Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2025; Vol. 48; No. 4

The Study of Changes in the Expression of Bax and Bcl-2 Genes in MCF-7 Cell Line Treated with Selenium Nanoparticles Containing Anthemis Atropatana Extract

Mahsa Kavousi[1*], Hadis Toosi[1], Amir Mirzaee[2]

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

Received: September 23, 2024; Accepted: February 18, 2025

Abstract

Background and Aim: Studies have shown that changes in the expression level of some genes play a role in the development of cancer. The aim of this study is to investigate the changes in the expression of apoptotic genes Bax and Bcl-2 in MCF-7 cell line after treatment with selenium nanoparticles containing chamomile extract.

Methods: This study is a practical and experimental intervention. One- way analysis (ANOVA) and t-test was used for statistical analysis. After synthesizing selenium nanoparticles with Anthemis atropatana extract, the correctness of the synthesis was confirmed by SEM, TEM and EDX. To perform MTT and calculate the IC50, the cells (cancer cell line) MCF-7 and (healthy cell line) MCF-10 were treated with selenium nanoparticles for 24 hours. Finally, the changes in Bax and Bcl-2 gene expression were examined.

Results: The results of checking the accuracy of the synthesis of selenium nanoparticles showed that the synthesized nanoparticles were spherical and had a diameter of 33.40 nm. The IC50 concentration was 6 µg/ml. The results of real- time PCR showed that after 24-hour treatment with the IC50 concentration of selenium nanoparticles, the expression of apoptotic gene Bax increased significantly by 2.69 ± 0.31-fold (P-value < 0.001) and the expression of anti- apoptotic gene Bcl-2 decreased significantly by 0.21 ± 0.17-fold (P-value < 0.001).

Conclusion: Selenium nanoparticles containing chamomile extract modulated gene expression in a manner that promotes apoptosis, suggesting their potential as therapeutic agents.

Keywords: Changes in gene expression; Selenium nanoparticle; Anthemis atropatana; chamomile; MCF-7; cytotoxicity; apoptosis

Please cite this article as: Kavousi M, Toosi H, Mirzaee A. The Study of Changes in the Expression of Bax and Bcl-2 Genes in MCF-7 Cell Line Treated with Selenium Nanoparticles Containing Anthemis Atropatana Extract. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;48(4):1-13.

[*]**Corresponding Author:** Mahsa Kavousi; **Email:** mkavosi@yahoo.co.uk
Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۴، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۱ تا ۱۳

مطالعه تغییر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با نانوذرات سلنیوم حاوی عصاره Anthemis atropatana

مهسا کاوسی[1*]، حدیث طوسی[1]، امیر میرزایی[2]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۳۰

چکیده

سابقه و هدف: مطالعه‌ها نشان داده است که تغییر در میزان بیان برخی از ژن‌ها در ایجاد سرطان نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با نانوذرات سلنیوم حاوی عصاره بابونه است.

روش کار: این مطالعه از نوع تجربی مداخله‌ای است. برای انجام مطالعه‌های آماری از One way ANOVA و t-test استفاده شد. پس از سنتز نانوذرات سلنیوم حاوی عصاره Anthemis atropatana، صحت سنتز آن با SEM، TEM و EDX تأیید شد. سپس برای انجام MTT و محاسبه IC50، سلول‌های MCF-7 (رده سلولی سرطانی) و MCF-10 (رده سلولی سالم)، به مدت ۲۴ ساعت با نانوذرات سلنیوم، تیمار شدند. در نهایت تغییرات میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مطالعه شدند.

یافته‌ها: نتایج بررسی صحت سنتز نانوذرات سلنیوم، نشان داد که نانوذرات سنتز شده کروی بوده و دارای قطر ۳۳/۴۰ نانومتر هستند. غلظت IC50، برابر با ۶ µg/ml به دست آمد. نتایج Real time PCR نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تیمار در غلظت IC50 از نانوذرات سلنیوم، میزان بیان ژن آپوپتوزی Bax، ۰/۳۱ ± ۲/۶۹ برابر افزایش بیان معنادار (P-value < ۰/۰۰۱) و ژن ضد آپوپتوز Bcl-2 به میزان ۰/۱۷ ± ۰/۲۱برابر کاهش بیان معنادار (P-value < ۰/۰۰۱) پیدا کرده است.

نتیجه‌گیری: نانوذرات سلنیوم حاوی عصاره بابونه توانستند بیان ژن‌های درگیر را به نفع القای آپوپتوز تغییر دهند.

واژگان کلیدی: تغییرات بیان ژن؛ نانوذرات سلنیوم؛ Anthemis atropatana؛ بابونه؛ MCF-7؛ سمیت سلولی؛ آپوپتوز

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Kavousi M, Toosi H, Mirzaee A. The Study of Changes in the Expression of Bax and Bcl-2 Genes in MCF-7 Cell Line Treated with Selenium Nanoparticles Containing Anthemis Atropatana Extract. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;48(4):1-13.

*نویسنده مسئول مکاتبات: مهسا کاوسی؛ آدرس پست الکترونیکی: mkavosi@yahoo.co.uk
گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

CC BY NC

مقدمه

سن بروز سرطان پستان در زنان ایران دست کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است. میانگین سن تشخیص این بیماری در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است (۱). سرطان به وسیله یک سری از جهش‌های متوالی در ژن‌های انسان اتفاق می‌افتد. هر جهش تا حدی تغییر جدید در سلول ایجاد کرده و ترکیب‌های شیمیایی سبب ایجاد سلول سرطان می‌شوند. انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور نقش مهمی در فرایند حفظ هومئوستازی سلول دارند، زیرا تکثیر یا مرگ سلول را تنظیم می‌کنند (۲). آخرین راه فرار از سرطانی‌شدن سلول، انتخاب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. چندین ژن در تولید مرگ برنامه‌ریزی شده نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از جمله *P53*، *Bcl-2*، *Bcl-Xl*، *Bim*، *Bad*، *Bak*، *Bax* و *I-MCL* (۳، ۴). پروتئین ۲۶-۲۵ کیلودالتونی Bcl-2، سرگروه این خانواده بوده و ساختمان آن به عنوان الگوی نام‌گذاری دیگر اعضای گروه استفاده می‌شود. این پروتئین از ژنی ۲۳۰ کیلو بازی و به صورت mRNA ۵/۶ کیلو بازی بیان می‌شود که دارای ۲۳۹ اسید آمینه است. در ساختمان آن در بخش انتهای کربوکسیلی، ۱۹ تا ۲۳ اسید آمینه بسیار هیدروفوب وجود دارند که سبب ایجاد قلمرو ترانس ممبرانی می‌شود. پروتئین Bcl-2 از این طریق در غشاء هسته، شبکه آندوپلاسمی خشن و به ویژه درمیتوکندری مستقر می‌شود. این پروتئین دارای هفت ساختار مارپیچ آلفا است. قلمروهای ساختمانی آن به صورت BH نشان داده شده و از BH_1 تا BH_4 تعریف شده است. قلمروهای BH_1 و BH_2 در ایجاد منفذ، BH_2 و BH_3 در ایجاد هترو دیمر و BH_3 و BH_4 در تنظیم فعالیت عمل می‌نمایند (۵). ژن *Bcl-2* یک پروتئین داخل غشاء خارجی میتوکندری را کد می‌کند که مرگ آپوپتوتیک تعدادی از سلول‌ها نظیر لنفوسیت‌ها را بلوک کرده و دو واریانت ترجمه شده دارد که در انتهای C-terminal تفاوت دارند. ژن *Bcl-2* بر روی کروموزوم ۱۸ و در موقعیت q 21.318؛ q 21.3318 قرار دارد. این ژن در سیستم‌های سلولی مختلف نظیر سلول‌های لنفو هماتو پوئتیک و سلول‌های عصبی، آپوپتوز را مهار کرده و مرگ سلولی را به وسیله کنترل نفوذپذیری غشاء تنظیم می‌کند. همچنین به عنوان سیستم چرخش فیدبک با کاسپازها عمل کرده و فعالیت کاسپاز را به وسیله پیشگیری از آزاد شدن سیتوکروم C و یا فاکتور فعال-کننده آپوپتوز مهار می‌کند (۶). پروتئین Bax که متعلق به خانواده پروتئین Bcl-2 است، با تشکیل هترو یا هومو دیمر به عنوان تنظیم‌کننده‌های آنتی یا پرو آپوپتیک با فعالیت‌های متنوع عمل می‌کنند. گزارش شده است که این پروتئین‌ها با کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ میتوکندریایی واکنش داده و اندازه منفذ کانال‌ها را افزایش می‌دهند. در نتیجه با از دست رفتن پتانسیل غشایی سیتوکروم C آزاد می‌شود. بیان ژن *Bax* به وسیله مهارکننده P_{53} تنظیم و در آپوپتوز وابسته به P_{53} نقش دارد. واریانت‌های ترجمه شده متعددی که به وسیله ایزوفرم‌های مختلف این ژن کد می‌شود، گزارش شده است. این ژن بر روی کروموزوم ۱۹ و در موقعیت q 13.3 ۱۹؛ q 13.4 ۱۹ قرار دارد. این پروتئین، پروآپوپتیک است که تا زمانی که به وسیله انواعی از محرک‌های مرگ سلولی فعال شود، در سیتوزول قرار دارد. به تازگی محل اتصال BIMSAHB بر روی Bax به صورت دو هلیکس آلفا ۱ و آلفا ۲ با محل اتصال بین آنها که شیار هیدروفوبیک را تشکیل می‌دهد، توصیف شده است و هدف جدیدی برای تنظیم درمانی آپوپتوز ایجاد کرده است (۷).

توانایی برای انتقال دارو به بافت هدف بیمار یک بحران در پزشکی است. زیرا دارورسانی هدفمند اثر درمان را بهبود داده (تجمع دارو را در بافت هدف افزایش می‌دهد) و اثرهای جانبی را کم می‌کند (تراکم دارو را در بافت سالم کاهش می‌دهد). خواص منحصر به فرد شیمیایی و فیزیکی نانوذرات سلنیوم، این ترکیب‌ها را برای کاربردهای دارورسانی مناسب می‌کند. اول این که نانوذرات سلنیوم پایدار بوده و سمی نیستند. بنابراین به بافت سالم آسیب نمی‌رسانند. دوم: این که گروه‌های عاملی می‌توانند با استفاده از پایه تیول با پیوند کووالانسی، به راحتی روی سطح نانوذرات سلنیوم قرار بگیرند. سرانجام خواص فتوفیزیکی نانوذرات سلنیوم می‌تواند برای کنترل از راه دور و آزاد شدن دارو از سطح

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

نانوذرات به کار برده شود (۸).

سرطان پستان با درگیر کردن زنان جامعه، اثر مخربی در خانواده‌ها دارد. از سوی دیگر هزینه‌های سرسام‌آور درمان روی اقتصاد خانواده مؤثر است. با توجه به روند رو به رشد سرطان پستان و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، محققان در پی کشف داروهای طبیعی جدید و مؤثر هستند. در مطالعه حاضر، اثر عصاره گیاه بابونه بارگذاری شده در نانوذرات سلنیوم در تغییرهای میزان بیان دو ژن مهم در القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 بررسی شده است. این تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه شهید بهشتی در سال ۱۴۰۰ انجام شده است.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی مداخله‌ای است. برای انجام مطالعه‌های آماری از One way ANOVA و t-test استفاده شد.

تهیه گیاه و عصاره‌گیری از آن

گیاه بابونه (*Anthemis atropatana*) از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هر باریومی ۱۵۶۸ تهیه شد. برای تهیه عصاره، پس از خشک کردن اندام هوایی گیاه در سایه و پودر کردن برگ‌ها، عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد.

سنتز سبز نانوذرات سلنیوم

برای سنتز نانو ذرات سلنیوم با خلوص بالا و در سایزهای مختلف، از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های سلنیوم استفاده شد. به این منظور نمک سلنیت سدیم (sodium selenite مرک- آلمان) و عصاره گیاه در شرایط دمایی به مدت دو ساعت هم‌زده شدند. سپس شست‌وشو و سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت شست‌وشوی انتهایی با اتانول انجام شد و محصول حاصل در دمای ۷۵ °C به مدت دو ساعت قرار داده شد.

بررسی صحت سنتز نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی گذاره و روبشی

برای بررسی ریخت‌شناسی و تأیید اندازه نانوذرات سلنیوم، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل Zeiss۱۰۰ KV)، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۲۰Kvو میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن تصویربرداری شد.

تهیه رده سلولی و کشت سلول

رده سلولی MCF-7 (Epithelial-like IBRC C10082) از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. سلول‌های این رده‌ی سلولی در محیط کشت (Bioidea ایران) RPMI با محتوای g/L ۴/۵ از D- گلوکز، FBS ۱۰٪ (Bioidea ایران)، پنی‌سیلین (Bioidea ایران) به میزان ۱۰۰µg/µl و استرپتومایسین (Biosera ایران) به میزان ۱۰۰µg/µl در دمای ۳۷ °C و فشار ۵٪ از CO_2 کشت داده شد. گروه کنترل، سلول‌های رده سلولی (CRL-10317-ATCC) MCF-10 بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه و کشت داده شدند. هر دو گروه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات سلنیوم به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند.

تکنیک MTT assay

در مطالعه حاضر از تکنیک MTT برای سنجش میزان کشندگی نانوذرات سبز استفاده شد. تعداد $۱۰^۴$ عدد سلول به همراه محیط کشت، در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه، کشت داده شده و پس از یک شب انکوباسیون، محیط کشت تخلیه شد. ۱۰۰µl از غلظت‌های متفاوت نانوذرات سبز (µg/ml ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵) با سه تکرار (۹) اضافه شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار انکوبه شدند. سپس به هر چاهک ۱۰۰µl از محلول MTT اضافه و به مدت سه ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از خروج از انکوباتور، محیط کشت سلول‌ها تخلیه و به هر چاهک ۱۰۰µl DMSO اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان جذب توسط دستگاه قرائت‌گر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس درصد بقای سلول‌ها محاسبه شد.

استخراج RNA از سلول MCF-7

از سلول‌های رده سلولی MCF-7 که با غلظت‌های مختلف نانوذره تیمار شده بودند، با استفاده از روش RNX-Plus، RNA استخراج

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

شد. برای استخراج RNA از کیت BIOZOL Total RNA Extraction Reagent شرکت Bioflux (Bioer technology Co. Ltd) استفاده شد. سپس کمیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و کیفیت آن با استفاده از روش ژل الکتروفورز ۱/۵درصد بررسی شد. پس از حصول اطمینان از خلوص RNA استخراج شده، از آن برای سنتز cDNA با کیت ساخت (Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* به کمک Real time PCR (Relative)

قبل از واکنش PCR، غلظت‌های یکسانی از cDNAهای حاصل با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. در این تحقیق از Master mix (Bioneer)، پرایمرهای ژن‌ها (*β-actin*، *Bcl-2* و *Bax*) و cDNA حاصل از RNA استخراج شده از سلول‌ها، با سه بار تکرار (۹) استفاده شد. در این پژوهش از روش SYBR Green و ژن *β-actin* به عنوان ژن مرجع، برای بررسی بیان تغییرهای بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن‌های *Bax*، *Bcl-2* و *β-actin* در جدول ۱ موجود است. توالی ژن‌های مورد نظر از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به دست آمد. سپس توسط سایت NCBI و نرم‌افزار Primer-BLAST اتصال پرایمرها به توالی‌ها بررسی شد و بعد از اطمینان از درست بودن، ساخت آن به شرکت ماکروژن سفارش داده شد.

واکنش PCR با دستگاه Bioneer exicycler 96 طبق پروتکل زیر انجام شد (جدول ۲). سپس منحنی ذوب و تکثیر رسم و مقادیر Ct به دست آمد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

نام ژن	توالی پرایمر (5'→3')	رفرنس
Bcl-2	F: 5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3' R: 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'	NM_000633.3
Bax	F: 5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' R: 5'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC-3'	NM_138761.4
β -actin	F: 5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3' R: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3'	NM_001101.5

جدول ۲- پروتکل واکنش Real- time PCR

Step	Function	Temprature (©)	Time	Reapeat
۱	INCUBATE	۹۵/۰۰	۰:۱۰:۰ دقیقه	۱
۲	INCUBATE	۹۵/۰۰	۰:۰:۲۰ ثانیه	۱
۳	INCUBATE	۶۲/۰۰	۰:۰:۴۰ ثانیه	۱
۴	SCAN			۱
۵	GO TO	Step 3		۴۰
۶	MELTING	62°C to 94°C, Every 1.0°C	۰:۰:۰۱ ثانیه	
۷	END			

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در تجزیه و تحلیل آماری از آزمون‌های استنباطی پارامتریک استفاده شد. آنالیز داده‌های Real time PCR به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. این روش نیازی به رسم نمودار استاندارد ندارد. کلیه واکنش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. قبل از انجام Real time PCR غلظت cDNA کلیه نمونه‌ها با نانودراپ یکسان‌سازی شدند. پس از انجام واکنش تغییرهای میزان بیان ژن، با استفاده از Ct به دست آمده با روش ΔΔCt و نرم‌افزار Rest2009 محاسبه شد. سپس تفاوت میزان بیان ژن‌های هدف در رده سرطانی، با نرم‌افزار Graphpad prism 6 با استفاده از متد One way ANOVA و t- test انجام و محاسبه شد. اطلاعات به صورت mean±standard deviation (SD) نمایش داده شده‌اند و ۰/۰۵ > P-value معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

عصاره‌گیری و سنتز نانوذرات سلنیوم

واکنش احیای محلول سلنیت سدیم در دمای اتاق پس از اضافه کردن عصاره خشک شده به محلول سلنیت سدیم انجام شد و تغییر رنگ به نارنجی، که نشان دهنده ساخت نانوذرات سلنیوم بود، بعد از دو ساعت رخ داد. محلول نارنجی رنگ حاصل، مورد آنالیز TEM، EDX و SEM قرار گرفت.

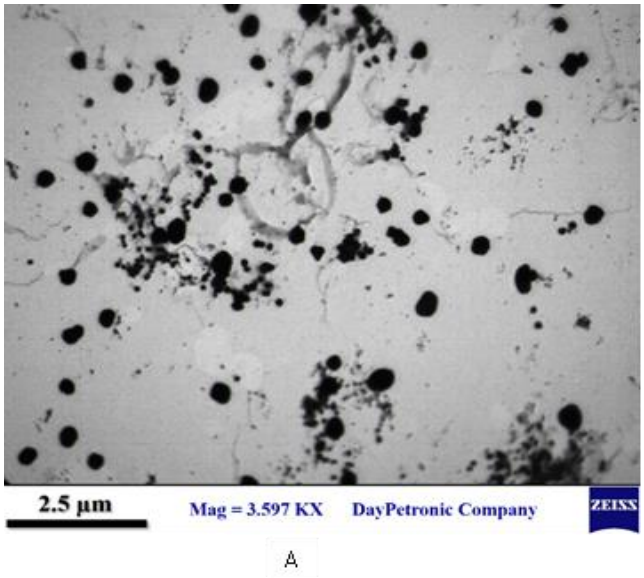
نتایج حاصل بررسی صحت سنتز نانوذرات سلنیوم

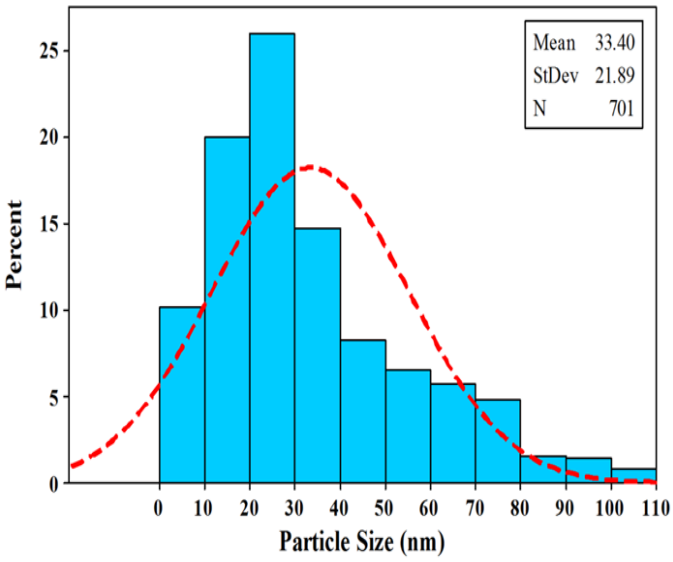
تست TEM و SEM

نتایج بررسی با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نشان داد که میانگین سایز نانوذرات ۳۳/۴۰ نانومتر است (شکل ۱). در شکل ۲A ساختار نانوذرات به خوبی قابل مشاهده است که به شکل کروی هستند.

نتایج حاصل از EDX

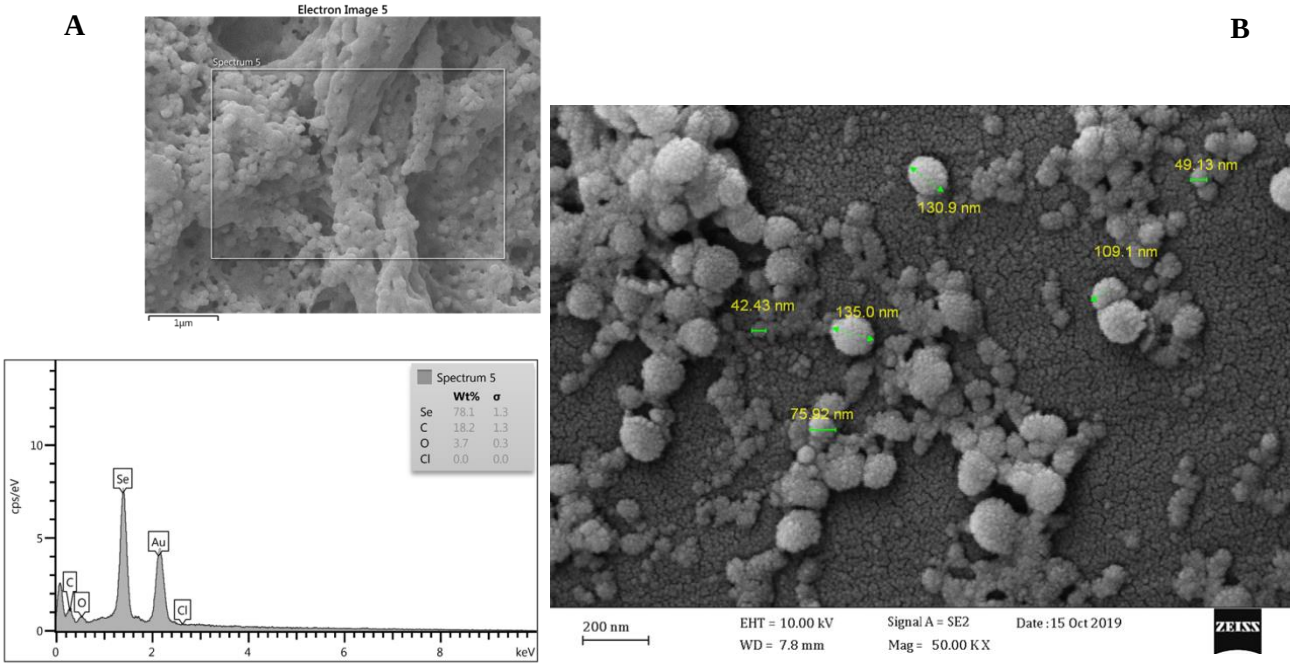
روش EDX وجود عنصر سلنیوم را در نانوذره سنتز شده با حضور ۷۸/۱ درصد از سلنیوم را نشان می‌دهد که بیانگر خلوص بالای نانوذره سنتز شده است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که برخی دیگر از عناصر نیز مانند C و O نیز به مقدار ناچیزی وجود دارند (شکل B ۲).





شکل ۱- شناسایی نانوذرات سلنیوم با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM).

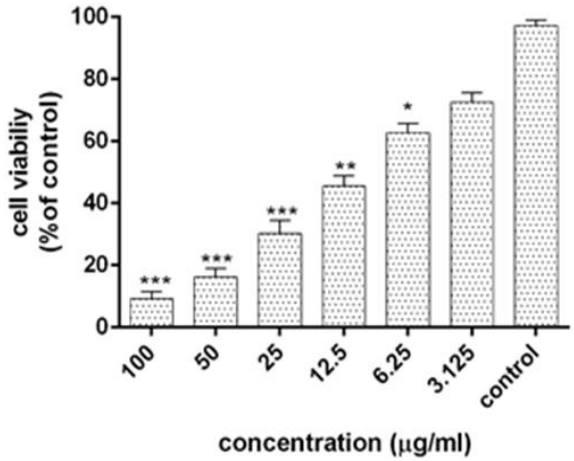
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]



شکل ۲- (A) تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نانوذرات سلنیوم سنتز شده؛ (B) نتایج حاصل از EDX که نشان می‌دهد که میزان عنصر سلنیوم ۷۸/۱درصد است.

تیمار سلول‌ها با نانوذرات سلنیوم به مدت ۲۴ ساعت

نتایج شکل ۳ و جدول ۳ نشان می‌دهند که میزان کشندگی نانوذره سلنیوم در غلظت‌های بالاتر از ۳/۱۲۵ µg/ml معنادار است. غلظت IC_{50} نانوذره سلنیوم پس از ۲۴ ساعت تیمار، ۶ µg/ml محاسبه شد. گروه کنترل، سلول‌های رده سلولی MCF-10 هستند که تحت تیمار با نانوذره قرار گرفتند. همان طور که در شکل ۳ مشخص است، به دلیل غیر سمّی بودن نانوذره سبز زنده باقی مانده‌اند. مقادیر به دست آمده بر اساس میانگین انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح P-value < ۰/۰۵ درنظر گرفته شده است.



شکل ۳- درصد بقای سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره سلنیوم نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است (*:P-value <0.05، **:P-value <0.01، ***P-value <0.001 :n=3).

جدول ۳- میزان توان زیستی سلول رده MCF-7 پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذره سلنیوم با روش MTT

۱۰۰ µg/ml	۵۰ µg/ml	۲۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۶/۲۵ µg/ml	۳/۱۲۵ µg/ml
۹/۲۷±۰/۹۳	۱۶/۳۶±۰/۶۹	۲۹/۹۳±۰/۱۲	۴۶/۱۵±۰/۷۷	۶۲/۷ ± ۰/۳۲	۷۲/۲ ± ۰/۴۹

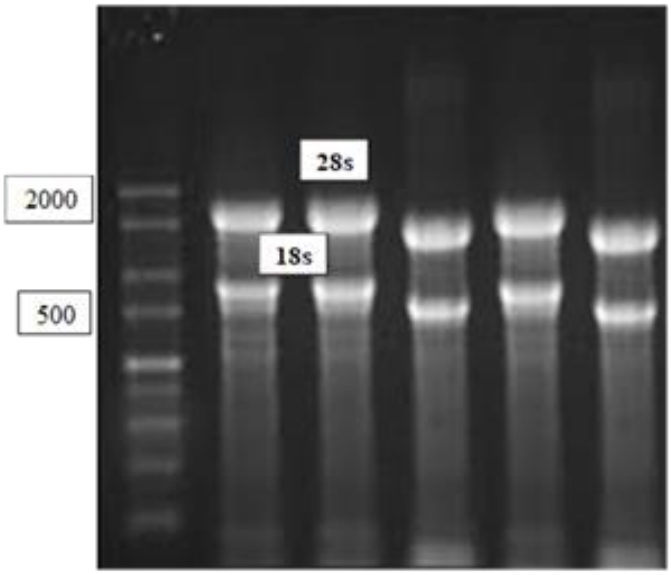
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

تعیین کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده

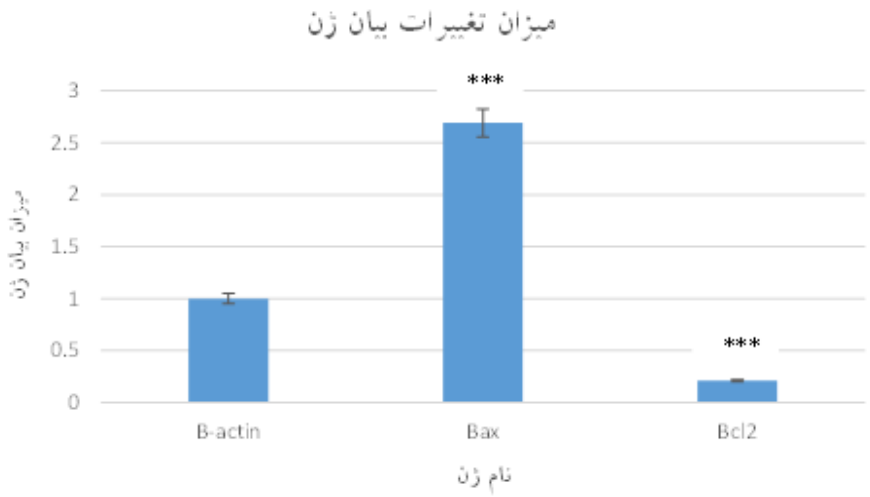
کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵درصد و کمیت آنها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل، دو باند ۱۸S و ۲۸S RNAی ریبوزومی به وضوح قابل مشاهده است که نشان می‌دهد که RNA تجزیه نشده است. غلظت RNA، ۲/۹۲۲ µg/ml به دست آمد (شکل ۴).

نتایج سنجش تغییرهای بیان ژن

پس از سنتز cDNA واکنش Real time PCR با پرایمرهای مربوط به ژن‌های *Bcl-2*، *Bax* و *β- actin* با سه بار تکرار انجام شد. تکثیر اختصاصی قطعه‌های ژنی مورد نظر، جفت نشدن پرایمرها و تکثیرنشدن قطعه‌های غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب بررسی و با استفاده از منحنی تکثیر Ct تعیین شد. میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* نسبت به ژن مرجع (*B-actin*) در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با نانوذره پس از ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان ۰/۳۱ ± ۲/۶۹ افزایش و ۰/۱۷± ۰/۲۱ کاهش یافت که از نظر آماری معنادار بود (نمودار ۱)، (P-value < ۰/۰۵).



شکل ۴- بررسی کیفی میزان RNA های استخراج شده از سلول‌های MCF-7 مجاور شده با غلظت IC50 نانوذره سلنیوم حاوی عصاره بابونه (لدر 100 bp).



نمودار ۱- تغییرهای میزان بیان ژن‌ها پس از تیمار با نانوذره سلنیوم حاوی عصاره گیاه (n=3 : P-value <0.001*).**

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، سنتز نانوذرات سلنیوم حاوی عصاره گیاه امکان‌پذیر بوده و توانستند میزان بیان ژن آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی را، به ترتیب، به طور معنادار افزایش و کاهش دهد. نکته قابل توجه این است که سلول‌های گروه کنترل با تیمار ۲۴ ساعته با نانوذرات سالم باقی ماندند که این امر نشان‌دهنده این است که این ماده اثر کشنده روی سلول‌های سالم ندارد. به تازگی گزارش‌های مختلفی از خاصیت ضد سرطانی و برخی دیگر از خواص نانوذرات سلنیوم منتشر شده است. امروزه توسعه نانوذرات به عنوان حاملین مؤثر دارو یا عصاره گیاهی، یک راهکار کم هزینه و سازگار با محیط زیست است (۱۰، ۱۱). گیاهان توانایی زیادی در سنتز محصولات فنلی دارند. این محصولات متابولیت‌های ثانویه هستند و به عنوان مکانیسم دفاع گیاه توسط میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کنند (۱۲).Gunti و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با استفاده از عصاره گیاه *Emblica officianlis* نانوذرات سلنیوم را سنتز و اثرهای ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن را بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانودات سنتز شده کروی و دارای اندازه‌ای بین ۱۵ تا ۴۰ نانومتر بودند. نانوذرات سلنیوم سنتز شده دارای اثرهای ضدسرطانی معناداری بوده و استفاده از آنها به عنوان آنتی اکسیدان در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد شد (۱۰). نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق پیشین همخوانی دارد. در تحقیق حاضر نیز نانوذرات سلنیوم کروی شکل بوده و خواص ضد سرطانی از خود نشان دادند. Alagesan و همکاران در سال ۲۰۱۹ بعد از سنتز نانوذرات سلنیوم با استفاده از عصاره گیاه *Withania somnifera* اثرهای بیولوژیکی آن را مطالعه کردند. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، اندازه نانوذرات سنتز شده ۴۵ تا ۹۰ نانومتر گزارش شد و نتایج تست EDX، خلوص بالای آن را نشان داد. دیگر یافته‌های تحقیق ثابت کرد که این نانوذرات سنتز شده دارای اثرهای ضد میکروبی و ضد سرطانی معنادار روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) است (۱۳). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق Alagesan و همکاران از نظر شکل نانوذرات سلنیوم و خواص ضد سرطانی آن روی رده سلولی MCF-7 مطابقت دارد.

Sowndarya و همکاران در سال ۲۰۱۶، مطالعه‌ای در مورد اثر نانوذرات سلنیوم (SENPS) حاوی عصاره برگ گیاه *Clausena dentate* بر روی لاروهای سن چهارم پشه‌های *Anopheles stephensi, Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus* که ناقل اصلی بسیاری از بیماری‌ها مانند چیکونگوین، مالاریا، دنگی، زیکا و ... هستند، انجام دادند. نتایج نشان داد که لاروها در اثر تیمار با نانوذرات سبز به میزان قابل توجهی از بین رفته‌اند. بنابراین می‌توان به پتانسیل SENPS حاوی عصاره برگ گیاه *C. dentate* به عنوان یک روش ایده‌آل برای کنترل لارو پشه‌های ناقل بیماری امیدوار بود (۱۴). هر چند که در تحقیق حاضر تأثیر نانوذرات روی لارو پشه‌ها بررسی نشده است، اما قابلیت نانوذرات سلنیوم در از بین بردن لارو حشرات بیماری‌زا و القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌تواند نوید بخش استفاده از این نانوذره در ریشه‌کن کردن بیماری‌ها باشد و از این نظر مطابق با تحقیق پیشین است. دی ناپولی و همکاران در سال ۲۰۲۰ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره *Anthemis secundiramea* را بررسی کرده و نشان دادند که روغن حاصل از گل‌های این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی است و از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند. عصاره گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف مثل CAT، SOD و GPX می‌شود. (۱۵). در تحقیق دی ناپولی و همکاران اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی یکی از گونه‌های جنس بابونه نشان داده شده است. از آنجا که ترکیب‌های آنتی اکسیدان خواص ضد سرطانی دارند، می‌توان نتایج تحقیق حاضر را از نظر القای مرگ در سلول‌های سرطانی MCF-7 مطابق با نتایج تحقیق پیشین دانست. امجد و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثر عصاره متانول گل و برگ گیاه *Anthemis gayana* را روی *Candida* Spp بررسی کردند. عصاره متانولی گل و برگ *Anthemis gayana* بر *Candida glabrata* cbc 2175، *Candida albicans* ATCC62061 و ATCC 1677 مؤثر بود، اما تأثیر بیشتری روی مهار *کاندیدا پاراپسیلوزیس* داشت. نتایج نشان داد که عصاره متانولی گل و برگ *Anthemis gayana* قادر به مهار تعداد زیادی از قارچ‌های بررسی شده با درجه مهار متفاوت بود. بنابراین،

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

تغییرهای قابل توجهی از اثر ضد قارچی بین قارچ‌های مؤثر و نمونه شاهد وجود داشت (۱۲). در تحقیق امجد و همکاران اثر ضد قارچی یکی دیگر از گونه‌های جنس بابونه نشان داده شده است. نتایج این دو تحقیق از نظر وجود ترکیب‌هایی در بابونه که خواص ضد قارچی و ضد سرطانی دارند، قابل مطابقت است. براداویل و همکاران در سال ۲۰۱۴، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی *Anthemis palestina* را روی شش گونه از باکتری‌های گرم مثبت و منفی و فعالیت ضد قارچی آن را روی گونه‌های *Candida* بررسی کردند. همچنین اثر ضد سرطانی گیاه روی هشت رده سلولی انسانی مطالعه شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه *Anthemis palestina* دارای اثر ضد باکتری، ضد قارچی و ضد تکثیر در سلول‌های سرطانی است و می‌تواند به عنوان یک ترکیب فعال برای کاربردهای تغذیه‌ای، پزشکی و آنتی‌اکسیدانی استفاده شود (۱۶). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که نانوذرات سلنیوم در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ µg/ml دارای آثار سمیت سلولی معناداری در رده سلولی MCF-7 می‌باشد و از نظر وجود ترکیب‌های ضد سرطان در دو گونه مختلف بابونه، مطابق با نتایج مطالعه پیشین است. نصرالله زاده و همکاران در سال ۲۰۱۵ سنتز نانوذرات مس حاوی عصاره آبی گل‌های *Anthemis nobilis* را بررسی کردند و از مس به عنوان یک عامل کاهنده و تثبیت کننده در واکنش جفت آلدهید-آمین-آلکین استفاده کردند. آنها صحت سنتز نانوذرات مس سنتز شده را با FTIR، XRD، EDS، SEM و اشعه ماورا بنفش بررسی کردند (۱۷). نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیق نصرالله‌زاده همخوانی دارد. چرا که سنتز سبز نانوذرات سلنیوم به دلیل خاصیت احیاکنندگی عصاره گیاه بابونه انجام شد و صحت سنتز آن با روش‌های مختلف تأیید شد. جاسبی و همکاران در سال ۲۰۱۶، میزان کشندگی عصاره گیاه *Anthemis xylopoda* را روی رده سلولی LS180، MCF-7 و MOLT-4 بررسی کردند. از تمام بخش‌های گیاه توسط دی کلرو متان و متانل عصاره‌گیری و سپس کروماتوگرافی انجام شد. نتایج کروماتوگرافی وجود ترکیب‌های تاراکساسترول، سودوتاراکساسترول، ۱- استرول بی-سیتوسترول و ۱- کومارین ۷- متوکسی کومارین را گزارش کرد. نتایج نشان داد که عصاره دی کلرو متان بیشترین کشندگی را در تیمارهای بررسی شده دارد (۱۸). نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیق جاسبی و همکاران مطابقت دارد. چون در مطالعه حاضر نشان داده شد که نانوذرات سلنیوم سنتز شده دارای آثارسمیت سلولی معنادار روی رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 است. در مطالعه حاضر نیز سمیت وابسته به دوز مشاهده شد به طوری که در غلظت ۱۰۰ µg/ml میزان بقای سلول‌ها به طور معناداری کاهش یافته بود. اینومتی و همکاران در سال ۲۰۲۰ میزان کشندگی نانو ذرات سلنیوم را روی رده سلولی HEPG2 با روش MTT بررسی کردند. در نتیجه، فعالیت سیتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم روی رده سلولی HEPG2 و قابلیت استفاده از آن به دلیل فعالیت ضد میکروبی و ایمن بودن گزارش شد (۱۹). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که نانوذرات سلنیوم می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار کنند و از این جهت با نتایج مطالعه پیشین مطابقت دارد. کانچی و همکاران در سال ۲۰۲۰ با سنتز نانوذره سلنیوم حاوی عصاره قارچ خوراکی، اثر آن را روی رده سلولی سرطان پروستات بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات 8nm قطر دارند و کروی هستند. نانوذرات سبز EME-SENPS در غلظت‌های pM ۱/۵- ۰.۵، هیچ سمیت سلولی در رده سلولی سرطان پروستات (PC3) نشان ندادند (۲۰). نتایج مطالعه پیشین با نتایج مطالعه حاضر از این نظر که هر دو مطالعه توانستند اثر مهاری نانوذرات سبز سلنیوم در رشد سلول‌های سرطانی را نشان دهند، همخوانی دارد. محمد و همکاران در سال ۲۰۲۰ ترکیب‌های فعال موجود در عصاره قسمت رویشی بابونه *Anthemis nobilis* را بررسی کردند. مواد اصلی شیمیایی در قسمت رویشی شامل فنل‌های متعدد، آلکالوییدها ، گلیکوزیدها، تانن ها، فلاونوییدها، ساپونین‌ها بودند (۲۱). Chigozie و همکاران روغن ضروری برگ *Anthemis murica* را از سه طریق فیتوشیمیایی، مواد معدنی و اجزای تشکیل‌دهنده آن در سال ۲۰۱۸ بررسی کردند. در تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی کیفی حضور آلکالوییدها، کربوهیدرات، فلاونویید، تانن‌ها، استروییدها، ترپنوییدها، گلیکوزید، ساپونین و اسید کارباکسیلیک را نشان داد (۲۲). نتایج دو مطالعه پیشین از این نظر با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد که عصاره گیاه بابونه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

به دلیل داشتن محتوای فلاونوییدی و تروپنوییدی، آثار ضد سرطانی دارد. Liao و همکاران اثر ضد سرطانی نانوذرات سلنیوم را در سرطان پروستات بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانو ذرات سلنیوم توانستند که چرخه سلولی و رشد سلول‌های سرطان پروستات را متوقف کنند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیق Liao و همکاران، از این نظر که نانوذرات سلنیوم خاصیت مهار سلول‌های سرطانی را دارند، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که نانوذره سلنیوم حاوی عصاره *Anthemis atropatana*، می‌تواند میزان بیان ژن آپوپتوزی *Bax* را به طور معنادار افزایش و میزان بیان ژن ضد آپوپتوز *Bcl-2* را به طور معنادار کاهش دهد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1399.103 ثبت شده است

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم حدیث طوسی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق بود.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

References

1. Dolatkhah R, Hosseinalifam M, Sanaat Z, Dolatkhah N, Dastgiri S. Molecular Epidemiology of Breast Cancer in Iran: A Review Article. Journal of Obstetrics, Gynecology and Cancer Research. 2023;8(5):422-430.

2. Nur Gokbayrak Atay İ, Genzer AH, Kasap E. The Importance of Apoptosis in Cancer Development and Treatment. Turkish Journal of Oncology. 2021;36(3):381–88.

3. Saddam M, Paul SK, Habib MA. Emerging biomarkers and potential therapeutics of the BCL-2 protein family: the apoptotic and anti-apoptotic context. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2024; 25:12.

4. Abd-Elhamid R, Nazmy MH, Fathy M. Targeting Apoptosis as a Therapeutic Approach in Cancer. Malaysian Journal of Medical Research. 2020;31(2):321-334.

5. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. Frontiers in Oncology. 2022; 12:985363.

6. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death and Disease. 2019;10(3):177.

7. Hussar P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia*. 2022; 2(4):1624-1636.

8. Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. International Journal of Nanomedicine. 2018; 13:2107-2128.

9. Maioli E, Torricelli C, Fortino V, Carlucci F, Tommassini V, Pacini A. Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. Biological Procedures Online. 2009; 11 (1).

10. Gunti L, Dass RS, Kalagatur NK. Phytofabrication of Selenium Nanoparticles from Emblica officinalis Fruit Extract and Exploring Its Biopotential Applications: Antioxidant, Antimicrobial, and Biocompatibility. Frontiers in Microbiology. 2019;30(10):931.

11. Wadhwani SA, Gorain M, Banerjee P, Shedbalkar UU, Singh R, Kundu GC, Chopade BA. Green synthesis of selenium nanoparticles using Acinetobacter sp. SW30: optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells. International Journal of Nanomedicine. 2017;13(12): 6841-6855.

12. Amjad L, Rezvani Z, Madani M. The effect of Methanolic Extract of Anthemis Gayana on Candida spp. Indian Journal of Advances in Chemical Science. 2013;5(10):1140-1144.

13. Alagesan V, Venugopal S. Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of Withania somnifera and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities. BioNanoScience.2019;9:105–116.

14. Sowndarya P, Ramkumar G, Shivakumar MS. Green synthesis of selenium nanoparticles conjugated Clausena dentata plant leaf extract and their insecticidal potential against mosquito vectors. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.2016;45(8):1490–1495.

15. Di Napoli M, Maresca V, Varcamonti M, Bruno M, Badalamenti N, Basile A, et al. (+)-(E)-Chrysanthenyl Acetate: A Molecule with Interesting Biological Properties Contained in the Anthemis secundiramea (Asteraceae) Flowers. Applied Sciences.2020; 10(19):6808.

16. Bardaweel SK, Tawaha KA, Hudaib MM. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of Anthemis palestina essential oil. BMC Complementary Medicine and Therapies. 2014;12(14):297.

17. Nasrollahzadeh M, Mohammad Sajadi S, Rostami-Vartooni A. Green synthesis of CuO nanoparticles by aqueous extract of Anthemis nobilis flowers and their catalytic activity for the A^3 coupling reaction. Journal Colloid Interface Science. 2015;1(459):183-188.

18. Jassbi AR, Firuzi O, Miri R, Salhei S, Zare S, Zare M, et al. Cytotoxic activity and chemical constituents of Anthemis mirheydari. Pharmaceutical Biology. 2016;54(10):2044-2049.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]

19. Indumathy M, Raj SS, Arumugham IM, Kumar RP. Assessment of Toxicity of Selenium Nanoparticle Varnish Using HepG2 Cell Lines: In vitro Study. Journal of Pharmaceutical Research International. 2020;32: 33-39.

20. Kanchi S, Inamuddin, Khan A. Biogenic Synthesis of Selenium Nanoparticles with Edible Mushroom Extract: Evaluation of Cytotoxicity on Prostate Cancer Cell Lines and Their Antioxidant, and Antibacterial Activity. Biointerface Research in Applied Chemistry.2020;10(6):6629–6663.

21. Mohammed IH, Hameed AT, Salman HF. Phytochemical and Biological of Anthemis nobilis (Asteraceae family) a Native Herbs of Iraq. Systematic Reviews in Pharmacy. 2020;11(2):458-461.

22. Chigozie O, Francis A, Austine U. J Assessment of Mineral and Essential Oil Composition of Anonna Muricata Leaves. Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2018;4(1):41-49.

23. Liao G, Tang J, Wang D, Zuo H, Zhang Q, Liu Y, et al. Selenium nanoparticles (SeNPs) have potent antitumor activity against prostate cancer cells through the upregulation of miR-16. World Journal Surgery Oncology. 2020;18(1):81.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-20]