اثر نوکلئولین غشایی به عنوان یک گیرنده اختصاصی جهت دارورسانی هدفمند نانوذرات پلی لاکتیک- پلی گلایکولیک اسید حاوی داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین و هدفمند شده با آپتامر AS1411 به سلول‌های سرطانی

جعفر مسافر[1*]، ادریس بذرافشان[2]

۱- مرکز تحقیقات نانوفنآوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- مرکز ارتقا سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نوکلئولین فراوان‌ترین فسفوپروتئین موجود در هسته سلول می‌باشد که به مقادیر زیادی در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های سرطانی دیده می‌شود. این مطالعه با هدف نقش نوکلئولین غشایی در هدف‌گیری سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوذرات هدفمند شده با آپتامر AS1411 و بدنبال آن هدف‌گیری و درمان اختصاصی این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های غیرسرطانی انجام گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین بطور همزمان در درون ساختار ماتریکس پلیمری نانوذرات پلی لاکتیک- پلی گلایکولیک اسید پگیله شده (PLGA-PEG) با استفاده از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال کپسوله شدند، و سپس با مولکول آپتامر از طریق واکنش بین گروه آمین آپتامر و گروه کربوکسیل انتهای پلیمر متصل و هدفمند شده و در ادامه نقش نوکلئولین غشایی در دارورسانی هدفمند این نانوذرات هدفمند شده با استفاده از آزمون‌های فلوسایتومتری و سمیت سلولی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج آزمون‌های فلوسایتومتری و سمیت سلولی، بیانگر حضور مقادیر بالای نوکلئولین در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های سرطانی C26 و C6 و به طبع آن افزایش معنی‌دار میزان جذب سلولی و سمیت سلولی این نانوذرات هدفمند شده با آپتامر توسط سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های L929 بود ($P<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نقش مهم نوکلئولین را به عنوان یک گیرنده اختصاصی در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های سرطانی جهت اتصال به نانوذرات هدفمند شده با آپتامر AS1411 به عنوان لیگاند اختصاصی و بدنبال آن افزایش ورود درون سلولی و نیز سمیت سلولی نانوذرات با مکانیسم اندوسیتوز و با واسطه گیرنده- لیگاند را نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: نوکلئولین، آپتامر AS1411، دارورسانی هدفمند، پلی لاکتیک- پلی گلایکولیک اسید، دوکسوروبیسین

***آدرس نویسنده مسئول: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.**

آدرس پست الکترونیک: *Mosaferj901@gmail.com*

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

مقدمه

امروزه توسعه سیستم‌های نوین دارورسانی بر پایه نانوذرات نقش بسیار مهمی در تحویل اختصاصی داروها به سلول‌های سرطانی ایفاء می‌کنند (۱). در این سیستم‌ها، انواع داروهای شیمی درمانی در درون ساختار این نانوذرات محصور می‌شوند و در ادامه لیگاندهای اختصاصی‌ای که بر علیه گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های سرطانی طراحی شده‌اند به سطح این نانوذرات متصل می‌شوند و از این طریق این نانوذرات می‌توانند بطور اختصاصی محموله داروئی خود را به سلول‌های سرطانی برسانند (۲-۴).

استفاده از پلیمر پلی لاکتیک-پلی گلایکولیک اسید (PLGA) به عنوان یک پلیمر زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر که مورد تایید سازمان غذا و دارو (FDA) می‌باشد، سال‌های طولانی است که جهت توسعه سیستم‌های دارورسانی بر پایه پلیمر به اثبات رسیده است (۵، ۶). دوکسوروبیسین (Doxorubicin) که با نام تجاری آدریامایسین (Adriamycin) در بازار موجود می‌باشد، از اوایل دهه ۱۹۶۰ میلادی تاکنون به عنوان یکی از معروفترین داروهای شیمی درمانی در درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها چون لمفوم و لوسمی و طیف وسیعی از تومورهای جامد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷-۱۰).

نوکلئولین فراوانترین فسفوپروتئین موجود در هسته سلول بوده و در سطح غشاء سلول‌های سرطانی نیز به وفور یافت می‌شود. نوکلئولین دارای عملکردهای گوناگونی در سلول بوده و در مکانیسم‌های بسیار زیادی در سلول چون اندوسیتوزیس، اتصال سلولی و سیگنال رسانی نقش ایفا کرده و به عنوان یک رسپتور برای بسیاری از پاتوژن‌ها نیز مورد پذیرش قرار گرفته است (۱۱). امروزه ثابت شده است که حضور بالای این مولکول در سطح سلول‌های سرطانی نقش مهمی در تغییر شکل و پیشرفت سرطان دارد (۱۲-۱۵). نوکلئولین در سطح غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های طبیعی وجود نداشته و یا مقادیر آن بسیار اندک است، بنابراین قادر به اتصال به آپتامر AS1411 و جذب آن نبوده و این خود حاکی از اثر انتخابی بالای سلول‌های سرطانی در اتصال و جذب AS1411 دارد (۱۶، ۱۷).

اعتقاد بر این است که نوکلئولین غشایی نقش بسیار مهمی در جذب آپتامر ۲۶ نوکلئوتیدی AS1411 بر عهده داشته، اما مکانیسم دقیق آن هنوز مشخص نشده است. بطور خلاصه اینکه نوکلئولین در واقع اولین هدف برای AS1411 بوده (۱۸-۲۱) و از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده-لیگاند به سرعت وارد سلول می‌شود (۲۲، ۲۳).

در این مطالعه دوکسوروبیسین در درون ساختار ماتریکس پلیمری پلی لاکتیک-پلی گلایکولیک اسید پگیله شده (PLGA-PEG) بارگزاری گردید و سپس توسط آپتامر AS1411 هدفمند شد. همچنین حضور مقادیر زیادی از نوکلئولین غشایی در سطح سلول‌های سرطانی با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و فلوسایتومتری به اثبات رسید. این مطالعه با هدف نقش مهم نوکلئولین غشایی در هدف گیری سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوذرات هدفمند شده با آپتامر AS1411 و بدنبال آن هدف گیری و درمان اختصاصی این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های غیرسرطانی انجام گرفت.

روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. برای انجام مطالعه دوکسوروبیسین هیدروکلراید (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا)، پلی لاکتیک- پلی گلایکولیک اسید پگیله شده با گروه عاملی کربوسیلیک اسید (وزن مولکولی ۴۰:۵ کیلودالتون، شرکت آکینابیک، آمریکا)، محیط کشت RPMI 1640، سرم گاوی، پنی‌سیلین استرپتوماسیسن و تریپسین (شرکت گیبکو، آلمان)، آپتامر AS1411 (سنتز شده توسط شرکت پلی ژن، آلمان)، سایر مواد و معرف‌ها از انواع رایج آزمایشگاهی تهیه شدند. رده سلولی گلایوبلاستومای رتی C6 ، رده سلولی کارسینومای کولون موشی C26 و رده سلولی بافت پستان موشی L929 از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

تهیه نانوذرات هدفمند شده با آپتامر

در این مطالعه ابتدا سنتز نانوذرات پلی لاکتیک گلایکولیک اسید پگیله شده حاوی داروی دوکسوروبیسین که با آپتامر AS1411 هدفمند شده بودند، انجام گردید (۲۴). بطور خلاصه دوکسوربیسن در درون ساختار ماتریکس پلیمر و با استفاده از روش رایج امولسیون چندگانه تبخیر حلال ($O_1/W_1/O_2/W_2$) بارگزاری شد. در نهایت آپتامر AS1411 با انتهای آمینی و با استفاده از واکنش شیمیایی EDC/NHS به گروه کربوکسیلیک اسید انتهای نانوذرات پگیله شده متصل گردید.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات

سایز نانوذرات تهیه شده در این مطالعه با استفاده از دستگاه زتا سایزر (ساخت شرکت مالورن) انجام گردید. مقدار نیم میلی‌گرم از نانوذرات در آب دیونیزه پراکنده و سایز و پتانسیل نانوذرات مشخص گردید. مورفولوژی نانوذرات نیز با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی روبرشی بررسی گردید. همچنین درصد محصورسازی (انکپسولاسیون) داروی دوکسوروبیسین مطابق با روش ارائه شده در مطالعات قبلی نویسنده و استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۵).

درصد محصورسازی= وزن داروی محصور شده در فرمولاسیون × ۱۰۰ / وزن اولیه داروی استفاده شده

درصد بارگیری= وزن داروی محصور شده در فرمولاسیون × ۱۰۰ / وزن اولیه فرمولاسیون استفاده شده

تست ایمونوهیستوشیمی

جهت تعیین حضور نوکلئولین در سطح غشاء پلاسمایی سلول، از آزمون ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شود که در این روش با استفاده از آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه بر علیه نوکلئولین غشایی و انجام مراحل بعدی رنگ آمیزی سلول، در نهایت حضور نوکلئولین بصورت یک لایه قهوه‌ای کمرنگ در سطح غشاء پلاسمایی قابل اثبات می‌باشد. حضور نوکلئولین در سطح غشاء سلول‌های C6، C26 و L929 قبلا توسط نویسنده در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (۲۴، ۲۵). در این مطالعه سعی شد تا تفاوت در میزان نوکلئولین غشایی در این سلول‌ها و نقش آن در میزان هدف گیری و میزان ورود درون سلولی نانوذرات تهیه شده بطور همزمان در هر سه سلول مورد بررسی قرار گیرد.

تست سمیت سلولی

رده سلولی گلایوبلاستومای رتی C6 ، رده سلولی کارسینومای کولون موشی C26 و رده سلولی بافت پستان موشی L929 در یک پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و یک در صد محلول آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. در اینجا نیز از آزمون رقابتی- ممانعتی (Competitive/Inhibition) که در آن از غلظت‌های متفاوتی از نانوذرات استفاده می‌گردد، بهره برده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت ۳۰۰-۳۷/۵ میکروگرم در میلی-لیتر از نانوذرات که حاوی ۵-۰/۶۲۵ میکروگرم دوکسوروبیسین می‌باشد و نیز محلول دوکسوروبیسین آزاد با غلظت ۵- ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی لیتر، به مدت دو ساعت انکوبه شدند. بعد از دو ساعت، محیط کشت تخلیه و سلولها مجددا توسط بافر فسفات سالین گرم شستشو داده شده و سپس محیط کشت تازه اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت دیگر نیز سلول‌ها انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت، تست سمیت سلولی (MTT) بر روی سلول‌ها انجام گردید و پلیت سلولی توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شده و مقادیر IC50 و نیز سطح معنی‌داری داده‌ها محاسبه گردید. سمیت سلولی نانوذراتی که فاقد دوکسوروبیسین بودند نیز بطور مشابه بررسی شد تا اثر سمیت سلولی آنها ارزیابی گردد.

آزمون فلوسایتومتری

با توجه به مطالعات قبلی انجام شده توسط نویسنده، در این مطالعه نیز جهت تعیین و مقایسه تفاوت میزان برداشت درون سلولی نانوذرات هدفمند با آپتامر AS1411 در مقایسه با نانوذرات غیر هدفمند به درون سلول و نیز بررسی این تفاوت‌ها بین سه رده سلولی C26، C6 و L929 از آزمون فلوسایتومتری استفاده گردید (۲۴، ۲۵). در اینجا از آزمون رقابتی– ممانعتی استفاده گردید که در آن از غلظت‌های متفاوتی از نانوذرات استفاده می‌شود تا بهترین غلظت از نانوذرات که در آن حداکثر اختلاف معنی‌داری بین نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند قابل مشاهده است نیز مشخص گردد. بطور خلاصه ابتدا تعداد ۴۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از ۳۰۰-۳۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات که حاوی ۵-۰/۶۲۵ میکروگرم دوکسوروبیسین می‌باشد و نیز محلول دوکسوروبیسین آزاد با غلظت ۵- ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بعد از دو ساعت، محیط کشت تخلیه شده و پس از کندن سلول‌ها و شستشو با بافر فسفات سالین، در نهایت رسوب سلولی حاصل با بافر فسفات سالین سرد پراکنده شد و شدت فلورسانس ناشی از حضور دوکسوروبیسن در درون سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری و با طول موج تهییجی ۴۸۰ نانومتر در کانال FL2 اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده ها از نرم افزار GraphPad Prism ورژن

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

۵ و آزمون t مستقل جهت انجام تست‌های مقایسه‌ای در تست سمیت سلولی استفاده گردید. از نرم افزار فلوجو ورژن 7.6.1 نیز جهت آنالیز نمونه‌های فلوسایتومتری و رسم دات پلات مربوطه استفاده شد. همچنین $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و نتایج نیز بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید.

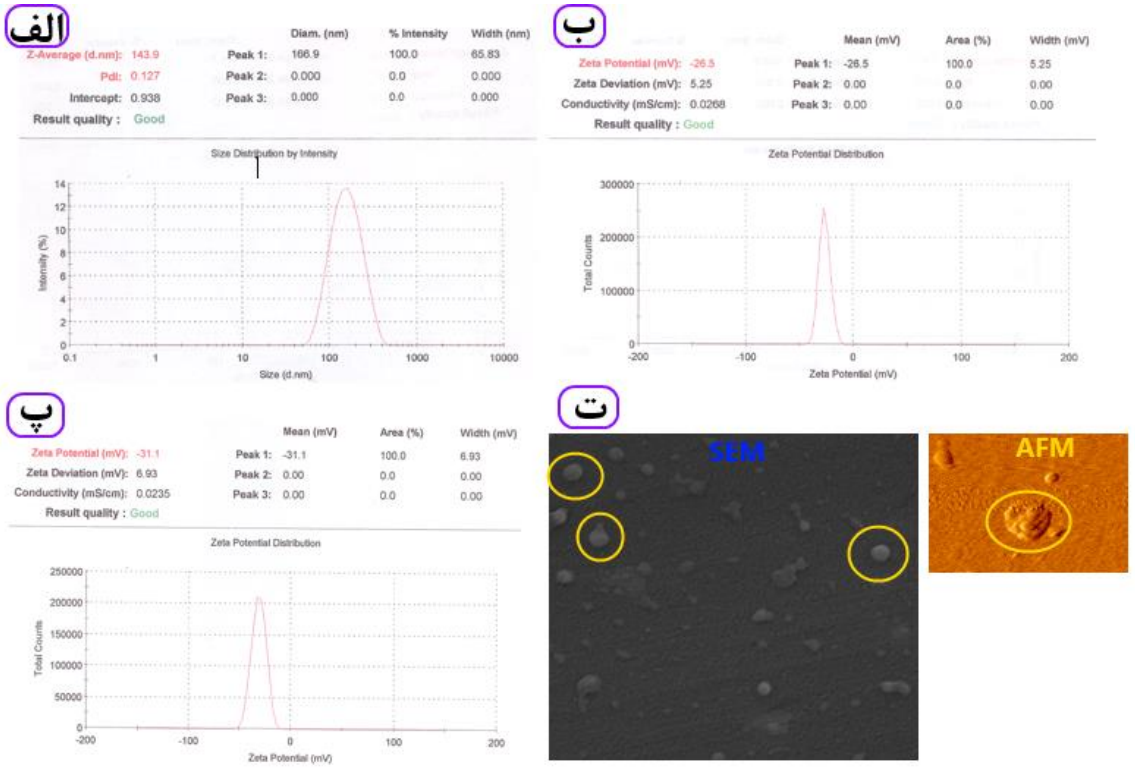
نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات

نتایج بدست آمده با استفاده از دستگاه زتا سایزر نشان‌دهنده سایز نانوذرات در حدود ۴/۲ ± ۱۴۳/۹ نانومتر و پتانسیل زتای ۲۶- میلی‌ولت و با توزیع ذره‌ای ۰/۰۳± ۰/۱ بود. این نتایج برای نانوذرات هدفمند شده با آپتامر در حدود ۷/۴±۱۵۰/۳ نانومتر و پتانسیل زتای ۳۱- میلی‌ولت با توزیع ذره‌ای ۰/۰۸± ۰/۱ بود که به علت دارا بودن بار منفی آپتامر نیز می‌تواند دلیلی بر اتصال آپتامر به سطح نانو ذرات باشد (شکل شماره ۱). نتایج حاصل از بررسی میزان محصورسازی و بارگیری دوکسوروبیسین نیز در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. اختلافی در میزان محصورسازی دارو بین نانو ذرات غیر هدفمند و هدفمند شده با آپتامر مشاهده نشد.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکو شیمیایی نانوذرات

اجزاء	مقدار (میلی‌گرم)	درصد محصورسازی (وزنی/وزنی)	درصد بارگیری (وزنی/وزنی)
دوکسوروبیسن	۱	۹۰/۱±۲/۹	۳±۰/۲
پلیمر	۲۰	-	-



شکل ۱. سایز نانوذرات غیر هدفمند (الف)، پتانسیل زتای نانوذرات غیر هدفمند (ب) و نانوذرات هدفمند شده با آپتامر (پ). مورفولوژی نانوذرات غیر هدفمند تهیه شده با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و میکروسکوپ الکترونی روبرشی (SEM) (ت)

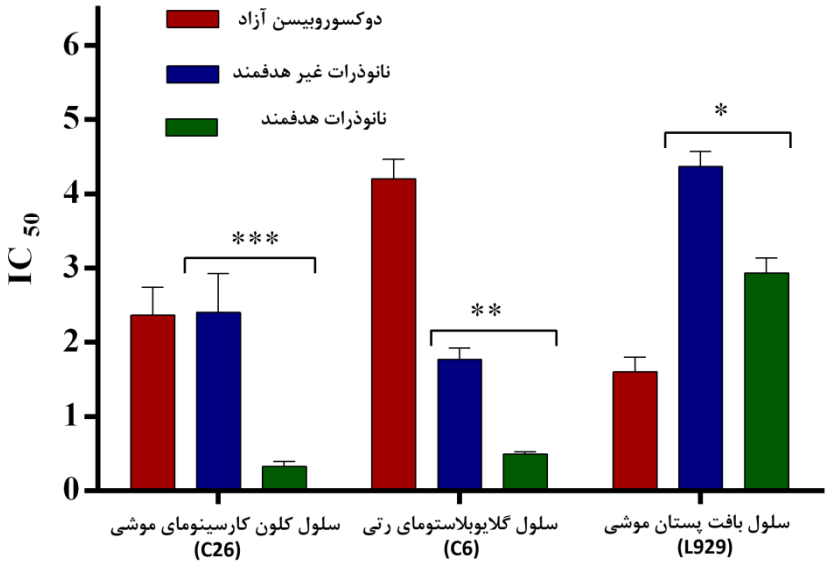
[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

تست سمیت سلولی

همانطور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، میزان سمیت سلولی نانوذرات هدفمند شده با آپتامر بطور معنی‌داری بیشتر از نانوذرات غیر هدفمند در رده سلول‌های سرطانی C26 و C6 بود که جهت مقایسه با رده سلولی L929 بطور همزمان بررسی شد که قابل مشاهده می‌باشد. این نتایج بیانگر این واقعیت است که نانوذرات هدفمند شده با آپتامر در رده سلولی C26 و C6 توانسته است سمیت بیشتری را به ترتیب با ۸ و ۳/۶ برابر بیشتر در مقایسه با رده سلولی L929 با ۱/۴ برابر ایجاد کند (**P<۰/۰۱) که نتیجه‌ای از برهمکنش اختصاصی بیشتر آپتامر- نوکلئولین به علت حضور بیشتر نوکلئولین در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های C26 و C6 می‌باشد. نمودار میله‌ای نیز جهت مقایسه بهتر این نتایج در تصویر شماره ۲ آورده شده است. داده ها بصورت میانگین و انحراف معیار (n=۳) بیان شده‌اند.

جدول ۲. مقایسه میزان سمیت (IC_{50}) نانوذرات غیر هدفمند و هدفمند شده با آپتامر و دوکسوروبیسین آزاد بر روی سلول‌های سرطانی C26، C6 و سلول‌های L929

رده سلولی	IC_{50} (میکروگرم دوکسوروبیسین/ میلی‌لیتر)			
	دوکسوروبیسین آزاد	نانوذرات غیرهدفمند	نانوذرات هدفمند	P
سلول C26	۲/۳±۰/۳	۲/۴ ±۰/۵	***۰/۳ ±۰/۰۶	*** P<۰/۰۰۱
سلول C6	۴/۲ ±۰/۳	۱/۸ ±۰/۲	**۰/۵ ±۰/۱	** P<۰/۰۱
سلول L929	۱/۶ ±۰/۲	۴/۳ ±۰/۲	*۲/۹ ±۰/۲	* P<۰/۰۵



شکل ۲. نتایج آنالیز سمیت سلولی رده های سلولی C26، C6 و L929 توسط داروی دوکسوروبیسین آزاد، نانوذرات غیر هدفمند و نانوذرات هدفمند

تست ایمونوهیستوشیمی

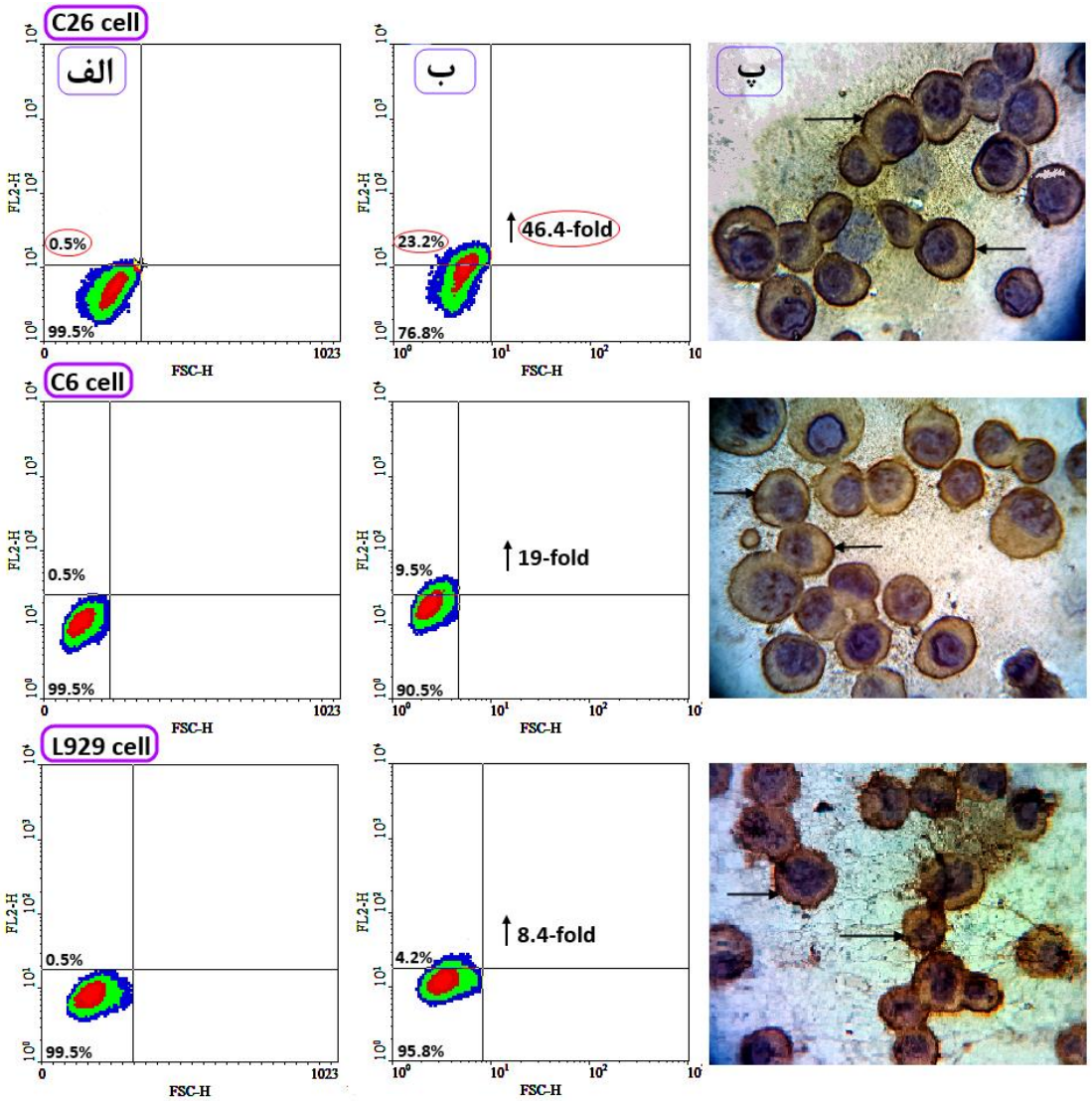
حضور یک لایه قهوه‌ای تیره رنگ در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌های سرطانی C26 و C6 نسبت به سلول‌های L929 نشانگر حضور بیشتر نوکلئولین در سطح سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های L929 می‌باشد که در اثر اتصال اختصاصی آنتی‌بادی ثانویه به آنتی‌بادی اولیه ضد نوکلئولین بوده و بصورت یک لایه قهوه‌ای رنگ قابل مشاهده می‌باشد (شکل شماره ۳، پ). سلول‌های کنترل که با آنتی‌بادی اولیه انکوبه نشده بودند، هیچگونه اتصال غیر اختصاصی را نشان ندادند.

آزمون فلوسایتومتری

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بهترین غلظت مورد استفاده نانوذرات در آزمون فلوسایتومتری جهت مشاهده اختلاف معنی-دار بین میزان برداشت نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند در حدود ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد بطوریکه در غلظت‌های

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

بالاتر از این، به علت اشباع نوکلئولین غشایی با مقادیر بالای آپتامر در سطح نانوذرات، تفاوت معنی‌داری بین میزان برداشت بین نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند مشاهده نمی‌شود. نتایج بدست آمده از آنالیز داده‌های فلوسایتومتری و رسم دات پلات مربوط به هر نمونه نشان می‌دهد که میزان برداشت نانوذرات هدفمند شده با آپتامر بین دو رده سلول سرطانی C26 و C6 در مقایسه با نانوذرات غیر هدفمند، به ترتیب ۴۶ و ۱۹برابر افزایش یافته است؛ در حالیکه این افزایش در رده سلولی L929 تنها در حدود ۸ برابر بوده است (شکل شماره ۳، الف وب). نتایج حاصل همچنین بیانگر حضور بیشتر نوکلئولین در سطح سلول‌های سرطانی C26 نسبت به سلول‌های C6 و نیز حضور مقادیر بسیار کمتری از این گیرنده در سطح سلول‌های L929 می‌باشد (شکل شماره ۳، پ). لذا از این خصوصیت سلول‌های سرطانی می‌توان جهت دارورسانی بیشتر و هدفمند شده به سلول‌های سرطانی از طریق واسطه لیگاند- گیرنده (آپتامر- نوکلئولین) بهره جسته و باعث کاهش عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی بر روی سایر سلول‌های طبیعی و بدنبال آن مشاهده نتایج بهتر درمانی بود.



شکل ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری رده های سلولی C26، C6 و L929 تیمارشده توسط نانوذرات غیر هدفمند (الف) و نانوذرات هدفمندشده با آپتامر (ب). حضور نوکلئوین در سطح غشاء پلاسمایی سلول‌ها بصورت یک لایه قهوه‌ای رنگ، با استفاده از آزمون ایمونوهیستوشیمی (پ)

نتیجه‌گیری

افزایش حضور نوکلئولین در سطح غشاء سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال و از طرفی اتصال اختصاصی این رسپتور با مولکول آپتامر AS1411 می‌تواند به عنوان یک استراتژی مفید جهت دارورسانی هدفمند داروهای شیمی درمانی به سلول‌های سرطانی در مقایسه با سایر سلول‌های نرمال بدن

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

استفاده گردد. نتایج بدست آمده در این مطالعه، بیانگر افزایش معنی‌دار ورود درون سلولی و بدنبال آن افزایش سمیت سلولی نانوذرات هدفمند شده با آپتامر در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌هایی که به میزان کمتری نوکلئولین را در سطح غشاء سلولی خود بیان می‌کنند، بوده که به طبع آن پتانسیل بالقوه هدفمندکردن نانوذرات حاوی دارو با آپتامر جهت دارورسانی بیشتر و البته کسب نتایج بهتر درمانی را به اثبات می‌رساند.

تضاد منافع: نتایج پژوهش حاضر فاقد هرگونه تضاد منافع می باشد.

تشکر و قدردانی: این طرح حاصل حمایت مالی و معنوی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد و با همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه جامع تحقیقات پژوهشکده بوعلی در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد.

References

1. Liu D, Auguste DT. Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles. J Controlled Release. 2015;219:632-43.

2. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. Nature nanotechnology. 2011;6(12):815-23.

3. Mi Kyung Yu JP, Sangyong Jon. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. Theranostics. 2012; 2(1): 3–44.

4. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature nanotechnology. 2007;2(12):751-60.

5. Sah H, Thoma LA, Desu HR, Sah E, Wood GC. Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. International journal of nanomedicine. 2013(8): 747–765.

6. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. J Controlled Release. 2012;161(2):505-22.

7. Xu W-H, Han M, Dong Q, Fu Z-X, Diao Y-Y, Liu H, et al. Doxorubicin-mediated radiosensitivity in multicellular spheroids from a lung cancer cell line is enhanced by composite micelle encapsulation. International journal of nanomedicine. 2012;7: 2661–2671.

8. Blay J-Y, Leahy MG, Nguyen BB, Patel SR, Hohenberger P, Santoro A, et al. Randomised phase III trial of trabectedin versus doxorubicin-based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. Eur J Cancer. 2014;50(6):1137-47.

9. Xu Q, Leong J, Chua QY, Chi YT, Chow PK-H, Pack DW, et al. Combined modality doxorubicin-based chemotherapy and chitosan-mediated p53 gene therapy using double-walled microspheres for treatment of human hepatocellular carcinoma. Biomaterials. 2013;34(21):5149-62.

10. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood. 2005;106(12):3725-32.

11. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. The FASEB Journal. 1999;13(14):1911-22.

12. Said EA, Krust B, Nisole S, Svab J, Briand J-P, Hovanessian AG. The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. J Biol Chem. 2002;277(40):37492-502.

13. Legrand D, Vigie K, Said EA, Elass E, Masson M, Slomianny MC, et al. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. The FEBS Journal. 2004;271(2):303-17.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

14. Shi H, Huang Y, Zhou H, Song X, Yuan S, Fu Y, et al. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. Blood. 2007;110(8):2899-906.

15. Nisole S, Said EA, Mische C, Prevost M-C, Krust B, Bouvet P, et al. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. J Biol Chem. 2002;277(23):20877-86.

16. Zhu J, Huang H, Dong S, Ge L, Zhang Y. Progress in aptamer-mediated drug delivery vehicles for cancer targeting and its implications in addressing chemotherapeutic challenges. Theranostics. 2014 4(9): 931–944.

17. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. Exp Mol Pathol. 2009;86(3):151-64.

18. Watanabe T, Hirano K, Takahashi A, Yamaguchi K, Beppu M, Fujiki H, et al. Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. Biol Pharm Bull. 2010;33(5):796-803.

19. Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. J Cell Sci. 1999;112(6):761-72.

20. Giuffrè G, Caruso RA, Barresi G, Tuccari G. Prognostic significance of standardized AgNOR analysis in early and advanced gastric carcinomas. Virchows Archiv. 1998; 433(3):261-6.

21. Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1995;73(4):497-502.

22. Gao H, Qian J, Cao S, Yang Z, Pang Z, Pan S, et al. Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles. Biomaterials. 2012; 33(20):5115-23.

23. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. Int J Pharm. 2012;430(1):266-75.

24. Mosafer J, Teymouri M, Abnous K, Tafaghodi M, Ramezani M. Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with doxorubicin to C6 glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells. Mater Sci Eng, C. 2017;72:123-33.

25. Mosafer J, Abnous K, Tafaghodi M, Mokhtarzadeh A, Ramezani M. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. Eur J Pharm Biopharm. 2017;113:60-74.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]

AS1411 Aptamer-Mediated Targeted Drug Delivery of Doxorubicin-loaded PLGA Nanoparticles to Cancer Cells through Cell Surface Nucleolin

Jafar Mosafer[1]*, Edris Bazrafshan[2]

1- Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Health Promotion Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

***Corresponding Address:** School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Email address: Mosaferj901@gmail.com

Abstract

Background & Aim: Nucleolin is one of the most abundant proteins in the nucleolus that is overexpressed on the surface of the plasmic membrane of cancer cells. It has been suggested that nucleolin is a new and promising candidate for effective targeted active-targeted delivery of nanoparticles with anti-nucleolin AS1411 aptamer (hereafter Apt), as a single-strand DNA, into a variety of high nucleolin-expressing cancer cells compared to low nucleolin-expressing cell lines.

Methods: In this study, doxorubicin (Dox), as a chemotherapy drug with a fluorescence nature, was entrapped into the Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based nanoparticles (NPs). Next, these NPs were conjugated to Apt and the targeting ability of these Apt-NPs was investigated by flow cytometry and cytotoxicity analysis.

Results: As a result, more rapidly internalization of Apt-NPs into C26 and C6 cancer cells was verified compared with L929 as a low nucleolin-expressing cell line. Similarly, the Apt-NPs increased the cytotoxicity effect of Dox compared with NPs and free Dox solution alone.

Conclusion: We think that Apt-NPs, as a ligand, first bind to nucleolin and that the receptor-ligand complex is then incorporated into the cells through receptor-mediated endocytosis pathway. In conclusion, the Apt-NPs were found to be a promising targeted delivery system for therapeutic purposes.

Keywords: Nucleolin, AS1411 aptamer, targeted delivery, PLGA, Doxorubicin

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2026-09-15]