**مقاله علمی پژوهشی**
مجله دوفصل نامه
**مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی**
**ISSN 2588-5073** چاپی
**ISSN 2588-5081** الکترونیکی online
**دوره ۱۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳**
**صفحه ۲۵۵-۲۴۶**

Research Article
**Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025**
Volume 13, Number 2, Pages: 246-255

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.13.2.4

# تاثیر مهار اینترلوکین ۶ به همراه داروی دوکسوروبیسین بر بیان ژنهای BIM, BAX, Bcl-2 در سرطان سینه

# The Effect of Inhibition of Interleukin 6 along with the Drug Doxorubicin on BIM, BAX and Bcl-2 Gene Expression in Breast Cancer

مهسا نیکدل خسروشاهی[۱]، فرهاد جدیدی نیارق[۲]، سیمین نامور آغداش *[۱]

**Mahsa Nikdel Khosroshahi[1], Farhad Jadidi Niaragh[2], Simin Namvar Aghdash[1*]**

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

1. Department of biology, Faculty of basic seinces, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Depatment of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences. Iran

*Corresponding Author, Email: نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: siminnamvar2@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۶/۱۳)

Received: 2024/12/28 | Accepted: 2025/03/01 | Published: 2025/09/04

## چکیده

## Abstract

Despite current treatments such as chemotherapy, many people around the world still die from breast cancer disease every year, which is mainly due to drug resistance in breast tumor cells and tumor recurrence. Also, the side effects caused by chemotherapy drugs are sometimes very severe, and it is necessary to reduce the required dose of these drugs with different methods. Interleukin 6 (IL-6) is one of the molecules that play a significant role in the development of breast cancer and drug resistance in breast tumor cells, and its inhibition can help in the treatment of this malignancy. Doxorubicin (DOX) is one of the common chemotherapy drugs that prevents tumor progression by interfering with DNA replication and transcription. In the present study, chitosan lactate (CL) nanoparticles were used for simultaneous delivery of DOX and anti-IL-6 siRNA molecules to 4T1 mouse breast cancer cells. Nanocarriers protect the drug from degradation and increase its half-life in the bloodstream and increase the solubility of hydrophobic drugs. Also, by specifically targeting the tumor, these carriers increase the drug concentration at the tumor site and reduce the toxicity of the drugs for other normal cells of the body. CL nanoparticles were synthesized by "ionic gelation" method. After evaluating the characteristics, the CL nanoparticles and CL+DOX, CL+siRNA and CL+DOX+siRNA formulations, as well as free DOX, were transferred to cultured 4T1 cells. Then, their effects on this cell line were investigated. Among these evaluations, MTT, CAM, scratch test, colony formation test, evaluation of related gene expression and measurement of interleukin-6 protein levels can be mentioned. The results showed that CL + DOX + siRNA nanoparticles have the highest toxicity and inhibitory effect on 4T1 cancer cells, compared to when each of the nanoparticles containing siRNA and DOX and DOX were applied separately. Also, the combined treatment significantly reduced the angiogenesis rate and the size of the tumors created by 4T1 cells. Therefore, based on these results, it can be resulted that CL nanoparticles loaded with DOX and anti-IL-6 siRNA can be considered as an effective formulation in the treatment of breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, IL-6, siRNA, Doxorubicin, 4T1 cell line

**رفرانس دهی این مقاله Citation**

Nikdel Khosroshahi M, namvar aghdash S, Jadidi Niaragh F. (2025). The Effect of Inhibition of Interleukin 6 along with the Drug Doxorubicin on BIM, BAX and Bcl-2 Gene Expression in Breast Cancer. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (2): 246-255. Doi: 10.61882/gebsj.13.2.4
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 13, Number 2, 2025**

**خلاصه**

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در زنان می‌باشد. با وجود درمان‌های در دسترس مانند شیمی‌درمانی، همچنان در هر سال افراد زیادی در سراسر جهان، جان خود را بر اثر این بیماری از دست می‌دهند که دلیل اصلی آن، مقاومت دارویی در سلول‌های توموری سینه و برگشت مجدد تومور می‌باشد. همچنین عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمی‌درمانی در برخی موارد، بسیار شدید بوده و باید با روش‌های مختلف مانند درمان ترکیبی و استفاده از درمان‌های هدفمند، مقدار مورد نیاز این داروها کاهش یابد. سایتوکاین اینترلوکین ٦ (IL-6) یکی از مولکول‌هایی است که در پیشرفت سرطان سینه و تقویت مقاومت دارویی در سلول‌های توموری سینه نقش زیادی دارد و مهار آن می‌تواند در درمان این بدخیمی کمک‌کننده باشد. دوکسوروبیسین (DOX) یکی از داروهای شیمی‌درمانی رایج می‌باشد که با تداخل در همانندسازی و رونویسی DNA از پیشرفت تومور جلوگیری می‌کند. در مطالعه حاضر از نانوذرات کیتوزان لاکتات (CL) برای تحویل همزمان DOX و مولکول RNA کوچک مداخله‌گر (siRNA) ضد IL-6 به سلول‌های سرطان سینه موشی 4T1 استفاده شد. نانوحامل‌ها از دارو در برابر تخریب محافظت کرده و باعث افزایش نیمه عمر آن در جریان خون و نیز افزایش حلالیت داروهای آبگریز می شوند. همچنین این حامل‌ها با هدف‌گیری خاص تومور باعث افزایش غلظت دارو در محل تومور و نیز کاهش سمیت داروها برای سایر سلول‌های طبیعی بدن می‌شوند. نانوذرات CL به روش«ژل شدن یونی» تولید شدند. این نانوذرات در فرمولاسیون‌های CL، CL+DOX، CL+siRNA و CL+DOX+siRNA و همچنین DOX به صورت آزاد، به سلول‌های رده 4T1 کشت داده شده، منتقل شدند. سپس، اثرهای آن‌ها بر روی این رده سلولی بررسی شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش با استفاده از RT-PCR نشان داد که فرمول CL+DOX+siRNA بیشترین اثر مهاری را بر روی سلول‌های سرطانی 4T1، درمقایسه با کاربرد جداگانه‌ی هریک از نانوذرات حاوی siRNA و DOX و نیز DOX به صورت آزاد، دارد. زیرا سبب افزایش معنی دار mRNA ژن های BIM,BAX می‌شود که محصولات این ژن‌ها پیش‌برنده آپوپتوز هستند. همچنین سبب کاهش معنی دار mRNA ژن Bcl-2 می‌شود که محصول این ژن خاصیت ضد آپوپتوزی دارد. بنابراین براساس این نتایج می‌توان گفت که نانوذرات CL بارگیری شده با DOX و siRNA ضد IL-6، احتمال دارد بتواند به عنوان یک روش موثر در درمان سرطان سینه مورد توجه قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی**: سرطان سینه، اینترلوکین ٦، RNA کوچک مداخله‌گر، دوکسوروبیسین، رده سلولی 4T1

## Introduction

**مقدمه**

سرطان سینه (Brest Cancer: BC)، شایع‌ترین نوع سرطان در زنان بوده و در لوبول‌های سینه، لوله‌ها یا بافت همبند ایجاد می‌شود (Park et al. 2022). در سال ۲۰۲۰، تعداد ۲/۳ میلیون زن در سراسر جهان به سرطان سینه مبتلا شدند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند در سال‌های گذشته، سرطان سینه با پیشی گرفتن از سرطان‌های ریه و پروستات، تبدیل به شایع‌ترین سرطان در جهان تبدیل شده است (Bray et al. 2022; Sung et al. 2021; Grady et al. 2021; Mayrovitz et al. 2021). براساس آمارها، در ایالات متحده میزان شیوع سرطان سینه در بیشتر سال‌های چهار دهه گذشته روند افزایشی داشته است (Cao et al. 2021; Giaquinto et al. 2022).

رده‌ی سلولی تومور پستانی موشی 4T1، یکی از نادرترین مدل‌های سرطان سینه است که توانایی متاستاز دادن مؤثر به محل‌هایی را دارد که در سرطان سینه انسان تحت تاثیر قرار می‌گیرند. این رده سلولی سرطان سینه در ابتدا توسط فرد میلر و همکارانش در موسسه سرطان کارمانوس جدا شد و استفاده از آن در سال‌های گذشته، به دلیل تمایل زیاد آن به متاستاز به استخوان و سایر جاهای بدن افزایش یافته است. رده سلولی 4T1، از یک تومور پستانی به نام BALB/c که به طور خودبه خودی ایجاد می‌شود، گرفته شده است. وقتی 4T1، به صورت ارتوتوپیک



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

(یعنی در محل طبیعی خود) القا شود، قادر به متاستاز به چندین اندام دیگر (مانند ریه، کبد، مغز و همچنین استخوان) می‌باشد. سلول‌های 4T1، به شدت و به طور تهاجمی رشد می‌کنند و حتی پس از برداشتن تومور اولیه نیز سبب یک بیماری کشنده می‌شوند (Tao et al. 2008; Gao et al. 2011). یکی دیگر از مزیت‌های سلول‌های 4T1، مقاومت آن در برابر ٦-تیوگوانین است. این ویژگی امکان کمی‌سازی دقیق سلول‌های متاستاتیک را فراهم می‌کند، حتی زمانی که در اندام‌های دور منتشر شده و در سطوح زیر میکروسکوپی هستند (Pulaski et al. 2000).

اینترلوکین-٦، سبب فراخوانی سلول های ایمنی به ریز محیط تومور می شود و سبب تحریک تولید سیتوکین‌های اضافی التهابی می‌شود. اینترلوکین-٦، به عنوان یک رابط اصلی بین التهاب مزمن و پیش آگهی تومور عمل می‌کند (Masjedi et al. 2018). داده‌های حاصل از بررسی‌های بالینی مشخص کرده‌اند که پیام‌رسانی از طریق اینترلوکین-٦، نقش مهمی در پیشرفت تومور دارد (Masjedi et al. 2020) .

دوکسوروبیسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوزیدی است که از چهارحلقه‌ی مسطح و یک قند آمینه تشکیل شده است (Rivankar et al.2014; Wallace et al. 2020). DOX با تداخل در همانندسازی و رونویسی DNA از پیشرفت تومور جلوگیری می‌کند. DOX تکثیر DNA را از طریق ساز و کارهای متعدد، از جمله جای‌گیری در DNA، تداخل با باز شدن DNA یا جداسازی رشته DNA و فعالیت هلیکازی، بیرون راندن هیستون از کروماتین باز و مهار توپوایزومراز II (Top2)، مهار می‌کند (Chen et al. 2022). ساز و کار دقیق اثر دوکسوروبیسین پیچیده و تا حدی نامشخص است. دوکسوروبیسین از طریق نفوذ و جای‌گیری، با DNA برهم‌کنش می‌دهد. بنابراین بیوسنتز مولکول‌های بزگ را مهار می‌کند (Malky et al. 2020). هنگامی که DOX روی سلول‌های تومور اثر می‌کند، قسمت حلقه مسطح این دارو در DNA قرار می‌گیرد و یک کمپلکس سه‌تایی DOX -DNA-TOP2α را تشکیل می‌دهد که از تکثیر DNA و فعالیت توپوایزومراز II جلوگیری می‌کند و منجر به تجمع شکست‌های دو رشته‌ای DNA می‌شود (Wallace et al. 2020).

سازوکار دیگر دوکسوروبیسین-HCl، توانایی آن در تولید رادیکال‌های آزاد است که سبب آسیب به DNA و غشای سلولی (اثر ضد تومور از طریق استرس اکسیداتیو) می‌شود (Wallace et al. 2020; Malky et al. 2020). با این حال، DOX باعث ایجاد سمیت کلیوی، سمیت کبدی، آلوپسی، سرکوب مغز استخوان، مه مغزی و سایر عوارض جانبی سمی در حین درمان سرطان می‌شود و جدی‌ترین واکنش جانبی آن ، سمیت قلبی می‌باشد. DOX پس از سوخت‌وساز در داخل بدن، به میزان زیادی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید می‌کند که از طریق سازوکار پیچیده و مختلف، باعث مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، می‌شود و سبب بروز آسیب قلبی می‌شود. علاوه بر سمیت‌های ناخواسته‌ای که در بالا اشاره شد، مشکل اصلی دیگری که در درمان سرطان با دوکسوروبیسین وجود دارد، ایجاد مقاومت در سلول‌های سرطانی در برابر این داروی شیمی‌درمانی است (Malky et al. 2020).

همان‌طور که می‌دانیم، سلول‌های سرطانی بعد از تولیدشدن با ایجاد تغییراتی در روند طبیعی چرخه سلولی سبب تغییر در مسیر طبیعی مرگ سلولی می‌شوند. بنابراین سلول به سمت نامیرایی و تکثیر بی‌نهایت می‌رود. با توجه به موارد گفته شده در این مطالعه، سه عامل مربوط به آپوپتوز سلولی مورد برررسی قرار گرفت که شامل عامل پیش‌آپوپتوز و هم عامل ضدآپوپتوز می‌باشد. براساس گزارش‌های ارائه شده، زمانی که دی هیدروآرتمیزینین با تیمار داده می‌شود مسیر آپوپتوزی سلول‌های سرطانی دچار تغییر می‌شود که درنهایت سبب افزایش مرگ سلول-های سرطانی و کاهش تکثیر و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی می‌شود (Mao H et al. 2013; Ye Z et al. 2016).

در این پژوهش، تاثیر مهار اینترلوکین- ٦ در رده سلولی 4T1 در موش، در بیان ژن‌های مربوط به پیش آپوپتوز (BIM,BAX) و ضد آپوپتوز (Bcl-2) مورد بررسی قرار گرفت.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

## مواد و روش‌ها
## Materials and Methods

**کشت سلولی:** سلول‌های رده سلولی 4T1 به صورت منجمد از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و سپس فرایند انجمادزدایی در آزمایشگاه بر روی آن‌ها انجام گرفت. به منظور کشت این سلول‌ها نیز از محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ( Fetal bovine serum) و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) و پنی‌سیلین (۱۰۰ µg/mL) استفاده شد. کشت سلول‌ها در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد $CO_2$ و ۹۵ درصد رطوبت انجام شد.

محیط کشت RPMI-1640 به شکل پودری و حاوی L–گلوتامین و فاقد بیکربنات سدیم می‌باشد (Masjedi et al. 2020). جهت تهیه یک لیتر از این محیط کشت، مقدار ۱۰/٤ گرم از پودر RPMI-1640 حاوی L–گلوتامین به همراه ۲ گرم سدیم بیکربنات در یک لیتر آب مقطر حل شده و به مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد روی هیتر استیرر قرار گرفت. پس از حل شدن کامل پودر، pH محلول در محدوده ۱/۲–۷/۷ تنظیم شد. در مرحله بعد و پس از فیلتراسیون محلول، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک 100X استرپتومایسین و پنی‌سیلین به آن اضافه شد. محیط کشت آماده شده، تا زمان استفاده در دمای ٦–۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**پروتکل شمارش سلولی:** به منظور شمارش سلول‌های مورد نظر در مراحل مختلف انجام این پژوهش، از لام شمارش سلول *نئوبار* و محلول رنگی تریپان بلو (Trypan blue) استفاده شد. لام نئوبار یک لام ضخیم و دارای ۲ محفظه است که هر کدام حاوی ۹ مربع هستند و با خطوط افقی و عمودی به صورت مشبک درآمده‌اند. پروتکل شمارش سلولی به این صورت است که تعداد سلولها در چهار مربع که خود نیز از ١٦ خانه کوچکتر تشکیل شده‌اند شمارش شده و سپس میانگین آنها محاسبه می‌شود. تریپان بلو نیز رنگی است که غشای سلول‌های زنده به این رنگ اجازه عبور نمی‌دهد اما در مقابل، غشای سلولهای مرده توانایی خارج کردن این رنگ حیاتی از سیتوپلاسم خود را ندارند؛ نتیجه آن می‌شود که سلول‌های مرده به رنگ آبی درآمده و سلولهای زنده رنگ نمی‌گیرند و به این ترتیب این دو نوع سلول از هم متمایز می‌شوند.

**تیمار سلول‌ها:** سلول‌های داخل پتری دیشی با سطح ۰/۳۲ سانتی متر مربع کشت داده شده (با تراکم سلولی ١٠٤×۵ سلول به ازای هر چاهک) و به صورت اوورنایت (۳۷ درجه سانتی‌گراد،۵ درصدCO2) انکوبه شدند. پس از آن، سلول‌ها در معرض نانوذرات بارگیری شده با (دوکسورودوبسین ۱۰۰ نانومولار) و ( IL-6-siRNA ۸۰ پیکومول) قرار گرفته و مجددا به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. برای بررسی زنده ماندن و پایداری زیستی سلول‌ها پس از تیمار از تست MTT استفاده شد که نتایج این تست آورده نشده است. تمام مراحل فوق با نانوذرات کیتوزان لاکتات فاقد siRNA/DOX، siRNA/DOX بدون کیتوزان، انجام گرفت. علاوه بر این سه چاهک نیز به عنوان بلانک بودند که به آن‌ها فقط محیط کشت اضافه شد. نرخ پایداری زیستی سلولی با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

**نرخ پایداری زیستی سلولی (٪) = (پایداری زیستی MTT تیمار شده/ پایداری زیستی MTT کنترل) × ۱۰۰**

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** برای هر یک از چاهک‌ها یک فالکون ۱۵ در نظر گرفته شد و نام گذاری گردید. ابتدا کل محیط رویی چاهک‌ها به فالکون مربوط به خودش ریخته شد و با دور۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی سلول ها بیرون ریخته شد و رسوب باقی مانده در یک میلی لیتر از محلول (RNXTM –PLUS ice cold) به خوبی حل شده و محلول یکنواخت گردید (۱۰ ثانیه ورتکس). پس از آن، محلول به دست آمده به چاهک‌های مربوطه انتقال داده شده و به مدت ۲۰ دقیقه و با دور آرام بر روی دستگاه شیکر قرار داده شدند.

پس از اتمام زمان مورد نظر، محتویات موجود در فالکون‌ها به داخل میکروتیوبی که عاری از آنزیم نوکلئاز بود انتقال یافت و به آن‌ها مقدار۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. با سر و ته نمودن، محلول با کلروفرم مخلوط گردید و سریعاً تیوب مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در درون یخ قرارداده شد. پس از اتمام مدت زمان ۵ دقیقه، تیوب‌ها مجدداً در سانتریفوژ یخچال دار با دور۱۳۰۰۰ rpmx و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

پس از انجام فرایند سانتریفوژ، محلول در داخل میکروتیوب ها به سه فاز تقسیم گردید؛ که این فازها از پایین میکروتیوب به بالا به ترتیب شامل محلول زرد رنگ، یک مرز شیری رنگ، محلول بی‌رنگ و شفاف بودند. فقط مایع شفاف و بی‌رنگ را به آرامی با سرسمپلر عاری از آنزیم نوکلئاز برداشته و به داخل یک میکروتیوب عاری از آنزیم نوکلئاز انتقال داده و دو برابر حجم مایع جمع‌آوری شده به آن اتانول مطلق اضافه شد و به سرعت با سر و ته نمودن میکروتیوب، محلول مورد نظر به حالت یکنواخت درآمد و سپس میکروتیوب‌ها به یخچال با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

برای ادامه کار، میکروتیوب ها در سانتریفوژ یخچال‌دار با دور۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و پس از اتمام فرایند سانتریفوژ، مایع رویی میکروتیوب را بیرون ریخته و رسوب سفید رنگ حاصل از سانتریفوژ را در یک میلی لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد حل نموده و پس از چند ثانیه ورتکس نمودن، میکروتیوب را در سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، سانتریفوژ شد؛ مجددا محلول رویی موجود در میکروتیوب بیرون ریخته شد و میکروتیوب به صورت در باز (جهت حذف کامل الکل از میکروتیوب) در در دمای نرمال آزمایشگاه قرار داده شد. در انتها، رسوب داخل میکروتیوب را در ۳۵۰ میکرو لیتر آب عاری از نوکلئاز به خوبی حل نموده و سپس در دستگاه Dray pass در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادیم تا محلول شفاف که همان RNA است، بدست آید. به منظور تعیین غلظت و مقدار RNA تام از روش طیف سنجی نوری استفاده شد.مولکول‌های RNAی استخراج شده با استفاده از کیت رونویسی معکوس شرکت BioFACT به صورت cDNA رونویسی گردیدند. به هرمیکروتیوب عاری از آنزیم نوکلئاز، ۱ تا ۸ میکرولیتر از RNA استخراج شده (با توجه به غلظت آن) و ۱۲ میکرولیتر از مستر میکس (که حاوی ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، oligo-d(T) و random hexamer و ۱۰ میکرولیتر آنزیم موجود در کیت بود) ریخته و سپس حجم هر میکروتیوب را با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و این ترکیب در حد چند ثانیه سانتریفوژ گردید. تمام مراحل ذکر شده روی یخ انجام پذیرفت. تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سرانجام برای پایان دادن به واکنش ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بر روی میکروتیوب‌ها اعمال گردید. محصول بدست آمده از این روند که همان cDNA می باشد در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**واکنش RT-PCR**: واکنش RT-PCR کمی (Quantitative real-time reverse-transcription PCR) نیز با استفاده از مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین (SYBR Green)، ۱ میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و آب مقطر انجام گرفت. شرایط دمایی که برای PCR درنظر گرفته شد، شامل اعمال دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (واسرشت‌سازی اولیه) و سپس ٤۰ چرخه‌ی دمایی به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، دمای اتصال برای هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و نیز دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (دمای گسترش) بود.

پس از اتمام واکنش PCR، از عدد مربوط به CT (Cycle threshold) برای محاسبه سطوح بیان ژن استفاده شد. سیگنال حاصل از PCR نشان‌دهنده میزان نسبی رونویسی از ژن هدف نسبت به سایر ژن‌ها، مانند ژن کالیبراتور می‌باشد. تغییرات بیان ژن در آزمایش qRT-PCR از روش لیواک به دست می‌آید. نقطه پایان در آزمایش qRT-PCR، تحلیل آستانه سیکل‌ها یا $C_t$ می‌باشد. $C_t$ از طریق طرح لگاریتم خطی سیگنال PCR در برابر تعداد سیکل‌ها تعیین می‌شود. در روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ نتایج به دست آمده، تغییرات در بیان ژن طبیعی را نسبت به ژن کنترل داخلی و نسبت به بلانک کنترل، اظهار می‌نمایند. در بلانک کنترل، $\Delta\Delta C_t$ برابر با صفر می‌باشد؛ بنابراین، ۲۰ برابر است با عدد یک، به طوری که تغییرات بیان ژن نسبت به بلانک کنترل برابر یک تعریف می‌شود. برای نمونه‌های مورد آزمایش واقع‌شده، ارزیابی $2^{-\Delta\Delta CT}$ نشان‌دهنده تغییر بیان ژن نسبت به کنترل بلانک می‌باشد. .با توجه به این که مقادیر RNA قابل حصول از سلول متغیر می‌باشد و از سوی دیگر mRNA، ۱ تا ۲ درصد از RNA کل را تشکیل می‌دهد؛ برای مقایسه بیان یک ژن خاص در دو نمونه متفاوت، ژنی به عنوان کنترل یا استاندارد داخلی انتخاب شده (که این ژن درنمونه‌های متفاوت بیان یکسان دارد) و میزان بیان ژن‌های دیگر در مقایسه با آن اندازه‌گیری می‌شود. برای ارائه نتایج به طور نسبی،



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

از یک جفت پرایمر طراحی شده برای بیان ژن β-actin استفاده گردید. طراحی پرایمرها از طریق مطالعه پرایمرهای طراحی شده در مقالات موجود مرتبط با ژن‌های هدف و نیز با استفاده از پایگاه داده‌ی primer blast در NCBI صورت گرفت. سنتز پرایمرها نیز توسط شرکت Metabion صورت پذیرفت (Masjedi et al. 2020).

**بررسی‌های آماری:** بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹ انجام گرفت. برای انجام بررسی‌های آماری مقایسه‌ای در مورد نمونه‌های چندگانه از آزمون ANOVA استفاده شد. همچنین، جهت انجام بررسی‌های مقایسه‌ای دو متغیر در گروه‌های مستقل، از آزمون Student's t-test استفاده شد. در تمامی بررسی‌های مذکور، نتایج با p-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

## نتایج و بحث
## Results and Discussion

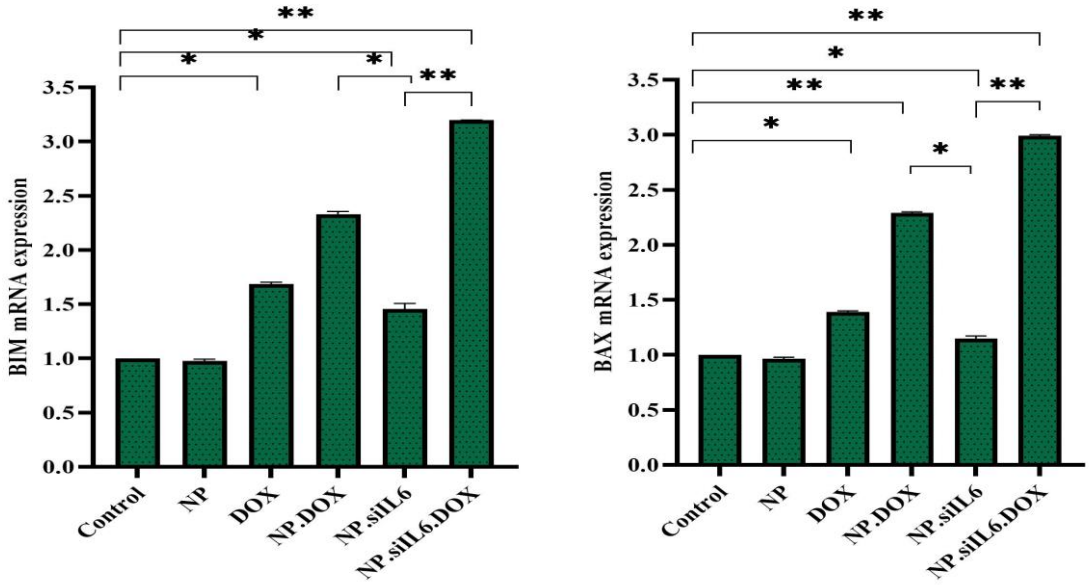
به منظور بررسی میزان رخداد آپوپتوز پس از مواجهه با فرمولاسیون‌های مختلفی از نانوذرات (یعنی NP+DOX، NP+siRNA و NP+DOX+siRNA) و نیز DOX ، سطوح mRNA برخی از ژن‌های دخیل در آپوپتوز مورد سنجش قرار گرفتند.

بررسی سطوح mRNA مربوط به ژن‌های BAX و BIM که محصولات پروتئینی آن‌ها پیش‌برنده آپوپتوز هستند نشان داد که به هنگام تیمار سلول‌ها با نانوذرات حاوی siRNA و DOX به طور همزمان، بیشترین افزایش در سطوح mRNA این دو ژن، در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها، حاصل می‌شود. همان‌طور که در شکل (۱) آورده شده است. این گروه، افزایش معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۰۱) با گروه کنترل در بیان هر دو ژن نشان می دهد. نانوذرات حامل دوکسورودوبسین نسبت به نانوذرات حامل siRNA افزایش معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۰۵) در بیان این ژن‌ها نشان داد. نانوذرات بلانک نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نداد. با این حال نانوذرات حامل دوکسورودوبسین نسبت به دوکسورودوبسین تنها، افزایش معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۰۵) در بیان ژن‌های پیش برنده آپوپتوزBAX و BIM نشان داد.

علاوه بر دو ژن بالا، سطوح mRNA ژن BCL-2 نیز بررسی شد. محصول پروتئینی این ژن برخلاف دو ژن BAX و BIM دارای اثرات ضد آپوپتوزی می‌باشد. بررسی سطوح mRNA ژن BCL-2 نشان داد که تیمار سلول‌ها با نانوذرات حاوی siRNA و DOX به طور همزمان، بیشترین اثر کاهشی را بر سطوح mRNA این ژن دارد. همان‌طور که در شکل (۲) آورده شده است. این گروه، کاهش معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۰۱) با گروه کنترل در بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL-2 نشان می دهد. نانوذرات حامل دوکسورودوبسین نسبت به نانوذرات حامل siRNA کاهش معنی داری (p-value کمتر از ۰/۰۱) در بیان این ژن نشان داد. نانوذرات حامل دکسورودوبسین به تنهایی با گروه نانوذرات siRNA، نیز تفاوت معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۰۵) نشان داد. نانوذرات بلانک نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد. با این حال نانوذرات حامل دوکسورودوبسین نسبت به دوکسورودوبسین تنها، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد.

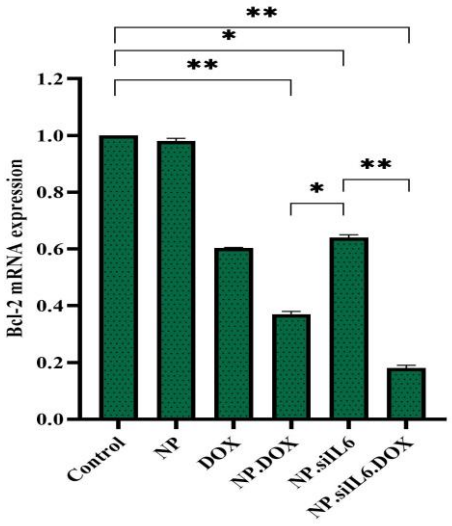
[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]




**شکل ۱**- نمودارهای میزان بیان ژن‌های BAX (راست) و BIM (چپ). گروه Control: سلول‌ها تیماری دریافت نکردند. گروه NP: سلول‌ها فقط نانوذرات خالی دریافت کردند. DOX: سلول‌ها فقط با داروی دوکسورودوبسین تیمار شدند. NP.DOX: سلول‌ها با نانوذرات حامل دوکسورودوبسین تیمار شدند. NP.siIL6: سلول‌ها تیمار نانوذرات حامل siRNA دریافت کردند. گروه NP.siIL6.DOX: سلول‌ها با نانوذرات حامل siRNA اینترلوکین ٦ و داروی دوکسورودوبسین تیمار شدند. * (p-value کمتر از ۰/۰۵) و ** (p-value کمتر از ۰/۰۵) .

**Fig1.** BAX (right) and BIM (left) gene expression graphs. Control: cells were not treated. NP**:**Cells received only blank nanoparticles. DOX: Cells were treated with doxorhodopsin alone. NP.DOX: Cells were treated with doxorhodopsin-loaded nanoparticles. NP.siIL6: Cells received siRNA-loaded nanoparticles. NP.siIL6.DOX group: Cells were treated with interleukin 6 siRNA-loaded nanoparticles and doxorhodopsin. * : P-value $\leq$ 0/05 and **: P-value $\leq$ 0/01.




**شکل ۲**- میزان بیان ژن BCL-2 . گروه Control: سلول‌ها تیماری دریافت نکردند. گروه NP: سلول‌ها فقط نانوذرات خالی دریافت کردند. DOX: سلول‌ها فقط با داروی دوکسورودوبسین تیمار شدند. NP.DOX: سلول‌ها با نانوذرات حامل دوکسورودوبسین تیمار شدند. NP.siIL6: سلول‌ها تیمار نانوذرات حامل siRNA دریافت کردند. گروه NP.siIL6.DOX: سلول‌ها با نانوذرات حامل siRNA اینترلوکین ٦ و داروی دوکسورودوبسین تیمار شدند. * (p-value کمتر از ۰/۰۵) و ** (p-value کمتر از ۰/۰۵) .

**Fig2.** Gene expression level of BCL2 . Control: cells were not treated. NP:Cells received only blank nanoparticles. DOX: Cells were treated with doxorhodopsin alone. NP.DOX: Cells were treated with doxorhodopsin-loaded nanoparticles. NP.siIL6: Cells received siRNA-loaded nanoparticles. NP.siIL6.DOX group: Cells were treated with interleukin 6 siRNA-loaded nanoparticles and doxorhodopsin. *: P-value $\leq$ 0/05 and **: P-value $\leq$ 0/01.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

**بحث:** عامل های مختلفی در ریز محیط زیست تومور مانند سیتوکین های مختلف ، هیپوکسی و سلول های سرکوب کننده سیستم ایمنی بدن باعث تسهیل پیشرفت تومور و مکانیسم های فرار سیستم ایمنی می شوند. یکی از سایتوکاین های غالب در ریزمحیط تومور IL-6 است که بخش اعظم آن توسط سلول های سرطانی تولید می شود. مطالعات متعددی نقش مهم IL-6 در پیشرفت سرطان را نشان داده است . بررسی ها، IL-6 و مسیرهای پایین دست سیگنالینگ مرتبط با آن را به عنوان اهداف معقول برای درمان سرطان معرفی می کنند. روش های مختلفی مانند آنتی بادی های مونوکلونال یا مهارکننده های دارویی برای مسدود کردن عملکرد IL-6 که با کارآیی متغیر همراه بوده است ، مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین مهار بیان آن می‌تواند به عنوان یک گزینه در درمان سرطان سینه، مورد بررسی قرار گیرد.

به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که انجام شده، نشان داده شد که افزایش سطح بیان IL-6 و IL-8 ممکن است به مقاومت دارویی در سلول‌های سرطان سینه انسان کمک کند. در این مطالعه استفاده از آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه IL-6 و IL-8 تا حدی مقاومت دارویی رده سلول پستانی MCF-7/R را به پاکلیتاکسل و دوکسوروبیسین معکوس کرد و همچنین مهار بیان IL-6 یا IL-8 توسط فناوری siRNA به طور قابل‌توجهی حساسیت دارویی سلول‌های MCF-7/R را افزایش داد. علاوه‌براین، مشخص شد که بیان بیش از حد IL-6 یا IL-8 از طریق ترانسفکشن، باعث افزایش مقاومت به دوکسوروبیسین در سلول‌های MCF-7/S شد (Shi et al. 2012).

در یک پژوهش دیگر، از لیپوفکتامین (LP) برای انتقال مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک علیه CD155 و IL-6 به رده‌ی سلولی سرطان سینه 4T1، به منظور هدف قرار دادن همزمان CD155 وIL-6 ، استفاده شد. نتایج مطالعه نشان داد که سلول‌ها به طور موثر با LP منتقل شده‌اند که این موضوع منجر به کاهش سطوح IL-6 و CD155 منجر شده بود. علاوه‌براین، خاموش کردن ترکیبی IL-6 و CD155 به میزان قابل‌توجهی باعث کاهش زیستایی سلول‌های سرطانی شد. بنابراین در این پژوهش، هدف‌گیری همزمان CD155 و IL-6 در سلول‌های سرطان سینه 4T1 به عنوان یک راهکار درمانی نوآورانه و کارآمد برای القای آپوپتوز در سلول‌های بدخیم مطرح شد ( Khodakarami et al. 2023).

نتایج ناشی از یک مطالعه نشان داده است که ترکیب BV6 نوعی مهارکننده IAPها و siRNAی اختصاصی علیه IL-6، به عنوان یک راهکار جدید درمانی بر علیه تومور می‌تواند مفید باشد. آن‌ها از نانوذرات هیالورونات--PEGکیتوزان-لاکتات (H-PCL) برای تحویل همزمان BV6 و siRNAی ضد IL-6 به سلول‌های رده‌ی 4T1 سرطان سینه و CT26 سرطان روده بزرگ استفاده کردند و خواص ضدتوموری این درمان ترکیبی را در شرایط *in vitro* و *in vivo* بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات H-PCL منجر به انتقال موثر BV6 و siRNA به سلول‌های سرطانی و سرکوب مولکول‌های هدف منجر می‌شود. علاوه‌براین، مشخص شد که درمان ترکیبی به طور هم‌افزایی آپوپتوز را افزایش داده و مهاجرت سلولی، تکثیر، تشکیل کلنی و رگ‌زایی را در رده‌های سلولی 4T1 و CT26 کاهش می‌دهد. همچنین این ترکیب، پیشرفت سرطان را در موش‌های حامل تومور سرکوب کرد که این امر با افزایش زمان بقا نیز مرتبط بود (Salimifard et al. 2020).

در یک پژوهش، دخالت مسیر میتوکندری و تعادل Bim/Bcl-2 در آپاپتوز ناشی از دی هیدروارتمیزینین در سرطان پستان انسان در شرایط in vitroرا بررسی کردند که نتیجه بدست آمده از این مطالعات دارای منطق علمی برای استفاده بالینی از DHA برای سرطان سینه از طریق برهم زدن تعادل BIM/BCL-2 در مسیر آپاپتوزی می‌باشد (Mao et al. 2013). در یک پژوهش دیگر، نشان داده‌اند که ناک‌داون کردن miR-221 با هدف قراردادن محور BIM-BAX/Bak در سرطان سینه، آپوپتوز القا کننده سیس‌پلاتین را بهبود می‌بخشد (Ye et al. 2016).

**نتیجه گیری:** در این پژوهش، تاثیر همزمان مهار تولید پروتئین IL-6 و تیمار با داروی دوکسوروبیسن، بر روی سلول‌های رده 4T1 برروی بیان ژن‌های پرو-آپوپتوتیک (BIM-BAX) و انتی آپوپتوتیک (Bcl-2) بررسی شد. مهار تولید IL-6 با استفاده از siRNA طراحی شده علیه mRNA این پروتئین انجام گرفت. مولکول‌های siRNA و داروی DOX به طور همزمان درون نانوذرات کیتوزان لاکتات قرار داده شده و سپس به سلول‌ها عرضه شدند. پس از تیمار سلول‌های رده 4T1 با این نوع از نانوحامل‌های حاوی siRNA و DOX، چگونگی تاثیر این



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]
[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

روش درمانی ترکیبی بر ویژگی‌های مختلف این سلول‌ها بررسی گردید. با این بررسی‌ها مشخص شد که کارایی این روش درمانی ترکیبی در کاهش میزان وقوع فرایندهای مربوط به مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، در مقایسه با کاربرد جداگانه‌ی هر یک از نانوذرات حاوی siRNA و یا DOX، بیشتر می‌باشد. در مجموع، می‌توان بر مبنای نتایج حاصل از این پژوهش چنین بیان کرد که تیمار سلول‌های سرطانی رده 4T1 با نانوذرات کیتوزان لاکتات (CL) حامل مولکول‌های siRNA و DOX به طور همزمان، اثرات مطلوبی را در کاهش و یا محدودسازی پتانسیل رشد، تکثیر، متاستاز و رگ‌زایی این نوع از سلول‌ها دارد. به بیان دیگر، اثرات هم‌افزایی مولکول‌های siRNA طراحی شده علیه mRNA اینترلوکین ٦ و داروی دوکسوروبیسین فرموله شده در داخل نانوذرات مذکور، به منظور حذف یا توقف سلول‌های سرطانی، مطلوب می‌باشد. بنابراین، این روش و این نوع فرمولاسیون می‌تواند به عنوان یک روش درمانی بالقوه برای درمان سرطان (بویژه سرطان سینه)، مطرح باشد. گرچه برای اظهار نظر قطعی در این مورد نیاز است تا برخی پژوهش‌های بیشتر انجام شود.

## منابع

## References


Al-Malky, H.S., Al Harthi, S. E. and A.-M. M. Osman, (2020). Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance, Journal of Oncology Pharmacy Practice, 26(2), 434-444. http://doi.org/10.1177/1078155219877931

Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. and Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide, Cancer, 127(16), 3029-3030.

Chen, Y., Shi, S. and Dai, Y. (2022). Research progress of therapeutic drugs for doxorubicin-induced cardiomyopathy, Biomedicine & Pharmacotherapy, 156, 113903. http://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113903

Gao, Z.G., Tian, L., Hu, J., Park, I.S. and Bae, Y.H. (2011). Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles, Journal of controlled release, 152(1), 84-89. http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.021

Giaquinto, A.N., Sung, H., Miller, K.D., Kramer, J.L., Newman, L. A., Minihan A., *et al.*, (2022) Breast cancer statistics, 72(6), 524-541. http:// doi.org/10.3322/caac.21754

Grady, W.M. (2021). Epigenetic alterations in the gastrointestinal tract: current and emerging use for biomarkers of cancer, Advances in cancer research, 151, 425-468. http://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.02.006

Khodakarami, A., Darvishi, S., Hassannia, H., Sadeghi, M., Esmaeeli, S., Hashemi V. *et al.*, (2023). Blockade of CD155 and interleukin-6 suppresses breast cancer cell growth, International Journal, 1, 2. http://doi.org/10.34172/ijdrc.2023.e10

Mao H, Gu H, Qu X, Sun J, Song B, Gao W, et al, 2013. "Involvement of the mitochondrial pathway and Bim/Bcl-2 balance in dihydroartemisinin-induced apoptosis in human breast cancer in vitro. http://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1176

Masjedi, A., Ahmadi, A., Atyabi, F., Farhadi, S., Irandoust, M., Khazaei-Poul Y. *et al*, (2020). Silencing of IL-6 and STAT3 by siRNA loaded hyaluronate-N, N, N-trimethyl chitosan nanoparticles potently reduces cancer cell progression, International journal of biological macromolecules, 149, 487-500http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.273

Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi M. *et al,* (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer, Biomedicine & Pharmacotherapy, 108, 1415-1424. http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.177

Mayrovitz, H. N. (2022). Breast Cancer. http://doi.org/10.1002/cncr.33587

Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K. and Yoon H., (2022). Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications, International Journal of Molecular Sciences, 23(12), 6806. http://doi.org/10.3390/ijms23126806

Pulaski B.A. and Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 breast tumor model," Current protocols in immunology, 39(1), 1-16. https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39

Qiu, H., Cao S., and Xu, R. (2020). Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020. 41(10), 1037-1048. http://doi.org/ 10.1002/cac2.12197

Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy, Journal of cancer research and therapeutics, 10(4), 853-858. http://doi.org/ 10.4103/0973-1482.139267




[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]

Salimifard, S., Karoon Kiani, F., Sadat Eshaghi, F., Izadi S., Shahdadnejad, K., Masjedi A. *et al.*, (2020). Retraction notice to Codelivery of BV6 and anti-IL6 siRNA by hyaluronate-conjugated PEG-chitosan-lactate nanoparticles inhibits tumor progression. Life Sciences, 260, 118423. http://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122774

Shi, Z., Yang, W.M., Chen, L.P., Yang, D.H., Zhou, Q., Zhu, J. *et al.*, (2012). Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production, Breast cancer research and treatment, 135, 737-747. http://doi.org/10.1007/s10549-012-2196-0

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal A., *et al.*, (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209-249. http://doi.org/10.3322/caac.21660

Tao K., Fang M., Alroy J., and Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer, *BMC cancer,* 8(1), 1-19. http://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228

Wallace, K.B., Sardão, V.A. and Oliveira, P.J. (2020). Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy, Circulation research, 126(7), 926-941. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314681

Ye, Z., Hao, R., Cai, Y., Wang, X., Huang, G., (2016). Knockdown of miR-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 37(4), 4509-15. http://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113903

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29 ]

[ DOI: 10.61882/gebsj.13.2.4 ]