان مبتلا به سرطان پستان و افزایش نرخ ابتلا به این سرطان در دهه اخیر، اهمیت مطالعه پیرامون این سرطان مشخص می‌شد. علاوه بر این روش درمان و داروهای موثر بر سرطان پستان نیز اهمیت ویژه‌ای دارد چرا که بسیاری از بیماران پس از درمان با یک دارو یا روش خاص دچار مقاومت به آن شده و بیماری عود می‌نماید (۳).

در سال‌های اخیر نانوتکنولوژی به‌عنوان یکی از اهداف بزرگ در درمان سرطان‌ها مطرح شده است. از مزایای آن در طراحی دارو می‌توان به افزایش حساسیت به رادیودرمانی، محافظت از آثار سو رادیودرمانی و افزایش سلول‌کشی تومورها می‌توان اشاره کرد. در این میان نانو ذرات اکسید فلزات توجه زیادی را برای درمان سرطان به‌خود اختصاص داده است. اکسید طبیعی فلزات در مقادیر بسیار فراوانی در طبیعت موجودند و تولید آن‌ها هزینه زیادی ندارد، لذا پژوهش در این زمینه را به‌سمت تولید فرآورده‌های دارویی مقرون به‌صرفه پیش می‌برد و فرآوری و سنتز این نانو ذرات جز کم هزینه‌ترین دستورالعمل‌های سنتز می‌تواند باشد (۴،۵). نانو ذرات اکسید روی در سال‌های اخیر به‌دلیل اثرات آن در درمان سرطان مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. این ترکیب به‌واسطه برداشت بیشتر یون‌های روی توسط سلول‌های سرطانی، اثرات درمانی خود را اعمال می‌کند (۶).

سیستم گلوتاتیون در حفاظت بدن از استرس‌های اکسیداتیو نقش حیاتی دارد. این سیستم، پراکسیدهای هیدروژن حاصل از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر روی یون سوپراکسید که یک گونه اکسیژن واکنش پذیر (ROS) خطرناک است را به آب تبدیل می‌کند. گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز آنزیم‌هایی هستند که در این چرخه نقش حیاتی داشته و بیان ژن‌های آن‌ها در صورت بالارفتن ROSها و قرار گرفتن بدن در حالت استرس اکسیداتیو بالا می‌رود. استرس اکسیداتیو القا شده با گونه‌های فعال اکسیژن باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی و از بین رفتن آن‌ها می‌شود (۷و۸). در این تحقیق با توجه به احتمال عوارض نامطلوب نانو اکسید روی بر روی سلول‌های غیرسرطانی و نیز ضروری بودن تعیین عامل القا کننده آپوپتوزیس ناشی از نانو اکسید روی، به بررسی میزان بیان ژن‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در سطح mRNA که شاخص‌هایی از بالا رفتن ROS و استرس اکسیداتیو بوده و القا کننده آپوپتوزیس میباشد، پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه نانو ذرات اکسید روی: در این تحقیق نانو ذرات اکسید روی (ZnONPs) خریداری شده از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان با اندازه بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر و ۹۹ درصد خلوص از شرکت آمریکایی US Research Nanomaterials بود. ارزیابی ریخت شناسی و اندازه نانو ذرات با کمک میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM) مدل Zeiss-EM10C-100 KV ساخت کشور آلمان مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: میکروگراف میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM) از نانو ذرات اکسید روی استفاده شده در این پژوهش

کشت سلولی: در این تحقیق از دو رده‌ی سلولی سرطان پستان MCF-7 و رده‌ی سلولی نرمال HEK293 استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت RPMI₁₆₄₀ مکمل شده با ۱۰ درصد سرم FBS برای کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت انکوباتور تیمار شد. درصد سلول‌های زنده با رنگ آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین شد. هنگامی که تعداد سلول‌ها در داخل فلاسک به تراکم در حدود ۸۰ درصد رسید، پاساژ داده شدند.

آزمون MTT: روش رنگ سنجی MTT یکی از آزمون‌هایی است که براساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. ارزیابی زیستایی سلول‌های سرطانی و نرمال مورد بررسی قرار گرفت. بعد از کشت سلولی، سوسپانسیون سلولی (۱۰^۴ سلول در هر میلی‌لیتر) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کاشته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس غلظت‌های مختلف تهیه شده از نانو ذرات اکسید روی به چاهک‌های حاوی سلول‌ها افزوده شد. از محیط کشت حاوی یک درصد DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) بدون تیمار نانو به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. چاهک‌های حاوی سلول و نانو ذرات به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما آلدریج، آلمان) (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد و برای حل کردن رسوب بنفش MTT، پلیت کشت به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس توسط قرائت گراالیزا جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۹). درصد میزان زنده‌مانی سلول‌ها نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان زنده مانی (\%)} = \left(\frac{OD_T}{OD_C} \right) \times 100$$

OD_T: جذب نوری سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی؛

OD_C: جذب نوری سلول‌های تیمار شاهد.

غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به‌عنوان IC₅₀ در نظر گرفته شد.

ارزیابی بیان ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز با کمک تکنیک Real time PCR: استخراج RNA کل سلولی با کشت تعداد ۱×۱۰^۶ سلول انجام گرفت. پس از تیمار با نانو ذرات اکسید روی، پلیت‌ها در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. استخراج RNA با کیفیت و کمیت مناسب از سلول‌ها با کمک کیت

استخراج RNA شرکت ترنس، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت تمامی RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه بایوفتومتر کمپانی شرکت اپندورف با طول موج A260/A230 مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور سنتز cDNA، از مولکول‌های RNA استخراج شده با کمک دستورالعمل کیت شرکت فرمنتاز Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis محصول کشور آمریکا استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی، ۵ میکرولیتر بافر واکنش 5x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو (dT)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آنزیم M-MulV، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، و آب عاری از آنزیم DNase (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) به‌هر لوله اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بلافاصله در یخ گذاشته شد. لوله‌ها به‌مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جهت طراحی پرایمرهای مورد استفاده از پایگاه اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov استفاده شد (جدول ۱). توالی پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار BLAST در توالی ژنوم انسان جستجو شد تا از ویژگی توالی و یکتا بودن محل اتصال آن‌ها اطمینان حاصل شود. در این پژوهش از ژن گلیسرآلدئیدفسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده برای این پژوهش

پرایمرها	ژن‌ها
۵' AGAAGTGCAGGTTGAACGGT-۳' F:	گلوکوتایون پراکسیداز
۵' CGATGTCAATGGTCTGGAAGC-۳' R:	
۵' CCTTCTTTGGTGGCAATTCTATCT-۳' F:	گلوکوتایون ردوکتاز
۵' CCCCTTCAGAGCCCATAGTCA-۳' R:	
۵' AAGGGCCCTGACAACTCTTT-۳' F:	GAPDH
۵' CTCCCCTCTCAAGGGGTCT-۳' R:	

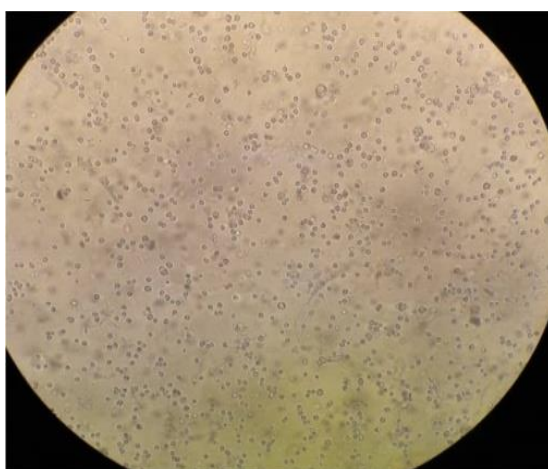
روش کمیت‌سنجی ژن‌ها با کمک دستگاه RealTime PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت. محلول واکنش شامل ۵ میکرولیتر cDNA، ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR حاوی سایبرگرین (SYBER-Green PCR Master Mix)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر جلویی و برگشتی و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه زمانی-گرمایی دستگاه برای تکثیر ژن‌ها شامل بازشدن اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه طی تکرار ۴۰ چرخه، اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و طولیل شدن رشته الگو در مدت زمان ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، اختلاف چرخه آستانه (Ct) سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با نانو ذرات به‌دست آمد. همچنین با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

تحلیل آماری

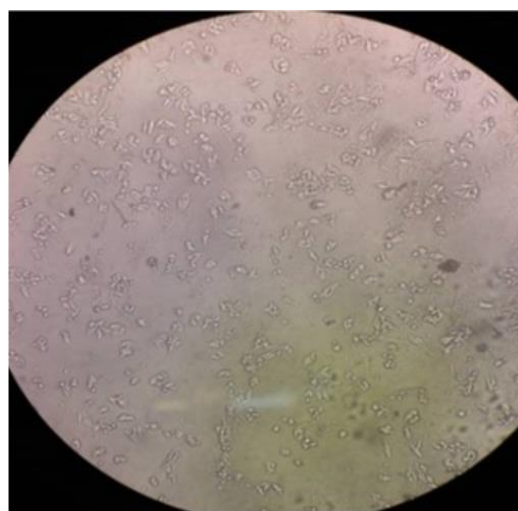
داده‌های این تحقیق با کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آنالیز آماری داده‌ها از آزمون T استفاده شد و $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بررسی ریخت‌شناسی اثر نانو ذرات اکسید روی با کمک میکروسکوپ در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ریخت‌شناسی حاصل از اثر نانو ذرات بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 نشان داد که تعداد و اندازه سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است، که نشان دهنده اثرات توکسیک نانو ذرات بود. در شکل ۲ نشان داده شده که با اثر نانو ذرات، علاوه بر کاهش تعداد سلول‌ها، تغییراتی مانند کاهش سیتوپلاسم سلولی نیز مشاهده می‌شود.



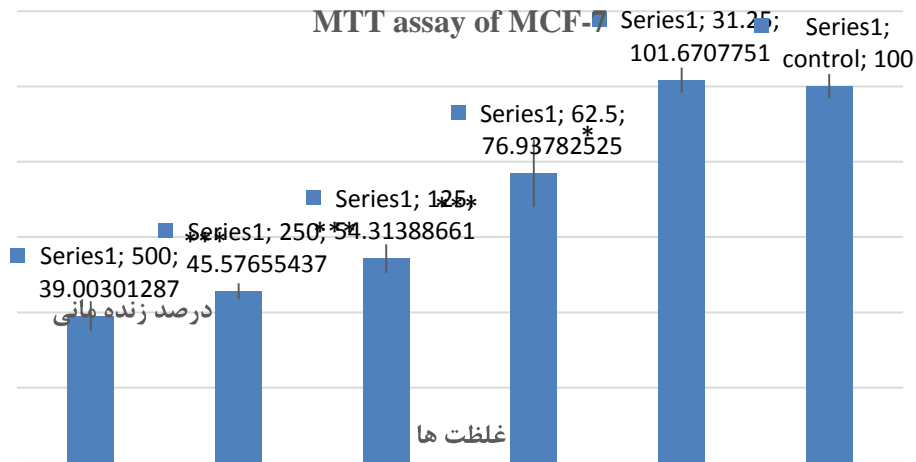
(الف)



(ب)

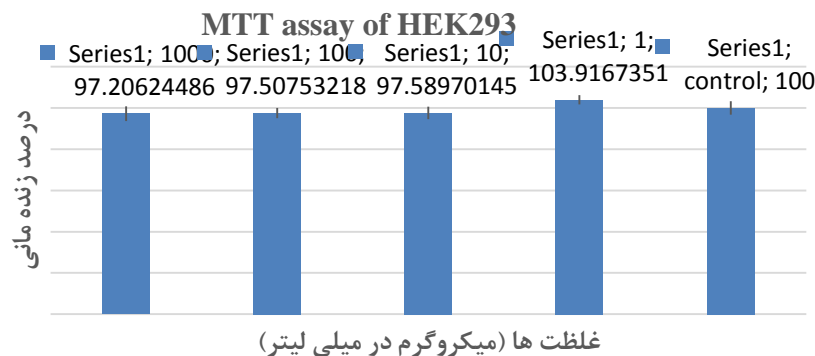
شکل ۲: بررسی ریخت‌شناسی اعمال اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی با کمک میکروسکوپ: سلول‌های رده‌ی سرطان پستان MCF-7 قبل از تیمار (الف) و بعد از تیمار ۲۴ ساعت با نانو ذرات اکسید روی (ب).

به منظور بررسی اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی ابتدا سلول ها کشت داده شدند و با غلظت های مختلف از نانو ذرات تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان زنده مانی سلول ها با کمک آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نمودار نتایج سمیت به دست آمده برای رده سلولی MCF-7 حاکی از آن است که نانو ذرات اکسید روی پس از بازه زمانی ۲۴ ساعت در غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثرکاهنده ای بر بقای سلولی در رده سلولی MCF-7 دارند.



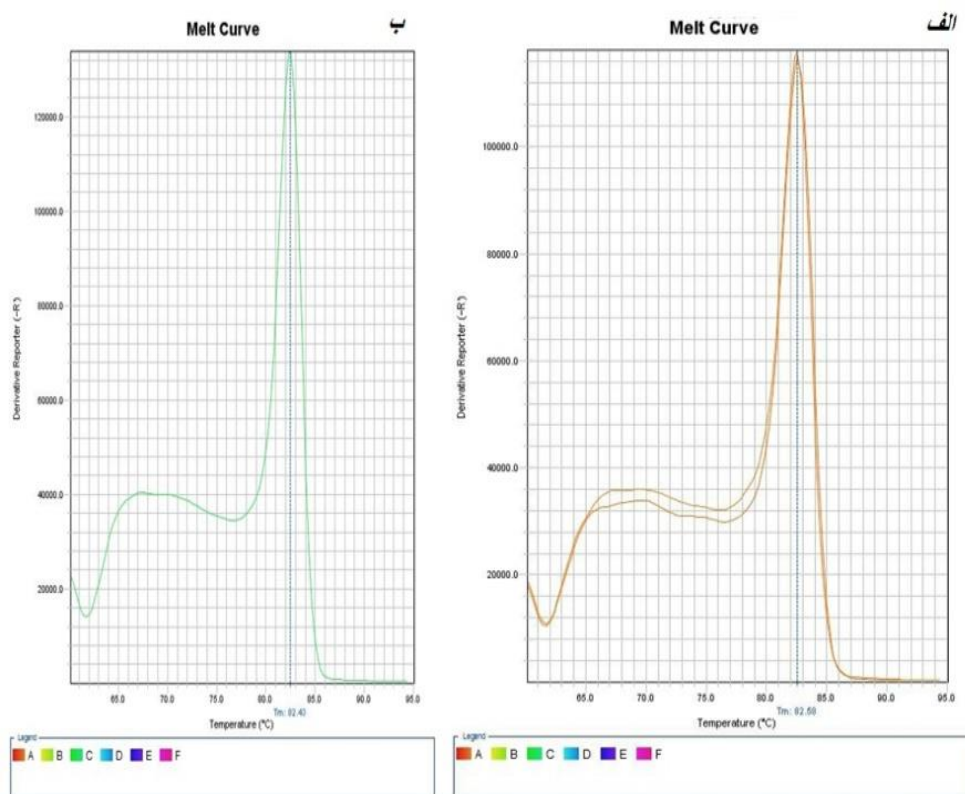
نمودار ۱: درصد زنده مانی سلول ها در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است ($p < 0.05$). (**, $n=3, p < 0.001$).

به طوری که غلظت ۵۰۰ میکروگرم از نانو ذرات باعث مرگ بیش از ۶۰ درصد از سلول های MCF-7 شد و از لحاظ آماری معنی دار بوده است ($p < 0.001$) این در حالی بود که در تمامی غلظت های نانو ذرات بر روی رده سلولی نرمال HEK293 نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار ۲: درصد زنده مانی سلول ها در رده سلولی نرمال HEK293. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است.

بررسی میزان بقا سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که نانو ذرات اکسید روی رشد سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. به منظور تایید این که آیا قطعات ژنی به صورت اختصاصی، بدون آلودگی و دایمر پرایمر تکثیر شده است، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. طبق نمودار ۳ وجود تنها یک پیک برای ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز در دمای ذوب ویژه آن‌ها، تاییدکننده اختصاصی بودن محصول تکثیر واکنش می‌باشد.



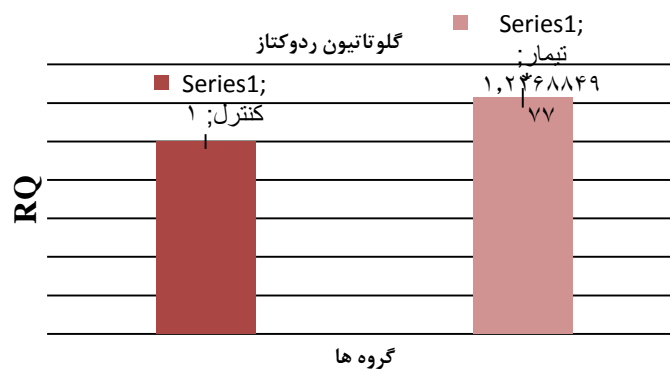
نمودار ۳: منحنی ذوب ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز. وجود یک نقطه حداکثری که عدم اتصال پرایمر دایمر و خلوص بالای واکنش‌ها را تایید می‌کند. الگوی منحنی ذوب ژن گلوکوتایون پراکسیداز (نمودار راست) در دمای ۸۲/۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همچنین الگوی منحنی ذوب ژن گلوکوتایون ردوکتاز (نمودار چپ) در دمای ۸۲/۴ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. محور افقی دما و محور عمودی مشتق سیگنال فلورسانس را نشان می‌دهد.

تغییر در بیان ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی با استفاده از روش real time PCR بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب نسبت بیان ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز به ژن کنترل داخلی در رده سلولی به ترتیب به میزان $2/13 \pm 0/07$ ($p < 0/001$) و $1/22 \pm 0/05$ ($p < 0/05$) برابر افزایش یافت که نشان دهنده تاثیر مثبت نانو ذرات در افزایش بیان ژن‌ها می‌باشد.

(الف)



(ب)



نمودار ۴: میزان بیان ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز (الف) و گلوکوتایون ردوکتاز (ب) نسبت به گروه کنترل.

بحث

امروزه، شیمی درمانی یکی از بیش‌ترین روش‌های درمان است که برای جلوگیری از پیشرفت سرطان‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، که دارای اثرات جانبی تهدید کننده برای بیمار بوده و از طرفی منجر به مقاومت دارویی، شکست درمان و اثر بخشی کم بر گسترش سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو می‌شود (۱۰). از طرفی، اثرات ضدسرطانی ترکیبات نانو ذرات اکسید روی در سال‌های اخیر به دلیل اثرات آن در درمان مشخص شده است.

نتایج حاصل از آزمون MTT سلول‌های رده‌ی MCF-7 این تحقیق نشان داد که نانو ذرات اکسید روی علیه این سلول‌ها سمی و کشنده بوده و هر چقدر که غلظت این ترکیب بیشتر می‌شود، میزان بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد. در مقابل این ترکیب برای سلول‌های نرمال، سمی و کشنده نیست. این تفاوت سمیت در سلول‌های سرطانی و نرمال نشان دهنده‌ی تفاوت نفوذ نانو اکسید روی توسط این سلول‌هاست. این موضوع در تحقیقات مشابه مورد اشاره و حتی اثبات شده است. برای مثال می‌توان به تحقیق پاتل و همکاران (۱۱) اشاره نمود. آن‌ها میزان برداشت نانو ذرات اکسید روی توسط سلول‌ها و نیز در مراحل

مختلف چرخه سلولی بررسی کردند و دریافتند برداشت یون‌های نانو ذرات اکسید روی توسط سلول‌های سرطانی به‌طور چشمگیری بیشتر از سلول‌های نرمال است.

طی تحقیقی که اختر و همکاران (۶) انجام دادند مشخص شد که نانو ذرات اکسید روی باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کبد انسانی HepG2 می‌شود. آن‌ها نشان دادند اثر نانو ذرات اکسید روی بر روی افزایش بیان ژن‌های *P53* و *bax* می‌شود. همچنین نشان دادند که ROS منجر به این تاثیرات می‌شود.

هاو و همکاران (۱۲) بر روی اثرات تیمار سلول‌های ماهی کپور با نانو ذرات اکسید روی انجام دادند و نشان دادند بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز با افزایش غلظت نانو ذرات افزایش می‌یابد. این تاثیرات متعاقب تولید ROS بوده که در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث آپوپتوزیس و مرگ سلول شوند. همچنین شارما و همکاران (۷) عنوان کردند که نانو ذرات روی باعث تولید ROS و بالا رفتن نسبت *Bax* به *Bcl-2* و افزایش آپوپتوزیس می‌شود.

پژوهش‌های مختلفی در رابطه با ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانتی نانو ذرات فلزی ارائه شده است. در پژوهشی که توسط دانتهال و همکاران (۱۳) انجام گرفت، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی نانو ذرات نقره سنتز شده با روش زیستی از طریق تست DPPH و ABTS مورد ارزیابی قرار گرفته و نشان دادند که در غلظت‌های ۷/۱۲ و ۱۶/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد شدند.

خاصیت آنتی‌اکسیدانتی نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با روش زیستی با کمک ارزیابی جذب رادیکال‌های DPPH و آنیون سوپراکسید که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای مهار ۵۰ درصدی رادیکال‌های آزاد بود (۱۴).

تحقیقی توسط موتورامان و همکاران (۱۵) بر روی اثرات ضدسرطانی نانو ذرات روی سنتز شده با روش شیمیایی پیرولیز بود. آن‌ها نشان دادند نانو ذرات اکسید روی منجر به افزایش ROS، پراکسیداسیون لیپیدها، کاهش گلوکاتایون، بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و همچنین فعالیت آنزیم‌های آن در سلول‌ها می‌شود.

همچنین طی تحقیقی که توسط پاندورانگان و همکاران (۱۶) پیرامون اثرات نانو ذرات اکسید روی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و بیان mRNA در سلول‌های C2C12 و 3T3-L1 انجام گرفت و مشخص شد که تیمار این سلول‌ها با نانو اکسید روی باعث کاهش سطح گلوکاتایون، افزایش ROS، پراکسیداسیون لیپیدها و مرگ تقریباً تمامی سلول‌ها می‌شود. مطالعات نشان داده است که تیمار نانو اکسید روی باعث ایجاد ROS می‌شود و این ROSها هستند که با تخریب DNA و سایر ترکیبات حیاتی سلول باعث القا آپوپتوز در سلول می‌شود. ROSهای حاصل از اثرات نانو اکسید روی با کاهش پتانسیل بار غشا اندامک میتوکندری و افزایش نسبت *Bax* به *Bcl-2* فرایند مرگ سلولی را تشدید می‌کنند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن با روش‌های مختلفی از جمله فعال‌سازی آبشار کاسپازی و اسفنگومیلیناز باعث خروج سیتوکروم C از غشا داخلی میتوکندری و فعال‌سازی مسیر داخلی آپوپتوزیس می‌شوند (۱۷).

در پژوهش حاضر، اثرات سمیت غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید روی بر علیه رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و سلول نرمال HEK293 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی زنده ماندن رده سلولی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تیمار نانو ذرات اکسید روی باعث کاهش معنی‌دار زنده مانی سلول‌های سرطانی تحت تاثیر نانو ذرات شدند. در حالی که در سلول‌های نرمال تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

مطابق بیشتر پژوهش‌ها، نانو ذرات اکسید فلزی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته شده است. نتایج این یافته نیز توانست همین عمل را نشان دهد. در این پژوهش علاوه بر سمیت نانو ذرات اکسید روی، ارزیابی بیان ژن‌های گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در رده سلولی MCF-7 انجام گرفت که به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. فعالیت

سیستم گلوکوتایون با افزایش میزان ROS افزایش می‌یابد تا با حذف آن‌ها از آسیب بیشتر به سلول‌ها جلوگیری کند. بنابراین، افزایش فعالیت سیستم گلوکوتایون وابسته به افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز به‌عنوان مارکری برای افزایش تولید ROS می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثرات ضدتوموری نانو ذرات اکسید روی در افزایش بیان ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 نشان داده شد. این افزایش به‌عنوان مارکری برای افزایش تولید ROS و متعاقب آن آپوپتوزیس می‌باشد. بنابراین، رویکرد بالقوه دارویی نانو ذرات نیازمند توجه بیشتر در تحقیقات مدل‌های حیوانی و داروسازی می‌باشد که می‌تواند جهت کمک درمانی در زمینه‌های مختلف درمانی از جمله سرطان باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه نویسنده اول است. بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌شد.

منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
2. Mitra S, Dash R. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018: 8324696.
3. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009; 86(3): 215-23.
4. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997; 57(15): 3071-8.
5. Djurišić AB, Leung YH, Ng A, Xu XY, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small.* 2015; 11(1): 26-44.
6. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Majeed Khan MA, et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomed.* 2012; 7: 845-857.
7. 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): 852-870.
8. Nelson DL, Michael M Cox. *Lehninger principles of biochemistry*, 2020, Macmillan. ISBN-13: 978-1429234146.
9. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, et al. Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesised *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated AgNPs. *IET Nanobiotechnol.* 2017; 11(4): 485-492.
10. Shiovitz S, Korde L. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 2015; 26(7): 1291-9.
11. Patel P, Kansara K, Senapati VA, Shanker R, et al. Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Mutagenesis.* 2016; 31(4): 481-90.

12. Hao L, Chen L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012; 80: 103-110.
13. Dauthal P, Mukhopadhyay M. In-vitro free radical scavenging activity of biosynthesized gold and silver nanoparticles using *Prunus armeniaca* (apricot) fruit extract. *J Nanopart Res*. 2013;15(1):1366.
14. Singh BN, Rawat AK, Khan W, Naqvi AH, et al. Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. *PLoS One*. 2014;9(9):e106937.
15. Muthuraman PK, Ramkumar, Kim DH. Analysis of dose-dependent effect of zinc oxide nanoparticles on the oxidative stress and antioxidant enzyme activity in adipocytes. *Appl biochem biotechnol*. 2014; 174(8): 2851-2863.
16. Pandurangan M, Veerappan M, Kim DH. Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and mRNA expression in the cocultured C2C12 and 3T3-L1 cells. *ApplBiochemBiotechnol*. 2015; 175(3): 1270-1280.
17. Trachootham DJ, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery* 2009;8(7): 579-91.

Evaluation of *Glutation Peroxidase and Glutation Reductase* gene expression against breast cancer cell line (MCF-7) treated with the Zinc Oxide Nanoparticles

Afshari M, M.Sc., Sadat Shandiz SA, Ph.D. *, Hamdi SMM, Ph.D.

-Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Received: 23 May. 2020

Accepted: 5 Jul. 2020

Abstract

Aim: The aim of the current work was to investigate the anticancer activities of Zinc Oxide nanoparticles (ZnONPs) through modulation of *Glutation peroxidase* and *Glutation reductase* gene expression in breast cancer cells.

Material and Methods: In this investigation, the breast cancer MCF-7 and normal HEK293 cell lines were treated with various concentrations of ZnONPs for overnight. Cell viability was measured using MTT(3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay against cancer and normal cells. The quantity of *Glutation peroxidase* and *Glutation reductase* genes compared to *GAPDH* gene expressions were evaluated using the real time PCR method.

Results: The MTT data showed that ZnONPs significantly decreased the viability of cancer cells compared to normal cells in dose-dependent mode. Moreover, the mRNA levels of *Glutation peroxidase* and *Glutation reductase* genes was significantly increased by 2.13 ± 0.07 ($P < 0.001$) and 1.22 ± 0.05 ($P < 0.05$) fold, respectively, following treatment with ZnONPs.

Conclusion: According to the results of this investigation, the *Glutation peroxidase* and *Glutation reductase* gene expression was the key factors of glutathione system in elimination of increasing reactive oxygen species treated with ZnONPs.

Keywords: Zinc Oxide nanoparticles, Breast cancer, *Glutation peroxidase*, *Glutation reductase*