بررسی اثر تیمار ترکیبی سیس پلاتین و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر بیان ژن BCL2L12 در سلول های سرطان پروستات

اعظم عمادی[۱]، محمدجواد مختاری[۱*]

۱) گروه زیست شناسی، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۹

چکیده

مقدمه: درمان ترکیبی سرطان موثرتر از استفاده از یک دارو تنها برای درمان سرطان می باشد در این مطالعه اثرات ضد سرطانی سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم را روی سلول های PC-3 سرطان پروستات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: سلول های PC-3 در محیط کشت RPMI1640 کشت داده شدند. میزان بقا سلول ها با استفاده از روش MTT assay طی زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجش و IC_{50} تعیین شد. RNA استخراج شد و سپس cDNA ساخته شد. میزان بیان ژن BCL2L12 نسبت به ژن مرجع TBP با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته های پژوهش: سیس پلاتین و سیس پلاتین همراه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم اثر مهاری وابسته به دوز و زمان بر بقاء سلول های PC-3 داشت. بیان ژن BCL2L12 در سلول های PC-3 تیمار شده با سیس پلاتین تنها در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۳/۵۸، ۰/۰۸ و ۰/۱۷ در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم(10 µg/ml) در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۰۹، ۰/۰۵ و ۰/۰۲ و در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم(25 µg/ml) در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۵۴، ۰/۰۴ و ۰/۰۷ تغییر یافت($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری: در این بررسی نشان داده شد که تیمار هم زمان سیس پلاتین و نانوذره دی اکسید تیتانیوم در غلظت پایین(۶/۲ و ۱۲/۵ میکرومولار) می تواند موجب مرگ سلول بیشتری در مقایسه با سیس پلاتین تنها شود. که شاید این اثر ناشی از تسهیل ورود سیس پلاتین به سلول با حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باشد.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات، نانوذره دی اکسید تیتانیوم، سیس پلاتین، آپوپتوز، BCL2L12

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران

Email: mj.mokhtari@zariau.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

مقدمه

سرطان پروستات چهارمین سرطان شایع در جهان و شایع ترین سرطان بدخیم در مردان می باشد(۱،۲). جراحی، پرتودرمانی، سرمادرمانی، هورمون درمانی، شیمی درمانی و ایمنی درمانی روش های درمانی سرطان پروستات است. اگر چه شیمی درمانی در حال حاضر یکی از موثرترین روش ها برای درمان سرطان می باشد ولی اثرات سمیت شیمی درمانی سبب ایجاد اثرات جانبی در بیمار می شود(۳،۴). سیس پلاتین یکی از پرفروش ترین داروهای ضد سرطان در جهان است. این دارو ترکیبی آلکیله کننده است که در درمان تعداد زیادی از سرطان ها استفاده می شود. تهوع و استفراغ، سرکوبی مغز استخوان و مسمومیت کلیه از متداول ترین اثرهای جانبی سیس پلاتین می باشد(۵،۶). از نانوذرات فلزی به طور گسترده ای در علوم زیست پزشکی و مهندسی استفاده می شود(۷). درمان ترکیبی یک روش استاندارد در شیمی درمانی معمولی برای غلبه بر مقاومت متقاطع و دستیابی به نتیجه درمانی پیشرفته سینرژیستی بدون افزایش قابل توجه سمیت می باشد(۸،۹).

BCL2L12 به عنوان عضوی جدید از خانواده BCL2 است. این پروتئین در تنظیم آپوپتوز نقش دارد، اما این نقش در انواع سرطان های مختلف، متفاوت می باشد(۱۲-۱۰). نقش بیولوژیکی BCL2L12 هنوز به طور کامل شناخته نشده است. این پروتئین در تومور پستان و سرطان معده نقش پروآپوپتوزی دارد. در سرطان نازوفارنکس، میزان بیان این پروتئین با متاستاز این سرطان ارتباط مثبت دارد(۱۰،۱۳،۱۴).

با توجه به نقش BCL2L12 در فرآیند آپوپتوز، می تواند به عنوان یک هدف در درمان سرطان استفاده شود. در این تحقیق اثرات سیس پلاتین تنها و سیس پلات به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم را بر بیان ژن BCL2L12 در سلول های تیمار شده در زمان های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

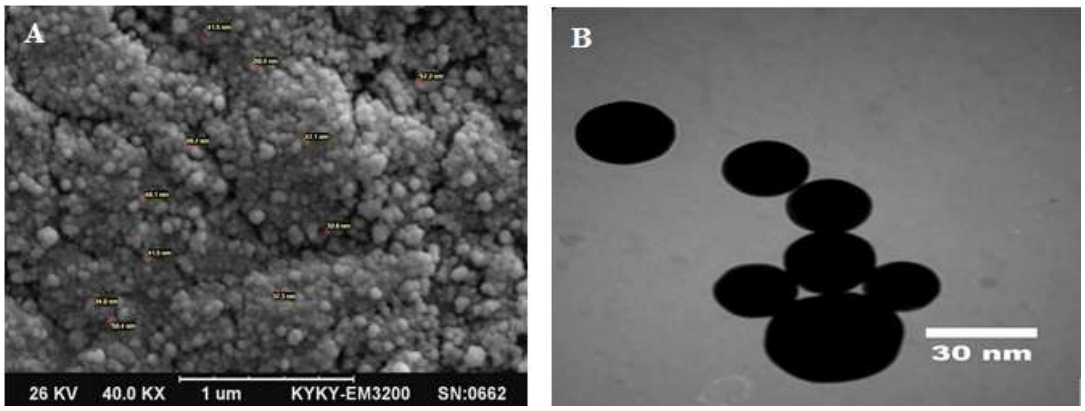
مواد و روش ها

کشت سلول: رده سلولی PC-3 از بانک سلولی ان ستیتو پا ستور ایران خریداری شد. این سلول ها، در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، دو میلی مولار گلوتامین، دو گرم در لیتر بی کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین(همه از Gibco، اسکاتلند) انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد که حاوی پنج درصد گاز CO_2 بود، کشت داده شدند.

انکوباسیون سلول ها با سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تعیین IC_{50}: نانوذره دی اکسید تیتانیوم از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری شد. اندازه نانوذرات ۲۰ تا ۳۰ نانومتر بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق از غلظت g/mlμ ۱۰ و g/mlμ ۲۵ نانوذره استفاده شد. غلظت های مختلفی از سیس پلاتین(Merck، آلمان) (۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شد. جهت تعیین دوز ۵۰ درصد کشندگی سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره بر روی رده سلولی PC-3، تمامی اطلاعات به دست آمده(درصد توکسیسیتی) از نمونه ها و کنترل با استفاده از نرم افزار statistical Pharm-PCS package بررسی شد و میزان دقیق IC_{50} مربوطه تعیین گردید.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]



شکل شماره ۱. (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM و (B) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM مربوط به نانوذره دی اکسید تیتانیوم

استخراج RNA و ساخت cDNA ابتدا سلول ها را در فلاسک ریخته و بعد از یک شب با سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره تیمار شده و پس از مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از ترایزول(یکتا تجهیز، ایران) استخراج RNA انجام شد. سپس RNA استخراج شده در آب DEPC (سیناژن، ایران) حل گردید و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. لازم به ذکر است همه مراحل کار در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل انجام شده است. پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با استفاده از فتونانومتر(IMPLEN GmbH, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه های دارای OD مناسب (محدوده ۱/۸ تا ۲) برای انجام مراحل بعد انتخاب شدند.

مولکول های DNA مکمل با کیت سنتز cDNA (BioFact, South Korea) مطابق با دستور کار شرکت تولیدکننده ساخته شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، برای ژن هدف BCL2L12 و ژن مرجع TBP از مطالعات قبلی استفاده شد(۱۵).

Real-time RT-PCR: در این مطالعه از دستگاه Real-time PCR مدل Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) استفاده شد. برنامه زمانی-دمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه برای ۴۰ چرخه متوالی، و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش های Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از کیت 2X Real-Time PCR Master Mix (BioFact, South Korea) و به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. جهت ترسیم منحنی استاندارد از رقت های متوالی cDNA استاندارد به صورت غلظت های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و چرخه آستانه یا (Ct) محور عمودی برای هر ژن ترسیم شد. از منحنی استاندارد دامنه غلظت بهینه cDNA الگو و میزان بازده PCR برای هر ژن تعیین شد. واکنش های رقت های متوالی برای پرایمرها و DNA استاندارد به همراه واکنش فاقد cDNA الگو برای هر ژن انجام شد.

درصد کارایی واکنش تکثیری = $[10^{(-1/slpOE)} -1]\times 10$

در این تحقیق از روش کمیت سنجی نسبی برای بررسی تغییرات بیان ژن استفاده گردید. آنالیز داده ها بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه های آستانه به دست آمده از نمونه های مورد آزمایش(سلول های تیمار شده با دارو) و نمونه های کنترل(سلول های تیمار نشده با دارو) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

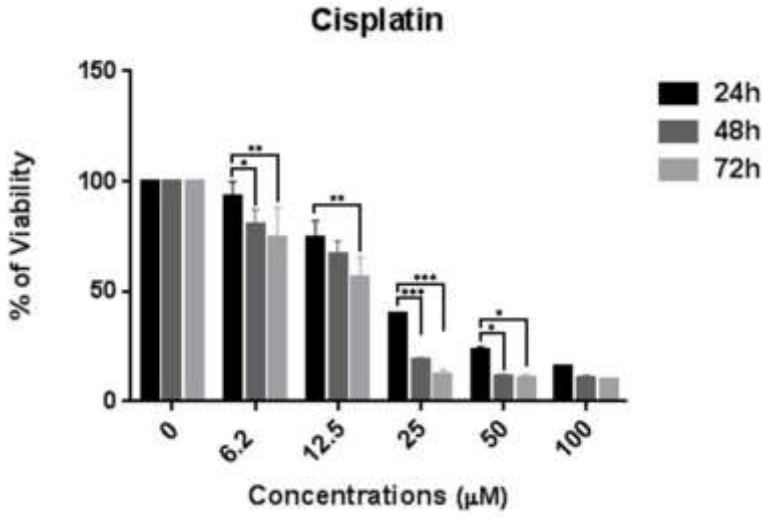
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

آنالیزهای آماری: همه نتایج به دست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل ۳ تکرار استوار می باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. تست های مقایسه ای مورد استفاده نیز شامل t تست و با آنالیز واریانس یک طرفه و محاسبه ارزش P بود که با استفاده از SPSS انجام شد و P<0.05 هر تست معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

نتایج اثر سیس پلاتین بر حیات سلول های PC-3: سلول های PC-3 با غلظت های مختلف سیس پلاتین (۱۲/۶،۵/۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب P=0.24 ±۱/۳۸ ۹۲/۴۷، P=0.05 ±۱/۹۷ ۷۴/۱۵، P=0.002 ± ۳/۳۵ ۳۹/۹۸، P=0.004 ±۰/۹۲ ۲۲/۹۶ و P=0.002 ±۲/۱۶ ۱۵/۴۸ می باشد. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۴۸ ساعت به ترتیب P=0.05 ± ۵/۶۹ ۷۹/۹۰، P=0.02 ± ۴/۵۸ ۶۶/۴۷، P=0.002 ± ۲/۸۳ ۱۸/۵۰، P=0.003 ± ۰/۷۷ ۱۱/۱۱ و P=0.003 ± ۰/۵۷ ۱۰/۶۴ می باشد. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب P=0.09 ± ۱۰/۹۹ ۷۳/۶۱، P=0.02 ± ۹/۶۹ ۵۶/۵۳، P=0.003 ± ۱/۱۸ ۱۲/۰۹، P=0.003 ± ۰/۸۶ ۱۰/۴۹ و P=0.003 ± ۱/۶۴ ۱۰/۰۷ می باشد(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. درصد بقاء سلول های PC-3 در برابر غلظت های مختلف سیس پلاتین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. درصد بقاء و میانگین(± انحراف معیار) گزارش شدند (*P<0.001، **P<0.01، *P<0.05).**

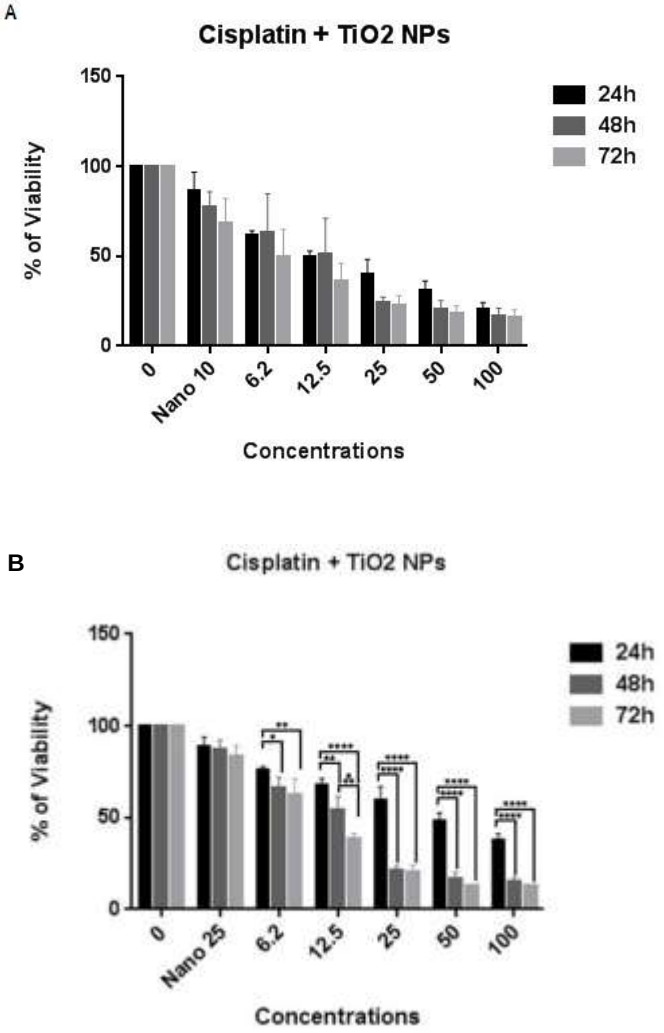
نتایج اثر سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم روی حیات سلول های PC-3: سلول های PC-3 با سیس پلاتین به همراه ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره بر اساس غلظت های مختلف سیس پلاتین(۵/۲، ۲۵/۶، ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بقاء سلول ها در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب P=0.01 ±۱۳/۵۵ ۶۱/۹۵، P=0.01 ± ۱۲/۶۱ ۴۹/۹۳، P=0.03 ± ۸/۱۸ ۳۸/۶۳، P=0.02 ± ۲/۶۷ ۳۰/۲۷ و P=0.02 ±۰/۶۹ ۱۹/۵۸ می باشد. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۴۸ ساعت به ترتیب P=0.12 ±۱۰/۸۸ ۶۰/۶۳، P=0.08 ±۱۰/۵۱ ۴۸/۴۶، P=0.02 ± ۴/۶۳ ۲۳/۶۸، P=0.02 ± ۲/۹۷ ۱۹/۳۵ و P=0.02 ± ۰/۹۶ ۱۶ می باشد. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب P=0.02 ± ۱۷/۷۲ ۴۹/۶۴، P=0.004 ± ۱۱/۷۴ ۳۶/۴۱، P=0.004 ± ۵/۲۴ ۲۲/۰۴، P=0.003 ± ۳/۷۴ ۱۸/۰۲ و P=0.003 ± ۳/۴۴ ۱۵/۸۷ می باشد(شکل شماره ۳)(A).

تیمار سلول ها با سیس پلاتین به همراه ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره بر اساس غلظت های مختلف سیس پلاتین(۵/۲، ۲۵/۶، ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

میکرومولار) در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بقاء سلول ها در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب ۶۶/۹۶ ± ۷/۳۷ P=0.004، ۷۵/۴۷± ۶/۷۵ P=0.001 ۴۷/۵۵ و ۵۹/۴۶ ± ۱۱/۲۸ P=0.004 ± ۳/۹۹ P=0.001، ۳۷/۱۳ ± ۰/۷۷ P=0.005 می باشد. میزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۴۸ ساعت به ترتیب ۵۳/۱۸ ± ۰/۵۹ P=0.03، ۶۵/۳۲ ± ۸/۴۰ P=0.02 ۱۵/۸۶ ± ۱/۲۸ P=0.01، ۲۱/۱ ± ۴/۱۴ P=0.007 و ۱۴/۹۴ ± ۱/۳۲ P=0.009 می باشد. میـــزان بقاء سلول ها در مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب P=0.01 ۳۸/۱۳ ± ۱/۵۶ P=0.003، ۶۲/۴۳ ± ۱۱/۲۷ ۱۲/۷۸ ± ۰/۶۵ P=0.001، ۲۰/۴۵ ± ۳/۶۴ P=0.001 و ۱۲/۵۶ ± ۰/۶۶ P=0.001 می باشد(شکل شماره ۳)(B).



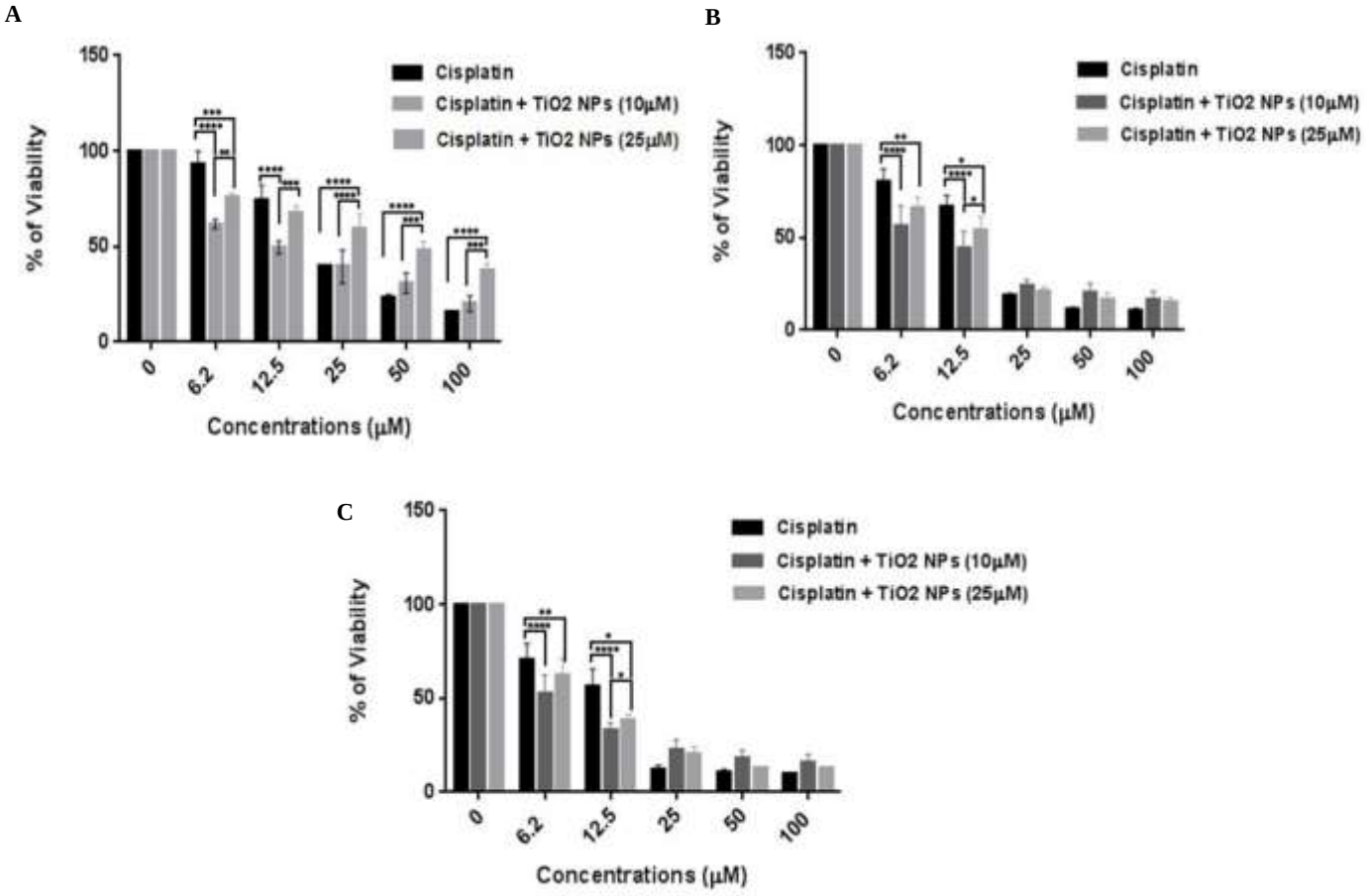
شکل شماره ۳. (A) درصد بقاء سلول های PC-3 در برابر غلظت های مختلف سیس پلاتین و نانوذره دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. (B) درصد بقاء سلول های PC-3 در برابر غلظت های مختلف سیس پلاتین و نانوذره دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج این نمودار به صورت درصد بقاء و میانگین(±انحراف معیار) نشان داده شد(**P<0.0001 ، ***P<0.001، **P<0.01،*P<0.05)**

مقایسه بقاء سلـــول های PC-3 تیمار شده با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره: تیمار سلول های PC-3 با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره در زمان ۲۴ ساعت نشان می دهد که در غلظت های پایین، سیس پلاتین به همراه نانوذره ۱۰ میکروگرم بر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

میلی لیتر خاصیت سیتوتوکسیتی بیشتری دارد. در غلظت های بالاتر خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین تنها بیشتر از سیس پلاتین به همراه نانوذره بوده است(شکل شماره ۴)(A). نتایج تیمار سلول ها در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داد که در غلظت های پایین، سیس پلاتین به همراه نانوذره۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر خاصیت سیتوتوکسی بیشتری دارند($P<0.05$). در غلظت های بالاتر خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین تنها بیشتر از سیس پلاتین به همراه نانوذره بود. البته این نتایج معنادار نبود($P>0.05$). نتایج در شکل شماره ۴ (B) نشان داده شده است. تیمار سلول ها با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره در زمان ۷۲ ساعت نشان داد که در غلظت های پایین، سیس پلاتین به همراه نانوذره ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر خاصیت سیتوتوکسیتی بیشتری دارد($P<0.05$). در غلظت های بالاتر خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین تنها بیشتر از سیس پلاتین به همراه نانوذره بود. البته این نتایج معنادار نبود($P>0.05$). نتایج در شکل شماره ۴ (C) نشان داده شده است.



شکل شماره ۴. (A) درصد بقاء سلول های PC-3 تیمار شده با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت. (B) درصد بقاء سلول های PC-3 تیمار شده با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مدت زمان ۴۸ ساعت. (C) درصد بقاء سلول های PC-3 تیمار شده با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسیدتیتانیوم در مدت زمان ۷۲ ساعت(**P<,0.0001***P<0.001، **P<0.1، *P<0.05)**

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

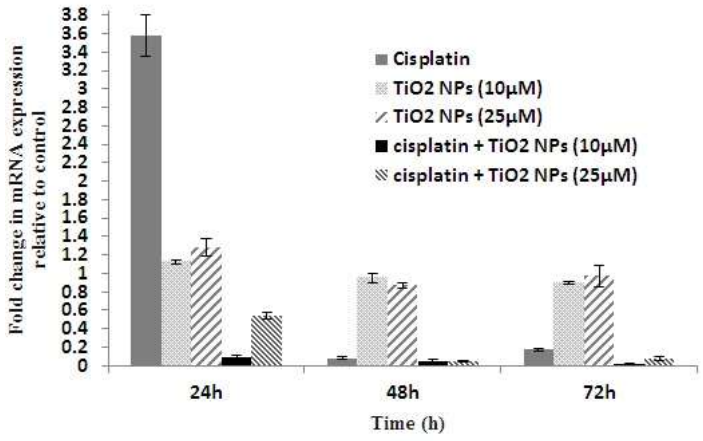
[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

محاسبه IC_{50}: بعد از تیمار سلول های PC3 با غلظت های متفاوت سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کمک نرم افزار pharm میزان IC_{50} محاسبه شد. جدول شماره ۱ میزان IC_{50} را نشان می دهد.

جدول شماره ۱. محاسبه IC_{50} سیس پلاتین و سیس پلاتین با نانوذره بر روی سلول های PC3 در زمان‌های ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
سیس‌پلاتین	۳۷/۳۲ میکرومولار	۱۹/۵ میکرومولار	۸/۲ میکرومولار
سیس پلاتین با نانوذره دی اکسید تیتانیوم(۱۰g/ml μ)	۱۲/۷۹ میکرومولار	۱۰/۵۹ میکرومولار	۳/۹۶ میکرومولار
سیس پلاتین با نانوذره دی اکسید تیتانیوم(۲۵g/ml μ)	۵۹ میکرومولار	۷/۸ میکرومولار	۱۱/۵۳ میکرومولار

پروفایل(mRNA) بیان ژن BCL2L12 در سلول های PC-3 تیمار شده با سیس پلاتین تنها و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم: تغییر در بیان ژن BCL2L12 در سلول های PC-3 تیمار شده با غلظت IC_{50} سیس پلاتین تنها و سیس پلاتین به همراه نانوذره بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد(شکل شماره ۵). بیان ژن BCL2L12 در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب به میزان ۳/۵۸، ۰/۰۸ و ۰/۱۷، در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین به همراه نانوذره(۱۰ g/mlμ) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب به میزان ۰/۰۹، ۰/۰۵ و ۰/۰۲ و در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین به همراه نانوذره(۲۵ g/mlμ) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب به میزان ۰/۵۴، ۰/۰۴ و ۰/۰۷ تغییر یافت($P<0.05$). البته تغییر بیان ژن BCL2L12 در سلول های تیمار شده با نانوذره اکسید روی(۱۰ g/mlμ) بعد از زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱/۱۲، ۰/۹۵ و ۰/۸۹، و در سلول های با نانوذره اکسید روی(۲۵g/mlμ) بعد از زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱/۲۷، ۰/۸۶ و ۰/۹۶، بود که این تفاوت ها معنادار نبود.



شکل شماره ۵. تغییر در بیان ژن BCL2L12 در سلول های PC-3 تیمار شده با غلظت IC_{50} سیس‌پلاتین تنها، IC_{50} سیس‌پلاتین به همراه نانوذره و نانو ذرات تنها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج این نمودار به صورت درصد بقا و میانگین(±انحراف معیار) نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشاهده شد که اثرات سمیت سیس پلاتین و نانوذره با سیس پلاتین با افزایش غلظت و زمان افزایش پیدا می کند و تاثیر نانوذره با سیس پلاتین، در برخی از غلظت ها، بیشتر از تاثیر سیس پلاتین تنها روی سلول های سرطانی می باشد. ژن مورد بررسی در این تحقیق BCL2L12 از خانواده ژن BCL2 است. مشاهده شد که بیان ژن BCL2L12

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

در حضور سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیتانیوم در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش داشت.

استفاده از فناوری نانو شیوه جدید درمانی است که هنوز به صورت یک چالش در درمان سرطان محسوب می شود. نانوذرات به خاطر کوچک بودن اندازه به راحتی از مویرگ های کوچک گذشته و به سلول هدف نفوذ می کنند. به نظر می رسد استفاده از داروهای شیمی درمانی در ترکیب با نانوذرات یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان مقاوم در برابر دارو است. درمان مبتنی بر نانومواد با استفاده از ترکیبی از نانومواد و عوامل شیمی درمانی، نقش مهمی در افزایش تاثیر درمان در برابر سرطان دارد. در عمل، شیمی درمانی ترکیبی (رویکرد "دو در یک") منجر به پاسخ بهتر و بقای بهتر در مقایسه با درمان تک عامل برای تحقیقات بالینی و پیش بالینی می شود(۸،۹).

در این مطالعه از نانوذره دی اکسید تیتانیوم با اندازه بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر در دو غلظت ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. در مطالعه کیم و همکاران نشان داده شد که دی اکسید تیتانیوم اثرات منفی کمی در تکثیر سلولی و زنده ماندن سلول نشان می دهند(۱۶). در مطالعه حاضر سلول های PC-3 تحت تیمار با غلظت های مختلف سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره دی اکسید تیانیوم در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سیس پلاتین میزان بقاء سلول های PC-3 کاهش پیدا می کند. البته این کاهش بقاء با افزایش مدت زمان نیز افزایش می یابد به گونه ای که بیشترین میزان کشندگی سلول های PC-3 سلول های تیمار شده در مدت زمان ۷۲ ساعت می باشد. در مطالعه حاضر میزان IC_{50} برای سیس پلاتین ۳۷/۳۲، ۱۹/۵، ۸/۲ میکرومولار برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد.

مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثرات سیس پلاتین و نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین بر زنده ماندن، مهاجرت و ظرفیت چسبندگی سلول های T47D مورد ارزیابی قرار دادند. این تحقیقات نشان داد که نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین اثرات ضد سرطانی را در مقایسه با سیس پلاتین آزاد بر رده سلولی T47D به شدت افزایش می دهد. میزان IC_{50} برای سیس پلاتین ۲۱ میکرومولار و برای نانوذره بارگذاری شده با سیس پلاتین ۱۲ میکرومولار محاسبه شد(۱۷). هم چنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ توسط مختاری و همکاران صورت گرفت اثرات سیس پلاتین و نانوذره بارگذاری شده با سیس پلاتین بر روی سلول های T47D سرطان پستان بررسی گردید. در این مطالعه میزان IC_{50} برای سیس پلاتین ۲۸/۳۹ میکرومولار و برای نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین ۱۷/۱۸ میکرومولار در مدت زمان ۴۸ ساعت بود(۱۸). در این مطالعه تیمار هم زمان سیس پلاتین با نانوذره نشان داد که در غلظت های پایین اثرات سیتوتوکسیک سیس پلاتین به همراه نانوذره ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشتر از سیس پلاتین تنها و سیس پلاتین به همراه ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره بود. اما در غلظت های بالا تاثیر سیس پلاتین تنها بیشتر از سیس پلاتین به همراه نانوذره بود. و این نتایج با نتایج مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت. در آن مطالعه تاثیر در غلظت های کم نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین، بیشتر از سیس پلاتین تنها بود و در غلظت های بالا تاثیر سیس پلاتین تنها، بیشتر از سیس پلاتین بارگذاری شده با نانوذره بود(۱۸).

در مطالعه ای تحت عنوان بررسی اثر هم زمان نانوذرات تیتانیوم و پرتوهای گاما بر رده سلولی سرطانی معده مشخص شد که سلول هایی که به طور هم زمان تحت اثر پرتو و نانوذره قرارگرفته بودند، درصد بقای کمتری از سلول هایی که تنها تحت اثر پرتو و یا نانوذره بودند، داشتند. نانوذرات تیتانیوم به دلیل ایجاد رادیکال های آزاد اکسیژن و افزایش سمیت سلولی، باعث افزایش حساسیت سلول های سرطانی معده به تابش گاما می شود(۱۹). مهر افسر و مختاری در سال ۲۰۱۸ اثرات سیس پلاتین و صوت روی زنده ماندن و ظرفیت مهاجرت سلول‌های PC-3 را از طریق ارزیابی BCL2L12 را بررسی کردند. نتایج نشان داد که کاهش بیان BCL2L12 در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین و صوت بیشتر از سیس پلاتین تنها بود(۱۵).

معصومی و همکاران در سال ۱۳۹۶، تاثیر نانوذرات تیتانیوم در پرتودرمانی(یک بررسی درون تنی در مدل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

حیوانی) مورد بررسی قرار دادند و چنین نتیجه گرفتند که نانوذره دی اکسید تیتانیوم به دلیل تولید رادیکال های آزاد اکسیژن سبب افزایش حساسیت پرتوی سلول های توموری می شوند(۲۰). وانگ و همکاران اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزیس نانوذره دی اکسید تیتانیوم را بر روی رده سلولی سرطان ریه(A459) مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه آن ها مشخص شد که نانوذره دی اکسید تیتانیوم دارای خاصیت سمیت سلولی وابسته به دوز است و بیشترین سمیت سلولی در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد(۲۱). در مطالعه حاضر مشخص شد که تیمار سلول های PC-3 با غلظت های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در زمان های مختلف سبب کاهش تعداد سلول های PC-3 می شود در صورتی که این کاهش تعداد سلول ها معنادار نبود. این نتایج با نتایج چلاپا و همکاران مطابقت داشت. در مطالعه چلاپا اثر غلظت های مختلف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی سلول MG63 بررسی گردید(۲۲).

یکی از مهم ترین روش ها در نابود کردن بدون عارضه سلول های سرطانی القا آپوپتوز می باشد. بیشتر داروهای ضد سرطانی اثرات درمانی خود را با آپوپتوز اعمال می کنند(۲۳). در این مطالعه بیان ژن BCL2L12 در سلول های PC-3 تیمار شده با سیس پلاتین و سیس پلاتین به همراه نانوذره بررسی گردید که به جز زمان ۲۴ در تیمار با سیس پلاتین که افزایش بیان ژن BCL2L12 مشاهده گردید در بقیه تیمارها کاهش بیان BCL2L12 مشاهده گردید. تحقیقات صورت گرفته روی بیان ژن های مرتبط با مرگ برنامه ریزی شده در سلول های سرطانی تخمدان تیمار شده با سیس پلاتین نشان داد که بیان ژن های BCL2، BCL-XL، BAD و BAX به صورت کاملاً گوناگون در اثر تیمار با سیس پلاتین تغییر می کند. هم چنین میزان بیان ژن های BCL2،BAD و BAX در سلول های تیمار شده با سیس پلاتین به ترتیب به میزان ۰/۹، ۱/۵، ۱/۲ برابر نسبت به سلول های کنترل و تیمار نشده با دارو تغییر می کند(۲۴).

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه اعظم عمادی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زرقان می باشد که بدین وسیله از کلیه زحمات و مساعدت های حوزه معاونت پژوهش و فناوری واحد زرقان سپاسگزاری می شود.

References

1. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. Epidemiology and control of common diseases in Iran 2th ed. Tehran Eshtiagh Publications. 2000;P.602-16.

2. Azizi F, Soleimani M, Hosseini SY, Nik SA, Hosseini J. Gene polymormisms and prostate cancera systematic review. MHJ 2018;2:6.

3. Wang J, Chen B, Chen J, Cai X, Xia G, Liu R, et al. Synthesis and antitumor efficacy of daunorubicin-loaded magnetic nanoparticles. Int J Nanomed2011;6:203-11. doi: 10.2147/IJN.S16165

4. Larsen ME, Rowntree J, Young AM, Pearson S, Smith J, Gibson OJ, et al., editors. Chemotherapy side effect management using mobile phones. 30th Ann Int Con IEEE Eng Med Biol Soc2008; France.

5.Schneider S, Reißner T, Ziv O, Livneh Z, Carell T. Translesion synthesis of 1, 3-GTG cisplatin DNA lesions. Chembiochem 2010;11:1521-4. doi: 10.1002/cbic.201000211

6. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours a retrospective evaluation. Oncol Rep2013;29:1285-92. doi: 10.3892/or.2013.2279

7. Rayford C, Schatz G, Shuford K. Optical properties of gold nanospheres. Nanoscape 2005;2:27-33.

8. Xu L, Wu X, Hu C, Zhang Z, Zhang L, Liang S, et al. A meta-analysis of combination therapy versus single-agent therapy in anthracycline and taxane-pretreated metastatic breast cancer: results from nine randomized Phase III trials. Oncol

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

Targ Ther 2016;9:4061-74. doi: 10.2147/OTT.S101423
9.He C, Chan C, Weichselbaum RR, Fleming GF, Yamada SD, Lin W. Nanomedicine for combination therapy of cancer. Ebio Med 2015;2:366-7. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.05.013
10.Yang MC, Loh JK, Li YY, Huang WS, Chou CH, Cheng JT, et al. Bcl2L12 with a BH3-like domain in regulating apoptosis and TMZ induced autophagy a prospective combination of ABT-737 and TMZ for treating glioma. Int J Oncol 2015;46:1304-16. doi: 10.3892/ijo.2015.2838.
11. Chou CH, Chou AK, Lin CC, Chen WJ, Wei CC, Yang MC, et al. GSK3β regulates Bcl2L12 and Bcl2L12A anti apoptosis signaling in glioblastoma and is inhibited by LiCl. Cell Cycle2012 ;11:532-42. doi: 10.4161/cc.11.3.19051
12. Stegh AH, Brennan C, Mahoney JA, Forloney KL, Jenq HT, Luciano JP, et al. Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor. Gen Dev 2010;24:2194-204. doi: 10.1101/gad.1924710
13. Hong Y, Yang J, Wu W, Wang W, Kong X, Wang Y, et al. Knockdown of BCL2L12 leads to cisplatin resistance in MDA-MB-231 breast cancer cells. Biochim Biophys Acta 2008;1782:649-57. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.09.008
14. Florou D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Molecular analysis and prognostic impact of the novel apoptotic gene BCL2L12 in gastric cancer. Biochem Biophys Res Com 2010;391:214-8.doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.034
15. Mehrafsar A, Mokhtari MJ. Effect of exposure to quran recitation on cell viability cell migration and BCL2L12 gene expression of human prostate adenocarcinoma cell line in Culture. Health Spirit Med Eth 2018;5:46-52.doi: 10.29252/jhsme.5.4.46
16. Kim IS, Baek M, Choi SJ. Comparative cytotoxicity of Al2O3 and CeO2 and TiO2 and ZnO nanoparticles to human lung cells. J Nanosci Nanotechnol 2010;10:3453-8. doi: 10.1166/jnn.2010.2340
17. Mokhtari MJ, Koohpeima F, Mohammadi H. A comparison inhibitory effects of cisplatin and MNPs PEG cisplatin on the adhesion capacity of bone metastatic breast cancer. Chem Biol Drug Des 2017;90:618-628. doi: 10.1111/cbdd.12985
18. Mokhtari MJ, Hoseineian Z, Koohpeima F, Akbarzadeh A, Hashemi M, Mahdian R, et al. [Evaluation of cisplatin and cisplatin-loaded magnetic iron oxide nanoparticles on BCL2 and BAX genes in the breast cancer T47D Cell Line]. Pathobiol Res2013;15:75-87. (Persian)
19. Hassanzadeh H, Rezaeitavariani M , Semnani V , Jabbariarfaie A , Seyyedi SS, Jafarzadeh L. Radiation sensitivity study of titanium nanoparticles in irradiation of human gastric cancer cells. J Ilam Uni Med Sci2013;20:121-8.
20. Masumi H, Hasanzadeh H, Rezaeitavirani M, Jadidi M, Nikoofar A, Nasr R, et al. [Effect of nano titana in radiotherapy An in vivo animal study]. J Mazandaran Uni Med Sci 2017;27:1-13. (Persian)
21. Wang Y, Cui H, Zhou J, Li F, Wang J, Chen M, et al. Cytotoxicity DNA damage and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non small cell lung cancer A549 cells. Environ Sci Pollut Res Int 2015;22:5519-30. doi: 10.1007/s11356-014-3717-7
22. Chellappa M, Anjaneyulu U, Manivasagam G, Vijayalakshmi U. Preparation and evaluation of the cytotoxic nature of TiO2 nanoparticles by direct contact method. Int J Nanomed2015;10:31-41.doi: 10.2147/IJN.S79978
23. Wahba J, Natoli M, Whilding LM, Parentepereira AC, Jung Y, Zona S, et al. Chemotherapy induced apoptosis autophagy and cell cycle arrest are key drivers of synergy in chemo-immunotherapy of epithelial ovarian cancer. Cancer Immunol Immunother 2018;67:1753-1765. doi: 10.1007/s00262-018-2199-8
24. Siervosassi R, Marrangoni A ,Feng X, Naoumova N, Winans M, Edwards R, et al. Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. Cancer Lett 2003;190:61-72.doi: 10.1016/s0304-3835(02)00579-7

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]

Effects of Combination Treatment of Cisplatin and Titanium Dioxide Nanoparticles on the BCL2L12 Gene in Prostate Cancer Cells

Emadi A[1], Mokhtari M[1]*

(Received: November 2, 2019 Accepted: December 10, 2019)

Abstract

Introduction: The combined therapy of cancer is more effective than using a single medication for the treatment of cancer. This study aimed at investigating the anticancer effects of cisplatin and cisplatin in combination with Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles on the PC-3 prostate cancer cells.

Materials & Methods: The PC-3 cells were cultured in a RPMI1640 medium. Cell viability was assessed by MTT assay during 24, 48, and 72 h, and IC_{50} was determined. The RNA was extracted, and then the cDNA was synthesized. The expression level of BCL2L12 gene was compared to that of the TBP reference gene using Real-Time Polymerase Chain Reaction method.

Findings: Cisplatin and cisplatin with TiO_2 nanoparticles exerted a dose and time dependent inhibitory effect on the viability of PC-3 cells. The expressions of the BCL2L12 gene in cisplatin-treated PC-3 cells at 24, 48, and 72 h were 3.58, 0.08, and 0.17, respectively. Moreover, the corresponding values in cisplatin-treated cells with TiO_2 nanoparticles (10µg/ml) were 0.09, 0.05, and 0.02 at 24, 48, and 72 h, respectively, and in cisplatin-treated cells with TiO_2 nanoparticles (25µg/ml) were 0.54, 0.04, and 0.07 at 24, 48, and 72 h, respectively ($P<0.05$).

Discussion & Conclusions: This study revealed that simultaneous treatment with cisplatin and TiO_2 nanoparticles (10µg/ml) at low concentration (6.2 and 12.5) can cause more cell death than cisplatin treatment alone. This may be due to the facilitation of cisplatin entry into the cell in the presence of TiO_2 nanoparticles.

Keywords: Apoptosis, BCL2L12, Cisplatin, Prostate Cancer, TiO_2 Nanoparticles

1. Dept of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran
**Corresponding author Email: mj.mokhtari@zariau.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.21]