

Effects of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Extracted from *Lactobacillus plantarum* on mRNA Levels of P53 and NF- κ B Genes in Colorectal Cancer Epithelial Cells

Mohammadreza Azimi¹, Anoosh Eghdami^{2*}, Bahram Keyvani²

Ramin Cheraghali²

1. PhD Student, Department of Biochemistry, Medical Faculty, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2. Professor, Department of Biochemistry, Medical Faculty, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 2023/10/27

Accepted: 2024/12/18

Abstract

Introduction: Nanoparticles are increasingly recognized as potential anticancer agents in cancer treatment research. This study aimed to synthesize zinc oxide nanoparticles from *Lactobacillus plantarum* biofilms and assess their impact on the expression of the P53 and NF- κ B genes in colorectal cancer epithelial cells.

Materials and Methods: Following the confirmation and isolation of zinc oxide nanoparticles from *Lactobacillus plantarum* biofilm, HT-29 cells were cultured with varying concentrations of these nanoparticles for 24 hours. The MTT assay was utilized to evaluate the toxicity of the isolated nanoparticles. The optimal concentration was determined based on these results, after which the expression levels of P53 and NF- κ B mRNA were analyzed.

Results: The MTT assay indicated that a concentration of 40 μ g/ml had the highest lethality after 24 hours. Notably, P53 expression significantly increased in the treatment group compared to the control group ($P < 0.0001$), while NF- κ B expression significantly decreased at a concentration of 10 μ g/ml ($P < 0.001$). Furthermore, the cell count in the treated group showed a significant reduction relative to the control group ($P < 0.0001$).

Conclusion: : ZnO nanoparticles induce lethality in HT-29 cells and enhance P53 expression, thereby suppressing tumor cell proliferation. These findings provide a foundation for further research and underscore the potential of zinc oxide nanoparticles in the pharmaceutical industry and colorectal cancer treatment.

***Corresponding Author:** Anoosh Eghdami

Address: Professor, Department of Biochemistry, Medical Faculty, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Tel: +989123072672

E-mail: eghdami49@gmail.com

Keywords: Colorectal cancer, Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles, MTT assay, Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), P53, NF- κ B

How to cite this article Azimi.M, Eghdami.A, Keyvani.B, Cheraghali.R. Effects of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Extracted from *Lactobacillus plantarum* on mRNA Levels of P53 and NF- κ B Genes in Colorectal Cancer Epithelial Cells. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2025; 32(2):110-122, DOI: 10.30468/jsums.2025.7618.2951.

Introduction

Cancer is characterized by the uncontrolled proliferation and growth of cells, which can invade surrounding tissues and metastasize to other body parts, leading to tumor formation. Recent statistics indicate that cancer is the second leading cause of death globally, following cardiovascular diseases. Colorectal cancer is a prevalent malignancy responsible for significant mortality worldwide, ranking as the second most common cancer in men after lung cancer. Traditional treatment modalities, including surgery, chemotherapy, and radiotherapy, often result in collateral damage to healthy cells, prompting researchers to explore novel therapeutic approaches with reduced side effects. The utilization of nanoparticles in cancer treatment has gained considerable attention in recent years.

Nanoparticles possess a high surface area-to-volume ratio, enhancing their therapeutic potential. The application of ZnO and other metal nanoparticles in biomedical and oncological contexts has become increasingly significant due to their unique chemical and physical properties. Their size, comparable to biological molecules, enables them to penetrate cells and interact with biological systems. Recent investigations have demonstrated the anticancer efficacy of ZnO nanoparticles, positioning them as promising candidates for cancer therapy.

The P53 gene, located on the short arm of chromosome 17, is a crucial tumor suppressor. It is the most frequently mutated gene in human cancers, with approximately 50% of tumors harboring mutations in P53. These mutations often result in the inactivation of both alleles during an individual's lifetime, contributing to various cancers, including lung, breast, and colorectal malignancies. In some cases, one mutated allele is inherited, while the other becomes mutated by age 25, leading to cancer development.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) was first identified as a regulator of κ light chain gene expression in rat B lymphocytes in 1986. Subsequent studies have evaluated the mechanisms and effects of NF- κ B as an inducible nuclear transcription factor that plays a pivotal role in both pathological and physiological processes. NF- κ B regulates the expression of numerous genes involved in growth, differentiation, immune responses, inflammation, and apoptosis. Given the critical roles of P53 and NF- κ B in cancer, this study aims to evaluate the effects of ZnO nanoparticles derived from *Lactobacillus plantarum*

biofilm on the expression of these genes in colorectal cancer epithelial cells.

Methodology

This study was conducted in the Cellular and Molecular Department of the Islamic Azad University of Saveh under project code 1400.123.3. The HT-29 cell line was prepared by the Department of Biotechnology (cell bank) in the central laboratory of the Islamic Azad University of Saveh. The cells were cultured in a filtered flask containing 90 cc of RPMI 640 medium (Gibco, USA), enriched with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 μ L of antibiotics (penicillin 0.01 μ g/ μ L and streptomycin 0.01 μ g/ μ L) in an incubator with 5% CO₂ at 37°C. Following this, the cells were passaged and separated based on calculations related to seeding density and added to 3-cm plates after counting.

MTT assay

The MTT assay was employed to assess the cell viability percentage and identify the optimal concentration for treatment with ZnO nanoparticles. Approximately 5×10^4 cells (counted using Trypan blue dye) were cultured in 96-well plates and treated with 5, 10, 20, and 40 μ g/ml of ZnO nanoparticles for 24 hours.

Percentage of live cells = (Average absorbance of treatment sample / Average absorbance of control sample) $\times 100$

Cell Culture in the Presence of ZnO Nanoparticles

Following the initial culture and cell counting, 3×10^5 HT-29 cells were transferred to 3-cm plates and divided into two groups: Group 1 received HT-29 cells with 10 μ g/ml ZnO nanoparticles, while Group 2 was the control group (HT-29 only). RNA extraction and real-time PCR analysis were performed after 24 hours of culture.

Primer Design and Quality Analysis Using Agarose Gel

Primers were designed for two exons using Oligo 7 software after obtaining the exon sequences from the Ensembl website. The accuracy of the primers was evaluated using the BLAST tool on the NCBI website.

Real-Time PCR Analysis

All biological samples were analyzed in triplicate using the Rotor-Gene Q 2.3.5 real-time PCR machine (RotorGene Co.). The protocol involved an initial separation of cDNA strands at 95 °C for 10 minutes,

followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 10 seconds, 60 °C for 20 seconds, and 72 °C for 20 seconds. Master Mix and SYBR Green kits from Yekta Tajhiz Azma Co. were utilized. A standard curve was generated based on concentration gradients to normalize the cDNA, and melting curves and CT values were analyzed for each sample. The results were measured using the delta-delta Ct method and log2 transformation, with statistical analyses performed using the t-test to assess differences between groups.

Results

MTT Assay: This assay determined the 50% lethal concentration, which was found to be 40 µg/mL after 24 hours of treatment. Based on the MTT assay results, a concentration of 10 µg/mL was selected for subsequent gene expression analysis.

Cell Count: Twenty-four hours post-culture with ZnO nanoparticles, the number of HT-29 cells in the treated group was significantly lower than in the control group ($P < 0.05$). Morphologically, the treated cells exhibited characteristics indicative of apoptosis.

RNA Extraction: RNA from both control and treated samples was subjected to electrophoresis to evaluate quality and quantity. In this study, RNA extraction was successful and suitable for cDNA synthesis. The extracted RNAs were quantified using NanoDrop, yielding an average OD of 540 ng/µl (range: 220-830 ng), with an OD ratio of 1.96. The P53 expression level was significantly higher in the ZnO nanoparticle-treated group compared to the control group ($P < 0.0001$). In contrast, NF-κB expression significantly decreased in the treated group ($P < 0.0001$).

Discussion

The application of nanoparticle technology in medical sciences presents a promising avenue for effectively diagnosing and treating various diseases. The current study demonstrated that treatment with 10 µg/mL of ZnO nanoparticles decreased cell numbers and increased P53 expression in HT-29 cells. Previous studies have reported that ZnO nanoparticles induce apoptosis and cell death in cancer cells. For instance, Ding-Ping Bai (2017) found that ZnO nanoparticles caused apoptosis and autophagy in breast cancer cells by damaging DNA and modulating the

expression of apoptosis-related genes. Their findings align with the results of the present study. Additionally, Selvakumari et al. (2015) reported that 30 µg/mL of ZnO nanoparticles caused the death of 50% of MCF-7 cells in breast cancer. Mohd Javed Akhtar et al. (2012) also indicated that ZnO nanoparticles caused apoptosis in cancer cells through reactive oxygen species (ROS) by increasing P53 expression and activation. Another study highlighted the strong antitumor effects of ZnO nanoparticles on P98G glioma cancer cells, noting that they did not exhibit toxicity toward normal HEK 293 cells. Furthermore, ZnO particles induced apoptosis in this line of cancer cells due to their genotoxic effects.

The present study also revealed that treatment with 10 µg/mL of ZnO nanoparticles derived from *Lactobacillus plantarum* causes a decrease in NF-κB expression in colorectal cancer epithelial cells. Min-Ho Kim (2015) demonstrated that ZnO nanoparticles suppressed NF-κB expression in LPS-stimulated cells. Moreover, Mahla Deylam et al. (2021) reported that concentrations of 5 and 10 µg/mL of ZnO nanoparticles were safe and maintained nanoparticle size while inhibiting DNA synthesis and inducing apoptosis in cancer cells via P53 and NF-κB pathways. Rizwan Wahab et al. also noted that ZnO nanoparticles increased P53 expression threefold and enhanced the expression of apoptosis-related genes in MCF-7 cancer cells. Devi Subramaniam Vimala et al. (2019) reported that ZnO nanoparticles inhibited the proliferation of HT-29 cancer cells in a dose-dependent manner. Studies suggest that ZnO nanoparticles can be absorbed through the respiratory tract and intestinal wall, facilitating apoptosis and the elimination of cancer cells by activating pathways that produce reactive oxygen species or by modulating apoptosis-related gene expression.

Conclusion

This study confirms the toxic and lethal effects of ZnO nanoparticles on colorectal cancer epithelial cells. Additionally, ZnO nanoparticles enhance P53 expression while decreasing NF-κB expression. The findings of this research, alongside existing literature, support the potential of ZnO nanoparticles in the treatment of colorectal cancer. These results may be utilized as a basis for further clinical investigations.

Acknowledgment

The authors would like to express their gratitude to all participants involved in this study.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this manuscript.

بررسی اثر مهاری نانو ذرات اکسید روی استخراج شده از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان P53 و NF-kB در سلول‌های اپیتلیال سرطان روده بزرگ

محمد رضا عظیمی^{۱*}، انوش اقدامی^{۲*}، بهرام کیوانی^۲، رامین چراغ علی^۲

۱. دانشجوی دکترای زیست‌فناوری، بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه ایران
۲. استاد تمام سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، نانو ذرات به‌عنوان یک فاکتور ضد سرطانی در تحقیقات حوزه درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته و هدف از مطالعه حاضر تولید نانو ذره اکسید روی از بیوفیلیم لاکتوباسیلوس پلانتاروم و تأثیر آن بر بیان ژن‌های P53 و NF-kB در سلول‌های اپیتلیال سرطان روده بزرگ است.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی و تأیید نانو ذرات اکسید روی از بیوفیلیم لاکتوباسیلوس پلانتاروم سلول‌های HT-29 با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید روی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. در این مطالعه، پس از بیوسنتز نانو ذرات ZnO توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شناسایی نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی UV-Vis، XRD و SEM انجام شد. پس از انجام آزمایش MTT غلظت مورد نظر انتخاب و سپس بیان P53 و NF-kB در سطح mRNA با استفاده از پرایمرهای جدید طراحی شده از روش Reverse transcription (RT) qPCR انجام و با نرم‌افزار GeniX6، مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمایش MTT نشان داد که غلظت ۴۰ µg/ml بیشترین کشندگی طی ۲۴ ساعت را دارد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با نانوذره اکسید روی، میزان بیان ژن P53 به میزان معنی‌داری در گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.0001$)؛ اما میزان بیان NF-kB در گروه تحت درمان با ۱۰ µg/ml نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$). همچنین تعداد سلول‌های مورد بررسی در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: نانو ذرات اکسید روی باعث ایجاد مرگ در سلول‌های HT-29 می‌شوند. همچنین نانو اکسید روی موجب افزایش بیان ژن P53 و کاهش بیان ژن NF-kB در سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند زمینه را برای تحقیقات بیشتر و استفاده از نانو ذرات اکسید روی در صنایع دارویی و درمان سرطان روده بزرگ فراهم سازد.

* نویسنده مسئول: انوش اقدامی

نشانی: بخش سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه ایران
تلفن: +۹۸۹۱۹۶۹۶۰۲۳۴
رایانامه:

eghdami49@gmail.com
شناسه ORCID: 0000-0002-4833-8495
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-8490-2500
DOI: 10.30468/jsums.2025.7618.2951

کلیدواژه‌ها:

سرطان روده بزرگ، نانو ذرات اکسید روی، MTT، qPCR، NF-kB، P53

۱. مقدمه

بیماری سرطان در نتیجه رشد و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود. این سلول‌ها قابلیت تهاجم و حرکت به سایر نقاط بدن را دارند و می‌توانند تومور ایجاد کنند (۱-۳). طبق آمار اخیر، سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان پس

از بیماری‌های قلبی عروقی به شمار می‌آید (۴، ۵). سرطان کولون یکی از رایج‌ترین بدخیمی‌ها به شمار می‌رود که سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در کل جهان می‌شود و این نوع سرطان در مردان پس از سرطان ریه به‌عنوان شایع‌ترین نوع سرطان است (۶ و ۷). امروزه از روش‌های مختلف جراحی،

سرطان روده مورد ارزیابی قرار گرفت..

۲. مواد و روش

۲.۱. بیوسنتز نانو ذرات اکسید روی *L. plantarum*

به منظور تولید نانو ذرات اکسید روی *L. plantarum* به صورت پودر لیوفیلیزه از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (کلکسیون باکتری و قارچ) تهیه شد و مقداری از پودر در شرایط استریل به محیط کشت مایع آبگوشت اضافه گردید تا در طی ۱۸ ساعت آنکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به رشد لگاریتمی برسد.

برای مطالعه بیوسنتز، *L. plantarum* در یک فلاسک ۷۵۰ ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر براث MRS تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت باهم زدن ۱۲۰ دور در دقیقه آنکوبه شد. پس از اتمام آنکوباسیون، کشت در $2800 \times$ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و هر دو زیست توده سلولی و مایع رویی بدون سلول جمع‌آوری شدند. به‌طور خلاصه، زیست توده سه بار با سالین بافر فسفات (PBS) قبل از تعلیق در ۵۰ میلی‌لیتر آب یونیزه استریل شده حاوی ۵۰۰ میلی‌مولار غلظت Zn^{2+} شسته شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باهم زدن ۱۲۰ دور در دقیقه آنکوبه شد تا فرآیند بیوسنتز آغاز شود. پس‌از آن، زیست توده با سانتریفیوژ جمع‌آوری شد و نانو ذرات اکسید روی بیوسنتز شده با اختلال فراصوت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه به دست آمد. نانو ذرات اکسید روی بیوسنتز شده با سانتریفیوژ با سرعت بالا ($18000 \times$ گرم به مدت ۳۰ دقیقه) به دست آمد.

مطالعه حاضر در بخش سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه با کد طرح 99-35-06 انجام شد. رده سلولی HT-29 از بخش بیوتکنولوژی (بانک سلولی) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه تهیه شد. سلول‌ها داخل فلاکس فیلتر دار حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI640 (شرکت گیپکو، آمریکا) غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ و استرپتومایسین $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)، در آنکوباتور در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس، سلول‌ها پاساژ داده‌شده و با توجه به محاسبات مربوط به Seeding density، موردنظر برای انجام آزمایش‌های سلول‌ها جداسازی و پس از شمارش به پلیت‌های سه سانتی اضافه شد.

شیمی‌درمانی و اشعه درمانی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود ولی یکی از معایب و عوارض جانبی این روش‌ها از بین بردن سلول‌های سالم است که این امر باعث شده است که پژوهشگران به سمت روش‌های جدید درمان با کاهش عوارض جانبی پیش روند (۸ و ۹). یکی از روش‌هایی که به‌تازگی پژوهش‌های زیادی بر روی آن‌ها انجام‌شده است، استفاده از نانو ذرات برای درمان سرطان است.

نانو ذرات حجم بالایی نسبت به سطح دارند و منجر به افزایش پتانسیل می‌شوند. استفاده از ذرات اکسید روی و همچنین سایر نانو ذرات فلزی در کاربردهای زیست پزشکی و سرطان به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی این نانو مواد اهمیت پیدا کرده است. نانو ذرات از نظر اندازه شبیه مولکول‌های بیولوژیکی هستند، بنابراین می‌توانند از طریق سلول‌ها نفوذ کنند و با سیستم بیولوژیکی تعامل کنند (۱۰، ۱۱). در سال‌های اخیر اثرات ضد سرطانی نانو ذرات اکسید روی به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج نشان داده است نانو ذرات اکسید روی می‌تواند به‌عنوان عامل بالقوه ضد سرطانی محسوب گردد (۱۲-۱۵).

P53 از مهم‌ترین ژن‌های سرکوب‌کننده تومور است که در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار داشته و رایج‌ترین هدف تغییرات ژنتیکی در انسان بوده و جهش در این ژن در حدود ۵۰٪ از تومورهای انسانی دیده می‌شود. حالت اکتسابی جهش در این ژن بسیار شایع بوده و در حقیقت هر دو آلل ژن در طول زندگی جهش‌یافته و ایجاد سرطان می‌نمایند. مثل کارسینومای مجاری تنفسی، تومور پستان و کولون. در حالت غیر شایع‌تر نیز یکی از آلل‌های ژن به‌صورت جهش‌یافته به ارث رسیده و آلل دیگر نیز تا ۲۵ سالگی جهش‌یافته و فرد سرطان می‌گیرد (۱۶-۱۸).

فاکتور هسته‌ای NF-kB، اولین بار به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن زنجیره سبک κ در لنفوسیت‌های B موش در سال ۱۹۸۶ شناسایی شد (۱۹ و ۲۰). مطالعات سال‌های اخیر در حال تحقیق در مورد مکانیسم و اثر NF-kB هستند. به‌عنوان یک فاکتور رونویسی هسته‌ای القایی، NF-kB نقش کلیدی در شرایط فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک ایفا می‌کند و NF-kB و مسیرهای سیگنالی مختلف بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در رشد، تمایز، رشد جنینی، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سازگار، التهاب و آپاپتوز را تنظیم می‌کنند (۲۱ و ۲۲).

با توجه به نقش مهم و اساسی P53 و NF-kB در سرطان مطالعه حاضر به‌منظور تأثیر نانو ذرات اکسید روی استخراج‌شده از بیوفلم لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان P53 و NF-kB علاوه بر این سمیت نانو ذرات اکسید روی در سلول‌های اپیتلیال

۲.۲. آزمون MTT

MTT، یکی از نمک‌های تترازولیوم به رنگ زرد محلول در آب است که به‌وسیله دهیدروژنازهای موجود در میتوکندری-های فعال سلولی احیا می‌شود و سپس به شکل کریستال‌های فورمازان و غیرمحلول در آب، در سلول‌های زنده رسوب می‌نماید. این کریستال‌ها به رنگ بنفش هستند و میزان رنگ بنفش آن متناسب با فعالیت سلولی و تعداد سلول‌های زنده است. برای انجام این آزمون، ابتدا حدود 5×10^4 عدد سلول (بعد از شمارش به‌وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو) در پلیت ۹۶ خانه (در ۱۰۰ ماکرولیتر محیط کشت) کشت داده شدند. سپس با نانو ذره اکسید روی $5, 10, 20, 40 \mu\text{g/ml}$ با محیط کشت به حجم $50 \mu\text{g}$ رسانده شد سپس به چاهک‌ها اضافه گردید و در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (مرک آلمان) اضافه شد. درنهایت پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری پلیت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. جهت حصول نتیجه بهتر و اطمینان از صحت نتایج به‌دست‌آمده، هر کدام از آزمایش‌ها ۵ بار تکرار شدند. درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۲۳):

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار}} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

۲.۳. کشت و گروه‌بندی

پس از کشت اولیه و شمارش، تعداد 3×10^5 سلول HT-29 را به پلت‌های سه سانتی انتقال و به دو گروه تقسیم شدند. گروه یک، سلول‌های HT-29 با توجه به نتایج آزمایش MTT با ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ نانو ذره اکسید روی و گروه دو فقط HT-29 به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پس از کشت ۲۴ ساعته استخراج RNA انجام و آنالیز ریل تایم PCR، انجام شد.

۲.۴. زنده‌مانی و مورفولوژی سلول‌های تحت درمان

سلول‌های کنترل و مواجه یافته با ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ نانو ذره اکسید روی به‌وسیله میکروسکوپ نوری از نظر تعداد سلول‌های زنده و مورفولوژی سطحی موردبررسی قرار گرفتند.

۲.۵. طراحی پرایمر و آنالیز کیفیت آن به‌وسیله ژل آگاروز

در پژوهش حاضر پس از اخذ توالی اگزون از دو پایگاه اینترنتی NCBI و Ensembl، به‌وسیله نرم‌افزار Beacon Designer، پرایمرهای موردبررسی بر روی دو اگزون یا به‌صورت وجود فوروارد یا ریورس بر روی محل اتصال دو اگزون طراحی شد. در ادامه از دو نرم‌افزار Beacon و Oligo و پایگاه NCBI پرایمرها از نظر جایگاه، هرپین و باند اضافه موردبررسی قرار گرفت. در ادامه پس از سفارش و خریداری پرایمرها طبق پروتکل شرکت سازنده رقیق و مورداستفاده قرار گرفت (جدول ۱).

استخراج Total RNA، با استفاده از کیت دنازیست آسیا برای سلول انجام شد؛ و پس از آنالیز نانودراپ و ژل آگاروز، توسط کیت یکتا تجهیز آزما به cDNA تبدیل شد. در ادامه با توجه به دمای اتصال از فرمول دمایی ۹۵ درجه جهت جداسازی رشته-های cDNA، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس یک دوره ۴۰ سیکلی شامل ۹۵ درجه در ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه در ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه جهت PCR و آنالیز کیفیت پرایمرهای موردبررسی در ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.

۲.۶. ریل تایم و آنالیز

تمامی نمونه‌های بیولوژیک به‌صورت سه تکرار در دستگاه Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) مدل Rotor-Gene Q 2.3.5 شرکت روتورژن قرار داده شد و طبق پروتکل دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی رشته‌های cDNA، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس یک دوره ۴۰ سیکلی شامل ۹۵ در ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه جهت تکثیر و خوانش استفاده شد. در این آزمایش از کیت مستر میکس و سایبرگرین شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا منحنی استاندارد^۱ جهت استاندارد بودن cDNA انجام شد. سپس منحنی ذوب و CT در هر سمپل مورد آنالیز قرار گرفت (۲۳).

آنالیز اولیه به‌وسیله نرم‌افزار GeneX v6.7 انجام شد و نتایج همه برحسب دلتا، دلتا سی تی و لوگ دو محاسبه شد. سپس مورد آنالیز آماری (T-Test) با نرم‌افزار GraphPad V.8 قرار گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و کنترل داخلی

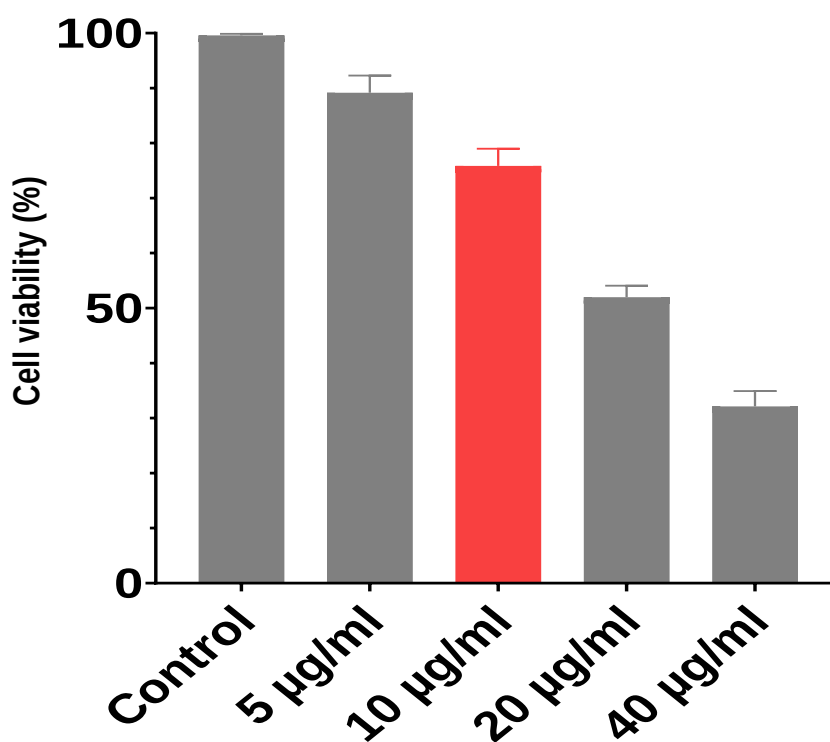
Gene (ENST)	Sequence (5' – 3')	Amplimer T _m (°C)	Length (bp)
P53(ENST00000617185.4)	F: CGATGGTGTACTTCCTGATA R: CAGCTCTCGGAACATCTC	60	84
NF-kB(ENST00000520915.5)	F: GGCTGACCATCATCATCG R: AGGAGAGACACCCAAAGG	60	126
B-ACTIN (ENST00000515712.1)	F: CTACCTTCAACTCCATCA R: GAGCAATGATCTTGATCTTC	60	165

۳. یافته‌ها

۳.۱. آزمون MTT

به منظور بررسی بقا از آزمون MTT استفاده شد. بیشترین کشندگی در غلظت ۴۰ µg/mL در ۲۴ ساعت پس از تیمار به دست

آمد (تصویر ۱). سپس با توجه به نتایج آزمون MTT و رفرانس (۱۴) از غلظت ۱۰ µg/mL جهت آنالیز تأثیر بر بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد.



تصویر ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های HT-29 تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی

۳.۲.۱. استخراج RNA

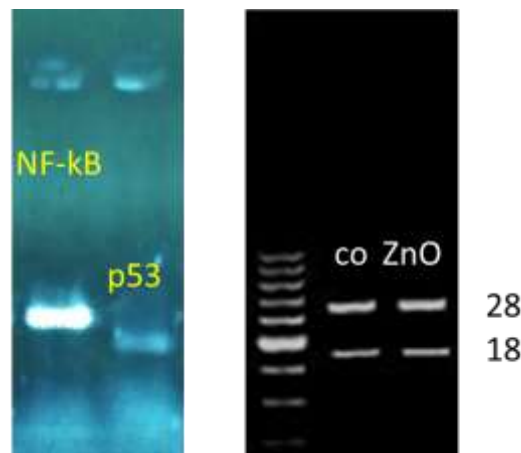
RNA نمونه کنترل و تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی، به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت الکتروفورز گردید. تصویر شماره ۲ نشان می‌دهد که استخراج RNA، به خوبی انجام شده و برای سنتز cDNA مناسب است. به منظور اطمینان از نتایج الکتروفورز و همچنین کنترل کمی، RNA های استخراج شده با نانودراپ

۳.۲. زنده‌مانی و مورفولوژی سلول‌های تحت درمان:

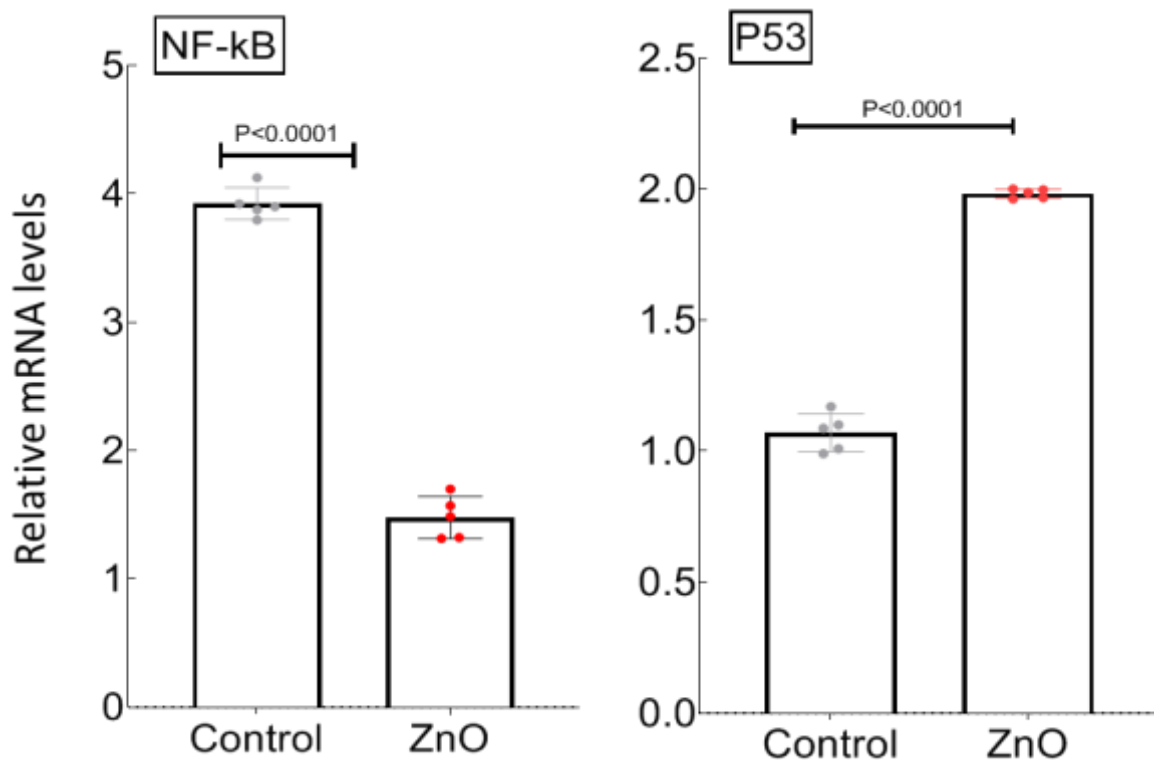
تعداد سلول‌های HT-29 در ساعت ۲۴ پس از کشت با نانو ذرات اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در گروه تحت درمان با نانو ذرات اکسید روی نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). همچنین از نظر مورفولوژی سلول‌ها ظاهری شبیه به آپاپتوز را نشان دادند.

NF- κ B، در گروه دریافت کننده نانو ذرات اکسید روی کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($P < 0.0001$) (تصویر ۲ و ۳).

ارزیابی شدند. میانگین OD نمونه ها ۵۴۰-220 ng/microl (830ng) و نسبت OD برابر ۱/۹۶ بود. میزان بیان ژن P53 در گروه دریافت کننده نانو ذرات اکسید روی بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.0001$)؛ اما میزان بیان ژن



تصویر ۲. سمت راست RNA، استخراج شده از گروه co و گروه مواجه یافته با نانوذره اکسید روی، سمت چپ تصویر عکس مربوط به ژل الکتروفورز P53 و NF- κ B



تصویر ۳. میزان تغییر بیان ژن P53 و NF- κ B بر اساس Fold change، در سلول های HT-29

حوزه های امیدوار کننده برای تشخیص و درمان مؤثر بسیاری از بیماری ها است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر نانوذره اکسید روی

۴. بحث و نتیجه گیری

استفاده از فناوری نانو ذرات در علوم پزشکی یکی از

از تکثیر سلول‌های سرطانی HT-29 به صورت وابسته به دوز جلوگیری می‌کنند (۳۳). طبق بررسی‌ها و مطالعات انجام شده نانو ذرات اکسید روی از طریق مجاری تنفسی و جداره روده می‌توانند جذب بدن شوند. این نانو ذرات از طریق فعال‌سازی مسیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا تأثیر بر ژن‌های مرتبط با آپاپتوز می‌تواند باعث ایجاد آپاپتوز و حذف سلول‌های سرطانی شود (۳۴-۳۶).

نتایج پژوهش حاضر تأییدکننده اثرات سمی و کشنده نانو ذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطان اپیتلیال کولون می‌باشند. علاوه بر این نانو ذرات اکسید روی باعث افزایش بیان p53 و کاهش بیان NF-Kb می‌شود. نتایج مطالعه حاضر و دیگر مطالعات انجام شده استفاده از نانو ذرات اکسید روی در درمان سرطان رود بزرگ را پیشنهاد می‌کند که نتایج حاضر ضمیمه ساز مطالعات بالینی گسترده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.ARAK.REC.1403.248 از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه است. به منظور رعایت مسائل اخلاقی پژوهش، در این پژوهش روند تحقیق به‌طور شفاف توضیح داده شد. همچنین در خصوص حفظ داده‌های جمع‌آوری شده اطمینان خاطر داده شد.

سهم نویسندگان

کلیه نویسندگان در نگارش مقاله همکاری داشته‌اند.

حمایت مالی

نویسنده‌های مقاله حاضر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه کمال تشکر را دارند.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

حاصل از نانو اکسید روی در غلظت ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ علاوه بر کاهش تعداد سلول‌ها باعث افزایش بیان P53 در سلول‌های HT-29 شد. مطالعات مختلف نشان دادند نانو ذرات اکسید روی باعث ایجاد آپاپتوز و مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۴ و ۲۵). طی مطالعه‌ای Ding-Ping Bai در سال ۲۰۱۷ نشان دادند نانو ذرات اکسید روی با شکست DNA و تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با آپاپتوز و اتوفازی باعث ایجاد آپاپتوز و اتوفازی در سلول‌های سرطانی پستان می‌شوند همچنین مشخص گردید نانو اکسید روی باعث افزایش بیان P53 می‌شود (۲۶) که با مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۵ Selvakumari و همکاران نشان دادند نانو ذرات اکسید روی در غلظت ۳۰ $\mu\text{g/mL}$ باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های رده MCF-7 مربوط به سرطان سینه می‌شود (۲۷). در مطالعه Mohd Javed Akhtar و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز مشخص گردید نانو ذرات اکسید روی از طریق گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش بیان و فعال‌سازی P53 باعث ایجاد آپاپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۸). در یک بررسی دیگر نشان داده شد که نانو ذرات اکسید روی اثر ضد توموری قوی روی سلول‌های سرطانی گلیوما P98G داشته این در حالی بود که نانو ذرات اکسید روی بر سلول‌های نرمال HEK 293 تأثیری نداشت و سمی در آن دیده نشد. علاوه بر این نشان داده شد که ذرات روی با اثرات ژنوتوکسیسیته باعث القای آپاپتوز در این رده سلول‌های سرطانی شده‌اند (۲۹).

نتیجه دیگر مطالعه حاضر نشان داد نانوذره اکسید روی حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ باعث کاهش بیان NF-kB در سلول‌های سرطانی اپیتلیال روده بزرگ می‌شود. Min-Ho Kim در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ نشان دادند نانو ذرات اکسید روی در سلول‌های تحریک شده با LPS باعث کاهش بیان و سرکوب NF-KB می‌شوند (۳۰). در مطالعه‌ای Mahla Deylam و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند نانو ذرات اکسید روی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ جهت حفظ اندازه نانو ذرات ایمن بوده و نشان دادند نانو ذرات اکسید روی از سنتز DNA جلوگیری می‌کنند و با تأثیر بر P53 و NF-kB باعث ایجاد آپاپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳۱). در مطالعه Rizwan Wahab و همکاران نشان دادند نانو اکسید روی باعث افزایش بیان سه برابری P53 و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آپاپتوز در سلول‌های سرطانی رده MCF-7 می‌شود (۳۲). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ Devi Subramaniam Vimala و همکاران نشان دادند نانو اکسید روی

References

- [1]. Azimi M, Mehrzad J, Ahmadi A, Ahmadi E, Ghorbani Ranjbary A. Apoptosis Induced by Ziziphora tenuior Essential Oil in Human Colorectal Cancer Cells. *Biomed Res Int*. 2021 Jul 22;2021:5522964. doi: 10.1155/2021/5522964.
- [2]. Ranjbary AG, Mehrzad J, Dehghani H, Abdollahi A, Hosseinkhani S. Variation in blood and colorectal epithelia's key trace elements along with expression of mismatch repair proteins from localized and metastatic colorectal cancer patients. *Biological trace element research*. 2020 Mar;194(1):66-75. doi: 10.1007/s12011-019-01749-9.
- [3]. Ranjbary AG, Saleh GK, Azimi M, Karimian F, Mehrzad J, Zohdi J. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis in HT-29 Cells by Stimulating Oxidative Stress and Damaging DNA. *Biological Trace Element Research*. 2022 Apr 22:1-1. doi: 10.1007/s12011-022-03229-z.
- [4]. Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis*. 2017 Mar;9(3):448-451. doi: 10.21037/jtd.2017.02.75.
- [5]. ReFaey K, Tripathi S, Grewal SS, Bhargav AG, Quinones DJ, Chaichana KL, Antwi SO, Cooper LT, Meyer FB, Dronca RS, Diasio RB, Quinones-Hinojosa A. Cancer Mortality Rates Increasing vs Cardiovascular Disease Mortality Decreasing in the World: Future Implications. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. 2021 Jun 8;5(3):645-653. doi: 10.1016/j.mayocpiqo.2021.05.005.
- [6]. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.
- [7]. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021 Oct;14(10):101174. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101174.
- [8]. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):193-9. doi: 10.7150/ijms.3635.
- [9]. Ranjbary AG, Bagherzadeh A, Sabbaghi SS, Faghihi A, Karimi DN, Naji S, Kardani M. Chlorogenic acid induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2023 Dec;50(12):9845-9857. doi: 10.1007/s11033-023-08854-y.
- [10]. Ghorbani Ranjbary A, Mehrzad J, Rahbar N, Dehghani H. Impacts of some clinicopathodemography and colorectal tissues key cell cycle and mucin stabilizing molecules on the metastasis trend in colorectal cancer patients. *Mol Biol Rep*. 2023 Oct;50(10):8589-8601. doi: 10.1007/s11033-023-08766-x.
- [11]. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010 Sep;7(9):1063-77. doi: 10.1517/17425247.2010.502560.
- [12]. Bisht G, Rayamajhi S. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine (Rij)*. 2016 Jan 1;3:9. doi: 10.5772/63437.
- [13]. Tanino R, Amano Y, Tong X, Sun R, Tsubata Y, Harada M, Fujita Y, Isobe T. Anticancer Activity of ZnO Nanoparticles against Human Small-Cell Lung Cancer in an Orthotopic Mouse Model. *ZnO Nanoparticles Inhibit Growth of Small-Cell Lung Cancer. Molecular Cancer Therapeutics*. 2020 Feb 1;19(2):502-12. doi: 10.1158/1535-7163.
- [14]. Yousef Aljohar A, Muteeb G, Zia Q, AATIF M, Farhan M, Khan M, Alsultan A, Jamal A, Alshoaibi A, Ahmad E, Alam W. Anticancer effect of zinc oxide nanoparticles prepared at diverse entry time of ion carriers against A431 skin cancer cells in vitro. *Frontiers in Chemistry*. 2022. doi: 10.3389/fchem.2022.1069450.
- [15]. Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, Kuhlbusch TA, Scherbart AM, Esser C, Schins RP, Albrecht C. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One*. 2013 Jun 3;8(6):e65704. doi: 10.1371/journal.pone.0065704.
- [16]. Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, Syrjänen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 1993 Feb;88(2):174-86. PMID: 8424417.
- [17]. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011 Apr;2(4):466-74. doi: 10.1177/1947601911408889.
- [18]. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011 Apr;2(4):466-74. doi: 10.1177/1947601911408889.
- [19]. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- [20]. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014 Sep;2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
- [21]. Hayden MS, Ghosh S. NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):203-34. doi: 10.1101/gad.183434.111.
- [22]. Liang Y, Chen G, Yang Y, Li Z, Chen T, Sun W, Yu M, Pan K, Guo W, Tian W. Effect of canonical NF-kB signaling pathway on the differentiation of rat dental epithelial stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019 Dec;10(1):1-2. doi: 10.1186/s13287-019-1252-7.
- [23]. Ghorbani Ranjbary A, Mehrzad J, Dehghani H, Abdollahi A, Hosseinkhani S. The study of expression of KI67 and P53 in co-culturing of colon epithelial cell line HT-29 with IL-17A. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2022 May 18;29(1):141-53.
- [24]. L SW, Lee CH, Lin MS, Chi CW, Chen YJ, Wang GS, Liao KW, Chiu LP, Wu SH, Huang DM, Chen L, Shen YS. ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 26;21(5):1612. doi: 10.3390/ijms21051612.
- [25]. Anjum S, Hashim M, Malik SA, Khan M, Lorenzo JM, Abbasi BH, Hano C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 12;13(18):4570. doi: 10.3390/cancers13184570.
- [26]. Bai DP, Zhang XF, Zhang GL, Huang YF, Gurunathan S. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2017 Sep 5;12:6521-6535. doi: 10.2147/IJN.S140071.
- [27]. Sadeghzadeh F, Golestani P, Beyramabdi P, Pouresmaeil V, Hosseini H, Homayouni Tabrizi M. The anticancer impact of folate-linked ZnO-decorated bovine serum albumin/silibinin nanoparticles on human pancreatic, breast, lung, and colon cancers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2024 May 29:1-18. doi: 10.1080/09205063.2024.2356967.
- [28]. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:845-57. doi: 10.2147/IJN.S29129.
- [29]. Anjum S, Hashim M, Malik SA, Khan M, Lorenzo JM, Abbasi BH, Hano C. Recent advances in zinc oxide nanoparticles (Zno nps) for cancer diagnosis, target drug delivery, and treatment. *Cancers*. 2021 Sep 12;13(18):4570. doi: 10.3390/cancers13184570.

- [30]. Kim MH, Jeong HJ. Zinc Oxide Nanoparticles Suppress LPS-Induced NF- κ B Activation by Inducing A20, a Negative Regulator of NF- κ B, in RAW 264.7 Macrophages. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015 Sep;15(9):6509-15. doi: 10.1166/jnn.2015.10319.
- [31]. Deylam M, Alizadeh E, Sarikhani M, Hejazy M, Firouzmandi M. Zinc oxide nanoparticles promote the aging process in a size-dependent manner. *Journal of materials science: Materials in medicine*. 2021 Oct;32(10):1-0. doi: 10.1007/s10856-021-06602-x.
- [32]. Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Shin HS. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 May 1;117:267-76. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.038.
- [33]. Subramaniam VD, Ramachandran M, Marotta F, Banerjee A, Sun XF, Pathak S. Comparative study on anti-proliferative potentials of zinc oxide and aluminium oxide nanoparticles in colon cancer cells. *Acta Biomed*. 2019 May 23;90(2):241-247. doi: 10.23750/abm.v90i2.6939.
- [34]. Siddiqi KS, Husen A. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. *Nanoscale research letters*. 2018 Dec;13(1):1-3. doi: 10.1186/s11671-018-2532-3.
- [35]. Liao C, Jin Y, Li Y, Tjong SC. Interactions of zinc oxide nanostructures with mammalian cells: cytotoxicity and photocatalytic toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Aug 31;21(17):6305. doi: 10.3390/ijms21176305.
- [36]. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NH, Ann LC, Bakhori SK, Hasan H, Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*. 2015 Jul;7(3):219-42. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x