

بررسی اثرات سمی و آپاتوتیک نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز بر روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7

پریسا شیشه‌ساز^۱ (M.Sc)، معصومه مهدوی اورتاکنند^۲ (Ph.D)، مریم بختی^۱ (M.Sc)، فهیمه باغبانی آرانی^۱ (Ph.D)

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

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۰

fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۳۶۷۲۵۰۱۱

چکیده

هدف: نانوذرات سنتز شده با روش‌های زیستی به عنوان یک فاکتور مؤثر ضد سرطان در مطالعات درمانی و تشخیصی در حال توسعه هستند. در این مطالعه، نانوذرات اکسید روی با روش سنتز سبز و توسط عصاره گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*) ساخته شد و اثرات سیتوتوکسیک و آپاتوتیک آن در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نانوذرات اکسید روی توسط عصاره میوه گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*) سنتز و با آنالیزهای Zeta sizer, XRD, EDS, FESEM، میزان سمیت غلظت‌های مختلف نانوذرات بر روی رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 و نرمال HEK-293 با روش MTT بررسی شده و نهایتاً غلظت IC50 تعیین گردید. سپس آنالیز بیان ژن‌های *P53*, *Bcl2*, *Bax* توسط تست Real time PCR انجام شد.

یافته‌ها: با استفاده از عصاره میوه گیاه زیره کرمانی نانوذرات اکسید روی (ZnO) با میانگین اندازه ۱۰۰ نانومتر و شکل چند وجهی ساخته شد. طبق آنالیز XRD نانوذرات سنتز شده دارای ساختار کریستالی تک فاز بوده و ناخالصی ندارد. نتایج MTT نشان داد که اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی در غلظت ۱۶-۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و در سلول‌های نرمال در غلظت ۳۱-۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ قابل مشاهده است ($P < 0/001$). مقدار IC50 طی ۲۴ ساعت برای نانوذرات در رده سرطانی ۱۸/۷ $\mu\text{g/ml}$ و در سلول نرمال ۵۷/۷ $\mu\text{g/ml}$ می‌باشد. نتایج اثر نانوذره بر بیان ژن‌ها نشان‌دهنده افزایش ۲/۷ برابری بیان ژن *P53* در سلول‌های تحت تیمار بود ($P < 0/001$) همچنین افزایش بیان به ترتیب ۶/۲ و ۲/۳ برابری ($P < 0/001$) در بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* مشاهده گردید. نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر ساخت نانوذره اکسید روی با استفاده از عصاره میوه زیره کرمانی با موفقیت انجام پذیرفت. همین‌طور نتایج نشان داد این نانوذرات اثر سمیت مؤثری روی رده سلولی سرطان پستان دارند و احتمالاً این اثر سمیت از طریق القا آپاتوز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، اکسید روی، گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*)، سرطان پستان، سلول‌های MCF-7

مقدمه

سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان در سراسر دنیا در حال افزایش است و متأسفانه سن بروز و تشخیص بیماری رفته رفته کاهش پیدا کرده و انواع بدخیم آن در حال گسترش است. امروزه برای درمان سرطان پستان از روش‌های رایج درمانی شامل جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی استفاده می‌شود [۱،۲]. رویکرد نوین در درمان سرطان‌ها، هدف‌دار نمودن داروهای ضد سرطانی است به طوری که دارو فقط روی سلول‌های سرطانی اثرگذار باشد و همچنین استفاده از حداقل غلظت داروها به گونه‌ای که اثرات سمی دارو روی سلول‌های طبیعی کاهش یابد. در این راستا

می‌توان از نانوذرات به عنوان حامل کمک گرفت [۳]. نانوذرات اکسید فلزات چندی است که به‌عنوان یکی از کاندیدهای درمان سرطان مورد چالش قرار گرفته‌اند. از آنجا که اکسید طبیعی فلزات در مقادیر بسیار زیادی در طبیعت وجود دارند، فرآوری و سنتز این نانوذرات جزو کم‌هزینه‌ترین پروتوکول‌های سنتز می‌تواند باشد [۴،۵]. چنانچه اثر درمانی و ضد توموری این ترکیبات مورد تایید قرار گیرد، این رویکرد می‌تواند قدم مؤثری در پیشبرد روش‌های درمانی در سرطان باشد. مطالعات نشان داده است که نانوذرات اکسید روی (ZnO) به عنوان یک ترکیب امن شناخته شده است و جزو ترکیبات GRAS (Generally Recognized As Safed)

می‌شود [۱۶،۱۷]. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت و آپتوتیک نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*) در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسه مصوب اخلاق. این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین با شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.018 به تصویب رسیده است.

تهیه عصاره گیاه و سنتز نانوذرات اکسید روی: در این مطالعه تجربی، ابتدا میوه گیاه زیره کرمانی از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران خریداری گردید و سپس سنتز نانوذره توسط عصاره آن انجام شد. جهت عصاره‌گیری ۱۰ گرم میوه گیاه زیره کرمانی تایید شده توسط متخصص سیستماتیک گیاهی با هاون پودر شده و در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس محلول رویی را از کاغذ صافی عبور داده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. جهت سنتز نانوذره 0.2% مولار استات روی دو آب $(Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O)$ تهیه و با ۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده مخلوط گردید تا نانوذره تحت شرایط دمایی اتاق و هم‌زدن تهیه گردد و سپس با سود محلول به $PH=11$ رسانده شد. احیای کامل یون‌های روی با طیف‌سنجی و تغییر رنگ محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گذشت ۱۰ دقیقه از زمان واکنش رسوب با آب مقطر شسته شده و در نهایت نانوذرات ZnO با سانتریفوژ سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه از مخلوط جدا گردید و پس از خشک کردن پودر شیری رنگ حاصل جهت مطالعات بعدی در شیشه غیر قابل نفوذ نگهداری شد.

تایید نانوذرات اکسید روی. ارزیابی اندازه و مورفولوژی نانوذره پس از پوشش‌دهی با طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SIGMA VP-500, ZEISS) (SEM) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز EDS (با دتکتور ساخت شرکت Oxford انگلستان) جهت تشخیص ترکیب عناصر موجود در نمونه و خلوص محصول در نقاط معینی از آن و با نقشه‌ای از توزیع عناصر موجود در نمونه با توجه به سطح تصویربرداری شده استفاده شد. آنالیز پتانسیل زتا یکی از آزمون‌هایی است که دستگاه تفرق نور پویا یا DLS در کنار تعیین توزیع اندازه ذرات انجام می‌دهد. این آنالیز با دستگاه زتا سایزر Zetasizer Nano S90 ساخت شرکت Malvern

طبقه‌بندی می‌شود که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا FDA تایید شده است [۶]. طبق بررسی‌ها و مطالعات انجام شده نانوذرات اکسید روی از طریق مجاری تنفسی و جداره روده می‌توانند جذب بدن شوند. این نانوذرات دارای سمیتی هستند که از طریق فعال‌سازی مسیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا ROS باعث حذف سلول‌های توموری می‌شوند. این سمیت اغلب در سلول‌های توموری بیش‌تر است [۷،۸]. سنتز نانوذرات با روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی و زیستی می‌تواند صورت پذیرد. نانوذرات سنتز شده به روش زیستی بخاطر داشتن ویژگی‌های نوین و هم‌چنین سازگاری با محیط زیست نقش مهمی را در پزشکی نوین بر عهده دارند. سنتز سبز نانوذرات روشی دوست‌دار طبیعت که با استفاده از گیاهان گوناگون صورت می‌گیرد و نانوذرات سنتز شده با این روش نسبت به سایر روش‌ها ایمن‌تر و با ثبات‌تر هستند [۹،۱۰]. زیره سیاه، گیاهی چند ساله از خانواده چتریان است که با نام علمی *Bunium persicum* شناخته می‌شود. زیره سیاه کرمانی یکی از گیاهان دارویی در ایران به شمار می‌رود و نشان داده شده که پلی‌فنول‌های موجود در این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند [۱۱].

الفا آپتوتوز یکی از هدف‌های درمانی داروهای ضد سرطانی است. زیرا یکی از مکانیسم‌های ایجاد سرطان فرار از آپتوتوز در سلول است، بنابراین اگر دارویی قدرت الفا آپتوتوز را داشته باشد اثرات درمانی موثرتری خواهد داشت. در آپتوتوز به عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، ژن‌های متعددی نقش ایفا می‌کنند که از آن جمله می‌توان به *Bcl2*, *Bcl-XL*, *Bax*, *Bad*, *Bak*, *Bim* و *P53* اشاره نمود [۱۲]. *P53* نیز یک عامل رونویسی فسفوپروتئینی است که بیان بیش از ۲۵۰۰ ژن هدف را تنظیم می‌کند و با نقش‌آفرینی در فرآیندهای مهم سلولی مانند حفظ ثبات و پایداری ژنوم و الفا آپتوتوز به عنوان یک سرکوبگر تومور مشهور است [۱۳]. جهش‌های *P53* تقریباً در نیمی از تومورهای انسانی یافت می‌شوند و به نظر می‌رسد که بقیه تومورها نیز به علت نقص در مسیرهای مرتبط با *P53* ایجاد می‌شوند [۱۴،۱۵]. در میان تمامی ژن‌های مربوط به آپتوتوز، *P53* اهمیت بسزایی دارد. به نوعی سرکوبگری تکثیر سلولی به دو روش زیر می‌باشد: در یک سلول معمولی *P53* موجب توقف مرحله G1 در پاسخ به عامل آسیب DNA می‌شود. در این حالت سلول فرصت می‌یابد تا ترمیم‌های عملکردی مهم را قبل از ورود به چرخه سیکل سلولی انجام دهد. اما از طرفی دیگر در حالتی که با تکثیر بیش از اندازه و غیر عادی سلول‌ها مواجه هستیم، *P53* آپتوتوز را راه‌اندازی می‌کند و از این طریق مانع ایجاد سرطان

میکرولیتر آب RNase free بود. در این واکنش ژن های *P53*، *Bax* و *Bcl2* به عنوان ژن هدف و ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده در این واکنش در جدول ۱ مشخص شده است. در این تحقیق برنامه زمانی دمایی دستگاه PCR (مدل ABI 7300، Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله آخر دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت تجزیه و تحلیل داده ها مطابق مقایسه چرخه آستانه انجام شده و اختلاف چرخه آستانه به دست آمده از سلول های تیمار شده با نانوذره و سلول های تیمار نشده با عصاره محاسبه شد و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد محاسبه قرار گرفت.

جدول ۱. توالی های پرایمر مورد استفاده

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
<i>P53</i>	F: CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	۱۹۴
	R: CAACCTCAGGCGGCTCATAG	
<i>Bax</i>	F: CGGCAACTTCAACTGGGG	۱۴۹
	R: TCCAGCCCAACAGCCG	
<i>Bcl-2</i>	F: GGTGCCGGTTCAGGTACTCA	۱۱۴
	R: TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG	
<i>Gapdh</i>	F: CCCACTCCTCCACCTTTGAC	۷۵
	R: CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	

آنالیز نتایج: داده ها با نرم افزار تحلیل آماری SPSS نسخه ۲۲ آنالیز گردید. برای بررسی توزیع نرمال داده ها از تست کولموگورف-اسمیرنوف استفاده شد و بدین وسیله توزیع داده ها مشخص گردید. با توجه به نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از روش One-Way ANOVA داده ها مورد آنالیز قرار داده شد؛ و $P < 0.05$ اختلاف معنادار در نظر گرفته شده است.

نتایج

مشاهده تغییر رنگ تدریجی محلول واکنش به زرد، اولین مرحله در تایید سنتز نانوذرات اکسید روی بود و در نهایت نانوذرات پس از سنتز به شکل پودری شیری رنگ در آمدند. در ادامه، ویژگی های نانوذرات سنتز شده توسط آنالیزهای Zeta sizer, XRD, EDS, FE-SEM مورد تایید قرار گرفت.

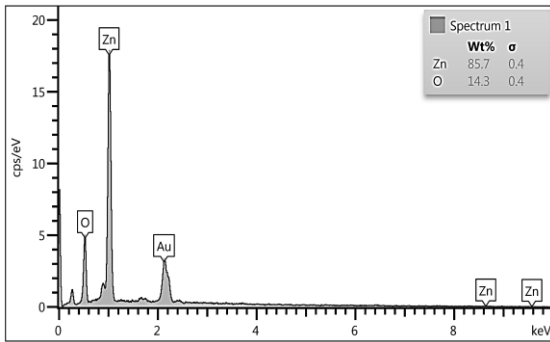
انجام شد. همچنین برای تعیین ترکیب شیمیایی، شناسایی فازها و تعیین سایز کریستالی نانوذرات سنتز شده، نمونه ی تهیه شده تحت آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) (X'Pert Pro, Panalitical) قرار گرفت. در این آنالیز نانوذره با پوشش Cu در محدوده ۰-۱۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

کشت سلولی: رده ی سلولی سرطان پستان MCF-7 و نرمال HEK-293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco, Scotland) در فشار یک اتمسفر و دمای ۳۷ درجه تحت شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند.

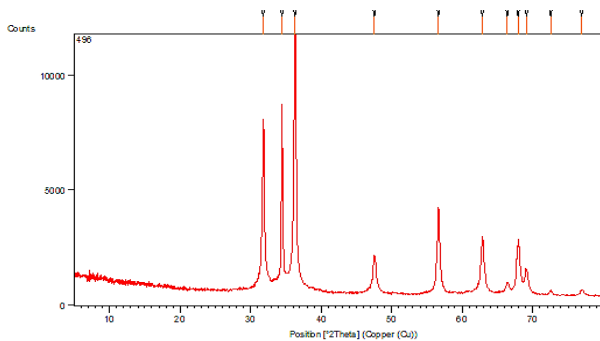
بررسی میزان سمیت نانوذرات ZnO با روش MTT: در این روش رقت های ۸، ۱۶، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول نانوذرات اکسید روی تهیه و رده های سلولی سرطانی و نرمال تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محتوای چاهک ها خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma Aldrich، آلمان) (۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، در تاریکی به پلیت ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. در نهایت پس از گذشت ۴ ساعت رنگ MTT از پلیت خارج شد و کریستال های فورامازان تولید شده توسط سلول های زنده، در محلول DMSO حل گردید. در نهایت میزان شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت گرانی (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) خوانده شد. نتایج حاصل به صورت میزان بقای سلولی به درصد گزارش گردید و غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می شود به عنوان IC50 لحاظ شد. در این تست هر غلظت با هشت بار تکرار انجام گرفت و درصد بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

بررسی بیان ژن با Real Time PCR: در این پژوهش بیان ژن های *P53*، *Bcl2*، *Bax* در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذرات اکسید روی با روش Real Time PCR بررسی گردید. به این منظور ابتدا کل RNA سلول ها با استفاده از کیت استخراج Trans Gene Biotech استخراج شد و سپس سنتز cDNA طبق پروتکل همان کیت صورت گرفت. به منظور انجام واکنش Real Time PCR حجم نهایی هر میکروتیوپ ۲۰ میکرولیتر لحاظ شد که حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی مربوط به هر ژن، ۴۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میکرولیتر mastermix و ۷



شکل ۳: آنالیز EDS نانوذرات اکسید روی سنتز شده



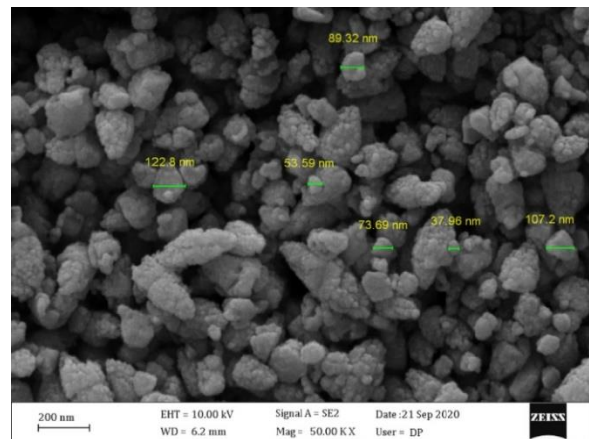
شکل ۴: آنالیز XRD نانوذرات اکسید روی

به طوری که ویژگی‌های سطحی و سایز نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM) مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود نانوذرات به شکل کروی تا چند وجهی بودند و اندازه‌های بین ۳۷ تا ۱۲۲ نانومتر دارند و در تایید آن آنالیز Zeta sizer هم میانگین اندازه نانوذرات را ۱۰۰ نانومتر گزارش کرد (شکل ۲و۱). آنالیز EDS نیز نشان داد که مقدار روی موجود در پودر سنتز شده، ۸۵/۷ درصد و اکسیژن آن ۱۴/۳ درصد است. هم‌چنین تایید کرد که نانوذرات سنتز شده خالص بوده و اثری از ناخالصی عناصر دیگر وجود ندارد (شکل ۳). در آنالیز XRD الگوی پراش اشعه ایکس همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای ساختار کریستالی تک فاز بوده و هیچ پیکی مربوط به ناخالصی مشاهده نمی‌گردد. طیف XRD دارای قله‌های درجه 02 است و به ترتیب، به صفحات بلوری ۱۰۰، ۲۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۱۰، ۱۰۳، ۱۱۲، ۲۰۱ و ۴۰۰ چندوجهی نانوذره ZnO نسبت داده می‌شود و نشان‌دهنده این است که نانوذرات ZnO با تبلور و خلوص بالا تهیه شده‌اند و دارای قله‌های محکم و واضح هستند.

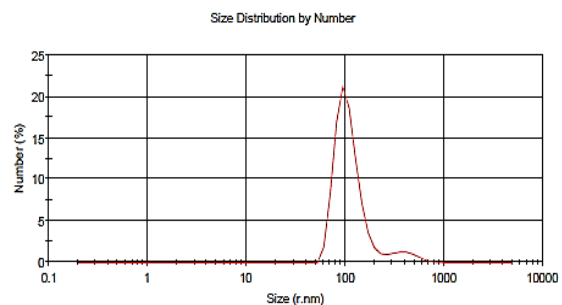
تیمار سلول‌ها با نانوذرات اکسید روی. اثرات نانوذرات اکسید روی، سنتز شده به روش سبز بر رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 و نرمال HEK-293 با روش MTT بررسی گردید و نتایج نشان داد که اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی در غلظت ۱۶-۵۰۰ μg/ml و در سلول‌های نرمال در غلظت ۳۱-۵۰۰ μg/ml قابل مشاهده است ($P < 0.001$). به طوری که نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ‌سنجی در شکل ۵ آمده است. به عبارتی با کاهش غلظت اثر سمیت نیز کاهش می‌یابد و تنها اختلاف اثر کشندگی در رده نرمال و سرطانی در غلظت ۳۱ μg/ml می‌باشد. هم‌چنین مقدار IC_{50} طی ۲۴ ساعت برای نانوذرات زیستی در رده سرطانی ۱۸/۷ μg/ml و در سلول نرمال ۵۷/۷ μg/ml می‌باشد.

نتایج بررسی بیان ژن با روش Real Time PCR

بررسی بیان ژن P53 در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 پس از تیمار با نانوذرات اکسید روی (دوز ۱ μg/ml IC_{50} = ۱۸/۷)، نشان‌دهنده افزایش ۲/۷ برابری بیان ژن P53 در سلول‌های تحت تیمار بود ($P < 0.001$). در حالی که افزایش بیان به ترتیب ۶/۲ و ۲/۳ برابری ($P < 0.001$) بیان ژن‌های Bax و Bcl2 مشاهده گردید.

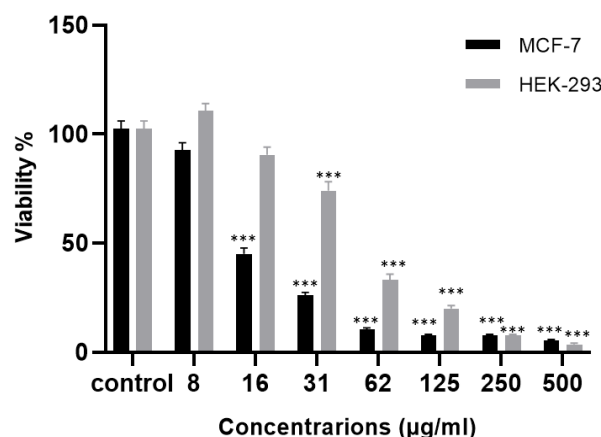


شکل ۱: تصویر SEM نانوذرات اکسید روی

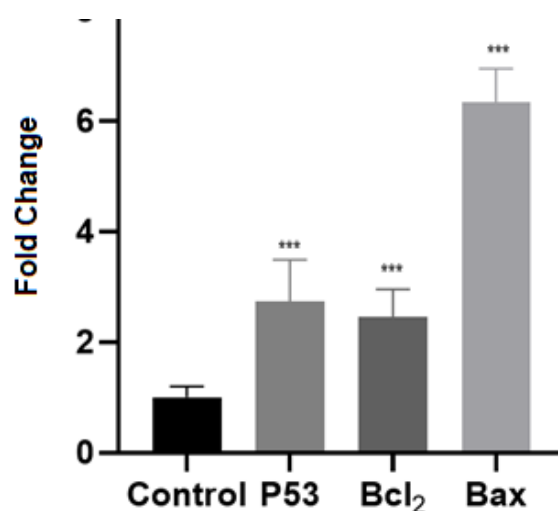


شکل ۲: آنالیز Zeta sizer و تعیین میانگین اندازه نانوذرات اکسید روی

میانگین ۱۰۰ نانومتر بوده و شکل آن چندوجهی است. در مطالعات قبلی که نانوذرات اکسید روی با روش سنتز سبز ساخته شده بود اغلب سایز نانوذرات کم‌تر از مطالعه حاضر بودند به طوری که در سنتز با عصاره گیاه خوراکی - دارویی بن سرخ (*Allium jesdianum*) متوسط سایز ۳۰ نانومتر [۱۸]، در سنتز با عصاره برگ‌های *Mangifera indica* متوسط سایز ۶۰ نانومتر [۱۹] و در سنتز توسط آویشن شیرازی [۲۰] سایز ذرات بین ۳۵ تا ۹۵ گزارش شدند. هرچند در هر سه گزارش شکل نانوذرات شبیه مطالعه حاضر و چندوجهی بودند. با توجه به این‌که سایز و شکل نانوذرات در عملکرد دارویی آن به‌ویژه ورود به سلول و کشتن آن موثر است. همگی این مطالعات هم تاییدکننده اثر کشندگی نانوذرات تولید شده بودند. در مطالعه حاضر نیز نتایج MTT نشان داد که تیمار سلول‌های MCF-7 با نانوذرات اکسید روی طی ۲۴ ساعت، اثرات سمیت و کشندگی بالقوه‌ای بر روی سلول‌ها داشته‌اند و این اثرات کشندگی در غلظت‌های بالاتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل دارد ($P < 0.001$). این در حالی است که طی تیمار سلول‌های نرمال درصد بقا و رشد سلول‌ها در این غلظت‌ها بیش‌تر از سلول‌های سرطانی می‌باشد. این بدان معناست که نانوذرات هم بر روی سلول‌های سالم و هم بر روی سلول‌های نرمال اثر سمیت و کشندگی داشته اما میزان این اثر سمیت در سلول‌های سرطانی بیش‌تر و قابل توجه می‌باشد. هم‌چنین با توجه به نتایج می‌توان غلظت ۱۶ میکروگرم را به عنوان غلظت نهایی در یک فرمولاسیون دارویی پیشنهاد داد زیرا در این غلظت اثر کشندگی اختصاصاً روی سلول سرطانی است و سلول نرمال از نانوذره تأثیر نمی‌پذیرد. در عین حال باید تأکید کرد که نهایتاً نانوذرات در یک فرمولاسیون دارویی ترکیبی و هدفمندسازی شده برای درمان سرطان قابل استفاده خواهد بود. در مطالعات قبلی نیز که نانوذرات اکسید روی با روش سنتز سبز ساخته شده بودند اثربخشی نانوذرات در غلظت‌های زیر ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع شده و با افزایش غلظت افزایش می‌یافت. به طوری که کم‌ترین غلظت موثر مربوط به مطالعه حاضر با حداقل غلظت موثر ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد در حالی که مطالعات قبلی غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر [۲۱]، ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر [۲۲] و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر [۲۳] را گزارش کرده‌اند. نهایتاً میزان IC_{50} در سلول سرطانی ۱۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. بدین معنا که در این غلظت ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی کشته شده و از این غلظت جهت انجام تست Real Time PCR استفاده شد تا ارزیابی بیان



شکل ۵: اثر سمیت غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید روی پس از ۲۴ ساعت بر رده سلولی نرمال HEK-293 و رده سلولی سرطانی MCF-7 ($P < 0.001$) (***)



شکل ۶: بررسی بیان ژن‌های P53, Bcl2, Bax در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 (***) ($P < 0.001$) تیمار شده با غلظت IC_{50} نانوذرات اکسید روی سنتز شده با روش سبز

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان پستان یکی از چالش برانگیزترین بیماری‌ها در حوزه بهداشت و سلامت زنان می‌باشد و بنابراین در دهه‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بهبود روش‌های درمانی و تشخیصی صورت پذیرفته است. با توجه به عوارض روش‌های درمانی موجود و هزینه‌های بالای آن، استفاده از تکنولوژی‌های نوین برای یافتن روش‌های جدید با عوارض و هزینه کم‌تر اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. در این بین استفاده از فناوری نانوذرات به‌ویژه استفاده از تکنولوژی سنتز سبز در تولید نانوذرات دارویی به علت مزایای آن مورد توجه می‌باشد. لذا در این تحقیق با استفاده از عصاره میوه گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*) نانوذرات اکسید روی سنتز شده و سپس اثرات ضد سرطانی آن بررسی گردید. تست‌های تاییدی نانوذرات نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای اندازه

مطالعات و پژوهش‌های پیش‌تری به‌ویژه مطالعات حیوانی با استفاده از این نانوذرات انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی جاوید تشکر می‌کنند.

مشارکت و نقش نویسندگان

فهیمة باغبانی آرانی، ایده و طراحی مطالعه و نهایی کردن نگارش مقاله، پریسا شیشه‌ساز و مریم بختی، انجام آزمایشات و گردآوری داده‌ها، معصومه مهدوی اورتاکند، آنالیز نتایج. همه نویسندگان نتایج را بررسی و نسخه نهایی مقاله را تایید کرده‌اند.

منابع

- [1] Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young woman: an overview. *Update Surg* 2017; 69: 313-317. <https://doi.org/10.1007/s13304-017-0424-1> PMID:28260181
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332> PMID:26742998
- [3] Jiang H, Moon Ks, Li Y, Wong CP. Surface functionalized silver nanoparticles for ultrahigh conductive polymer composites. *Chem Mater* 2006; 18: 2969-2973. <https://doi.org/10.1021/cm0527773>
- [4] Djurišić AB, Leung YH, Ng AM, Xu XY, Lee PK, Degger N, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small* 2015; 11: 26-44. <https://doi.org/10.1002/sml.201303947> PMID:25303765
- [5] Sharma H, Mishra Pk, Talegaonkar S, Vaidya B. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov* 2015; 20: 1143-1151. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.009> PMID:26007605
- [6] 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. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1593> PMID:23621000
- [7] 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. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 845-857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29129> PMID:22393286 PMID:PMC3289443
- [8] Surbone A, T ralongo P. Categorization of cancer survivors: why we need it. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3372-3374. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.3870> PMID:27458280
- [9] Rafiee B, Ghani S, Sadeghi D, Ahsani M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using eucalyptus mellidora leaf extract and evaluation of its antimicrobial effects. *J Babol Univ Med Sci* 2018; 20: 28-35. (Persian).
- [10] Gharbavi M, Johari M, Ghorbani R, Madanchi H, Sharafi A. Green synthesis of Zn nanoparticles and in situ hybridized with BSA nanoparticles for Baicalein targeted delivery mediated with glutamate receptors to U87-MG cancer cell lines. *Appl Organomet Chem* 2023; 37: e6926. <https://doi.org/10.1002/aoc.6926>

ژن‌های آپتوتیک *Bax* و آنتی‌آپتوتیک *Bcl2* و ژن ضد توموری *P53* در تعیین نوع مرگ سلولی صورت گیرد. نتایج حاکی از آن بود که میزان بیان ژن *Bax* و *Bcl2* به ترتیب به مقدار $۶/۲$ ($P < ۰/۰۰۱$) و $۲/۳$ ($P < ۰/۰۰۱$) و ژن *P53* $۲/۷$ ($P < ۰/۰۰۱$) برابر افزایش یافتند. به طور کلی القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپتوز) توسط نانومواد یکی از رویکردهای جذاب در حوزه نانوبیوتکنولوژی به شمار می‌رود. اثر نانوذرات اکسید روی در افزایش بیان ژن‌های دخیل در القاء آپتوز سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۲۰-۲۶]. مسیر آپتوز سلولی می‌تواند شامل به راه‌اندازی رویدادهای پروآپتوتیک اندامک سلولی میتوکندری باشد. این مسیر در پاسخ به سیگنال‌های داخلی فعال شده و منجر به برهم‌کنش‌های پروتئین‌های ویژه‌ای از خانواده *Bcl-2* (*Bcl-2* Family) می‌گردد، از این طریق سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء میتوکندری وارد سیتوزول می‌گردد و با تشکیل کمپلکسی به نام آپتوزوم، مسیر آبخاری کاسپازها فعال می‌شود. ژن *Bax* نیز یک نقطه ورود منحصر به فرد برای مسیر سیگنالینگ آپتوز درونی می‌باشد. پروتئین *BCL2* به عنوان یک مهارکننده آپتوز شناخته شده که سبب تجمع و انتشار سلول‌های حاوی تغییرات ژنتیکی شده و به نظر می‌رسد فعالیت غیرطبیعی ژن *Bcl2* می‌تواند سبب مهار آپتوز و تسهیل فرآیند تومورزایی شود [۱۲]. بالا بودن نسبت *Bax/Bcl2* یکی از شاخصه‌های پیشرفت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق آپتوز می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج و بالا بودن نسبت بیان ژن *Bax* به *Bcl2* توسط نانوذرات اکسید روی سنتز شده، می‌توان گفت که این نانوذره سبب القاء آپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. افزایش بیان ژن *P53* نیز به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور که فعالیت مهار خود را از طریق القاء آپتوز انجام می‌دهد تاییدی بر کشندگی نانوذرات اکسید روی از طریق آپتوز می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره میوه گیاه زیره کرمانی (*Bunium persicum*) با موفقیت سنتز شده و سپس به بررسی سمیت آن روی رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 پرداخته شد و مشخص شد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای اثر سمی علیه رده سلولی MCF-7 بوده و احتمالاً می‌تواند سبب القاء آپتوز از طریق تغییر در بیان ژن آپتوتیک در سلول‌های MCF-7 گردد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد نانوذرات اکسید روی به عنوان گزینه مناسبی در یک فرمولاسیون ترکیبی دارویی جهت درمانی سرطان در نظر گرفته شود و برای بررسی‌های دقیق‌تر،

nanoparticles using *Mangifera indica* leaves and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties in lung cancer (A549) cells. *Enzyme Microb Technol* 2018; 117: 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.009> PMID:30037558

[20] Jahan peymay sabet B, Mahdavi-Ourtakand M, Baghbani-Arani F. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Zataria multiflora* extract and evaluation of its antimicrobial, cytotoxic and apoptotic effects on HT-29 cell line. *Koomesh* 2017; 24: 388-396. (Persian).

[21] Wahab R, Kaushik NK, Kaushik N, Choi EH, Umar A, Dwivedi S, et al. ZnO nanoparticles induces cell death in malignant human T98G gliomas, KB and non-malignant HEK cells. *J Biomed Nanotech* 2013; 9: 1181-1189. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1652> PMID:23909132

[22] Selvakumari D, Deepa R, Mahalakshmi V, Subhashini P, Lakshminarayan N. Anti cancer activity of zinc nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell). *ARPN J Eng Appl Sci* 2015; 10: 5418-5421.

[23] Malaikozhundan B, Vaseeharan B, Vijayakumar S, Pandiselvi K, Kalanjiam MA, Murugan K, et al. Biological therapeutics of *Pongamia pinnata* coated zinc oxide nanoparticles against clinically important pathogenic bacteria, fungi and MCF-7 breast cancer cells. *Microb Pathog* 2017; 104: 268-277. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.029> PMID:28115262

[24] Shandiz SA, Sharifian F, Behboodi S, Ghodrathpour F, Baghbani Arani F. Evaluation of metastasis suppressor genes expression and in vitro anti-cancer effects of zinc oxide nanoparticles in human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D. *Avicenna J Med Biotechnol* 2021; 13: 9-14.

[25] Mozdoori N, Safarian S, Sheibani N. Augmentation of the cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles by MTCP conjugation: Non-canonical apoptosis and autophagy induction in human adenocarcinoma breast cancer cell lines. *Mater Sci Eng C* 2017; 78: 949-959. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.300> PMID:28576071 PMID:PMC6018014

[26] Sharifian A, Baghbani-Arani F, Sahebajami H. Effect of topotecan and zinc oxide nanoparticles combination on cytotoxicity and P53 gene expression against breast cancer (MCF-7) cell line. *Koomesh* 2017; 22: 192-197. (Persian). <https://doi.org/10.29252/koomesh.22.1.192>

[11] Haghirossadat F, Bernard F, Kalantar M, Sheikhha M, Hokmollahi F, Azimzadeh M, et al. *Bunium persicum* (Black Caraway) of Yazd province: Chemical assessment and Evaluation of its Antioxidant Effects. *SSU J* 2010; 18: 284-291.

[12] Xu G, Kuang G, Jiang W, Jiang R, Jiang D. Polydatin promotes apoptosis through upregulation the ratio of Bax/Bcl-2 and inhibits proliferation by attenuating the β -catenin signaling in human osteosarcoma cells. *Am J Transl Res* 2016; 8: 922-931.

[13] Pappas K, Xu J, Zairis S, Zairis S, Resnick-Silverman L, Abate F, et al. P53 maintains baseline expression of multiple tumor suppressor genes. *Mol Cancer Res* 2017; 15: 1051-1062. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0089> PMID:28483946 PMID:PMC5587155

[14] Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers* 2016; 106: 598-612. <https://doi.org/10.1002/bip.22772> PMID:26572807

[15] Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of TP53 variants in clinical practice. *Cancer Res* 2017; 77: 1250-1260. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2179> PMID:28254861 PMID:PMC7457206

[16] Dehghan R, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Babaei E, Montazeri V, Fakhrajoo A. Association of p53 (-16ins-pro) haplotype with the decreased risk of differentiated thyroid carcinoma in Iranian-Azeri patients. *Pathol Oncol Res* 2015; 21: 449-454. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9846-y> PMID:25410025

[17] Jiang XH, Wong BC, Lin MC, Zhu GH, KungHF, Jiang SH, et al. Functional p53 is required for triptolide-induced apoptosis and AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in gastric cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 8009-8018. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204981> PMID:11753684

[18] Karimi N, behbahani M, Dini G, Razmjou A. Green synthesis of ZnO nanoparticles using extract of edible and medicinal plant (*Allium jesdianum*). *Razi J Med Sci* 2018; 25: 1-7. (Persian).

[19] Rajeshkumar S, Kumar SV, Ramaiah A, Agarwal H, Lakshmi T, Roopan SM. Biosynthesis of zinc oxide

Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Green Synthesized Zn Oxide Nanoparticles on the MCF-7 breast cancer Cell Line

Parisa Shishesaz (M.Sc)¹, Masoumeh Mahdavi-Ourtakand (Ph.D)², Maryam Bakhti (M.Sc)¹, Fahimeh Baghbani-Arani (Ph.D)^{*1}

1- Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

2 - Department of Biology, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

* Corresponding author. +98 21-36725011 fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Received: 4 Dec 2022; Accepted: 10 May 2023

Introduction: Today, nanoparticles have been considered an effective anti-cancer factor in cancer therapy and diagnostic studies. In this way, nanoparticles synthesized by biological methods are being developed. This study aimed to green synthesize zinc oxide nanoparticles by *Bunium persicum* and study toxicity and apoptotic effects in breast cancer cell lines.

Materials and Methods: Zinc oxide nanoparticles were synthesized by the fruit extract of *Bunium persicum* and synthesized nanoparticles were evaluated by FESEM, EDS, XRD, and Zeta sizer analyses. Then, the cytotoxicity of ZnO nanoparticles on breast cancer cell line MCF-7 and normal HEK-293 was evaluated by the MTT method within 24 hours, and the IC50 lethality was determined. Finally, P53, Bcl2, and Bax gene expression were analyzed by Real-time PCR.

Results: ZnO nanoparticles with an average size of 100 nm and a polyhedral shape were made using the fruit extract of the *Bunium persicum*. According to the XRD analysis, the synthesized nanoparticles have a single-phase crystal structure and no impurities. Based on the MTT results, ZnO nanoparticles had cytotoxicity effects on cancer cells (in 16-500 µg/ml concentration) as well as normal HEK-293 cells (in 31-500 µg/ml concentration) ($P < 0.001$). The gene expression results indicated a 2.7-fold increase in P53 ($P < 0.001$), 6.2 in Bax, and 2.3-fold in Bcl2 ($P < 0.001$).

Conclusion: The findings indicated that the fabrication of zinc oxide nanoparticles by fruit extract of *Bunium persicum* was done successfully. Also, these nanoparticles have toxicity effects on breast cancer cell lines, and this toxicity is probably due to the induction of apoptosis.

Keywords: Zinc Oxide, Nanoparticles, *Bunium Persicum*, Breast Neoplasms, MCF-7 Cells