اثر ترکیب توپوتکان و نانوذرات اکسید روی بر سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان MCF-7

علیرضا شریفیان [۱](M.Sc)، فهیمه باغبانی‌آرانی [۱*](Ph.D)، حسن صاحب جمعی [۲](Ph.D)

۱- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، ایران

۲ - گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۳۶۷۲۵۰۱۱ fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱

چکیده

هدف: سرطان پستان فراوان‌ترین نوعِ بدخیمی در میان زنان می‌باشد. امروزه، استفاده از نانوذرات به عنوان یکی از امیدهای موفق در درمان و تشخیص بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان مطرح است. هدف این مطالعه، بررسی اثرات داروی ضد سرطان توپوتکان و نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) به طور ترکیبی بر روی سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه غلظت‌های مختلف داروی توپوتکان و نانوذرات اکسید روی به صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر بر روی سلول‌های سرطانی MCF7 تیمار گردید. سپس درصد زنده مانی سلول‌ها به روش MTT مورد سنجش قرار گرفت. پس از استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و ساخت cDNA، میزان بیان ژن P53 به روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج MTT اثر سمی ZnoNPs و داروی توپوتکان بر علیه سلول‌های MCF7 وابسته به دوز می‌باشد و میزان بقاء سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. هم‌چنین ترکیب غلظت ۴۵ میکروگرم ZnoNPs با تمامی غلظت‌های توپوتکان در رده سلولی MCF-7 موجب افزایش اثرات توکسیک دارو گردید. نتایج بیان ژنی اثرات ترکیبی نانوذرات و داروی توپوتکان نشان داد که در رده سلولی تحت تیمار، بیان ژنی P53 به میزان ۱/۳ برابر افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان به صورت ترکیبی اثرات ضد سرطانی سینرژیک را بر روی رده سلولی سرطان پستان نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، توپوتکان، نانوذرات اکسید روی، P53

مقدمه

سرطان پستان حدود ۲۵ درصد از کل موارد سرطان در زنان را تشکیل می‌دهد و سالیانه تعداد قابل توجهی بر اثر این بیماری از دنیا می‌روند. تشخیص و درمان به موقع سرطان پستان یکی از مهم‌ترین چالش‌های محققین علوم پایه و پزشکی به شمار می‌رود [۱]. به طور کلی سرطان پستان همانند دیگر سرطان‌ها به علت جهش‌های ژنتیکی ایجاد می شود. که در این میان، تعدادی از ژن های سرکوب‌کننده تومور دچار جهش می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ژن P53 است. جهش‌های این ژن با افزایش آنژیوژنز، تسریع در رشد تومور، اختلال در روند آپوپتوز و مقاومت درمانی همراه است. اکثر داروها از طریق تحریک آپوپتوز باعث حذف سلول‌های سرطانی می شوند و ژن P53 در این راستا نقش اصلی دارد [۲-۵]. هم‌چنین مشخص شده است که P53 می‌تواند در رگ‌زایی و بیان سرکوب‌کننده‌های دیگر تومور و متاستاز نقش داشته باشد. از آن‌جایی که اکثر جهش‌ها در ژن P53 منجر به تغییر در پایداری پروتئین می شود، افزایش بیان ژن P53 می‌تواند جایگزینی برای اختلالات عملکردی این ژن باشد [۶،۷]. امروزه فناوری نانو در تولید بسیاری از داروها پیشگام بوده است و سنتز نانوذرات کاربردهای فراوانی در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان دارد. نانوذرات اکسید فلزات چندی است که به‌عنوان یکی از کاندیداهای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸]. از خواص ویژه نانوذرات اکسید روی می‌توان به پایداری شیمیایی بالا، ثابت دی الکتریک پایین، فعالیت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]

کاتالیزوری بالا، جذب نور فرو سرخ و فرابنفش و از همه مهم‌تر خاصیت ضد باکتری آن اشاره نمود. چنان‌چه اثر درمانی و ضد توموری این ترکیبات مورد تایید قرار گیرد، این مساله می‌تواند قدم به سزایی در پیشبرد روش‌های درمانی در سرطان باشد. هم‌چنین یکی از رویکردهای جدید در درمان سرطان استفاده از ترکیب دارویی و نانوذرات فلزی می‌تواند باشد. در این میان، توپوتکان یک داروی ضد سرطان است که مشتقی از Compothecin بوده و برای درمان سرطان‌های تخمدان، گردن رحم پیشرفته، سرطان سلول‌های کوچک ریه، مورد استفاده و از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) مورد تأیید قرار گرفته است [۹]. توپوتکان پس از عبور از پمپ‌های گلیکوپروتئین (P-GP) P و تأثیر بر آنزیم توپوایزومراز I موجب تجمع شکست‌های تک رشته‌ای DNA در طی فاز S چرخه‌ی سلولی می‌شود [۱۰،۱۱]. مکانیزم اثر این دارو به صورتی است که با اتصال به کمپلکس توپوایزومراز I-DNA، مانع اتصال دوباره شکست‌های تک زنجیره‌ای می‌شود [۹]. بنابراین، سمیت سلولی این دارو نیز به واسطه آسیب‌های دو رشته‌ای DNA حین سنتز DNA صورت می‌گیرد [۱۲،۱۳]. با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر توام داروی توپوتکان و نانوذره روی نپرداخته است پژوهش حاضر به دنبال پاسخ علمی به این سوال که ترکیب داروی توپوتکان و نانوذرات روی (Zn oxide nanoparticles) به طور ترکیبی چه اثراتی بر روی سمیت و بیان ژن P53 در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌گذارد، هدف‌گذاری شده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده و دارای کد اخلاق (IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.023) از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین می‌باشد.

کشت رده‌های سلولی

به منظور کشت سلولی، رده سلولی پستان MCF-7 از انستیتوپاستور ایران تهیه شد و در محیط DMEM high glucose غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco, Scotland)، در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تهیه و آماده‌سازی داروی توپوتکان و نانوذرات اکسید روی

در این مطالعه تجربی، داروی توپوتکان (هایکامتین) به صورت پودر از شرکت آمریکایی سیگما آلدریچ خریداری و جهت تهیه استوک در محیط کشت استریل حل شد تا غلظت آن به ۰/۵ mg/ml برسد. سپس در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. هم‌چنین، نانوذرات اکسید روی به صورت پودر از شرکت US RESEARCH NANOMATERIAL, INC با اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر تهیه گردید.

بررسی میزان سمیت نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان و ترکیب آن‌ها بر روی رده‌ی سلولی MCF-7

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که به منظور ارزیابی میزان تاثیر سلول‌کشی یک دارو بر روی سلول‌ها، انجام می‌گیرد. به منظور انجام این تست، در ابتدا سلول‌ها در پلیت ۹۶ تایی در حجم ۱۰۰ لاندا (۱۰ هزار سلول در هر چاهک) کاشته و جهت رشد و تکثیر، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه شدند. بعد از رشد سلول‌ها، به همین منظور ابتدا غلظت‌های مختلفی از نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان تهیه شد. پس از تاثیر نانوذرات و داروی توپوتکان بر روی سلول‌ها، در مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه، زنده ماندن سلول‌ها توسط رنگ MTT (Sigma Aldrich، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت این مدت، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml تهیه و با محیط رویی چاهک‌ها تعویض شد. پلیت سلولی به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO به چاهک‌ها اضافه شد که این امر موجب تبدیل کریستال‌های فورامازان به رنگ بنفش می‌شود. نهایتاً، میزان رنگ آزاد شده توسط سلول‌های زنده و جذب نوری پلیت، توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر ارزیابی شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

در همه تست‌ها کنترل مثبت و منفی لحاظ شده و تست‌ها با سه بار تکرار انجام شد. هم‌چنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (Half maximal inhibitory concentration یا IC50) نیز محاسبه شد [۱۴]. لازم به ذکر است که در نهایت اثر ترکیبی غلظت های مختلف دارو و کم‌ترین دوز موثر نانوذره بر روی سمیت سلولی نیز با روش MTT بررسی گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از کشت سلول‌ها در پلیت ۶ خانه‌ای (۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه) به مدت یک شبانه روز، داروی توپوتکان، نانوذرات اکسید روی و ترکیب آن‌ها تیمار شد و جهت بررسی تاثیر نمونه‌ها، انکوباسیون مجدد در مدت زمان ۲۴ ساعت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]

صورت گرفت. سپس کل RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل آن استخراج شده و خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH، آلمان) سنجیده شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل (cDNA) بر طبق دستورالعمل کیت Revert AidTM First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase, USA) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۲۰ میکرولیتر که شامل یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو dT، پنج میکرولیتر بافر x5، دو میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بوده و واکنش با برنامه دمایی ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در انتها با انجام واکنش PCR و مشاهده تک باند، ساخت و کیفیت cDNAو پرایمر تایید شد. cDNAی ساخته شده به عنوان الگو جهت انجام تست Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

Real Time PCR

در این مطالعه پرایمرهای مورد استفاده برای ژن هدف P53 و ژن مرجع GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase) با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردید و در مرحله بعدی با استفاده از توالی‌های موجود در بانک های ژنی و ابزار آنلاین BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) صحت پرایمرها تایید شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای دو ژن هدف p53 و مرجع GAPDH نشان داده شده است.

جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن هدف و مرجع

نام ژن	پرایمر ها	اندازه محصول
P53	forward: 5′CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT-3′ reverse: 5′-CAACCTCAGGCGGCTCATAG-3′	۱۹۴bp
GAPDH	forward: 5′-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3′ reverse: 5′-TACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3′	۷۴bp

تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت. هم‌چنین برای انجام تست RealTime PCR از کیت سایبر گرین شرکت تاکارا(PrimeScript™ RT Reagent Kit) و کپ استریپ شرکت ABI تولید کشور آمریکا استفاده شد. مواد لازم جهت انجام واکنش ریل تایم شامل ۱ میکرولیتر cDNA(۵۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر پرایمرهای جلوبر و برگشتی (۲۰۰ نانومولار)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبر گرین Real Time PCRو ۷ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط گردید و طبق برنامه زمانی–گرمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای مرحله اول، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله پایانی برای رسم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت آنالیز نتایجReal Time PCR با استفاده از روش ΔΔ Ct طبق فرمول‌های زیر صورت گرفت:

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{test\ sample} - \Delta Ct_{control\ sample}$$
$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

در این فرمول ΔCtT اختلاف بین سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه مورد آزمون و ΔCt control نیز اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه کنترل می‌باشد [۱۵].

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی نتایج به‌دست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه تکرار استوار می‌باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه P با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. هم‌چنین، مقدار P< ۰/۰۵در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج اثر غلظت‌های متفاوت توپوتکان و نانوذره اکسید روی بر سمیت سلولی رده MCF-7

تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از داروی توپوتکان با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت میزان درصد بقای سلول‌های تحت تیمار با دارو در شکل ۱ (A) نشان داده شده است. در مجموع نتایج MTT نشان داد که تمامی غلظت‌های داروی توپوتکان اثر کشندگی روی سلول‌ها دارد به طوری که در بالاترین غلظت یعنی ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان بقای سلول MCF-7، ۷۰ درصد کاهش می یا بد (P<۰/۰۰۱).

هم‌چنین سلول های سرطانی MCF-7 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف (۴/۵، ۴۵، ۴۵۰ و ۴۵۰۰ میکروگرم در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]

میلی‌لیتر) نانوذرات اکسید روی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. طبق شـــکل ۱ (B) مشـــاهده شـــد که غلظت‌های ۴/۵ و ۴۵ میکروگرم از نانوذرات اکســـید روی تأثیری بر بقای ســـلول‌ها نداشـــت (P>۰/۰۵). در حالی که غلظت ۴۵۰ میکروگرم باعث مرگ ۳۰ درصـدی سـلول‌ها شـده (P<۰/۰۱) و غلظت ۴۵۰۰ میکروگرم نیز باعث مرگ تقریباً ۷۰ درصدی سلول‌های MCF-7 می‌گردد (P<۰/۰۰۱).

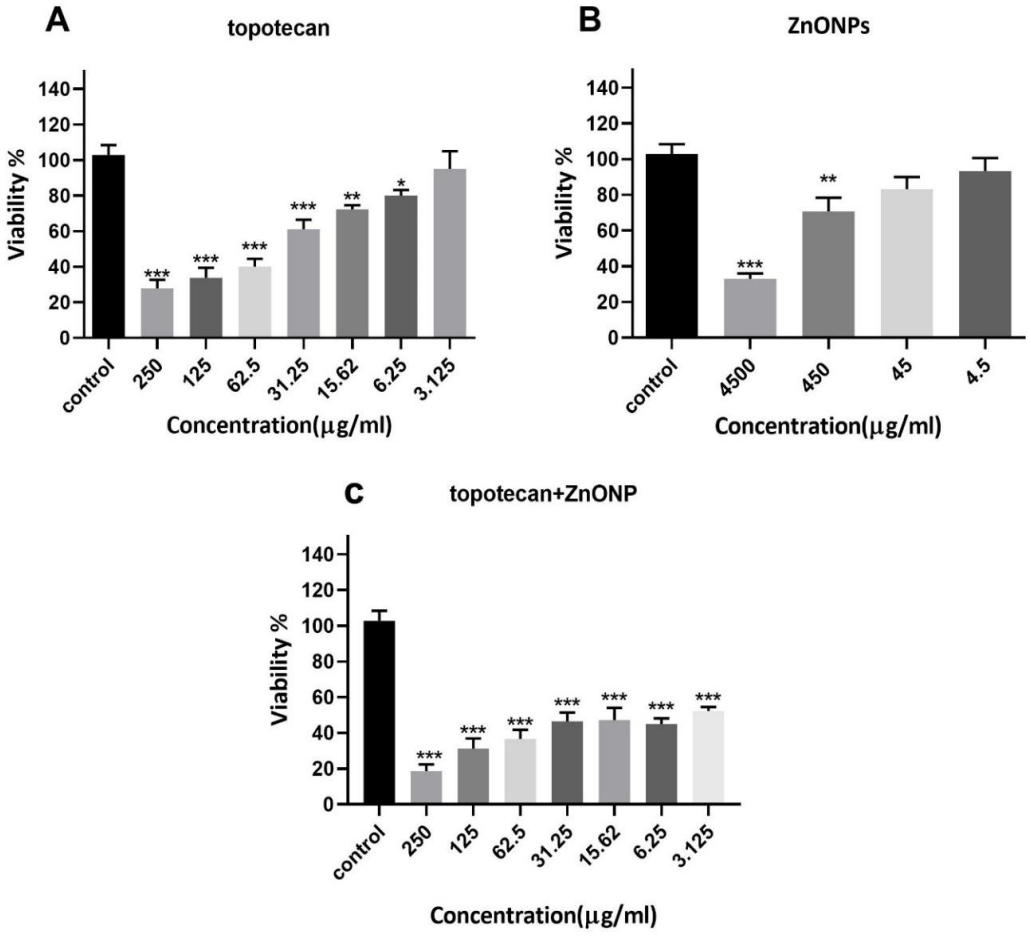
نتایج اثرات سمیت غلظت‌های متفاوت توپوتکان در ترکیب با نانو ذرات اکسید روی

در این مطالعه علاوه بر بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و توپوتکان به صورت تکی بر رده‌های سلولی MCF-7 اثرات ترکیبی این دو نیز بررسی شد. به همین منظور تک غلظت ۴۵۰ میکروگرم نانوذرات اکســـید روی با غلظت های مختلف از توپوتکان (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با هم ترکیب شـــد و به مدت ۲۴ ساعت رده سلولی MCF-7 تحت تیمار قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱(C) نشان داده شده ترکیبی از غلظت ۴۵۰ میکروگرم نانوذرات اکســـید روی و تمامی غلظت‌های توپوتکان در رده سلولی MCF-7 موجب تفاوت معنادار در بقای سلول می‌گردد (P<۰/۰۰۱).

نتایج بررسی بیان ژن P53 با روش Real Time PCR

بررسی بیان ژن P53 در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 پس از تیمار با داروی توپوتکان (دوز IC50 = 704.6 µM)، نانوذره اکسید روی و ترکیب آن‌ها با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام گرفت.

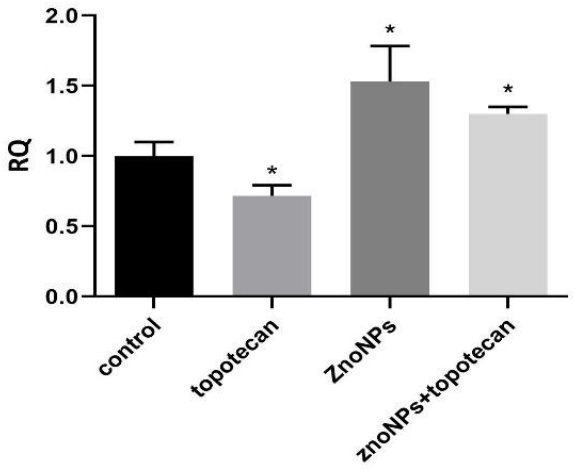
۴۸ نتایج نشـــان‌دهنده کاهش ۰/۷ برابری بیان ژن P53 در ســـلول های تحت تیمار با توپوتکان بودند (P<۰/۰۰۱). در حالی که، افزایش ۱/۵ برابری (P<۰/۰۵). بیان ژن P53 در سلول‌های تحت تیمار با ۴۵۰ میکروگرم نانوذرات اکسید روی مشاهده گردید (شکل ۲). زمانی که سلول‌های سرطانی با ترکیب دارو و نانوذره تیمار شدند بیان ژن P53 افزایش ۱/۳ برابری را نشان داد که از نظر آماری معنادار بود (P<۰/۰۵).



شکل ۱. بررسی اثرات داروی توپوتکان (A) ، نانوذرات اکسید روی (B) و ترکیب غلظت ۴۵۰ میکروگرم نانوذره و غلظت های مختلف توپوتکان بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 . نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه کنترل و به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده است. (*P <۰/۰۵ ،**P<۰/۰۱ ،***P <۰/۰۰۱ : n=3).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]



شکل ۲. تغییر بیان ژن P53 در رده‌های سلولی MCF-7 تحت تیمار با داروی توپوتکان، نانوذره اکسید روی و ترکیب دارو و نانوذره(*P <۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

برای بررسی اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی بر رده‌های سلولی MCF-7، این رده سلولی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف این نانوذرات قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده خاصیت سمیت وابسته به دوز نانو ذرات اکسید روی بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) است. در سال ۲۰۱۵ D. Selvakumari و همکارانش روی اثر ضد توموری نانو ذرات اکسید روی مطالعه‌ای انجام دادند. در بخشی از این بررسی روی رده‌ی سلولی MCF-7 به‌عنوان یک مدل سلولی سرطان پستان مطالعه‌ای انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد به‌کارگیری ۱۳/۲ میکروگرم از این نانوذره باعث مرگ ۵۰ در صد از سلول‌های توموری شده است [۱۶]. در مطالعه‌ی دیگری تو سط Wahab R و همکاران، روی اثرات ZnO-NPها بر روی رده‌های سلولی MCF-7 به عنوان رده‌ی سلولی سرطان پستان و رده‌ی سلولی HepG2 به‌عنوان رده‌ی سلولی کار سینوم کبد انجام شد. نتایج نشان داد غلظت ۲۵میکروگرم در میلی‌لیتر از این نانو ذرات باعث القای مرگ سلولی می شود و در صد سلول‌های زنده تا کم‌تر از ۱۰ درصد کاهش می‌یابد [۱۷]. بنابراین نتایج پژوهش حاضر و مطالعات دیگر تأییدکننده اثرات سمی و کشنده نانو ذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطانی به‌ویژه سرطان پستان می‌باشند. هر چند اختلافاتی در میزان دوز کشنده در این مطالعات وجود دارد که با توجه به متفاوت بودن اندازه نانوذرات قابل توجیه است.

علاوه بر بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و داروی توپوتکان به صورت جدا، مطالعه ترکیبی این نانوذرات و دارو بر رده‌ی سلولی MCF-7 نیز بررسی شد. با مقایسه نتایج حاصل از تیمار رده‌های سلولی سرطانی به‌وسیله ترکیب دو ماده نسبت به حالت تیمار با یکی از دو ماده به‌صورت جداگانه می‌توان نتیجه گرفت ترکیب این دو ماده نسبت به حالت تیمار جداگانه می‌تواند به میزان بهتری اثر سمیت آن‌ها را بر روی سلول‌های سرطانی افزایش دهد هر چند این تأثیر چشمگیر نبود. که می‌تواند به دلیل تداخل مکانیسم‌های اثر آن‌ها باشد. در حالی که انتظار می‌رفت با ترکیب کردن این دو ماده با هم اثرات شدیدتر و در دوزهای پایین‌تر دیده شود. برای یافتن علت این موضوع نیاز به دانستن مکانیسم‌های دقیق اثر این دو ترکیب دارویی می‌باشد.

یکی از راه‌های تاثیر دارو ها، تغییر و تنظیم بیان ژن های کلیدی است که می‌توانند آبشاری از فرآیندهای مولکولی ایجاد کنند. بنابراین می‌توان با ارزیابی میزان تغییر بیان این ژن‌ها به مکانیسم عمل داروها پی برد. یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر محافظت سلول‌ها از سرطانی شدن ژن p53 است. لذا برای بررسی این‌که آیا مکانیسم اثر توپوتکان با مکانیسم‌های مولکولی p53 ارتباط دارد یا خیر، میزان بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با توپوتکان و سلول‌های تیمار نشده اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج بیان ژن p53 در سلول‌های MCF-7 تحت تیمار نسبت به سلول‌های تیمار نشده کاهش بیان ۰/۷ برابری را نشان داد. بیان کاهشی ژن p53 در سلول‌های تیمار شده بیانگر این است که مکانیسم عمل داروی توپوتکان بر مرگ سلول‌های سرطانی از طریق القای بیان ژن P53 نمی‌باشد. هم‌چنین، با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیقات، میزان بیان ژن P53 در سلول‌های توموری تیمار شده با نانوذرات اکسید روی با افزایش بیان ۱/۵ برابر رو به رو شد. این در صورتی است که کاهشی در میزان بیان ژن P53 در سلول‌های توموری تیمار شده با توپوتکان آزاد رخ داد که این کاهش بیان را می‌توان به دنبال مسیر آپوپتوزی غیر وابسته به P53 قلمداد کرد. در حالی که به نظر می‌رسد نانوذره مورد نظر با تحریک ژن P53 از طریق آپاپتوز مرگ سلولی را پیش می‌برد.

هم‌چنین، میزان بیان این ژن در سلول‌های توموری تیمار شده توسط ترکیب نانوذرات و توپوتکان بررسی شد. اگر چه نتایج بیانگر افزایش معناداری بیان ژن P53 (به میزان ۱/۳ برابر) داشت؛ اما میزان تحریک ژن نسبت به نانوذره به تنهایی کم‌تر ولی نسبت به دارو بیش‌تر می‌باشد. این مشاهده بیانگر آن است که نانوذره اکسید روی می‌تواند در ترکیب با داروی توپوتکان نوع مرگ سلولی ایجاد شده با توپوتکان را به سمت مسیرهای با دخالت P53 مانند آپاپتوز تغییر جهت دهد. برای تایید این ادعا و در تکمیل مطالعه حاضر لازم است تست‌های بررسی آپاپتوز نیز انجام شود.

در این مطالعه برای اولین بار به بررسی سمیت داروی توپوتکان و نانوذره اکسید روی رده سلولی سرطانی پستان پرداخته شد و مشخص شد که اثر سمی ZnoNPs و داروی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]

توپوتکان بر علیه سلول‌های MCF7 وابسته به دوز می‌باشد و میزان بقاء سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. هم‌چنین نتایج بیان ژن پیشنهاد می‌کند که نانوذره اکسید روی می‌تواند در ترکیب با داروی توپوتکان نوع مرگ سلولی ایجاد شده با توپوتکان را به سمت مسیرهای با دخالت P53 مانند آپاپتوز تغییر جهت دهد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان از کمک‌های کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک به‌خصوص جناب آقای دکتر عسگری و خانم بیگدلی سپاس‌گذاری می‌نمایند.

منابع

[1] DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2014; 64: 52-62.

[2] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49-53.

[3] Menendez JA, Lupu R. RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells. Int J Mol Med 2005; 15: 33-40.

[4] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997; 88: 323-331.

[5] Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA. The role of the p53 protein in the apoptotic response. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1994; 345: 277-280.

[6] Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, et al. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11307-11311.

[7] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, Connell T, Saito S, Moul JW et al. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. J Biol Chem 2000; 275: 6051-6054.

[8] Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology: History and future. Hum Exp Toxicol 2015; 34: 1318-1321.

[9] Souza LG, Silva EJ, Martins AL, Mota MF, Braga RC, Lima EM, et al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. Eur J Pharm Biopharm 2011; 79: 189-196.

[10] Shen B, Zhao K, Ma S, Yuan D, Bai Y. Topotecan-loaded mesoporous silica nanoparticles for reversing multi-drug resistance by synergetic chemoradiotherapy. Chem Asian J 2015; 10: 344-348.

[11] Nguyen D, Zajac-Kaye M, Rubinstein L, Voeller D, Tomaszewski JE, Kummar S, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition enhances p53-dependent and independent DNA damageresponses induced by DNA damaging agent. Cell Cycle 2011; 10: 4074-4082.

[12] Patankar NA, Waterhouse D, Strutt D, Anantha M, Bally MB. topophore C: a liposomal nanoparticle formulation of topotecan for treatment of ovarian cancer. Invest New Drugs 2013; 31: 46-58.

[13] Mira K, Kwangsu O, Keunchang Ch, Sang-Woo J, So YL. Live-cell monitoring of the glutathione-triggered release of the anticancer drug topotecan on gold nanoparticles in serum-containing media. Chem Commun 2012; 48: 4205-4207.

[14] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med 2014; 5: 927-946.

[15] Shandiz SA, Farasati S, Saeedi B, Baghbani-Arani F, Akbari Asl E, Keshavarz-Pakseresht B, et al. Up regulation of KAI1 gene expression and apoptosis effect of imatinib mesylate in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line. Asian Pac J Trop Dis 2016; 6: 120-125.

[16] Santini D, Stumbo L, Spoto C, D'Onofrio L, Pantano F, Iuliani M, et al. Bisphosphonates as anticancer agents in early breast cancer: preclinical and clinical evidence. Breast Cancer Res 2015; 17: 121.

[17] Wahab R, Dwivedi S, Umar A, Singh S, Hwang IH, Shin HS, et al. ZnO nanoparticles induce oxidative stress in Cloudman S91 melanoma cancer cells. J Biomed Nanotechnol 2013; 9: 441-449.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]

Volume 22, Issue 1 (Winter 2020), 192 – 197

Effect of topotycan and zinc oxide nanoparticles combination on cytotoxicity and P53 gene expression against breast cancer (MCF-7) cell line

Alireza sharifian (M.Sc)[1], Fahimeh Baghbani-Arani (Ph.D)[*1], Hasan Sahebjami (Ph.D)[2]
1 - Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2 - Department of Biophysics, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
* Corresponding author. +98 2136725011 fbaghbani@iauvaramin.ac.ir
Received: 31 Mar 2019; Accepted: 2 Jul 2019

Introduction: Breast cancer is one of the most common malignancies in women worldwide. Today, nanoparticles are one of the hopes of treatment and diagnosis of many diseases, including cancer. the The present study aimed to explore the effect of topotycan and zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) combination on cytotoxicity and P53 gene expression in MCF7 breast cancer cells.

Materials and Methods: Cancerous MCF7 cell line were treated with different concentrations of ZnONPs and topotecan as an anti-cancer drug, separately, as well as combined formulation. Then, the cell viability was evaluated using MTT assay. The expression level of P53 gene was evaluated in treated cells via real time PCR after RNA extraction and cDNA synthesis.

Results: According to MTT results, the ZnONPs and topotecan significantly decreased the viability of MCF7 cells in a dose-dependent manner. Also, the combined effect of ZnONPS and topotecan on the MCF7 cell line at concentrations of 45 mol/ml of zinc and different concentrations of topotecan had an additional toxic effect. Our data revealed that mRNA level of P53 was up regulated (1.3-fold) in cells treated with topotecan combined with ZnONPs.

Conclusion: Our results demonstrated that combination of the topotecan and ZnONPs could have a powerful synergistic cytotoxic effect on breast cancer cell line.

Keywords: Breast Cancer, Zinc Oxide Nanoparticles, P53 gene, Topotecan.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.1.192]