

## بررسی سمیت سلولی نانوذره اکسید سریم روی رده سلولی سرطان کلون HT29 و آنالیز بیان ژن‌های آپوتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹

رها نصیری M.Sc.، شهره زارع کاریزی Ph.D.\*، نسیم حیاتی رودباری Ph.D.<sup>۱</sup>، نازنین فرهادیار Ph.D.<sup>۲</sup>

- ۱- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، گروه زیست شناسی، ورامین، ایران
- ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
- ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، گروه شیمی، ورامین، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Shohrehzare@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۰

### چکیده

**هدف:** مطالعه حاضر بررسی اثرات سمیت سلولی نانو ذره اکسید سریم روی رده سلولی سرطانی کلون HT29 و آنالیز بیان ژن‌های آپوتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه سلول‌های HT 29 در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید سریم قرار گرفته و میزان بقای سلول‌ها توسط روش MTT (-4,5)-3-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) اندازه گیری شد. سپس میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ با روش Real Time PCR در سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذره در مدت زمان ۲۴ ساعت و القای آپوتوزیس توسط روش فلوسایتومتری مشخص شد.

**نتایج:** نتایج تست MTT نشان داد که نانو ذره در مدت زمان ۷۲ ساعت و در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین سمیت سلولی را روی رده سلولی HT29 داشته است. همچنین نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان نسبی ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در رده سلولی سرطانی HT-29 تیمار شده با نانوذره به ترتیب به میزان  $(p > 0.05)$   $2.36 \pm 0.76$ ،  $(p > 0.05)$   $3.4 \pm 0.95$  طی ۲۴ ساعت افزایش داشته و نتایج فلوسایتومتری میزان آپوتوزیس ۱۶ درصد در صدی را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** سمیت سلولی نانو ذره اکسید سریم برای سلول‌های سرطانی HT-29 وابسته به دوز و زمان است. که در آینده با مطالعات بیشتر و با هدفمند کردن این نانوذره به‌عنوان یک ترکیب دارویی کاندید جهت اهداف درمانی می‌توان استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** رده سلولی HT29، کاسپاز ۳ و ۹، نانو ذره اکسید سریم

## مقدمه

یکی از این نانوذرات، نانوذره اکسید سریم است. طی مطالعات اخیر نشان داده است که این نانوذره اثر سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی دارد، لذا بررسی‌های بیشتر جهت تعیین عوارض جانبی و استفاده از آن در درمان سرطان‌ها مورد اهمیت می‌باشد (۱۲).

نانو ذرات اکسید سریم از یک سریم احاطه شده توسط شبکه‌های اکسیژن تشکیل شده است. این نانو ذره دارای رفتارهای آنتی اکسیدانتی شامل سوپراکسیداز دیسموتاز، فعالیت آنزیم کاتالیزی، مهار رادیکال اکسید نیتریک و مهار رادیکال هیدروکسیل و هم‌چنین رفتارهای اکسیدانی دارد که شرایط مختلف از قبیل pH محیط نوع فعالیت این نانو ذره را تعیین می‌کند (۱۳). این نانو ذره در سلول‌های پستانداران با مسیره‌های چندانگانه از جمله اندوسیتوز با واسطه گیرنده وارد سلول‌ها می‌شود. نانو ذرات اکسید سریم قادرند فاکتورهای دخیل در فرایند آپوپتوزیس سلولی را از طریق افزایش تولید Reactive Oxygen ROS Species که به‌صورت غیرآنزیمی عمدتاً در میتوکندری به‌ویژه در کمپلکس‌های I و III انتقال الکترون میتوکندری به‌وجود می‌آید را فعال کنند (۱۴). سطح بالای ROS باعث از بین رفتن غشای خارجی و داخلی میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن آبتشار آپوپتوزیسی می‌شود (۱۵). از آنجایی‌که سرطان کلون جز یکی از سرطان‌های شایع در ایران است و فراوانی آن روند رو به افزایشی دارد، در مطالعه حاضر، بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانو ذره سریم اکساید در دستور کار قرار گرفت. زیرا مطالعات گسترده‌ای مبنی بر تاثیر نانوذره مذکور روی سرطان کلون وجود ندارد.

## مواد و روش‌ها

**ویژگی نانوذرات اکسید سریم:** این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران به انجام رسیده است. در این تحقیق نانو ذره اکسید سریم از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان با برند US Nano خریداری شد. اندازه ذرات ۱۰ تا ۳۰ نانومتر و به‌صورت پودر شیری رنگ بود. از نظر مورفولوژیکی ذرات کروی بوده و چگالی سطحی آن ۰/۸ تا

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های غیرطبیعی به‌صورت کنترل نشده تکثیر یافته و می‌توانند بافت‌های مجاور را درگیر کنند. این امر در پی وقوع چند واقعه ژنتیکی از جمله غیر فعال شدن ژن‌های سرکوب گر تومور و فعال شدن آنکوژن‌ها می‌تواند اتفاق بیافتد (۱). ماهیت این وقایع شامل انواع جهش‌ها، فقدان هتروزیگوسیتی، خاموشی اپی‌ژنتیکی رونوشت ژن‌ها توسط هیپرمتیلاسیون پروموتور، تکثیر ژن و وقوع جهش‌های کسب عملکرد می‌باشد (۲). سرطان‌های گوارشی در میان مردان و سرطان سینه از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان است (۳). مطالعات نشان می‌دهد که شیوع سرطان کلون در سن پایین در حال افزایش است و در چند سال آینده به یک مشکل اساسی در سلامت عمومی تبدیل خواهد شد (۴). سرطان کلون زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌های غیر طبیعی در آستر روده بزرگ (کلون) یا راست روده (رکتوم) به‌صورت پولیپ ایجاد می‌شوند (۵)

امروزه از روش‌های مختلف جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمانی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود ولی یکی از معایب و عوارض جانبی این روش‌ها از بین بردن سلول‌های سالم می‌باشد. این امر سبب شده است که محققان به سمت روش‌های جدید درمان با کاهش عوارض جانبی پیش روند (۶ و ۷) این روش‌ها ممکن است به بافت‌های سالم نیز آسیب رسانده و یا بافت‌های سرطانی را ناقص از بین ببرند. نقص در این روش‌ها باعث شده تا محققان به دنبال روش‌های جدید جهت تشخیص و درمان سرطان با عوارض جانبی کمتر باشند (۸). فناوری نانو می‌تواند وسیله‌ای برای هدف قرار دادن مستقیم، انتخابی سلول‌های سرطانی و افزایش اثر بخشی در اختیار پزشکان قرار دهد (۹). نانوذرات در موارد مختلفی مانند رساندن دارو به سلول‌های سرطانی و هم‌چنین جهت تصویر برداری از سلول‌های سرطانی و مشاهده دقیق‌تر آن‌ها کاربرد دارند و دارای پتانسیل خوبی برای تشخیص و درمان سرطان هستند (۱۰). ذرات در اندازه‌های نانومتر می‌توانند به مواد دارویی در ابعاد نانومتریکی متصل شده و به‌صورت اختصاصی توسط سلول‌های سرطانی جذب شوند. با این روش، سلول‌های سالم در معرض مواد دارویی قرار نمی‌گیرند و عوارض جانبی دارو کمتر می‌شود (۱۱).

۱/۱ گرم بر سانتی متر مکعب با در صد خلوص ۹۹/۹۷ درصد گزارش شد.

**کشت رده سلولی سرطان کلون HT29** رده سلولی سرطانی کلون HT-29 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Biosera, USA) غنی شده با ۱ درصد (v/v) پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد رطوبت قرار داده شدند. برای انجام تست‌های بعدی، تراکم سلول‌ها ۸۰ درصد در نظر گرفته شد.

**بررسی سمیت سلولی نانوذره اکسید سربیم با استفاده از تست MTT** برای بررسی سمیت سلولی نانوذره اکسید سربیم روی رده سلولی HT-29 در زمان‌های مختلف از روش MTT Assay استفاده شد. ابتدا تعداد یکسان سلول (۱۰۰۰۰ سلول) در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد. به دنبال آن غلظت‌های میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۱۱۰، ۵۶/۷۸، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲، ۵۰۲۵/۵، ۱۰۰ از نانوذره تهیه شده و در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی رده سلولی HT-29 تاثیر داده شد و ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT به داخل هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. سپس رنگ MTT حذف شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب در طول موج ۵۷۰ یا ۵۹۰ نانومتر با استفاده از (ELISA Reader) Stat (fax bariae ELISA) خوانده شد. تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار و میزان درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\% \text{ Cell inhibition} = 100 - \left[ \frac{(\text{At-Ab})}{(\text{Ac-Ab})} \right] \times 100$$

100 × (میانگین جذب نمونه کنترل / میانگین

جذب نمونه تیمار) - درصد سلول‌های زنده

At = جذب نمونه مورد تست، Ab = جذب نمونه بلانک و Ac = جذب نمونه کنترل است. هم چنین واحد IC50 (غلظتی که ۵۰ درصد سلول‌ها زنده و ۵۰ درصد مرده هستند) نیز محاسبه شد.

**بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ توسط روش Real Time PCR** بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ (Casp3) و ۹ (Casp9) با روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA

سلول‌های تیمار شده و نشده با نانوذره با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن، امریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن توسط دستگاه فتونانومتر (IMPLEN GmbH, آلمان) اندازه گیری شد. سنتز cDNA با کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, آمریکا) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، ۱۰ واحد مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی-زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

در این مطالعه از GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی آغازگرهای رفت و برگشتی ژن هدف Casp3 به صورت:

3'-ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC-5' رفت  
و 3'-GTACCAGAGCGAGATGACA-5' برگشتی  
بود. توالی آغازگرهای رفت و برگشتی ژن هدف Casp9 به صورت:

3'-GGCGGAGCTCATGATGTCTGTG-5'  
رفت و 3'

-TTCCGGTGTGCCATCTCCATCA- برگشتی و

برای ژن مرجع GAPDH:

3'-CGTCTGCCCTATCAACTTTTCG-5' رفت  
و 3'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-5' برگشتی

است. در نهایت واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Light cycler (Bioneer, کره) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه انجام گرفت (۱۶).

**آنالیز میزان آپوپتوزیس/نکروزیس سلول‌های HT29 توسط روش فلوسایتومتری:** به منظور بررسی میزان القای آپوپتوزیس در سلول‌های HT29 تیمار شده

ابتدا سلول‌های HT29 با غلظت‌های ۱/۰، ۵۶/۷۸، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۵۰/۲۵، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید سریم تیمار شدند. سپس درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج سمیت سلولی نشان داد که تیمار سلول‌های HT29 در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان  $۹۴/۵ \pm ۰/۲۶$ ،  $۸۹ \pm ۰/۵۱$ ،  $۸۰ \pm ۰/۳۸$ ،  $۶۸/۵ \pm ۰/۴۱$ ،  $۶۰/۵ \pm ۰/۳۵$ ،  $۵۳/۷ \pm ۰/۲۵$ ،  $۴۰/۵ \pm ۰/۲۹$ ،  $۳۲/۷۵ \pm ۰/۴۵$  شد. همچنین، در مدت زمان ۴۸ ساعت نانوذرات اکسید سریم در همان غلظت‌ها به ترتیب باعث کاهش بقای سلول‌ها به میزان  $۸۵/۳ \pm ۰/۲۵$ ،  $۷۲/۵ \pm ۰/۴۲$ ،  $۶۶/۵ \pm ۰/۴۸$ ،  $۵۰/۵ \pm ۰/۵۲$ ،  $۳۹/۵ \pm ۰/۳۹$ ،  $۳۱ \pm ۰/۳۱$ ،  $۲۰/۷ \pm ۰/۲۷$  و  $۱۶/۷۵ \pm ۰/۲۴$  شد. به دنبال آن، تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های فوق‌الذکر در مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلولی به میزان  $۷۳/۲ \pm ۰/۴۲$ ،  $۵۹/۵ \pm ۰/۲۸$ ،  $۵۱/۲ \pm ۰/۳۲$ ،  $۴۱/۵ \pm ۰/۳۸$ ،  $۲۹/۵ \pm ۰/۵۵$ ،  $۲۳ \pm ۰/۴۷$  و  $۱/۷ \pm ۰/۲۹$  شد (شکل ۱). همچنین، نتایج نشان داد که مقدار IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در سلول‌های سرطانی HT29 به ترتیب  $۳۱/۵۴$ ،  $۶/۰۸$  و  $۲/۹۶$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

با نانوذره اکسید سریم، این سلول‌ها با استفاده از روش Apoptosis ) AnnexinV/propidium iodide (PI (detection kit, Roch, Germany) و دستگاه فلوسایتومتر (Flumax barai flow) بر اساس دستورالعمل مربوطه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های HT29 ( $1 \times 10^5$  سلول/چاهک) با غلظت IC50 نانوذره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده HT29 به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان نکروز/آپتوزیس شده توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفتند.

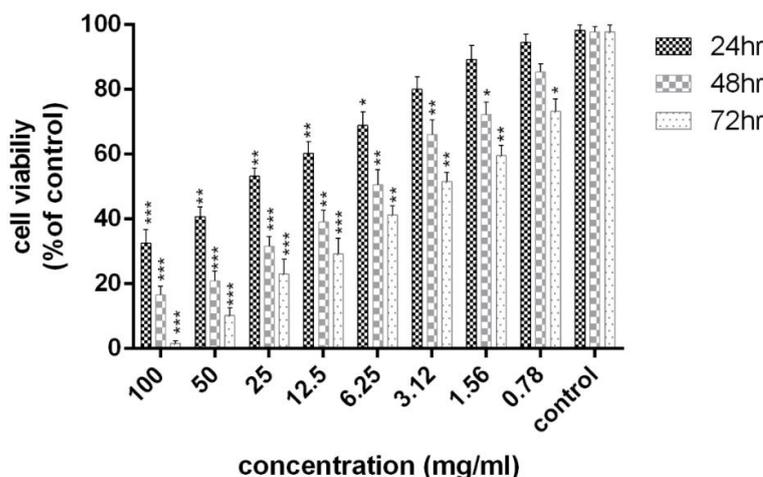
### آنالیز آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام شد و نتایج با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات به صورت  $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$  (SD) نمایش داده شده اند و  $p < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز بیان ژن نیز از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. معنی‌دار بودن یا نبودن نتایج نیز بر اساس آزمون T-test ( $p < 0/05$ ) ارزیابی گردید.

### نتایج

#### نتایج سنجش سمیت نانوذره اکسید سریم با روش

#### آزمون MTT

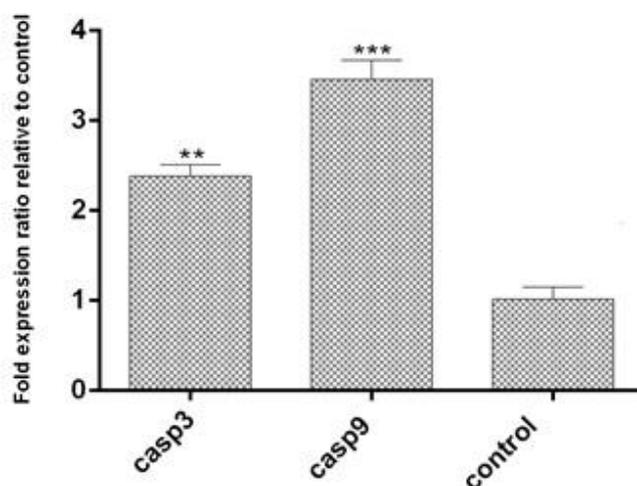


شکل ۱: درصد بقای سلول‌های HT29 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید سریم در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ( $p < 0/05$ :\*)، ( $p < 0/01$ :\*\*)، ( $p < 0/001$ :\*\*\*). (n=3).

در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به‌دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با نانوذره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با نانوذره) محاسبه و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta Ct$  (نسبت ژن هدف به ژن مرجع (GAPDH) از طریق  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های Casp9 و Casp3 نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی HT29 به ترتیب به میزان  $2/36 \pm 0/76$  ( $p < 0/05$ ) و  $3/4 \pm 0/95$  ( $p < 0/05$ ) طی ۲۴ ساعت افزایش یافت (شکل ۲).

### نتایج بررسی بیان ژن‌های Casp3 و Casp9 توسط Real Time PCR

در این تست، تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزیسی Casp3 و Casp9 در سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذره اکسید سرب با استفاده از روش Real Time PCR ارزیابی شد. آنالیز داده‌های Real Time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد آنالیز منحنی ذوب ژن‌های Casp9 در دمای ذوب ۸۲ درجه سانتی‌گراد، GAPDH با دمای ذوب ۸۵/۸ درجه سانتی‌گراد و Casp3 با دمای ذوب ۸۸/۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

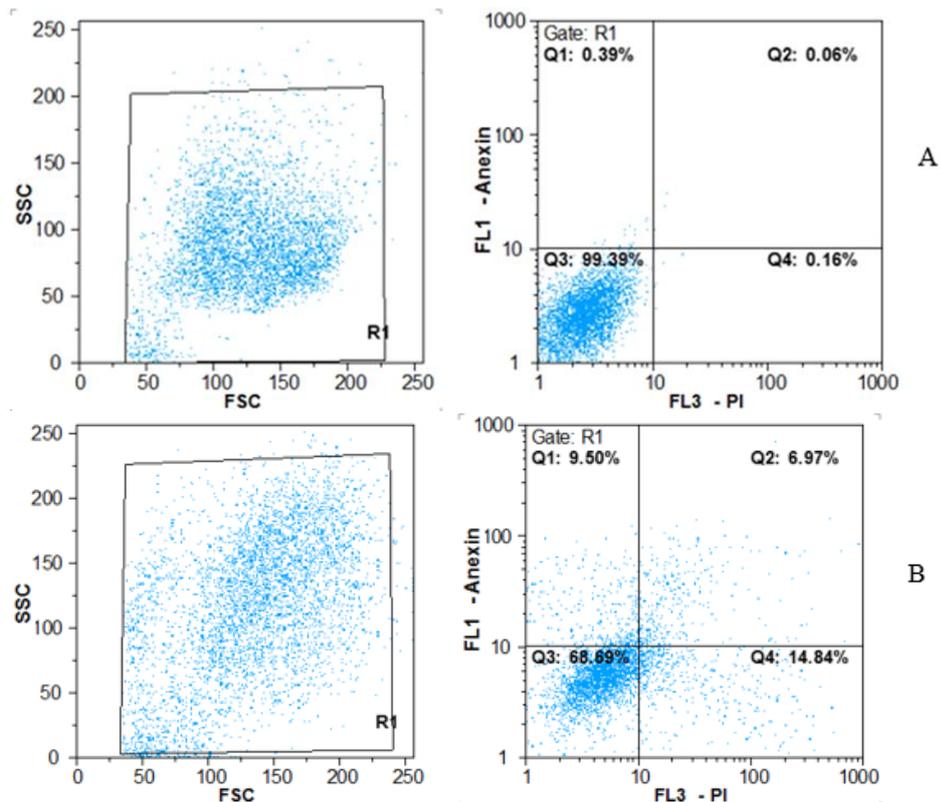


شکل ۲: بیان ژن‌های Casp3 و Casp9 نسبت به ژن مرجع GAPDH در رده سلولی سرطانی کلون HT29 تیمار شده با نانوذره اکسید سرب به ترتیب به میزان  $2/36 \pm 0/76$  ( $p < 0/05$ ) و  $3/4 \pm 0/95$  ( $p < 0/05$ ) طی ۲۴ ساعت افزایش یافت.

در طی فاز اولیه آپوپتوزیس، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا منتقل شده و توسط Annexin V رنگ می‌شود و رنگ PI به هسته در زمان نکروز متصل می‌شود. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده است، دو مربع بالا (Q1 و Q2) میزان آپوپتوزیس را نشان می‌دهد. همان‌طوری که نتایج نشان می‌دهد نانوذره اکسید سرب را ۱۶ درصد سلول‌های HT29 را به سمت آپوپتوزیس هدایت کرده است (شکل ۳).

### نتایج فلوسایتومتری جهت تعیین میزان آپوپتوزیس القا شده در رده سلول‌های سرطانی کلون

به‌منظور بررسی کمی میزان آپوپتوزیس و نکروزیس در بین روش‌ها روش فلوسایتومتری روشی دقیق تر و تکرار پذیرتر می‌باشد که جهت تعیین میزان آپوپتوزیس القا شده در سلول‌های HT29 تیمار شده با نانوذره اکسید سرب، این سلول‌ها با FITC Annexin V and PI رنگ آمیزی شده و توسط روش فلوسایتومتری مطالعه شدند.



شکل ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری تاثیر نانوذره اکسید سریم بروی رده سلولی HT29 (A نمونه تیمار نشده، B) نمونه تحت تیمار. دو مربع کوچک Q1 و Q2 در نتایج، میزان آپوپتوزیس را نشان می‌دهد. همان‌طوری‌که نتایج نشان می‌دهد نانوذره اکسید سریم را ۱۶ درصد به سمت آپوپتوزیس هدایت کرده است.

**بحث**

امروزه ابتلا به سرطان یکی از موارد شایع مرگ و میر در سرتاسر دنیا به‌شمار می‌رود (۱۷). استفاده از روش‌های کنونی شیمی درمانی و رادیوتراپی در درمان سرطان دارای معایبی است. یکی از این معایب آسیب رسیدن به سلول‌های سالم اطراف تومور می‌باشد (۱۸). از این‌رو، یک عملکرد تکنولوژیک نوآورانه برای حل این مشکل با استفاده از نانوذرات به‌عنوان پروب‌های درون سلولی است (۱۹).

در سال‌های اخیر راه‌کار استفاده از نانو ذرات به‌عنوان سیستم حامل برای درمان و انتقال دارو پیشرفت قابل توجهی کرده است (۲۰). یکی از این نانوذرات که توجه محققان را به‌خود جلب کرده است، نانو ذره اکسید سریم است که در سال‌های اخیر از آن به‌عنوان یک عامل درمان برای تعدادی از بیماری‌ها از جمله سرطان در شرایط *in vivo* و *in vitro* استفاده کرده‌اند (۲۱). نانو ذره سریم اکساید یک نانو ذره فلزی است و برای سلول‌های سرطانی سمی است و باعث مهار تهاجم و حساس شدن سلول‌ها به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، محافظت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش آپوپتوزیس در سلول می‌شود. همچنین این نانو ذره باعث مهار متاستاز نیز می‌شود (۲۲). میوفیبروبلاست‌ها تا حد زیادی واسطه سیگنالینگ اپیتلیال و استرومال هستند که نقش مهمی در بیان اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند آلفا اکتین عضلات صاف و کلاژن به‌منظور تسهیل در تهاجم تومور و رگ‌زایی دارد. این نانو ذره دارای توانایی تنظیم کردن تشکیل میوفیبروبلاست و تغییر از فیبروبلاست به میوفیبروبلاست توسط TGF-B1 که ناشی از افزایش بیان ROS وابسته به اکتین عضلات صاف است. همان‌طور که برخی میوفیبروبلاست‌ها در تومورهای مهاجم هستند درمان با

در سال‌های اخیر راه‌کار استفاده از نانو ذرات به‌عنوان سیستم حامل برای درمان و انتقال دارو پیشرفت قابل توجهی کرده است (۲۰). یکی از این نانوذرات که توجه محققان را به‌خود جلب کرده است، نانو ذره اکسید سریم است که در سال‌های اخیر از آن به‌عنوان یک عامل درمان برای تعدادی از بیماری‌ها از جمله سرطان در شرایط *in vivo* و *in vitro* استفاده کرده‌اند (۲۱). نانو ذره سریم اکساید یک نانو ذره فلزی است و برای سلول‌های سرطانی سمی است و باعث مهار تهاجم و حساس شدن سلول‌ها به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، محافظت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش آپوپتوزیس در سلول می‌شود. همچنین این نانو ذره باعث مهار متاستاز نیز می‌شود (۲۲). میوفیبروبلاست‌ها تا حد زیادی واسطه سیگنالینگ اپیتلیال و استرومال هستند که نقش مهمی در بیان اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند آلفا اکتین عضلات صاف و کلاژن به‌منظور تسهیل در تهاجم تومور و رگ‌زایی دارد. این نانو ذره دارای توانایی تنظیم کردن تشکیل میوفیبروبلاست و تغییر از فیبروبلاست به میوفیبروبلاست توسط TGF-B1 که ناشی از افزایش بیان ROS وابسته به اکتین عضلات صاف است. همان‌طور که برخی میوفیبروبلاست‌ها در تومورهای مهاجم هستند درمان با

در سال‌های اخیر راه‌کار استفاده از نانو ذرات به‌عنوان سیستم حامل برای درمان و انتقال دارو پیشرفت قابل توجهی کرده است (۲۰). یکی از این نانوذرات که توجه محققان را به‌خود جلب کرده است، نانو ذره اکسید سریم است که در سال‌های اخیر از آن به‌عنوان یک عامل درمان برای تعدادی از بیماری‌ها از جمله سرطان در شرایط *in vivo* و *in vitro* استفاده کرده‌اند (۲۱). نانو ذره سریم اکساید یک نانو ذره فلزی است و برای سلول‌های سرطانی سمی است و باعث مهار تهاجم و حساس شدن سلول‌ها به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، محافظت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش آپوپتوزیس در سلول می‌شود. همچنین این نانو ذره باعث مهار متاستاز نیز می‌شود (۲۲). میوفیبروبلاست‌ها تا حد زیادی واسطه سیگنالینگ اپیتلیال و استرومال هستند که نقش مهمی در بیان اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند آلفا اکتین عضلات صاف و کلاژن به‌منظور تسهیل در تهاجم تومور و رگ‌زایی دارد. این نانو ذره دارای توانایی تنظیم کردن تشکیل میوفیبروبلاست و تغییر از فیبروبلاست به میوفیبروبلاست توسط TGF-B1 که ناشی از افزایش بیان ROS وابسته به اکتین عضلات صاف است. همان‌طور که برخی میوفیبروبلاست‌ها در تومورهای مهاجم هستند درمان با

Saikat Jana و همکاران (۲۷) تحقیقی در مورد اثر سمیت نانو ذره اکسید سریم روی رده سلولی HCT-15 انجام دادند. در این آزمایش هم ROS و پراکسیداسیون لیپیدی که شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی هستند به مقدار قابل توجهی با توجه به دز افزایش پیدا کرده است.

Lin و همکاران (۲۸) نیز اثر نانو ذره اکسید سریم را روی رده سلول‌های ریه بررسی کردند. در نهایت نتایج تایید کننده این امر بود که نانو ذره اکسید سریم باعث افزایش مرگ سلول‌های سرطانی شده و استرس اکسیداتیو را به سلول القا می‌کند.

مکانیسم دیگر اثرات سمیت سلولی نانوذره اکسید سریم، آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد. در واقع باعث افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی به وسیله شروع مرگ سلولی میتوکندریایی بدون تغییرات شیمیایی و از طریق هدف قرار دادن میتوکندری می‌شود (۲۹). به طور کلی القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوزیس یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میتوکندری توسط پروتئین‌های Bax و Bak شروع شده و موجب آزاد سازی سیتوکروم C از آن و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود (۳۰). علاوه بر این پروتئین‌های Bcl2 و Bclxl با قرار گرفتن در سطح شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری و هسته از کنار هم قرار گرفتن پروتئین‌های Bax و Bak جلوگیری می‌نماید. بنابراین فعالیت ضد آپوپتوزیسی نشان می‌دهند (۳۱). در مطالعه حاضر اثرات نانوذره اکسید سریم در افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی کلون و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی نشان داده شد. اما بررسی‌های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد که آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن‌ها می‌تواند مدرکی برای نقش آن در پیش‌گویی اختصاصی و دقیق تر پاسخ سرطان به درمان باشد؟ علاوه بر این، در بخش فلوسایتومتری، برای ارزیابی میزان آپوپتوزیس و نکروزیس القا شده توسط نانوذره، از غلظت IC50 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره توانایی القای ۱۶ درصدی آپوپتوزیس را دارد. به طور کلی، ظرفیت فلوسایتومتری برای آنالیز سریع و

این نانو ذره باعث کاهش توانایی میوفیبروبلاست در تهاجم سلول‌های سنگفرشی مهاجم می‌شود. همچنین نانوذره سریم اکساید باعث کاهش ذاتی سلول‌های تومور سنگفرشی برای حمله می‌شود (۲۳). در این مطالعه اثرات سمیت سلولی نانوذره اکسید سریم در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف در رده سلولی سرطان کلون مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که این نانوذره بیشترین اثر سمیت خود را در غلظت‌های ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده و اختلاف معنی‌داری با سلول‌های کنترل داشته است ( $p < 0.05$ ) و اثرات سمیت سلولی آن وابسته به دوز است. هم چنین نتایج نشان داد که اثرات این نانوذره وابسته به زمان است، یعنی با افزایش زمان، میزان سمیت سلولی آن نیز افزایش می‌یابد. به طور کلی، با افزایش زمان و غلظت نانوذره، نانوذرات فرصت بیشتری برای ورود سلول پیدا می‌کنند و اثرات سمیت خود را با ایجاد استرس اکسیداتیو (تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن) در درون سلول القا می‌کنند. استرس اکسیداتیو موجب برهم‌زدن هموستازی درون سلولی و برهم‌کنش با ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شوند. به طوری که این استرس اکسیداتیو باعث شکست‌های DNA دورشته‌ای شده و باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۴). مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذره اکسید سریم در رده‌های سلولی مختلف انجام شده است. در مطالعه ای توسط Sandeep و همکاران (۲۵) روی اثر نانو ذره اکسید سریم روی سلول‌های سرطانی ریه (A549) انجام دادند، نشان داده شد که این نانو ذره باعث سمیت قابل ملاحظه و تغییرات مورفولوژیکی در رده سلولی A549 می‌شود.

تحقیق Pešić M و همکاران (۲۶) به بررسی اثر سیتوتوکسیک CONPs روی چند نوع سرطان و رده‌های سلول‌های طبیعی پرداخته و خاصیت تغییر ردوکس داخل سلولی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که CONPs باعث افزایش مرگ سلولی و گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود و بیشترین حساسیت به نانو ذره اکسید سریم در رده سلول‌های 518A2 ملانوما و HT-29 کلورکتال آدنو کارسینوما با ارزش IC50 بالا دیده شد. در نهایت نتیجه‌گیری شد که ROS باعث افزایش مرگ سلولی شده است.

- AcadGeneesk Belg. 2010; 72(5-6): 309-26.
2. Meng X, Zhong J, Liu S, Murray M, Gonzalez-Angulo AM. A new hypothesis for the cancer mechanism. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31(1-2): 247-68.
  3. Kolligs FT. Diagnostics and epidemiology of colorectal cancer. *Visc Med.* 2016; 32(3): 158-64.
  4. Faivre J, Lemmens VE, Quipourt V, Bouvier AM. Management and survival of colorectal cancer in the elderly in population-based studies. *Eur J Cancer.* 2007; 43(15): 2279-84.
  5. Williamson B. Strum, M.D. *New England Journal of Medicine.* 2016; 374: 1065-1075.
  6. Stacey LH, Nikki C. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther.* 2009; 14: 7(2): 254-267.
  7. Golfopoulos V, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Treatment of colorectal cancer in the elderly: a review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2006; 32(1): 1-8.
  8. Aschele C, Bergamo F, Lonardi S. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(6): 509-16.
  9. Ediriwickrema A, Saltzman WM. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS BiomaterSci Eng.* 2015 Feb 9; 1(2): 64-78.
  10. Babu A, Templeton AK, Munshi A, Ramesh R. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *AAPS PharmSciTech.* 2014; 15(3): 709-21.
  11. Ghaz-Jahanian MA, Abbaspour-Aghdam F, Anarjan N, Berenjia A, et al. Application of chitosan-based nanocarriers in tumor-targeted drug delivery. *MolBiotechnol.* 2015; 57(3): 201-18.
  12. Das S, Dowding JM, Klump KE, McGinnis JF, et al. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 2013;

منحصر به فرد تعداد زیادی سلول، آن را برای مطالعات مرگ سلولی ایده آل می‌کند. در این تست، از دو معرف Annexin V که نشان دهنده آپوپتوزیس و پروپیدیوم (PI) که نمایانگر نکروز می‌باشد، استفاده شد. این روش میزان آپوپتوزیس را بر اساس جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین لایه داخلی غشای پلاسمایی به لایه خارجی آن در فاز آپوپتوزیس می‌باشد (۳۲). در این مطالعه نتایج فلوسایتومتری تاثیر نانوذره اکسید سریم نشان داد که این نانوذره توانایی القای آپوپتوزیس را در سلول‌های HT29 را دارد.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره بر روی رده سلولی سرطان کلون خاصیت کشندگی چشم‌گیری دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی این نانوذره انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این نانوذره بیشتر مشخص شود و به‌عنوان یک ترکیب ضدسرطانی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره اکسید سریم دارای اثرات سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطان کلون می‌باشد و می‌تواند آپوپتوزیس را در این سلول‌ها القا کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی این نانوذره انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این نانوذره بیشتر مشخص شود و به‌عنوان یک ترکیب ضدسرطانی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه با عنوان بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذره اکسید سریم در رده سلولی سرطان کلون و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز ۳ و ۹ در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران اجرا شده است.

#### منابع

1. De Wever O, Lapeire L, De Boeck A, Hendrix A. Cellular and molecular mechanisms of cancer cell invasion. *Verh K*

- 8(9):1483-508.
13. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2011; 3(4): 1411-20.
  14. Clark A, Zhu A, Sun K, Petty HR. Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis. *J Nanopart Res*. 2011; 13(10): 5547-5555.
  15. Baumber j, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies Morel MC. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm mobility viability acrosomal integrity mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*. 21(6): 895-902
  16. Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, et al. . Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2000; 6(3): 356-360.
  17. Pukkala E, Martinsen JI, Lynge E, Gunnarsdottir HK, et al. Occupation and cancer - follow-up of 15 million people in five Nordic countries. *Acta Oncol*. 2009; 48(5): 646-790.
  18. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009; 1;1(2): 1-4.
  19. Shannon AM, Williams KJ. Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(8): 1029-36.
  20. Sánchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa JL, Peula-García JM, Marchal JA, et al. Smart drug-delivery systems for cancer nanotherapy. *Curr Drug Targets*. 2016; 27(1): 21-29.
  21. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2011; 3(4): 1411-20.
  22. Ying Gao, Kan Chen, Jin-lu Ma, Fei Gao. 2014. Cerium oxide nanoparticles in cancer. *Dovo press journal*. 27(7): 835-840.
  23. Can Xu and Xiaogang Qu. 2014. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Materials* (2014) 6, e90; doi:10.1038/am.2013.88.
  24. Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2008; 28; 2(10): 2121-34.
  25. Sandeep M, Alok KP. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung Cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *BioMed Research International*. 2014; 14(2): Article ID 891934, 14 pages.
  26. Pešić M, Podolski-Renić A, Stojković S, Matović B, et al. Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity. *elsevire*. 2015; 232:85-93
  27. Saikat Kumar Jana, Priyanka Banerjee, Soumen Das, Sudipta Seal, et al. Redox-active nanoceria depolarize mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014; 16: 2441.
  28. Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol*. 2006; 25(6): 451-7.
  29. Arya A, Sethy NK, Das M, Singh SK, et al. Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential. *Free Radic Res*. 2014; 48(7): 784-93.
  30. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*. 2007; 12(5): 887-96.
  31. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*. 2008; 27 Suppl 1: S93-104.
  32. Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. 2013; 65(2): 157-72.

## **Cytotoxicity of cerium oxide nano-particles (CeO<sub>2</sub>) on colon cancer cell line (HT29) and evaluation of caspase 3 and 9 apoptosis gene expression using Real Time PCR and flow-cytometry methods**

Nasiri R, MSc.<sup>1</sup>, Zare Karizi Sh, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Hayati Roodbari N, Ph.D.<sup>3</sup>, Farhadyar N, Ph.D.<sup>4</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran  
Iran

2. Department of Biology, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

3. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran  
Iran

4. Department of chemistry, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

\* Email corresponding author: Shohrehzare@yahoo.com

Received: 11 Sep. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

---

### **Abstract**

**Aim:** In the current study, effect of cerium oxide nano-particles cytotoxicity was investigated on the colon cancer cell line HT29 and evaluation of caspase 3 and 9 apoptosis genes expression.

**Material and Methods:** In this experimental study, the HT29 cell line was treated with different concentrations of cerium oxide nano-particles, including 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/ml in 24, 48 and 72 hours and the cell viability was determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test. Then, the gene expression level of caspase 3 and 9 genes was evaluated by using Real Time PCR in treated HT29 cell line with IC<sub>50</sub> value during 24 h. Finally, the apoptosis induction was assessed by flow-cytometry.

**Results:** The MTT results show that cerium oxide nano-particles had maximum cytotoxicity on HT29 cell line in 25, 50 and 100 mg/ml concentrations in 72 h. Moreover, the Real Time PCR results indicated that the relative expression level of caspase 3 and 9 was up-regulated significantly ( $2.36 \pm 0.76$  and  $3.4 \pm 0.95$ , respectively) in HT29 cell line treated with nano-particle. The flow-cytometry results revealed the 16% apoptosis in HT29 cell line.

**Conclusion:** Findings showed that the cytotoxicity of cerium oxide was based on time and applied dose. Thus, it appears that this nano-particle could be used in pharmaceutical applications with further studies about selective targeting of cerium oxide nano-particles.

**Key words:** caspase 3 and 9, cerium oxide nanoparticles, HT29 cell line.