

مکانیسم و میزان تخریب سلول های سرطانی رده PC12 به وسیله نانو ذره طلا پوشیده شده با لیزین

کیانا شاهزمانی (PhD)^۱، هادی زارع مرزونی (MSc)^۲، فاضل ترخان (MD)^۲، حامد اسمعیل لشگریان (PhD)^{۳*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان خرم آباد

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان خرم آباد

۴- مرکز تحقیقات هیاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان خرم آباد

دریافت: ۹۴/۱۰/۱۳، اصلاح: ۹۴/۱۲/۱۲، پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: امروزه استفاده از نانو ذرات طلا در درمان سرطان، توجه بسیاری از محققین را به خود اختصاص داده است. ورود این نانو ذرات به داخل سلول یکی از مشکلاتی است اثر بخشی درمان را تحت تاثیر قرار می دهد. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی میزان و مکانیسم تخریب نانوذره طلا پوشیده شده با اسیدآمینه لیزین روی سلول های سرطانی رده PC12 می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، تولید نانو ذرات طلا به روش هیدروترمال دمای پایین بود. پس از تهیه رده سلولی PC12 از انیستیتو پاستور تهران و کشت آن، به ۷ گروه تحت تیمار با غلظت های ۰/۵، ۲/۵، ۵ میکرومولار نانوذره طلا با و بدون پوشش لیزین و یک گروه کنترل قرار گرفتند. اثر سایتوتوکسیسیته نانو ذره ها با استفاده از تست MTT و رها شدن LDH از سلول ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مورفولوژی سلولی و میزان ROS در درون سلول بررسی شد.

یافته ها: براساس نتایج حاصل، افزایش مرگ سلولی به میزان ۴۰٪، در اثر مواجهه با غلظت ۲۵ میکرومولار نانو ذره طلا پوشیده شده با آمینواسید لیزین رخ داد که نسبت به گروه تیمار شده با نانو ذره طلا بدون پوشش (۱۸٪ مرگ سلولی) دارای اختلاف آماری معنی داری بود ($p \leq 0.001$). همچنین آنکوباسیون سلول ها با نانوذرات بدون پوشش و پوشش دار، باعث افزایش ROS شده و مکانیسم مرگ سلولی نیز از طریق آپوپتوز می باشد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که نانو ذره طلا پوشیده شده با لیزین اثرات موثری در تخریب سلول های سرطانی رده PC12 داشته و مرگ سلولی را بسمت آپوپتوز هدایت می کند.

واژه های کلیدی: سرطان، نانو ذره، لیزین، آپوپتوز.

مقدمه

روش عمده درمان سرطان می باشند. در پرتودرمانی، برای نابودی سلول های سرطانی از پرتوهای یونیزان استفاده می شود که منجر به آسیب به سلول های سالم قرار گرفته در میدان پرتو می گردد (۱۱ و ۱۰). به همین دلیل در پرتو درمانی افزایش دوز پرتو عملاً امکان پذیر نبوده (۱۲) و برای افزایش بازده درمان از ترکیباتی استفاده می شود که به کارگیری آنها مقاومت پرتویی بافت سالم و یا حساسیت پرتویی بافت تومورال را افزایش می دهند (۱۳). مکانیسم اثر در بسیاری از موارد در مورد ترکیبات حساس کننده، تولید رادیکال آزاد ROS می باشد. در رابطه با حساس کننده ها، مطالعات زیادی بر روی، ترکیبات فیزیکی و شیمیائی متفاوت صورت گرفته (۱۴ و ۱۵) که در این بین، ترکیبات نانو از جایگاه ویژه ای برخوردار بوده که از این بین می توان به نانوذرات طلا (۱۶-۱۸) اشاره نمود.

درحال حاضر سرطان پس از بیماری های قلبی-عروقی دومین عامل مرگ و میر در کشورهای پیشرفته می باشد (۱ و ۲). عوامل مختلفی در سرطانی شدن سلول ها دخیل هستند. که همه آنها منجر به آسیب دیدگی ژنوم سلولی می شوند. بنابراین آسیب دیدگی DNA (ماده سازنده ژنوم)، مهمترین دلیل سرطانی شدن سلول ها هستند. از این رو آسیب دیدگی ژنها می تواند تفاوت های زیادی را بین سلول های سرطانی و سلول های عادی ایجاد نماید (۳-۷). از این تفاوت ها میتوان برای شناسایی و از بین بردن اختصاصی سلول های سرطانی نیز استفاده کرد. رده سلولی PC12 نوعی سلول سرطانی بوده که از فتوکروموسایتمای موش صحرایی جدا می شود و در محیط کشت رشد نموده و می تواند ویژگی های سلولهای عصبی را نشان می دهد (۹ و ۸). جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی سه

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۴۰۳۳۰۵۱۳۹۰۲۰۱۴ دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه می باشد.

*مسئول مقاله: حامد اسمعیل لشگریان

آدرس: لرستان، خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات هیاتیت. تلفن: ۰۶۶-۳۳۳۳۹۹۴۳

تهیه نانوذره های پوشش دار طلا با آمینواسید لیزین: به منظور تهیه نانوذره های پوشش دار، ابتدا در یک بشر محتوی ۱۵ میلی لیتر آب دیونیزه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول آمینواسیدی با غلظت ۲۵ میلی مولار اضافه گردید. سپس بشر بر روی هیتر قرار داده شد تا محلول درون آن به نقطه جوش برسد. در این لحظه به یک باره یک میلی لیتر محلول یک میلی مولار نمک طلا (HAuCl₄) به محلول در حال جوش اضافه گردید.

پس از تغییر رنگ و تکمیل شدن واکنش، ظرف به سرعت در حمام آب یخ قرار داده شد تا محلول کلوتیدی به طور کامل سرد گردد. در انتها محلول کلوتیدی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتری فیلتر گردید (۲۴ و ۲۳). در این مطالعه، به منظور تهیه نمونه ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه نانوذره طلا بر روی گرید مسی کوت شده با کربن قرار گرفته و به مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید. پس از خشک کردن گرید، نمونه دوبار با آب دوبار تقطیر شستشو داده شده و به مدت یک دقیقه با استات اورانیل ۲٪ رنگ آمیزی گردید (۲۵). نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل Hu-12A (هیتاچی، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثرات نمونه های مختلف از نانوذره های طلا بر سلول ها: به منظور بررسی اثر احتمالی پوشش های آمینواسیدی بر سمیت زایی نانوذره طلا، سلول های سرطانی رده PC12 به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت های مختلفی از نانوذره های طلا (۰/۵، ۲/۵ و ۵ میکرومولار) قرار گرفتند. میزان مرگ سلولی با سنجش میزان رهاسازی آنزیم سیتوزولی لاکتات دهیدروژناز (LDH) از سلول ها مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم LDH در محلول رویی و رسوب لیز شده سلولی (در کنترل) به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (کیت تشخیصی LDH). درصد LDH رها شده از سلول به محیط کشت توسط فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{LDH درصد} = \frac{\text{LDH موجود در محیط کشت}}{\text{LDH موجود در محیط کشت} + \text{LDH موجود در محلول لیز سلولی}} \times 100$$

همزمان تست MTT جهت سنجش بقای سلولی انجام شد. همچنین به منظور بررسی مورفولوژی سلولی، سلول های کنترل و تیمار شده با نمونه های مختلف از نانوذره های طلا، از نظر شکل ظاهری توسط میکروسکوپ فاز کنتراست مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور بررسی نوع مرگ سلولی القاء شده توسط نانوذره های طلا پوشش دار و بدون پوشش، از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید/اگریدین ارنج (EtBr/AO) استفاده شد. در این رنگ آمیزی میزان مرگ سلولی و همچنین نوع مرگ سلولی مشخص می شود. در این رنگ آمیزی، DNA در سلول هایی که دستخوش مرگ آپوپتوزی میشوند، بصورت متراکم و قطعه قطعه شده در می آید، این در حالی است که سلول های نکروز شده کروماتینی متراکم و قطعه قطعه نشده را نشان می دهند (۲۶ و ۲۷). در انتها نیز میزان ROS در درون سلول با استفاده از پروب فلورسانس ۲، ۷-دی کلروفلورسئین دی استات (DCFH-DA) اندازه گیری شد (۲۸).

آنالیز آماری داده ها: بررسی آماری داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS16 و آزمون های آماری واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست توکی انجام شد و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نانومواد با ایجاد استرس اکسیداتیو و پراکسید شدن لیپیدها، نقشی کلیدی در آسیب به DNA، تخریب غشا و نهایت مرگ سلولی دارند که می توانند منتهی به روشهای درمانی مؤثری شوند (۱۵ و ۱۴). تحقیقات نشان می دهد نانوذره های طلایی که با پادتن ضد سرطان روکش داده شده اند به طور مؤثری قادرند به سلول های سرطانی متصل گردند. بسیاری از سلول های سرطانی حاوی پروتئینی به نام گیرنده فاکتور رشد اپیدرم (EGFR) در سطح خود هستند که در سلول های سالم بدن انسان عمدتاً مشاهده نمی شود. این پژوهشگران با اتصال نانوذره های طلا به پادتن EGFR (با نام anti EGFR) توانسته اند نانوذره های یاد شده را به سلول های سرطانی متصل کنند و باعث تخریب اختصاصی سلول های سرطانی با نانو ذرات طلا شوند (۲۰ و ۱۹).

با این حال، اتصال و ورود نانوذرات به سلول های سرطانی همواره از مشکلاتی است که مورد توجه پژوهشگران بوده و بهبود آن، می تواند باعث تغییر میزان اثر نانوذرات شود. لیزین یکی از اسید آمینه های سطحی غشای سلولی می باشد که از نظر سایز، اندازه کوچکی دارد. این احتمال وجود دارد که با پوشیده شدن نانوذرات با اسید آمینه لیزین، میزان اتصال و ورود نانوذرات به درون سلول - های سرطانی بهبود یافته و اثر استفاده از نانوذرات افزایش یابد. در همین راستا، این مطالعه با هدف شناسایی میزان و میکانیسم مرگ سلول های سرطانی PC12 مواجهه یافته با نانوذره های طلایی فاقد پوشش و پوشش دار با اسید آمینه لیزین، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

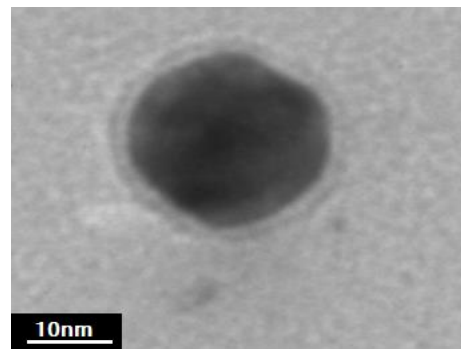
در این مطالعه تجربی، اثر نانوذرات طلا پوشش دار با اسید آمینه لیزین بر میزان و نوع مرگ سلولی، در سلول های سرطانی رده PC12 بررسی شد. مراحل انجام مطالعه به شرح زیر می باشد.

کشت سلول: در این مطالعه برای کشت invitro از رده سلولی PC12 که از انیسیتو پاستور ایران تهیه شده بود استفاده شد. سلول ها در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco) به همراه (Bovine Serum Albumin=BSA) ۰/۲٪ (w/v)، L-Glutamine ۱٪ (v/v) و Nonessential Amino=NEAA) و (Acids) ۱٪ (v/v) درون فلاسک کشت سلول T-25 (NUNC) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵٪ CO₂ و رطوبت کافی کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت قدیمی با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که سلول ها، ۷۰ تا ۸۰ درصد از کف فلاسک را فرا گرفتند، پاساژ سلول ها با استفاده از محلول Trypsin-EDTA (200 unit/ml)، انجام گرفت (۲۲ و ۲۱).

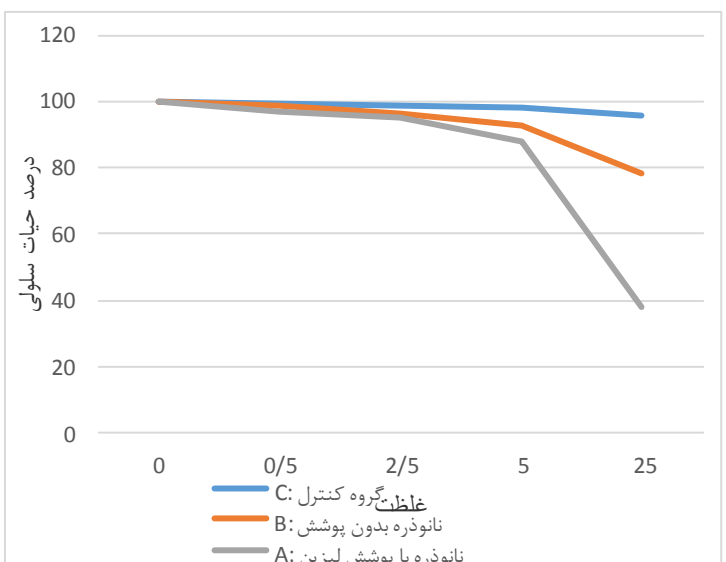
تولید نانو ذرات طلا بدون پوشش: به منظور تهیه نانوذره های طلایی بدون پوشش، ابتدا (HAuCl₄، ۲۵۴۱۶۹) در آب با غلظت مولی ۰/۰۱ محلول گردید و قدرت یونی و PH آن به ترتیب ۰/۰۰۵ مولار و ۷/۸ توسط سیستم بافری فسفات تنظیم شد. یک فاز غیر آبی (تولون C₆H₅CH₃) حاوی سدیم تترا بروهیدراته با غلظت ۰/۰۲ مولار نیز جداگانه آماده گردید. در مرحله بعد هر دو فاز به یکدیگر اضافه و به شدت تکان داده شد. پس از جداسازی فاز آلی در دمای ۵۰ درجه و تحت فشار کم توسط دستگاه روتاری حلال حذف گردید. و بالاخره ذرات نانو طلا که در کف ظرف جمع شده بودند و در محلول بافر فسفات با قدرت یونی و PH به ترتیب ۰/۰۰۵ مولار و ۷/۶ پراکنده و محلول هموزنی بدست آمد (۲۳).

یافته ها

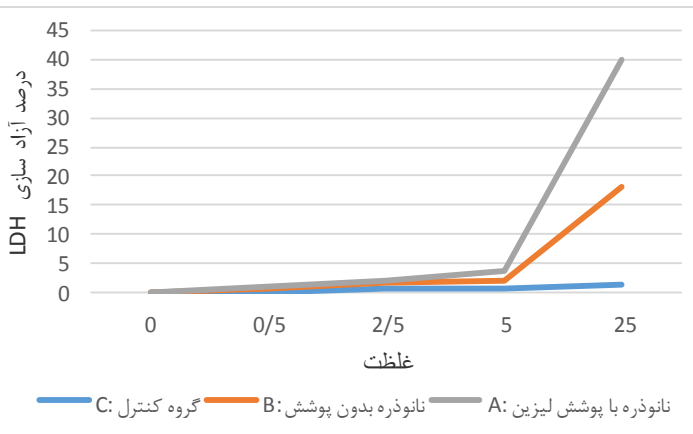
به منظور مطالعه ساختار نانوذره طلای پوشش دار از میکروسکوپ الکترونی بهره گرفته شد. تصاویر تهیه شده حضور پوشش های آمینواسیدی را بصورت هاله ای در اطراف نانوذره نشان می دهد (شکل ۱). میانگین قطر نانوذره های طلا در حالات بدون پوشش و پوشش دار با آمینو اسید لیزین به ترتیب 10 ± 0.2 و 29 ± 0.3 نانومتر محاسبه گردید. به دنبال آنکوباسیون سلول های سرطانی رده PC12 با نانوذره طلای پوشیده با آمینواسید لیزین، نتایج نشان داد که این نانوذره در غلظت های پایین ($5/0$ تا 5 میکرومولار) اثرات بسیار ناچیزی بر حیات سلولی داشته اما در غلظت های بالا توانسته بصورت وابسته به دوز، تاثیرات برجسته ای بر فعالیت متابولیکی داشته باشد، به گونه ای که در بالاترین غلظت 25 میکرومولار، حیات سلولی را نسبت به سلول های کنترل، در حدود 62% کاهش داده است. ولی کاهش حیات سلولی در مجاورت با نانوذرات طلا بدون پوشش نسبت به گروه کنترل حدود 22% بود (نمودار ۱ و ۲).



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذره پوشش داده شده با آمینواسید لیزین



نمودار ۱. درصد حیات سلولی (بر اساس تست MTT) پس از 48 ساعت آنکوباسیون سلول های سرطانی رده PC12 با غلظت های مختلف از نانوذره طلا پوشیده شده با لیزین (A)، نانو ذره طلا بدون پوشش (B) و گروه کنترل (C). از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین حیات سلولی در سه گروه A، B و C در غلظت های $5/0$ ، 5 و 25 میکرومولار مشاهده نشد ($p > 0.05$). ولی سطح معنی داری در غلظت 25 میکرومولار در گروه های مختلف قابل تشخیص بود ($P_{AC} > 0.01/0$)، ($P_{BC} = 0.1/0$) و ($P_{AB} > 0.01/0$).



نمودار ۲. درصد آزاد سازی سیتوپلاسمی آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) به درون محیط کشت سلولی پس از 48 ساعت آنکوباسیون سلول های سرطانی رده PC12 با غلظت های مختلف از نانوذره طلا پوشیده شده با لیزین (A)، نانو ذره طلا بدون پوشش (B) و گروه کنترل (C). از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین تخریب دیواره سلولی و آزاد سازی LDH در غلظت های $5/0$ ، 5 و 25 میکرومولار، در سه گروه A، B و C مشاهده نشد ($p > 0.05/0$). ولی در غلظت 25 میکرومولار سطح معناداری در گروه های مختلف قابل تشخیص بود ($P_{AC} > 0.01/0$)، ($P_{BC} = 0.1/0$) و ($P_{AB} = 0.1/0$).

میزان حیات سلولی در گروه از نانوذرات پوشیده شده با لیزین بصورت معناداری پایین تر از نانوذرات طلا بدون پوشش بود ($p > 0.001$). سنجش میزان یکپارچگی ساختار غشایی نیز نشان می دهد این نانوذره در بالاترین غلظت میزان رها سازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز به محیط کشت را، نسبت به سلول های کنترل، در حدود 38% افزایش داده است. این در حالی است که کاهش حیات سلولی در گروه نانوذرات طلا بدون پوشش نسبت به گروه کنترل حدود 20% بود. میزان حیات سلولی در گروه نانوذرات طلا پوشیده شده با لیزین، به طور معناداری پایین تر از گروه نانوذرات طلا بدون پوشش بود ($p = 0.1/0$).

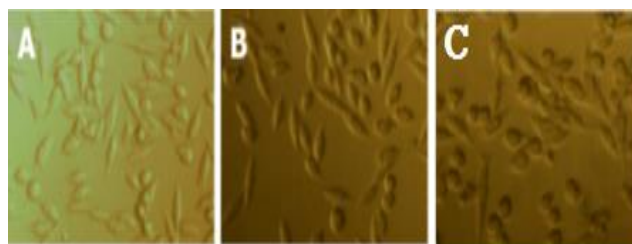
نتایج مربوط به مورفولوژی نشان داد سلول های سرطانی رده PC12 نرمال عمدتاً دارای مورفولوژی دوکی شکل هستند. این مورفولوژی طی آنکوباسیون سلول ها با نانوذره های طلای بدون پوشش و پوشش دار دچار تغییر شده و با تغییر مورفولوژی از دوکی شکل به سمت کروی شکل همراه بوده است (شکل ۲). همچنین نتایج مطالعه حاضر ثابت کرد بخش عمده مرگ سلولی حاصل از آنکوباسیون سلول ها با غلظت 25 میکرومولار از نانوذره های طلای بدون پوشش و پوشش دار در رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج (EtBr/AO) بصورت آپوپتوز می باشد (شکل ۳). نتایج در این مطالعه نشان دادند که 48 ساعت مجاورت سلول های سرطانی رده PC12 با غلظت 25 میکرومولار از نانوذره های طلا پوشیده با لیزین، منجر به افزایش در تولید ROS درون سلولی نسبت به سلول های کنترل می گردد ($p > 0.001$). نتایج بیانگر افزایش مرگ سلولی به میزان 60% در اثر مجاورت با نانو ذره طلا پوشیده شده با لیزین در غلظت 25 میکرومولار می باشد. این در حالی است که این تغییر در گروه تیمار شده با نانو ذره طلا بدون پوشش 20% بوده و تاثیر برجسته ای بر سطح ROS درون سلولی نداشت ($p = 0.1/0$). تفاوت مرگ سلولی در دو گروه دارای اختلاف آماری معنی داری بود ($p < 0.001$).

مطالعه، میزان مرگ سلولی ناشی از مجاورت از نانوذره طلا پوشش دار باعث افزایش مرگ سلولی نسبت به حالت نانوذره بدون پوشش و گروه کنترل بود. علاوه بر آن نوع مرگ سلولی ناشی از مجاورت سلول های سرطانی PC12 با نانوذرات طلا پوش دار و بدون پوشش، القاء مرگ آپوپتوزی در آنها را نشان می دهد. همچنین نتایج این بررسی نشان می دهند که میزان ROS تولیدی توسط سلول هایی که در مجاورت نانوذره های پوشش دار، بطور قابل توجهی بیشتر از نانوذره بدون پوشش بود. این مساله بیانگر القاء مرگ آپوپتوزی در این سلول ها توسط نانوذره های طلا، با واسطه افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) می باشد.

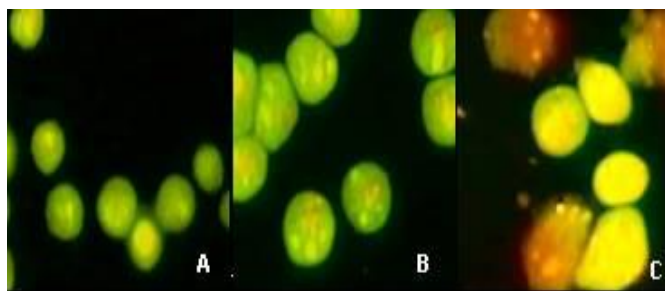
در مطالعه Shubayev و همکارانش به این نکته اشاره شده است که از ویژگی های نانوذرات این است که باعث افزایش میزان ROS می شوند و با آسیب رساندن به مولکول های DNA باعث ایجاد مرگ سلولی از طریق آپوپتوز می شوند (۱۵). در مطالعه Wassan و همکارانش که روی حساسیت سلول های سرطانی لوزالمعده در مجاورت با نانوذرات در تولید ROS انجام گرفت مشخص شد که تولید گونه های فعال اکسیژن در این نوع از سلول های سرطانی در هنگام مجاورت با نانوذرات افزایش می یابد و منجر به مرگ انتخابی در این سلول ها می شود (۱۴). با این حال نتایج حاصل از مطالعه Connor و همکارانش بیان کننده عدم سمی بودن نانوذرات در ۳ روز مجاورت با سلول ها بود. آنها بیان کردند که اگر چه ممکن است برخی از پیش سازهای نانوذرات سمی باشد، ولی نانوذرات به خودی خود بر عملکرد سلولی ضرری ندارند (۲۷). آزمایشات تکمیلی ما بر روی سایر اسید آمینه ها نشان دهنده این واقعیت بوده که بسته به نوع پوشش نانوذرات، مکانیسم های متفاوتی برای مرگ سلولی و حتی میزان آن وجود دارد. براساس نتایج به دست آمده پوشش لیزین بیشترین تاثیر را در القاء مرگ آپوپتوزی در سلول های سرطانی PC12 بر جای گذاشته که بیانگر برهمکنش قوی این نوع نانوذره با گیرنده های مرگ واقع در سطح سلول های سرطانی می باشد. این یافته ها با نتایج Selvakannan و همکارانش مطابقت دارد (۳۰). به طور کلی نتایج حاصل بررسی مجاورت سلول های سرطانی رده PC12 با نانوذرات پوشیده شده با لیزین در برابر نانوذرات بدون پوشش، نشان داد که پوشش دار شدن نانو ذره طلا با آمینواسید لیزین باعث افزایش مرگ سلولی نسبت به نانوذرات بدون پوشش می شود. از طرفی این مرگ سلولی با افزایش ROS با فرآیند آپوپتوز صورت می گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه خرم آباد و دانشکاه آزاد ارومیه و تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نموده اند، تشکر و قدردانی می گردد.



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست سلول های سرطانی رده PC12 تیمار شده با انواع مختلف از نانوذره های طلا غلظت ۲۵ میکرومولار: A: نمونه کنترل، B: انکوبه شده با نانوذره بدون پوشش، C: انکوبه شده با نانوذره با پوشش لیزین



شکل ۳. القاء مرگ آپوپتوزی و نکروزه توسط انواع مختلف از نانوذره های طلا غلظت ۲۵ میکرومولار: A: رنگ آمیزی EtBr/DAPI در سلول های تیمار نشده، B: تیمار شده با نانوذره بدون پوشش، C: تیمار شده با نانوذره با پوشش دار لیزین

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که پوشش دار کردن نانوذرات طلا با اسید آمینه لیزین، میزان مرگ سلولی، در سلول های سرطانی رده PC12 را نسبت به نانوذرات طلا بدون پوشش، افزایش می دهد. سالهای زیادی است که محققان، از رده سلولی PC12 برای مطالعات بیولوژیکی و مطالعات روی سلول های سرطانی استفاده می کنند (۲۲). نتایج حاصل از سنجش احیاء MTT و میزان رها سازی LDH به درون محیط کشت، عمدتاً حاکی از اثرات تخریبی بیشتر نانوذره پوشش دار طلا نسبت به نانوذره بدون پوشش بوده است. اختلاف در شکل، اندازه و بار سطحی نانوذرات طلا عاملی در ایجاد سمیت نانوذرات بر سلول های سرطانی در این مطالعه بوده است (۲۹).

مطالعات Suh و همکارانش در رابطه با یکپارچگی غشاء نشان می دهند که حضور پوشش های آمینواسیدی، می تواند به واسطه افزایش برهمکنش بین نانوذره و سطوح سلولی و یا ایجاد منفذ در غشاء سلولی منجر به اختلال در یکپارچگی غشاء سلول های سرطانی گردد (۲۹). که این یافته در مطالعه حاضر در رابطه با سلول های سرطانی رده PC12 تایید شد. بر اساس نتایج حاصل از این

A Study of Mechanism and Rate of PC12 Cancer Cell Destruction Induced by Lysine-Coated Gold Nanoparticle

K. Shahzamani (PhD)¹, H. Zare Marzouni (MSc)², F. Tarkhan (MD)³, H.E. Lashgarian (PhD)^{*4}

1.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran

2.Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R.Iran

3.Student Research Committee, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R.Iran

4.Hepatitis Research Center, Lorestan University of Medical Science , Khorramabad, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(8); Aug 2016; PP: 41-7

Received: Jan 3th 2016, Revised: Mar 2th 2016, Accepted: Jun 1st 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Using gold nanoparticles for cancer treatment has attracted the attention of many researchers in recent years. Entry of these nanoparticles into cells is one the problems that influences the effectiveness of the treatment. The purpose of this study is to identify the destructive effects of amino acid lysine-coated gold nanoparticles on PC12 cancer cells.

METHODS: In this empirical study, gold nanoparticles were prepared using low temperature hydrothermal technique. After obtaining PC12 cells from Pasteur Institute of Iran and culturing them, we divided them into 7 treatment groups with concentrations of 0.5, 2.5 and 5 μ M gold nanoparticles, with and without lysine coating; plus one control group. The cytotoxic effect of nanoparticles was assessed using MTT assay and LDH release from cells. In addition, cell morphology and amount of ROS (reactive oxygen species) within cells were examined.

FINDINGS: According to the results of this study, a 40% increase in cell death occurred as a result of exposure to 25 μ M amino acid lysine-coated gold nanoparticles, which was significantly higher than the group treated by uncoated gold nanoparticles (18% cell death) ($p \leq 0.001$). In addition, incubating cells with coated and uncoated nanoparticles increased the amount of ROS and mechanism of cell death through apoptosis.

CONCLUSION: Results of the study revealed that lysine-coated gold nanoparticles have promising effects on destruction of PC12 cancer cells and they direct cell death towards apoptosis.

KEY WORDS: *Cancer, Nanoparticle, Lysine, Apoptosis.*

Please cite this article as follows:

Shahzamani K, Zare Marzouni H, Tarkhan F, Lashgarian HE. A Study of Mechanism and Rate of PC12 Cancer Cell Destruction Induced by Lysine-Coated Gold Nanoparticle. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(8):41-7.

*Corresponding author: H.E. Lashgarian (PhD)

Address: Hepatitis Research Center, Lorestan University of Medical Science, Khorramabad, I.R.Iran

Tel: +98 66 33239943

E-mail: hamedesmailli@gmail.com

References

1. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanotechnol Biol Med.* 2014;10(1):19-34.
2. Marzouni HZ, Lavasani Z, Shalilian M, Najibpour R, Fakhr MS, Nazarzadeh R, et al. Women's awareness and attitude toward breast self-examination in dezfoul city, Iran, 2013. *Iran Red Crescent Med J.* 2015;17(1):17829.
3. Kurfurstova D, Bartkova J, Vrtel R, Mickova A, Burdova A, Majera D, et al. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Molecular Oncol.* 2016;10(6):879-94.
4. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015;763:212-45.
5. Khanna A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse?. *Cancer Res.* 2015;75(11):2133-8.
6. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):20-33.
7. Wang H, Zhang X, Teng L, Legerski RJ. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp Cell Res.* 2015;10;334(2):350-8.
8. Fan B, Liu S, Xu C, Liu J, Kong F, Li G, et al. The role of P2X7 receptor in PC12 cells after exposure to oxygen-glucose deprivation. *Auton Neurosci.* 2014;185:36-42.
9. Lanju X, Jing X, Shichang L, Zhuo Y. Induction of apoptosis by antimycin A in differentiated PC12 cell line. *J app toxicol.* 2014;34(6):651-7.
10. Szymanski MS, Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J Immunol Methods.* 2013;31;387(1-2):262-9.
11. Chessum N, Jones K, Pasqua E, Tucker M. Recent advances in cancer therapeutics. *Prog Med Chem.* 2015;54:1-63.
12. Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;105:342-52.
13. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;169(2):59-79.
14. Wason MS, Colon J, Das S, Seal S, Turkson J, Zhao J, et al. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. *Nanomedicine.* 2013;9(4):558-69.
15. Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(6):467-77.
16. Breitner EK, Hussain SM, Comfort KK. The role of biological fluid and dynamic flow in the behavior and cellular interactions of gold nanoparticles. *J nanobiotechnol.* 2015;13(56):1-10.
17. Sadeghi B, Mohammadzadeh M, Babakhani B. Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: characterization and their stability. *J Photochem Photobiol.* 2015;148:101-6. [In Persian].
18. Abdalla S, Al-Marzouki F, Al-Ghamdi AA, Abdel-Daiem A. Different technical applications of carbon nanotubes. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):358.
19. Ahmadi TS, Logunov SL, El-Sayed MA. Picosecond dynamics of colloidal gold nanoparticles. *J Physic Chem.* 1996;100(20):8053-6.
20. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*, 5th : Lippincott Williams & Wilkins; 2006. P.546.
21. Najmi-Nejad S, Zhaleh H, Azadbakht M. Protective effects of morphine low concentration on dexamethasone-induced cell death in differentiated PC12 cells. *J Babol Univ Med Sci.* 2013;15(5):7-16. [In Persian].
22. Zhaleh H, Bidmeshki Pour A, Azadbakht M, Haramshahi M. Protective effects of morphine on serum deprivation-induced cell death in PC12 cells. *J Babol Univ Med Sci.* 2013;15(6):44-51. [In Persian].

23. Inbathamizh L, Ponnu TM, Mary EJ. In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *J Pharma Res.* 2013;6(1):32-8.
24. Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AAA, Kadhum AAH, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(1):58-63.
25. Goldstein J. *Practical scanning electron microscopy, New York: electron and ion microprobe analysis;* 2012. P. ?
26. Saini P, Saha SK, Roy P, Chowdhury P, Babu SP. Evidence of reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis in *Setaria cervi* induced by green silver nanoparticles from *Acacia auriculiformis* at a very low dose. *Exp Parasitol.* 2016;160:39-48.
27. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005;1(3):325-7.
28. Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell J, et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol Vitro.* 2013;27(2):954-63.
29. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh Y-H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog neurobiol.* 2009;87(3):133-70.
30. Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M. Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. *Langmuir.* 2003;19(8):3545-9.