مقاله پژوهشی

Expression changes of apoptotic and metastatic genes in MCF-7 and SKBR3 breast cancer cells under the influence of niosomes containing farnesol and gingerol

Zahra Asghari Lalemi, Farzaneh Tafvizi*, Vahid Naseh, Masoud Salehipour

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Abstract

Aim and Background: Farnesol and gingerol are two powerful plant active ingredients that have proven anti-cancer and antioxidant effects. In this study, the expression changes of Caspase 8, Matrix metalloproteinases 2, Matrix metalloproteinases 9 and Vascular endothelial growth factor genes were studied in MCF-7 and SKBR3 cancer cell lines treated with niosomes containing farnesol and gingerol.

Material and Methods: MCF-7 and SKBR3 cells were treated with niosome containing farnesol and gingerol, combination of two drugs, single drug niosome formulation and free drug for 48 hours. Gene expression changes were investigated using Real-Time PCR technique and statistical analysis was done at 0.05 level with GraphPad Prism software.

Results: Niosome codelivery containing two drugs (N-Far/Gin) caused a significant increase in the level of caspase 8 gene expression and also a significant decrease in the regulation of the expression of Matrix metalloproteinases 2, Matrix metalloproteinases 9, and Vascular endothelial growth factor genes (P<0/001). It had a higher significance level than the treatment with other formulations.

Conclusion: It seems that farnesol and gingerol-loaded niosomes have great anti-apoptotic, anti-metastatic, and anti-angiogenic potential in the prevention of breast cancer. Further in vivo experiments and clinical studies can elucidate the potential of N-Far/Gin to be applied as a medicinal agent in breast cancer treatment.

Key words: Niosome, Farnesol, Gingerol, Breast cancer, Apoptosis, Metastasis, Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

Corresponding author:
Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
Email:farzanehtafvizi54@gmail.com

تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی و متاستاتیک در سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 و SKBR3 تحت تاثیر نیوزوم حاوی فارنسول و جینجرول

زهرا اصغری لالمی، فرزانه تفویضی*، وحید ناصح، مسعود صالحی پور
گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فارنسول و جینجرول دو جزء فعال گیاهی قدرتمند هستند که دارای اثرات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی ثابت شده می‌باشند. در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های Caspase 8، Matrix metalloproteinases 2، Matrix metalloproteinases 9 و Vascular endothelial growth factor در دو رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 تیمار شده با نیوزوم های حاوی فارنسول و جینجرول مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: سلول های MCF-7 و SKBR3 تحت تیمار با نیوزوم حاوی فارنسول و جینجرول، ترکیب دو دارو، فرمولاسیون نیوزومی تک دارو و داروی آزاد بمدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بررسی تغییرات بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR انجام شد و آنالیز آماری در سطح ۰/۰۵ با نرم افزار GraphPad Prism صورت گرفت.

یافته‌ها: نیوزوم کودلیوری حاوی دو دارو (N-Far/Gin) باعث افزایش معنادار در سطح بیان ژن Caspase 8 و همچنین کاهش چشم‌گیر در تنظیم بیان ژن‌های Matrix metalloproteinases 2، Matrix metalloproteinases 9 و Vascular endothelial growth factor شد (P<۰/۰۰۱) که این افزایش سطح معناداری بالاتری نسبت به تیمار با سایر فرمولاسیون‌ها داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که نیوزوم‌های حاوی فارنسول و جینجرول (N-Far/Gin) پتانسیل قوی در فعالیت ضد رگزایی و جلوگیری از گسترش سرطان پستان دارند که تایید قطعی تر این نتایج نیازمند تحقیقات in vivo و مطالعات کلینیکی می‌باشد.

واژگان کلیدی: نیوزوم، فارنسول، جینجرول، سرطان پستان، آپوپتوز، متاستاز،Iau Science.

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین و دومین علت مرگ و میر مرتبط با سرطان در زنان در سطح جهان است (۱). عوامل خطرزای مختلفی برای سرطان پستان وجود دارد که می‌توان از مهمترین آن‌ها به سن، جنس، عوامل خطر ژنتیکی، سابقه خانوادگی، سیگار کشیدن، عدم فعالیت بدنی، مصرف الکل و یائسگی اشاره کرد (۲). درمان و کنترل سرطان پستان به جنبه‌های مختلفی به ویژه مرحله سرطان و سن فرد بستگی دارد. این سرطان معمولاً با جراحی کنترل می‌شود، اما در برخی موقعیت‌های متاستاتیک یا سایر اشکال پیشرفته سرطان پستان، شیمی درمانی یا پرتودرمانی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۳). شیمی درمانی به طور گسترده برای درمان سرطان استفاده می‌شود. با این حال، روش‌های شیمی درمانی می‌تواند منجر به طیف گسترده‌ای از عوارض جانبی و سمیت شود. سمیت داروهای شیمی درمانی نیز یک چالش بزرگ در درمان سرطان توسط داروهای آلوپاتیک یا داروهای موجود است (۴،۵). بسیاری از درمان-های دیگر برای درمان سرطان پیشنهاد شده‌اند که برخی از آن‌ها از اجزای گیاهی استفاده می‌کنند. گیاهان همچنین دارای ظرفیت عظیمی برای ارائه داروهای نوآورانه هستند و منبعی از مواد شیمیایی آلی و معدنی می‌باشند که می‌توانند نقش محافظتی در برابر سرطان را ایفا کنند (۵). گیاهان، حاوی طیف گسترده‌ای از مواد دارویی مانند فنولیک، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، ساپونین ها، اینوزیتول و ترپن‌ها (۱) مقرون به صرفه

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
پست الکترونیکی: farzanehtafvizi54@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

برای درمان سرطان‌های انسانی هستند (۶). ترکیبات گیاهی بیش از پنجاه درصد مصرف فعلی ترکیبات با خاصیت دارویی را تشکیل می‌دهند (۷). جینجرول به دلیل خواص آروماتیک و درمانی خود به خوبی شناخته شده است و به دلیل سمیت ضعیف و طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست پزشکی از جمله اثرات ضد تکثیری، ضد آپوپتوز، آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد قارچ به تازگی در مطالعات بررسی شده است (۱۰-۸). فارنسول جزء فعال به دست آمده از منابع طبیعی متعدد است که می‌تواند به صورت درون زا در مسیر بیوسنتز کلسترول تولید شود. مطالعات نشان داده است که این ترکیب فعال دارای اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطانی مختلف و همچنین ارتقای پاسخ ایمنی است (۱۱). چندین سال است که ترکیبات دارویی در درمان عفونت‌ها و بیماری ها استفاده می‌شوند (۱۲). استفاده از ترکیبات دارویی مزایای زیادی دارد که می توان به بهبود بالقوه در اثر بخشی اثرات درمانی، کاهش دوز سمیت داروها و محدودیت مقاومت دارویی که یک مشکل بزرگ برای پزشکی مدرن، به ویژه در درمان سرطان و عفونت های باکتریایی است، اشاره کرد (۱۳،۱۴). نانوتکنولوژی در حال حاضر به تدریج در زیست شناسی و پزشکی از جمله فناوری‌هایی برای تشخیص، درمان و هدف گیری تومورها در فرآیندی بهتر و کارآمدتر به کار گرفته شده است (۱۵). پلتفرم‌های دارورسانی مبتنی بر نانوذرات، مزایای متعددی را از جمله فارماکوکینتیک قوی، هدف‌گیری موثر سلول‌های تومور، کاهش عوارض جانبی و مقاومت دارویی برای درمان سرطان نشان داده‌اند (۱۶،۱۷). نیوزوم‌ها حامل‌های غیریونی مبتنی بر سورفکتانت به عنوان یک سیستم دارورسانی منحصر به فرد هستند. ساختارهای نیوزومی دارای مزایای مختلفی از قبیل پایداری بالا، ارزان بودن، طراحی راحت و افزایش مقیاس تماس دارو هستند (۱۸). این نانوحامل ممکن است برای استفاده در دارورسانی از طریق مسیرهای متعدد مانند خوراکی، تزریقی و موضعی استفاده شوند. حجم عظیمی از داده ها نشان داده است که نانوحامل های دارویی حاوی ترکیبات گیاهی دارای اثرات ضد توموری، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هستند (۱۹،۲۰). در مطالعه پیشین ما، نشان داده شد که جینجرول و فارنسول به خوبی در ساختار نیوزومی بارگذاری شد و اثرات سینرژیک دو دارو مورد بررسی قرار گرفت و اثبات شد که این نانوحامل دارویی توانایی بالایی در بدام اندازی دارو و القای خاصیت ضدسرطانی علیه دو رده سلول سرطانی MCF-7 و SKBR3 (رده سلول‌های سرطانی پستان) است. بررسی ژن‌های دخیل در آپوپتوز، رگ‌زایی و ژن‌های متاستاتیک می‌توانند اهمیت به سزایی در شناسایی مکانیسم اثر ضد سرطانی این نانوذرات داشته باشند. نقش ژن‌هایی مانند *CASP8* که تحریک کننده آپوپتوز هستند (۲۱) و ژن‌های *MMP2* و *MMP9* که موجب بروز متاستاز می‌شوند (۲۲) و همین‌طور ژن *VEGF* که موجب رگ زایی می‌شود (۲۳) در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. لذا در این تحقیق، تغییرات بیان ژن‌های Caspase 8 (*CASP8*)، Matrix metalloproteinases 2 (*MMP2*)، Matrix metalloproteinases 9 (*MMP9*) و Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) در دو رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 تیمار شده با نیوزوم حاوی فارنسول و جینجرول، ترکیب دو دارو، فرمولاسیون نیوزومی تک دارو و داروی آزاد مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، نیوزوم های حاوی دو داروی جینجرول-فارنسول و همچنین نیوزوم های حاوی جینجرول و نیوزوم-های حاوی فارنسول (ارائه شده در مطالعه پیشین) با روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شدند. بدین صورت که مقادیر مشخص از کلسترول، اسپن ۶۰ و داروی جینجرول و فارنسول در مخلوط حلال‌های ۶ میلی لیتر کلروفرم و ۳ میلی لیتر متانول (نسبت ۲ به ۱) حل شد. سپس کاملا محلول حاصل هم زده شد تا اجزا به طور کامل حل شوند. محلول حاصل در بالن مخصوص روتاری ریخته و تحت شرایط مورد نظر (دمای ۶۰ درجه سلیسوس و ۱۵۰ rpm) تحت خلا قرار داده می‌شود تا حلال کاملا تبخیر شود. سپس در مرحله هیدراسیون، به فیلم لیپیدی تهیه شده، مقادیر ۱۰ سی سی محلول بافر فسفات pH = ۷/۲ در دمای بالای انتقال فاز اضافه شد و با استفاده از روتاری با سرعت ۱۲۰ rpm به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از اتمام مراحل هیدراسیون، به منظور کاهش اندازه ذره‌ای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۲۴). از فرمولاسیون حاصله، در مطالعات بیان ژن استفاده شد. در مطالعه قبلی جهت بررسی اثرات سمیت سلولی فرمولاسیون‌های نیوزوم (N)، فارنسول (F-Far)، جینجرول (F-Gin)، ترکیب نیوزوم حاوی جینجرول (F-Far/Gin) و نیوزوم حاوی دو دارو (N-Far/Gin) بر روی رده‌های سلولی (MCF7 و SKBR3) از تست MTT استفاده شد. بطور خلاصه، $۱۰^۴ \times ۱$ سلول در هر چاهک در محیط RPMI1640 غنی شده با FBS ۱۰ درصد، آنتی بیوتیک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

پنی سیلین و استرپتومایسین ۱ درصد، CO2 یک درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس تحت تیمار غلظت‌های مختلف فرمولاسیون-های نیوزوم (N)، فارنسول (F-Far)، جینجرول (F-Gin)، ترکیب نیوزوم حاوی جینجرول (F-Far/Gin) و نیوزوم حاوی دو دارو (N-Far/Gin) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در حضور CO2 ۵ درصد انکوبه شدند. برای اندازه گیری میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی (MCF7 و SKBR3) به آن ها رنگ MTT [3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma, Germany) colorimetric اضافه شد و انکوبه شدند. برای حل نمودن فرمازان تولید شده، به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و سی دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. جذب توسط دستگاه ELISA Reader (Oraganon Teknika, Netherlands) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. جهت تعیین دوز ۵۰٪ کشندگی فرمولاسیون‌های سنتز شده بر رده سلول‌های سرطانی مذکور، میزان IC_{50} تعیین گردید (۲۴). در مطالعه حاضر، به بررسی تاثیر تیمارهای (N)، F-Far، F-Gin، F-Far/Gin و N-Far/Gin بر تغییر بیان ژن های *CASP8*، *MMP2*، *MMP9* و *VEGF* با استفاده از تکنیک Real-Time PCR (Bioneer, Daejeon, South Korea) پرداخته شد. در ابتدا، سلول-های سرطانی کشت شده تحت تاثیر غلظت IC_{50} فرمولاسیون‌های نیوزوم (N)، فارنسول (F-Far)، جینجرول (F-Gin)، ترکیب نیوزوم حاوی جینجرول (F-Far/Gin) و نیوزوم حاوی دو دارو (N-Far/Gin) به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس، RNA کل از سلول‌های تحت تیمار با استفاده از کیت استخراج RNA مطابق با راهنمای کیت (سیناکلون، ایران) به‌دست آمد. cDNA از طریق کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis خریداری شده از شرکت Fermentas (لیتوانی) سنتز شد. سپس، مخلوط واکنشی شامل ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5X)، ۱ میکرولیتر (۱ میکروگرم) RNA به‌دست‌آمده، ۰/۵ میکرولیتر (۱ میکرومولار) پرایمر هگزامر تصادفی، ۲ میکرولیتر مخلوط تری فسفات دئوکسی نوکلئوتید (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر اولیگو dT، ۱ میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و آب تقطیر دوگانه (ddH2O) (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) ارائه شد. دمای واکنش در ۲۵ درجه سلسیوس (۵ دقیقه)، ۴۲ درجه سلسیوس (۱ ساعت)، ۷۰ درجه سلسیوس (۵ دقیقه) تنظیم شد و سپس در ۴ درجه سلسیوس (۵ دقیقه) نگهداری شد. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ نشان داده شده است. در پایان، چرخه نوری در برنامه واکنش Real-Time PCR اعمال شد. (۹۵ درجه سلسیوس (۱ دقیقه)، ۹۵ درجه سلسیوس (۱۵ ثانیه)، ۶۰ سلسیوس (۱ دقیقه)). بیان نسبی ژن‌ها بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ که در مقالات دیگر توصیف شده است، تعیین شد. GraphPad Prism نسخه ۸ (نرم افزار GraphPad, San Diego, CA) برای ارزیابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها در این تحقیق استفاده شد. تفاوت آماری معنی داری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و post hoc Tukey انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) با سطح معنی داری P<۰/۰۵ ارائه شد. تمام مراحل در سه تکرار جداگانه انجام شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

جدول ۱. توالی پرایمر های مورد استفاده برای ژن‌های *CASP8*، *MMP2*، *MMP9* و *VEGF*

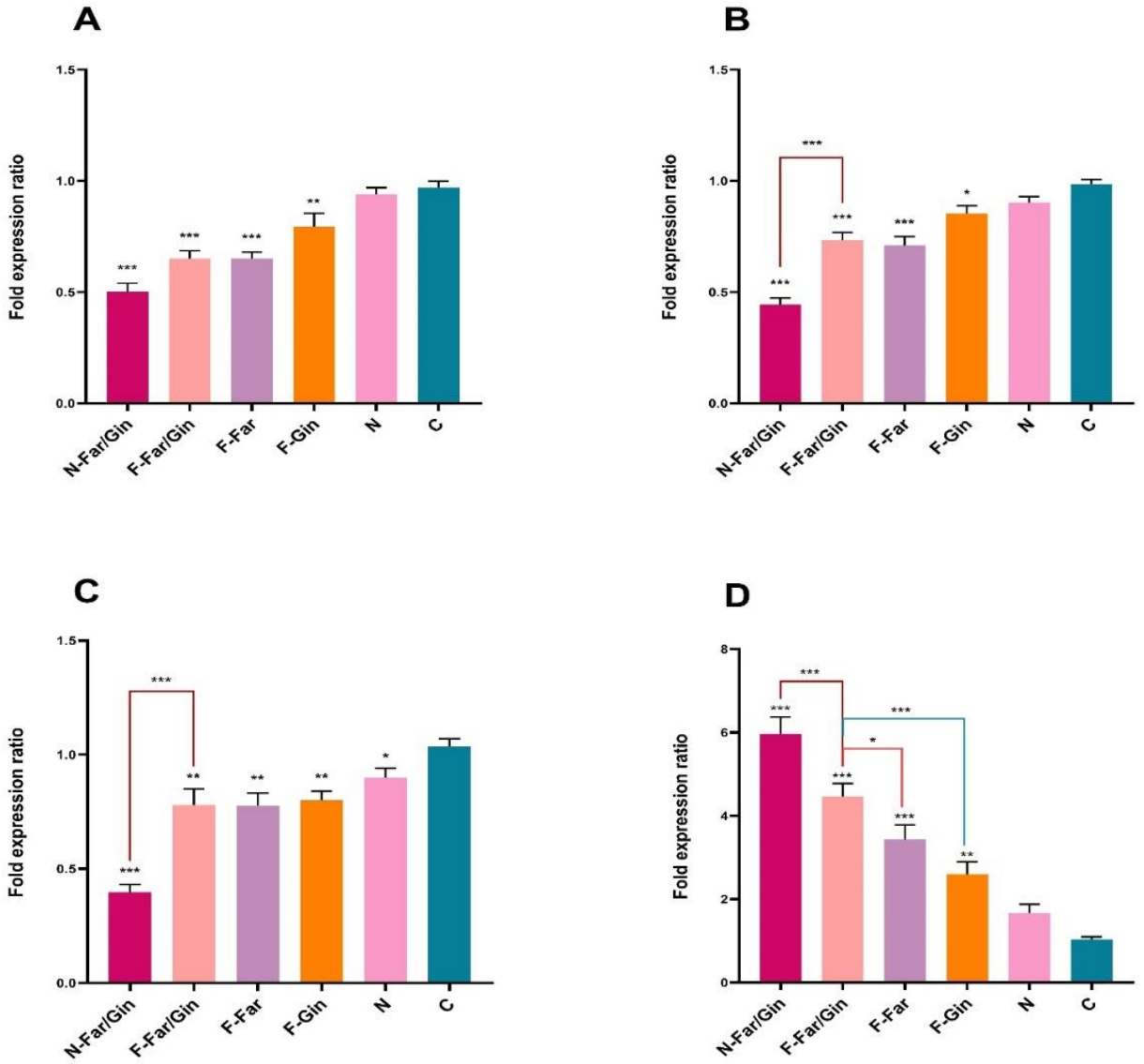
Gene	Primer sequence	Product Size
CASP8	Forward:5'-CCAGAGACTCCAGGAAAAGAG-3′ Reverse: 5'-GATAGAGCATGACCCTGTAGG-3'	185 bp
MMP2	Forward: 5’- F: TTG ACG GTA AGG ACGGAC TC-3’ Reverse: 5’- CAT ACT TCA CAC GGA CCA CTTG - 3’	126 bp
MMP9	Forward: 5'- GCACGACGTCTTCCAGTACC -3′ Reverse: 5'- CAGGATGTCATAGGTCACGTAGC -3'	124 bp
VEGF	Forward: 5’- TGTCTAATGCCCTGGAGCCT -3 Reverse: 5’- GCTTGTCACATCTGCAAGTACG -3’	175 bp
BACT	Forward: 5’- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3’ Reverse: 5’- CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3’	89 bp

نتایج

در پژوهش قبلی انجام گرفته، فرمولاسیون‌های تهیه شده بهینه سازی شدند و بارگذاری موفق دو دارو و آزادسازی کنترل شده و مستمر دارو از ساختار نیوزومی تأیید شد. همچنین نشان داده شد که نانوذرات تهیه شده پایداری قابل قبولی در دمای یخچال دارند. به‌علاوه اثرات وابسته به غلظت و وابسته به زمان فرمولاسیون‌های تهیه شده علیه سلول‌های سرطانی نشان داده شد که با افزایش غلظت (غلظت‌های تهیه شده به صورت سریالی بین : ۱۸/۷۵–۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در زمان ۷۲ ساعت، N-Far/Gin باعث بیشترین کاهش در زنده مانی هر دو رده سلول سرطانی شد که بروز و شدت آپوپتوز با تست فلوسایتومتری نشان داده شد و تاییدکننده نتایج حاصل از تست MTT بود (۲۴). تغییرات بیان ژن های *CASP8*، *MMP2*، *MMP9* و *VEGF* در سلول‌های MCF-7 و SKBR3 (سلول‌های سرطانی پستان) تیمار شده با N، F-Far، F-Gin، F-Far/Gin و N-Far/Gin به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نمایش داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تمامی فرمولاسیون‌ها به جز فرمول نیوزوم فاقد دارو، باعث افزایش معنادار در بیان ژن *CASP8* در سلول سرطانی MCF-7 شدند. افزایش بیان ژن *CASP8* پس از تیمار با F-Gin (۲/۶ برابر) (P<۰/۰۱)، F-Far (۳/۵ برابر) (P<۰/۰۰۱)، F-Far/Gin (۴/۵ برابر)(P<۰/۰۰۱) و N-Far/Gin (۶ برابر) (P<۰/۰۰۱) برآورد شد. افزایش معنادار در بیان ژن *Caspase 8* در تیمار با F-Far/Gin نسبت به F-Far (P<۰/۰۵) و F-Gin (P<۰/۰۰۱) و همچنین N-Far/Gin نسبت به F-Far/Gin (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد. در رابطه با تغییرات بیان ژن‌های *MMP2* و *MMP9* در سلول MCF-7 مشاهده شد، تمامی تیمارها بجز تیمار با فرمولاسیون نیوزوم فاقد دارو، باعث کاهش معنادار در بیان ژن نسبت به کنترل شدند که این کاهش در بیان ژن *MMP9* در سلول‌های تیمار شده با N-Far/Gin نسبت به سلول‌های تیمار شده با F-Far/Gin بطور معناداری بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). تغییرات بیان ژن *MMP2* پس از تیمار سلول‌ها با F-Gin (۰/۷۸ برابر) (P<۰/۰۱)، F-Far (۰/۶۵ برابر) (P<۰/۰۰۱)، F-Far/Gin (۰/۶۴ برابر) (P<۰/۰۰۱)، N-Far/Gin (۰/۵برابر) (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل و برای ژن *MMP9* پس از تیمار با F-Gin (۰/۸۵ برابر) (P<۰/۰۵)، F-Far (۰/۷۱ برابر) (P<۰/۰۰۱)، F-Far/Gin (۰/۷۳ برابر) (P<۰/۰۰۱) و N-Far/Gin (۰/۴۴ برابر) (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل بدست آمد. بعلاوه کاهش معنادار در بیان ژن *VEGF* پس از تیمار با تمامی فرمولاسیون‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۱) که این کاهش بطور چشم‌گیری در سلول‌های تیمار شده با N-Far/Gin نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). الگوی تغییرات بیان ژن *VEGF* پس از تیمار با نیوزوم خالی (۰/۹ برابر) (P<۰/۰۵)، F-Gin (۰/۸ برابر)، F-Far(۰/۷۸ برابر) (P<۰/۰۱)، F-Far/Gin (۰/۷۸ برابر) (P<۰/۰۱) و پس از تیمار با N-Far/Gin (۰/۴ برابر) (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل بود. مطابق با شکل ۲ که تغییرات بیان ژن را در سلول‌های SKBR3 نشان می‌دهد، افزایش معناداری در بیان ژن *Caspase 8* در تمامی تیمارها بجز نیوزوم فاقد دارو نسبت به گروه کنترل، ۲/۴ برابر (P<۰/۰۱) ، ۳/۵ برابر ، ۴ برابر و ۵/۵ برابر به ترتیب برای F-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

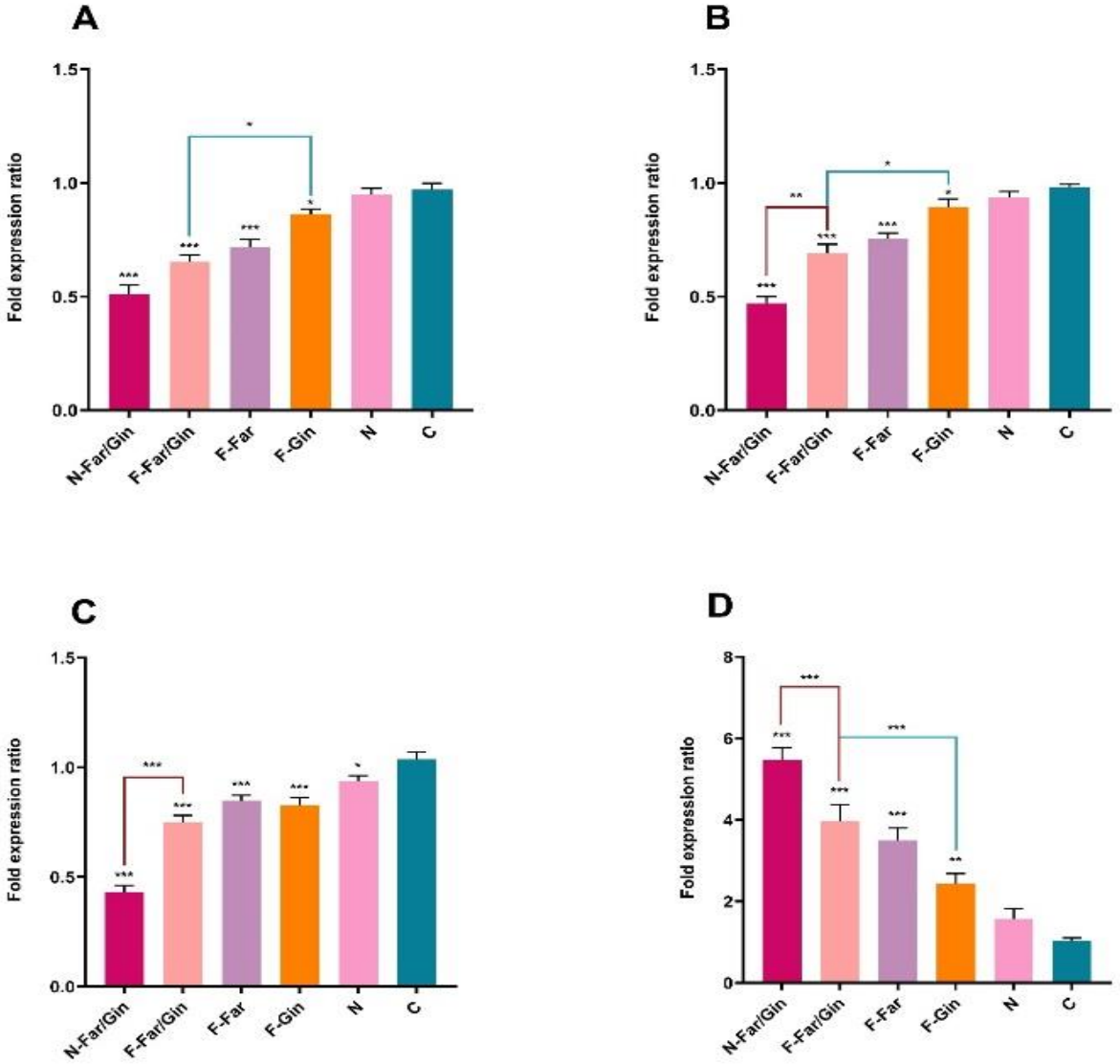
Gin، F-Far ، F-Far/Gin و N-Far/Gin (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد، که این افزایش در سلول‌های تیمار شده با F-Far/Gin نسبت به F-Gin و در سلول‌های N-Far/Gin نسبت به F-Far/Gin بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). همچنین تیمار با تمامی فرمولاسیون‌ها به جز نیوزوم خالی باعث کاهش معنادار در بیان ژن‌های *MMP2* و *MMP9* نسبت به کنترل شد. تغییرات بیان ژن به دست آمده برای *MMP2* پس از تیمار با F-Gin (۰/۸۷ برابر)(P<۰/۰۵)، F-Far (۰/۷۲ برابر)(P<۰/۰۰۱)، F-Far/Gin (۰/۶۶ برابر) (P<۰/۰۰۱) و N-Far/Gin (۰/۵۱ برابر) (P<۰/۰۰۱) و برای *MMP9* پس از تیمار با F-Gin (۰/۸۹ برابر) (P<۰/۰۵)، F-Far (۰/۷۵ برابر)(P<۰/۰۰۱)، F-Far/Gin (۰/۶۹ برابر) (P<۰/۰۰۱) و N-Far/Gin (۰/۴۷ برابر) (P<۰/۰۰۱) گزارش شد که این کاهش به‌طور چشم‌گیری در سلول های تیمار شده با F-Far/Gin (P<۰/۰۰۱) نسبت به F-Gin افزون‌تر بود (P<۰/۰۵). همچنین کاهش معناداری در بیان ژن *MMP9* در تیمار با N-far/Gin نسبت به F-Far/Gin مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تغییرات بیان ژن *VEGF* در سلول‌های SKBR3 بدنبال تیمار با نیوزوم فاقد دارو (۰/۹۳ برابر)، F-Gin (۰/۸۳ برابر)، F-Far (۰/۸۵ برابر)، F-Far/Gin (۰/۷۵ برابر) و N-Far/Gin (۰/۴۳ برابر) گزارش شد. کاهش معنی دار بیان ژن *VEGF* پس از تیمار با نیوزوم فاقد دارو (P<۰/۰۵)، فرمولاسیون های F-Gin، F-Far، F-Far/Gin و N-Far/Gin (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد. نتایج نشان داد که تیمار با N-Far/Gin سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیان ژن *VEGF* در مقایسه با سلول های تیمار شده با F-Far/Gin می‌شود (P<۰/۰۰۱).



شکل ۱. تغییرات سطح بیان ژن‌های A) *MMP2*، B) *MMP9*، C) *VEGF* و D) *CASP8* در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت IC_{50} فرمولاسیون های نیوزوم (N)، فارنسول (F-Far)، جینجرول (F-Gin)، ترکیب فارنسول و جینجرول (F-Far/Gin) و نیوزوم حاوی جینجرول و فارنسول (N-Far/Gin) با

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

استفاده از تکنیک Real-Time PCR در بازه زمانی ۴۸ ساعت از نظر آماری نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است. خطوط ارائه شده در بالای ستون‌ها مقایسه بین گروهی تیمارها را از نظر آماری نشان می‌دهد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. * نمایانگر: P<۰/۰۵ ، **: P<۰/۰۱ و ***: P<۰/۰۰۱ می‌باشد. Far: فارنسول، Gin: جینجرول، C: کنترل، N: نیوزوم خالی، N/Far-Gin: نیوزوم لود شده با فورنیسول و جینجرول، F-Far: فارنسول آزاد و کپسوله نشده، F-Gin: جینجرول آزاد وکپسوله نشده.



شکل ۲. تغییرات سطح بیان ژن‌های A) *MMP2*، B) *MMP9*، C) *VEGF* و D) *CASP8* در سلول های SKBR3 تیمار شده با غلظت IC_{50} فرمولاسیون‌های N نیوزوم (N)، فارنسول (F-Far)، جینجرول (F-Gin)، ترکیب فارنسول و جینجرول (F-Far/Gin) و نیوزوم حاوی جینجرول و فارنسول (N-Far/Gin) با استفاده از تکنیک Real-Time PCR که از نظر آماری نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است. خطوط ارئه شده در بالای ستون‌ها مقایسه بین گروهی تیمارها را از نظر آماری نشان می‌دهد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. * نمایانگر: P<۰/۰۵ ، **: P<۰/۰۱ و ***: P<۰/۰۰۱ می‌باشد. Far: فارنسول، Gin: جینجرول، C: کنترل، N: نیوزوم خالی، N/Far-Gin: نیوزوم لود شده با فورنیسول و جینجرول، F-Far: فارنسول آزاد و کپسوله نشده، F-Gin: جینجرول آزاد وکپسوله نشده.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

بحث

آپوپتوز نامنظم یکی از مشخصه‌های سرطان‌های انسانی است. دو مسیر اصلی آپوپتوز وجود دارد: مسیر بیرونی که در پاسخ به اتصال لیگاندی اعضای ابرخانواده گیرنده‌های مرگ فعال می‌شود که منجر به فعال‌سازی کاسپاز-۸ و به دنبال آن کاسپاز-۳ می‌شود. مسیر دوم شامل مسیر ذاتی (یا میتوکندریایی) است که توسط آزادسازی سیتوکروم c میتوکندری ایجاد می شود که منجر به تشکیل Apaf-1 و سیتوکروم c کمپلکس با کمک ATP می شود و متعاقباً کاسپاز-۹ و به دنبال آن کاسپاز-۳ فعال می شود (۲۵, ۲۶). بیان ویا فعال سازی نابجای کاسپاز در انواع مختلف سرطان نقش دارد. از دست دادن بیان mRNA/پروتئین Caspase 8 در سرطان‌های مختلف شناسایی شده است و نشان داده شده است که کاهش بیان این ژن با بروز سرطان مرتبط است (۲۹-۲۷). در مطاله حاضر نشان داده شد فرمولاسیون N-Far/Gin با بیشترین افزایش در بیان ژن *CASP8*، می تواند موجب بروز آپوپتوز قوی نسبت به سایر تیمارها در سلول‌های سرطانی پستان شود که در مطالعه قبلی هم تایید شد (۲۴). مطالعه‌ای مبنی بر تاثیر حامل دارویی نیوزومی بر تغییر بیان ژن *CASP8* در سلول سرطانی یافت نشد، ولی برخی مطالعات نشان دهنده آنند که نانوحامل‌های لیپیدی همچون لیپوزوم ها می توانند به‌عنوان یک حامل دارویی مناسب باعث افزایش بیان ژن *CASP8* در سلول‌های سرطانی مختلف شوند (۳۲-۳۰). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده‌ای از پروتئازهای وابسته به روی هستند که MMP2 و MMP9 اعضای اصلی خانواده MMP هستند (۳۳, ۳۴). MMP2 و MMP9 عمدتاً توسط سلول‌های تومور و سلول‌های استرومایی به شکل زیموژن ترشح می‌شوند. پس از فعال‌سازی از طریق هیدرولیز، MMP2 و MMP9 کلاژن نوع IV غشای پایه را تخریب می‌کنند و بر توانایی غشای پایه برای ممانعت از حرکت سلول‌های تومور تأثیر می‌گذارند (۳۵). تحقیقات نشان داده است که MMP2 و MMP9 نقش کلیدی در تخریب ماتریس‌های خارج سلولی و ترویج تهاجم و متاستاز تومور دارند (۳۶). در این مطالعه نشان داده شد که تمامی فرمولاسیون‌ها بجز نیوزوم فاقد دارو توانایی کاهش در بیان ژن-های *MMP2* و *MMP9* را دارا می‌باشند که بهترین فرمولاسیون در تاثیرگذاری بر این کاهش N-Far/Gin بود. این نتایج بیانگر آن است که فرمولاسیون تهیه شده بخصوص N-Far/Gin پتانسیل بالایی در مهار متاستاز و تهاجم سلول سرطانی پستان دارد. در مطالعه ای که به بررسی خواص ضد سرطانی نیوزوم پگیله شده فولات دار حاوی لتروزول و آسکوربیک اسید علیه رده های سلولی سرطانی پستان انجام شد، نشان داده شد که این فرمولاسیون نسبت به داروی تک باعث کاهش معنادار تری در بیان ژن های *MMP2* و *MMP9* می شود (۳۷). همچنین نشان داده شده است ملیتین بارگذاری شده در نیوزوم می‌تواند بر بیان ژن‌ها تأثیر بگذارد و بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس *MMP2* و *MMP9* را کاهش دهد (۳۸). داده‌های Real-Time PCR در مطالعه منصوری کرمانی و همکاران نشان داد هیالورونیک اسید نیوزومه شده باعث کاهش تنظیم بیان ژن‌های *MMP2*، *MMP9*، *cyclin D* و *cyclin E* می شود، در حالی که بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ را تنظیم مثبت می کند (۳۹). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، یک عامل رگ‌زایی قوی، نقش مهمی در رشد و متاستاز تومور ایفا می کند (۳۸). سیگنال دهی VEGF در سلول های سرطانی مسئول مقاومت آن‌ها در برابر محرک های آپوپتوز و مهاجرت و تهاجم آن‌ها است (۴۰). VEGF در سرطان پستان تنظیم بیان مثبت دارد. در مطالعات پیشین، در مقایسه با بافت های نرمال یا خوش خیم پستان، سرطان پستان سطوح بالاتری از رونوشت‌های VEGF را نشان داد (۴۱, ۴۲). بیان VEGF در تومورهای پستان با اندازه بزرگ، درجه بافت شناسی بالا، منفی بودن گیرنده استروژن (ER)، منفی بودن گیرنده پروژسترون (PR)، بیان بیش از حد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی-۲ (HER2) و متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است (۴۳). پس همانطور که انتظار می‌رفت، تمامی فرمولاسیون ها با کاهش بیان ژن *VEGF* نشان دادند که در بین فرمولاسیون-های تهیه شده، N-Far/Gin باعث بیشترین میزان کاهش در سطح بیان mRNA ژن *VEGF* شد. مطالعه‌ای مروری نشان داد لیپوزوم‌ها که شباهت زیادی به نیوزوم‌ها دارند، می توانند عوامل دارورسان مناسب برای درمان سرطان‌های مختلف باشند (۴۴). همچنین نشان داده شده است نانوذرات حاوی plasminogen kringle 5 باعث کاهش بیان ژن *VEGF* در التهاب کلیوی شوند (۴۵). در تحقیقی نشان داده شد درمان با نیوزوم‌های حاوی دارو به طور قابل توجهی الگوی بیان ژن سلول‌های سرطان پستان را تغییر داد که با کاهش معنی‌دار آماری در بیان ژن‌های Cyclin D، Cyclin E، *VEGFR-1*، *MMP-2*، و *MMP-9* و افزایش تنظیم بیان کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ همراه بود (۴۶). به نظر می رسد که نیوزوم های حاوی دو دارو با کاهش بیان ژن *VEGF*، پتانسیل قوی در فعالیت ضد رگزایی و جلوگیری از گسترش سرطان دارند که تایید قطعی تر این نتایج نیازمند مطالعات in vivo می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه پیشین ما نشان داده شد که N-Far/Gin با تاثیر بر ژن‌های دخیل در آپوپتوز و چرخه سلولی موجب بروز آپوپتوز و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

توقف چرخه سلولی در هر دو رده سلول سرطانی پستان آپوپتوزی، ضد متاستازی و ضد رگزایی فرمولاسیون N-Far/Gin با تکیه بر نتایج افزایش در بیان سطح mRNA ژن *CASP8* و کاهش در بیان ژن‌های *MMP2*، *MMP9* و *VEGF* نشان داده شد. نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که فرمولاسیون بهینه N-Far/Gin می تواند به عنوان کاندید بالقوه برای درمان و مدیریت سرطان پستان پس از انجام مطالعات دقیق in vivo و بالینی معرفی شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی جهت فراهم نمودن شرایط تحقیق قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

منابع

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2021;71(3):209-49.

2. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. Menopause Review/Przegląd Menopauzalny. 2015;14(3):196-202.

3. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. Jama. 2019;321(3):288-300.

4. Pearce A ,Haas M, Viney R, Pearson S-A, Haywood P, Brown C, et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. PloS one. 2017;12(10):e0184360.

5. Mosca L, Vitiello F, Coppola A, Borzacchiello L, Ilisso CP, Pagano M, et al. Therapeutic potential of the natural compound S-adenosylmethionine as a chemoprotective synergistic agent in breast, and head and neck cancer treatment: Current status of research. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(22):8547.

6. Yeshi K, Crayn D, Ritmejerytė E, Wangchuk P. Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. Molecules. 2022;27(1):313.

7. Bayles BP. Herbal and other complementary medicine use by Texas midwives. Journal of Midwifery & Women's Health. 2007;52(5):473-8.

8. Sharma S, Yadav A. Gingerol Derivatives as 14α-demethylase Inhibitors: Design and Development of Natural, Safe Antifungals for Immune-compromised Patients. Letters in Drug Design & Discovery. 2020;17(7):918-28.

9. Wen C, Liu Y, Ye Y, Tao Z, Cheng Z, Wang T, et al. Effects of gingerols-rich extract of ginger on growth performance, serum metabolites, meat quality and antioxidant activity of heat-stressed broilers. Journal of Thermal Biology. 2020;89:102544.

10. Czarnik-Kwaśniak J, Kwaśniak K, Kwasek P, Świerzowska E, Strojewska A, Tabarkiewicz J. The influence of lycopene,[6]-gingerol, and silymarin on the apoptosis on U-118MG glioblastoma cells in vitro model. Nutrients. 2019;12(1):96.

11. Jung YY, Hwang ST, Sethi G, Fan L, Arfuso F, Ahn KS. Potential anti-inflammatory and anti-cancer properties of farnesol. Molecules. 2018;23(11):2827.

12. Habtemariam S. Recent advances in berberine inspired anticancer approaches: from drug combination to novel formulation technology and derivatization. Molecules. 2020;25(6):1426.

13. Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati MA, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. Journal of Cellular Physiology. 2020;235(4):3142-56.

14. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. Oncotarget. 2017;8(23):38022.

15. Mukherjee A, Bhattacharyya S. Nanotechnology in medicine. Biotechnology business-concept to delivery: Springer; 2020. p. 57-64.

16. Palazzolo S, Memeo L, Hadla M, Duzagac F, Steffan A, Perin T, et al. Cancer extracellular vesicles: next-generation diagnostic and drug delivery nanotools. Cancers. 2020;12(11):3165.

17. Gogoi H, Mani R, Bhatnagar R. A niosome formulation modulates the Th1/Th2 bias immune response in mice and also provides protection against anthrax spore challenge. International Journal of Nanomedicine. 2018;13:7427.

18. Akbarzadeh I, Fatemizadeh M, Heidari F, Niri NM. Niosomal formulation for co-administration of hydrophobic anticancer drugs into MCF-7 cancer cells. Archives of Advances in Biosciences. 2020;11(2):1-9.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

19. Elmowafy E, El-Derany MO, Biondo F ,Tiboni M, Casettari L, Soliman ME. Quercetin loaded monolaurate sugar esters-based niosomes: Sustained release and mutual antioxidant—hepatoprotective interplay. Pharmaceutics. 2020;12(2):143.

20. Baranei M, Taheri RA, Tirgar M, Saeidi A, Oroojalian F, Uzun L, et al. Anticancer effect of green tea extract (GTE)-Loaded pH-responsive niosome Coated with PEG against different cell lines. Materials Today Communications. 2021;26:101751.

21. Li X, Hu D, Li Y, Luo Y, Liang B, Yu K, et al. Overexpression of TP53INP2 promotes apoptosis in clear cell renal cell cancer via caspase-8/TRAF6 signaling pathway. Journal of Immunology Research. 2022.

22. Yen Y-T, Yang J-C, Chang J-B, Tsai S-C. Down-regulation of miR-194-5p for predicting metastasis in breast cancer cells. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(1):325.

23. Vimalraj S. A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions. International Journal of Biological Macromolecules. 2022.

24. Lalami ZA, Tafvizi F, Naseh V, Salehipour M. Characterization and optimization of co-delivery Farnesol-Gingerol Niosomal formulation to enhance anticancer activities against breast cancer cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2022;72:103371.

25. Michael OH. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.

26. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. Journal of biological Chemistry. 2009;284(33):21777-81.

27. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nature medicine. 2000;6(5):529-35.

28. Green LD, Mack L, Pasieka JL. Anaplastic thyroid cancer and primary thyroid lymphoma: a review of these rare thyroid malignancies. Journal of surgical oncology. 2006;94(8):725-36.

29. Yin J, Tang W, Shao A, Wang L, Wang X, Ding G, et al. Caspase8 rs1035142 G> T polymorphism was associated with an increased risk of esophageal cancer in a Chinese population. Molecular biology reports. 2014;41(4):2037-43.

30. De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Martinez-Ara M, Plou J, Anel A, Martinez-Lostao L. Double-edged lipid nanoparticles combining liposome-bound trail and encapsulated doxorubicin showing an extraordinary synergistic pro-apoptotic potential. Cancers. 2019;11(12):1948.

31. Chou T-H, Liang C-H. The molecular effects of aloe-emodin (AE)/liposome-AE on human nonmelanoma skin cancer cells and skin permeation. Chemical research in toxicology. 2009;22(12):2017-28.

32. Sugiyama I, Kaihatsu K, Soma Y, Kato N, Sadzuka Y. Dual-effect liposomes with increased antitumor effects against 67-kDa laminin receptor-overexpressing tumor cells. International Journal of Pharmaceutics. 2018;541(1-2):206-13.

33. Chia CY, Kumari U, Casey PJ. Breast cancer cell invasion mediated by Gα12 signaling involves expression of interleukins-6 and− 8, and matrix metalloproteinase-2. Journal of molecular signaling .2014;9(1):1-11.

34. Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, et al. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. Cancer research. 2003;63(12):3370-7.

35. Zhang W, Wang F, Xu P, Miao C, Zeng X, Cui X, et al. Perfluorooctanoic acid stimulates breast cancer cells invasion and up-regulates matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by activating NF-κB. Toxicology letters. 2014;229(1):118-25.

36. Iochmann S, Bléchet C, Chabot V, Saulnier A, Amini A, Gaud G, et al. Transient RNA silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 modulates lung cancer cell invasion. Clinical & experimental metastasis. 2009;26(5):457-67.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

37. Bourbour M, Khayam N, Noorbazargan H, Yaraki MT, Lalami ZA, Akbarzadeh I, et al. Evaluation of anti-cancer and anti-metastatic effects of folate-PEGylated niosomes for co-delivery of letrozole and ascorbic acid on breast cancer cells. Molecular Systems Design & Engineering. 2022;7(9):1102-18.

38. Dabbagh Moghaddam F, Akbarzadeh I, Marzbankia E, Farid M, Reihani AH, Javidfar M, et al. Delivery of melittin-loaded niosomes for breast cancer treatment: an in vitro and in vivo evaluation of anti-cancer effect. Cancer Nanotechnology. 2021;12(1):1-35.

39. Mansoori-Kermani A, Khalighi S, Akbarzadeh I, Niavol FR, Motasadizadeh H, Mahdieh A, et al. Engineered hyaluronic acid-decorated niosomal nanoparticles for controlled and targeted delivery of epirubicin to treat breast cancer. Materials Today Bio. 2022;16:100349.

40. Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. Endocrine-related cancer. 2006;13(3):905-19.

41. Rice A, Quinn C. Angiogenesis ,thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. Journal of clinical pathology. 2002;55(8):569-74.

42. Liu Y, Tamimi RM, Collins LC, Schnitt SJ, Gilmore HL, Connolly JL, et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. Breast cancer research and treatment. 2011;129(1):175-84.

43. Kostopoulos I, Arapantoni-Dadioti P, Gogas H, Papadopoulos S, Malamou-Mitsi V, Scopa CD, et al. Evaluation of the prognostic value of HER-2 and VEGF in breast cancer patients participating in a randomized study with dose–dense sequential adjuvant chemotherapy. Breast cancer research and treatment. 2006;96(3):251-61.

44. Khodabakhsh F, Muyldermans S, Behdani M, Kazemi-Lomedasht F. Liposomal delivery of vascular endothelial growth factor/receptors and their inhibitors. Journal of Drug Targeting. 2020;28(4):379-85.

45. Jin J, Zhou KK, Park K, Hu Y ,Xu X, Zheng Z, et al. Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor. Investigative ophthalmology & visual science. 2011;52(9):6230-7.

46. Akbarzadeh I, Farid M, Javidfar M, Zabet N, Shokoohian B, Arki MK, et al. The optimized formulation of tamoxifen-loaded niosomes efficiently induced apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. AAPS PharmSciTech. 2022;23(1):1-13.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]