

Research Article

## Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on the Expression of Zinc Transporter 1-4 Genes in the Male rat hippocampal cell line<sup>1</sup>

<b>Maede Nilechi</b>	PhD. Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. maedenilechi@yahoo.com
<b>Akram Eidi</b>	Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. akram_eidi@yahoo.com
<b>Hamid Galehdari</b>	Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (Corresponding Author). galehdari@scu.ac.ir
<b>Mahnaz Kesmati</b>	Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. m.kesmati@scu.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Zinc plays an important role in the function of vital organs, especially the central nervous system. Zinc homeostasis disorder causes and progresses nervous system diseases such as Alzheimer, depression, learning disabilities and stress. Zinc homeostasis in the body is mediated by ZnT and ZIP proteins. The aim of this study was to investigate the effect of zinc oxide nanoparticles on the expression of *Znt1*, *Znt2*, *Znt3*, and *Znt4* genes in hippocampus cells as one of the tissues with high zinc density.

**Material and methods:** First, the cell passage of the hippocampus cell line was performed, then the MTT assay test was performed for zinc oxide nanoparticles. In the next step, RNA extraction and CDNA synthesis were performed, and nanodrop spectrophotometer was used to ensure the purity of the RNA samples. Specific and appropriate primers of the desired genes were designed and synthesized. Then, changes in the expression of *Znt1*, *Znt2*, *Znt3*, and *Znt4* genes were investigated using Real-Time RT-PCR.

- 
1. **The present study is taken from:** the PhD thesis in Cellular and Molecular Biology entitled **Evaluation the role of zinc-oxide nanoparticles on expression of zinc transporter genes 1, 2, 3 and 4 in hippocampus of rats under acute restraint stress**, by Maede Nilechi, Supervisors: Dr. Akram Eidi and Dr. Hamid Galehdari, Advisor: Dr. Mahnaz Kesmati was presented at the Islamic Azad University, science and research brach, in 1400.

**Received:** 2020/12/22 ; **Accepted:** 2021/03/23

\*\*Copyright © the authors

<http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir>



**Results:** Concentrations of 10 and 20  $\mu\text{g/mL}$  of zinc oxide nanoparticles, significantly increased the expression of *Znt1*, *Znt2*, *Znt3*, and *Znt4* genes in the hippocampus cell line of rat, while creating the lowest cytotoxicity.

**Conclusion:** Zinc oxide nanoparticles can be investigated pharmacologically by increasing the expression of *Znt1*, *Znt2*, *Znt3*, and *Znt4* genes in the treatment of zinc homeostasis disorders such as Alzheimer, depression, learning disabilities and stress.

**Keywords:** Gene Expression, Hippocampus, Nanoparticles, Rats, Real-Time RT-PCR, ZnO, Znt.

## اثرات نانوذرات اکسید روی بر بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی ۱-۴ در سل لاین هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر<sup>۱</sup>

مانده نیله‌چی | دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. maadeniichi@yahoo.com  
اکرم عیدی | استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. akram\_eidi@yahoo.com  
حمید گله‌داری | استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (نویسنده مسئول). galehdari@scu.ir  
مهناز کسمتی | استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. M.kesmati@scu.ac.ir

### چکیده

سابقه و هدف: عنصر روی نقش مهمی در کارکرد ارگان‌های حیاتی، به ویژه سیستم عصبی مرکزی ایفا می‌نماید. اختلال در هموستازی روی موجب ایجاد و پیشرفت بیماری‌های سیستم عصبی نظیر آلزایمر، افسردگی، اختلال در یادگیری و استرس می‌گردد. هموستازی روی در بدن توسط پروتئین‌های ZnT و ZIP صورت می‌پذیرد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر نانوذرات اکسید روی در بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی ۱-۴ موسوم به *Znt3*، *Znt2*، *Znt1* و *Znt4* در سلول‌های هیپوکامپ به عنوان یکی از بافت‌هایی که تراکم بالایی از روی را در خود جای داده، می‌باشد. روش کار: ابتدا پاساژ سلولی رده سلولی هیپوکامپ انجام شد، سپس تست MTT assay برای نانوذره اکسید روی صورت گرفت. در مرحله بعد استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شده و جهت اطمینان از خلوص نمونه RNA از اسپکتروفتومتر نانودراپ استفاده گردید و پرایمرهای اختصاصی و مناسب ژن‌های مورد نظر طراحی و سنتز شد. سپس با استفاده از Real-Time PCR تغییرات بیان ژن‌های *Znt4*، *Znt3*، *Znt2*، *Znt1* بررسی گردید. یافته‌ها: غلظت‌های ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  از نانوذره اکسید روی ضمن ایجاد کم‌ترین سیتوتوکسیته، موجب افزایش بیان معنادار هر چهار ژن *Znt3*، *Znt2*، *Znt1* و *Znt4* در رده سلولی هیپوکامپ موش صحرایی گردید. نتیجه‌گیری: نانوذره اکسید روی می‌تواند با افزایش بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی *Znt3*، *Znt2*، *Znt1* و *Znt4* در درمان بیماری‌های ناشی از اختلال هموستازی روی نظیر آلزایمر، افسردگی، اختلال در یادگیری و استرس مورد بررسی داروشناسی قرار گیرد.

**کلیدواژه‌ها:** بیان ژن، هیپوکامپ، نانوذرات، موش‌های صحرایی، Real-Time RT-PCR، ZnO، ZnT

۱. پژوهش حاضر برگرفته از: رساله دکتری تخصصی رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مانده نیله‌چی، با عنوان: بررسی نقش نانوذرات اکسید روی بر بیان ژن‌های زینک ترانسپورتر ۱، ۲، ۳ و ۴ در هیپوکامپ موش‌های صحرایی تحت استرس محدودیت حرکتی، حاد، استاد راهنما: دکتر اکرم عیدی و دکتر حمید گله‌داری و استاد مشاور دکتر مهناز کسمتی، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات در سال ۱۴۰۰ است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۳

## ۱. مقدمه

روی به عنوان یک عنصر حیاتی در سلامت بدن شناخته می‌شود که چندین نقش مهم در سیستم عصبی و ایمنی ایفا می‌نماید (۱). تراکم روی در قسمت‌های مختلف مغز و به ویژه هیپوکامپ به مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متنوعی مربوط می‌گردد. در خلال کنش‌های عصبی، انتقال روی سلولی در رشته‌های خزه‌ای هیپوکامپ صورت می‌گیرد. از این رو می‌توان روی را به عنوان یک تنظیم‌کننده عصبی در بدن به شمار آورد (۲). از سوی دیگر کمبود روی باعث ترشح قابل ملاحظه هورمون گلوکوکورتیکوئید شده که این امر به نوبه خود سبب بروز انواع عوارض عصبی- رفتاری از جمله موارد خاصی از آلزایمر و عملکرد نادرست مغز نظیر صرع می‌گردد (۳). همچنین روی با دارا بودن خواص ضد التهابی، ضد اضطرابی، ضد افسردگی و تسکینی می‌تواند به عنوان یک عامل مداخله‌گر درمانی برای مقابله با عوارض رفتاری به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرد (۴). انتقال روی سلولی، به میزان روی در رژیم غذایی و نیز شرایط فیزیولوژیکی بستگی دارد و توسط پروتئین‌های انتقال‌دهنده روی صورت می‌پذیرد (۵).

نتایج مطالعات تجربی نشان می‌دهد که اختلال در تنظیم بیان انتقال‌دهنده‌های روی باعث ابتلاء و یا پیشرفت بیماری‌ها از جمله انواع سرطان، آسم، دیابت، اختلال در عملکرد مغز و بیماری‌های روانی مانند افسردگی می‌گردد (۶-۸). هموستازی روی به طور عمده توسط دو خانواده از پروتئین‌های انتقال‌دهنده روی به نام‌های ZIP و ZnT صورت می‌پذیرد. پروتئین‌های عضو خانواده ZIP وظیفه انتقال روی از فضای خارج سلولی به درون سلول را بر عهده دارند و باعث افزایش روی درون سلولی می‌شوند. پروتئین‌های عضو خانواده ZnT، روی را از سیتوپلاسم به اندامک‌ها یا ماتریکس خارج سلولی منتقل می‌نمایند (۹).

اولین پروتئین خانواده ZnT موسوم به ZnT1، در غشای پلاسمای بافت‌های مختلف از جمله مغز قرار دارد (۱۰). این پروتئین، یون‌های روی سیتوزولی را به فضای خارج سلولی منتقل می‌نماید و در شرایط مختلف فیزیولوژیکی از انباشت روی در سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند (۱۱). پروتئین ZnT2 نقش مهمی در انتقال روی به شیر مادر داشته و به طور عمده در روده، کلیه و بیضه موش صحرائی بیان شده و کم‌تر در مغز بیان می‌شود (۱۲). پروتئین ZnT3 نقش اساسی در چندین مسیر سیگنالینگ عصبی در هیپوکامپ ایفا می‌کند (۱۳). هر دو پروتئین ZnT2 و ZnT3، روی سیتوپلاسمی را به اجزای ویزیکولار منتقل نموده و باعث کاهش روی درون سلولی می‌شوند

(۱). پروتئین ZnT4 با انتقال روی به دستگاه گلژی، وظیفه حفظ هموستازی روی در اندامک‌های درون سلولی مختلف در انواع بافت‌ها از جمله مغز را بر عهده دارد. همچنین در خلال فرآیند شیردهی، این پروتئین یون‌های روی را به شیر مادر منتقل می‌نماید (۱۴).

با توجه به ماهیت منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی نانوذرات که باعث کاربرد گسترده آنها در عرصه بیوتکنولوژی و علوم پزشکی شده است، نانوذرات اکسید روی<sup>۱</sup> نیز در زمینه اهداف درمانی و تکنولوژیکی در صنایع مختلف مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱۵-۱۶). مشاهدات تجربی نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی سبب افزایش قابل توجه بیان ژن‌های ZnT1 و ZnT2 در سلول‌های هپاتوسیت<sup>۲</sup> انسان می‌شود (۱۷). نانوذرات اکسید روی افزایش بیان ژن ZnT1 در رده سلولی گونه‌ای از سلول‌های اپیتلیال<sup>۳</sup> را در پی داشته است و بسته به دوز و سایز نانوذره می‌تواند باعث سمیت سلولی شود (۱۸).

با وجود مطالعات صورت گرفته در زمینه اثرات نانوذرات اکسید روی بر موش و موش صحرائی، تاکنون تأثیر این نانوذره بر بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی در سلول‌های هیپوکامپ مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر تغییرات بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* بر اثر دریافت نانوذره اکسید روی در رده سلولی هیپوکامپ موش صحرائی نر را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

## ۲. روش کار

### ۲-۱. پاساژ دادن

در این مطالعه از رده سلولی هیپوکامپ موش صحرائی (تهیه شده از انیستیتو پاستور فرانسه) استفاده شد. این رده سلولی در محیط کشت DMEM (L-G) ۹۰% به اضافه‌ی FBS ۱۰% و مجموعه‌ی آنتی بیوتیکی پنسیلین/ استرپتومایسین (شرکت Sigma) و در فلاسک‌های ۱۰۰ cc کشت داده شد. به منظور نگهداری سلول‌ها، آنها به طور منظم پاساژ داده شدند. برای این منظور ابتدا محیط رویی فلاسک که همان محیط کشت DMEM است، دور ریخته شد. سلول‌های به

- 
1. ZnO NPs
  2. HepG2
  3. A549 Cell line

کف چسبیده با ۱ تا ۲ میلی لیتر PBS شستشو داده شد و برای حصول نتیجه بهتر، این کار دو مرتبه انجام شد. به منظور جدا کردن سلول‌هایی که به کف چسبیده بودند، در حدود ۲ میلی لیتر تریپسین ۰/۲۵ درصد به فلاسک افزوده و به آرامی تکان داده شد تا تمام سطح فلاسک با تریپسین تماس پیدا کند و سپس به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، فلاسک از انکوباتور بیرون آورده شد و سلول‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. در صورتی که ۸۰ تا ۹۰ درصد سلول‌ها گرد شده باشد، با یک ضربه آرام، سلول‌ها از کف فلاسک جدا و شناور می‌شوند. بعد از این مرحله، سریعاً به سلول‌ها محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد اضافه گردیده و با پیپت پاستور چند بار پر و خالی شد تا اطمینان حاصل شود سلولی به کف فلاسک نچسبیده است. از آنجا که تریپسین، دیواره سلولی را از بین می‌برد، باید آن را کاملاً خنثی و خارج کرد. به همین منظور سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در ادامه محیط رویی سلول‌ها خارج گردید و ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد به رسوب سلولی اضافه شد و به آرامی آسپیره شد تا سلول‌ها به صورت منفرد درآیند. از این سوسپانسیون سلولی حجم معینی به فلاسک ۲۵ سانتیمتری حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد منتقل و کشت داده شد. سپس به ۲ فلاسک ۲۵ سی سی، حدود ۴/۵ سی سی محیط کشت آماده دارای سرم اضافه کرده و به ازای هر کدام ۰/۵ سی سی از سوسپانسیون سلولی هموزن شده اضافه گردید. از سلول‌ها حداقل سه بار زیرکشت تهیه شد تا برای جداسازی RNA و سایر آزمایشات، مناسب گردد.

## ۲-۲. نانوذره اکسید روی

ماده‌ی مورد استفاده در این پژوهش نانوذره‌ی اکسید روی محصول شرکت USnano با اندازه‌ای بین ۱۰ الی ۳۰ نانومتر می‌باشد که از شرکت کیمیا طب تهیه گردید.

## ۲-۳. MTT assay

به منظور بررسی سیتوتوکسیسیتی نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های هیپوکامپ، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده می‌شود. در این روش که یکی از نمک‌های محلول تترازولیم به نام MTT استفاده می‌گردد، ارزیابی بقای سلول براساس میزان جذب نوری رنگ صورت می‌پذیرد. کلیه مراحل این آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ی کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه خواننده الایزا اندازه‌گیری می‌شود. لذا تعداد زیادی نمونه را می‌توان هم‌زمان آزمایش کرد. متیل دی

فنیل تترازولیوم بروماید یک رنگ تترازولیوم زرد رنگ محلول در آب است که از غشای پلاسمایی و غشای میتوکندری عبور می‌کند و تحت تأثیر آنزیم‌های میتوکندریایی احیاء می‌شود. در نتیجه از واکنشی که در میتوکندری اتفاق می‌افتد، جهت اندازه‌گیری فعالیت متابولیک میتوکندری استفاده می‌شود. این واکنش احیاء هنگامی که آنزیم‌های میتوکندری فعال هستند، اتفاق می‌افتد و اغلب به عنوان معیار زنده بودن سلول‌ها در نظر گرفته می‌شوند. در این تست ماده‌ی زرد رنگ MTT بر اثر احیاء شدن توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری به فورمازان آبی - ارغوانی رنگ درمی‌آید که در آب محلول نبوده و در دی متیل سولفاکساید<sup>۱</sup> محلول می‌باشد.

در این مطالعه پس از شمارش سلول‌های هیپوکامپ، حجمی از سوسپانسیون که حاوی ۵۰۰۰ سلول می‌باشد، در هر یک از چاهک‌ها کشت داده شد و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شد. به منظور تعیین غلظت مناسب، سلول‌های هیپوکامپ موش در معرض نانوذره‌ی اکسید روی در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر لیتر قرار گرفته و به چاهک‌های تست اضافه گردید که برای هر غلظت سه تکرار در پلیت ۹۶ خانه صورت گرفت. پلیت را ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت تأثیر نانوذره اکسید روی، انکوبه نموده و محیط کشت رویی دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه نموده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا قرائت شد.

## ۲-۴. استخراج RNA

پس از گذشت مدت زمان لازم جهت تیمار سلول‌ها با نانو ذره، محتویات کلیه چاهک‌ها تخلیه گردید. در این مطالعه برای استخراج RNA کل از محلول ترايزول (محصول شرکت Roche با شماره ۱۱۶۶۷۱۶۵۰۰۱) استفاده شد. در ابتدا محیط کشت از روی سلول‌ها برداشته شد و سطح آنها با بافر PBS ۱۰% دو بار شسته شد. ۸۰۰ میکرو لیتر ترايزول روی سلول‌ها (حدوداً ۱۰۶ سلول) ریخته شد و با بیپیتینگ سلول‌ها از سطح پتری کنده شده و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. به ازای هر یک میلی لیتر

ترایزول، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به میکروتیوب اضافه و ۱۵ ثانیه با دست به شدت تکان داده شد. میکروتیوب‌ها ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سه فاز تشکیل شد، فاز آبی بالایی (بی رنگ) را به یک تیوب جدید منتقل و به آن به میزان ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپرانولول سرد اضافه و مخلوط شد. در لایه سفید رنگ میانی DNA قرار داشته و پروتئین در لایه پایینی به رنگ قرمز مشاهده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شد و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه و به آرامی تکان داده شد تا رسوب آزاد شود. میکروتیوب‌ها به مدت ۸ دقیقه با ۷۶۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شد و رسوب‌ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه خشک گردید. بسته به میزان رسوب، ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase به میکروتیوب اضافه و رسوب در آن حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه RNA استخراج شده تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

## ۲-۵. طراحی پرایمر

توالی‌های ژنی مربوط به سل لاین هیپوکامپ مورد نظر، از پایگاه اطلاعات ژنی NCBI دریافت و پرایمرهای اختصاصی با استفاده از پایگاه [www.GeneScript.com](http://www.GeneScript.com) طراحی گردید. الیگونوکلوئوتیدهای طراحی شده پایانی با استفاده از محیط آنالین Nucleotid Blast از سایت NCBI با کل توالی‌های ژنوم موش صحرائی مقایسه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR در بررسی سل لاین

ژن	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Act $\beta$	TATCGGCAATGAGCGGTTC	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG
Znt1	ACCAGGAGCAGACCAACAC	CTCAACTTCTCTGGCTCTGC
Znt2	GCACCTTCCTTCTCCATC	GTAAGGCTTCCACACCATCC
Znt3	TCAGCACCTTCTTCTC	GTGGAAGTAAGCGTCAGC
Znt4	AGTCGTTGATGAAGATAGAAGATG	CGAATGTGTTCCAGCAAGAGG

## ۲-۶. تست Real-Time PCR

در این تحقیق با استفاده از Real-time PCR میزان بیان ژن‌های Znt1، Znt2، Znt3 و Znt4



نسبت به بیان ژن  $\beta$  act (به عنوان ژن کنترل) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش از سایبرگرین به عنوان ماده فلورسانت استفاده گردید که به DNAهای دو رشته‌ای متصل شده و فلورسانس ساطع شده در چرخه‌ای تحت عنوان چرخه آستانه (CT) توسط دستگاه گزارش شده و سپس CT مورد آنالیز قرار گرفت.

در هر واکنش Real Time منحنی ذوب رسم گردید که نشان‌دهنده وجود محصول اختصاصی، غیراختصاصی و پرایمر دایمر است. بدین صورت که پیک پرایمر دایمر قبل از پیک محصول قرار می‌گیرد. اگر در ویال، محصول اختصاصی مد نظر، تکثیر شده باشد، یک پیک و اگر دو پیک مجزا از هم داشته باشیم، یعنی به غیر از محصول اختصاصی مد نظر، محصول غیراختصاصی نیز داریم. برای سنتز cDNA از کیت (۲۰۰ reaction) primeScript RT Reagent محصول کمپانی Takara استفاده شد. سنتز cDNA بر طبق دستورالعمل کیت انجام شد که به طور خلاصه طی این دستورالعمل محلول‌ها، بافرها و آب فاقد RNAase قبل از شروع به کار در دمای محیط (۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب شدند. نمونه RNA روی یخ ذوب شده و برای شروع به کار آماده شد. همه اجزای مورد نیاز براساس جدول ۲ تهیه و محتویات این مخلوط به خوبی با هم مخلوط شدند.

جدول ۲- اجزای واکنش رونویسی معکوس

واکنش‌گر	حجم در یک واکنش
آنزیم PrimeScript RT	۰/۵ میکرو لیتر
بافر 5X PrimeScript	۲ میکرو لیتر
پرایمرهای الیگو dT (۲۵ pM)	۰/۵ میکرو لیتر
راندوم هگزامر (۵۰ pM)	۰/۵ میکرو لیتر
آب فاقد RNase	تا حجم مواد به ۱۰ میکرو لیتر برسد
Total RNA	۱ میکرو گرم
حجم نهایی	۱۰ میکرو لیتر

مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیر فعال شدن آنزیم Quantiscript Reverse Transcriptase انکوبه شد. محصول cDNA حاصل، ماه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل ABI 7500 (آمریکا) و نرم‌افزار مربوط به آن (SDS 2.4) استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد، مرحله اول که

منجر به دناتوره شدن مولکول cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز گردید، به صورت ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم ۹۵ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) به صورت ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه به مدت ۱ ثانیه انجام شد.

واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به صورت تکرار سه تایی انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۸ میکرولیتر master SYBR-Green PCR، ۲ میکرولیتر پرایمر رقیق شده اختصاصی هر ژن، ۲ میکرولیتر cDNA و ۳ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید تا به حجم ۱۵ میکرولیتر رسید.

## ۲-۷. آنالیز آماری

به منظور بررسی آماری نتایج بدست آمده در این تحقیق، از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۸) استفاده شد. کلیه داده‌ها در قالب میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد ارائه شده است. در بررسی MTT، مقایسه میان گروه‌های مختلف با روش One Way ANOVA صورت گرفت. آزمون t-test برای محاسبه مقدار p و به منظور بررسی تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه نرم افزار REST ویرایش ۲۰۰۹ مورد استفاده قرار گرفت که در کلیه مراحل آنالیز آماری، محدوده  $P < 0.05$  بیانگر معناداری تغییر بیان ژن، لحاظ گردید.

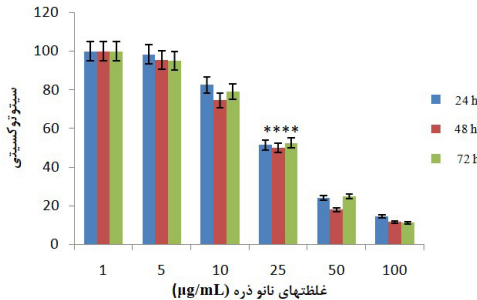
## ۳. یافته‌ها

### ۳-۱. تکنیک MTT assay

میانگین جذب نوری به دست آمده از سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره قرار گرفتند، با میانگین جذب نوری سلول‌هایی که تحت تأثیر نانوذره نبودند (خانه کنترل) مقایسه شدند. مجموع نتایج جذب که در سه گروه تکرار شده بود، توسط نرم افزار Excel به نمودار تبدیل شد. با انجام بررسی آماری، نتایج بدست آمده از بررسی میزان سمیت سلولی برای نانوذره، ارزیابی شد و مشخص گردید که بین درصد مرگ و میر سلول‌های تیمار شده با نانوذره در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دوزهای مختلف، تفاوت معناداری وجود دارد.

IC50 برای نانوذره در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد و با توجه به نتایج تست MTT، غلظت ۲۵  $\mu\text{g/mL}$  از نانوذره کم‌ترین سیتوتوکسیسیته را بر روی سلول‌های

هیپوکامپ در پی داشت (شکل ۱).

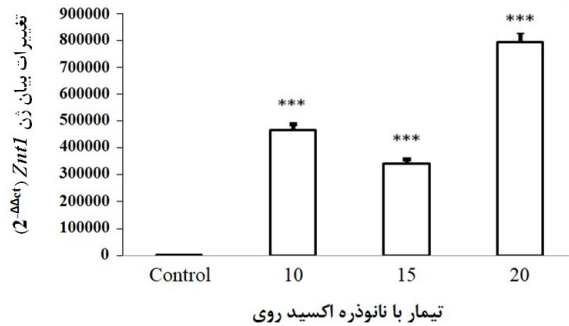


شکل ۱- مقایسه میزان سیتو توکسیسیته به دست آمده در غلظت‌های مختلف نانوذره در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار

### ۲-۳. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* در سلول‌های هیپوکامپ موش تحت تأثیر نانوذره

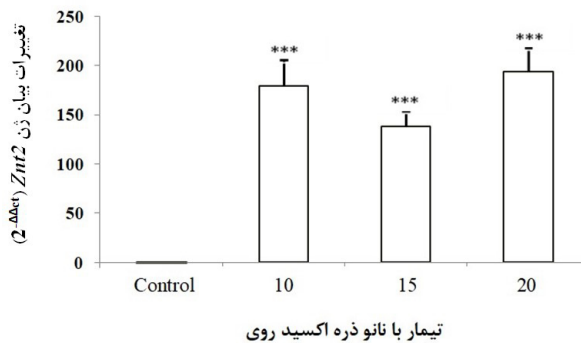
با توجه به نتایج تست MTT، تغییرات بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* در سلول‌های هیپوکامپ موش تحت تأثیر غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ µg/ml از نانوذره اکسید روی در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری شد. میانگین Ct های حاصل از خوانش نمونه‌هایی که به صورت دوبریکیت به دستگاه ABI 7500 داده شده، وارد برنامه Excel شد. تفاوت بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* و ژن کنترل داخلی *act β*، در میان گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار REST مشخص شد. نتایج کم‌تر از ۰/۰۵ به صورت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مطابق با شکل ۲ بیان ژن *Znt1* نسبت به گروه کنترل در غلظت‌های ۱۰ µg/mL ( $p=0/000078$ )، ۱۵ µg/mL ( $p=0/00022$ ) و ۲۰ µg/mL ( $p=0/00021$ ) از نانوذره اکسید روی افزایش معناداری نشان داده است. در غلظت ۱۵ µg/mL نسبت به غلظت ۱۰ µg/mL کاهش بیان دیده می‌شود که این کاهش معنادار است ( $p=0/0023$ ). در تیمار ۲۰ µg/mL از نانوذره بیان ژن نسبت به تیمار با غلظت ۱۰ و ۱۵ µg/mL افزایش بیان قابل توجهی داشته است (به ترتیب  $p=0/0005$  و  $p=0/0004$ ). بیشترین افزایش بیان برای این ژن با غلظت ۲۰ µg/mL صورت پذیرفت.



شکل ۲- تغییرات بیان ژن *Znt1* در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ μg/mL از نانوذره اکسید روی و گروه کنترل

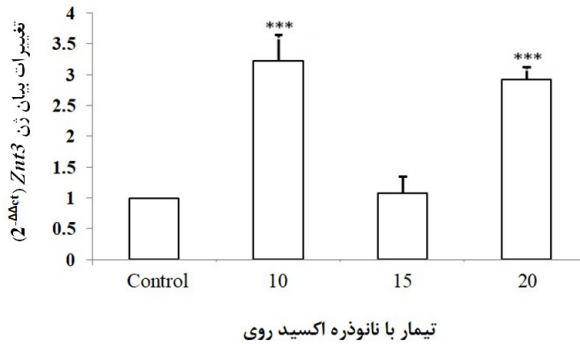
مطابق شکل ۳ بیان ژن *Znt2* نسبت به گروه کنترل در غلظت‌های ۱۰ μg/mL ( $p=0/005$ )، ۱۵ μg/mL ( $p=0/007$ ) و ۲۰ μg/mL ( $p=0/003$ ) از نانوذره اکسید روی افزایش معناداری نشان داده است. در غلظت ۱۵ μg/mL نسبت به غلظت ۱۰ μg/mL کاهش بیان معناداری وجود ندارد ( $p=0/13$ ). در تیمار ۲۰ μg/mL از نانوذره اکسید روی بیان ژن نسبت به غلظت ۱۰ و ۱۵ μg/mL افزایش بیان، معنادار نیست ( $p=0/3$  و  $p=0/06$ ).



شکل ۳- بیان ژن *Znt2* در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ μg/mL از نانوذره اکسید روی و گروه کنترل

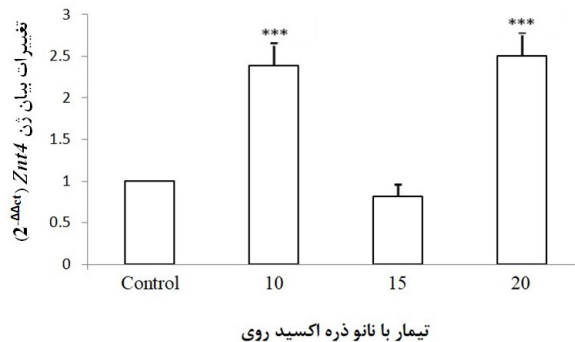
بیان ژن *Znt3* در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ μg/mL از نانوذره نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داده است ( $p=0/0026$  و  $p=0/007$ ). اما افزایش بیان با غلظت ۱۵ μg/mL از نانوذره نسبت به گروه کنترل معنادار نبوده است ( $p=0/14$ ). در تیمار با غلظت ۱۵ μg/mL نسبت به غلظت ۱۰ μg/mL کاهش بیان معنادار ژن *Znt3* دیده می‌شود ( $p=0/0023$ ). در تیمار ۲۰ μg/mL

نانوذره، بیان ژن نسبت به غلظت ۱۰  $\mu\text{g/mL}$  کاهش نشان داده که این کاهش معنادار نبوده ( $p=0/0004$ )، ولی نسبت به غلظت ۱۵  $\mu\text{g/mL}$  افزایش بیان معنادار داشته است ( $p=0/15$ ). بیشترین افزایش بیان برای این ژن در تیمار با غلظت ۱۰  $\mu\text{g/mL}$  مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- بیان ژن *Znt3* در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  از نانوذره اکسید روی و گروه کنترل

بیان ژن *Znt4* در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  از نانوذره نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داده است ( $p=0/0071$  و  $p=0/0064$ ). بیان این ژن در غلظت ۱۵  $\mu\text{g/mL}$  کاهش نشان داده که این کاهش نسبت به گروه کنترل معنادار نمی‌باشد ( $p=0/24$ )، اما این کاهش نسبت به غلظت‌های ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  معنادار است ( $p=0/0074$  و  $p=0/0082$ ). اختلاف بیان ژن در غلظت ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  نسبت به ۱۰  $\mu\text{g/mL}$  تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد ( $p=0/35$ ). بیشترین افزایش بیان برای این ژن با غلظت ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  صورت پذیرفت (شکل ۵).



شکل ۵- بیان ژن *Znt4* در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  از نانوذره اکسید روی و گروه کنترل

#### ۴. بحث

روی به عنوان یک عنصر اساسی در ارگان‌های حیاتی شناخته شده است و اختلال در هموستازی این عنصر در بدن موجب بروز بیماری‌های مختلف از جمله آلزایمر، اختلال در یادگیری و افسردگی می‌شود (۱-۲). همچنین ترشح هورمون کورتیکوسترون باعث افزایش روی درون سلولی شده که موجب تولید اکسیژن غیرفعال در سلول‌های هیپوکامپ می‌گردد (۱۹). در میان اجزای مختلف، سیستم عصبی مرکزی هیپوکامپ بیشترین تراکم روی را دارد که بر اثر محرک‌های عصبی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۲۰). تزریق داروی حاوی نانوذره روی موجب بهبود اثرات رفتاری در موش‌های تحت استرس شده است (۲۱). با توجه به این که هموستازی روی در بدن توسط پروتئین‌های انتقال‌دهنده روی صورت می‌پذیرد، به منظور کاهش اثرات و یا درمان بیماری‌های مرتبط با اختلالات هموستازی روی، مطالعه اثرات نانوذرات اکسیدهای فلزی به ویژه نانوذره اکسید روی بر بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه تاثیر نانوذرات اکسید روی بر بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* در رده سلولی هیپوکامپ موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مطابق با نتایج بدست آمده، نانوذره اکسید روی باعث افزایش بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* در رده سلولی هیپوکامپ می‌گردد. در مطالعه مشابهی تزریق نانوذره اکسید روی باعث افزایش بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2* و *Znt4* در بافت‌های کبد، پانکراس و کلیه موش گردیده بود (۲۲). پیش از این نقش پروتئین *Znt1* در مقابله با انباشته شدن و پیشگیری از سیتوتوکسیته روی در سلول‌ها مشخص شده بود (۲۳). از سوی دیگر نشان داده شده است که فقدان روی در رژیم غذایی نیز باعث کاهش بیان ژن *Znt1* در مغز می‌گردد (۲۴). همچنین طی بررسی‌های گذشته بیان ژن *Znt2* به ندرت در مغز گزارش شده و بیشتر تغییرات بیان این ژن در بافت‌های دیگر از قبیل بیضه، روده و کلیه مشاهده شده است (۲۵). بیان ژن *Znt3* در برابر تغییرات روی در رژیم غذایی، تغییر معناداری در بافت مغز نداشته است (۲۳). در حالی که نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده افزایش بیان ژن *Znt3* در رده سلولی هیپوکامپ در اثر دریافت نانوذره اکسید روی است. بر اثر افزایش میزان روی در رژیم غذایی به منظور پیشگیری از انباشته‌گی روی و تولید سمیت سلولی و نیز ذخیره‌سازی روی در بخش‌های درون سلولی، ژن‌های *Znt1* و *Znt4* در اکثر بافت‌ها و ژن *Znt2* در روده کوچک، کلیه، کبد و جفت بیان می‌شود (۱۲، ۲۶).

مطالعات بیشتری نیاز است تا تاثیر همزمان بیماری‌های ناشی از اختلال مکانیسم روی و داروی حاوی نانوذره اکسید روی مورد بررسی قرار گیرد و در ضمن آن تغییرات بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی مورد بررسی قرار گیرد. این در حالی است که تاثیر مطلوب‌تر استفاده از نانوذرات اکسید روی نسبت به داروهای رایج، حاوی روی و یا رژیم‌های غذایی مبتنی بر این عنصر در بیان ژن‌های انتقال‌دهنده محققان را بر آن داشته تا مطالعات خود را بر درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی از قبیل آلزایمر، اختلال در یادگیری، اضطراب، افسردگی و استرس معطوف نمایند.

### ۵. نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و تیمار رده سلولی هیپوکامپ موش صحرائی با نانوذره اکسید روی با دوزهای ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{g/mL}$  بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* افزایش معنادار داشته و کم‌ترین سیتوتوکسیته رخ می‌دهد و می‌تواند در زمینه‌های دارو درمانی بیماری‌های ناشی از اختلال هموستازی روی نظیر بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی حائز اهمیت باشد.

### ۶. تقدیر و تشکر

محققان این پژوهش مراتب قدردانی خود را از مسئولین محترم آزمایشگاه ژنتیک و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز و نیز آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک نرگس اهواز اعلام می‌نمایند.

## References

1. Gower-Winter SD, Levenson CW. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *Biofactors*. 2012; 38(3): 186-93.
2. Takeda A, Tamano H, Ogawa T, Takada S, Ando M, Oku N, Watanabe M. Significance of serum glucocorticoid and chelatable zinc in depression and cognition in zinc deficiency. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1): 259-64.
3. Dou X, Tian X, Zheng Y, Huang J, Shen Z, Li H & et al. Psychological stress induced hippocampus zinc dyshomeostasis and depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2014; 273: 133-8.
4. Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Am Coll Nutr*. 2009; 28: 257-65.
5. Song Y, Elias V, Wong CP, Scrimgeour AG, Ho E & et al. Zinc transporter expression profiles in the rat prostate following alterations in dietary zinc. *Biometals*. 2010; 23(1): 51-8.
6. Pfaender S, Föhr K, Lutz AK, Putz S, Achberger K, Linta L & et al. Cellular zinc homeostasis contributes to neuronal differentiation in human induced pluripotent stem Cells. *Neural Plast*. 2016; 3760702.
7. Chowanadisai W, Graham DM, Keen CL, Rucker RB, Messerli MA. A zinc transporter gene required for development of the nervous system. *Commun Integr Biol*. 2013; 6(6): e26207.
8. Gower-Winter SD, Corniola RS, Morgan Jr TJ, Levenson CW. Zinc deficiency regulates hippocampal gene expression and impairs neuronal differentiation. *Nutr Neurosci*. 2013; 16(4): 174-82.
9. Bin BH, Seo J, Kim ST. Function, structure, and transport aspects of ZIP and ZnT zinc transporters in immune cells. *J Immunol Res*. 2018; 9365747.
10. Downey AM, Hales BF, Robaire B. Zinc transport differs in rat spermatogenic cell types and is affected by treatment with cyclophosphamide. *Biol Reprod*. 2006; 95(1): 22.
11. Jobarteh ML, Mcardle HJ, Holtrop G, Sise EA, Prentice AM, Moor SE. mRNA levels of placental iron and zinc transporter genes are upregulated in gambian women with low iron and zinc status. *J Nutr*. 2017; 1401-9.
12. Lee S, Hennigar SR, Alam S, Nishida K, Kelleher SL. Essential role for zinc transporter 2 (ZnT2)-mediated zinc transport in mammary gland development and function during lactation. *J Biol Chem*. 2015; 290 (21): 13064-78.
13. Lee JY, Kim JS, Byun HR, Palmiter RD, Koh JY. Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain. *Brain Res*. 2011; 1418: 12-22.
14. McCormick NH, Kelleher SL. ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 303 (3): 291-7.
15. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2011; 1062562.
16. Scherzad A, Meyer T, Kleinsasser N, Hackenberg S. Molecular mechanisms of zinc



- oxide nanoparticle-induced genotoxicity short running title: genotoxicity of ZnO NPs. *Materials*. 2017; 10(12): 1427.
17. Chevallet M, Gallet B, Fuchs A, Jouneau PH, Um K, Mintz E. Metal homeostasis disruption and mitochondrial dysfunction in hepatocytes exposed to sub-toxic doses of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2016; 8(43): 18495-506.
  18. Hanagata N, Xu M, Takemura T, Zhuang F. Cellular response to ZnO nanoparticle toxicity inferred from global gene expression profiles. *Nano Biomed*. 2010; 2(2): 153-69.
  19. Zheng Y, Huang J, Tao L, Shen Z, Li H, Mo F & et al. Corticosterone increases intracellular Zn (2+) release in hippocampal HT-22 cells. *Neurosci Lett*. 2015; 588: 172-7.
  20. Portbury SD, Adlard PA. Zinc signal in brain diseases. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 2506.
  21. Torabi M, Kesmati M, Pourreza N, Varzi HN, Galehdari H. Neurobehavioral and biochemical modulation following administration of MgO and ZnO nanoparticles in the presence and absence of acute stress. *Life Sci*. 2018; 203: 72-82.
  22. Wang C, Lu J, Zhou L, Li J, Xu J, Li W & et al. Effects of long-term exposure to zinc oxide nanoparticles on development, zinc metabolism and biodistribution of minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in mice. *PLoS*. 2016; 11(10): e0164434.
  23. Lehvy AI, Horev G, Golan Y, Shammai Y, Assaraf YG. Alterations in ZnT1 expression and function lead to impaired intracellular zinc homeostasis in cancer. *Cell Death Discov*. 2019; 5: 144.
  24. Chohanadisai W, Kelleher SL, Lönnerdal B. Zinc deficiency is associated with increased brain zinc import and LIV-1 expression and decreased ZnT-1 expression in neonatal rats. *Nutr Neurosci*. 2005; 135(5): 1002-7.
  25. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RO. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr*. 2001; 131:46-52.
  26. Pfaffl MW, Windisch W. Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2003; 17(2): 97-106.

#### استناد به این مقاله

نیله‌چی، مانده؛ عیدی، اکرم؛ گله‌داری، حمید؛ کسمتی، مهناز (۱۴۰۰). اثرات نانوذرات اکسید روی بر بیان ژن‌های انتقال‌دهنده روی ۱-۴ در سل لاین هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۱، شماره ۴۱، ص ۵-۲۲.