

The impact of Niosomal DNAzyme targeting the NFκB gene on factors involved in cell migration

Leila Aghamohseni¹ , Neda Mousavi-Niri² , Maryam Naseroleslami^{1*} 

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Biotechnology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 3 Dec 2024

Revised: 13 Jul 2025

Accepted: 19 Jul 2025

ePublished: 13 Sep 2025

Keywords:

- MCF7 cell line
- DNAzyme
- Snail
- Twist
- NFκB
- VEGF
- MMP2
- MMP9

Abstract

Background. As one of the most common human malignancies, breast cancer is the second leading cause of cancer-related death among women globally. Multiple cellular and molecular mechanisms contribute to the development and progression of breast cancer. Metastasis, inflammation, and angiogenesis are significant factors in tumor progression. This study aimed to investigate the impact of niosomal DNAzyme targeting the nuclear factor kappa B (NFκB) gene on factors involved in cell migration.

Methods. In this research, MCF7 cells were divided into four groups: DNAzyme treatment, niosome treatment, niosomal DNAzyme treatment, and untreated control group. Western blotting was employed to assess the expression levels of proteins implicated in metastasis and inflammation.

Results. The study findings revealed that DNAzyme effectively reduced the expression of Snail, Twist, NFκB, VEGF, MMP2, and MMP9 proteins. Moreover, the niosomal DNAzyme group exhibited a more significant reduction in protein expression compared to the Oligo group ($P < 0.005$).

Conclusion. The results of the research demonstrate the efficacy of niosomal DNAzyme targeting the NFκB gene against breast cancer. Due to its low molecular weight, high stability, versatility, and cost-effectiveness, niosomal DNAzyme holds promise as a potential treatment for breast cancer. Further investigations are necessary to fully explore its therapeutic potential.

Practical Implications. The use of gene silencing techniques, particularly the use of DNAzyme, is a promising therapeutic approach for cancer treatment. However, further studies are needed in this field.

How to cite this article: Aghamohseni L, Mousavi-Niri N, Naseroleslami M. The impact of Niosomal DNAzyme targeting the NFκB gene on factors involved in cell migration. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(4):. doi: 10.34172/mj.025.33845. Persian.

Extended Abstract

Background

Breast cancer remains a leading cause of cancer-related mortality in women, with metastasis posing a major therapeutic challenge. Genes such as MMP2 and Twist are well-established drivers of this process. Current research emphasizes molecular pathways involving inflammation and angiogenesis, where NFκB

and VEGF play pivotal roles in tumor progression. This study proposes a novel therapeutic strategy utilizing a niosome-encapsulated DNAzyme targeting NFκB. DNAzymes are promising gene-silencing agents due to their catalytic nature and high specificity. Niosomes serve as effective and biocompatible delivery vehicles, particularly for MCF7 breast cancer cells. This

*Corresponding author; Email: naseroleslami.m@iau.ac.ir

© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

combined approach aims to downregulate proteins associated with metastasis and inflammation. By precisely interfering with the NFκB pathway, this strategy offers a more targeted and potentially safer treatment for advanced-stage breast cancer, aiming to improve patient outcomes.

Methods

This study rigorously investigated the therapeutic effects of a novel NFκB-targeting DNAzyme formulated in niosomes in MCF7 cells, a widely used model for estrogen receptor-positive breast cancer. All experiments were performed in triplicate to ensure robust and reliable results. MCF7 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Cells were divided into four distinct treatment groups: (1) DNAzyme group: treated with NFκB DNAzyme, (2) niosomal group: treated with free niosomes to assess the effects of the vehicle, (3) niosomal DNAzyme group: treated with encapsulated NFκB DNAzyme, and (4) control group: untreated cells for baseline comparison. After a 48-hour treatment period, total cellular proteins were extracted using RIPA buffer, and concentrations were determined via the Bradford assay to ensure equal loading. Western blotting was performed to quantify the expression of key proteins associated with metastasis and inflammation, including Snail, Twist, NFκB, VEGF, MMP2, and MMP9. These proteins were selected for their critical roles in tumor invasion, angiogenesis, and inflammatory responses in breast cancer. Protein separation was achieved by SDS-PAGE, followed by transfer to PVDF membranes. Membranes were incubated with specific primary and HRP-conjugated secondary antibodies, and protein bands were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) system. β-actin served as the internal loading control for normalization. Band intensities were meticulously quantified using ImageJ software. Statistical analysis was conducted using SPSS version 24, employing one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test for multiple comparisons. All data are presented as the mean ± standard deviation (SD), with a *P*-value of less than 0.05 indicating statistical significance.

Results

Our comprehensive Western blot analysis revealed highly significant and promising results regarding the efficacy of both free-form and niosomal NFκB DNAzyme treatments. Both therapeutic approaches led to a significant downregulation in the protein expression levels of all targeted markers (Snail, Twist, NFκB, VEGF, MMP2, and MMP9) when compared to the untreated control group. This compelling finding robustly confirms the effectiveness of NFκB DNAzyme in silencing its primary target and subsequently inhibiting the expression of crucial downstream genes intricately involved in breast cancer metastasis and inflammation. A particularly noteworthy observation was the stark difference in efficacy between the two DNAzyme delivery methods. The niosomal DNAzyme group consistently exhibited a significantly greater reduction in protein expression compared to the free DNAzyme group ($P < 0.005$) for all evaluated proteins. This clear and statistically significant difference strongly indicates the enhanced delivery efficiency and superior stability conferred by the niosomal carrier system. Niosomes, acting as protective and efficient transport vehicles, successfully facilitated a more substantial intracellular delivery of the DNAzyme, leading to a more pronounced therapeutic effect. In several instances, the reduction in protein expression achieved by the niosomal DNAzyme treatment was more than two-fold greater when compared to the effects observed with the administration of free-form DNAzyme. This amplified effect underscores the critical role of the niosomal formulation in optimizing the therapeutic potential of the DNAzyme. Crucially, no significant changes in protein expression were observed in either the control group or the niosome group. The control group, as expected, maintained baseline protein levels, while the niosome group confirmed that the niosomal carrier itself does not exert any non-specific effects on the expression of these proteins. This lack of change in the control and niosome groups unequivocally supports the specificity of the DNAzyme-mediated gene silencing, confirming that the observed downregulation is directly attributable

to the target-specific action of the NFκB DNAzyme and not to any off-target effects of the carrier or general cellular stress. These results collectively highlight the promising potential of niosomal NFκB DNAzyme as a highly effective and specific therapeutic strategy for mitigating breast cancer progression by targeting key metastatic and inflammatory pathways.

Conclusion

This study unequivocally demonstrates the significant therapeutic potential of a niosomal DNAzyme targeting NFκB in breast cancer cells. Our findings confirm the effective downregulation of crucial proteins linked to both metastasis and inflammation. Specifically, we observed reduced expression of Snail and Twist (key regulators of

epithelial-mesenchymal transition (EMT)), NFκB (a central mediator of inflammation and cell survival), VEGF (a critical angiogenesis factor promoting tumor growth), and MMP2 and MMP9 (matrix remodeling enzymes essential for invasion). The enhanced efficacy observed with the niosomal formulation highlights the vital role of nanocarriers in optimizing gene therapy approaches. Considering their inherent advantages including low molecular weight, improved stability, functional versatility, and cost-effectiveness, niosomal DNAzymes present a highly promising strategy for targeted breast cancer treatment. This research strongly advocates integration of DNAzyme-based gene silencing with advanced delivery systems to develop more effective and specific oncologic therapeutics.

بررسی اثر DNazyme نیوزومه ژن NFκB بر روی فاکتورهای دخیل در مهاجرت سلول‌های سرطان پستان MCF-7

لیلا آقامحسني¹، ندا موسوي نيري²، مریم ناصرالاسلامي^{3*}

¹گروه علوم سلولی مولکولی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
²گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

In Press

چکیده

زمینه. سرطان پستان جایگاه خود را به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در جمعیت انسانی تثبیت کرده است و دومین عامل مهم مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان به شمار می‌رود. مکانیسم‌های سلولی و مولکولی متعددی در توسعه و پیشرفت سرطان پستان دخیل هستند. یکی از عوامل اصلی پیشرفت این سرطان، متاستاز است. التهاب و آنژیوژنز نیز نقش قابل‌توجهی در پیشرفت تومور دارند. در این مطالعه، اثر DNazyme نیوزومه ژن NFκB بر روی فاکتورهای دخیل در مهاجرت سلولی موردبررسی قرار گرفت.

روش کار. در این پژوهش، سلول‌های MCF-7 به چهار گروه تقسیم شدند: تیمار با DNazyme، تیمار با نیوزوم، تیمار با DNazyme نیوزومه و گروه کنترل. برای بررسی میزان بیان پروتئین‌های دخیل در متاستاز و التهاب، تست وسترن بلات انجام شد.

یافته‌ها. نتایج نشان داد که DNazyme باعث کاهش بیان پروتئین‌های MMP-2، MMP-9، VEGF، NFκB، Twist و Snail می‌شود. همچنین، در گروهی که الیگونیوزوم دریافت کردند، میزان تغییر بیان پروتئین نسبت به گروه دریافت‌کننده تنها الیگو معنادارتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری. نتایج پژوهش نشان داد که استفاده از DNazyme نیوزومه ژن NFκB علیه سلول‌های سرطان پستان موثر است. با توجه به وزن مولکولی پایین، پایداری بالا، تنوع و هزینه کم، DNazyme نیوزومه ژن NFκB می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی بالقوه برای سرطان پستان مطرح شود، هرچند اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

پیامدهای عملی. استفاده از تکنیک‌های خاموش‌سازی ژن‌ها، به‌ویژه DNazyme یک راهکار درمانی امیدوارکننده برای سرطان به شمار می‌رود که نیاز به پژوهش‌های بیشتری در این زمینه وجود دارد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۹/۱۳
اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۴/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۲۸
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۶/۲۲

کلیدواژه‌ها:

- رده سلولی MCF7
- DNazyme
- MMP9
- MMP2
- VEGF
- NFκB
- Twist
- Snail

مقدمه

یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در درمان سرطان پستان به شمار می‌رود. ۴ محققان توجه زیادی به بررسی مکانیسم‌های مولکولی و بیان ژن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با سرطان داشته‌اند. مسیرهای مهم و مؤثر در سرطان پستان شامل مسیرهای التهابی، آپوپتوز، تکثیر سلولی، متاستاز و آنژیوژنز هستند. یکی از فاکتورهای کلیدی در پاسخ ایمنی و التهاب، فاکتور هسته‌ای NFκB است که نقش حیاتی در پیشرفت سرطان دارد. این فاکتور رونویسی عمومی می‌تواند فرایندهای مانند چرخه سلولی، آنژیوژنز، انتقال اپیتلیال به مزانشیم، آپوپتوز، تکثیر سلولی و التهاب را تنظیم کند.^۵

NFκB در پاسخ به التهاب، از فرم فعال (P100) به غیرفعال (P65) تبدیل می‌شود تا از التهاب اضافی جلوگیری کند. این

سرطان پستان به‌عنوان یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین سرطان‌ها و دومین عامل شایع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان سراسر جهان، تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و تغییرات در بیان پروتئین‌های کلیدی و مسیرهای مولکولی مرتبط با تومورزایی و پیشرفت بیماری قرار دارد. نقش این عوامل و پروتئین‌ها در بروز و پیشرفت سرطان پستان به‌طور گسترده مورد بررسی گرفته است.^{۲،۱} توسعه سرطان پستان یک فرآیند چندمرحله‌ای است و پیشگیری از آن همچنان در سطح جهان چالش‌برانگیز محسوب می‌شود.^۳ سلول‌های سرطان پستان می‌توانند از طریق خون و لنف به اندام‌های دوردست متاستاز دهند. این فرآیند شامل جدا شدن سلول‌ها از تومور اصلی و تهاجم به بافت‌های دیگر است که ژن‌هایی مانند MMP-2 و Twist در آن نقش دارند. متاستاز هنوز

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: naseroleslami.m@iaua.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله به دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

ساله سفیدپوست جدا شده و دارای ویژگی‌های شبه‌اپیتلیالی و رشد چسبنده است. MCF-7 بیان بالایی از HLA-A، HLA-B و HLA-C دارد و جهش‌های شاخص آن شامل CDKN2A، TP53 و PTEN است.^{۱۵}

به منظور بررسی اثر DNzyme بر تکثیر سلول‌های سرطانی، رده سلولی MCF-7 با غلظتی از این دارو تیمار شد. DNzyme مولکول‌های تکرشته‌ای کاتالیزوری هستند که در شرایط آزمایشگاهی سنتز می‌شوند و به دلیل وزن مولکولی پایین، پایداری بالا، تنوع و هزینه کم، در خط مقدم روش‌های درمانی مبتنی بر اسید نوکلئیک قرار دارند.^{۱۶}

برای افزایش کارایی انتقال DNzyme به سلول‌ها و اطمینان از جذب مؤثر آن توسط رده سلولی MCF-7، از نیوزوم به عنوان حامل استفاده شد. DNzyme در این حامل‌ها کیسوله شد و سپس سلول‌ها با این کمپلکس تیمار شدند. نیوزوم‌ها نانو حامل‌های کلونیدی از کلسترول و سورفکتانت‌های غیر یونی هستند که می‌توانند حلالیت و پایداری داروهای هیدروفیل و هیدروفوب را افزایش دهند. ویژگی‌هایی مانند زیست‌سازگاری، نیمه‌عمر طولانی، مقرون به صرفه بودن، سنتز آسان و عدم تحریک سیستم ایمنی، نیوزوم‌ها را برای تحویل هدفمند دارو به سلول‌های تومور مناسب می‌کند، اثربخشی درمان را افزایش داده و عوارض جانبی را کاهش می‌دهد.^{۱۷، ۱۸}

در این پژوهش، تأثیر DNzyme در ترکیب با نیوزوم بر بیان پروتئین‌های مرتبط با متاستاز و التهاب بررسی شد؛ رویکردی نوین که می‌تواند مسیر توسعه درمان‌های هدفمند در سرطان پستان را هموار کند.

روش کار

به منظور طراحی DNzyme ژن NFκB، ابتدا توالی این ژن از سایت NCBI جستجو گردید و توالی mRNA مربوط به زیر واحد P65 استخراج شد. سپس این توالی در نرم‌افزار Oligo7 جایگذاری گردید و بخش‌هایی که دارای سکانس و ساختار مطلوب بودند شناسایی شدند. از میان توالی‌های به دست آمده، فهرستی تهیه شد و بر اساس معیارهایی همچون درصد بازهای سیتوزین و گوانین (GC%)، دمای ذوب (Tm) مطلوب دو بازوی DNzyme و عدم تشکیل ساختار ثانویه، امتیازدهی انجام گرفت. در نهایت، توالی منتخب برای سنتز سفارش داده شد و DNzyme طراحی شده با خصوصیات ذکر شده (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت.

توالی DNzyme:

5'CTGAAAGGAGGCTAGCTACAACGATCTTCTTC3'

پروتئین نقش کلیدی در پاسخ‌های ایمنی و التهابی دارد و به همین دلیل یک هدف درمانی مهم در بیماری‌هایی مانند سرطان است. با این حال، نقش NFκB در سرطان پیچیده است. فعال‌سازی بیش‌ازحد آن در شرایط التهاب مزمن می‌تواند منجر به فرار سلول‌های سرطانی از سیستم ایمنی شود.^{۶، ۷} محققان در تلاش‌اند تا با مهار رگ‌زایی در تومورهای سرطان پستان، رشد و پیشرفت آنها را متوقف کنند.

پروتئین VEGF نیز نقش مهمی در رشد و متاستاز تومور ایفا می‌کند. این پروتئین با ایجاد شبکه عروقی در بافت سرطانی، رشد و توسعه تومور را تسهیل می‌کند و به همین دلیل یک هدف درمانی کلیدی در سرطان محسوب می‌شود.^{۸، ۹} سلول‌های سرطانی پروتئین‌های بیشتری نسبت به سلول‌های سالم تولید می‌کنند. ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) به ویژه MMP-2 و MMP-9 نقش کلیدی در متاستاز و تهاجم سلول‌های سرطانی دارند. این آنزیم‌ها می‌توانند پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن، الاستین، فیبرونکتین، ژلاتین و لامینین را تجزیه کنند و اثرات پیش‌التهابی و ضدالتهابی بر بافت‌ها داشته باشند.^{۱۰، ۱۱} دلائل انتخاب ژن MMP-2 و MMP-9 با یکدیگر این است که به لحاظ ساختاری باهم مرتبط هستند. آنها ویژگی مشترک در دامنه اتصال دارند و در حالت طبیعی خود، کلاژن‌های V و IV را کاهش می‌دهند و سایتوکاین‌ها را نیز فعال می‌کنند.^{۱۲} پروتئین Snail سرکوبگر رونویسی است و با اتصال به پروموتور ژن‌های هدف و جذب آنزیم‌هایی مانند متیل ترانسفرازها و هیستون داستیلازها، فعالیت رونویسی را مهار می‌کند. این پروتئین با نیمه‌عمر کوتاه و تغییرات پس از ترجمه، پایداری و فعالیت خود را تنظیم می‌کند و نقش مهمی در چرخه سلولی و بقای سلول دارد. بیان بیش‌ازحد Snail می‌تواند با تأخیر یا توقف چرخه سلولی، رشد سلول‌ها را مهار کند و پتانسیل درمانی آن را نشان دهد.^{۱۳}

پروتئین Twist از نوع Helix-Loop-Helix است و نقش مهمی در مهاجرت سلولی و سرطان دارد. این پروتئین در بخش N-ترمینال خود غنی از گلیسین و در بخش C-ترمینال دارای دامنه‌ای سرکوب‌کننده Twist Box است. Twist در طول رشد جنینی باعث مهاجرت سلول‌های تاج عصبی می‌شود و این توانایی را برای تسهیل انتقال اپیتلیال به مزانشیم در سرطان نیز به کار می‌گیرد. این پروتئین با کاهش E-cadherin و افزایش N-cadherin و همچنین فعال‌سازی پروتئین POSTN به متاستاز کمک می‌کند و با محافظت از سلول‌ها در برابر آپوپتوز، نقش پروتوآنکوژن دارد.^{۱۴} تمام آزمایش‌ها در این پژوهش بر روی رده سلولی MCF-7 انجام شد. این رده سلولی سرطان پستان انسانی از یک زن ۶۹

جدول ۱. خصوصيات DNAzyme

Oligo Name Sequence 5'-3'	Oligo ID	BC	Purif.	EC	MW (Da)	TM (°C)	OD (260nm)	nmol	µl required for 100µM solution
DNAzyme	220426X043A022/2	۳۵	Desalted	۰/۰۳۴۷	۰/۷۰۲۱۰	۷۴	۴/۱۸	۲/۴۲۴	۲۴۲۴

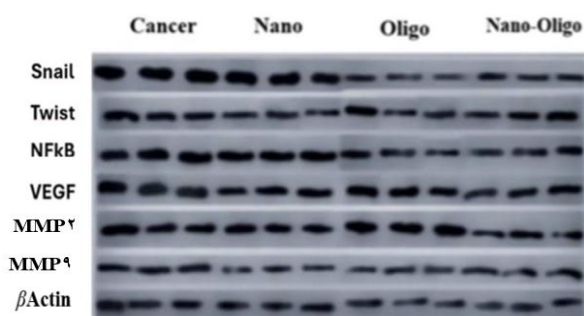
اختصاصی انکوبه گردید. در ادامه غشاءها با TBS حاوی ۱/۰ درصد توتین ۲۰ (TBST) (DNAbiotech; Iran) شسته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه کوئزوک به Horseradish Peroxidase (HRP) انکوبه گردید و با TBST مجدداً شسته شد. نهایتاً باند‌های پروتئینی با استفاده از کیت کمیلومینسانس (ECL Kit, Hyclone Laboratories) و با دستگاه کمی داکت مشاهده گردید و توسط نرم‌افزار ImageJ آنالیز شدند. سطح بیان پروتئین‌ها نسبت به سطح بیان ژن کنترل داخلی β -actin نرمالیز شد. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey's HSD post-hoc بررسی شدند. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردید و مقادیر $P < ۰/۰۵$ ، $P < ۰/۰۱$ ، $P < ۰/۰۰۱$ معنادار در نظر گرفته شدند. این پژوهش با اخذ کد اخلاق (کد: IR.IAU.PS.REC.1402.047) از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شد.

یافته‌ها

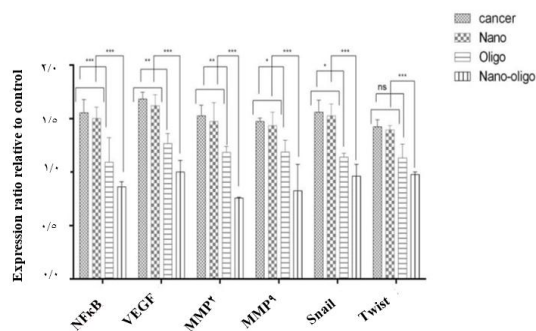
در شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM از نیوزوم‌های حامل DNAzyme نشان داده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، ذرات کروی با ساختاری دولایه با میانگین اندازه بین ۱۰ تا ۶۰ نانومتر قابل مشاهده می‌باشند. بررسی میزان بیان پروتئین‌ها بر روی گروه‌های مختلفی از سلول‌های MCF7 در شرایط مختلف تیمار (طبق گروه‌های مورد مطالعه) انجام شد.

همان‌طور که در شکل ۲A و شکل ۲B و جدول ۲ مشخص است، میزان بیان پروتئین‌های Snail, Twist, NF κ B, VEGF, MMP9, MMP2 در نمونه الیگو و الیگو نیوزوم کاهش بیشتری نسبت به گروه نیوزوم و کنترل نشان دادند. میزان بیان پروتئین‌ها پس از نرمال‌سازی با ژن کنترل داخلی β -actin مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان پروتئین NF κ B (دخیل در التهاب) در گروه‌های الیگو و الیگو نیوزوم نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). بیان پروتئین VEGF (دخیل در آنژیوژنز) در گروه الیگو نیوزوم ($P < ۰/۰۰۱$) و در گروه الیگو ($P < ۰/۰۰۱$) نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری داشت. پروتئین‌های دخیل در متاستاز (MMP-2 و MMP-9)، MMP-2 در گروه

به‌منظور تهیه نیوزوم و محصور کردن اولیگو در آن، از روش هیدراتاسیون لایه‌نازک استفاده شد. در این روش، دترجنت غیر یونی Span60 به میزان ۵۸ mg و کلسترول به میزان ۴۲ mg در مخلوطی از حلال‌های آلی شامل کلروفرم (۹ mg) و متانول (۱ mg) در یک فلاسک ته‌گرد حل شدند. سپس محلول حاصل به دستگاه Rotary Evaporator در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه منتقل شد تا حلال تبخیر شود. در ادامه، محلول آبی حاوی DNAzyme (۱ cc محلول PBS شامل ۸۶ µg/ml DNAzyme) افزوده شد و مجدداً همان شرایط تبخیر اعمال شد. در طی این فرایند یک لایه‌نازک در سطح داخلی فلاسک تشکیل گردید که با افزودن PBS هیدراته شد. نیوزوم‌های حاصل برای یکنواخت‌سازی به مدت ۲ دقیقه تحت امواج سونیکاتور قرار گرفتند. برای بررسی مورفولوژی نانوذرات از میکروسکوپ TEM استفاده شد. سلول‌های MCF7 خریداری‌شده از انستیتو پاستور ایران، در محیط کشت RPMI-1640 (Biosera, France) حاوی HEPEs، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (۱۰۰ unit/ml) و سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, USA) با غلظت ۱۰۰% کشت داده شدند. سلول‌ها به چهار گروه تقسیم شدند: (۱) گروه تیمار با DNAzyme (۲) گروه تیمار با نیوزوم (۳) گروه تیمار با DNAzyme نیوزومه و (۴) گروه کنترل. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند. سلول‌های MCF7 با PBS شستشو داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت با ۸۶ µg/ml الیگو تیمار شدند. سپس با استفاده از بافر RIPA (DNAbiotech, Iran) حاوی کوکتل بازدارنده پروتئاز و فسفاتاز به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ هموژنیزه و لیز شدند. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت پروتئین به روش برادفورد با استفاده از تست کالریمتریک (kit BC Assay, DNAbiotech, Iran) تعیین گردید و مقادیر مساوی از نمونه‌ها (برحسب میکروگرم) بر روی ژل SDS-PAGE (DNAbiotech, Iran) ۱۰ یا ۱۲ بارگذاری و جداسازی گردید. پس از انتقال پروتئین‌ها به غشاء پلی‌وینیلیدین فلوراید (PVDF) (Sigma-Aldrich; USA)، غشاءها در محلول بلاکینگ ۲% شیر خشک، انکوبه شدند. سپس غشاءها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه



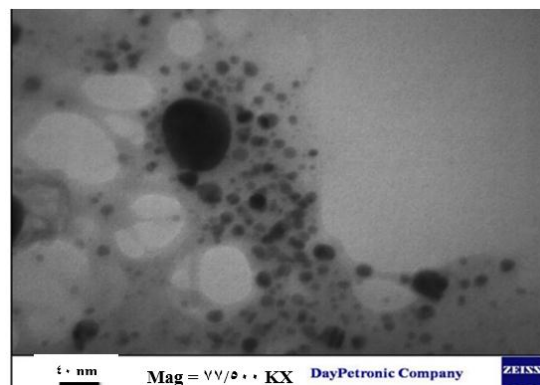
A



B

شکل ۲. نتايج حاصل از آناليز وسترن بلات

اليگونيوزوم ($P < 0.001$) و در گروه اليگو ($P < 0.01$) نسبت به كنترل كاهش يافت. MMP-9 نيز در گروه اليگونيوزوم ($P < 0.001$) و در گروه اليگو ($P < 0.05$) كاهش معني داري نشان داد. در ارتباط با پروتئين هاي دخيل در EMT (Twist و Snail)، بيان Snail در گروه اليگونيوزوم ($P < 0.001$) و در گروه اليگو ($P < 0.05$) نسبت به كنترل كاهش يافت. بيان Twist در هر دو گروه اليگو و اليگونيوزوم نسبت به كنترل به طور معني داري كاهش داشت ($P < 0.001$).



شکل ۱. تصوير نانوذرات DNAzyme نيزومه با ميكروسكوپ الكتروني TEM

جدول ۲. نتايج حاصل از كمی سازی داده های وسترن بلات

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Difference	95% CI of difference	Summary	Adjusted P value
NFκB				
cancer vs Nano	-0.0233	-0.1724 تا 0.1257	ns	0.8960
cancer vs Oligo	-0.4637	-0.7389 تا -0.1884	***	0.01
cancer vs Nano-oligo	-0.7933	-0.9181 تا -0.6686	***	0.01
VEGF				
cancer vs Nano	-0.620	-0.1627 تا 0.2867	ns	0.8427
cancer vs Oligo	-0.4163	-0.1916 تا 0.6411	**	0.01
cancer vs Nano-oligo	-0.7830	-0.4583 تا 0.9077	***	0.01
MMP2				
cancer vs Nano	-0.0520	-0.1727 تا 0.2767	ns	0.8982
cancer vs Oligo	-0.3423	-0.1176 تا 0.5671	**	0.01
cancer vs Nano-oligo	-0.7697	-0.0447 تا 0.9944	***	0.01
MMP9				
cancer vs Nano	-0.3867	-0.1871 تا 0.2634	ns	0.9037
cancer vs Oligo	-0.2853	-0.6070 تا 0.0510	*	0.05
cancer vs Nano-oligo	-0.7463	-0.4216 تا 0.8711	***	0.001
Snail				
cancer vs Nano	-0.30323	-0.1894 تا 0.2601	ns	0.9639
cancer vs Oligo	-0.4187	-0.1939 تا 0.6434	*	0.05
cancer vs Nano-oligo	-0.0997	-0.3749 تا 0.8244	***	0.01
Twist				
cancer vs Nano	-0.2867	-0.1971 تا 0.2534	ns	0.9799
cancer vs Oligo	-0.2900	-0.6027 تا 0.0547	**	0.05
cancer vs Nano-oligo	-0.4453	-0.2206 تا 0.7701	***	0.01

رحم، كولوركتال و آندومتر منجر به ايجاد بيماري عروق كرونر، بيماري عروق محيطي و لكواسفالوپاتي می‌شود.^{۲۴} تالونساری ماتیلا و همكاران به بررسی بیان پروتئين MMP2 و نقش آن در متاستاز تومور پرداختند. آنها در مطالعه خود دریافتند که اختلال در عملکرد این پروتئين منجر به افزایش متاستاز و کاهش بقا در افراد مبتلا به سرطان پستان می‌شود. همچنین نتایج مطالعه آنها نشان داد که MMP2 در کارسینوم پستان بیان می‌شود. تالونساری ماتیلا و همكارانش با استفاده تست ایمنوهیستوشیمی با $P < 0.05$ نشان دادند که ماتریکس متالوپروتئيناز-۲ به‌عنوان یک عامل در پیش‌آگهی در کارسینوم پستان می‌تواند به‌کار رود.^{۲۵}

جوزف و همكارانش به بررسی بیان پروتئين MMP9 در چندین رده سرطان پستان پرداختند. آنها دریافتند که اختلال در سیگنال-دهی MMP9 منجر به تغییر ساختار اسکلت سلولی، مهاجرت، تهاجم و تغییر در مورفولوژی سلولی می‌شود و تخریب ECM توسط اعضای خانواده MMP از جمله MMP9 باعث رشد تومور، متاستاز، تهاجم و سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی می‌شود. تحقیقات آنها نشان داد که بیان بالای MMP9 با افزایش تکثیر سلولی و همچنین سطوح بالای CK17 با افزایش بیان MMP9 همراه بود. در تومورهای پستان با بیان بالای CK17 و CK5/6، میزان مرگ‌ومیر بالاتری گزارش شده است که نقش احتمالی MMP9 را در پیشرفت تومور تقویت می‌کند. جوزف و همكاران گزارش کردند که بیان بالای MMP9 به‌طور مثبت با مسیرهای سیگنالینگ EGFR و PI3K مرتبط است. اختلال در مسیر K/Akt PI3 منجر به ترشح MMP9 و افزایش تهاجم سلولی می‌شود و نشان می‌دهد که MMP9 می‌تواند در مسیرهای تومورزایی نقش کلیدی داشته باشد.^{۲۶} اسمیت و همكاران به بررسی بیان پروتئين Snail در چندین رده سرطان پستان پرداختند. آنان دریافتند که اختلال در سیگنال‌دهی (ERK1/2) MAPK منجر به متاستاز و EMT می‌شود و این مسیر توسط Snail تنظیم می‌گردد. بیان بیش‌ازحد Snail در رده سلولی MCF7 باعث القای EMT، افزایش مهاجرت سلولی، کاهش چسبندگی سلولی و افزایش تومورزایی می‌شود. اسمیت و همكاران با استفاده از تست وسترن بلات، افزایش بیان Snail را در رده سلولی MCF7 نسبت به سلول‌های نرمال پستان (HMEPiC) مشاهده کردند. همچنین، افزایش بیان بیشتری از این پروتئين در رده‌هایی سلولی T47-D و MDA-MB-231 گزارش شد.^{۲۷} کاو و همكاران بیان پروتئين Twist و نقش آن در EMT و متاستاز ریوی را بررسی کردند. آنها نشان دادند که اختلال در بیان Twist منجر به انتقال اپیتلیال-مزانشیمی و

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان و عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان است که ۱۴ درصد از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان را به خود اختصاص می‌دهد.^{۲۰،۱۹} مطالعات توجه زیادی به بررسی مکانیسم‌های مولکولی و بیان ژن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با سرطان داشته‌اند. از مسیرهای مهم و مؤثر دخیل در سرطان پستان مسیرهای التهابی، تکثیر سلولی، متاستاز، رگ‌زایی و آپوپتوز است.^{۲۱} از جمله فاکتورهای مهم درگیر در پاسخ ایمنی و التهاب فاکتور هسته‌ای NFκB است که نقش حیاتی در پیشرفت سرطان دارد. این فاکتور در سلول نرمال در تنظیم عملکرد سلول نقش دارد اما در شرایط بدخیمی تحت‌تأثیر عوامل مختلف می‌تواند تغییر عملکرد داشته باشد. در شرایط افزایش بیان می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در تنظیم چرخه سلولی، التهاب و آپوپتوز شود و عملکرد سلول را کاملاً تغییر داده و آنها را به سمت سرطانی شدن سوق دهد.^{۲۲} مسیر سیگنالینگ NFκB در ايجاد سرطان به‌خصوص سرطان پستان نقش مهمی دارد و سبب بیان ژن‌های دخیل در تکثیر سلولی، التهاب، متاستاز و رگ‌زایی می‌شود. نقش NFκB در تبدیل یک سلول نرمال به سلول بدخیم می‌تواند پیچیده باشد. فعال‌سازی NFκB در سرطان‌های مختلف، انواع مختلفی از عملکردهای انکوژنیک را اعمال می‌کند.^{۲۰،۶} نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات در مطالعه حاضر نشان داد که DNazyme به‌عنوان یک کاتالیزور توانست باعث کاهش معنی‌دار بیان پروتئين‌های Twist، Snail، NFκB، VEGF، MMP2، MMP9 شود. همچنین، استفاده از DNazyme نیوزومه می‌تواند کاهش معنی‌داری در فاکتورهای دخیل در مهاجرت سلولی ايجاد کند. ناصرالاسلامی و همكاران از DNazyme نیوزومه ژن NFκB در درمان نارسایی قلبی استفاده کردند. آنها DNazyme ژن NFκB را به دو شکل الیگو و الیگونیزوم مورد مطالعه قرار دادند و در نمونه نیوزومه‌شده افزایش اثربخشی دارو را مشاهده کردند. با توجه به نقش NFκB در التهاب و آپوپتوز، ناصرالاسلامی و همكارانش به بررسی فاکتورهای التهابی پرداختند و کاهش بیان فاکتورهای التهابی را مشاهده کردند.^{۲۳} بروگوسکا و همكاران به بررسی بیان VEGF و نقش آن در سرطان پستان پرداختند. آنها در این مطالعه دریافتند که بیان بالای VEGF منجر به آنژیوژنز شده و شرایط تهاجم و متاستاز سلول تومور فراهم آورده و با ايجاد روندی در کاهش بیان VEGF می‌تواند به‌عنوان روشی در درمان ضد رگ‌زایی استفاده گردد. بروگوسکا و همكارانش گزارش کردند که افزایش بیان VEGF علاوه‌بر ايجاد سرطان به‌ویژه سرطان پستان، گردن

درمانی برای سرطان پستان مطرح شود. این روش با کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با متاستاز، التهاب و آنژیوژنز اثربخشی قابل‌توجهی داشته و ترکیب آن با نیزوم موجب افزایش کارایی درمان شده است. با توجه به ویژگی‌هایی مانند وزن مولکولی پایین، پایداری بالا و هزینه کم، DNAzyme- نیزومه ژن NFκB می‌تواند یک گزینه درمانی امیدوارکننده باشد. با این‌حال، برای تأیید کامل اثربخشی و ایمنی این روش، انجام مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی ضروری است. این پژوهش گامی مهم در جهت توسعه روش‌های هدفمند و کم‌هزینه برای درمان سرطان پستان به‌شمار می‌رود و می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات گسترده‌تر در این حوزه باشد.

قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه مصوب در دانشگاه آزاد علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مشارکت پدیدآوران

مریم ناصرالاسلامی و ندا موسوی نیری: ایده پردازی و طراحی اثر؛ لیلا آقامحسني: جمع‌آوری و تحلیل و تفسیر داده‌ها و لیلا آقامحسني، مریم ناصرالاسلامی، ندا موسوی نیری: تهیه پیش‌نویس و نقد و بررسی آن را بر عهده داشتند.

منابع مالی

این تحقیق با بودجه شخصی نویسندگان انجام شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

در صورت نیاز تمام داده‌ها قابل ارائه هستند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی آزمایش‌ها بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه آزاد علوم پزشکی تهران پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1402.047 انجام شد.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله وجود ندارد.

متاستاز شده و مقاومت دارویی ایجاد می‌کند. در این مطالعات، Twist/ROR1 در تهاجم و متاستاز به ریه نقش موثری ایفا می‌کند. کائو و همکاران با استفاده از تست وسترن بلات، افزایش بیان Twist را گزارش کردند.^{۲۸} جیان‌تونیو و همکاران به طراحی DNzyme با هدف کاهش بیان Twist پرداختند و آن را DZ-TWT نامیدند. آنها نشان دادند که DZ-TWT قادر به جدا کردن mRNA ژن Twist است. ترنس‌فکشن DZ-TWT در سلول‌های HCT10/21 کاهش چشمگیر سطح mRNA ژن Twist و افزایش آپوپتوز را به دنبال داشت.^{۲۹} در مطالعه حاضر نیز DNzyme هدف‌گیرنده ژن NFκB به‌کار گرفته شد و سلول‌ها با آن تیمار شدند. علاوه‌براین، برای افزایش کارایی دارو از نیزوم به‌عنوان حامل استفاده گردید. نتایج نشان داد که در گروه تیمار شده با DNzyme به‌تنهایی، تغییر بیان پروتئین‌ها مشاهده شد، اما در گروه تیمار شده با DNzyme- نیزومه به دلیل رهايش کنترل‌شده دارو، اثربخشی بیشتری گزارش شد.^{۳۰} این یافته‌ها نشان داد که DNzyme می‌تواند بیان پروتئین‌های Snail، Twist، NFκB، VEGF، MMP2، MMP9 را کاهش دهد؛ پروتئین‌هایی که در مسیرهای مرتبط با مهاجرت سلولی و آنژیوژنز نقش اساسی دارند. همچنین، ترکیب DNzyme با نیزوم اثربخشی معنادارتری نسبت به DNzyme به‌تنهایی داشت. با توجه به وزن مولکولی پایین، پایداری بالا و هزینه کم، این ترکیب می‌تواند به‌عنوان یک گزینه درمانی مؤثر برای سرطان پستان مطرح شود. این پژوهش در راستای توسعه روش‌های نوین درمانی برای سرطان پستان گام برداشته و نیاز به مطالعات بیشتر برای تأیید اثربخشی آن دارد. با این‌حال، باید محدودیت‌های مطالعه در نظر گرفته شود: این پژوهش روی رده سلولی MCF-7 انجام شد که یک مدل آزمایشگاهی است و نتایج آن ممکن است در شرایط in vivo متفاوت باشد. همچنین اثر DNzyme- نیزومه ژن NFκB در درازمدت بررسی نشده است و ایمنی و پایداری آن مشخص نیست. علاوه بر این، نتایج به یک نوع خاص از سلول‌های سرطانی محدود شده و ممکن است به سایر رده‌های سلولی یا دیگر سرطان‌ها قابل تعمیم نباشد. از سوی دیگر، هرچند کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با متاستاز و التهاب مشاهده شد، اما مکانیسم دقیق عملکرد DNzyme در سطح مولکولی همچنان نیازمند بررسی بیشتر است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از DNzyme-نیزومه ژن NFκB می‌تواند به‌عنوان یک روش نوین

References

1. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*. 2022;95(1130):20211033. doi:10.1259/bjr.20211033
2. Hamta A, Ghasemian Safaei P. Relationship between polymorphisms in the CD40 gene with the prevalence of breast cancer: A case-control study. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2023;45(4):305-14. doi: 10.34172/mj.2023.34. Persian
3. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*. 2017;13(11):1387. doi:10.7150/ijbs.21635
4. Xie HY, Shao ZM, Li DQ. Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chinese journal of cancer*. 2017;36(1):36. doi:10.1186/s40880-017-0202-y
5. Ledoux AC, Perkins ND. NF- κ B and the cell cycle. *Biochemical Society Transactions*. 2014;42(1):76-81. doi:10.1042/BST20130156
6. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*. 2016;5(1):12. Published 2016 Mar 18. doi:10.3390/cells5010012
7. Jardin F. NF κ B pathway and Hodgkin lymphoma. *Biomedicines*. 2022;10(9):2153. doi:10.3390/biomedicines10092153
8. Zhang Q, Lu S, Li T, Yu L, Zhang Y, Zeng H, Qian X, et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):173. doi: 10.1186/s13046-019-1156-5
9. Banerjee S, Dowsett M, Ashworth A, Martin LA. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nature clinical practice Oncology*. 2007;4(9):536-50. doi:10.1038/ncponc0905
10. Cancemi P, Aiello A, Accardi G, Caldarella R, Candore G, Caruso C, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in ageing and longevity: Focus on sicilian long-living individuals (LLIs). *Mediators of Inflammation*. 2020;2020(1):8635158. doi:10.1155/2020/8635158
11. Koskinen SO, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikkala V, Mäkinen TT, Oksa J, et al. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2001;11(1):9-15. doi: 10.1034/j.1600-0838.2001.011001009.x
12. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1370. doi:10.3389/fonc.2019.01370
13. Yastrebova MA, Khamidullina AI, Tatarskiy VV, Scherbakov AM. Snail-family proteins: role in carcinogenesis and prospects for antitumor therapy. *Acta naturae*. 2021;13(1):76. doi:10.32607/actanaturae.11062
14. Franco HL, Casasnovas J, Rodríguez-Medina JR, Cadilla CL. Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic acids research*. 2011;39(4):1177-86. doi:10.1093/nar/gkq890
15. <https://www.atcc.org/search#q=mcf7&sort=relevancy&numberOfResults=24> ATCCAMCL.
16. Thomas IB, Gaminda KA, Jayasinghe CD, Abeysinghe DT, Senthilnithy R. DNAszymes, novel therapeutic agents in cancer therapy: a review of concepts to applications. *Journal of Nucleic Acids*. 2021;2021(1):9365081. doi:10.1155/2021/9365081
17. Rahmati M, Babapoor E, Dezfulian M. Amikacin-loaded niosome nanoparticles improve amikacin activity against antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38(12):230. doi: 10.1007/s11274-022-03405-2
18. Obeid MA, Khadra I, Aljabali AA, Amawi H, Ferro VA. Characterisation of niosome nanoparticles prepared by microfluidic mixing for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2022;4:100137. doi: 10.1016/j.ijpx.2022.100137
19. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA cancer J clin*. 2008;58(2):71-96. doi:10.3322/CA.2007.0010
20. Zou Q, Tang Q, Pan Y, Wang X, Dong X, Liang Z, et al. MicroRNA-22 inhibits cell growth and metastasis in breast cancer via targeting of SIRT1. *Retraction in*. 2021.10628. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(2):1009-16. doi:10.3892/etm.2017.4590
21. Hutchinson L. Challenges, controversies, breakthroughs. *Nature reviews clinical oncology*. 2010;7(12):669-70. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.192
22. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *nature*. 2008;454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205

23. Naseroleslami M, Mousavi Niri N, Hosseinian SB, Aboutaleb N. DNzyme loaded nano-niosomes attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury by targeting apoptosis, inflammation in a NF- κ B dependent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023;396(9):2127-36. doi:10.1007/s00210-023-02467-9
24. Brogowska KK, Zajkowska M, Mroczko B. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2023;12(6):2412. doi: 10.3390/jcm12062412
25. Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2003;89(7):1270-5. doi: 10.1038/sj.bjc.6601238
26. Joseph C, Alsaleem M, Orah N, Narasimha PL, Miligy IM, Kurozumi S, et al. Elevated MMP9 expression in breast cancer is a predictor of shorter patient survival. *Breast cancer research and treatment*. 2020;182(2):267-82. doi: 10.1007/s10549-020-05670-x
27. Smith BN, Burton LJ, Henderson V, Randle DD, Morton DJ, Smith BA, Tet al. Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. *PloS one*. 2014;9(8):e104987. doi: 10.1371/journal.pone.0104987
28. Cao J, Wang X, Dai T, Wu Y, Zhang M, Cao R, et al. Twist promotes tumor metastasis in basal-like breast cancer by transcriptionally upregulating ROR1. *Theranostics*. 2018;8(10):2739. doi: 10.7150/thno.21477
29. Hjiantonou E, Iseki S, Uney JB, Phylactou LA. DNzyme-mediated cleavage of Twist transcripts and increase in cellular apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;300(1):178-81. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02804-8
30. Aghamohseni L, Barzegarian K, Ferdowsinia M, Mousavi-Niri N, Naseroleslami M. DNzyme Loaded Nano-Niosomes Confer Anti-Cancer Effects in the Human Breast Cancer MCF-7 Cells by Inhibiting Apoptosis, Inflammation, and c-Myc/cyclin D1. *Iranian Journal of Science*. 2024;48(6):1397-410. doi: 10.1007/s40995-024-01731-8