

بررسی تاثیر نانو ریز حباب ها بر بیان ژن p53، القای آپوپتوز و مهار رشد سلولی سرطان سینه (4T1)

آزیتا مهجور^۱، حمید رضا رحیمی^۲، اکبر صفی پور افشار^{۴*}

- ۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات التهاب نوروزنیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- استادیار، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه سرطان سینه، شایع ترین سرطان در بین زنان است و میانگین سن ابتلا در کشور ایران پایین تر از میانگین جهانی است. امروزه استفاده از ترکیبات نانو به عنوان یکی از روش های درمان موثر سرطان تبدیل شده است. تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران با هدف بررسی استفاده از آب حاوی نانو حباب اکسیژن با غلظت ۹۸ درصد اکسیژن به عنوان مکمل درمانی در درمان سرطان سینه در موش می باشد. مواد و روش ها موش های BALB/c با گرافت سلول های سرطانی مهاجم 4T1-TNBC، مبتلا به سرطان سینه شدند و سپس موش ها در دو گروه آماری با آب نانوحباب اکسیژن و نانو حباب هوا در مدت ۱۴ روز تغذیه و با گروه کنترل (آب معمولی) مقایسه شدند. در نهایت بیان ژن p53 در سه گروه با استفاده از روش Real time PCR با هم مقایسه شدند. یافته ها کاهش سایز تومور در هفته دوم و همچنین کاهش وزن نهایی تومور در موش های تغذیه شده با نانو حباب اکسیژن در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید و افزایش بیان ژن p53 در گروه نانو اکسیژن که احتمالاً ناشی از غلظت بالای اکسیژن در بافت سرطانی بود نیز نسبت به گروه کنترل بدست آمد. نتیجه گیری به نظر می رسد نانو حباب اکسیژن توانسته است با افزایش بیان ژن p53 در مقایسه با آب نانوها و آب معمولی در مهار رشد توده توموری نقش مثبتی را ایفا نماید. کلیدواژه ها p53، نانوحباب اکسیژن، real time RT-PCR، سرطان سینه، موش، 4T1-TNBC	تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۳ *نویسنده مسئول: اکبر صفی پور افشار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، نیشابور، ایران تلفن: ۰۵۱-۴۲۶۲۱۹۰۱ پست الکترونیک: Asafshar@iau-neyshabur.ac.ir



مقدمه

سرطان پستان به عنوان رایج‌ترین سرطان در بین زنان شناخته می‌شود که در بین زنان ایرانی علت ۷۶ درصد سرطان‌های شایع زنان است و در سال ۲۰۱۶ حدود ۴۱ هزار مورد ابتلا به این سرطان در ایران گزارش شده است. میانگین سنی زنان مبتلا ۹۱-۴۱ سال است که این میزان در ایران پایین‌تر از سایر کشورها است (۱). با توجه به افزایش تعداد مبتلایان به سرطان سینه در سال‌های اخیر و هم‌منطور افزایش بار اقتصادی وارده بر بیمار به واسطه پیشرفت تکنولوژی در درمان سرطان، محققان بدنبال کاهش هزینه و روش‌های مکمل درمانی کم هزینه‌تر می‌باشند.

در واقع هر چه وخامت و کلاس درگیری سرطان بالاتر باشد هزینه‌ها بالاتر و احتمال بهبودی کمتر است (۲). در مقایسه با تومورهای پستانی مختلف، میزان شیوع تومور سه گانه منفی (TNBC) کمتر از انواع دیگر است ولی با توجه به میزان پایین پاسخ به درمان و بهبودی ناچیز، مورد اهمیت هستند (۳). تومور سلولی 4T1 که اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط میلر^۱ و همکاران در بافت کارسینوم پستان موش شناسایی شد یک سلول تومورال سه گانه منفی فوق العاده مهاجم بوده و بر خلاف سایر مدل‌های توموری قادر است خود به خود از بافت ابتدایی تومور در غدد پستان به مقاصد چندگانه از جمله کبد و کلیه حمله کند. این الگوی متاستاتیک بسیار شبیه تومور پستان در انسان است، به صورتیکه در انسان تهاجم اولیه تومورهای پستانی به ریه و کبد بوده و 4T1 در موش همین رفتار را از خود نشان می‌دهد. تهاجم سلول سرطانی سینه در انسان به مغز

استخوان نیز در ۷۰ درصد موارد رخ می‌دهد در مورد 4T1

نیز می‌توان این رفتار مشابه را بررسی کرد (۴).

p53 به عنوان یک عامل رونویسی و تومور ساپرسور شناخته شده است و به تغییرات سلول پاسخ داده و موجب القا آپوپتوز، ترمیم DNA می‌شود. در سلول سرطانی، جهش در p53 منجر به تغییر در فاکتورهای پایین دست و بالادست آن و تغییر در سیگنالینگ می‌گردد (۵).

اکسیژن نقش مهمی در فرآیندهای متابولیسم حیاتی از جمله گیرنده الکترون در طی فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و تولید انرژی دارد. از طرفی دیگر، با کاهش سطح اکسیژن در سلول گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) تولید می‌شوند. سلول‌ها تا حدی می‌توانند با اثرات سمی و آسیب اکسیداتیو این مولکول‌ها مقابله کنند و در صورت تجمع بیش از حد ROS آسیب اکسیداتیو به DNA، پروتئین‌ها و چربی ایجاد می‌شود که در نهایت ممکن است به بیماری‌های دژنراتیو مرتبط با پیری و سرطان منجر شود. در واقع، شروع و پیشرفت سرطان با افزایش جهش‌ها و آسیب DNA، بی‌ثباتی ژنوم و تکثیر سلولی به استرس اکسیداتیو مرتبط است (۷۶). در مطالعات انجام شده توسط شن برگر^۲ و دیکسون^۳ اثر مجاورت اکسیژن بر سلول‌های صاف عضلات ریه مشخص گردید که تکثیر و توقف چرخه سلولی در فاز S وابسته به غلظت اکسیژن و مدت زمان مواجهه سلول با آن می‌باشد و این تغییرات موجب افزایش بیان p53 و مهار کننده‌های (p21^{waf1/cip1}) CDK خواهد شد. در نتیجه ترمیم سلولی بیشتر از آپوپتوز مشاهده می‌شود (۸).

Shenberger^۲
Dixon^۳

Fered Miller^۱



محیط، گرافت بافت توموری متعلق به سلول 4T1 برای ۱۸ عدد از موش‌ها انجام شد.

کد اخلاق: IR.MUMS.fm.REC.1397.299

القاء تومور

ابتدا موش‌ها با ترکیب ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین که به صورت ایزوتونیک داخل یک سرنگ انسولین تهیه می‌شود از ناحیه یک چهارم خلفی فضای شکمی به روش تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس به مقدار ۷۰-۱۰۰ میلی‌گرم از بافت توموری تازه استخراج شده یک موش مبتلا به سرطان سینه با سلول 4T1 که در نرمال سالین به مدت چند دقیقه تا انجام عمل گرافت قرار داده شده بود، به روش کاملاً استریل زیر پوست موش در ناحیه پهلوی (Subdermal) قرار داده شد.

اجرای آزمایش

موش‌ها تحت مراقبت و تغذیه با آب و غذای عادی قرار گرفتند و روزانه وزن و وضعیت زنده ماندن موش‌ها در مقایسه با موش‌های سالم فاقد گرافت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حجم توده توموری به وسیله اندازه‌گیری بزرگترین قطر و کوچکترین قطر توده تومور بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۱۰/۱۱).

$$V = \frac{(\text{longest diameter of tumor}) \times (\text{the shortest diameter})^2}{2}$$

بعد از اینکه اندازه توده تومور به حد دلخواه ۷۵-۸۰ میلی‌متر مکعب (حدود ۱۴ روز بعد از گرافت) رسید، تیمار شروع شد (۱۰). موش‌ها به سه گروه نانو اکسیژن، گروه نانو هوا و کنترل دسته‌بندی شدند که به دو گروه آب حاوی نانو اکسیژن و نانو هوای شرکت میناب توس با pH=۸-۸/۵ و درجه اشباع ۱۰۰ درصد داده شد. سایز تومورها در مدت ۱۴ روز تیمار با آب نانو هوا و نانو اکسیژن به تفکیک در

بر اساس خواص دینامیک گاز در مایع، میکرو حباب‌ها و به خصوص نانوحباب‌ها زمان بیشتری تحمل ماندن زیر آب را دارند و می‌توانند زنجیره‌ای از حباب‌ها را تشکیل داده و به راحتی در فاز مایع حرکت کنند (۹). تکنیک آب درمانی حاوی نانومیکرو حباب‌های اکسیژن یک روش کم خطر و کم هزینه و آسان در درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان می‌باشد که به کمک رساندن اکسیژن به بافت توموری مانع از رگ‌زایی و گسترش تومور می‌شود. لذا هدف از این مطالعه، مصرف خوراکی آب حاوی نانوحباب اکسیژن و بررسی اثرات آن بر سایز و اندازه رشد تومور همچنین بررسی بیان ژن p53 در کمک به کنترل سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوحباب‌ها

در مرحله نخست، آب نانو اکسیژن و نانو هوا (حاوی حباب‌های اکسیژن و هوا در پایه آب مقطر) از شرکت میناب توس واقع در پارک علم و فن آوری دانشگاه شاهرود با شماره ثبت ۵۴۷۷۸ با pH=۸-۸/۵ و درجه اشباع ۱۰۰ درصد نانو میکرو حباب‌های هوا و اکسیژن به تفکیک، به میزان ۱۰ لیتر تهیه شد تا آب روزانه مورد نیاز برای گروه‌های تیماری فراهم شود. آب‌ها در دمای اتاق و دور از نور مستقیم نگهداری شدند.

حیوانات

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شد. بدین منظور ۱۸ عدد موش ماده BALB/c (inbred) ۳-۵ هفته با وزن ۱۴-۱۵ گرم از انیستیتو پاستور تهران خریداری و به حیوان خانه دانشکده پزشکی مشهد منتقل شد. پس از ۵ روز آشنا سازی با



انجام شد و cDNA سنتز گردید. بررسی بیان ژن با کمک روش real time RT-PCR (روش $\Delta\Delta CT$) و با دستگاه Step-one (ABI) انجام شد که بدین منظور پرایمرهایی برای p53 و بتا‌اکتین مطابق جدول ۱ به شماره سفارش (OG171226-234) توسط شرکت دنازیست آسیا واقع در دانشگاه فردوسی مشهد طراحی گردید.

گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این فرمول در مدت ۱۴ روز تیمار در نرم‌افزار SPSS v.16 در غالب جدول متغیرها ثبت شد و آنالیز داده‌ها به روش ANNOVA انجام شد.

بعلاوه در روز ۱۴ تیمار، پس از قربانی کردن موش‌ها، از بافت تازه تومورها با استفاده از کیت ساخت شرکت Jena RNA استخراج BIOscience GmbH (cat.# pp-210S)

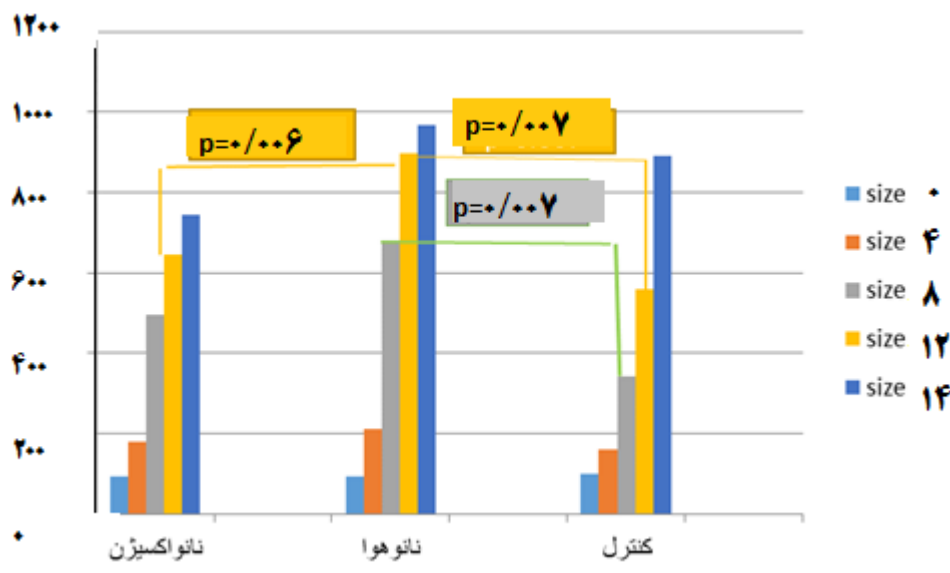
جدول ۱- طراحی پرایمرهای این مطالعه برای ژن p53 و بتا‌اکتین

p53	FP	5'-GTA TTT CAC CCT CAA GAT CC-3'
	RP	5'-TGG GCA TCC TTT AAC TCT-3
β ACTIN	FP	5'-GCG GGC GAC GAT GCT C-3'
	RP	5'-GGA TAC CTC TCT TGC TCT GGG-3'

گروه کنترل معنی‌دار بود بطوریکه سطح معنی‌داری بین دو گروه نانو هوا و نانو اکسیژن ($P=0/007$) و گروه نانو هوا با گروه کنترل ($P=0/006$) بود (نمودار ۱). این یافته نشان داد آب نانو اکسیژن توانسته در مقایسه با دو گروه دیگر در مهار سایز تومور و کاهش روند رشد موثر باشد.

یافته‌ها

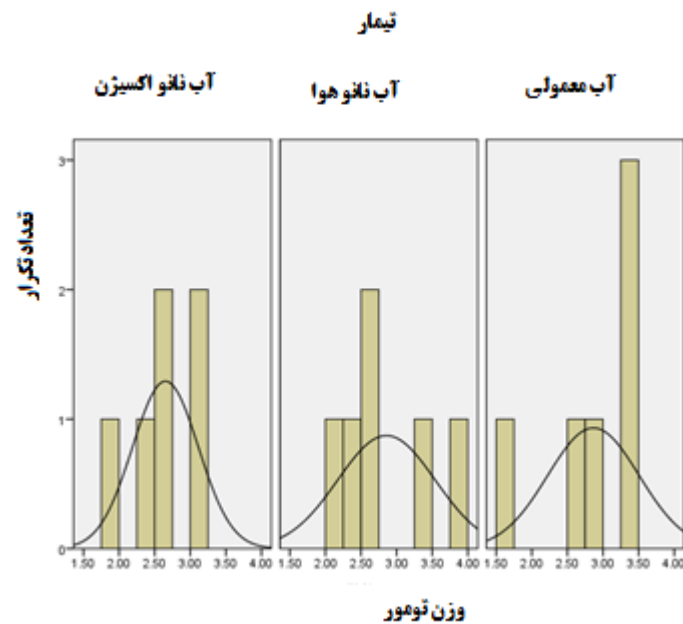
نتایج نشان داد که در روز ۸، اختلاف آماری معنی‌داری ($P=0/007$) بین گروه نانو هوا و گروه کنترل در سایز تومور وجود دارد. همچنین در روز ۱۰ این اختلاف واضح‌تر شد ($P<0/001$). در روز دوازدهم بعد از تیمار اختلاف آماری بین سایز تومور در دو گروه درمانی نانو هوا و نانو اکسیژن با



نمودار ۱- مقایسه سائز تومورها در روزهای صفر و ۴ و ۸ و ۱۲ و ۱۴ بر حسب میلیمتر مکعب

میانگین وزن در گروه کنترل و نانو هوا ۳ گرم بود ولی در گروه نانو اکسیدژن به کمتر از ۲/۵ گرم کاهش پیدا کرد.

نتایج نشان داد که وزن نهایی تومور در گروه نانو اکسیدژن در مقایسه با گروه‌های کنترل و نانو هوا کاهش یافته بود.

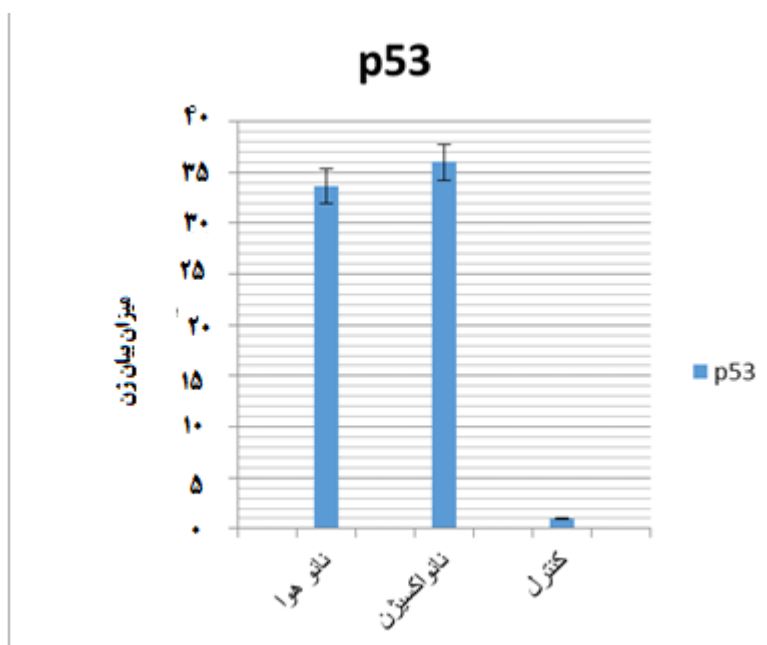


نمودار ۲- مقایسه وزن توده نهایی تومور در لحظه استخراج در گروه‌های مختلف



نانوها افزایشی بیشتر از ۳۴ برابر داشته است (نمودار ۳).

نتایج حاصل از بیان ژن به روش Real time RT-PCR (ΔΔCT) نشان داد که بیان p53 در گروه‌های نانو اکسیژن و



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن p53 در مقایسه با ژن پایه در گروه‌های درمانی مختلف

جدول ۲- میزان بیان ژن p53 و ΔΔCT p53 در گروه‌های مختلف

گروه‌های درمانی	p53 fold change ($2^{\Delta\Delta CT}$)	ΔΔCT p53 (ACT P53control - ACT P53nano)
نانو هوا	۳۳/۶۲±۲/۱	-۵/۰۷۱۲۴
نانو اکسیژن	۳۶/۰۱±۱/۸	-۵/۱۷۰۳۶
کنترل	۱	۰

اینکه رشد تومور همراه با ایجاد بافت نکروز (۱۱) و خصوصاً عفونت موضع توموری همراه بود افزایش سایز توده در گروه‌ها دور از تصور نبود. از بررسی ژن p53 در دو گروه تیماری نانو اکسیژن و نانو هوا نسبت به گروه کنترل، مشخص شد که بیان این ژن به شکل واضحی افزایش یافته

بحث

در بررسی‌های ابتدایی در خصوص سایز تومور در طول ۱۴ روز درمان با آب نانو اکسیژن و نانو هوا مشخص شد که بیشترین سایز در هفته دوم تیمار و خصوصاً در گروه کنترل و کمترین رشد مربوط به گروه نانو اکسیژن بود. با توجه به



که نشان دهنده فعالیت سلول‌های توموری پس از مصرف آب نانو هوا و نانو اکسیژن به سمت آپوپتوز بود. همچنانکه که دیده می‌شود بیان ژن p53 در گروه نانو اکسیژن حدود ۳۶ برابر و در گروه نانو هوا حدود ۳۳ برابر افزایش داشت (جدول ۱ و ۲).

هیو^۱ در زمینه ارتباط ROS و p53 دریافت که درمان جنین موش در مراحل تقسیم دو-چهار سلولی با H₂O₂ که یکی از مشتقات ROS می‌باشد، منجر به توقف تقسیم سلول و به عبارتی ایجاد اکسپتوز شد. سپس با استفاده از مهار کننده p53 (PFT α) نشان دادند که چرخه تقسیم سلولی افزایش یافت در حالیکه سطح p53 به شدت کاهش یافت. این مطالعه نشان داد ROS بر p53 تاثیر مستقیم گذاشت و ژن‌های هدف p53 (GADD45, P21) را نیز دستخوش تغییرات کرد (۱۳).

در مقایسه با یافته‌های هیو، شن برگر و کساوردانا^۲ گمان می‌رود در گروه نانو اکسیژن، علیرغم تصحیح نسبتا مناسب هیپوکسی و به تبع آن کاهش گونه فعال اکسیژن، افزایش بیان p53 را به دلیل آسیب DNA سلولی (آپوپتوز) در مجاورت اکسیژن ۹۸ درصد نشان داده است اما در گروه نانو هوا عدم کفایت اکسیژن در برطرف نمودن هیپوکسی و یا حضور مواد سمی نظیر نیتريت اکساید و کمک به حفظ مشتقات گونه فعال اکسیژن در سلول، شرایط القای اکسپتوز و افزایش بیان p53 را در مقایسه با گروه کنترل فراهم نموده است (۸ و ۱۳).

نتیجه‌گیری

می‌توان برداشت کرد که به غیر از آپوپتوز، اکسپتوز (مرگ سلولی مستقل از کاسپاز حاصل از تجمع گونه‌های فعال

اکسیژن) در بافت توموری نکرولی همراه با آبه بافتی دور از انتظار نیست که البته برای تایید قطعیت آن نیاز به بررسی‌های هیستوشیمیایی بافت توموری می‌باشد (۱۲). آب نانو اکسیژن توانست در مجموع مدت درمان در ۱۴ روز باعث کاهش سائز تومور مهار ضایعات تخریبی بافت توموری شده و همچنین باعث افزایش بیان p53 گردد. با توجه به تعداد کم نمونه‌ها و کمبود منابع مالی پیشنهاد می‌شود این بررسی در طیف وسیعتر و تعداد آماری بالاتری با در نظر گرفتن آزمایشات هیستوشیمیایی بافت در تایید آپوپتوز سلولی و همینطور ارزیابی پالس اکسیمتری موش‌ها در طول مدت تیمار انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور است که از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور و دانشگاه علوم پزشکی مشهد در طرح شماره ۹۶۰۷۱۵ استفاده نموده است. همچنین از همکاری‌های بسیار ویژه آقای دکتر محمود حسینی (ریاست اتاق حیوانات دانشکده پزشکی)، آقای هاشم زهی دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی و آقای دکتر اسماعیل نورمحمدی دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی تقدیر به عمل می‌آید.

Hu^۱
kesavardhana^۲



References

1. Asgarian F, Mirzaei M, Asgarian S, Jazayeri M. Epidemiology of Breast Cancer and the Age Distribution of Patients over a Period of Ten Years. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease* 2016;9(1):31-6.
2. Joyce DP, O'Neill C, Heneghan HM, Curran C, Barry K, Sweeney K, *et al.* The changing cost of breast cancer care: lessons from a centralised modern cancer centre. *Ir J Med Sci* 2018.
3. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer* 2007;109(9):1721-8.
4. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001.
5. Bourdon J-C. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 2007;97(3):277-82.
6. Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Adv Cancer Res.* 2014;122:1-67.
7. Zhou Y, Xu H, Ding Y, Lu Q, Zou M-H, Song P. AMPK α 1 deletion in fibroblasts promotes tumorigenesis in athymic nude mice by p52-mediated elevation of erythropoietin and CDK2. *Oncotarget* 2016;7(33):53654-667.
8. Shenberger JS, Dixon PS. Oxygen induces S-phase growth arrest and increases p53 and p21WAF1/CIP1 expression in human bronchial smooth-muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(3):395-402.
9. Temesgen T, Bui TT, Han M, Kim T-i, Park H. Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;246:40-51.
10. Baghbani F, Chegeni M, Moztaezadeh F, Mohandesi JA, Mokhtari-Dizaji M. Ultrasonic nanotherapy of breast cancer using novel ultrasound-responsive alginate-shelled perfluorohexane nanodroplets: In vitro and in vivo evaluation. *Mater Sci Eng C* 2017;77:698-707.
11. Zhang C, Wang W, Liu T, Wu Y, Guo H, Wang P, *et al.* Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles for liver tumor chemotherapy. *Biomaterials* 2012;33(7):2187-96.
12. Kesavardhana S, Kanneganti T-D. Stressed-out ROS take a silent death route. *Nature Immunol* 2018;19:103-5.
13. Hu D-B, Li Z-S, Ali I, Xu L-J, Fang NZ. Effect of potential role of p53 on embryo development arrest induced by H₂O₂ in mouse. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 2017;53(4):344-53.