دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و یکم، شماره ۶، صفحه ۴۳۸ - ۴۲۶ (بهمن و اسفند ۱۳۹۷)

Iran South Med J 2019; 21(6): 426-438

بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذره دی اکسید تیتانیوم (TiO2) بر روی رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ با استفاده از روش Real Time PCR و فلوسیتومتری

فائزه شکرالهی (MSc)[۱*]، الهه علی عسگری (PhD)[۱**]، امیر میرزایی (PhD)[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

(دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۶- پذیرش مقاله: ۹۷/۴/۳)

چکیده

زمینه: امروزه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) دارای کاربرد وسیع در زمینه‌های درمانی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی آن بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اثرات سمیت سلولی نانوذره TiO_2 بر روی رده سلولی HT29 در غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توسط روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال آن، پس از تیمار سلول‌های HT29 با غلظت ۵۰ درصد کشندگی TiO_2، میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نسبت به ژن مرجع GAPDH با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. در نهایت به منظور تأیید آپوپتوز از روش رنگ‌آمیزی DAPI و فلوسیتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف TiO_2 نشان داد که نانوذره TiO_2 در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). همچنین، بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در رده سلولی HT29 تیمار شده با نانوذره طی ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان (P=۰/۰۰۰۵) ۲/۶۹±۰/۱۳ و (P=۰/۰۰۰۶) ۳/۴۶±۰/۲۹ (P=۰/۰۰۰۲) افزایش یافت. همچنین نتایج رنگ‌آمیزی DAPI و فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های HT29 وارد آپوپتوز شده‌اند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در آینده بتوان از نانوذرات TiO_2 به عنوان ترکیب دارویی کاندید جهت اهداف دارویی استفاده کرد، اما نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

واژگان کلیدی: نانوذره TiO_2، سرطان کولون، آپوپتوز، Real Time PCR، فلوسیتومتری

** تهران، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: ealiasgari@iauet.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-1708-8868
**ORCID: 0000-0003-0512-4224

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

مقدمه

امروزه استفاده از نانومواد به طور گسترده‌ای در حال افزایش است، به طوری که در تمامی جنبه‌های زندگی وارد شده است و در این بین استفاده از ترکیبات نانو در فرایندهای پزشکی نیز کاربرد روز افزونی پیدا کرده است (۱). نانوذرات دارای کاربردهای مختلفی در پزشکی از جمله پیشگیری و درمان بیماری‌ها، نانو ربات‌ها جهت تشخیص، سنسورهای مختلف پزشکی، تصویربرداری و سیستم دارورسانی می‌باشد (۲). یکی از جنبه‌های کاربردی فناوری نانو که امروزه مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از ترکیبات نانو به عنوان ترکیبات ضدسرطان و همچنین استفاد از آن‌ها به عنوان یک سیستم تحویل دارو در درمان سرطان می‌باشد (۳ و ۴). عامل‌دار نمودن و نشاندن داروهای مورد استفاده در درمان سرطان برروی نانوذرات سبب می‌شود تا دارو با کارایی بالاتری به سلول‌های سرطانی تحویل داده شود و از طرفی سمیت و عوارض جانبی آن بر روی سلول‌های سالم کاهش یابد (۵).

در سال‌های اخیر به علت افزایش شیوع مرگ ومیر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیو درمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود (۶). هدف‌دار نمودن داروهای ضدسرطانی به طوری که فقط روی سلول‌های سرطانی اثرگذار باشند و همچنین استفاده از حداقل غلظت داروها به گونه‌ای که اثرات سمی دارو روی سلول‌های طبیعی کاهش یابد، نیز در این امر ضروری تلقی می‌گردد (۷). از این رو جهت تحویل اختصاصی دارو به بافت سرطانی و کم نمودن عوارض جانبی آن از روش‌های جدید تحویل دارو به بافت با کمک نانوذرات به عنوان حامل می‌توان کمک گرفت (۸). استفاده از نانوذرات با اندازه ۱۰۰ نانومتر یا کمتر برای رساندن و هدف‌گیری عوامل تشخیصی و دارویی در پروژه‌های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است (۹). اخیرا بسیاری از نانوذرات به صورت هدفمند برای از بین بردن سلول‌های توموری بدخیم با کاهش سمیت سیستمیک داروهای ضد سرطانی به خدمت گرفته شده‌اند. امروزه استفاده از کاتالیزورهایی که با تابش نور (فوتوکاتالیست) فعال می‌شوند بسیار رایج شده است. یکی از فوتوکاتالیست‌هایی که از گذشته در صنعت کاربرد داشته است، نانوذره دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) است و همچنین غیرمضر بودن این ماده برای انسان و محیط زیست به اثبات رسیده است. همچنین از نقطه اقتصادی تهیه این نانوذره مقرون به صرفه بوده و مطالعات انجام شده از ابتدای قرن ۲۰ تابحال بر روی نانوذره TiO_2 دو نقش متفاوت این ترکیب را به اثبات رسانده است. نقش اول قابلیت اکسیداسیون احیا و نقش دوم تغییر خصوصیات سطح ذرات به حالت هیدروفیلی (آبدوستی) زمانی که TiO_2 بر روی آن سطح قرار گیرد. همچنین این نانوذره دارای سازگاری زیستی بالا (biocompatibility)، مقاوم به مایعات بدن انسان و بسیار مقاوم به خوردگی می‌باشد (۱۰). امروزه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) به عنوان محصولی مهم در نانوتکنولوژی به عنوان ترکیب دارویی و هم چنین کاندیدای جذاب برای رساندن بسیاری از مولکول‌های دارویی کوچک یا بیومولکول‌های بزرگ از قبیل DNA، RNA و پروتئین‌ها می‌باشد. نانوذرات TiO_2 مقاوم به گرما بوده و در اثر تابش نور می‌تواند گونه‌های O2 و OH را تولید کند که این ترکیبات می‌توانند بر روی لیپیدهای غشایی تأثیر گذاشته و باعث تخریب آن شوند (۱۱). تاکنون مطالعات مختلفی بر روی تأثیر نانوذره TiO_2 بر روی سلول‌های سرطانی به انجام رسیده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

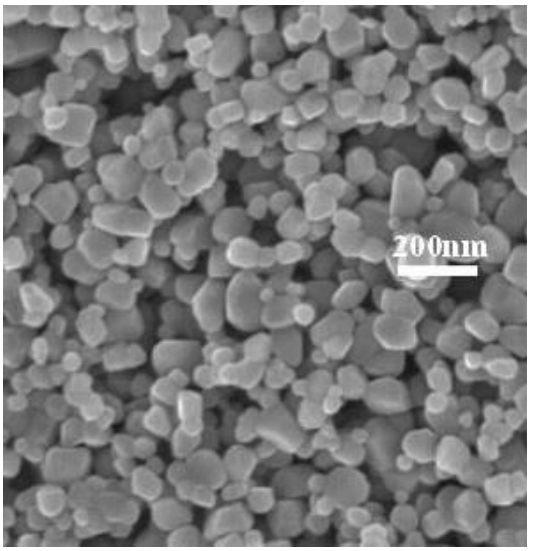
ونگ (Wnag) و همکاران، اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزیس نانوذره TiO_2 را بروی رده سلولی سرطان ریه (A549) مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه با استفاده از تست MTT نشان داده شد که نانوذره TiO_2 دارای خاصیت سمیت سلولی وابسته به دوز است و بیشترین سمیت سلولی در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. با استفاده از روش رنگ‌آمیزی DAPI مشخص شد که سلول‌ها وارد فاز آپوپتوزیس شده‌اند. همچنین نتایج فلوسیتومتری نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سلول‌ها وارد فاز آپوپتوزیس می‌شوند (۱۲).

سرطان روده بزرگ یا سرطان کولون یکی از انواع پرشیوع سرطان در سرتاسر دنیا می‌باشد، بطوری که در تمام دنیا، سرطان کولون، سومین نوع معمول سرطان است و ۱۰ درصد تمامی موارد سرطان را در بر می‌گیرد (۱۳). در سال ۲۰۱۲، ۱/۴ میلیون مورد ابتلای جدید به این بیماری و همین‌طور ۶۹۴ هزار مورد مرگ از آن اتفاق افتاد. این بیماری در کشورهای توسعه یافته شایع‌تر است و ۶۵ درصد موارد در این کشورها یافت می‌شود و شیوع این بیماری در زنان کمتر از مردان است (۱۴). به‌طور معمول جهت درمان سرطان کولون از روش‌های جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و غیره. استفاده می‌کنند اما این روش‌ها دارای اثرات جانبی زیادی می‌باشند، بنابراین استفاده از روش‌های درمانی جایگزین از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد که این راهکارهای جایگزین، استفاده از نانوذرات می‌باشد (۱۵). تاکنون مطالعات انجام گرفته برروی اثرات سمیت سلولی نانوذره TiO_2 بر رروی رده‌های سلولی سرطان ریه، سرطان سینه، سرطان پروستات و سرطان دهانه رحم به انجام رسیده است (۱۶). هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذره TiO_2 بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ و همچنین تأیید القای آپوپتوز توسط روش رنگ‌آمیزی DAPI و فلوسیتومتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

خصوصیات نانوذره تیتانیوم دی اکسید (TiO_2) مورد مطالعه

نانوذره TiO_2 خریداری شده از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان دارای متوسط اندازه ذرات نانو اکسید تیتانیوم ۲۰ نانومتر، ۹۹/۹۹ درصد خلوص و از شرکت امریکایی US Nano می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذره دی اکسید تیتانیوم. تصویر گرفته شده با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰۰× می‌باشد.

Fig 1) The transmission electeron microscopy image of titanium dioxide nanoparticle with ×100000 magnification.

کشت سلول و بررسی اثرات سمیت سلولی

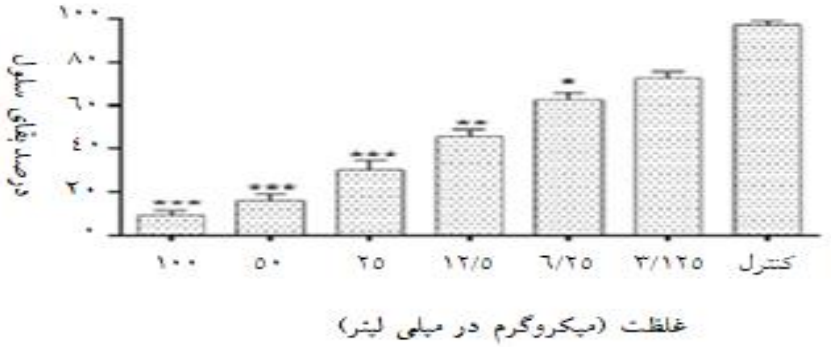
رده سلولی سرطان کولون (HT29) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با مشخصات– HT29 cell: Human colon cancer cell Line (NCBI C135) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

گلوتامین ۲ میلی‌مولار و سدیم پیرووات ۱ میلی‌مولار در ۵ درصد CO_2 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به منظور بررسی اثرات کشندگی نانوذرات TiO_2 بر روی رده سلولی سرطانی HT29 از روش کالریمتری MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. در ابتدا تعداد ۱×۱۰۶ سلول HT29 در داخل چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای کاشته شد و غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره TiO_2 بر روی رده سلولی HT29 به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد. به دنبال آن بعد از ۲۴ ساعت، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای تخلیه شد و به آن رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵CO_2 درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزاریدر (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول‌های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

همچنین میزان غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز بررسی شد.



شکل ۲) درصد بقای سلول‌های HT29 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت، نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (*P<۰/۰۵:، **P۰/۰۱>، ***P<۰/۰۰۱: n=3).

Fig. 2) The cell viabity of HT29 cells against differenr concentration of titanium dioxide nanoparticle in 24 hours. Percentage of viability is expressed relative to untreated controls ($P<0.05^{*}$, $P<0.01^{**}$, $P<0.001^{***}$, n=3).

سنتز cDNA و اندازه‌گیری بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ (casp3) و ۹ (casp9) با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا RNA سلول‌های تیمار شده و نشده با نانوذرات TiO_2 با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن،آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد. سنتز مولکول‌های cDNA با استفاده از کیت Revert AidTM First strand cDNA

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت که مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش 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 میلی‌مولار)، یک میکرولیتر 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 (غیرفعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف کاسپاز ۳ و ۹ و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای ژن‌های مورد مطالعه کاسپاز ۳ و ۹ و GAPDH در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱) توالی پرایمرهای ژن‌های کاسپاز ۳، ۹ و GAPDH

نام ژن	توالی پرایمر (۵′ به ۳′)
کاسپاز ۳ (casp3)	F ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC R CGTACCAGAGCGAGATGACA
کاسپاز ۹ (casp9)	F GGCGGAGCTCATGATGTCTGTG R TTCCGGTGTGCCATCTCCATCA
GAPDH	F CGTCTGCCCTATCAACTTTCG R CGTTTCTCAGGCTCCCTCT

واکنش Real Time PCR شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)، یک میکرولیتر (۴۰۰ نانومولار) از پرایمرهای جلویی و برگشتی اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر cDNA (۳۰۰ نانوگرم) و مابقی آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. 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 ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه انجام گرفت. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با نانوذره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با نانوذره) محاسبه و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (GAPDH) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

رنگ‌آمیزی DAPI

جهت بررسی آپوپتوز در سلول‌های HT29 تیمار شده با نانوذره TiO_2 از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. به منظور رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ DAPI ابتدا سلول‌ها در پلیت ۶ خانه کاشته شدند به دنبال آن سلول‌ها با غلظت IC50 از نانوذره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و با فرمالدهید ۰/۴ درصد فیکس شدند. در ادامه، سلول‌ها با رنگ DAPI ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌ها مجدد با PBS دو بار شستشو داده شدند و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. در نهایت آپوپتوز با قطعه قطعه شدن هسته تعیین شدند.

آنالیز میزان آپوپتوز/نکروز سلول‌های HT29 توسط روش فلوسیتومتری

به منظور بررسی میزان القای آپوپتوز در سلول‌های کولون (HT29) تیمار شده با نانوذره TiO_2، این سلول‌ها با استفاده از روش AnnexinV/propidium iodide(PI)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

(Apoptosis detection kit, Roch, Germany) و دستگاه فلوسیتومتری بر اساس دستورالعمل مربوطه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های HT29 (۱×۱۰۵ سلول/چاهک) با غلظت IC50 عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده HT29 به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. طول موج برانگیخته (Excitation wavelength) استفاده شده ۴۸۸ نانومتر و طول موج انتشار (emission wavelength) ۶۱۰ نانومتر برای PI بود. در نهایت میزان سلول‌های نکروز/آپوپتوز شده توسط دستگاه فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و با تست Tukey's *post-hoc* مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات به صورت mean±standard deviation (SD) نمایش داده شده‌اند و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

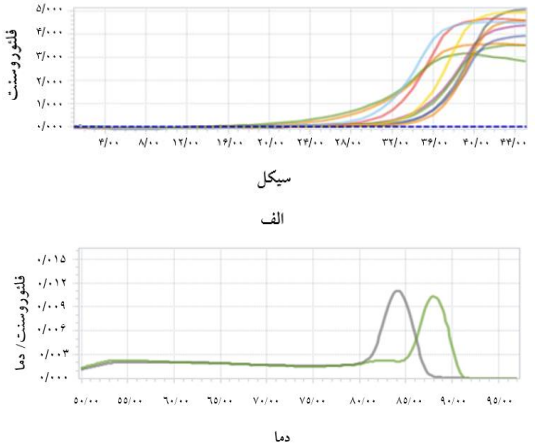
یافته‌ها

تیمار سلول‌های HT29 با نانوذرات TiO_2 در مدت ۲۴ ساعت

تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره TiO_2 با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بر اساس تست آماری one way ANOVA گروه‌های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که نانوذره TiO_2 در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲). همچنین میزان IC50 برای نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مدت زمان ۲۴ ساعت ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

پروفایل بیانی ژن‌های مورد مطالعه در سلول‌های HT29 تیمار شده با نانوذره TiO_2

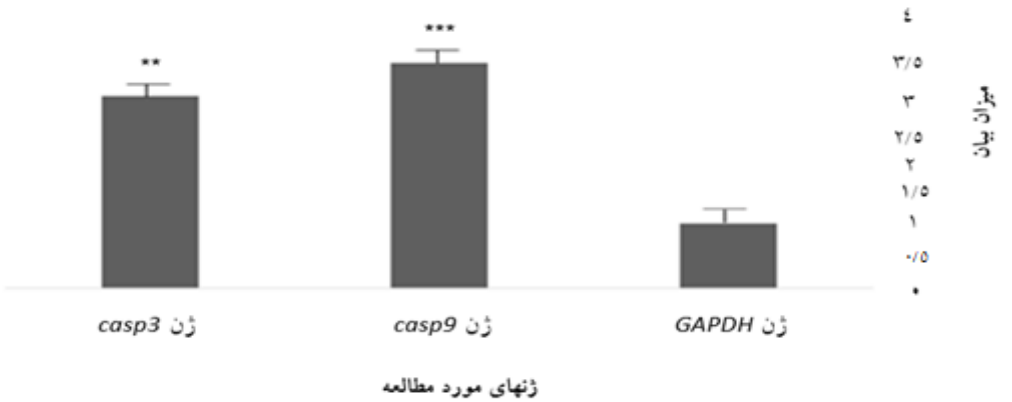
جهت بررسی بیان ژن‌های casp3، casp9 از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی که فقط قطعه مورد نظر را تکثیر کرده و از تکثیر قطعات غیر اختصاصی ممانعت شود، استفاده شد. نمودار حاصل از تابش فلورسانس مربوط به محصولات مختلف واکنش PCR در شکل ۳ نشان داده شده است (کلیه تیمارها و واکنش‌های PCR به‌صورت داپلیکیت انجام گرفت). نتایج این مرحله حاکی از آن بود که، دمای اتصال پرایمر مناسب برای هر دو ژن casp3، casp9 به ترتیب با دمای ۸۴/۱۳ درجه سانتی‌گراد و دمای ۸۷/۹۱ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۳). تغییر در بیان ژن‌ها در سلول HT29 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذره TiO2 بعد از ۲۴ ساعت ارزیابی شد. نسبت بیان ژن‌های casp3 و casp9 به ژن مرجع در رده سلولی HT29 تیمار شده با نانوذره طی ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان (P=۰/۰۰۰۵) ۲/۶۹±۰/۱۳ و (P=۰/۰۰۰۶) ۳/۴۶±۰/۲۹ (P=۰/۰۰۰۲) افزایش یافت (شکل ۴).



شکل ۳) (الف). نمودار تکثیر ژن‌های مورد مطالعه. (ب): نمودار آنالیز منحنی ذوب. پیک بنفش منحنی ذوب ژن *casp3* با دمای ۸۴/۱۳ درجه سانتی‌گراد و پیک سبز منحنی ذوب ژن *casp9* با دمای ۸۷/۹۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

Fig 3) The amplification plot of desired genes. (B): Melting curve analysis. The purple peak shows melting curve of casp3 gene with 84.13 ^{0} C and green peak shows the metig curve of casp 9 gene with 87.91 ^{0} C.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

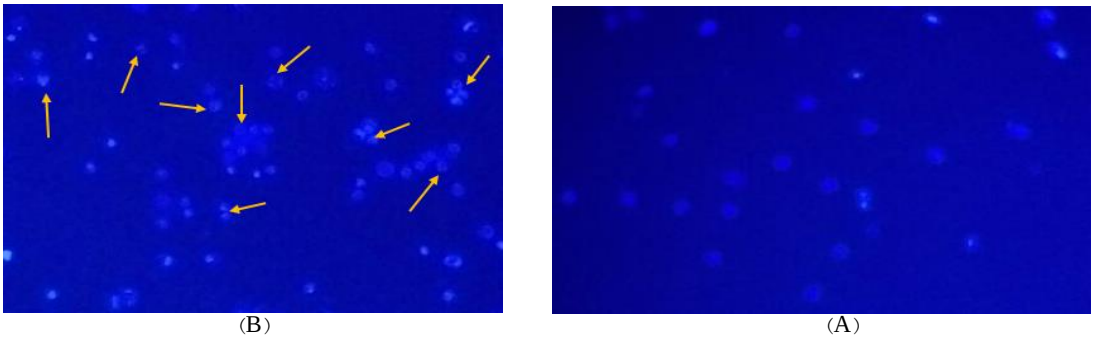


شکل ۴) بررسی بیان ژن های *casp3* و *casp9* در مقایسه با ژن مرجع (GAPDH). (*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، *** P<۰/۰۰۱: n=3).

Fig. 4) The gene expression of *casp3* and *casp9* in comparision of reference gene (GAPDH). ($P<0.05^{*}$, $P<0.01^{**}$, $P<0.001^{***}$, n=3).

رنگ‌آمیزی DAPI

در این مطالعه به منظور بررسی فرایند آپوپتوز از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، هسته سلول‌های تیمار شده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با سلول‌های کنترل تغییر شکل داده است که نشان دهنده وقوع فرایند آپوپتوز می‌باشد.



(B) (A)

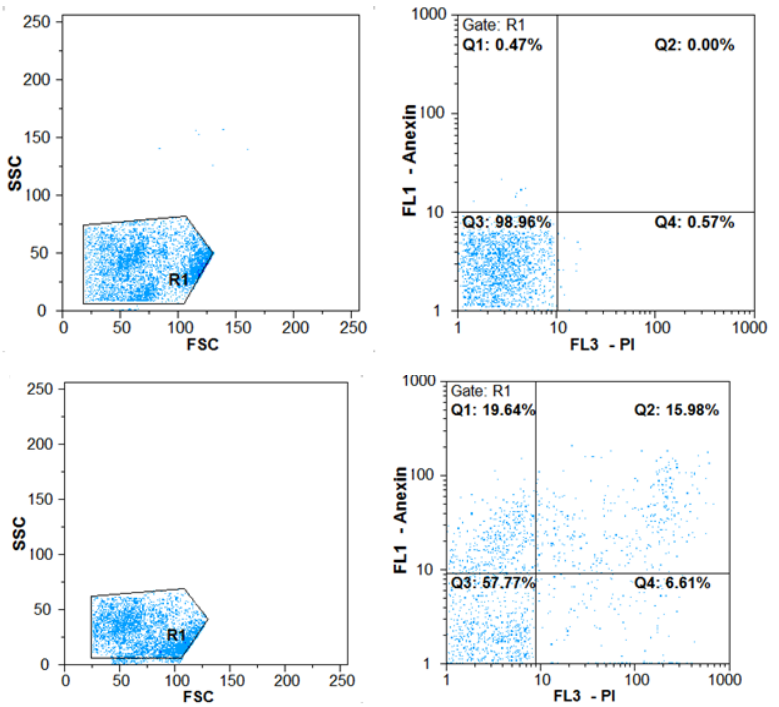
شکل ۵) رنگ‌آمیزی DAPI به منظور تشخیص آپوپتوز. A: سلول قبل از تیمار، B: سلول بعد از تیمار با غلظت IC50 نانوذره TiO_2 در مدت ۲۴ ساعت (B). فلش‌ها سلول‌های آپوپتوتیک را نشان می‌دهند.

Fig 5) DAPI staining in order to detection of apoptosis. A: The cells befor treatment, B: after treatment with IC50 value of TiO2 nanoparticle in 24 h. (B): The arrows shows apoptotic cells.

نتایج فلوسیتومتری

به منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذره TiO_2 این سلول‌ها با FITC Annexin V and PI رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا سلولی منتقل شده و توسط Annexin V رنگ می‌شود و رنگ PI به هسته سلول در زمان نکروز متصل می‌شود. نتایج فلوسیتومتری در شکل ۶ نشان داده شده است که طی آن مربع سمت چپ بالا (Q1) بیانگر درصد سلول‌های آپوپتوز تأخیری، مربع بالا سمت راست (Q2) نشان دهنده سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه می‌باشد. همانطوری که نتایج نشان می‌دهد نانوذره TiO_2 سلول را به سمت آپوپتوز ۳۸ درصدی هدایت کرده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]



شکل ۶) نتایج آنالیز فلوسایتومتری تأثیر نانوذره TiO_2 بروی رده سلولی HT29. دو تصویر بالا: نمونه کنترل تیمار نشده، دو تصویر پایین: نمونه تحت تیمار نانوذره. در تصاویر چهارخانه: مربع سمت چپ پایین: سلول‌های زنده، مربع سمت چپ بالا: آپوپتوز اولیه، مربع سمت راست پایین: نکروز، مربع سمت راست بالا: آپوپتوز تأخیری. در نمونه‌های تحت تیمار نانوذره سلول‌ها وارد آپوپتوز ۳۸ درصدی شده‌اند.

Fig 6) The flowcytometry analysis of TiO2 nanoparticle on HT29 cell line. Two upper images: untreated cells (Control), two lower images: treated cells with nanoparticle. The bottom left square: live cells, top left square: early apoptosis, bottom right square: necrosis, upper right square: delayed apoptosis

بحث

خاصیت ضد سرطانی نانوذرات از چندین سال قبل مشخص شده است و به همین دلیل نانوذرات از اهمیت بالائی برخوردار هستند. با توجه به اینکه تغییرات ژنتیکی زیادی مورد نیاز است تا فرم سرطانی یک سلول ایجاد شود و به علت اینکه ایجاد بسیاری از سرطان‌ها جنبه ارثی دارد، در برخی از انواع سرطان‌ها بعد از درمان و جراحی، امکان ایجاد توده اولیه وجود دارد (۱۶). علاوه بر متاستاز، پدیده آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، مهم‌ترین شکل خودکشی سلول به شمار می‌رود. در این فرآیند بدون آنکه سلول‌ها و یا بافت‌های اطراف صدمه ببینند، سلول‌های ناخواسته، آسیب دیده و خطرناک حذف می‌شوند (۱۷). سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه‌ریزی شده فرار می‌کنند که یکی از دلایل آن تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند (۱۸). بیشتر عوامل ضد سرطانی آثار درمانی خودشان را با القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده اعمال می‌کنند. القای مرگ برنامه‌ریزی شده یکی از مهم‌ترین روش‌ها به منظور از بین بردن بدون عارضه سلول‌های سرطانی است (۱۹). در این مطالعه، با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT نشان داده شد که نانوذرات TiO_2 دارای اثر کشندگی وابسته به غلظت در سلول‌های سرطانی HT29 می‌باشند. علاوه بر این، در تحقیق حاضر مشخص شد نانوذرات TiO_2، باعث افزایش آپوپتوز در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

سلول‌های سرطانی HT29 شده است.

امروزه مرکز توجه مطالعات سرطان، جستجوی عوامل ضد سرطان با ضریب اطمینان بالاتر و قابلیت پذیرش بیشتر برای بیماران می‌باشد. علاوه بر این نانوذرات می‌توانند در ترکیب با شیمی درمانی سایتوتوکسیک و یا اشعه درمانی برای فعالیت ضد سرطانی سینرژیسم و یا مازاد عمل کنند. بنابراین درمان هدف‌دار شده به عنوان یک راهکار جدید و امیدوار کننده برای درمان سرطان است. با پیدایش علم نانوتکنولوژی، الگوی سیستم‌های انتقال دارو توسعه یافته است که این می‌تواند حمل کننده بسیاری از داروهای با خواص شیمیایی باشد و به طور فعال سلول‌های مشخص را هدف‌گیری کند و از سدهای بیولوژیکی عبور کرده و محموله خود را در جایگاه هدف بدون مداخلات دارویی انتقال دهند. امروزه توسعه نانوذرات به عنوان حاملین مؤثر دارو در مرکز توجه است (۲۰). در این مطالعه از نانوذرات TiO_2 جهت اهداف سیتوتوکسیک علیه رده سلولی سرطان کولون با استفاده از روش MTT استفاده شد. نتایج نشان داد که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثرات معنادار سمیت سلولی می‌باشد. یکی از دلایلی که نانوذرات TiO_2 اثر قابل توجهی بر روی سلول‌های سرطانی HT29 داشتند، این است که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن‌ها برروی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری می‌باشد. بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرایند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، بستر مناسبی برای نانوذره TiO_2 جهت تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می‌شود (۲۱). یکی دیگر از دلایل، تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین غشاء سلول‌های سرطانی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ آن‌ها می‌باشد (۲۲). مطالعات مختلفی جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات TiO_2 بر روی رده‌های سلول سرطانی به انجام رسیده است. گارسیا کونترارس (Garcia-Contreras) و همکاران، اثرات سمیت سلولی نانوذره TiO_2 را برروی رده سلولی کارسینومای سلول‌های دهانی با روش MTT مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره TiO_2 در غلظت‌های پایین (۳/۲-۰/۲ میلی‌مولار) فاقد سمیت سلولی معنادار می‌باشد اما در غلظت‌های بالاتر اثرات سمیت سلولی قابل توجهی دارد (۲۳). همچنین چلپا (Chellappa) و همکاران، اثرات سیتوتوکسیک نانوذره TiO_2 را بر روی رده سلولی MG63 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که سمیت سلولی نانوذره TiO_2 وابسته به دوز و زمان است و پیشنهاد دادند که این نانوذره می‌تواند کاربردهای بیومدیکال داشته باشد (۲۴). بطور کلی نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات در زمینه سمیت سلولی نانوذره TiO_2 همخوانی دارد. یکی دیگر از مکانیسم‌های سمیت سلولی نانوذره TiO_2 ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن (ROS) می‌باشد که باعث برهم زدن تعادل ردوکس سلولی می‌شوند که اصطلاحاً استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود. استرس اکسیداتیو باعث تخریب آنزیم‌های آنتی اکسیدان سلولی، تخریب ساختار DNA سلولی، اکسیداسیون پروتئین‌های سلولی و لیپید غشایی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۵).

به طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در حوزهٔ نانو به شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزاد سازی سیتوکروم c از آن آغاز می‌شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی و القاء مرگ برنامه‌ریزی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۲۶). در مطالعه ما به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی HT29 میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ با روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بعد از تیمار سلول‌ها میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه افزایش بیان چشمگیری دارند که بیانگر القای آپوپتوز در سلول‌های HT29 می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که نانوذرات TiO_2 می‌توانند آپوپتوز را القا کند که توسط رنگ‌آمیزی DAPI و فلوسیتومتری نشان داده شد.

یکی از موضوعات مهم در زمینه استفاده از نانوذرات فلزی در درمان سرطان، عدم سمیت سلولی نانوذرات بر روی سلول‌های نرمال است. مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات TiO_2 بر رده‌های سلول سرطانی تأثیر بیشتری دارد که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن‌ها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری می‌باشد. بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرایند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، بستر مناسبی برای نانوذره TiO_2 تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می‌شود. یکی دیگر از دلایل، تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین غشاء سلول‌های سرطانی و طبیعی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ آن‌ها می‌باشد. همچنین اختلاف در شکل، اندازه و بار سطحی نانوذرات عامل دیگر در تفاوت میزان سمیت نانوذرات بین سلول‌های سرطانی و نرمال می‌باشد. برون (Brune) و همکاران، تأثیر نانوذرات TiO_2 را بر روی اپی‌تلیال گوارشی در شرایط آزمایشگاهی و بدن موجود زنده مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات TiO_2 از اپی‌تلیال ایلئوم و کولون عبور کرده و آگلومره می‌شود. در شرایط آزمایشگاهی این نانوذرات در سلول‌های M و سلول‌های مخاطی تجمع پیدا می‌کنند اما به‌طور قابل توجهی سمیت سلولی و آپوپتوز را القا نمی‌کنند و این نکته در زمینه عدم سمیت سلولی این نانوذره برروی سلول‌های نرمال و سالم بسیار حایز اهمیت است که بتوان در آینده به عنوان کاندید دارویی ضدسرطان مورد استفاده قرار گیرد (۲۷). بدیهی است که شناسایی اهمیت الگوی بیان ژن‌های آپوپتوزی در پاسخ به فعالیت متاستازی داروهای ضدسرطانی حائز اهمیت است. بنابراین بررسی‌های بیشتری برای اثبات اینکه پروفایل بیانی mRNA این ژن می‌تواند در پاسخ به درمان ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه استفاده درمانی نانوذرات TiO_2 را در سلول‌های سرطانی کولون نشان داد. طبق این بررسی‌ها مطالعات بالینی روی مدل حیوانی و انسانی برای تأیید اثر نانوذرات و همچنین تأثیر این نانوذره بر روی رده سلولی سالم و نرمال ضروری می‌باشد. بنابراین استفاده از نانوذرات TiO_2 در افزایش بیان برخی ژن‌های پروآپوپتوزی می‌تواند مؤثر باشد. می‌توان بر اساس این تحقیق و تحقیقات پیشین نتیجه گرفت که نانوذره TiO_2 اثرات ضد سرطانی قدرتمندی بر سلول‌های سرطانی دارد و مشتقات این ترکیب در آینده می‌تواند نقش مهمی در درمان این نوع از سرطان‌ها بازی کنند. بنابراین در صورتی که پروسه بالینی این نانوذره تأیید شود، این نانوذرات می‌توانند در موارد بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان کولون در آینده به کار گرفته شوند.

سپاس و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته سلولی و مولکولی خانم فائزه شکرالهی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی به اجرا درآمده است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnology 2004; 2: 3.

2.Liang XJ, Chen C, Zhao Y, et al. Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. Curr Drug Metab 2008; 9(8): 697-709.

3.Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. Mol Cells 2011; 31(4): 295-302.

4.Zhang G, Zeng X, Li P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. J Biomed Nanotechnol 2013; 9(5): 741-50.

5.Chen Y, Chen H, Shi J. Drug delivery/imaging multifunctionality of mesoporous silica-based composite nanostructures. Expert Opin Drug Deliv 2014; 11(6):917-30.

6.Zaimy MA, Saffarzadeh N, Mohammadi A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. Cancer Gene Ther 2017; 24(6): 233-43.

7.Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. Eur J Pharm Biopharm 2015; 93: 52-79.

8.Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. Colloids Surf B Biointerfaces 2015; 126: 631-48.

9.Ali I, Lone MN, Suhail M, et al. Advances in Nanocarriers for Anticancer Drugs Delivery. Curr Med Chem 2016; 23(20): 2159-87.

10.Peer D, Karp JM, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nat Nanotechnol 2007; 2(12): 751-60.

11.Shi H, Magaye R, Castranova V, et al. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Part Fibre Toxicol 2013; 10: 15.

12.Wang Y, Cui H, Zhou J, 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(7): 5519-30.

13.Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med 2016; 13(1): 120-35.

14.Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. Gastroenterology 2015; 149(5): 1177-90.

15.Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, et al. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. Colorectal Dis 2012; 14(2): e31-47.

16.Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, et al. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. Int J Nanomedicine 2009; 4: 1-7.

17.Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4): 495-516.

18.Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. Trends Cell Biol 2013; 23(12): 620-33.

19.Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998; 138(5): 482-91.

20.Gmeiner WH, Ghosh S. Nanotechnology for cancer treatment. Nanotechnol Rev 2015; 3(2): 111–22.

21.Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. Adv Exp Med Biol 2012; 942: 287-308.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

22.Nicolson GL. Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. Cancer Res 2015; 75(7): 1169-76.
23.Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, et al. Effects of TiO2 nanoparticles on cytotoxic action of chemotherapeutic drugs against a human oral squamous cell carcinoma cell line. In Vivo 2014; 28(2): 209-15.
24.Chellappa M, Anjaneyulu U, Manivasagam G, et al. Preparation and evaluation of the cytotoxic nature of TiO2 nanoparticles by direct contact method. Int J Nanomedicine 2015; 10 Suppl 1: 31-41.
25.Dubey A, Goswami M, Yadav K, et al. Oxidative stress and nano-toxicity induced by TiO2 and ZnO on WAG cell line. PLoS One 2015; 10(5): e0127493.
26.Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. J Med Genet 2009; 46(8): 497-510.
27.Brun E, Barreau F, Veronesi G, et al. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. Part Fibre Toxicol 2014; 11: 13.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

Iran South Med J 2019; 21(6): 426-438

Original Article

Cytotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Colon Cancer Cell Line (HT29) and Analysis of Caspase-3 and 9 Gene Expression Using Real Time PCR and Flow Cytometry

***F. Shokrolahi** (MSc)[1*], **E. Aliasgari** (PhD)[1**], **A. Mirzaie** (PhD)[2]*

[1] *Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[2] *Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran*

(Received 16 Jan, 2018 Accepted 24 Jun, 2018)

Abstract

Background: Today, titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles present extensive therapeutic applications. The present study was conducted to investigate the cytotoxicity of TiO_2 on colon cancer cell line (HT29), and analyze the expression of caspase-3 and 9 genes.

Materials and Methods: The present experimental study used the MTT assay to examine the cytotoxicity of 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml concentrations of TiO_2 nanoparticles on cell line HT29. After the treatment of HT29 cells with IC50 concentration of TiO_2, the gene expression levels of caspase-3 and caspase-9 were investigated and compared with the reference gene of GAPDH using real time PCR. DAPI staining and flow cytometry were ultimately used to confirm apoptosis in HT29 cells.

Results: The treatment of HT29 cells with different concentrations of TiO_2 showed that TiO_2 nanoparticles at 50 and 100 µg/ml concentrations present the highest cytotoxicity, which was statistically significant ($P<0.05$). Moreover, the expression of caspase-3 gene was found to be significantly upregulated by 2.0±69.13 ($P<0.001$) and that of caspase-9 gene by 3.0±46.29 ($P<0.001$) in HT29 cell lines treated with TiO_2 nanoparticles for 24 hours. The results of DAPI staining and flow cytometry also confirmed apoptosis in HT29 cells.

Conclusion: According to the obtained results, TiO_2 nanoparticles can be recommended as prospective medicinal candidates for pharmaceutical purposes, although further studies are required in this field.

Keywords: TiO_2 nanoparticle, colon cancer, apoptosis, real time PCR, flow cytometry

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Shokrolahi F, Aliasgari E, Mirzaie A. Cytotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Colon Cancer Cell Line (HT29) and Analysis of Caspase-3 and 9 Gene Expression Using Real Time PCR and Flow Cytometry. Iran South Med J 2019;21(6):426-438

Copyright © 2019 Shokrolahi, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence*: Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E.mail: ealiasgari@iauet.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-1708-8868
**ORCID: 0000-0003-0512-4224

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]