

اثرات نانو ذرات اکسید آهن عامل‌دار شده با پیریدین کربوکس آلدئید تیوسمی کاربازون بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه و بررسی تغییر بیان ژن NDRG1

چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۸ ویرایش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

زمینه و هدف: سرطان ریه، بیماری با مرگ‌ومیر بالاست که درمان‌های دارویی مرسوم در کنترل آن موفقیت چندانی نداشته است. فعالیت شلاته‌کننده‌های آهن در تحقیقات مختلف، یک راهبرد درمانی جدید مورد توجه دانشمندان بوده است. هدف اصلی این تحقیق سنتز کمپلکس جدیدی از نانوذرات اکسید آهن عامل‌دار با تیوسمی کاربازون (Fe3O4 thiosemicarbazone complex) و بررسی ویژگی ضد تکثیری آن علیه رده سلولی A549 سرطان ریه بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از شهریور ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۸ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت انجام گرفت. ابتدا به روش واکنش متراکم‌سازی گروه‌های آمینی و آلدئیدی، تیوسمی کاربازون (PTSC) سنتز شد. نانوذرات Fe3O4 به روش هم‌رسوبی در حضور گلوتامیک اسید سنتز شدند. کمپلکس Fe3O4@Glu از طریق گروه‌های عاملی در PTSC عامل‌دار شد. ویژگی‌های ریخت شناسی کمپلکس از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخص شد. بقاء سلولی در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ µg/ml به روش MTT بررسی شد. تغییرات سطح بیان ژن NDRG1 به روش qRT-PCR با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

یافته‌ها: تصاویر SEM، کروی بودن کمپلکس Fe3O4@Glu/PTSC را تایید نمود. اندازه نانوذرات یکنواخت و در حدود ۲۳-۵۲ nm بود. نتایج MTT، ویژگی ضد تکثیری این کمپلکس را در غلظت‌های مختلف تایید نمود (IC50=۱۳۵/۶ µg/ml). ژن NDRG1 در سلول‌های تیمار شده، پس از ۱۲ ساعت، ۱/۸ برابر افزایش بیان داشت. در حالی که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، این ژن کاهش بیان ۰/۶۷ نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که Fe3O4@Glu/PTSC با کاهش بیان NDRG1، اثرات ضد تکثیری مناسبی علیه سلول‌های سرطان ریه دارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های A549، آپوپتوز، NDRG1

علیرضا حبیبی^۱، سید عطااله سادات شاندیز^{۲*}، علی صالح‌زاده^۱، زینب مرادی شونیلی^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، میدان پونک، بلوار امام حسن (ع)، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

تلفن: ۰۲۱-۸۰۷۴۹۰۷

E-mail: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

مقدمه

(NDRG1) بیان متفاوتی در انواع سلول‌های توموری دارد. به طور کلی، بیان آن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی پایین‌تر است.^۱ ژن NDRG1 بر روی کروموزوم شماره 8q24.22 قرار دارد.^۲ و عضو خانواده ژن‌های پایین‌دست N-myc و ابر خانواده آلفا/بتا هیدرولاز است.^۳ تحقیقات بر پایه آزمایشات ایمونوهیستوشیمی نشان داده است که این ژن در Non-small cell

در ایجاد و گسترش سرطان ریه، ژن‌های زیادی دخالت دارند. این ژن‌ها در مسیرهای پیام‌رسانی مختلف مانند انتقال پیام افزایش بیان داده و منجر به ایجاد و پیشرفت سرطان ریه می‌شوند. تحقیقات مختلف نشان داده است که ژن (N-myc downstream regulated 1)

بر مقاومت دارویی است که از طریق قابلیت ترکیب آن‌ها با چندین دارو به صورت هم‌زمان و دور کردن دارو از efflux pump انجام می‌شود و سلول‌های سرطانی از این پمپ‌ها برای خروج دارو از داخل خود استفاده می‌کنند.^{۱۱} نانوذرات مس، طلا و آهن از مهم‌ترین نانوذراتی هستند که می‌توانند به این ترکیبات متصل شوند. در این بین، نانوذرات آهن موج جدیدی از مولکول‌ها هستند که در سال‌های اخیر اتصال آن‌ها با ترکیبات شیمیایی مثل تیوسمی کاربازون‌ها، در درمان انواع سرطان مورد توجه قرار گرفته اند.^{۱۲}

آهن یک عنصر اساسی است که سلول در فرآیندهای مختلف مثل تکثیر و سنتز DNA از آن استفاده می‌کند. تیوسمی کاربازون‌ها که قدرت شلاته‌کردن Fe(II) و Fe(III) را دارند، می‌توانند با جذب موثر آهن به خود، رادیکال‌های فعال تولید کنند و مسیرهای مختلفی را در سلول‌های سرطانی تحت تاثیر قرار دهند. نانوذرات اکسید آهن با ویژگی رسانش دارو، سبب ورود تیوسمی کاربازون‌ها به داخل سلول می‌شوند.^{۱۳} هدف این تحقیق بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن عامل‌دار شده با پیریدین کربوکس‌آلدئید تیوسمی کاربازون (PTSC) بر بیان ژن NDRG1 در سلول‌های A549 سرطان ریه است.

روش بررسی

این مطالعه تجربی به صورت بنیادی-کاربردی در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و با همکاری آزمایشگاه دانشگاه تربیت مدرس و شرکت بیم گستر تابان از شهریور ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۸ انجام گرفت. روش انجام تحقیق مبتنی بر تست‌های آزمایشگاهی و تحلیل داده‌ها و مقایسه آن‌ها با داده‌های تحقیقات مشابه بوده است.

سنتز و مشخصه‌یابی Fe₃O₄@Glu/PTSC: به‌منظور سنتز تیوسمی کاربازون (PTSC) برابر گزارش پیشین ما از روش متراکم‌سازی استفاده شد.^{۱۴} بطور خلاصه در یک بالن ۲۵۰ ml مقدار ۰/۹۱ gr تیوسمی کاربازید و ۱ ml (۰/۹۵ ml) از ۲- پیریدین کربوکس‌آلدئید و ۱۰۰ ml اتانول مخلوط شد و در دمای ۷۰-۶۰ و سرعت ۴۰۰ دور بر دقیقه به مدت دو ساعت به هم زده شد. سپس به مدت چهار-شش ساعت رفلکس شد. رسوب حاصل پس از سانتریفیوژ با پنج تا ۱۰ ml اتر شستشو شد. از روش هم‌رسوبی جهت

lung cancer (NSCLC) بیشتر از سلول‌های نرمال بافت ریوی بیان می‌شود، به‌طوری‌که بیان آن در سیتوپلاسم، هسته و در غشاء سلول اتفاق می‌افتد. بنابراین افزایش بیان این ژن در ژنوم بیماران، به‌عنوان یک شاخص تشخیصی مهم در رگ‌زایی تومور و پیش‌بینی سلول‌های بدخیم سرطان ریه مطرح شده است. یافته‌های اخیر نشان دهنده ارتباط افزایش بیان NDRG1 با پیشرفت میزان تومور است که ممکن است به دلیل عدم توازن اکسیژن‌زایی تومور و در نتیجه رگ‌زایی ضعیف در NSCLC باشد. این ژن در تومورهای سلول‌های بافت اپی‌تلیال مانند سرطان ریه، یک سرکوب‌کننده بالقوه متاستاز محسوب می‌شود.^۴

در سرطان ریه، عملکرد این ژن به شدت با واکنش‌های استرسی ناشی از هایپوکسی (کمبود اکسیژن) ارتباط دارد. تحقیقات نشان داده است که فاکتور رونویسی القا کننده هایپوکسی (Hypoxia-Inducible Transcription Factor (HIF)-1 α) قادر است به پروموتور NDRG1 متصل شده و سبب افزایش بیان آن شود. افزایش بیان این ژن سبب افزایش تکثیر در رده سلولی A549 سرطان ریه می‌شود.^۵ افزایش بیان NDRG1 همچنین منجر به افزایش ویژگی‌های خود تجدیدشوندگی در سلول‌های آغاز کننده سرطان ریه (Lung Cancer Tumor-Initiating Cells) می‌شود. این عمل، در نتیجه واکنش NDRG1 با S-*skp2* (Phase Kinase Associated Protein 2) و کاهش فسفریلاسیون *skp2* صورت می‌گیرد. بنابراین با مهار فرآیند یوبیکوئیتین شدن (Ubiquitination) از تخریب c-Myc ممانعت شده و سلول‌های آغاز کننده تومور اقدام به خود تجدیدشدن می‌کنند.^۶

در برخی از پژوهش‌ها، تاثیر شلاته‌کننده‌هایی مثل DpC, Dp44Mt بر افزایش بیان این ژن در سلول‌های سرطانی گزارش شده است.^۷ برای مثال، تیوسمی کاربازون‌ها به دلیل توانایی شلاته کردن انواع فلزات، به‌عنوان عوامل شیمیایی موفق در درمان‌های هدفمند انواع سرطان‌ها، مورد توجه واقع شده‌اند.^۸ امروزه، سیستم‌های رسانش بر پایه نانوذرات مختلف در درمان‌های هدفمند توسعه پیدا کرده است.^۹ در این درمان‌ها، دارو به جای تهاجمی عمل کردن، به‌صورت منطقه‌ای عمل می‌کند. نانوذرات با اندازه ۲۰-۴۰۰ mm می‌توانند در سلول‌های سرطانی تجمع یافته و با منفعل کردن این سلول‌ها، سبب نفوذ دارو به داخل این سلول‌ها شده و آن‌ها را کنترل کنند. از مزایای دیگر نانوذرات در رسانش و اثر بخشی داروها، غلبه

شرکت Kunshan چین قرائت گردید و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد. میزان دوز مهارى دارو IC50 روی رده سلولی A549 با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism V5.0 محاسبه گردید.

Quantitative real-time PCR. در این تحقیق، براساس گزارش Eimani و همکاران، سطوح بیان mRNA ژن NDRG1 با استفاده از آنالیز SYBR Green qRT-PCR ارزیابی شد.^{۱۷} به منظور استخراج RNA کل براساس دستورالعمل سازنده کیت TransZol (Transgen Biotech). ابتدا تعداد 6×10^4 ml سلول A549 که با Fe3O4@Glu/PTSC تیمار شده بودند در یک پلیت ۱۲ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از سه بار شستشو با محلول PBS، ۱ ml TransZol به هر چاهک اضافه شد و چند دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. سلول‌ها به یک میکروپیوژ عاری از آنزیم RNase منتقل شدند و از طریق پیست چند بار بالا و پایین شدند و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. به منظور تهیه امولسیون سلولی، ۰/۱ ml کلروفرم به میکروپیوژ افزوده شد و ۱۵ ثانیه شیک انجام شد. پس از سه دقیقه انکوباسیون در دمای 4°C ، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm/min صورت گرفت و سوپ رویی به یک میکروپیوژ جدید منتقل شد. در ادامه پس از افزودن ۰/۲۵ ml ایزوپروپیل الکل، انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C انجام شد.

به محض مشاهده رسوبات کلونیدی در انتهای لوله، مایه رویی دور ریخته شد و پس ۱ mm الکل ۹۶٪ به آن افزوده شد. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ rpm/min در دمای 4°C ، به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. محلول رویی دور ریخته شد و پس از خشک شدن اتانول در هوای اتاق، رسوبات بر جای مانده با افزودن ۱-۲ ml محلول لیز کننده RNA، حل شد و پس از یک دقیقه انکوباسیون در درجه حرارت اتاق سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ rpm/min به مدت یک دقیقه انجام شد. محلول رویی در حجم‌های کوچک تقسیم شد و در دمای 80°C - نگهداری گردید. در نهایت غلظت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ، با طول موج A260/A230 مورد بررسی قرار گرفت. سنتز cDNA که جهت انجام PCR در داخل توالی ژن‌های هدف و کنترل قرار گرفت، براساس پروتکل شرکت سازنده کیت cDNA Synthesis SuperMix (Transgen Biotech)

سنتز نانوذرات Fe3O4 استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا ۰/۶۲۵ gr اسید ال-گلوتامیک با ۷/۵۷ g نمک FeCl3.6H2O و ۳/۱۷ g نمک FeCl2.4H2O در ۳۰۰ ml آب مقطر حل و به مدت یک ساعت در دمای حدود ۸۰ درجه به هم زده شد. سپس حجم ۴۰ ml محلول NH3 غلیظ اضافه گردید و به مدت سه ساعت در دمای ۸۰ درجه و تحت گاز N2 به هم زده شد. در ادامه برای عامل‌دار کردن نانوذرات، به ازای ۱/۸۲۹ gr از Fe3O4@Glu، ۰/۶۲۵ gr از PTSC برداشته شد. به مواد بالا ۲۰ ml اتانول اضافه شد و به مدت سه ساعت در دمای ۷۵-۸۰ درجه و تحت گاز N2 به هم زده شد. رسوب حاصل (Fe3O4@Glu/PTSC) با استفاده از آهن‌ریا جداسازی و سپس با آب و اتانول شستشو و سپس خشک شد.

برای مشاهده ریخت شناسی نانو ذرات اکسید آهن عامل‌دار شده با PTSC از میکروسکوپ الکترونی روبشی (MIRA3 FEG-SEM) ساخت شرکت Tescan کشور چک و روشی که توسط Walbrück و همکاران ارایه شده است، استفاده شد.^{۱۸} به طور خلاصه، ماده سنتز شده در مقدار کافی استون حل شد و ظرف حاوی محلول به مدت ۱۰ دقیقه داخل دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. سپس یک قطره از سوسپانسیون به دست آمده روی یک لام به ابعاد 1×1 cm قرار داده شد. لام حاوی نمونه، پس از خشک شدن، با یک لایه نازک کربن پوشیده شد و به میکروسکوپ روبشی منتقل گردید.

تست رنگ‌سنجی MTT: به منظور بررسی تاثیر رنگ‌سنجی Fe3O4@Glu/PTSC بر روی رشد و بقاء رده سلولی A549 از تست رنگ‌سنجی MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) به روش گزارش لانگمن استفاده شد.^{۱۶} سلول‌های کشت شده پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از کمپلکس Fe3O4@Glu/PTSC تیمار شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت از واکنش دارو و سلول‌ها، محتوای چاهک‌ها به دقت خارج شد. به هر چاهک ۱۰۰ ml از محیط کشت حاوی ۰/۵ mg/ml محلول MTT اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت دو تا چهار ساعت در انکوباتور CO2 و 37°C قرار داده شدند. برای حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید شده، ۲۰۰ μl از محلول ۱٪ دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری محلول به دست آمده از تیمار و کنترل در طول موج ۵۷۰ nm توسط قرائت‌گر الیزا (DNM-9602G) ساخت

جدول ۲: برنامه و مراحل واکنش qRT-PCR

مرحله واکنش	زمان	دما (°C)
واکشن اولیه (شکستن پیوندهای هیدروژنی)	۱۰ ثانیه	۹۵
واکشن موجود در سیکل	۵ ثانیه	۹۵
اتصال پرایمرها	۱۵ ثانیه	۶۰
طویل شدن	۱۰ ثانیه	۷۲
تعداد سیکل	۴۰ سیکل	

دمایی °C ۰/۵ در هر چرخه و بین دمای °C ۹۵-۷۲ انجام شد تمام واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد و وضعیت بیان ژن هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با سطح بیان mRNA ژن *GAPDH* مقایسه شد.

یافته‌ها

تجزیه تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار GraphPad Prism 5 San Diego, USA و با آزمون ANOVA انجام شد و مقدار معناداری در سطح خطا $P < 0/05$ پذیرفته و تحلیل شد.

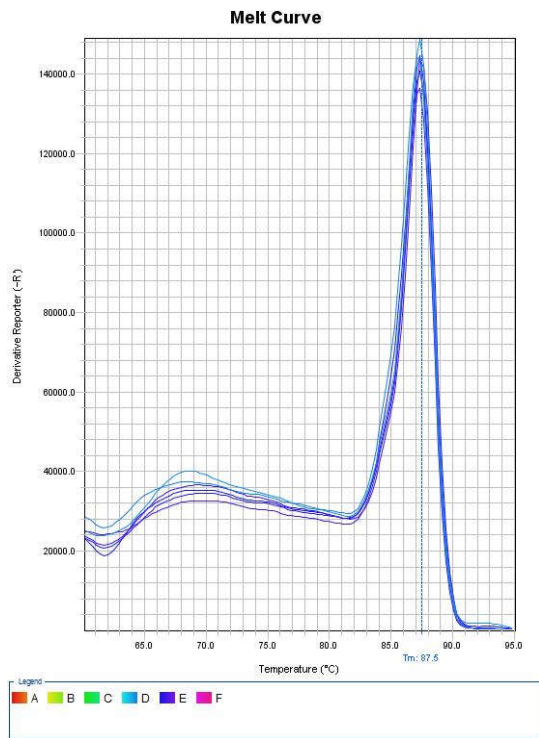
پس از انجام فرآیند سنتز و عامل‌دار کردن، محصول نهایی واکنش به رنگ قهوه‌ای سوخته متمایل به سیاه به نام Fe3O4@Glu/PTSC در نظر گرفته شد. شکل ۱ شمای کلی سنتز و نتیجه عامل‌دار کردن Fe3O4 با PTSC را نشان می‌دهد. این ترکیب با میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد تایید قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مربوط به نانوذرات سنتز شده Fe3O4@Glu/PTSC، کروی بودن این کمپلکس را تایید نمود (شکل ۲). گسترش نانوذرات یکنواخت بوده و اندازه آن‌ها به‌طور میانگین در حدود ۵۲-۲۳ nm به‌دست آمد. تفاوت اندازه‌های مشاهده شده در تصاویر SEM را می‌توان به تجمع نسبی نانوذرات سنتز شده نسبت داد. بررسی تصاویر نشان‌دهنده پوشش کامل نانوذرات Fe3O4 توسط PTSC است. برای بررسی تاثیر تیوسمی کاربازون بر روی سلول‌های A549 سرطان ریه، تست سنجش بقاء و تکثیر سلولی (MTT) انجام شد. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است Fe3O4@Glu/PTSC در مقادیر وابسته به غلظت (IC50=۱۳۵/۶ μg/ml) توانایی مهار رشد سلول‌های A549 را دارد (P<0/001).

برای این منظور، ۵ μg از RNA کل، 1 μL Anchored oligo (DT) 18 primer (0.5 μg/μL) و ۲۰ μL آب عاری از DNase در داخل یک میکروتیوپ مخلوط شدند و به مدت پنج دقیقه در دمای °C ۶۵ انکوبه شدند و سپس به مدت دو دقیقه روی یخ قرار داده شدند. در ادامه ترکیبات دیگر شامل 1 μL EasyScript RT/RI Enzyme Mix و 10 μL 2×ES Reaction Mix به میکروتیوپ افزوده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۴۲ انکوبه شد. برای غیرفعال کردن آنزیم، مخلوط به مدت پنج ثانیه در دمای °C ۸۵ انکوبه شد و در °C ۸۰- نگهداری شد.

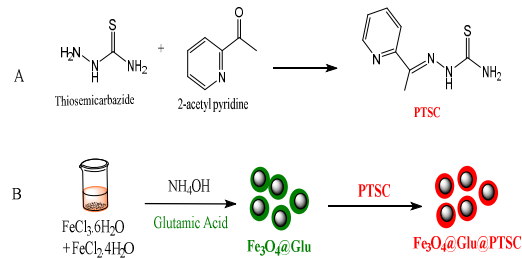
از توالی‌های زیر برای پرایمرهای NDRG1 استفاده شد: F: 5'-AGGCAGGTGACAGCAGGGAC-3' و R: 5'-CGTGGCAGACGGCAAAGT-3'. جفت پرایمرهای سنتز شده پس از دریافت، با استفاده از آنزیم Premix Ex Taq (TaKaRa, Japan) تست شده و طول آن‌ها از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز ۲/۵٪ اندازه‌گیری شد پس از آزمایش پرایمرها، واکنش‌های qRT-PCR با استفاده از SYBR® Premix Ex Taq™ kit (TaKaRa, Japan) و دستگاه ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) انجام شد. از GAPDH با توالی 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3' به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. در جدول ۱ مواد مورد نیاز در حجم ۲۰ μL برای انجام qRT-PCR خلاصه شده است. شرایط چرخه دمایی براساس پروتکل شرکت سازنده کیت فوق در جدول ۲ خلاصه شده است. در نهایت واکنش در دمای °C ۴ پایان یافت. در پایان آنالیز به‌منظور تعیین خلوص قطعه تکثیر شده پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب RNA با برنامه

جدول ۱: مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش qRT-PCR

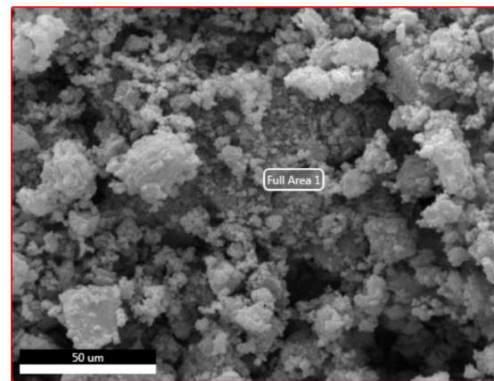
ماده	مقدار
cdNA	۱ μl
Primer Forward	۲ μl (۲۰۰ nm)
Primer Reverse	۲ μl (۲۰۰ nm)
Master mix	۱۰ μl
RNase-Free Water	۵ μl



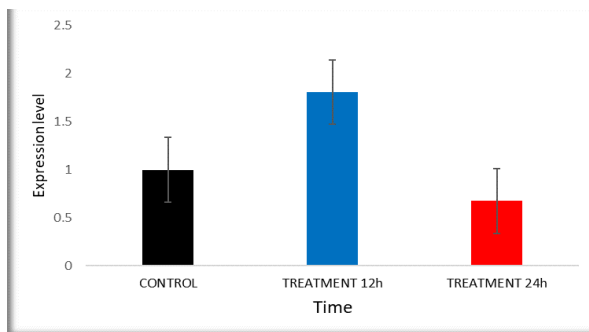
نمودار ۱: منحنی ذوب RNA ژن NDRG1. وجود یک نقطه حداکثری که عدم اتصال پرایمر دایمر و خلوص بالای واکنشها را تایید می کند. الگوی منحنی ذوب ژن NDRG1 در دمای ۸۷/۵ °C نشان داده شده است.



شکل ۱: شمای کلی مراحل سنتز و عامل دار کردن برای (A) PTSC و (B) برای نانوذرات Fe₃O₄@Glu/PTSC



شکل ۲: تصویر SEM مربوط به نانوذرات سنتز شده Fe₃O₄@Glu/PTSC پوشش نانوذرات Fe₃O₄ توسط PTSC به وضوح دیده می شود.



نمودار ۲: سطح بیان mRNA در ژن NDRG1 در سلولهای A549 پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار با Fe₃O₄@Glu/PTSC و مقایسه آن با گروه کنترل. افزایش ۱/۸ برابری بیان mRNA ژن NDRG1 پس از ۱۲ ساعت و کاهش ۰/۶۷ آن پس از ۲۴ ساعت تیمار نشان داده شده است.

جدول ۳: فعالیت ضدتکثیری کمپلکس Fe₃O₄@Glu/PTSC روی رده سلولی A549 (IC₅₀=۱۳۵/۶ μg/ml)

بقای سلول (% نسبت به کنترل) (میانگین ± انحراف معیار)	Fe ₃ O ₄ @Glu/PTSC (μg/ml)
۱۰۰	صفر
۸۶/۰ ± ۶۲/۰۱	۶۲/۵
۷۹/۰ ± ۹۴/۰۲	۱۲۵
**۵۱/۰ ± ۳۹/۰۳	۲۵۰
***۴۳/۰ ± ۲۳/۰۳	۵۰۰
***۱۰/۰ ± ۲۵/۰۱	۱۰۰۰

نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است (P < ۰/۰۱). (n=۳, P < ۰/۰۰۱)

PTSC، به دلیل مقاومت سلول‌های سرطانی در ورود به داخل سلول در طی انکوباسیون ۱۲ ساعته، اولین دلیل احتمالی افزایش بیان بود. در ادامه، آزمایشات پس از ۲۴ ساعت تیمار با $50 \mu\text{l}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ انجام شد.

پس از این مدت، بیان NDRG1 کاهش محسوس را نشان داد. رفتار متفاوت ژن NDRG1 با تغییر نوع سلول سرطانی دلیل دیگری بود که می‌توانست علت این وضعیت باشد. از آنجایی که بیان این ژن در سلول‌های سرطانی A549، بیشتر از سلول‌های طبیعی بود، این یافته که $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ توانسته بود آن را مهار کند، معقول به نظر رسید. این نتایج با یافته‌های Zheng و همکاران که کاهش بیان NDRG1 را در مهار رشد و تکثیر این سلول‌ها موثر دانسته‌اند، موافق بود.^{۲۱}

رفتار متفاوت از بیان NDRG1 این فرضیه را مطرح نمود که در مراحل ابتدایی رشد، سلول با مقاومت ناشی از پمپ‌های Efflux همراه است و چون غلظت دارو به اندازه کافی نرسیده است، NDRG1 همچنان در سلول‌های توموری افزایش بیان دارد. اما در ادامه که سلول به رشد ۲۴ ساعته می‌رسد، غلظت دارو در اثر فراسانی ناشی از نانوذرات Fe_3O_4 ، به اندازه کافی افزایش یافته و ژن NDRG1 دچار کاهش بیان می‌شود.

دوم اینکه ترکیبات شلاته‌کننده آهن سبب افزایش بیان NDRG1 می‌شوند ولی وقتی به صورت ترکیبی با نانوذراتی مثل Fe_3O_4 وارد سلول می‌شوند، کاهش بیان ژن فوق را منجر می‌شوند. از این رو با تمرکز بر یافته‌های این تحقیق و بررسی گزارش محققان دیگر، مکانیسم مولکولی احتمالی این ارتباط به این صورت مشخص شد که نانوذرات آهن سبب افزایش ورود PTSC به داخل سلول‌های سرطانی (مثل A549) می‌شوند. PTSC مانند سایر تیوسمی‌کاربازون‌ها از عوامل آسیب‌رسان به DNA بوده و ارتباط بین کاهش بیان NDRG1 بر اثر برخی از عوامل آسیب‌رسان به DNA اثبات شده است.^{۲۲} بنابراین PTSC به صورت کونژوگه با Fe_3O_4 سبب کاهش بیان ژن NDRG1 می‌شود. هدف اصلی این تحقیق بررسی نقش مهارتی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ در سلول‌های A549 سرطان ریه و تغییرات بیان ژن NDRG1 بود. نتایج نشان داد که $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ یک ماده با فعالیت ضد تکثیری علیه سلول‌های سرطانی است. همچنین فعالیت سینرژیک نانوذرات PTSC و Fe_3O_4 کاهش بیان ژن NDRG1 را القا می‌کند. عدم بررسی تاثیر کمپلکس سنتز شده بر رده‌های سلولی دیگر

کمترین غلظت موثر $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ بر روی سلول‌های سرطانی $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ بود. منحنی ذوب ژن NDRG1 (نمودار ۱) دارای یک نقطه حداکثری (Peak) بود که بیانگر عدم اتصال دایمر پرایمری و اختصاصیت بالای واکنش‌های qRT-PCR می‌باشد. اثر $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ بیان متفاوتی از ژن NDRG1 بر جای گذاشتند، به طوری که این ترکیب توانست پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون، بیان mRNA این ژن را $1/8$ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش دهد اما در ادامه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، بیان این ژن $0.7/1$ نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا نمود (نمودار ۲).

بحث

در برخی از تحقیقات، دخالت ژن NDRG1 در ایجاد سرطان ریه به اثبات رسیده است. این ژن، پروتئینی به همین نام را در سیتوپلاسم، هسته، میتوکندری و غشای پلاسمایی رمزدهی می‌کند. محققین حوزه بیان ژن، گزارش‌های متفاوتی از تغییرات بیان این ژن و پیامدهای آن در سلول‌های سرطان ریه ارائه کرده‌اند.^{۲۰}

در تحقیق Fang و همکاران، افزایش نقش سرکوب‌کنندگی این ژن در تومورهای پستان، لوزالمعده، پروستات و کولون گزارش شده است.^{۲۱} Li و همکاران نشان داده‌اند که افزایش بیان این ژن سبب افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز در رده سلولی A549 می‌شود.^{۲۲} Wei و همکاران کاهش بیان این ژن را وقتی که سلول‌های A549 با Digoxin تیمار می‌شوند، گزارش نموده‌اند.^{۲۳}

برخی محققان افزایش بیان NDRG1 را در سلول‌های سرطانی گلیال سیستم عصبی که با تیوسمی‌کاربازون‌ها تیمار شده بودند، گزارش نموده‌اند.^{۲۴} در تحقیق دیگر Wang و همکاران گزارش کرده‌اند که کاهش بیان NDRG1 در سلول‌های تیمار شده با کامبرستاتین A-4 (CA-4) که یک عامل دپلمریزه کننده توبولین است، اتفاق می‌افتد.^{۲۵} در تحقیق کنونی، رفتار ژن NDRG1 پس از تیمار سلول‌های A549 با کمپلکس $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ با هدف تعیین افزایش یا کاهش بیان این ژن پس از تیمار با ترکیب بررسی شد. از جمله یافته‌های این تحقیق افزایش بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu}/\text{PTSC}$ پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون بود. این یافته با نتایج Kovacevic و Ma موافق بود. ناکافی بودن غلظت

روی آپوپتوز و تغییرات بیان ژنهای *BAX*, *BCL2* و *NDRG1* در رده سلولی سرطان ریه" در مقطع دکترای تخصصی زیست‌شناسی علوم سلولی و مولکولی در سال ۱۳۹۸ و کد ۱۱۷۳۰۵۵۴۹۶۱۰۰۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت اجرا شده است.

سرطان‌ها و سایر ژن‌ها و نیز در شرایط *In vivo* از محدودیت‌های مطالعه کنونی بود که برای بررسی در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود. **سپاسگزاری:** این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "مطالعه اثر نانوذرات Fe_3O_4 عامل دار شده با تیوسمی کاربازون بر

References

- Bae DH, Jansson PJ, Huang ML, Kovacevic Z, Kalinowski D, Lee CS, et al. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *J Clin Pathol* 2013;66(11):911-7.
- Pflueger D. t (8; 21)(q24; q22) in prostate cancer. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2012.
- Fan C, Yu J, Liu Y, Xu H, Wang E. Increased NDRG1 expression is associated with advanced T stages and poor vascularization in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res* 2012;18(3):549-56
- Wangpu X, Lu J, Xi R, Yue F, Sahni S, Park KC, et al. Targeting the metastasis suppressor, N-Myc downstream regulated gene-1, with novel di-2-pyridylketone thiosemicarbazones: Suppression of tumor cell migration and cell-collagen adhesion by inhibiting focal adhesion kinase/paxillin signaling. *Mol Pharmacol* 2016;89(5):521-40.
- Wang Q, Li L-H, Gao G-D, Wang G, Qu L, Li J-G, et al. HIF-1 α up-regulates NDRG1 expression through binding to NDRG1 promoter, leading to proliferation of lung cancer A549 cells. *Mol Biol Rep* 2013;40(5):3723-9.
- Wang Y, Zhou Y, Tao F, Chai S, Xu X, Yang Y, et al. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes the stem-like properties of lung cancer cells through stabilized c-Myc. *Cancer Lett* 2017;401:53-62.
- Kovacevic Z, Chikhani S, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Pharmacol* 2011;80(4):598-609.
- Authors'-Group. personalized-cancer-medicine: advancing cancer care, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2017 Available from: <https://www.cancer.net>.
- Medina LA, editor Liposomes as delivery systems for antineoplastic drugs. AIP Conference Proceedings; 2014: American Institute of Physics.
- Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target* 2016;24(3):179-91.
- Zeineldin R. Cancer nanotechnology: methods and protocols: Springer; 2017.
- Kalinowski DS, Quach P, Richardson DR. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Med Chem* 2009;1(6):1143-51.
- Abayawera GS, Wang H, Shrestha TB, Yu J, Angle K, Thapa P, et al. Synergy of iron chelators and therapeutic peptide sequences delivered via a magnetic nanocarrier. *J Funct Biomater* 2017;8(3):23
- Habibi A, Shandiz SAS, Moradi-Shoeili Z. Novel pyridinecarboxaldehyde thiosemicarbazone conjugated magnetite nanoparticles (MNPs) promote apoptosis in human lung cancer A549 cells. *J Biol Inorg Chem* 2020;25(1):13-22.
- Walbrück K, Kuellmer F, Witzleben S, Guenther K. Synthesis and Characterization of PVP-Stabilized Palladium Nanoparticles by XRD, SAXS, SP-ICP-MS, and SEM. *J Nanomater* 2019;2019.
- Langdon SP. Cancer cell culture: Springer; 2010.
- Eimani BG, Sanati MH, Houshmand M, Ataei M, Akbarian F, Shakhssalim N. Expression and prognostic significance of bcl-2 and bax in the progression and clinical outcome of transitional bladder cell carcinoma. *Cell J (Yakhteh)* 2014;15(4):356.
- Sinha D, Tiwari AK, Singh S, Shukla G, Mishra P, Chandra H, et al. Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *Eur J Med Chem* 2008;43(1):160-5.
- Pei Z, Du X, Song Y, Fan L, Li F, Gao Y, et al. Down-regulation of lncRNA CASC2 promotes cell proliferation and metastasis of bladder cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2017;8(11):18145.
- Kitowska A, Pawelczyk T. N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. *Acta Biochim Pol* 2010;57(1):15.
- Fang BA, Kovačević Ž, Park KC, Kalinowski DS, Jansson PJ, Lane DJ, et al. Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2014;1845(1):1-19.
- Li K, Chen B, Xu L, Feng J, Xia G, Cheng J, et al. Reversal of multidrug resistance by cisplatin-loaded magnetic Fe_3O_4 nanoparticles in A549/DDP lung cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Nanomed* 2013;8:1867.
- Wei D, Peng J-J, Gao H, Li H, Li D, Tan Y, et al. Digoxin downregulates NDRG1 and VEGF through the inhibition of HIF-1 α under hypoxic conditions in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):7273-85.
- Ma W, Na M, Tang C, Wang H, Lin Z. Overexpression of N-myc downstream-regulated gene 1 inhibits human glioma proliferation and invasion via phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways. *Mol Med Rep* 2015;12(1):1050-8.
- Wang H, Li W, Xu J, Zhang T, Zuo D, Zhou Z, et al. NDRG1 inhibition sensitizes osteosarcoma cells to combretastatin A-4 through targeting autophagy. *Cell Death Dis* 2017;8(9):e3048-c.
- Zheng Y, Wang LS, Xia L, Han YH, Liao SH, Wang XL, et al. NDRG1 is down-regulated in the early apoptotic event induced by camptothecin analogs: The potential role in proteolytic activation of PKC δ and apoptosis. *Proteomics* 2009;9(8):2064-75.

Effects of Fe₃O₄@Glu/PTSC against lung cancer A549 cells and analysis of NDRG1 gene expression

Alireza Habibi Ph.D.¹
Seyed Ataollah Sadat Shandiz Ph.D.^{2*}
Ali Salehzadeh Ph.D.¹
Zeinab Moradi-Shoaili Ph.D.³

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Emam Hassan Blvd., Pounak Sq., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 88074907
E-mail: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Abstract

Received: 16 Apr. 2020 Revised: 23 Apr. 2020 Accepted: 14 Oct. 2020 Available online: 21 Oct. 2020

Background: Lung cancer is a disease with high mortality rate that conventional drug treatments have not been successful in controlling it. The activity of iron chelators in various studies has been considered by scientists as a new treatment strategy. The primary objective of this study was to synthesize a novel Fe₃O₄ thiosemicarbazone complex and investigate its anti-proliferative activity against A549 cells of lung cancer.

Methods: This experimental study was carried out in Islamic Azad University of Rasht Branch, from September of 2018 to September 2019. First thiosemicarbazone (PTSC) was synthesized by the method of the condensation reaction of amine and aldehyde groups. Also, the Fe₃O₄ nanoparticulates were synthesized using the co-precipitation method in the presence of glutamic acid. Then, Fe₃O₄@Glu complex functionalized with bio-reactive PTSC moiety. Besides, morphological characteristics of Fe₃O₄@Glu/PTSC complex were determined by scanning electron microscope (SEM) images. The cell viability was detected in 62.5, 125, 250, 500, and 1000 µg/ml for treated cells with Fe₃O₄@Glu/PTSC complex via MTT assay. Changes of NDRG1 gene expression the level in treated cells were investigated via qRT-PCR analysis. Therefore, total RNA was extracted after culturing the cells and cDNA of NDRG1 and GAPDH genes as the study and control gene was obtained, respectively. Ultimately, the level of NDRG1 gene expression was compared with level of GAPDH mRNA expression via the 2^{-ΔΔCt} method.

Results: SEM images confirmed the sphericity of the Fe₃O₄ @ Glu / PTSC complex. The size of the nanoparticles was uniform and about 52-23 nm. The cell survival assay (MTT) results revealed the anti-proliferative properties of this complex in a dose-dependent manner (IC₅₀=135.6 µM/ml). In treated cells, the gene expression of NDRG1 was 1.8-fold higher after 12 h. However, after 24 hours of incubation, this gene was showed a 0.67-fold decrease in expression compared to the control group.

Conclusion: The results of the present study suggest that Fe₃O₄@Glu/PTSC nanoparticulates by a decrease of NDRG1 expression, exhibit effective anti-cancer activity against lung cancer cells.

Keywords: A549 cells, apoptosis, NDRG1.