

القای آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان سینه (4T1) توسط نانوذره بر پایه نارینگین

شمیم نجاتی، M.Sc.، حسین غفوری، Ph.D.*، سودا زارعی، Ph.D.

- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، رشت، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: H.ghafoori@guilan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۷

چکیده

هدف: هدف اصلی این مطالعه توسعه و توصیف نانوذرات لیپیدی جامد (NRG-SLN) در رده سلولی سرطان پستان 4T1 بود. **مواد و روش‌ها:** نانوذرات لیپیدی جامد حاوی NRG با امولسیون سازی با ذوب داغ و روش همگن سازی با سرعت بالا تهیه شدند. سمیت سلولی NRG-SLN ها با اندازه گیری میزان زنده ماندن سلول‌های 4T1 با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. علاوه بر این، القای پروتئین‌های پیش آپوپتوزیس و سرکوب پروتئین‌های ضد آپوپتوزیس توسط NRG-Slns با استفاده از روش وسترن بلات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **نتایج:** NRG-SLN های تهیه شده دارای اندازه متوسط ۸۴ نانومتر، پتانسیل زتا ۲۱- میلی ولت و بازده گیرافتادن ۷۳،۱۷ درصد بودند. مقادیر IC₅₀ سلول‌های 4T1 تیمار شده با NRG-SLN در ۲۴ ساعت ۲۰ میکرومولار و در ۴۸ ساعت انکوباسیون ۲ میکرومولار بود. تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که NRG-SLN ها می‌توانند نسبت Bax/BCL2 را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهند. هم‌چنین سطح پروتئین 1KSA-p، xab و سیتوکروم c در گروه تیمار افزایش یافت. **نتیجه گیری:** در نتیجه، NRG-SLN ها ممکن است پتانسیل مهار رشد و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی سینه 4T1 را داشته باشند.

واژگان کلیدی: فلاونوئید، نارینگین، SLN، رده سلولی 4T1، آپوپتوزیس

مقدمه

سرطان عارضه‌ای است که بیش از ۲۰۰ نوع متفاوت از آن تاکنون شناخته شده که هر کدام به شیوه‌های خاص و باروشی مشابه شروع می‌شد یعنی با تغییر در ساختار طبیعی یک سلول، که در نهایت منجر به تشکیل تومور می‌شود. دو نوع تومور وجود دارد: خوش خیم و بدخیم. تومورهای خوش خیم سرطان نیستند ولی تومورهای بدخیم همان سرطان‌هایی هستند که می‌توانند به قسمت‌های مجاور بدن حمله کرده و مانع فعالیت سلول‌های سالم آن منطقه شده و درعین حال گسترش یافته و به نقاط دیگر بدن، در مکانی دور از محل اولیه تجمعاتی از سلول‌های غیرطبیعی را ایجاد و موجب متاستاز شوند (۱). بعد از سرطان پوست، شایع‌ترین و مهم‌ترین نوع کشنده سرطان تشخیص داده شده عصر حاضر به‌خصوص در زنان، سرطان سینه است (۲) که ناشی از تکثیر و رشد نامنظم سلول‌های بافت پستان، از قبیل سلول‌های پوششی مجاری شیری یا لوبول‌های تولیدکننده شیر می‌باشد و شمار اندکی به بافت‌های دیگر مربوط می‌شد (۳).

برای مقابله و درمان سرطان امروزه روش‌های زیادی از جمله جراحی و شیمی درمانی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد، از آن جایی که مقاومت دارویی و آسیب سلول‌های طبیعی از مشکلات اساسی شیمی‌درمانی می‌باشد، به‌نظر می‌رسد با هدف قرار دادن ترکیباتی که موجب فعال شدن آنزیم‌های دخیل در فرآیند آپوپتوزیس می‌شود، بتوان درمان بدون عوارض جانبی را باعث شد (۴).

آپوپتوزیس یک فرآیند کنترل شده سیگنالینگ سلولی می‌باشد که به‌وسیله مسیر بیرونی گیرنده‌های مرگ در غشای سلولی و یا مسیر درونی وابسته به میتوکندری هدایت می‌شود. کاسپازها از اعضای اصلی فرآیندهای آپوپتوزی بوده که هر دو مسیر موجب فعال شدن آن می‌شود (۵). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم مسیر درونی دارند، و شامل چندین پروتئین پروآپوپتوزی مانند Bak و Bax می‌باشد که منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندری و انتشار سیتوکروم C به‌سیتوزول می‌شود که با فاکتور فعال‌کننده پروتئازی آپوپتوز ۱ (Apaf-1) منجر به تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم، و درنهایت باعث فعال سازی کاسپاز ۹، ۳، ۷ می‌شود که آپوپتوزیس را اجرا می‌کنند (۶). تعادل نسبی پروتئین پروآپوپتوزی (Bax) و پروتئین آنتی آپوپتوزی (Bcl-2) باعث حفظ هموستاز سلولی می‌شود. اختلال در تنظیم آپوپتوزیس یکی از ویژگی‌های اساسی زیست‌شناسی سرطان است و بینش‌های جدید در زمینه درمان سرطان و طراحی دارو ارائه می‌دهد (۷).

فلاونونوئیدها، گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه و هم‌چنین منبعی از ترکیبات فعال زیستی در گیاهان هستند که علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانتی، ضدالتهابی، ضد فشار خون و ضدآلرژی دارای خاصیت ضدسرطانی می‌باشند (۸). یکی از فراوان‌ترین بیوفلاونونوئیدها در گریپ فروت، فلاونونوئید نارینگین (۴، ۵، ۷، ۵-تری هیدروکسی فلاونون-۷-L-β-رامنولگلوکوزید-۱،۲) α-D-گلوکوپیرانوزید است که در ساختار خود دارای فلاونون و دی‌ساکارید نیوهسپریدوس می‌باشد که فراوان‌ترین فلاونونوئید موجود در مرکبات است و مصرف آن غیرسمی، غیرآلرژیک و فاقد عوارض جانبی می‌باشد (۹). همچنین یکی از اجزای اصلی فعال در داروهای طب چینی به شمار می‌رود. گروه‌های قندی متصل به نارینگین در فرایند جذب از طریق دستگاه گوارش اختلال ایجاد کرده و مانع انتشار فعال آن توسط غشاهای بیولوژیکی می‌شد (۱۰).

حلالیت کم برخی از داروها در آب و کم بودن قابلیت زیستی مولکول‌های دارویی جدید یکی از مشکلات اساسی می‌باشد. بدین منظور، نیاز به توسعه سیستم‌های دارورسانی که به این مشکلات فایده‌آید ضروری به‌نظر می‌رسد. امروزه نانوذرات لیپید جامد (SLN) به‌عنوان سیستم‌های حامل برای کاربردهای زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است. از مزیت‌های آن در مقایسه با سایر سیستم‌های کلوییدی می‌توان به کنترل آزادسازی دارو و افزایش در پایداری شیمیایی داروهای وارد شده به آن، اشاره کرد. علاوه بر این حامل‌های ایمنی بوده، در مقیاس بالا به راحتی تولید گشته و موجب افزایش عمل‌کرد و تنوع در اشکال دارویی می‌شدند. فرمولاسیون دقیق این ذرات منجر به پایداری بیشتر آن‌ها شده، انحلال را تسریع کرده و سرعت رسیدن به سطوح بیولوژیکی را افزایش می‌دهد، در نتیجه موجب سرعت بخشی به اثر درمان و بهبود قابلیت زیستی آن‌ها می‌شود (۱۱). در همین راستا در مطالعه حاضر، با توجه به نقش نارینگین به‌عنوان متابولیت ثانویه و هم‌چنین منبعی از ترکیب فعال زیستی در گریپ فروت، نانوذره‌ای بر پایه آن سنتز کرده و اثرات آن بر روی رده سلولی 4T1 بررسی شد. شایان ذکر است که پروتئین شوک حرارتی Bcl-2 و p-AKT نقش‌های آنتی آپوپتوزیس و آنکوژنیک را ایفا می‌کند. بنابراین مهار آن به‌عنوان یک راه بالقوه برای درمان سرطان به کار می‌رود.

مواد و روش‌ها

مواد شيميايي: مواد مورد استفاده جهت كشت سلول: محيط كشت‌هاي DMEM، RPMI 1640 بدون phenol red، سرم جنين گاوي (FBS) و آنتي‌بيوتيك پني‌سيلين-استرپتوميسين (Pen/Strep) از شركت سيگما آلدريج و رده سلولي سرطان سينه موش (4T1) از انستيتو پاستور ايران بخش بانك سلولي خريداري شد. هم‌چنين تركيب نارينگين به‌صورت آماده و ساير مواد شيميايي مورد استفاده جهت سنتز (SLN) از كمپاني مرک تهیه شد.

سنتز: براي آماده كردن نانوذره حاوي تركيب مورد مطالعه (نارينگين) به پلوکسامر، آب مقطر، كامپريتول، تويين ۲۰ و نارينگين نيازمنديم. روش كار بدین صورت می‌باشد: در يك فالكون، به ۴۵۰ ميلي گرم پلوکسامر ۲۰ ميلي ليتر آب مقطر افزوده و در داخل بشر پر از آب قرار داده و آن را روی Heater تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظيم می‌نماییم، سپس ۵۰۰ ميلي گرم كامپريتول را در همان بشر روی Hretaer قرار داده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌کنیم، ۱۰۰ ميكروليتر تويين ۲۰ را به كامپريتول ذوب شده افزوده، در نهايت ۵۰ ميلي گرم تركيب نارينگين را اضافه می‌نماییم، سپس پلوکسامر درون فالكون را با قطره‌چكان قطره قطره به محلول كامپريتول می‌افزاییم، بعد ۵-۶ دقيقه محتوای فالكون حاوي پلوکسامر قطره قطره را اضافه می‌کنیم. سپس حدود ۱۵-۱۶ دقيقه با دور (rpm) ۱۲۷۰۰ در دستگاه هموژنايزر هم می‌خورد. بارگيري دارو تاثير به‌سزايی بر ویژگی‌های SLN (مانند توزيع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا، تغييرات چربی و...) دارد (۱۲).

كشت سلولي: رده سلولي 4T1 مربوط به سرطان سينه موش و از نوع چسبنده، در محيط كشت DMEM حاوي ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتي‌بيوتيك پني‌سيلين-استرپتوميسين كشت داده و با ۵ درصد CO₂، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد انكوبه شدند. پس از پر شدن ۸۰ تا ۹۰ درصد از كف فلاسك جهت پاساژ سلولي، سلول‌ها به كمك محلول تريپسين-EDTA از كف فلاسك برداشته شده و به ميكروتيوب منتقل شد. بعد از سانترفيوژ مایع رويی دور ريخته و به‌رسوب محيط كشت DMEM حاوي FBS اضافه كشت و در فلاسك T25 كشت داده شد. سلول‌ها تا رسيدن به فاز رشدی مناسب پاساژ داده شدند (۱۳).

تيمار سلول‌ها با نانوذره سنتزی: به‌منظور بررسی اثر نانوذره سنتزی حاوي نارينگين بر روی رده‌ی سلولي 4T1، ابتدا سلول‌ها در فلاسك مناسب كشت داده شدند تا زمانی كه به تراكم حدود ۹۰ درصد رسيدند. سپس اين سلول‌ها توسط تريپسين-EDTA از سطح فلاسك جدا و با رنگ تريبان‌بلو با استفاده از لام هموسيتومتر مورد شمارش قرار گرفتند (۱۴). تعداد حدود ۱×۱۰^۵ سلول در حجم نهايي ۲۰۰ ميكروليتر محيط كشت كامل (DMEM حاوي ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتي‌بيوتيك Pen/Strep) در هر چاهك پليت ۹۶ خانه ريخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انكوبه شد. اين زمان، فرصت اتصال سلول‌ها به پليت و تكثير آن‌ها را فراهم می‌كند. روز بعد محيط داخل هر چاهك تخليه شده سلول‌ها با غلظت‌هاي (۰، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ ميكرومولار) از نانوذره حاوي نارينگين در محيط كشت جديد حاوي ۱ درصد SBF تيمار شدند. يك گروه بدون تيمار مورد نظر نيز به‌عنوان گروه كنترل (شاهد) جهت مقايسه در نظر گرفته شد. سپس پليت‌ها به مدت ۴۲ و ۸۴ ساعت انكوبه شده پس از آن ميزان زنده‌مانی سلول‌ها به روش سنجش TTM ارزيابی شد.

بررسی سمیت سلولي با استفاده از آزمون رنگ سنجی MTT و تعيين IC₅₀ اين آزمون نوعی رنگ‌سنجی بوده و امکان بررسی تعداد زياد نمونه را در كم‌ترين زمان و هزينه فراهم می‌كند. از اين روش می‌توان برای تعيين زنده بودن سلول‌ها تحت تاثير يك ماده استفاده كرد و برپايه شكستن نمك تترازوليوم MTT زرد رنگ و تبديل آن به بلورهای فورمازان بنفش رنگ می‌باشد. اين احیای سلولي با دخالت كوفاكتر NADH و NADPH و دهيدروژنازهای ميتوكندريایی سلول‌های زنده صورت می‌گیرد. كريستال‌های فورمازانی تشكيل شده محلول در DMSO هستند و ميزان جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند

به‌طور کمی مورد بررسی قرار گیرد (۱۵). پس از تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌ها با نانوذره سنتزی حاوی نارینگین، محیط کشت قبلی خارج و با محیط کشت RPMI-1640 بدون phenol red، حاوی ۱۰ درصد محلول MTT جایگزین شد و به مدت ۴-۲/۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام این زمان، محیط کشت رویی سلول‌ها به آرامی خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و پلیت‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر با دور پایین قرار داده تا رسوب‌های فورمازان کاملاً حل شوند. پس از انحلال فورمازان، جذب نوری (OD) هر چاهک توسط دستگاه الیزا ریدر (Biotek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که هر غلظت در سه چاهک تکرار شد.

درصد بقا توسط فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{میانگین جذب گروه تیمار شده}}{\text{میانگین جذب گروه کنترل}} \times 100$$

IC₅₀ بیان‌گر غلظتی از ترکیب است که باعث مهار رشد ۵۰ درصد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌شود، پس از رسم منحنی، با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف تیمار و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد (۱۵).

مراحل انجام وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین‌ها: به منظور تشخیص و آنالیز بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2، p-ASK1، AKT و Cyt C در نمونه‌های سلولی، با استفاده از آنتی‌بادی، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد (۱۶). به‌طور خلاصه: مقدار مشخصی از هر نمونه بر روی چاهک‌های ژل بارگذاری و الکتروفورز در مدت ۴۵ دقیقه با اعمال جریان با ولتاژ ۱۲۰ میلی‌ولت انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل در بافر انتقال (۲/۴۲ گرم تریس، ۱۱/۲۵ گرم گلیسین، ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول و حداکثر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) جهت انجام ایمونوبلاتینگ قرار گرفت. سپس صفحه PVDF نیز در بافر انتقال قرار گرفت. انتقال پروتئین از ژل به PVDF صورت پذیرفت. این سیستم دارای محفظه حاوی بافر انتقال است که شامل اسفنج، ظرف یخ و کاست مخصوص نیز می‌باشد. PVDF، اسفنج و ژل در درون این کاست قرار می‌گیرد. ترتیب قرارگیری در کاست به ترتیب شامل اسفنج، کاغذ صافی، ژل و PVDF، کاغذ صافی و اسفنج است و اصطلاحاً ساندویچ گفته می‌شود. در نهایت دستگاه با ولتاژ ۱۰۰ میلی‌ولت به مدت یک ساعت به منبع مولد جریان، متصل گشته و پروتئین‌های موجود در ژل به PVDF منتقل شد. پس از اتمام انتقال پروتئین‌ها بر سطح PVDF، صفحه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ (بافر TBST (تریس - HCL، کلرید سدیم، توئین ۲۰ و آب مقطر)، ۲ درصد شیر خشک بدون چربی که به منظور پوشاندن صفحه برای جلوگیری از واکنش غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه به کار می‌رود، به شکل ملایمی تکان داده شد. پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ، صفحه با آنتی‌بادی‌های اولیه به ترتیب (sc-7480, sc-492, sc-271966, sc-47778 β-actin) sc-109911, sc-13156، پس از اتمام مرحله قبل، شست‌وشو با بافر TBST انجام شد. سپس صفحه با آنتی‌بادی ثانویه Rabbit (ab2359) Anti با غلظت (۱:۱۰۰۰۰) برای تمام آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و در پایان این مرحله نیز صفحه سه بار با بافر TBST شست‌وشو شد. جهت آشکارسازی باند پروتئینی مورد نظر، از کیت کمولومینسنس ECL advanced reagents شامل شیر بدون چربی و واکنشگرهای A و B استفاده شد. پس از شست‌وشوی نهایی مرحله قبل، آب اضافی گرفته و صفحه PVDF روی سلفون قرار داده و محلول کمولومینسانس با سمپلر روی نواحی باند مورد نظر ریخته در سلفون گذاشته شد و درون کاست فیلم قرار گرفت.

برای مشاهده باند پروتئینی مورد نظر فیلم X-ray را بر کاغذ دارای پوشش نایلونی گذاشته و در کاست را می‌بندیم. پس از خارج کردن فیلم از کاست آن را ابتدا در محلول ظهور به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده تا باندها ظاهر شوند. سپس در آب، فیلم را

به مدت ۲۰ ثانیه شسته و بعد از آن به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ثبوت تکان داده می‌شود. سپس مجدداً فیلم را با آب جاری شسته و خشک شد. سپس لکه‌های ظاهر شده بر روی فیلم توسط نرم افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفت.

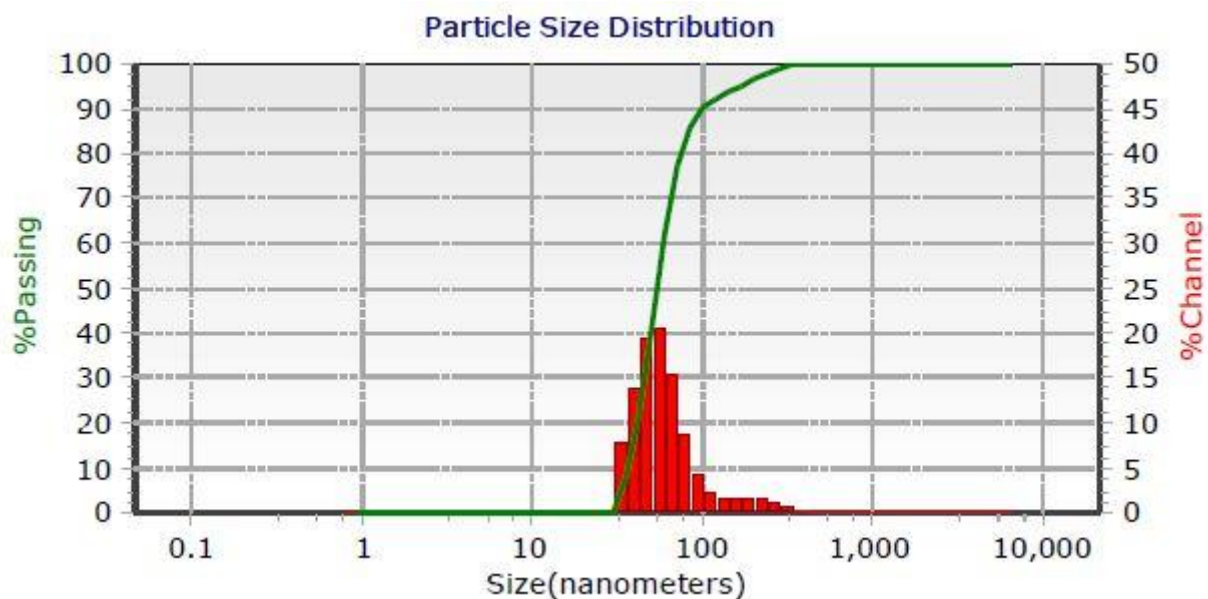
آنالیز آماری:

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم افزاری SPSS و GraphPad Prism 8 استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SEM) ارائه و اختلاف معنی‌دار بودن بین گروه‌ها توسط آزمون‌های آنالیز طرح آزمایش تک متغیره (ANOVA)، آنالیز طرح آزمایش چند متغیره (MANOVA) و آزمون t-test مورد بررسی قرار گرفت، اختلافات در سطح ($p < 0.0001$) معنی‌دار تلقی شدند.

نتایج

تایید سنتز نانوذره حاوی نارینگین

تست پتانسیل زتا برای اشاره به پتانسیل الکتریکی در تعلیق کلوییدی به کار می‌رود. هم‌چنین به‌عنوان قسمت کاربردی بار الکتریکی سطح غشا عمل می‌کند. نتیجه‌ی تست زتای نانوذره سنتز شده ۲۵- می‌باشد. روش فیزیکی دیگر تست پراکندگی نور دینامیکی (DLS) است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. اندازه ذرات، پتانسیل زتا و PDI با استفاده از دستگاه نانو Zetasizer تعیین شد. نتایج نشان داد که قطر نانوذرات لیپید جامد از ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر و در ۵۰ درصد از نانوذرات سنتز شده ۵۴/۱ نانومتر است و این نتیجه نشان می‌دهد که سنتز نانوذرات صحیح می‌باشد (شکل ۱).

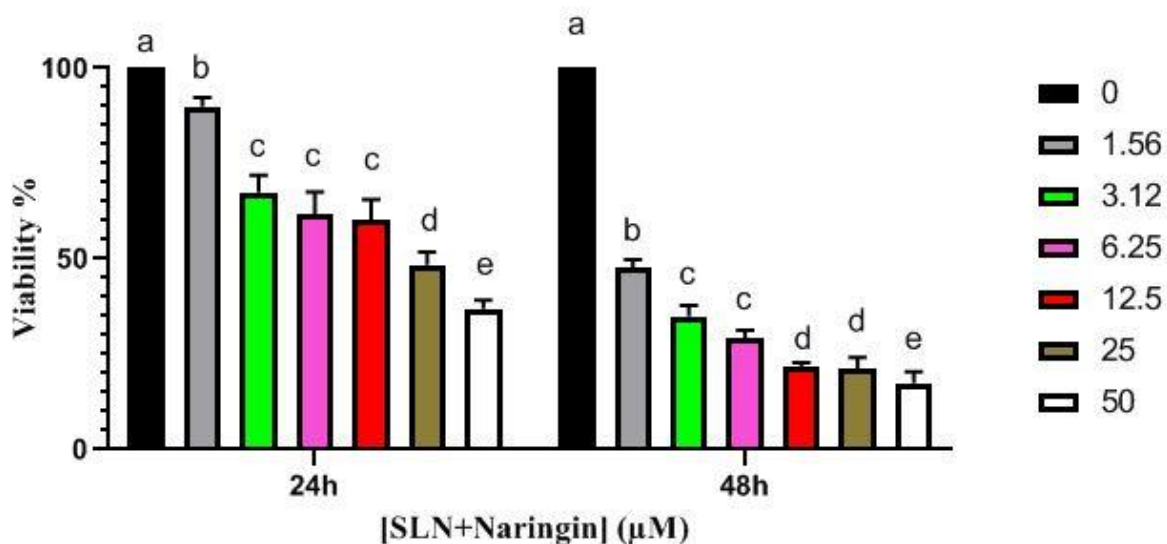


شکل ۱: تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و PDI با استفاده از دستگاه نانو Zetasizer

نانوذره حاوی نارینگین به صورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان سینه می‌شود

اثر سمیت سلولی نانوذره حاوی نارینگین بر روی رده سلولی سرطان پستان (4T1)، با استفاده از تست MTT انجام گرفت. تیمار سلول‌های 4T1 با غلظت‌های مختلف نانوذره حاوی نارینگین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت (شکل ۲)، باعث مهار معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.0001$). به این ترتیب با افزایش غلظت دوز تیمارها، درصد بقا به‌طور

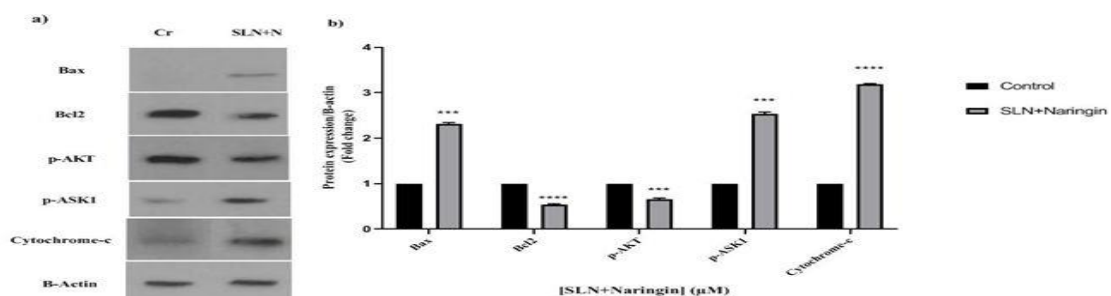
معنی داری کاهش یافت. هم‌چنین مقدار IC_{50} نانوذره حاوی نارینگین در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۲۰ و ۲ میکرومولار طبق فرمول درصد مهارکنندگی محاسبه شد. نتایج نشان داد که نانوذره حاوی نارینگین، تکثیر سلول‌های 4T1 را به صورت وابسته به دوز مهار می‌نماید. مورفولوژی سلول‌های 4T1 در محیط کشت، ظاهری چند وجهی (دوکی) و یا تقریباً کروی داشته، به شکل کلونی‌هایی که از تراکم سلولی و سرعت تکثیر بالایی برخوردار بوده و رشد می‌کنند.



شکل ۲: فعالیت ضدتکثیری ترکیب نانوذره سنتزی حاوی نارینگین علیه سلول‌های 4T1. تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب نانوذره سنتزی حاوی نارینگین، در مقابل درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از سنجش MTT. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون آنالیز طرح آزمایش تک متغیره (ANOVA) بوده و در سطح کمتر از ($p < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دارند.

بررسی بیان پروتئین‌ها در سلول‌های تحت تیمار نانو ذره حاوی نارینگین

جهت بررسی اثرات آپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک نانو ذره حاوی نارینگین (۷ میکرومولار) در ۲۴ ساعت، میزان مهار بیان پروتئین‌ها در سلول‌های 4T1، باروش وسترن بلات انجام گرفت (۱۶). با استفاده از نرم افزار Image J میزان شدت باندها محاسبه شد. نتایج نشان داد که میزان بیان پروتئین Bcl2 در نانوذره حاوی نارینگین در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (کنترل) ۵۰ درصد کاهش داشت (شکل ۳).



شکل ۳: میزان بیان پروتئین‌های Bax, Bcl-2, p-AKT, p-ASK1, و Cyt C نسبت به B-Actin باروش وسترن بلات، در سلول‌های 4T1 تیمار شده با نانوذره حاوی نارینگین. (a) عکس ژل وسترن بلات، Cr گروه کنترل و SLN+NRG نانوذره حاوی نارینگین می‌باشد. (b) نمودار کمی بیان پروتئین‌ها نسبت B-Actin را نشان می‌دهد.

بحث

فلاونوئیدها جز متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌باشند که در زمینه‌های متفاوتی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، اثرات ضد میکروبی، گیرنده‌های نوری، جاذب بینایی و از همه مهم‌تر طبق تحقیقات انجام شده اثرات ضدسرطانی کاربرد دارند (۱۷، ۱۸). اثرات فلاونوئیدها علیه سرطان نه تنها با مراحل اولیه فرایند سرطان، بلکه با پیشرفت سرطان نیز در ارتباط است و تاثیرات ضدسرطانی قوی را در برابر مدل‌های مختلف سرطانی در شرایط *in vitro* و *in vivo* نشان داده‌اند (۱۷، ۱۹). فلاونوئیدها متداول‌ترین و گسترده‌ترین گروه از ترکیبات گیاهی هستند که تقریباً در تمام قسمت‌های گیاهان دیده می‌شوند ترکیباتی چون اپی گالوکاتچین-۳-گالات، کوئرستین، جنیستئین، آپیزین، نارینگین، سلیبینین و کامفرول برای مقابله با انواع سرطان کاربرد دارد ولی متأسفانه، به دلیل حلالیت کم، جذب و متابولیسم سریع پتانسیل ضدسرطانی آن‌ها کافی نیست. فراهمی زیستی فلاونوئیدها را، نانو حامل‌ها (کپسوله شدن) می‌توانند بهبود بخشند. نتایج این تحقیق حاکی از آن هست که نارینگین به‌تنهایی حلالیت کم و نفوذپذیری ناچیزی دارد ولی هنگامی که به‌وسیله نانوذره کپسوله می‌شود جذب و متابولیسم بالایی از خود نشان می‌دهد. بیش‌تر مطالعات انجام شده تعیین کننده خواص ضدسرطانی نانوذرات فلاونوئید، پیش‌بالینی هستند. فعالیت ضدسرطانی نانوذره حاوی فلاونوئید بالقوه بیش‌تر روی سلول‌های سرطانی پستان MCF-7، سلول‌های سرطانی ریه A549، سلول‌های سرطانی کبد HepG2 و سلول‌های ملانوم متمرکز است و هم‌چنین می‌تواند با افزایش اثر ضدتوموری یا کاهش سمیت سیستمیک داروها در درمان سرطان به‌کار گرفته شود (۲۰). افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 از جمله راه‌کارهای القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌باشد. هم‌چنین Bax باعث فعال‌سازی میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C شده و منجر به فعال‌سازی آبشار کاسپازی می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شد، یافته‌های نتایج حاضر با پژوهشی که Lu و همکاران (۲۱) بر روی کوئرستین داشتند هم‌راستا می‌باشد، آن‌ها گزارش کردند که کپسوله کردن کوئرستین در حامل‌های لیپیدی موجب افزایش حلالیت، پایداری و افزایش غلظت کوئرستین در سلول‌های سرطانی MCF-7 شده و خاصیت ضدسرطانی بالایی از خود نمایان می‌کند. هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر، نانوذرات جامد لیپیدی بارگذاری شده با رسوراترول برای درمان سلول‌های MDA-MB-531 بررسی و مشاهده شد که نانوذرات حامل رسوراترول در مقایسه با رسوراترول آزاد، توانایی بالایی در مهار تکثیر سلول‌های MDA-MB-231 دارد و تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که نانوذرات حامل رسوراترول می‌تواند نسبت Bax/BCL2 را افزایش و بیان C-Myc و Cyclin D1 را کاهش دهد. اندازه ذرات SLNs برابر $116 \pm 8/2$ نانومتر و PDI آن برابر $0/05 \pm 0/35$ و اندازه ذرات Res-SLNs برابر 107 ± 168 و PDI آن برابر $0/03 \pm 0/26$ و پتانسیل زتا SLNs برابر $0/8 \pm 22/6$ میلی‌ولت و پتانسیل زتا Res-SLNs برابر $1/6 \pm 23/5$ میلی‌ولت گزارش شد. هم‌چنین IC_{50} مربوط به Res-SLN برابر $3/92 \pm 40/82$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و IC_{50} مربوط به Free Res برابر $7/85 \pm 72/06$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. نانوذرات حامل رسوراترول سمیت سلولی موثرتری را در مقایسه با رسوراترول آزاد داشته و می‌تواند پتانسیل زیادی برای درمان سرطان پستان داشته باشد (۲۲) هم‌راستا با مطالعات پیشین، نسبت بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و p-AKT، در سلول‌های تیمار شده 4T1 با نانوذره حاوی نارینگین در مقایسه با گروه کنترل، به پروتئین‌های آپوپتوزی مانند Bax، p-ASK1 و Cyt C کاهش معنی‌داری نشان داد و قطر نانوذرات لیپید جامد از ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر و در ۵۰ درصد از نانوذرات سنتز شده ۵۴/۱ نانومتر مشاهده شد. وگونین یک فلاون-O-متیله و ترکیب شیمیایی شبه فلاونوئید است که در *Scutellaria baicalensis* یافت می‌شود. در تحقیقی اثر نانوذرات حامل وگونین (W-SLN) را روی سلول‌های MCF7 بررسی نمودند. W-SLN بالاترین جذب سلولی ($2/1 \pm 12/8$ نانوگرم بر میکروگرم) و وگونین آزاد ($1/1 \pm 4/6$ نانوگرم بر میکروگرم) داشت. سرعت ترشح وگونین از نانوذره جامد لیپید آهسته‌تر از

وگونین آزاد بود و سمیت سلولی پایداری را در برابر MCF7 نشان داد. W-SLN می‌تواند یک ناقل امیدوارکننده برای تحویل وگونین علیه سلول‌های سرطانی پستان باشد (۲۳). با توجه به یافته‌های قبل، مقدار IC_{50} ترکیب نارینگین آزاد در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۱۷ و ۲۰ میکرومولار و مقدار IC_{50} نانوذره حاوی نارینگین در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۲ و ۲۰ میکرومولار گزارش شد که موجب مهار رشد در سلول‌های 4T1 می‌شود. در پژوهشی دیگر نانوذرات جامد لیپیدی حامل عصاره میوه *Annona muricata* و عصاره آزاد روی سلول‌های سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت و اثر سمیت سلولی SLN حامل عصاره با استفاده از روش MTT و آپوپتوزیس تعیین و با عصاره آزاد مقایسه گشت. IC_{50} مربوط به SLN حامل عصاره برابر ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و با کاهش ۲/۵ برابری عصاره آزاد، ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده افزایش اثربخشی SLN می‌باشد. هم‌چنین درصد آپوپتوزیس SLN حامل عصاره (۸۶ درصد) به‌طور قابل توجهی بالاتر از عصاره آزاد (۳۴/۷۱ درصد) مشاهده شد. بنابراین، این یافته‌ها نشان می‌دهد که SLN حامل عصاره میوه *Annona muricata* می‌تواند نقش بالقوه‌ای در درمان سرطان پستان داشته باشد (۲۴). در پژوهشی نانوذرات جامد لیپیدی حاوی دوکتاکسل (SLN-DTX) روی سلول‌های 4T1 بررسی شد. اندازه پراکندگی SLN‌ها ۱۲۸ نانومتر و شاخص چندپراکندگی آن $PDI = 0.2$ پتانسیل زتای منفی را نشان دادند. برای ارزیابی سمیت سلولی SLN-DTX و DTX آزاد، روش MTT با استفاده از رده‌های سلولی سرطان پستان انجام شد. سلول‌ها با غلظت‌های DTX معادل (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰) میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. مقادیر IC_{50} SLN-DTX علیه سلول‌های 4T1 معادل ۰/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۴ ساعت) و ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴۸ ساعت) و IC_{50} DTX آزاد ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۴ ساعت) و ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴۸ ساعت) گزارش شد. SLN-DTX در مقایسه با دوکتاکسل آزاد با کاهش حجم تومور، اثر ضدتوموری بالاتری را نشان می‌دهد و هم‌چنین از متاستاز خودبه‌خودی ریه در موش‌های توموردار 4T1 جلوگیری می‌کند.

در پژوهش حاضر ترکیب نارینگین مورد بررسی و هم‌چنین نانو ذره‌ای بر پایه این ترکیب سنتز و اثر ضدسرطانی آن بر روی سلول‌های 4T1 مطالعه شد. در ابتدا با استفاده از تست MTT اثرات مهارکنندگی ترکیب نارینگین و نانوذره حاوی نارینگین بر رشد و تکثیر سلول‌ها ارزیابی شد. مقدار IC_{50} ترکیب نارینگین در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۱۷ و ۲۰ میکرومولار و مقدار IC_{50} نانوذره حاوی نارینگین در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۲ و ۲۰ میکرومولار که موجب مهار رشد در سلول‌های 4T1 شد. نتایج نشان داد که ترکیب نارینگین و نانوذره حاوی نارینگین، تکثیر سلول‌های 4T1 را به‌صورت وابسته به‌دوز مهار می‌نماید. هم‌چنین نتایج روش وسترن بلات نشان دهنده کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و p-AKT نسبت به پروتئین‌های آپوپتوزی مانند Bax، p-ASK1 و Cyt C در سلول‌های تیمار شده با نانوذره حاوی نارینگین در مقایسه با گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، نتایج تحقیق حاضر در راستای سایر مطالعات نشان دهنده القای مسیر داخلی آپوپتوزیس توسط مشتقات فلاونوئید می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه فعلی، پتانسیل القای آپوپتوزیس و مهار رشد در سلول‌های 4T1 تیمار شده با نانوذره حاوی نارینگین به‌واسطه مهار بیان Bcl-2 و p-AKT و افزایش بیان پروتئین‌های آپوپتوزی مانند Bax، p-ASK1 و Cyt C نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه گیلان در انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Roy P, Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*. 2016;53(3):441.
2. Williams F, Jeanetta SC. Lived experiences of breast cancer survivors after diagnosis, treatment and beyond: qualitative study. *Health expectations*. 2016;19(3):631-42.
3. Oliveira N, Gomig T, Milioli H, Cordeiro F, et al. Comparative proteomic analysis of ductal and lobular invasive breast carcinoma. *Genet Mol Res*. 2016;15(2):1-10.
4. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*. 2009;1(2):1.
5. Obexer P, Ausserlechner MJ. X-linked inhibitor of apoptosis protein—a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Frontiers in oncology*. 2014;4:197.
6. Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar T, Sharma S, et al. Novel BCL2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction. *Biochemical pharmacology*. 2017;131:16-28.
7. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2011;30(87): 1-14.
8. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(5):507-26.
9. Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy research*. 2001;15(8):655-69.
10. Chen R, Qi Q-L, Wang M-T, Li Q-Y. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*. 2016;54(12):3203-10.
11. Lin C-H, Chen C-H, Lin Z-C, Fang J-Y. Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *Journal of food and drug analysis*. 2017;25(2):219-34.
12. Fontana G, Maniscalco L, Schillaci D, Cavallaro G, et al. Solid lipid nanoparticles containing tamoxifen characterization and in vitro antitumoral activity. *Drug delivery*. 2005;12(6):385-92.
13. Meurer SK, Tezcan O, Lammers T, Weiskirchen R. Differential regulation of Lipocalin 2 (LCN2) in doxorubicin-resistant 4T1 triple negative breast cancer cells. *Cellular Signalling*. 2020;74:109731.
14. Hasibuan PAZ, Harahap U, Sitorus P, Satria D. The anticancer activities of *Vernonia amygdalina* Delile. Leaves on 4T1 breast cancer cells through phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. *Heliyon*. 2020;6(7):e04449.
15. Jamalzadeh L, Ghafoori H, Aghamaali M, Sariri R. Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells by a Semi-Synthetic Derivative of Artemisinin: A Caspase-Related Mechanism. *Iranian journal of biotechnology*. 2017;15(3):157-165.

16. Dai H, Ge S, Guo J, Chen S, et al. Development of novel bis-pyrazole derivatives as antitumor agents with potent apoptosis induction effects and DNA damage. *European journal of medicinal chemistry*. 2018;143:1066-76.
17. Liskova A, Koklesova L, Samec M, Smejkal K, et al. Flavonoids in cancer metastasis. *Cancers*. 2020;12(6):1498.
18. Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 2000;63(7):1035-42.
19. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.
20. Dobrzynska M, Napierala M, Florek E. Flavonoid Nanoparticles: A Promising Approach for Cancer Therapy. *Biomolecules*. 2020;10(9):1268.
21. Lu J, Sun D, Gao S, Gao Y, et al. Cyclovirobuxine D induces autophagy-associated cell death via the Akt/mTOR pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2014;125(1):74-82.
22. Wang W, Zhang L, Chen T, Guo W, et al. Anticancer effects of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles on human breast cancer cells. *Molecules*. 2017;22(11):1814.
23. Baek J-S, Na Y-G, Cho C-W. Sustained cytotoxicity of wogonin on breast cancer cells by encapsulation in solid lipid nanoparticles. *Nanomaterials*. 2018;8(3):159.
24. Sabapati M, Palei NN, CK AK, Molakpogu RB. Solid lipid nanoparticles of *Annona muricata* fruit extract: formulation, optimization and in vitro cytotoxicity studies. *Drug development and industrial pharmacy*. 2019;45(4):577-86.

Induction of apoptosis in breast cancer 4T1 cells by Naringin-based nanoparticles

Nejati SH* M.Sc., Ghafouri H Ph.D., Zarei S Ph.D.

. Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Guilan, Rasht, Iran

* Email corresponding author: H.ghafoori@guilan.ac.ir

Received: 19 Oct. 2021

Accepted: 19 Jan. 2022

Abstract

Aim: The main objective of this study was to develop and characterize NRG-loaded solid lipid nanoparticles (NRG-SLNs) on the breast cancer cell line (4T1).

Material and Methods: NRG-loaded solid lipid nanoparticles were prepared by hot-melt emulsification and high-speed homogenization method. The cytotoxicity of NRG-SLNs was evaluated by measuring the viability of 4T1 cells using the MTT assay. Additionally, the induction of pro-apoptotic proteins and suppression of anti-apoptotic ones by NRG-SLNs were analyzed through using Western-blotting method.

Results: The prepared NRG-SLNs had mean size of 84 nm, zeta potential of -21 mV and the entrapment efficiency of 73.17%. IC50 values of 4T1 cells treated with NRG-SLNs were 20 μ M at 24 h and 2 μ M at 48 h of incubation. The western blot analysis showed that NRG-SLNs could increase Bax / BCL2 ratio compared to the control group. Based on the results, level of Bax, p-ASK1 and cytochrome c enhanced in the treatment group.

Conclusion: In conclusion, NRG-SLNs may have the potential to inhibit growth and induce apoptosis in the breast cancer cells of 4T1.

Keywords: Flavonoids, Naringin, SLN, 4T1 cell line, Apoptosis