

## افزایش نفوذ نانوذرات طلا به داخل رده‌های سلولی سرطانی بر اثر اتصال با پپتید TAT

دکتر صدیقه خامه‌چیان<sup>۱</sup>، دکتر سامان حسینخانی<sup>۲</sup>، دکتر رسول مدنی<sup>۳</sup>، مریم نیکخواه<sup>۴</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** نانوذرات طلا (GNPs یا Gold nanoparticles) با داشتن خصوصیات نظیر عدم سمیت، سنتز آسان و قابلیت اتصال به پپتیدهای نفوذ کننده در سلول (Cell penetrating peptides یا CPPs)، برای اهدافی نظیر ره‌ایش هدفمند و تصویربرداری زیستی مناسب می‌باشند.

**روش‌ها:** مطالعه‌ی حاضر، افزایش جذب نانوذره‌ی طلا در سلول بر اثر اتصال به پپتید TAT را نشان می‌دهد. نانوذرات طلا پس از اتصال به پپتید با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش- مرئی (Ultraviolet-visible spectrophotometry)، عکس‌برداری TEM (Transmission electron microscopy)، روش تفرق نور پویا (Dynamic light scattering یا DLS) و زتا پتانسیل (Zeta potential) توصیف شدند. سپس سیتوتوکسیسیته‌ی نانوذرات طلا در برابر سلول‌های HeLa و A431 مورد مطالعه قرار گرفت. در آخر، جذب نانوذره‌ی متصل به پپتید TAT (TAT-C-GNP) در سلول‌ها بررسی شد.

**یافته‌ها:** اثر سیتوتوکسیسیته‌ی GNP و TAT-C-GNP بر روی سلول‌ها بسیار ناچیز بود. پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات طلا، رده‌ی سلولی A431 مقدار زیادی از TAT-C-GNP را نسبت به GNP جذب کرد. در حالی که در رده‌ی سلولی HeLa هیچ یک از ذرات GNP و TAT-C-GNP جذب نشدند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که TAT-C-GNP می‌تواند جذب نانوذره‌ی طلا را در سلول افزایش دهد و نانوکمزوگه‌ی مناسبی در جهت اهداف مختلف زیست‌پزشکی باشد.

**واژگان کلیدی:** نانوذره‌ی طلا، پپتید نفوذ کننده در سلول، جذب سلولی، سیتوتوکسیسیته

**ارجاع:** خامه‌چیان صدیقه، حسینخانی سامان، مدنی رسول، نیکخواه مریم. افزایش نفوذ نانوذرات طلا به داخل رده‌های سلولی سرطانی بر

اثر اتصال با پپتید TAT. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۱): ۱۵۸۳-۱۵۷۴

## مقدمه

در سال‌های اخیر، نانوذرات طلا به دلیل قابلیت ره‌ایش مواد مختلف در جایگاه هدف، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱-۲). نانوذرات طلا با توجه به شکل‌ها و اندازه‌های مختلف، خواص فیزیکی و

شیمیایی مختلفی در جهت انتقال و بارگذاری مواد دارویی از خود نشان می‌دهند. این نانوذرات، غیر سمی هستند (۳)، سنتز آن‌ها ساده است و خواص فیزیکی شیمیایی آن‌ها می‌تواند منجر به آزادسازی دارو در نقاط مورد دست شود (۴). نانوذرات طلا،

۱- گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

۴- استادیار، گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سامان حسینخانی

نانویه به نام CADY (۲۰)، پپتید مشتق از متیلین (۷)، پپتید Rev (برگرفته از پروتئین تنظیمی HIV-1) (۲۱) و CALNRR8 (۲۲) اشاره کرد. نانوذرات طلای متصل به CPP، می‌توانند به داخل سیتوپلاسم و هسته جابه‌جا شوند (۲۳). بنا بر این، هدف از مطالعه‌ی حاضر، تولید یک نانوحامل ترکیبی (از نانوذره‌ی طلا و CPP) در جهت ره‌ایش بیومولکول‌ها و افزایش جذب سلولی بود که در این راستا، پپتید TAT به نانوذره‌ی طلا متصل و اثر پپتید در افزایش ورود نانوذره به داخل سلول‌های HeLa و A431 بررسی گردید.

## روش‌ها

### سنتز نانوذرات طلا

نانوذرات طلا بر اساس روش Turkevich (۲۴) سنتز شدند. به ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۱ درصد تتراکلرید طلای در حال جوش، ۷۵۰ میکرولیتر از محلول تری‌سدیم سیترات دی‌هیدرات به عنوان عامل احیایی اضافه گردید. بعد از این مرحله، رنگ محلول از زرد به بی‌رنگ و در نهایت به قرمز تغییر یافت. این محلول، پس از تغییر رنگ به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد و سپس گرمادهی متوقف گردید.

### عامل دار کردن نانوذرات طلا با پپتیدها و بررسی

#### خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها

جهت اتصال پپتید به نانوذرات طلای کروی، غلظت ۲۵ نانومولار TAT-C (توالی GRKKRRQRRR-C) به ۱ میلی‌لیتر از نانوذره‌ی طلا افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه روی هم‌زن قرار گرفت. سپس این محلول، با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شد. نانوذرات

می‌توانند به نوکلئیک اسید، دارو، آنتی‌بادی، پلی‌اتیلن گلیکول (۵)، SiRNA (Small interfering RNA) (۶-۵) و پپتیدها (۷-۸) متصل شوند و با حداقل سمیت، به شکل گسترده‌ای توزیع شوند (۹). این نانوذرات وظیفه‌مند، در انتقال هدفمند دارو و ژن (۷)، تشخیص داخل سلولی، تصویربرداری بیولوژیک (۸)، مطالعه‌ی سرطان (۱۱-۱۰) و حسگرهای زیستی (۱۲) مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان نانوذرات طلای وظیفه‌مند، به طور معمول نانوذرات متصل به پپتید برای افزایش انتقال به داخل سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند.

معمول‌ترین نوع پپتیدهایی که برای عامل‌دار کردن نانوذرات طلا به کار می‌روند، پپتیدهای نفوذ کننده به داخل سلول (CPPs یا Cell penetrating peptides) می‌باشند. این پپتیدها کوچک و دارای قابلیت عبور از غشای سلولی هستند و برای آزادسازی مولکول‌های درمانی، پروتئین‌ها، لیپوزوم‌ها، نانوذرات، نوکلئیک اسیدها و SiRNA استفاده می‌شوند (۱۳). به طور معمول، پپتیدهای CP از میان غشای سلولی و از طریق نفوذ مستقیم، تشکیل میسل وارونه یا منافذ ناپایدار، ماکرو پینوسیتوز (۱۴)، کلاترین یا اندوسیتوز از طریق کاوئول (۱۵) یا میکروپینوسیتوز (۱۶) جابه‌جا می‌شوند. متداول‌ترین پپتید CP، پپتید تجاری HIV TAT می‌باشد که برای آزادسازی ماکرو مولکول‌ها و یا داروها به داخل هسته و یا سیتوپلاسم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷-۱۸). از دیگر پپتیدهایی که به منظور افزایش ره‌ایش مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان به پروتئین B سورفکتانت انسانی، (سورفکتانت ریه)، لاکتو فریسین (یک گلیکوپروتئین گلبولار) (۱۹)، یک CPP آمفپاتیک

چاهک شاهد که تنها حاوی محیط بود و ۱۰۰ درصد سلول‌ها زنده در نظر گرفته شدند، محاسبه گردید.

### مطالعه‌ی میکروسکوپی زمینه تاریک

برای مطالعه‌ی جذب نانوذرات عامل‌دار شده در سلول‌های HeLa و A431،  $10^4 \times 3$  از هر نوع سلول، روی لامل‌هایی به اندازه‌ی  $18 \times 18$  که از قبل داخل چاهک‌های پلیت ۶ خانه جای گرفته بودند، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد  $CO_2$  انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از GNP و TAT-C-GNP بر روی هر یک از سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از شستشو، سلول‌ها در متانول تثبیت شدند. سپس سلول‌ها بر اساس خاصیت پراکنش نوری نانوذرات طلا، زیر میکروسکپ زمینه تاریک Olympus مطالعه گردیدند.

### یافته‌ها

در این مطالعه، نانوذرات کرومی طلا سنتز شدند و سپس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها تعیین گردید. سپس اثر اتصال پپتید در کاهش میزان سیتوتوکسیسیته‌ی نانوذرات بر روی رده‌های سلولی HeLa و A431 مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، اثر پپتید در افزایش میزان جذب نانوذرات به داخل سلول مطالعه شد.

### عامل‌دار کردن GNP با پپتید

توالی پپتید TAT-C، GRKKRRQRRR-C می‌باشد. در انتهای کربوکسیلیک پپتید TAT یک ریشه‌ی سیستمین قرار گرفته است که اتصال پپتید با نانوذره‌ی طلا را از طریق گروه تیول امکان‌پذیر می‌کند. چنان‌که در شکل ۱ نشان داده شده است، با افزودن شدن

عامل‌دار شده با استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis spectrophotometry) و عکس‌برداری TEM (Transmission electron microscopy) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین، اندازه، شاخص توزیع اندازه (Polydispersity index یا PDI) و پتاسیل زتای (Zeta potential) این نانوذرات با اندازه‌گیری DLS (Dynamic light scattering) بررسی شد.

### اثر سیتوتوکسیسیته‌ی نانوذرات عامل‌دار شده بر

#### روی سلول‌های HeLa و A431

$10^4 \times 2$  سلول HeLa و  $10^4 \times 1$  سلول A431 در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰ درصد از FBS (Fetal bovine serum) و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین (PS یا Penicillin-estreptomycin) در پلیت ۹۶ خانه قرار گرفتند و برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد  $CO_2$  انکوبه شدند. پس از شستشوی پلیت با PBS (Phosphate-buffered saline)، ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره‌ی تنها (GNP یا Gold nanoparticle) و نانوذره‌ی متصل به پپتید TAT (TAT-C-GNP) به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط قبلی انکوبه گردید.

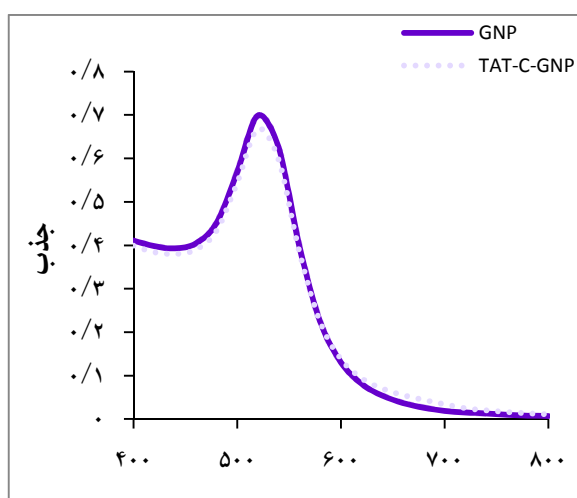
پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد رنگ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) به چاهک‌ها افزوده شد و بعد از گذشت یک دوره‌ی انکوباسیون ۳ ساعته، جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه Reader خوانده شد. در نهایت، درصد سلول‌های زنده با در نظر گرفتن

۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید. اندازه‌ی GNP پس از اتصال به پپتید TAT-C از ۵۳/۵۴ به ۹۶/۰۴ افزایش و زتا پتانسیل آن از ۳۱/۶- به ۱۲/۶- کاهش یافت (جدول ۱). همچنین، نمودار توزیع اندازه‌ی ذرات GNP و TAT-C-GNP در شکل ۲ آمده است. تصاویر TEM مربوط به GNP و TAT-C-GNP نیز در شکل ۳ آمده است.

#### اثر سیتوتوکسیسیته نانوذرات

با استفاده از آزمون MTT، اثر سیتوتوکسیسیته GNP و TAT-C-GNP بر روی سلول‌های HeLa و A431 مطالعه گردید. ۱۰۰ درصد سلول‌های A431 و ۹۱ درصد سلول‌های HeLa، پس از تیمار با GNP زنده ماندند. همچنین، درصد حیات سلول‌ها پس از تیمار با TAT-C-GNP بیش از ۸۷ درصد بود (شکل ۴). مقدار P محاسبه شده برای سلول‌های A431 تیمار شده با GNP و TAT-C-GNP در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده‌ی همین رده‌ی سلولی (شاهد) به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۱۸ بود. این مقادیر، برای سلول‌های HeLa نیز محاسبه گردید و معادل ۰/۱۸ و ۰/۲ برای GNP و TAT-C-GNP به دست آمد. در همه‌ی موارد ذکر شده، مقدار P بیش از ۰/۰۵ بود. بنا بر این، مرگ سلولی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد آن رده‌ی سلولی، معنی‌دار نبود و GNP و TAT-C-GNP برای هیچ یک از رده‌های سلولی سمی و کشنده نبود.

پپتید TAT-C به نانوذره‌ی طلا در غلظت ۲۵ نانومولار، شدت جذب نانوذره نسبت به حالت بدون پپتید کاهش یافته است که نشان دهنده‌ی جذب پپتید بر روی سطح نانوذره می‌باشد. برای عامل‌دار کردن نانوذره‌ی طلا، از غلظت ۲۵ نانومولار پپتید TAT-C استفاده گردید که این بالاترین غلظت پپتیدی است که در حضور آن، نانوذره برای مدت بیش از دو هفته در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد پایدار می‌باشد.

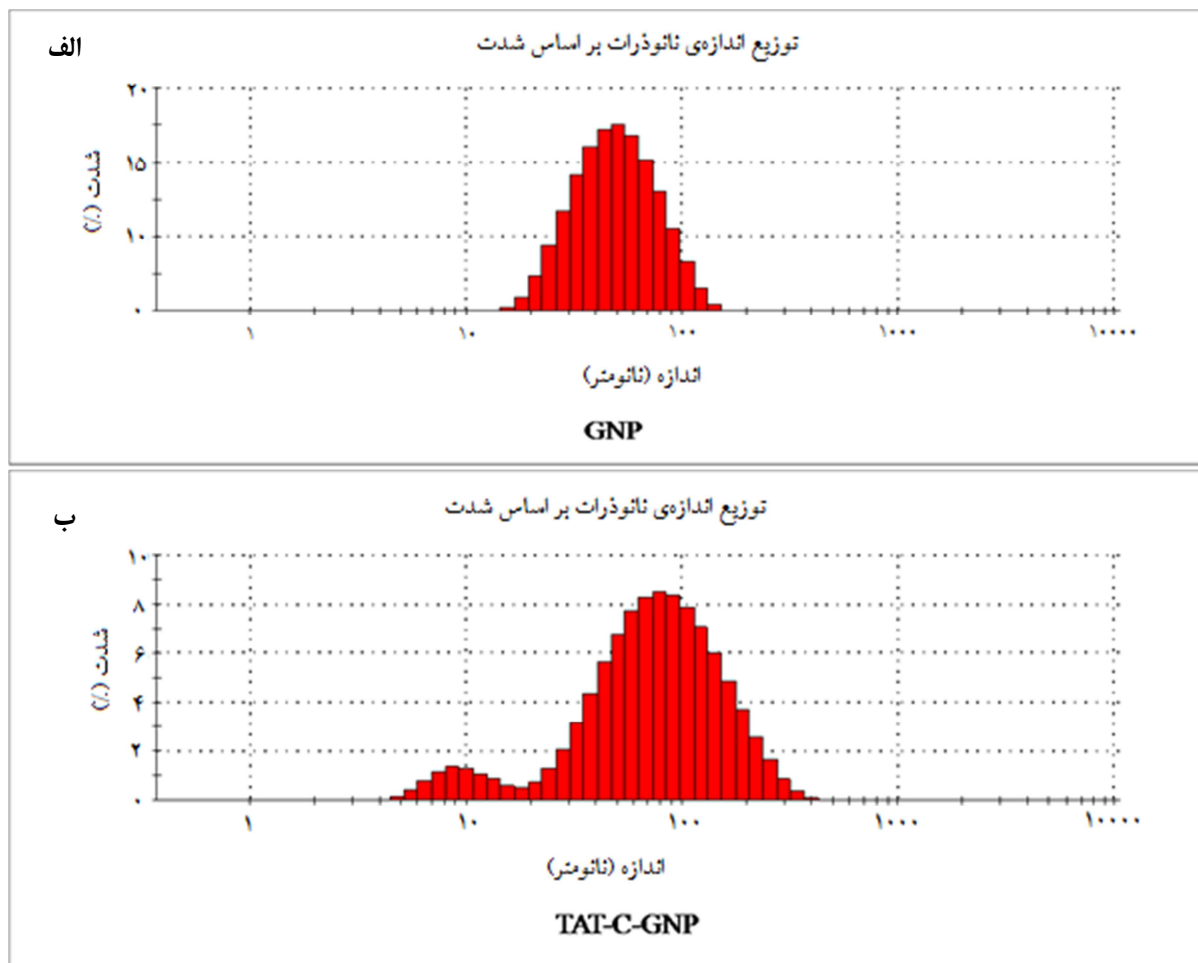


شکل ۱. اسپکتروم جذب نانوذره طلا (Gold nanoparticle) با GNP و TAT-C-GNP (۲۵ نانومولار). به تنهایی و نانوذره بعد از اتصال به پپتید

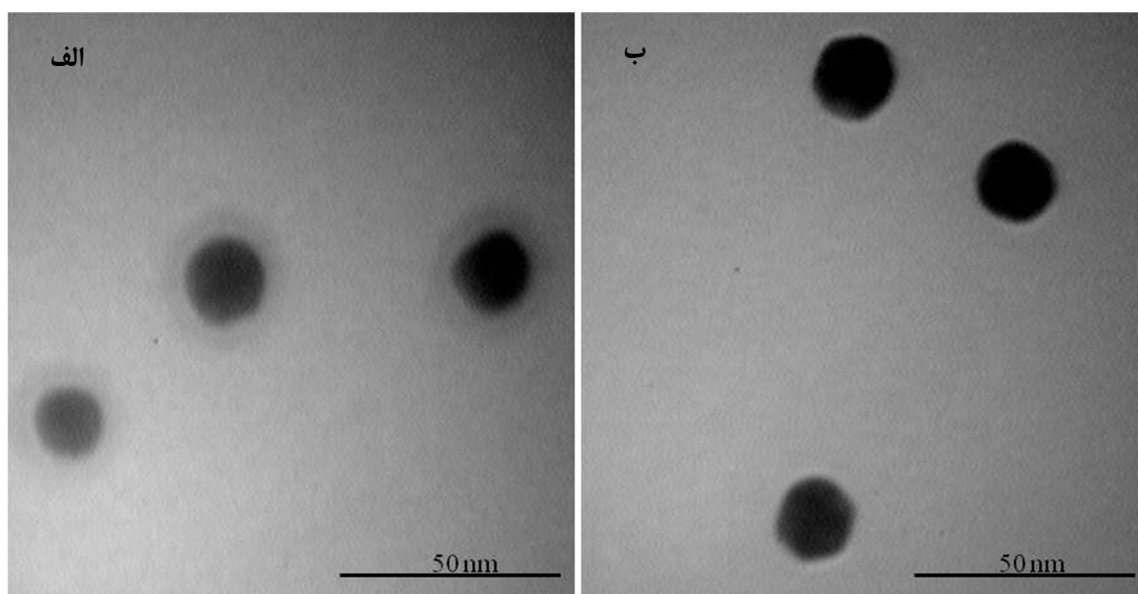
پس از تأیید اتصال پپتید به GNP، در مرحله‌ی بعد، اندازه‌گیری DLS در مورد GNP و TAT-C-GNP انجام شد. اندازه، شاخص توزیع اندازه (PDI) و زتا پتانسیل نانوذرات در دمای

جدول ۱. نتایج DLS (Dynamic light scattering)، اندازه، توزیع اندازه و زتا پتانسیل GNP (Gold nanoparticle) و TAT-C-GNP

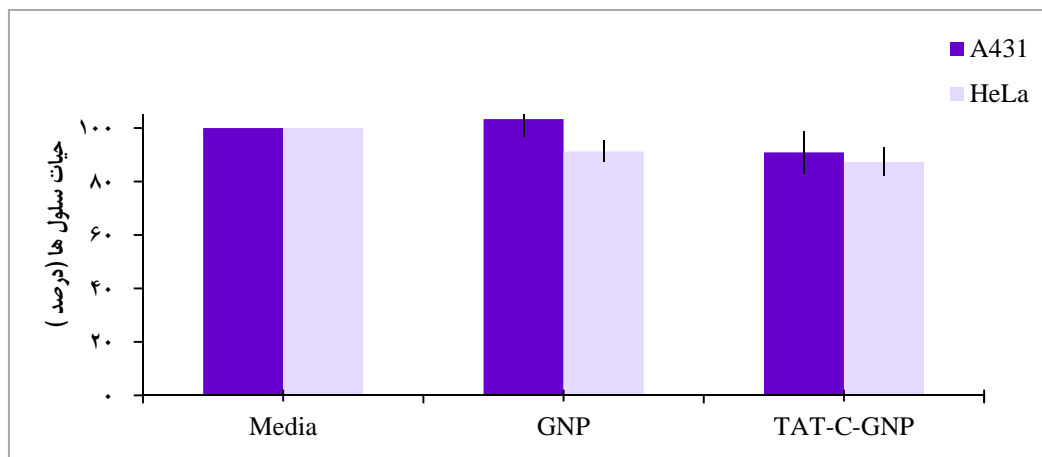
متغیر	اندازه (نانومتر)	شاخص توزیع اندازه‌ی ذرات	زتا پتانسیل (میلی ولت)
GNP	۵۳/۵۴	۰/۲۴۹	-۳۱/۶
TAT-C-GNP	۹۶/۰۵	۰/۴۱۵	-۱۲/۶



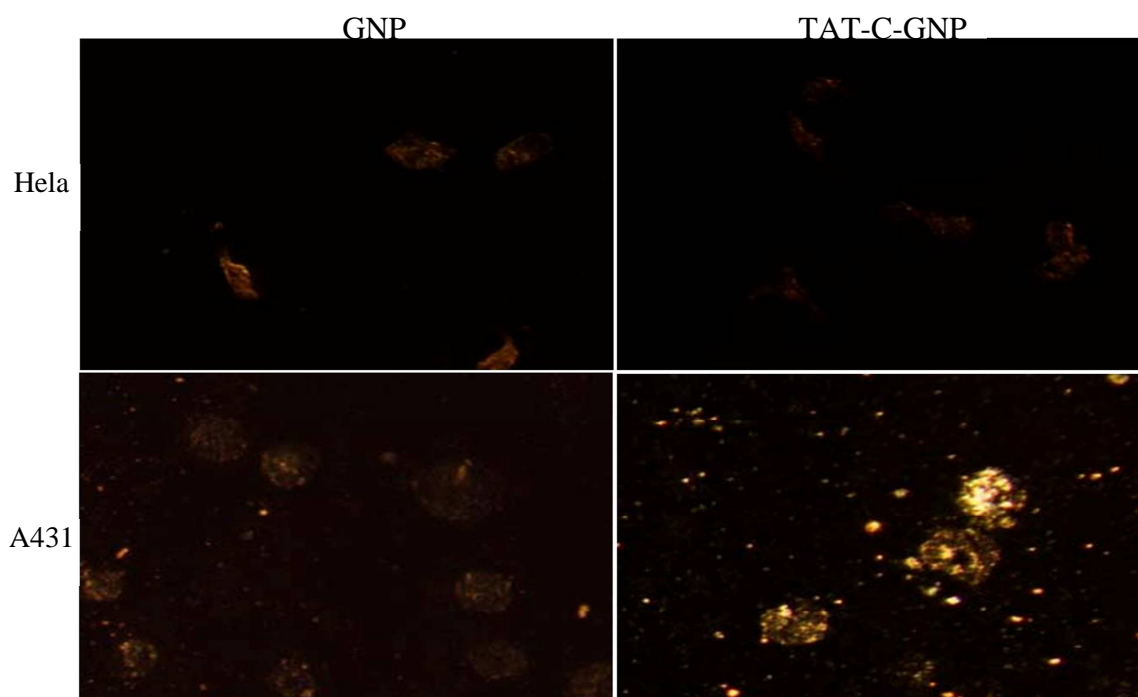
شکل ۲. نمودار هیستوگرام توزیع اندازه‌ی نانوذرات بر اساس شدت. الف) GNP (Gold nanoparticle) ب) TAT-C-GNP



شکل ۳. تصاویر TEM (Transmission electron microscopy) الف) نانوذره‌ی طلا (GNP یا Gold nanoparticle) و ب) TAT-C-GNP



شکل ۴. اثر سیتوتوکسیسیته GNP (Gold nanoparticle) و TAT-C-GNP بر روی سلول‌های HeLa و A431



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ زمینه تاریک سلول‌های HeLa و A431 در اثر تیمار با GNP (Gold nanoparticle) و TAT-C-GNP (بزرگ‌نمایی ۲۰×).

میان‌کنشی نشان نداد؛ در حالی که نفوذ آن به داخل سلول A431 قابل ملاحظه بود. بنا بر این، پپتید TAT توانست به شکل انتخابی ورود GNP به سلول‌های A431 را افزایش دهد؛ در حالی که بر روی نفوذ GNP به سلول‌های HeLa بی‌تأثیر بود (شکل ۵).

### جذب نانوذره به داخل سلول‌ها

نانوذرات طلا دارای قدرت پراکنش نوری قوی هستند. بر اساس این خاصیت، از میکروسکوپ زمینه تاریک برای بررسی اثر پپتید بر روی افزایش میزان جذب نانوذرات به داخل سلول‌ها استفاده گردید. مقایسه با GNP، TAT-C-GNP با سلول HeLa

## بحث

مطالعه‌ی اخیر با هدف افزایش نفوذ نانوذرات طلا به داخل سلول‌های سرطانی با تکیه بر اتصال پپتید نفوذ کننده در سلول یا CPP (پپتید TAT) به نانوذره به منظور تولید یک نانوحامل با پتانسیل حمل دارو صورت پذیرفت.

در بیش از ۱۵ سال گذشته، روش‌های مختلفی در جهت رهایش هدفمند طراحی شده است تا ورود الیگونوکلوئیدهای کوچک، پلاسمیدها، پپتیدها و پروتئین‌ها تسهیل گردد. از زمان کشف پروتئین‌ها تسهیل گردد. از زمان کشف پپتیدهای کاتیونی کوچکی (CPPs) که بدون آسیب به غشای سلولی می‌توانستند از آن عبور کنند، شگفتی فراوانی را به وجود آورد (۲۶-۲۷). از آن زمان به بعد، پپتیدهای مختلف دیگری با این خصوصیت نظیر TAT، ترانسپورتن و پلی‌آرژنین شناسایی شدند (۲۸). تا کنون نانوذرات طلا با انواع مختلف CPP عامل‌دار شده‌اند و اثر آن‌ها در رهایش نانوذرات مورد مطالعه قرار گرفته است. نکته‌ی روشن آن است که جذب بر اثر اتصال با CPP افزایش پیدا می‌کند (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، نانوذرات طلا با پپتید TAT-C جذب شدت جذب TAT-C-GNP نسبت به GNP در محدوده‌ی مرئی به اثبات رسید (شکل ۱). در مرحله‌ی بعد، مطالعه‌ی DLS (اندازه، زتا پتانسیل و توزیع اندازه‌ی ذرات) به منظور تعیین خصوصیات GNP و TAT-C-GNP و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر، انجام شد (جدول ۱). این مطالعه نشان داده است، اندازه‌ی TAT-C-GNP نسبت به GNP افزایش یافته است و این افزایش، نشان دهنده‌ی

اتصال پپتید با نانوذره است. همچنین، در مطالعه‌ی زتا پتانسیل، بار منفی TAT-C-GNP نسبت به GNP کاهش یافته است. بار نانوذره‌ی طلا به دلیل وجود لایه‌ی سیترات بر روی آن منفی می‌باشد که به دلیل نشستن پپتید با بار مثبت، میزان بار منفی نانوذره‌ی عامل‌دار شده با پپتید کاهش یافته است که خود، دلیل دیگری بر اتصال پپتید با نانوذره می‌باشد. در شکل ۲، هیستوگرام پراکنش GNP (الف) و TAT-C-GNP (ب) نشان داده شده است. پیک کوچکی که در هیستوگرام مربوط به پراکنش ذرات TAT-C-GNP مشخص شده است، غیر واقعی و مربوط به حرکات چرخشی ذرات غیر کروی می‌باشد (۳۰).

به علاوه، تصاویر TEM از GNP و TAT-C-GNP گرفته شده است (شکل ۳). این تصاویر حاکی از آن است که در سطح خارجی GNP، لایه‌ای با چگالی کمتر نسبت به خود نانوذره قرار گرفته است که این لایه پس از اتصال پپتید در TAT-C-GNP حذف شده است. در این جا نیز اتصال پپتید به نانوذره تأیید گردید.

اثر سیتوتوکسیسیته‌ی GNP و TAT-C-GNP بر روی رده‌های سلولی HeLa و A431 آزمایش شد که در همه‌ی موارد، میزان سمیت کمتر از ۱۵ درصد بود. بنا بر این، در مرحله‌ی بعد نفوذ آن‌ها به داخل هر یک از سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۵). بین هیچ یک از نانوذرات طلا (GNP و TAT-C-GNP) و رده‌ی سلولی HeLa میان‌کنشی صورت نگرفت؛ یعنی وجود پپتید TAT نیز نتوانست باعث افزایش جذب نانوذره‌ی طلا به داخل سلول شود؛ چرا که به طور کلی، نانوذراتی با اندازه‌ی کمتر از ۵۰ نانومتر،



ورود موادی نظیر داروهای ضد سرطان را به داخل سلول‌های سرطانی نظیر A431 افزایش دهد.

### تشکر و قدردانی

از اعضای محترم بخش بانک ژن و سلول و نیز جناب آقای دکتر مجید تیبانیان در بخش تصفیه‌ی سرم‌های درمانی مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج که در انجام مراحل مختلف این مطالعه همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

نمی‌توانند به داخل سلول HeLa نفوذ کنند (۳۱). اما در مورد سلول A431، پپتید TAT توانست باعث افزایش نفوذ نانوذره‌ی طلا به داخل سلول شود؛ در حالی که خود GNP به تنهایی نتوانست به داخل سلول A431 نفوذ بکند.

در مجموع، نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که پپتید TAT می‌تواند با توجه به نوع سلول و اندازه‌ی نانوذره‌ی طلا، ورود نانوذره به داخل رده‌های سلولی از جمله رده‌های سلولی سرطانی را افزایش دهد. بنا بر این، TAT-C-GNP به عنوان یک نانوحامل، پتانسیل آن را خواهد داشت که بتواند

### References

- Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev Res* 2006; 67(1): 47-54.
- Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(11): 1307-15.
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005; 1(3): 325-7.
- Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release* 2011; 149(1): 65-71.
- Nelson CE, Kintzing JR, Hanna A, Shannon JM, Gupta MK, Duvall CL. Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo. *ACS Nano* 2013; 7(10): 8870-80.
- Hou KK, Pan H, Ratner L, Schlesinger PH, Wickline SA. Mechanisms of nanoparticle-mediated siRNA transfection by melittin-derived peptides. *ACS Nano* 2013; 7(10): 8605-15.
- Jin E, Zhang B, Sun X, Zhou Z, Ma X, Sun Q, et al. Acid-active cell-penetrating peptides for in vivo tumor-targeted drug delivery. *J Am Chem Soc* 2013; 135(2): 933-40.
- Chanda N, Kattumuri V, Shukla R, Zambre A, Katti K, Upendran A, et al. Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(19): 8760-5.
- Tiwari PM, Vig K, Dennis VA, Singh SR. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials* 2011; 1(1): 31-63.
- Bartczak D, Muskens OL, Sanchez-Elsner T, Kanaras AG, Millar TM. Manipulation of in vitro angiogenesis using peptide-coated gold nanoparticles. *ACS Nano* 2013; 7(6): 5628-36.
- Oyelere AK, Chen PC, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjug Chem* 2007; 18(5): 1490-7.
- Wang C, Wang J, Liu D, Wang Z. Gold nanoparticle-based colorimetric sensor for studying the interactions of beta-amyloid peptide with metallic ions. *Talanta* 2010; 80(5): 1626-31.
- Hoyer J, Neundorf I. Peptide vectors for the nonviral delivery of nucleic acids. *Acc Chem Res* 2012; 45(7): 1048-56.
- Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(16): 1839-49.
- Hao X, Wu J, Shan Y, Cai M, Shang X, Jiang J, et al. Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells. *J Phys Condens Matter* 2012; 24(16): 164207.



16. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MCP. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals* 2010; 3(4): 961-93.
17. de la Fuente JM, Berry CC. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug Chem* 2005; 16(5): 1176-80.
18. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 55(6): 1189-93.
19. Karagiannis ED, Urbanska AM, Sahay G, Pelet JM, Jhunjhunwala S, Langer R, et al. Rational design of a biomimetic cell penetrating peptide library. *ACS Nano* 2013; 7(10): 8616-26.
20. Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, Nguyen QN, McMaster GK, Brasseur R, et al. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol Ther* 2009; 17(1): 95-103.
21. Tran NT, Wang TH, Lin CY, Tsai YC, Lai CH, Tai Y, et al. Direct synthesis of Rev peptide-conjugated gold nanoparticles and their application in cancer therapeutics. *Bioconjug Chem* 2011; 22(7): 1394-401.
22. Sun L, Liu D, Wang Z. Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell-targeting agents. *Langmuir* 2008; 24(18): 10293-7.
23. Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, Glomm WR, et al. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug Chem* 2004; 15(3): 482-90.
24. Turkevich J. Colloidal gold. Part I. *Gold Bull* 1985; 18(3): 86-91.
25. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10444-50.
26. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997; 272(25): 16010-7.
27. Fischer R, Fotin-Mleczek M, Hufnagel H, Brock R. Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem* 2005; 6(12): 2126-42.
28. Pujals S, Fernandez-Carneado J, Lopez-Iglesias C, Kogan MJ, Giralt E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(3): 264-79.
29. Levy R, Shaheen U, Cesbron Y, See V. Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review. *Nano Rev* 2010; 1: 1-18.
30. Khlebtsov BN, Khlebtsov NG. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J* 2011; 73(1): 118-27.
31. Trono JD, Mizuno K, Yusa N, Matsukawa T, Yokoyama K, Uesaka M. Size, concentration and incubation time dependence of gold nanoparticle uptake into pancreas cancer cells and its future application to X-Ray Drug Delivery System. *J Radiat Res* 2011; 52(1): 103-9.

## Enhanced Intracellular Translocation of Gold Nanoparticles Functionalized with TAT Peptide into Cancer Cell Lines

Sedigheh Khomehchian PhD<sup>1</sup>, Saman Hosseinkhani PhD<sup>2</sup>, Rasool Madani PhD<sup>3</sup>,  
Maryam Nikkhah PhD<sup>4</sup>

### Review Article

#### Abstract

**Background:** Reduced toxicity and ease of modification make gold nanoparticles (GNPs) suitable for targeted delivery and bioimaging via conjugating cell-penetrating peptides (CPPs). This study aimed to assess the enhanced penetration of gold nanoparticles into cells via using TAT peptide as a cell-penetrating peptide.

**Methods:** Gold nanoparticles and TAT-conjugated gold nanoparticles (TAT-C-GNP) were characterized using ultraviolet-visible spectrophotometry, dynamic light scattering, zeta potential method, and transmission electron microscopy. The cytotoxicity effects of nanoparticles on HeLa, and A431 cell lines were studied. Uptake of TAT-conjugated gold nanoparticles was tested in cells, using dark field microscopy.

**Findings:** Gold nanoparticles and TAT-conjugated gold nanoparticles had little to no effect on cell viability. Upon exposure to gold nanoparticles, TAT-conjugated gold nanoparticles displayed higher uptake than gold nanoparticles in A431 cell line; whereas none of the nanoparticles showed penetration in HeLa cell.

**Conclusion:** Thus, TAT-conjugated gold nanoparticles have enhanced cellular internalization and are suitable for various biomedical applications as nanoconjugates.

**Keywords:** Gold nanoparticle, Cell penetration peptide, Cellular uptake, Cytotoxicity

**Citation:** Khomehchian S, Hosseinkhani S, Madani R, Nikkhah M. **Enhanced Intracellular Translocation of Gold Nanoparticles Functionalized with TAT Peptide into Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(351): 1574-83

1- Department of Nanotechnology, School of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor Department of Biochemistry, School of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

4- Assistant Professor, Department of Nanotechnology, School of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Saman Hosseinkhani, Email: saman\_h@modares.ac.ir