

Research Article

The Effect of Fluorescent Tamoxifen Nanodrug on the Expression of Apoptosis and Cell Cycle Genes in MCF-7 Breast Cancer Cells

Noora Amraee¹, Maryam Bikhof Torbati^{2*}, Ahmad Majd¹, Masoud Shaabanzadeh³

1- Department of Biology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, YI.C., Islamic Azad university, Yadegar-e-Imam Khomeini (Rah) Shahr-e-ray, Iran

3- Department of Chemistry, Da.C., Islamic Azad University, Damghan, Iran

*Corresponding author: bikhof@iau.ac.ir

Received: 15 July 2025

Accepted: 03 September 2025

DOI: 10.60833/ASCIJ.2026.1216598

Abstract

Tamoxifen is the most common drug for the treatment of estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer. The antagonistic effects of tamoxifen against ERs prevent DNA synthesis and the cellular response of cancer cells to the stimulating effects of estrogen, and as a result, increase cell death. In order to overcome the side effects of tamoxifen and the low solubility of this drug, many nanosystems have been developed to carry tamoxifen molecules, which have the ability to deliver tamoxifen at a lower and safer dose to tumors and protect the hydrophobic molecules of tamoxifen against destruction by macrophages in the bloodstream. The effect of fluorescent nano drug tamoxifen (TMX-FPGs) on MCF-7 cancer cells was evaluated by the MTT method. The expression changes of *P53*, *BCL2*, *BAX*, and *CyclinD1* genes in MCF-7 cells treated with nano drugs were investigated using Real-Time PCR. Also, cellular uptake of the nano drug was evaluated using confocal microscopy. TMX-FPGs nano drug decreased the viability of MCF-7 cells in a dose-dependent manner, and with the increase of *P53* expression and *BAX/BCL2* ratio, and the decrease of *CyclinD1* expression, significantly increased apoptotic activity. Also, cell uptake and fluorescence emission of the nano drug were confirmed in cell imaging with a confocal microscope. Considering the fluorescence properties of the nano drug and its ability to induce apoptosis by increasing the expression of genes involved in this, and its cytotoxic effect on MCF-7 cancer cells, the TMX-FPGs nano drug is a suitable candidate for monitoring and targeting MCF-7 cancer cells.

Keywords: Tamoxifen, GQDs, Real-Time PCR, drug delivery, Breast cancer, MCF-7.



مقاله پژوهشی

اثر نانو داروی فلورسنت تاموکسیفن بر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های سرطان پستان MCF-7

نورا امرایی^۱، مریم بی خوف تربتی^{۲*}، احمد مجد^۱، مسعود شعبانزاده^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه شیمی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*مسئول مکاتبات: bikhof@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴

DOI: 10.60833/ASCIJ.2026.1216598

چکیده

تاموکسیفن رایج‌ترین داروی درمان سرطان پستان با گیرنده استروژن مثبت (ER+) می‌باشد، اثرات آنتاگونیست تاموکسیفن علیه ERs مانع از سنتز DNA و پاسخ سلولی سلول‌های سرطانی به اثرات تحریکی استروژن می‌شود و در نتیجه مرگ سلولی را افزایش می‌دهد. به منظور غلبه بر عوارض تاموکسیفن و حلالیت کم و ناچیز این دارو، سیستم‌های بسیاری با قابلیت نانو برای حمل مولکول‌های تاموکسیفن توسعه یافته‌اند که توانایی انتقال تاموکسیفن با دوز کمتر و ایمن‌تر به تومورها و محافظت از مولکول‌های آبریز تاموکسیفن در برابر تخریب توسط ماکروفاژها در جریان خون را دارند. اثر نانو داروی فلورسنت تاموکسیفن (TMX-FPGs) روی سلول‌های سرطانی MCF-7 با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییر بیان ژن‌های *BCL2*، *P53*، *CyclinD1* و *BAX* در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو دارو با استفاده از Real-Time PCR بررسی شد. همچنین جذب سلولی نانودارو با میکروسکوپ کانفوکال مورد ارزیابی قرار گرفت. نانو داروی TMX-FPGs با روشی وابسته به غلظت سبب کاهش توان زیستی سلول‌های MCF-7 گردید و با افزایش بیان *P53* و نسبت *BAX/BCL2* و کاهش بیان *CyclinD1* موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آپوپتوز شد. همچنین، جذب سلولی و نشر فلورسانس نانودارو در تصویربرداری سلولی با میکروسکوپ کانفوکال تایید شد. با توجه به خواص فلورسانس نانودارو و توانایی آن در القاء آپوپتوز با افزایش بیان ژن‌های دخیل در این امر و اثر سیتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی MCF-7، نانو داروی TMX-FPGs کاندید مناسبی برای نظارت و هدف‌گیری سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌باشد.

کلمات کلیدی: تاموکسیفن، GQDs، Real-Time PCR، دارورسانی، سرطان پستان، MCF-7.

مقدمه

سرطان پستان به‌عنوان رشد کنترل‌نشده سلول‌های منشأ گرفته از لوبول‌ها یا مجاری پستان تعریف می‌شود که قابلیت گسترش به سایر نواحی بدن را دارد. این بیماری شایع‌ترین سرطان مهاجم در زنان و دومین عامل مرگ‌ومیر آن‌ها در سطح جهان است (۱،۲). با وجود استفاده گسترده از شیمی‌درمانی به‌عنوان درمان استاندارد، توجه به سامانه‌های دارورسانی هدفمند به‌دلیل کاهش عوارض جانبی و

مولکول‌های بزرگ‌تر تاموکسیفن راحت‌تر می‌توانند به رگ‌های خونی اطراف سلول‌های سرطانی نفوذ کنند و باعث جذب سلولی غیرفعال نانوسیستم‌های تاموکسیفن توسط تومورها و در نتیجه افزایش انتقال تاموکسیفن می‌شوند (۱۱). از جمله این نانو حامل‌ها سیستم‌های دارویی مبتنی بر نقاط کوانتومی گرافن (GQDs) است که نه تنها به دلیل سمیت پایین و وجود گروه‌های عملکردی بلکه به دلیل ظرفیت بارگیری دارویی بالا و توانایی ردیابی همزمان به دلیل فوتولومینسانس آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۲، ۱۳). این امر منجر به بسیاری از مطالعات با استفاده از GQDs به عنوان سیستم‌های دارورسانی شیمی درمانی برای درمان بیماری‌ها شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانو داروی تاموکسیفن مبتنی بر GQDs بر تغییر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از نانو داروی تاموکسیفن با نام اختصاری TMX-FPGs (mPEG-GQDs-FOLATE/) TAMOXIFEN با اندازه کمتر از ۲۰۰ نانومتر که توسط همین گروه تحقیقاتی سنتز و گزارش شده (Amraee et al. 2023) استفاده گردید. رده سلولی MCF-7 (آدنو کارسینوما پستان انسان IBRC C10682) از مرکز ذخایر زیستی ایران به دست آمد. سلول‌ها در محیط با گلوکز بالای DMEM و FBS ۱۰ درصد و (v/v) ۱ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین/ پنی‌سیلین در انکوباتور با ۵ درصد CO2 با دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند.

بررسی زنده‌مانی سلول با روش MTT assay : اثر سمیت سلولی نانوداروی TMX-FPGs با روش MTT بررسی شد به این صورت که میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های فعال از نظر متابولیک رابطه مستقیم

بهبود کیفیت زندگی، رو به افزایش است (۳). درمان هدفمند در ارائه مولکول‌های کوچک درمانی و مواد ایمنولوژیکی مانند آنتی‌بادی‌ها، به اهداف مولکولی خاص که در غشاهای توموری قرار دارند تمرکز دارد. این اهداف مولکولی معمولاً گیرنده‌هایی هستند که بر روی تومورهای پستان بیش از حد بیان می‌شوند. گیرنده‌های غدد درون‌ریز (EnRs)، به‌ویژه گیرنده‌های استروژن (ERs) و پروژسترون (PRs)، از رایج‌ترین اهداف مولکولی در این نوع درمان‌ها هستند. حدود ۸۰ درصد موارد سرطان پستان به استروژن پاسخ می‌دهند و به‌عنوان سرطان‌های گیرنده استروژن مثبت (ERs+) شناخته می‌شوند (۴). گیرنده‌های استروژن (ERs) از مهم‌ترین اهداف مولکولی در درمان هدفمند سرطان پستان هستند. تعدیل‌کننده‌های انتخابی گیرنده استروژن (SERMs)، با رقابت برای اتصال به ERs، اثرات استروژن را در بافت پستان مهار می‌کنند. تاموکسیفن، شناخته‌شده‌ترین SERM است که با کاهش فعالیت ERs موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۵، ۶). با وجود کاربرد گسترده تاموکسیفن در درمان سرطان پستان، نگرانی‌هایی درباره بروز سرطان آندومتر و کبد، استفاده طولانی‌مدت از این دارو را محدود کرده است (۷). بیشتر عوارض جانبی تاموکسیفن وابسته به دوز و غلظت دارو هستند، بنابراین استفاده از دوز پایین می‌تواند تعادل مناسبی بین اثربخشی و ایمنی ایجاد کند (۸). با این حال، رسیدن غلظت مؤثر دارو به محل هدف تحت تأثیر مکانیسم‌های دفاعی بدن و فعالیت ماکروفاژها ممکن است کاهش یابد. در این راستا، فرمولاسیون‌های مبتنی بر نانو با افزایش زمان گردش خون و محافظت از تاموکسیفن در برابر تخریب، امکان انتقال ایمن و مؤثرتر دارو به بافت توموری را فراهم می‌کنند (۹، ۱۰). از آنجایی که نانوفرمولاسیون‌های بارگذاری شده با تاموکسیفن در اندازه‌های نانو هستند، در مقایسه با

تک رشته RNA به کمک کیت سنتز cDNA (Yekta Tajhiz Azma cDNA Synthesis Kit, Yekta Tajhiz Azma Co., Cat. No. YT4500, Tehran, Iran)، تک رشته cDNA در دستگاه PCR سنتز شد.

واکنش Real-Time PCR: میزان تغییر بیان ژن‌های *Cyclin D1* و *P53*, *BAX*, *BCL2* qRT-PCR با روش در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوداروی TMX-FPG پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. بیان این ژن‌ها در مقایسه با ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی سنجیده شد. مراحل آماده‌سازی با توجه به پروتکل کیت (RealQ Plus 2x Master Mix Green, Ampliqon A/S, Cat. No. A323402, Odense, Denmark) برای cDNA استخراج شده از سلول‌های تیمار و کنترل انجام شد. تنظیم دستگاه Thermo Cycler به گونه‌ای صورت گرفت که ابتدا دما به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه باقی بماند. سپس ۴۰ سیکل با تغییر دمایی ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد به ازای هر سیکل به دستگاه اعمال شد. برای تایید اتصال صحیح و اختصاصی پرایمر و عدم وجود دایمر آغازگر ارزیابی منحنی ذوب استفاده شد. هر نمونه به طور Duplicate با دستگاه Real-Time PCR (ABI Step One Plus) مورد آزمایش قرار گرفت و سپس با تعیین حد آستانه مناسب کمیت Ct از دستگاه در قالب اکسل خارج شد. محاسبه fold change برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها و محاسبات آماری با روش One-Way Anova انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism انجام شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

تصویربرداری سلولی توسط میکروسکوپ کانفوکال: برای ارزیابی جذب سلولی و شدت فلورسانس نانو داروی TMX-FPG از روش میکروسکوپ لیزری کانفوکال استفاده شد. به این ترتیب که 1×10^5 سلول MCF-7 در کف پلیت ۶

دارد. تعداد مناسبی از سلول‌های MCF-7 (1×10^4) در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای به طور جداگانه کشت داده شد، پس از چسبیدن سلول‌ها نمونه‌هایی با رقت‌های ۱/۵، ۱، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر از نانو داروی TMX-FPG به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس محلول MTT در غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در PBS تهیه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. در ادامه کریستال‌های فورمازان تشکیل شده با ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید حل شده و میزان رنگ تولید شده از آن توسط دستگاه الیزا پلیت ریدر بر حسب جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد. به این ترتیب میزان درصد زیستایی نسبت به گروه کنترل و میزان IC50 برای نانو داروی TMX-FPG در رده سلولی MCF-7 در مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت محاسبه شد. هر رقت در ۴ تکرار انجام شد. به چاهک‌های گروه کنترل محیط کشت حاوی سلول و فاقد دارو اضافه شد، همچنین به چند چاهک به عنوان نمونه بلانک، محیط کشت تنها اضافه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: رده سلولی MCF-7 در دو فلاسک تیمار و شاهد کشت داده شد. فلاسک تیمار به مدت ۲۴ ساعت با غلظت کمتر از IC50 از نانودارو (۵۰ میکروگرم/میلی لیتر) انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با تریپسین از کف فلاسک جدا و با ۲ میلی لیتر بافر فسفات سالین (PBS) استریل، شستشو داده شد. در ادامه از نمونه‌های سلولی کشت داده شده در فلاسک به وسیله ترايزول استخراج RNA با کیت (RiboExTM Total RNA, GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Cat. No. 301-001, Seoul, South Korea) انجام شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شدند، سپس از روی

چاهکی روی کاور اسلیپ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد تا سلول‌ها به آن بچسبند. پس از رسیدن سلول‌ها به کانفلوئنسی ۷۰ درصد محیط رویی خارج شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند سپس سلول‌ها با ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از نانوحامل حاوی تاموکسیفن در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سه چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و با نانو دارو تیمار نشدند. پس از شستشو با PBS با پارا فرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند و با میکروسکوپ کانفوکال بررسی شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده

Table 1. Designed primer sequences

Genes (Accession number)	Sequence (5' → 3')	Primer size	Size of replicated fragments	Tm/GC%
<i>GAPDH</i> (NM_002046.7)	F: CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R: GCGTCAAAGGTGGAGGAGTG	22 N 20 N	120 bp	60/50 60/60
<i>BCL2</i> (NM_000633.3)	F: AGATTGATGGGATCGTTGCCT R: AGTCTACTTGCTCTGTGATGTTGT	21 N 24 N	109 bp	60/47.62 60/41.67
<i>BAX</i> (NM_138761.4)	F: CAGGACGCATCCACCAAGAAG R: TGCCACACGGAAGAAGACCTC	21 N 21 N	135 bp	64/57.14 64/57.14
<i>P53</i> (NM_000546.6)	F: TACTCCCCTGCCCTCAACA R: GGACCAGACCATCGCTATCT	19 N 20 N	193 bp	60/57.89 60/55
<i>Cyclin D1</i> (NM_053056.3)	F: ACAACTGGATGCTGGAGGTC R: GGGGGTTGGTCTACTTCATCTTAG	20 N 24 N	174 bp	60/55 60/50

نتایج

بررسی زنده مانی به روش **MTT assay** : درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوداروی TMX-FPGs با آنالیز MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 با افزایش غلظت نانو داروکاهش یافت به طوریکه بیشترین اثر سمیت سلولی مربوط به غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو دارو بود ($p \leq 0/0001$) و این امر بیانگر آن است که میزان غلظت نانو دارو یکی از عوامل مهم در حذف سلول‌های سرطان پستان می‌باشد. مقادیر IC50 نانوداروی TMX-FPG روی سلول‌های MCF-7 در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت، $84/27 \pm 3/38$ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد. با توجه به نتایج بارگذاری دارو در مطالعه اخیر (Amraee et al. 2023) ۳۰ درصد از وزن نانوداروی

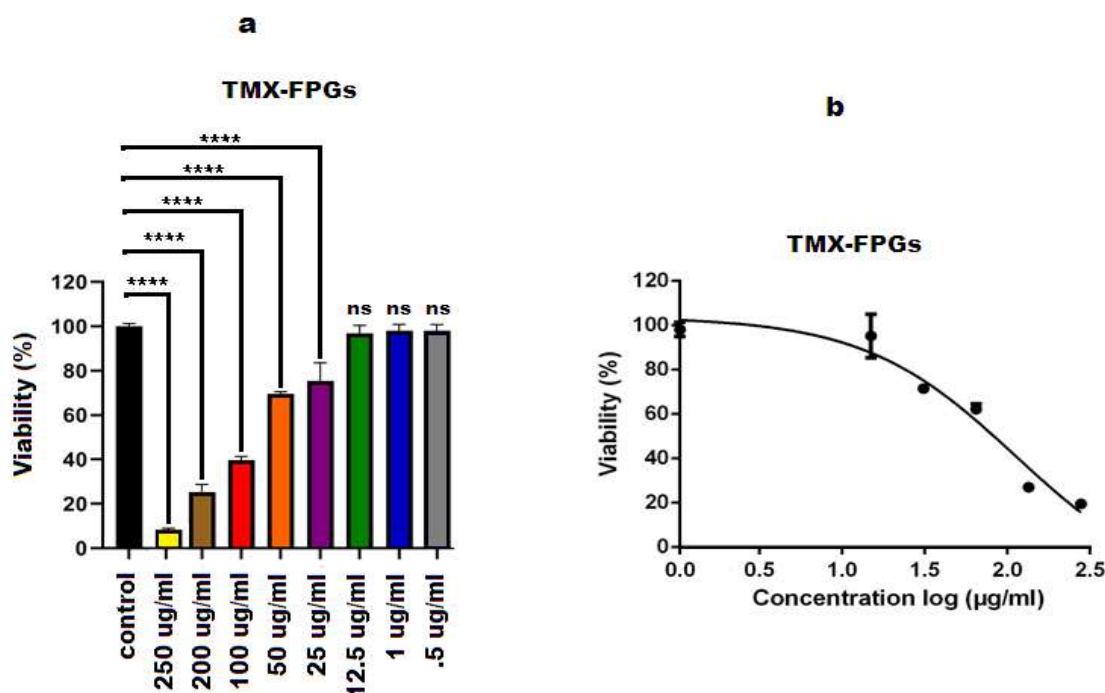
بررسی زنده مانی به روش **MTT assay** : درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوداروی TMX-FPGs با آنالیز MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 با افزایش غلظت نانو داروکاهش یافت به طوریکه بیشترین اثر سمیت سلولی مربوط به غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو دارو بود ($p \leq 0/0001$) و این امر بیانگر آن است که میزان غلظت نانو دارو یکی از عوامل مهم در حذف سلول‌های سرطان پستان می‌باشد. مقادیر IC50 نانوداروی TMX-FPG روی سلول‌های MCF-7 در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت، $84/27 \pm 3/38$ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد. با توجه به نتایج بارگذاری دارو در مطالعه اخیر (Amraee et al. 2023) ۳۰ درصد از وزن نانوداروی

بررسی تغییر بیان ژن‌های *BCL2*، *BAX*، *P53* و *Cyclin D1* در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوداروی TMX-FPGs: بر اساس داده‌های حاصل از آنالیز Real-Time PCR نتایج تغییرات بیان ژن با استفاده از رابطه $Fold.change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد. نتایج نشان داد بیان در سطح mRNA ژن *P53* در سلول‌های MCF-7 تحت تیمار با نانودارو ۱/۲۷ برابر نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده) افزایش یافته است ($p < 0/0001$)، بیان ژن *BCL2* ۱/۸۶ برابر ($p < 0/0001$) و ژن *BAX* ۴/۳۸ برابر ($p < 0/0001$) نسبت به گروه

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال دارند. با توجه به نتایج تصویربرداری کانفوکال همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، سلول‌های MCF-7 تیمار شده با TMX-FPGs شدت فلورسانس مناسب را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (گروه شاهد) نشان دادند. این یافته جذب سلولی نانوذرات TMX-FPGs و وارد شدن آن‌ها به سلول‌های سرطان پستان MCF-7 پس از ۲ ساعت انکوباسیون دارویی را تایید می‌کند.

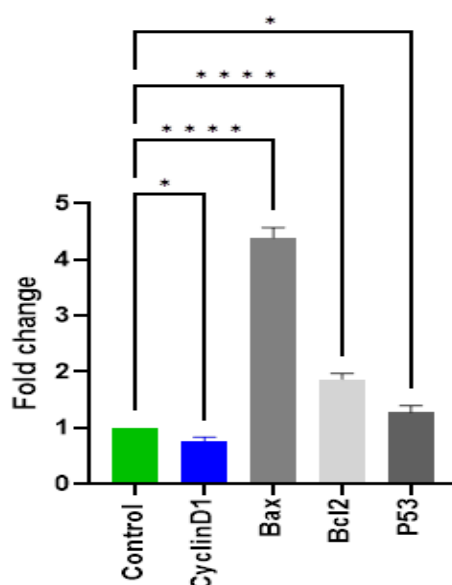
کنترل افزایش یافته است، همچنین بیان ژن *Cyclin D1* نسبت به گروه کنترل ۱/۳۳ برابر کاهش یافته است ($p < 0.05$).

ارزیابی جذب سلولی نانودارو با تصویربرداری سلولی کانفوکال: GQDs به عنوان نانوذرات فلورسنت پتانسیل زیادی به عنوان حامل‌های دارویی در کاربردهای تصویربرداری زیستی و همچنین در پیگیری جذب سلولی دارو توسط



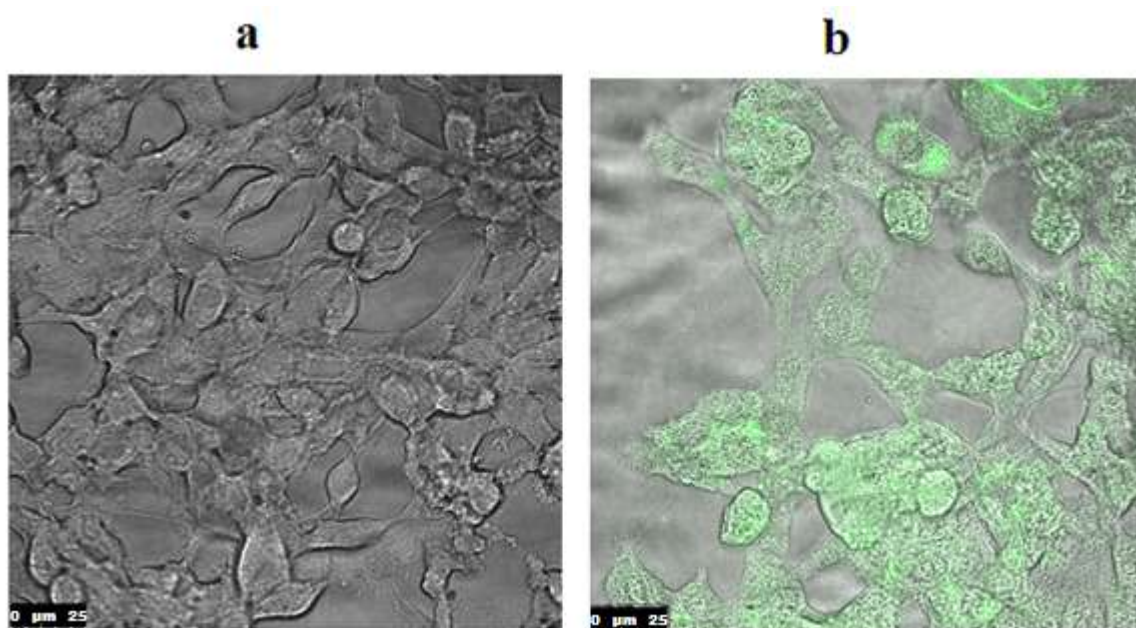
شکل ۱. نمودار ستونی تاثیر غلظت‌های مختلف نانو داروی TMX-FPGs بر درصد زنده ماندن سلول‌های MCF-7 در ۲۴ ساعت (a). منحنی درصد زنده‌مانی بر مبنای لگاریتم غلظتی نانو داروی TMX-FPGs بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون روی سلول‌های MCF-7 (b). **** معرف ($p \leq 0.0001$) می‌باشد.

Figure 1. Histogram illustrating the effect of various concentrations of the TMX-FPGs nanodrug on the viability of MCF-7 cells following 24 h incubation (a). viability percentage curve based on the logarithmic concentration of TMX-FPGs nanodrug after 24 h of incubation on MCF-7 breast cancer cells. (b). **** denotes statistical significance at $p \leq 0.0001$.



شکل ۲. نمودار مقایسه بیان ژن‌های *P53*, *BCL2*, *BAX* و *Cyclin D1* نسبت به یکدیگر و گروه کنترل (علامت * و **** به ترتیب معرف $p < 0.05$ و $p < 0.0001$ می‌باشند).

Figure 2. Comparative expression analysis of *P53*, *BCL2*, *BAX*, and *Cyclin D1* genes relative to each other and to the control group. Symbols * and **** indicate statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ کانفوکال از سلول‌های MCF-7 بدون تیمار به عنوان کنترل (a) و سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو داروی TMX-FPG (b).

Figure 3. Confocal microscopy images of MCF-7 cells without treatment using as the control (a), and cells treated with TMX-FPGs nanodrug (b).

بحث

تومورزایی در سرطان پستان، فرآیندی پیچیده ناشی از تکثیر بی‌رویه سلولی، تمایز غیرطبیعی و اختلال در آپوپتوز است. بنابراین، هدف‌گذاری مسیر آپوپتوز، راهبردی کلیدی در درمان این بیماری محسوب می‌شود. تاموکسیفن (TMX)، به عنوان یک داروی استاندارد در درمان سرطان پستان، آپوپتوز را به عنوان مکانیسم اصلی اثر خود القا می‌کند (۱۴). اثرات این دارو، که از طریق گیرنده استروژن ($ER-\alpha$) عمل می‌کند، می‌تواند به دو صورت سیتواستاتیک (توقف رشد سلولی) در غلظت‌های نانومولار (nM) و سیتوتوکسیک (مرگ سلولی) در غلظت‌های میکرومولار (μM) ظاهر شود (۱۵، ۱۶). در این مطالعه، اثر تاموکسیفن بارگذاری‌شده روی نانوحامل فلورسنت مبتنی بر نقاط کوانتومی گرافن (GQDs) که مطابق با دستورالعمل (Amraee et.al) سنتز شده بود، بر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های MCF-7 بررسی شد. نانوحامل GQDs علاوه بر قابلیت بارگذاری دارو، دارای خاصیت فلورسنت ذاتی است که امکان ردیابی نانودارو در محیط سلولی را فراهم می‌کند (۱۷). این ویژگی، نانوداروی طراحی‌شده را در دسته پلتفرم‌های *theranostic* قرار می‌دهد که همزمان قابلیت درمان و تشخیص را دارا هستند (۱۸). سلول‌های MCF-7 در مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت با نانو داروی تاموکسیفن تیمار شدند و سپس تغییر بیان ژن‌های *BAX*، *BCL2*، *P53* و *Cyclin D1* با روش *Real-time PCR* بررسی شد. این بازه زمانی بر اساس مطالعات پیشین مبنی بر بروز تغییرات آپوپتوتیک ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از مواجهه با تاموکسیفن انتخاب شد (۱۹، ۲۰). نتایج حاصل از ارزیابی سمیت سلولی نانو دارو با روش MTT پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون روی سلول‌های MCF-7 نشان داد با افزایش غلظت نانو

دارو سمیت آن افزایش می‌یابد و در محدوده غلظت ۱۲/۵ تا ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر معنادار است ($p \leq 0.0001$) بطوریکه زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر حدود ۱۰ برابر نسبت به غلظت ۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش یافته است. Abbasalipourkabir و همکارانش القاء آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 را با استفاده از تاموکسیفن آزاد و تاموکسیفن بارگذاری شده روی نانوذرات لیپیدی جامد بررسی کردند. نتایج نشان داد این ترکیبات سبب افزایش قابل توجه فعالیت آپوپتوز به شکلی وابسته به زمان و دوز بر روی سلول‌های MCF-7 می‌گردند که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد (۲۱). در سرطان پستان با گیرنده استروژن مثبت ($ER+$)، سیگنال‌دهی ER در رشد تومور نقش اساسی دارد. قطع این سیگنال‌دهی با استفاده از درمان‌هایی مانند تاموکسیفن یکی از رویکردهای موفق درمانی است (۲۲). ER از طریق افزایش بیان ژن‌هایی مانند *Cyclin D1* و *Myc* (که در چرخه سلولی نقش دارند) و *BCL2* (که مانع آپوپتوز می‌شود) به تومورزایی کمک می‌کند. تاموکسیفن با مهار این سیگنال‌ها، رشد تومور را متوقف کرده و آپوپتوز را تحریک می‌کند. مسیر ذاتی آپوپتوز از طریق میتوکندری عمل کرده و با افزایش نسبت *BAX/BCL2*، باعث آزادسازی سیتوکروم c و فعال شدن کاسپازها می‌شود (۲۳). *Cyclin D1* (پروتئین ۳۶ کیلودالتونی کد شده توسط ژن *CCND1*) بیان بالایی در تومورهای پستان دارد و تکثیر کنترل نشده سلولی و رشد تومور را تحریک می‌کند، بنابراین در پاتوژنز سرطان و مقاومت به تاموکسیفن نقش دارد (۲۴-۲۶). در مجموع، مطالعات نشان می‌دهد که *Cyclin D1* یک واسطه کلیدی تکثیر وابسته به استروژن است (۲۷). در شرایط عادی *P53* سطوح پایینی در سلول دارد، اما عوامل استرس‌زا مانند

آسیب DNA، فعال شدن انکوژن‌ها و هیپوکسی موجب تثبیت و افزایش آن از طریق تغییرات پس از ترجمه می‌شوند *P53* فعال شده با توقف چرخه سلولی یا القای آپوپتوز، نقش مهمی در مهار رشد تومور ایفا می‌کند. مطالعات Ichikawa و همکاران نشان داد که درمان سلول‌های سرطان پستان با تاموکسیفن موجب افزایش وابسته به زمان و دوز در سطح *P53* نوع وحشی می‌شود (۲۸). همچنین، داروهای ضد استروژن و مهارکننده‌های آروماتاز مانند لتروزول، آناستروزول، تاموکسیفن و فاسلودکس با افزایش سطح پروتئین و mRNA نوع وحشی *P53*، رشد سلولی را سرکوب کرده و چرخه سلولی را متوقف می‌کنند (۲۹). این مطالعات افزایش بیان *P53* پس از تیمار سلولی با تاموکسیفن را تایید می‌کنند که هم راستا با نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌باشد. در فرآیند انکوژن‌ز، بیان غیرطبیعی پروتئین‌های خانواده *BCL-2* رایج است. این خانواده شامل عوامل ضد آپوپتوز مانند *BCL2* و محرک‌های مرگ سلولی مانند *BAX* است که تعامل آن‌ها سرنوشت سلول را تعیین می‌کند (۳۰). ژن *BCL2* که در موقعیت کروموزومی 18q21 قرار دارد، به عنوان یک پروتئین‌انکوژن و عامل ضد آپوپتوز شناخته می‌شود (۳۱،۳۲). *BAX* با تشکیل هتروداایمر با *BCL2*، اثرات ضد آپوپتوز آن را خنثی کرده و نسبت *BAX/BCL2* نقش کلیدی در تصمیم‌گیری مرگ یا بقای سلول دارد (۳۳،۳۴). در این تحقیق نانو داروی TMX-FPGs به طور معنا داری سبب افزایش بیان ژن‌های *P53* و *BAX* نسبت به سلول کنترل شد. از طرفی با وجود افزایش بیان ژن *BCL2* در مقایسه با گروه کنترل، به دلیل آنکه نسبت بیان *BAX* به *BCL2* ۲/۳۵ برابر افزایش یافته است، همین امر نهایتاً منجر به القاء آپوپتوز گردیده و از این لحاظ همسو با گزارشات قبلی می‌باشد (۲۳). همچنین بیان ژن *Cyclin D1* پس

از تیمار با نانودارو نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، با توجه به اینکه مطالعات نشان می‌دهد در سلول‌های حساس به تاموکسیفن، کمبود القاء *Cyclin D1* از پیشرفت چرخه سلولی جلوگیری می‌کند (۳۵-۳۷) بنابراین نتایج بالا مورد انتظار بود و بیانگر توانایی نانوداروی تاموکسیفن در القاء آپوپتوز و جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌باشد. در مجموع، نانوداروی طراحی شده در این تحقیق نه تنها اثرات ضدتوموری تاموکسیفن را حفظ کرده، بلکه با بهره‌گیری از ویژگی‌های منحصر به فرد GQDs، امکان ردیابی دارو در داخل سلول را فراهم کرده و پتانسیل بالایی برای توسعه پلتفرم‌های درمانی-تشخیصی در سرطان پستان را دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد نانوداروی فلورسنت تاموکسیفن (TMX-FPGs) سبب کاهش توان زیستی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 با روشی وابسته به غلظت می‌شود همچنین ترکیب TMX-FPGs توانست بیان ژن‌های *P53* و *BAX* و همچنین نسبت *BAX/BCL2* را افزایش دهد و سبب القاء آپوپتوز گردد. این یافته‌ها حاکی از پتانسیل TMX-FPGs به عنوان یک سیستم دارورسانی کارآمد برای درمان سرطان پستان است که می‌تواند با افزایش اثربخشی، در درمان این بیماری مفید واقع شود. بعلاوه، مطالعات تصویربرداری سلول کانفوکال نشان داد که نانودارو TMX-FPGs، علاوه بر اینکه یک سیستم تحویل داروی ضد سرطان مناسب است، شدت فلورسانس مناسب و نفوذپذیری غشاء سلولی خوبی دارد و می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای برای تشخیص، نظارت و درمان سرطان پستان به طور همزمان داشته باشد. از جمله محدودیت‌های این تحقیق مطالعه بر روی تعداد معدودی از ژن‌های مرتبط با مسیر آپوپتوز

6. Linowiecka K, Szpotan J, Godlewska M, Gawel D, Zarakowska E, Gackowski D, et al. Selective estrogen receptor modulators' (SERMs) influence on TET3 expression in breast cancer cell lines with distinct biological subtypes. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8561.

7. Jena SK, Sangamwar AT. Polymeric micelles: a promising tool for tamoxifen delivery in cancer? *Ther. Deliv.* 2017;8(3): 109-111.

8. Öztürk-Atar K, Kaplan M, Çalış S. Development and evaluation of polymeric micelle containing tablet formulation for poorly water-soluble drug: tamoxifen citrate. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020; 46(10):1695-1704.

9. Xuan QJ, Wang JX, Nanding A, Wang ZP, Liu H, Lian X, Zhang QY. Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:619-624.

10. Ventola CL. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. *P&T.* 2017;42(12):742.

11. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanomedicine and drug delivery: A comprehensive review of recent advances. *Nanomedicine.* 2019;14(1):93-126.

12. Chung S, Revia RA, Zhang M. Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. *Adv. Mater.* 2021;33(22):1904362.

13. Some S, Gwon AR, Hwang E, Bahn GH, Yoon Y, Kim Y, Kim SH, Bak S, Yang J, Jo DG, Lee H. Cancer therapy using ultrahigh hydrophobic drug-loaded graphene derivatives. *Sci Rep.* 2014;4(1):6314.

14. Eanes LA, Eldeeb M, Storholt D, Patel YM. Naringenin impairs mitochondrial function via ROS to induce apoptosis in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2025;20(4):e0320020.

و چرخه سلولی بوده است و با توجه به گستردگی ژن‌های دخیل در این فرایندها نمی‌توان تصویر جامعی از همه مسیرهای تحت تاثیر نانودارو به دست آورد و دستیابی به این هدف نیازمند به تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد. همچنین مطالعه حاضر در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) انجام شده است ولی از آنجا که استفاده از نانوداروها ممکن است پاسخ ایمنی یا التهابی را القاء کنند پیشنهاد می‌شود در آینده، اثربخشی و ایمنی TMX-FPGs در مدل‌های حیوانی (in vivo) نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از حمایت آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره) از این اثر تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Day CM, Hickey SM, Song Y, Plush SE, Garg S. Novel tamoxifen nanoformulations for improving breast cancer treatment: Old wine in new bottles. *Molecules.* 2020; 25(5):1182.
2. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018;5(2):77-106.
3. Hung MH, Liu CJ, Teng CJ, Hu YW, Yeh CM, Chen SC, et al. Risk of second non-breast primary cancer in male and female breast cancer patients: a population-based cohort study. *PLoS One.* 2016;11(2): e0148597.
4. Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol.* 2014;10(14):2293-2301.
5. Kim N, Lukong KE. Treating ER-positive breast cancer: a review of the current FDA-approved SERMs and SERDs and their mechanisms of action. *Front Oncol Rev.* 2025; 15:1564642.

23. Dehghan MH, Hedayati M, Shivaee S, Shakib H, Rajabi S. Tamoxifen triggers apoptosis of papillary thyroid cancer cells by two different mechanisms. *Gene Rep.* 2021; 24:101266.
24. Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma. *Cells.* 2020;9(12):2648.
25. Hanf D, Müller V, Schmidt M, et al. Impact of CCND1 amplification on the prognosis of hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2025;194(2):245-256.
26. Erdyneeva DB, Babyshkina NN, Dronova TA, Vtorushin SV, Slonimskaya EM, Stegny V.N., et al. Role of cyclin D1 in the mechanisms of tamoxifen resistance. *Sib J Oncol.* 2020;19(4):138-145.
27. Ishii Y, Waxman S, Germain D. Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.* 2008;68(3):852-860.
28. Ichikawa A, Ando J, Suda K. G1 arrest and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in tamoxifen-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Hum. Cell.* 2008;21:28-37.
29. Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 2015;75(23):5001-7.
30. 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. *Front Oncol.* 2022;12:985363.
31. Huang X, Zhang Q, Wang N. The significance of Bcl-2 expression in breast cancer: A 10-year follow-up study. *J Clin Invest.* 2021;4(1):1-6.
32. Kawiak A, Kostecka A. Regulation of Bcl-2 family proteins in estrogen receptor-
15. Jayaraman S, Wu X, Kalari KR, Tang X, Kuffel MJ, Bruinsma ES, et al. Endoxifen downregulates AKT phosphorylation through protein kinase C beta 1 inhibition in ER α ⁺ breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2023;9:101.
16. Akbarzadeh I, Farid M, Javidfar M, Zabet N, Shokoohian B, Kazem Arki M, et al. The optimized formulation of tamoxifen-loaded niosomes efficiently induced apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2022; 23(2):56.
17. Khan R, Qureshi A, Azhar M, et al. Recent progress of fluorescent carbon dots and graphene quantum dots for biosensors: synthesis of solution methods and their medical applications. *J Fluoresc.* 2024; 34(3):765-782.
18. Zarepour A, Hasanzadeh M, Shadjou N. Innovative approaches for cancer treatment: graphene quantum dots for photodynamic and photothermal therapies. *J Mater Chem B.* 2024;12(5):1021-1035.
19. Rouhimoghadam M, Safarian S, Carroll JS, Sheibani N, Bidkhorji G. Tamoxifen-induced apoptosis of MCF-7 cells via GPR30/PI3K/MAPKs interactions: verification by ODE modeling and RNA sequencing. *Front Physiol.* 2018;9:907
20. Yang T, Li W, Zhou J, Xu M, Huang Z, Ming J, Huang T. A novel bystander effect in tamoxifen treatment: PPIB derived from ER⁺ cells attenuates ER⁻ cells via endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2024;15(2):147.
21. Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R. Tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *J Exp Nanosci.* 2016; 11(3):161-74.
22. Yang T, Li W, Zhou J, Xu M, Huang Z, Ming J, Huang T. A novel bystander effect in tamoxifen treatment: PPIB derived from ER⁺ cells attenuates ER⁻ cells via endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2024;15(2):147.

35. Kilker RL, Planas-Silva MD. Cyclin D1 is necessary for tamoxifen-induced cell cycle progression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(23):11478-11484.
36. Zhang Y, Wang Y, Li X. Cyclin D1 suppression enhances tamoxifen sensitivity by arresting cell cycle progression in ER-positive breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2023;22(4):512-524.
37. Shi Q, Li Y, Jin L, et al. LncRNA DILA1 inhibits Cyclin D1 degradation and contributes to tamoxifen resistance in breast cancer. *Nat Commun.* 2020;11:5515.
- positive breast cancer and their implications in endocrine therapy. *Cancers.* 2022;14(2): 279.
33. Martinez-Arribas F, Martín-Garabato E, Zapardiel I, Sánchez J, Lucas AR, Tejerina A, Schneider J. Bax expression in untreated breast cancer: an immunocytometric study of 255 cases. *Anticancer Res.* 2008;28(5A): 2595-2598.
34. Kim IY, Han SY, Moon A. Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2004;67(23-24):2025-2035.