



Investigating the cytotoxic effect of zinc oxide nanoparticles conjugated with gingerol on breast cancer cell line

Sadat Mousavi F, Salehzadeh A*

Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Sadat Mousavi F, Salehzadeh A. Investigating the cytotoxic effect of zinc oxide nanoparticles conjugated with gingerol on breast cancer cell line. *Journal of Cell and Tissue*. 2025; 16(1):18-31.

doi <https://doi.org/10.61882/JCT.16.1.18>

KEYWORDS

Apoptosis
Breast Cancer
Flow Cytometry
Zinc Oxide Nanoparticle

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most important and widespread type of cancer in women's population.

Aim: This study was conducted to synthesize zinc oxide nanoparticles conjugated with gingerol (ZnO@CPTMS-Gingerol) and evaluate their anticancer effects on breast cancer cells.

Materials and Methods: To synthesize ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles, one gram of ZnO@CPTMS nanoparticles was dispersed in 30 ml of dry toluene. One gram of gingerol and 10 ml of triethylamine were added to the reaction mixture and refluxed for 24 hours. The product was washed twice with a mixture of distilled water and ethanol (1:1), and the final product was dried at 100°C for 24 hours. Physicochemical properties of ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles were studied by FT-IR, XRD, DLS, EDS, zeta potential measurement, and electron microscope imaging. The inhibitory effects of different concentrations of ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells and HEK293, as normal cells, were evaluated by the MTT test. To perform this experiment, cells were prepared in 96-well cell culture plates with a density of 104 cells/well, and then were treated with concentrations of 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL of ZnO@CPTMS-Gingerol. After incubating the cells for 24 hours at 37°C, 0.2 ml of MTT solution was added to each well. The wells without nanoparticles treatment were considered as controls. After incubation for 4 hours, the supernatant was removed, and 100 µl of DMSO solution was added to each well. After pipetting, the optical density was read at 570 nm using an ELISA Reader. To determine the percentage of apoptotic and necrotic cells, 5×10^5 cells were treated with ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles for 24

* Corresponding author. Tel: 09126932196

E-mail address: a.salehzadeh@iau.ac.ir

DOI: <https://10.61882/JCT/16.1.18>

Received: 15 Nov. 2024; 8 Mar. 2025; Received in revised form: 14 Apr. 2025

Original article

© Author



hours with half inhibitory concentration (IC₅₀). Then, the treated and control cells were stained with annexin V and propidium iodide (PI) dyes. Finally, cell analysis was done by a flow cytometer. Data analysis was done using device software and dividing the points recorded in the two-dimensional curve into four regions including Q1 to Q4. The experiments were performed in three replicates, and the results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical analysis including t-tests, and one-way ANOVA was performed using SPSS. A p<0.05 was considered significant.

Results: Based on the results, the synthesized nanoparticles exhibited a spherical morphology and an approximate size of 10 to 50 nm. The surface charge of these particles in aqueous medium was -30.4 mV. The nanoparticles were free of elemental impurities. FT-IR analysis revealed functional groups of ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles. The evaluation of the crystal structure of ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles by XRD showed that the peaks at values of 2θ equal to 31.84, 34.52, 36.33, 47.63, 56.71, 62.96, 68.13, and 69.18 degrees are related to the hexagonal phase of ZnO nanoparticles. Treatment of breast cancer cells showed that ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles have dose-dependent inhibitory effects, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was 117µg/ml. The exposure of breast cancer cells to ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles increased the population of cells with early and late apoptosis and necrotic cells.

Conclusion: This study showed that ZnO@CPTMS-Gingerol nanoparticles can inhibit the proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis and cell necrosis, and this capability can be considered in the design of effective nanomedicines in the treatment of breast cancer.



بررسی اثر سمیت سلولی نانوذره اکسید روی کنژوگه با جینجرول روی رده سلولی سرطان پستان

فاطمه سادات موسوی، علی صالح زاده*

- گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: سرطان پستان مهم‌ترین و فراگیرترین نوع سرطان در جمعیت‌های زنان به‌شمار می‌آید. این مطالعه با هدف سنتز نانوذره اکسید روی کنژوگه با جینجرول (loregniG-SMTPC@OnZ) و ارزیابی اثرات ضدسرطانی آن بر روی سلول‌های رده سرطان پستان انجام پذیرفت. مواد و روش‌ها: ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانوذره loregniG-SMTPC@OnZ با آنالیزهای RI-TF، DRX، SLD، SDE، سنجش پتانسیل زتا و عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. اثرات مهار غلظت‌های مختلف نانوذره loregniG-SMTPC@OnZ بر روی سلول‌های رده سرطان پستان 7-FCM با آزمایش TTM ارزیابی شد. به‌منظور تعیین جمعیت سلول‌های آپوپتوزیس/نکروزیس شده از آزمایش فلوسیتومتری استفاده شد. نتایج: بر اساس نتایج، نانوذرات سنتز شده دارای مورفولوژی کروی و با اندازه حدودی ۰۱ تا ۰۵ نانومتر بودند. بار سطحی ذرات در محیط آبی ۰۳/۴- میلی ولت بود. نانوذرات فاقد ناخالصی عنصری بودند و سنتز صحیح آن‌ها با آزمایش‌های RI-TF و DRX تأیید شد. تیمار نانوذرات با سلول‌های سرطان پستان نشان داد که نانوذره loregniG-SMTPC@OnZ دارای اثرات مهار و وابسته به دوز و غلظت نیمه مهاری (05CI) میلی‌لیتر بود. مواجهه سلول‌های سرطان پستان با نانوذره loregniG-SMTPC@OnZ ۷۱۱/ میکروگرم سبب افزایش جمعیت سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه و تاخیری و سلول‌های نکروزی شد. نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که نانوذره loregniG-SMTPC@OnZ می‌تواند با القای آپوپتوزیس و نکروزیس سلولی سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطان پستان شود و این قابلیت می‌تواند در طراحی نانو داروهای مؤثر در درمان سرطان پستان مد نظر قرار گیرد.</p>	<p>آپوپتوزیس سرطان پستان فلوسایتومتری نانوذره اکسید روی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳</p>

۱- مقدمه

سرطان پستان به‌عنوان مهم‌ترین و شایع‌ترین نوع سرطان در جمعیت زنان در سراسر دنیا شناخته می‌شود (۱). بر اساس آخرین گزارش‌ها، سرطان پستان سبب مرگ سالیانه حدود ۷۰۰ هزار نفر می‌شود و میزان موارد جدید سالیانه آن هم حدود ۲/۳ میلیون مورد تخمین زده می‌شود. این بیماری دارای فنوتیپ‌های مختلفی بوده که در پاسخ به هورمون‌ها و فاکتورهای رشد سلولی رفتارهای متفاوتی را نشان می‌دهند و این امر بر ویژگی‌های متاستاتیک و پاسخ به شیمی درمانی آنان اثرگذار است (۲). شیوع و گسترش بسیار بالا، روند بیماری‌زایی متنوع، متاستاز به اندام‌های دور و نزدیک به ویژه ریه و بروز مقاومت دارویی از مهم‌ترین

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۲۶۹۳۲۱۹۶

آدرس پست الکترونیک: a.salehzadeh@iau.ac.ir

چالش‌ها در زمینه درمان این بیماری به شمار می‌آید. عمل جراحی و به دنبال آن انجام شیمی درمانی به‌عنوان اولین مداخلات پزشکی در درمان این بیماری به‌شمار می‌آیند. تاکنون داروهای متعددی به‌منظور درمان این بیماری معرفی شده است که از اثربخشی قابل قبولی بر روی سلول‌های سرطانی برخوردار هستند (۳). در عین حال، اغلب داروهای شیمی درمانی دارای اثرات سمیت سیستمیک هستند به این معنی که سبب آسیب به بافت‌ها و سلول‌های غیر سرطانی می‌شوند. علاوه بر سمیت انتخابی، دسترسی زیستی و پایداری از فاکتورهای تعیین کننده در میزان اثربخشی داروهای ضدسرطانی می‌باشند (۴).

طراحی و فرمولاسیون نانو داروها به‌عنوان رویکرد جدیدی در زمینه شیمی درمانی ضد سرطان شناخته می‌شود. در این گونه از داروها، مولکول‌هایی با ابعاد نانو طراحی می‌شوند که یا خودشان دارای اثرات ضدسرطانی هستند یا به‌عنوان یک بستر تثبیت و پایدار کننده مولکول‌های زیست فعال همچون آنتی‌بادی‌ها، اسیدهای نوکلئیک، پپتیدها، داروهای شیمیایی و یا مواد طبیعی استفاده می‌شوند (۵). مطالعات در زمینه طراحی نانو داروها به‌منظور مهار تکثیر و گسترش سلول‌های سرطانی به‌طور فزاینده‌ای در حال انجام می‌باشد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که روش‌های دارورسانی در ابعاد نانو می‌تواند مزیت‌هایی همچون بهبود اثر بخشی، افزایش زیست سازگاری، پایداری بیشتر و اثرات سمیت سیستمیک کم‌تر فراهم آورد. علاوه بر این، امکان دستیابی دارورسانی هدفمند و همچنین شیمی درمانی ترکیبی با توسعه نانو داروها در حال افزایش است (۶). نانوذره اکسید روی به‌عنوان یکی از پرکاربردترین محصولات نانو در زمینه زیست-پزشکی شناخته می‌شود. اکسید روی از زیست سازگاری مناسبی برخوردار بوده و اثرات سمیت سیستمیک کمتری در مقایسه با بسیاری از نانوذرات فلزی دیگر دارا است. وجود ویژگی‌های داروشناسی متعددی همچون فعالیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضدسرطانی از یک سو، و سمیت پایین و پایداری مناسب از سوی دیگر، سبب شده‌اند که نانوذرات اکسید روی در مطالعات فناوری‌های نانو در زمینه‌های زیست پزشکی مورد توجه دو چندان قرار گیرد (۷).

جینجرول یک ترکیب زیست فعال طبیعی است که به‌طور عمده در گیاه زنجبیل یافت می‌شود و به‌دلیل ویژگی‌های دارویی خود به‌ویژه فعالیت ضدسرطانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که جینجرول می‌تواند سبب مهار تکثیر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی همچون سرطان پستان، پروستات، کولون و غیره شود (۸). گزارشات پیشین نشان داده‌اند که این ماده قادر به القای آپوپتوزیسی و مهار تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی است (۸). اگرچه، مشابه با بسیاری از ترکیبات طبیعی زیست فعال، بهبود حلالیت، پایداری و دسترسی زیستی از جمله چالش‌هایی هستند که باید همراه با کاربردهای بالینی این ماده مورد توجه قرار گیرد. علیرغم مطالعات پیشین در زمینه خواص دارویی جینجرول، مطالعات کمتری به بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی این ماده با استفاده از نانو محصولات پرداخته‌اند. بر این اساس، مطالعه پیش رو با هدف فرمولاسیون نانوذره اکسید روی کنژوگه با جینجرول (ZnO@CPTMS-Gingerol) و ارزیابی اثرات ضد سرطانی آن بر روی سلول‌های رده سرطان پستان انجام پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات: در مرحله اول نانوذره اکسید روی به‌روش هم رسوبی سنتز شد. در ابتدا ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار از ماده روی اکسید ZnO در آب مقطر تهیه شد و سپس pH محلول را به کمک NaOH ۱۰ درصد به حدود ۱۱ افزایش داده شد. سپس مخلوط حاصل را روی هیتر داخل حمام روغن داغ با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار داده شد. رسوب حاصل را به کمک سانتریفیوژ جداسازی و چندین بار به کمک آب مقطر و سپس اتانول شستشو داده شد تا pH خنثی

پیدا کند. در نهایت رسوب به دست آمده را به مدت ۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. در مرحله بعد، نانوذره اکسید روی با استفاده از ۳ کلرو پروپیل تری متوکسی سیلان ((3- CPTMSenalisyohtemirt(lyporporolhC) عامل دار شد. به این منظور، یک گرم از نانوذره ZnO در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و با دستگاه اولتراسونیک سونیکه شد. سپس روی هیتر قرار گرفت و به دمای ۸۰ درجه سانتی گراد رسانده شد. در مرحله بعد ۲۰ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. سپس محلول ۳-کلرو پروپیل تری متوکسی سیلان (CPTMS) (۸ درصد در اتانل) به صورت قطره قطره افزوده شد و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد هم خورد. نانوذرات حاصل سه بار با مخلوط آب مقطر و اتانول شستشو شدند و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت خشک شدند. مرحله نهایی، به منظور سنتز نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol، یک گرم از نانوذره ZnO@CPTMS در ۳۰ میلی لیتر تولوئن خشک پراکنده شد. مقدار یک گرم جینجرول و ۱۰ میلی لیتر تری اتیل آمین به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت تقطیر شد. محصول دو بار با مخلوط آب مقطر و اتانول (۱:۱) شسته شد محصول نهایی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. مراحل سنتز نانوذره بر اساس روش گزارش شده توسط Habizadeh و همکاران (۹) انجام پذیرفت.

آنالیزهای تأیید کننده سنتز ZnO@CPTMS-Gingerol: به منظور ارزیابی گروه‌های عاملی سطحی T آزمایش FT-IR با استفاده از دستگاه اسپکترومتر شرکت Perkin Elmer (Spectrum 100) و در محدوده جذبی $4500-500 \text{ cm}^{-1}$ انجام پذیرفت. آزمایش پراش اشعه ایکس (XRD) با هدف ارزیابی ساختار کریستالی نانوذرات و با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس (PW1730، فیلیپس هلند) با طول موج 1.54056 \AA (Cu-K α X-ray tube، $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$) انجام شد. همچنین، آزمایش‌های DLS و سنجش پتانسیل زتا به منظور سنجش اندازه و بار سطحی ذرات در محیط آبی با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری شرکت HORIBA (مدل SZ-100، ژاپن) انجام شدند. عکس برداری با میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره شرکت Tescan مدل MIRA3 و گذاره شرکت Zeiss آلمان مدل Zeiss-EM900 انجام شد. آنالیز پراکندگی انرژی اشعه (SDE) نیز برای تشخیص عناصر تشکیل دهنده نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM شرکت Tescan (MIRA3)، جمهوری چک) انجام شد.

ارزیابی اثرات ضدسرطانی نانوذره: در این مطالعه از سلول‌های رده MCF-7 به عنوان سلول‌های رده سرطان پستان و سلول‌های 392KEH به عنوان رده نرمال استفاده شد. سلول‌های مذکور از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و از محیط RPMI640 برای تکثیر و آماده‌سازی سلول‌ها استفاده شد. به منظور بررسی اثر نانوذره Gingerol-ZnO@CPTMS بر زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان پستان از آزمایش MTT استفاده شد. معرف MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است که جذب میتوکندری سلول‌های فعال از نظر متابولیک شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروناز، تولید بلور فورمازان بنفش رنگ می‌کند که در دی متیل سولفوکساید حل شده و میزان رنگ تولید شده با نشانگر میزان زنده‌مانی سلول‌ها است. برای انجام این آزمایش، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی با تراکم 10^4 سلول/چاهک آماده‌سازی شدند و سپس ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol، ۳۱/۱۵، ۵/۱۵، ۲۵/۱۵ با غلظت‌های ۶۲۵ تیمار شدند. چاهک‌های فاقد نانوذره به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و برای هر غلظت آزمایش در سه تکرار انجام شد. پس

از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول MTT به هر چاهک افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، مایع رویی حذف شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیمایش، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA Reader (مدل: Elx 800، آمریکا) خوانده شد (۱۰).

درصد بقای سلول‌های رده سرطانی پستان که با نانوذره ZnO@ CPTMS-Gingerol تیمار شدند با استفاده از فرمول‌های a و b محاسبه شد:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = 1 - \frac{\text{mean absorbance of toxicant treated cells}}{\text{mean absorbance of negative control}} \times 100 \quad (\text{a})$$

$$\% \text{ Viability} = 100 - \% \text{ cytotoxicity} \quad (\text{b})$$

آنالیز میزان آپوپتوزیس/نکروزیس سلول‌ها توسط روش فلوسایتومتری: به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوزیس شده در یک جمعیت سلولی از سلول‌های تیمار شده با نانوذره IoregniG-SMTPC @OnZ، ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با نانوذره مذکور و در غلظت نیمه مهاری (IC₅₀) تیمار شدند. سپس سلول‌های تیمار شده و شاهد با تعداد ۵×۱۰^۵ سلول بارنگ‌های V و پروپیدیوم یدید (PI) با استفاده از دستورالعمل کیت (Apoptosis detection kit, Roch, Germany) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری (Bio-Rad, ZE5) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه Q₁ تا Q₄ صورت گرفت.

۳- آنالیز آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. آزمون‌های مقایسه‌ای مورد استفاده نیز شامل t تست و آنالیز واریانس یک‌طرفه و محاسبه p-value بود که با استفاده از SPSS انجام و p < ۰/۰۵ در هر آزمون، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

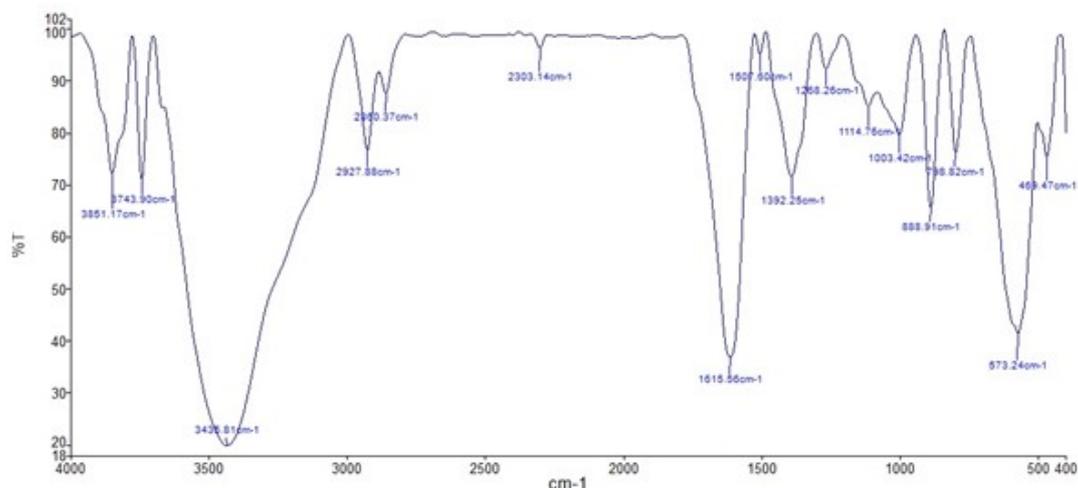
۴- نتایج

ویژگی‌های نانوذره

بر اساس طیف FT-IR نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol در نوار FT-IR برای نانوذرات روی طول موج‌های جذبی شدید در ۴۶۹ cm⁻¹ ناشی از پیوندهای Zn-O مربوط به یون‌های Zn²⁺ می‌باشد. لذا وجود این طول موج‌ها تایید کننده حضور فلز اکسید روی هستند. در نوار FT-IR مربوط به جینجرول، طول موج‌های در ۸۸۸، ۵۷۳، ۷۹۸ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H، C-H، C-H، C-N، C=C، C=O می‌باشد. همچنین طول موج جذبی ۱۳۹۲، ۱۶۱۵، ۲۳۰۳ مربوط به پیوندهای C-C، C=N، C-O است.

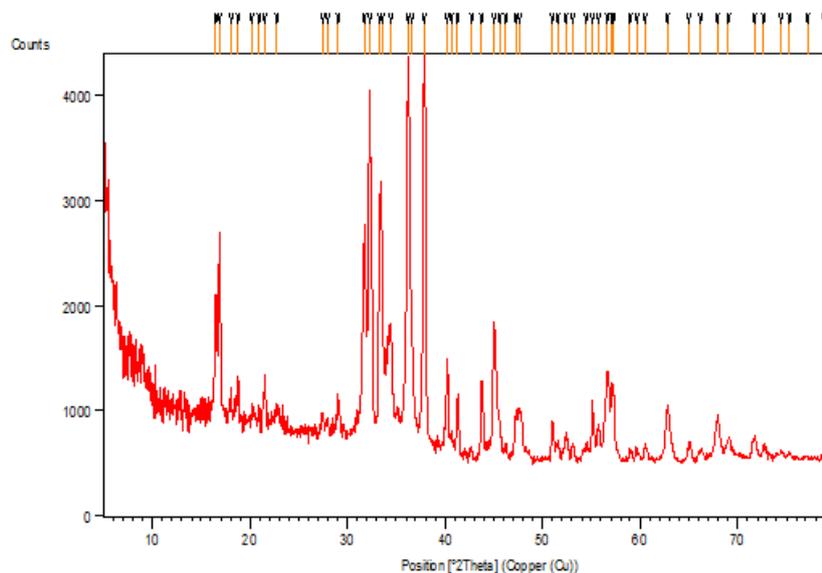
طول موج‌های ۲۹۲۷ و ۳۴۳۶ نیز مربوط به پیوندهای OH می‌باشند که تایید کننده حضور آب در نانوذره نهایی می‌باشد. با توجه به وجود پیک‌های مربوط به روی و جینجرول در ساختار نانوذره، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره SMTPC @OnZ-

loregniG به درستی سنتز شده است. شکل ۱ طیف RI-TF نانوذره سنتز شده را نمایش می‌دهد.



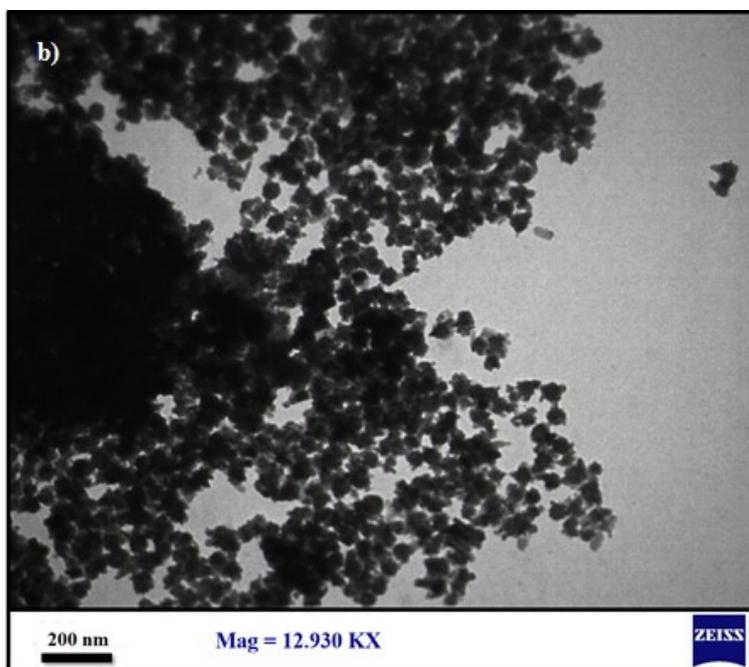
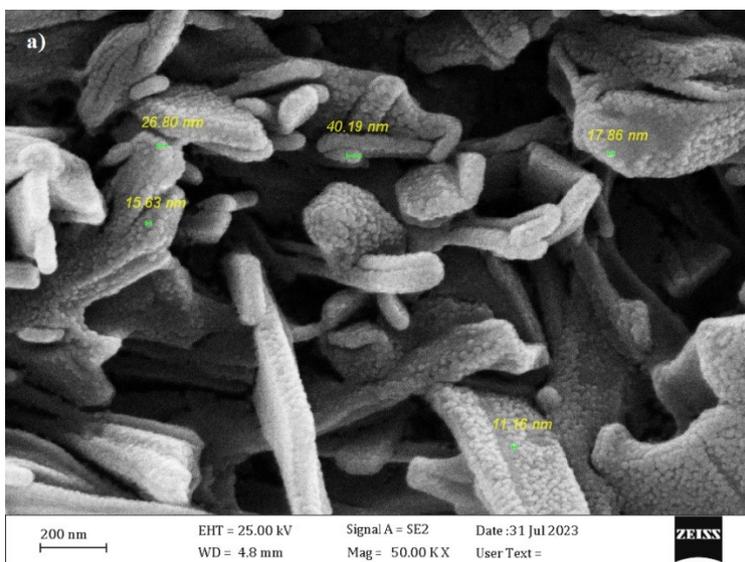
شکل ۱: طیف FT-IR نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol

ارزیابی ساختار کریستالی نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol نشان دهنده پیک‌هایی در مقادیر 2θ برابر ۳۱.۸۴، ۳۴.۵۲، ۳۶.۳۳، ۴۷.۶۳، ۵۶.۷۱، ۶۲.۹۶، ۶۸.۱۳ و ۶۹.۱۸ درجه است که به فاز شش ضلعی ZnO مربوط می‌باشند و مطابق با شماره کارت ۱۴۵۱-۳۶ است (شکل ۲).



شکل ۲: طیف XRD نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol

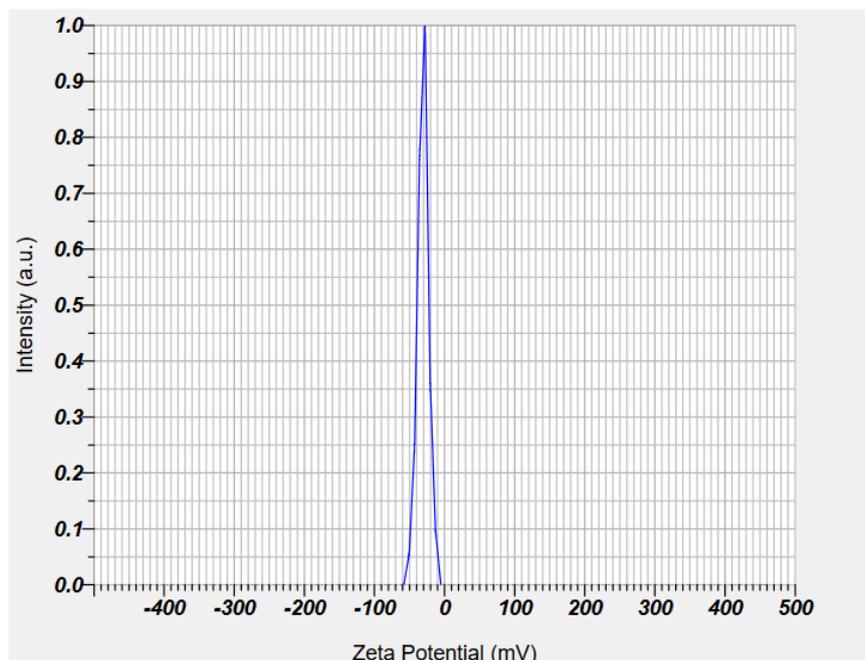
ریخت شناسی، اندازه و پراکنش نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol در تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۳) قابل مشاهده است. بر اساس نتایج، نانوذره مذکور دارای ابعادی در محدوده تقریبی ۱۰ تا ۵۰ نانومتر هستند و دارای ظاهری تقریباً کروی می باشند.



شکل ۳: تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره (a) و گذاره (b) از نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol. اندازه ذرات ۱۰ تا ۵۰ نانومتر و شکل ذرات کروی می باشد.

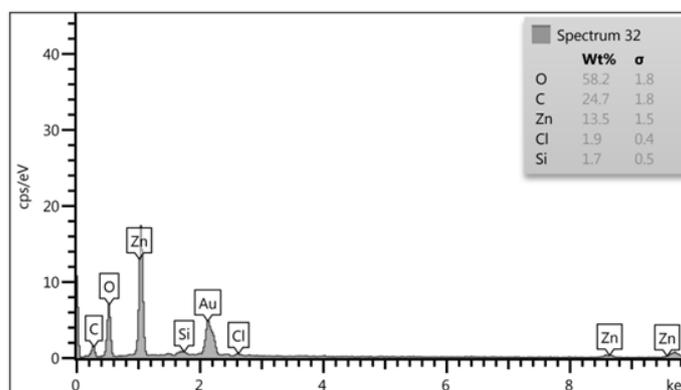
سنجش بار سطحی و اندازه نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol در محیط آبی نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای بار سطحی ۳۰/۴- میلی ولت است. نتایج در شکل ۴ نمایش داده شده است.

Zeta Potential (Mean) : -30.4 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000235 cm²/Vs



شکل ۴: اندازه گیری پتانسیل زتا نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol

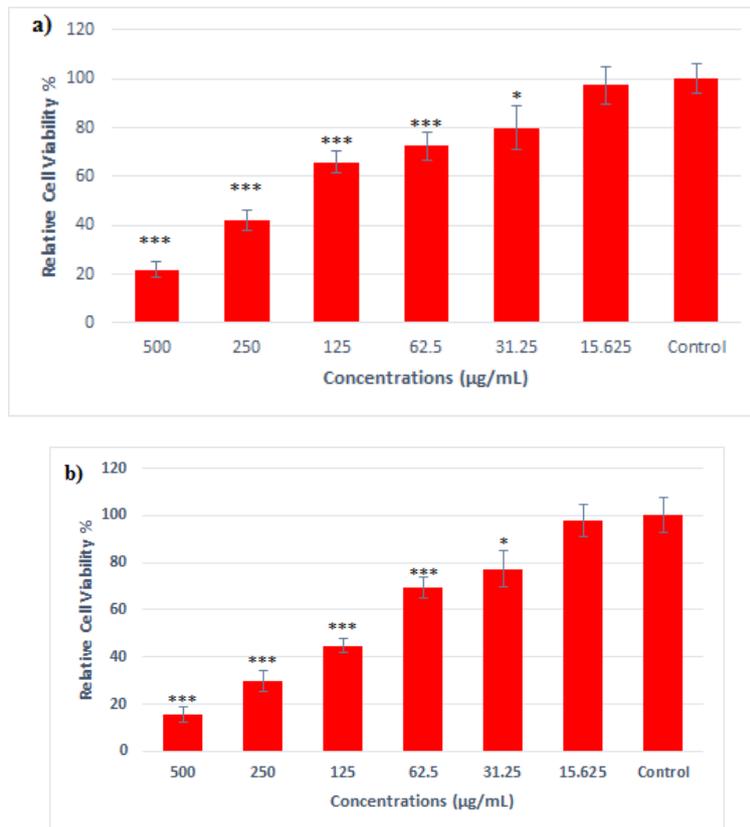
آنالیز عنصری نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol توسط آنالیز EDS نشان داد که نشان داد که عناصر O و C و Zn و Cl و Si در نمونه نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol وجود دارند و نانوذرات فاقد آلودگی عنصری هستند (شکل ۵).



شکل ۵: آنالیز عنصری نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol

سنجش زنده مانگی سلول‌های رده سرطان پستان

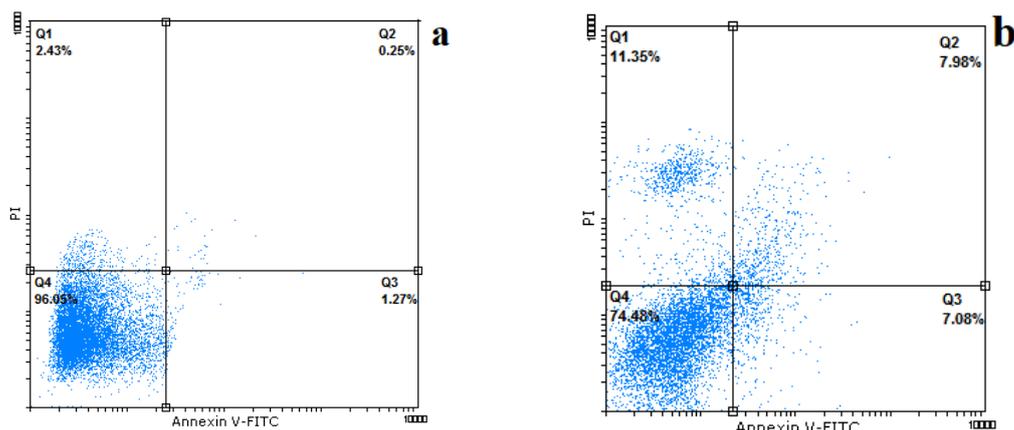
ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌های رده سرطان پستان و نرمال نشان داد که نانوذره ZnO@CPTMS-Gingrol دارای اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت بر سلول‌های مورد مطالعه هستند. غلظت نیمه مهاری نانوذره مذکور بر سلول‌های رده سرطان پستان ۱۱۷ میکروگرم/میلی‌لیتر بود در حالی که این شاخص در مورد سلول‌های نرمال ۱۷۳ میکروگرم/میلی‌لیتر است. نتایج زیستایی سلول‌های مورد مطالعه در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره در شکل ۶ نمایش داده شده است.



شکل ۶: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO@CPTMS-Gingrol بر زیستایی سلول‌های نرمال (a) و سلول‌های سرطان پستان (b) در زمان ۲۴ ساعت (نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه کنترل گزارش شده است). (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

میزان آپوپتوزیس و نکروزیس سلول‌های تیمار شده توسط روش فلوسایتومتری

نتایج فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوذره ZnO@CPTMS-Gingrol نشان داد که حدود ۷/۰۸ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس اولیه، ۷/۹۸ درصد دچار آپوپتوزیس تاخیری و ۱۱/۳۵ درصد هم دچار نکروزیس شده‌اند. در گروه شاهد، میزان آپوپتوزیس اولیه و تاخیری به ترتیب ۱/۲۷ و ۰/۲۵ درصد بود. ضمن اینکه میزان نکروزیس سلولی در این گروه ۲ درصد بود. نتایج در شکل ۷ نمایش داده شده‌اند.



شکل ۷: آنالیز فلوسایتومتری سلول های رده سرطان پستان. (a) شاهد و (b) تیمار شده با نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol.

در سلول های تیمار شده میزان آپوپتوزیس اولیه و تاخیری و نکروزیس سلولی افزایش دارد.

۵- بحث

میزان شیوع و نرخ مرگومیر بالای ناشی از سرطان پستان یکی از مهم ترین چالش های بهداشتی در همه نقاط دنیا به شمار می آید. بر این اساس توسعه داروهای جدید موثر بر سلول های سرطان پستان از اهمیت پژوهشی بالایی برخوردار است، به ویژه مطالعات در زمینه فرمولاسیون نانو داروها که می تواند مزایای متعددی در مقایسه داروهای سنتی داشته باشد. بر این اساس در این پژوهش به فرمولاسیون و ارزیابی اثرات ضد سرطانی نانوذره ZnO@COTMS-Gingerol بر روی سلول های رده سرطان پستان پرداخته شد.

در این مطالعه از CPTMS به منظور عامل دار کردن نانوذرات استفاده شد. این ماده به طور رایج برای عامل دارسازی سطحی نانوذرات به منظور تسهیل کنژوگه کردن آنان با لیگاندهای مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. بررسی اثر نانوذره سنتز شده بر زنده ماندن سلول های سرطانی نشان داد که ZnO@COTMS-Gingerol دارای اثر مهاری بر روی سلول های سرطانی بوده و در غلظت ۱۱۷ میکروگرم/میلی لیتر سبب کاهش ۵۰ درصدی زیستایی سلول های سرطانی می شود. علاوه بر این، تیمار سلول های سرطان پستان با نانوذره مذکور سبب افزایش جمعیت سلول های آپوپتوزیسی و نکروزیزی می شود. اثرات ضد سرطانی نانوذره ZnO@COTMS-Gingerol را می توان با فعالیت سیتوتوکسیک نانوذره اکسید روی و جینجرول مرتبط دانست. مطالعات پیشین مکانیسم های مختلفی را برای فعالیت ضد سرطانی نانوذره اکسید روی پیشنهاد کردند.

هم سو با نتایج این پژوهش zidnahS tadaS و همکاران (۰۱) نشان دادند که نانوذره اکسید روی دارای اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت بر روی سلول های رده سرطان پستان 7-FCM و D74T می باشد در حالی که اثرات سیتوتوکسیک به مراتب خفیف تری بر روی سلول های رده نرمال دارد. آنان گزارش کردند که نانوذره اکسید روی می تواند سبب افزایش توقف چرخه سلولی در فاز G1، القای آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپازی در سلول های سرطان پستان شود.

اثرات ضد سرطانی نانوذره اکسید روی را با افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و استرس اکسیداتیو می توان مرتبط دانست. مطالعات پیشین نشان داده اند که نانوذرات فلزی از جمله اکسید روی می تواند سبب افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن شود (۱۱). این رخداد سبب آسیب به اجزای مختلف ساختاری و متابولیک سلول می شود و در نتیجه سبب توقف چرخه سلولی می شود. آسیب به DNA به عنوان مهم ترین مکانیسم سیتوتوکسیک ناشی از استرس اکسیداتیو شناخته می شود. در صورت عدم

ترمیم به موقع آسیب‌های وارده، این فرایند سبب فعال‌سازی فاکتورهای پیش برنده آپوپتوزیس از جمله کاسپازها و پروتئین مهارکننده تومور p53 شده و سبب مرگ سلول می‌شود (۱۲).

علاوه بر نانوذره اکسید روی، اثرات سیتوتوکسیک نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol به‌میزان زیادی به حضور مولکول‌های جینجرول مرتبط است. مکانیسم‌های ضدسرطانی جینجرول در مطالعات پیشین به خوبی نشان داده شده است. Lin و همکاران (۱۳) نشان دادند که جینجرول می‌تواند از طریق توقف چرخه سلولی و افزایش بیان و فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ سبب القای آپوپتوزیس و مرگ سلول‌های سرطانی شوند. فعال‌سازی کاسپازهای ۸ و ۹ به‌عنوان عوامل پیش برنده آپوپتوزیس‌های بیرونی و داخلی در نظر گرفته می‌شوند که نقش بسیار مهمی در راه اندازی آبشار کاسپازی و پیشروی آپوپتوزیس بر عهده دارند (۱۴). علاوه بر این، گزارش شده است که جینجرول می‌تواند سبب اتصال و آسیب به DNA سلول و همچنین مهار فعالیت آنزیم‌های همانندسازی و رونویسی شده و به این ترتیب با اختلال در فرایند چرخه سلولی سبب القای آپوپتوزیس می‌شود (۱۵).

برخی از مطالعات به بررسی اثر ضدسرطانی نانوذرات حاوی جینجرول پرداختند، اگر چه اغلب این مطالعات معطوف به استفاده از پلیمرهای طبیعی یا سنتزی بوده‌اند و از فرمولاسیون نانوذرات فلزی کنژوگه با جینجرول گزارشات معدودی در دسترس می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Akbarzadeh و همکاران (۱۶) انجام شد، اثر ضد سرطانی نانوذرات SiO₂ بارگزاری شده با جینجرول بر روی سلول‌های سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفت. آنان مشاهده کردند که بارگزاری جینجرول بر روی نانوذرات سبب افزایش پتانسیل سیتوتوکسیک نانوذرات شده و از طریق افزایش بیان ژن‌های پروآپتوزیس از جمله *Bax* و *caspase-9* و کاهش بیان ژن‌های آنتی آپوپتوزیس همچون *Bcl-2*، *cyclinD* و *cyclinE* سبب توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 و بروز آپوپتوزیس می‌شود. نتایج مشاهده شده در این مطالعه از جمله مهار تکثیر سلول رده سرطان پستان و افزایش سلول‌های آپوپتوتیک در اثر تیمار با نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol با مطالعه Akbarzadeh و همکاران مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای که توسط Alkinani و همکاران (۱۷) انجام شد، اثر نانوذره Fe₃O₄@Glucose-Gingerol روی رده سلولی آدنوکارسینوم ریه (A549) بررسی گردید. نانوذرات Fe₃O₄@Glu-Gingerol سمیت قابل توجه بیشتری را در سلول‌های A549 نسبت به رده سلولی نرمال با غلظت IC₅₀ به ترتیب ۱۹۰ و ۵۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. تیمار سلول‌های A549 با نانوذرات Fe₃O₄@Glu-Gingerol منجر به افزایش آپوپتوز سلولی از ۴/۶ به ۳۹/۴۸ درصد شد. همچنین، بیان ژن‌های *CASP8* و *BAX* به ترتیب ۲/۴۹ و ۲/۸ برابر افزایش یافتند. نتایج مشاهده شده در این مطالعه، از جمله مهار تکثیر رده سرطانی پستان با افزایش غلظت نانوذره و افزایش سلول‌های دچار آپوپتوز در اثر تیمار با نانوذره ZnO@CPTMS-Gingerol با مطالعه Alkinani و همکاران هم راستا می‌باشد.

۶- نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانوذره اکسید روی کنژوگه با جینجرول سنتز شد و اثرات آن بر روی زیستایی و آپوپتوزیس/نکروزیس سلول‌های سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذره ZnO@CPTMS-gingerol دارای اثرات مهاری وابسته به دوز بر روی سلول‌های سرطان پستان است و با افزایش درصد آپوپتوزیس اولیه و تاخیری و نکروزیس سلولی سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. بر اساس نتایج این مطالعه، نانوذرات اکسید روی می‌توانند به‌منظور بستری پایدار برای ارائه جینجرول به سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گیرند.

۷- منابع

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021 May;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Caldarella A, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Urso C, Biancalani M, Zappa M. Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis. *Pathology & Oncology Research*. 2011 Sep;17:753-8. . doi: 10.1007/s12253-011-9381-z
3. Saloustros E, Mavroudis D, Georgoulas V. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2008 Oct 1;9(15):2603-16.
4. Bilia AR, Piazzini V, Risaliti L, Vanti G, Casamonti M, Wang M, Bergonzi MC. Nanocarriers: A successful tool to increase solubility, stability and optimise bioefficacy of natural constituents. *Current Medicinal Chemistry*. 2019 Jul 1;26(24):4631-56. . doi: 10.2174/0929867325666181101110050
5. Kim K, Khang D. Past, present, and future of anticancer nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*. 2020 Aug 6:5719-43.
6. Dong P, Rakesh KP, Manukumar HM, Mohammed YH, Karthik CS, Sumathi S, Mallu P, Qin HL. Innovative nano-carriers in anticancer drug delivery-a comprehensive review. *Bioorganic chemistry*. 2019 Apr 1;85:325-36. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.01.019
7. Mishra PK, Mishra H, Ekielski A, Talegaonkar S, Vaidya B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug discovery today*. 2017 Dec 1;22(12):1825-34. doi: 10.1016/j.drudis.2017.08.006
8. Nafees S, Zafaryab M, Mehdi SH, Zia B, Rizvi MA, Khan MA. Anti-cancer effect of gingerol in cancer prevention and treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2021 Mar 1;21(4):428-32. doi: 10.2174/1871520620666200918100833
9. Habibzadeh SZ, Salehzadeh A, Moradi-Shoeili Z, Shandiz SA. Iron oxide nanoparticles functionalized with 3-chloropropyltrimethoxysilane and conjugated with thiazole alter the expression of BAX, BCL2, and p53 genes in AGS cell line. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*. 2023 Feb 1;53(2):191-8. doi: 10.1080/24701556.2021.2025074
10. Shandiz SA, Sharifian F, Behboodi S, Ghodrattpour 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 Journal of Medical Biotechnology*. 2021 Jan;13(1):9. doi: 10.18502/ajmb.v13i1.4576
11. Hassan HF, Mansour AM, Abo-Youssef AM, Elsadek BE, Messiha BA. Zinc oxide nanoparticles as a novel anticancer approach; in vitro and in vivo evidence. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2017 Feb;44(2):235-43.. doi: 10.1111/1440-1681.12681
12. Kim SJ, Kim HS, Seo YR. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2019 (2019), 5381692. doi: 10.1155/2019/5381692

13. Lin CB, Lin CC, Tsay GJ. 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2012;2012. doi: 10.1155/2012/326096.
14. Stegh AH, Peter ME. Apoptosis and caspases. *Cardiology clinics*. 2001 Feb 1;19(1):13-29.doi: 10.1016/S0733-8651(05)70192-2.
15. Chakraborty, D., Bishayee, K., Ghosh, S., Biswas, R., Mandal, S.K. and Khuda-Bukhsh, A.R., 2012. Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: drug–DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. *European journal of pharmacology*, 694(1-3), pp.20-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.08.001>.
16. Akbarzadeh, I., Poor, A.S., Khodarahmi, M., Abdihaji, M., Moammeri, A., Jafari, S., Moghaddam, Z.S., Seif, M., Moghtaderi, M., Lalami, Z.A. and Heydari, M., 2022. Gingerol/letrozole-loaded mesoporous silica nanoparticles for breast cancer therapy: In-silico and in-vitro studies. *Microporous and Mesoporous Materials*, 337, p.111919. doi: 10.1016/j.micromeso.2022.111919.
17. Alkinani, T.A., Bajgiran, F.A., Rezaei, M., Maivan, A.M., Golrokh, F.J., Bejarbaneh, M., Mojdehi, S.R., Gorji, S., Ghasemian, R., Sarai, M.D.J.P. and Akbari, F., 2024. Evaluation the cytotoxic effect of Fe₃O₄@ Glu-Gingerol on lung adenocarcinoma cell line (A549) with biological mechanisms. *Heliyon*, 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23419>.