Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 35, No. 4, Wintwr 2026 ORIGINAL ARTICLE

Simultaneous targeting of three human papillomavirus type 16 oncoproteins using gene editing in a C57BL/6 mouse model of C3 epithelial tumor

Ali Anvar[1], Azam Bolhassani[2], Iman Salahshoorifar[1], Shiva Irani[1]
[1]Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

Abstract

Background: Human papillomavirus type 16 (HPV16) is a leading cause of cervical cancer, with its oncoproteins E5, E6, and E7 playing pivotal roles in tumor development. This study aimed to investigate the effect of simultaneous targeting of these three oncogenes using CRISPR/Cas9 technology delivered via the HR9 peptide in a mouse model of solid epithelial tumors.
Materials and methods: Female C57BL/6 mice (4–6 weeks old, weighing approximately 15–20 g) were divided into five groups. Subcutaneous injection of HPV16-positive C3 tumor cells was performed. After tumor formation, intratumoral administration of PX460-based CRISPR/Cas9 vectors containing E5, E6, or E7 sgRNAs, complexed with HR9 peptide, was carried out on days 7, 14, and 21. On day 60, apoptosis was assessed using H&E staining, immunohistochemistry (IHC), and caspase-3 expression analysis.
Results: Mice treated with E6-PX460 + E7-PX460 nanoparticles exhibited a statistically significant reduction in tumor size and an increased rate of apoptosis compared to those treated with the triple combination (E5+E6+E7-PX460) or E5-PX460 alone ($p<0.0001$). These findings indicate the superior therapeutic efficacy of dual targeting of E6 and E7.
Conclusion: Simultaneous targeting of E6 and E7 oncogenes using CRISPR/Cas9 technology delivered via the HR9 peptide effectively induced apoptosis and suppressed tumor growth in C57BL/6 mice. This approach shows promise as a novel targeted strategy for HPV16-related tumor therapy and warrants further investigation.
Keywords: *HPV16, Oncoproteins, CRISPR/Cas9, Gene editing, C3 tumor cells.*

Cited as: Anvar A, Bolhassani A, Salahshoorifar I, Irani, S. Simultaneous targeting of three human papillomavirus type 16 oncoproteins using gene editing in a C57BL/6 mouse model of C3 epithelial tumor. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(4): **426-435.**

Correspondence to: Azam Bolhassani
Tel: *+98 9125373264*
Email*: A_bolhasani@pasteur.ac.ir*
ORCID ID: 0000-0001-7363-7406
Received: 4 Feb 2025; **Accepted:** 8 Jun 2025

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات ۴۲۶ تا ۴۳۵

Original Article

هدف‌گیری همزمان سه انکوپروتئین ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ با استفاده از ویرایش ژن در مدل موشی C57BL/6 تومور اپیتلیالی C3

علی انوار[۱]، اعظم بوالحسنی[۲]، ایمان سلحشوری فر[۱]، شیوا ایرانی[۱]

[۱] دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] واحد هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ (HPV16) از عوامل اصلی سرطان دهانه رحم است. انکوپروتئین‌های E5، E6 و E7 این ویروس نقش مهمی در سرطان‌زایی دارند. این مطالعه با هدف بررسی اثر هدف‌گیری همزمان این سه انکوژن با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 و انتقال توسط پپتید HR9 در مدل موشی مبتلا به تومور اپی‌تلیالی جامد انجام شد.*

روش بررسی: *موش‌های ماده C57BL/6 (۴ تا ۶ هفته، با وزن تقریبی ۱۵ تا ۲۰ گرم) به پنج گروه تقسیم شدند. سلول‌های توموری C3 به‌صورت زیرجلدی به پهلو تزریق شد. پس از تشکیل تومور، تزریق نانوذرات DNA/HR9 حاوی وکتورهای نوترکیب E5، E6 و E7-PX460 در سه نوبت (روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱) به‌صورت داخل‌توموری انجام شد. در روز ۶۰، ارزیابی آپوپتوز با رنگ‌آمیزی H&E، IHC و بررسی بیان کاسپاز-۳ انجام شد.*

یافته‌ها: *گروه تیمار شده با نانوذرات حاوی E6-PX460 + E7-PX460، کاهش معنی‌دار آماری در اندازه تومور و افزایش قابل توجه آپوپتوز در مقایسه با گروه‌های E5+E6+E7-PX460 و E5-PX460 نشان داد ($p < 0.0001$). این نتایج نشان‌دهنده اثربخشی بیشتر هدف‌گیری همزمان E6 و E7 نسبت به سایر ترکیبات درمانی است.*

نتیجه‌گیری: *هدف‌گیری همزمان انکوپروتئین‌های E6 و E7 ویروس HPV16 با استفاده از CRISPR/Cas9 و انتقال توسط پپتید HR9، اثربخشی بالایی در القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور در مدل موشی C57BL/6 نشان داد. این روش به عنوان یک راهکار نوین درمانی هدفمند قابل بررسی بیشتر است.*

واژگان کلیدی: *HPV16، انکوپروتئین، CRISPR/Cas9، ویرایش ژن، رده سلول‌های توموری C3.*

مقدمه

سرطان گردن رحم چهارمین سرطان شایع در زنان در سطح جهانی است و همچنین شایع‌ترین تومور بدخیم سیستم تولیدمثل زنان است. بررسی ها نشان دادند که عفونت با ویروس-های پاپیلومای انسانی (Human papillomavirus :HPV) با خطر بالا، عامل اصلی سرطان گردن رحم است (۱، ۲). ژنوم HPV شامل هشت پروتئین است که به دو دسته "زودرس" یا "دیررس" تقسیم‌بندی می‌شوند. بخش "زودرس" شامل شش پروتئین (E1، E2، E4، E5، E6 و E7) است که نقش‌هایی در تعدیل ایمنی و تکثیر ژنوم HPV دارند. از طرف دیگر، منطقه "دیررس" شامل پروتئین‌های کپسیدی L1 و L2 است که مسئول انتقال ویروس هستند (۱). حدود ۴۰ نوع مختلف HPV با عفونت ناحیه تناسلی مرتبط هستند و در میان این انواع، HPV 16 و 18 قوی‌ترین نوع‌های پرخطر هستند که تقریباً ۵۰ درصد از ضایعات پیش‌سرطانی شدید گردن رحم را ایجاد

آدرس نویسنده مسئول: تهران واحد هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران، اعظم بوالحسنی (**email**: *A_bolhasani@pasteur.ac.ir*)
ORCID ID: 0000-0001-7363-7406
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۳/۱۹

می‌کنند (۲، ۳). وجود پروتئین‌های E5، E6 و E7 در حفظ وضعیت تغییر یافته سلول‌های سرطانی حیاتی است. بنابراین، ژن‌های E5، E6 و E7 به عنوان انکوژن‌های کلیدی در نظر گرفته می‌شوند که می‌توانند به عنوان اهدافی برای ویرایش ژن عمل کنند (۴). ژن E5 به عنوان یکی از انکوژن های ویروس پاپیلومای انسانی، نقش کلیدی در ایجاد و پیشرفت تومور های بدخیم دارد، اما نسبت به ژن های E6 و E7 کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۵). پروتئین E5 با تأثیر بر مسیرپیام رسان سلولی مانند رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR: Epidermal growth factor receptor) ، مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول-'3-کیناز (PI3K/AKT) و همچنین مهار ارائه آنتی ژن در سطح سلول های آلوده، نقش مهمی در فرار ایمنی و تسهیل تومورزایی ایفا میکند (۶) (۷). مطالعات اخیر نشان داده اند که ژن E5 می تواند از طریق افزایش بیان EGFR و تنظیم منفی MHC کلاس I، بقای سلولی و رشد تومور را تحریک کند (۸). با وجود این، جزئیات مکانیزم های مولکولی دخیل در عملکرد E5 همچنان به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

ویرایش ژن، رویکردی انقلابی برای درمان عفونت HPV، ترکیب ژنتیکی سلول‌های آسیب‌دیده را تغییر می‌دهد. تکنیک کریسپر (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) یکی از کارآمدترین و دقیق‌ترین روش‌های ویرایش ژن شناخته شده است (۹). انکوژن‌های E6/E7 با استفاده از روش CRISPR تغییر یافته‌اند که باعث کاهش تولید انکوپروتئین‌های E6/E7 و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی گردن رحم می‌شود . با این حال، به دلیل اثرات غیرهدفمند و نیاز به حداقل سمیت سیستمیک در حین توزیع، استفاده درمانی از این تکنیک محدود شده است. برای مقابله با این محدودیت، ابزارهای متعددی توسعه یافته‌اند تا ویرایش دقیق ژن را در حالی که اثرات غیرهدفمند را به حداقل می رسانند، محقق کنند. چالش اصلی، تحویل مؤثر اجزای CRISPR به سلولهای هدف در میزان مناسب است. بنابراین، توسعه راهبردهایی که بتوانند اجزای CRISPR را به طور مؤثر به سلول‌های خاص منتقل کنند، به عنوان یک تمرکز پیشگام برای پیشبرد استفاده از فناوری CRISPR ظهور کرده است (۱۳-۱۰). با توجه به این محدودیت‌ها، محققان اخیراً پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs: Cell-penetrating peptides) را به عنوان ابزاری جدید برای انتقال ژن بررسی کرده‌اند که می‌توانند از غشاء سلولی نفوذ کرده و بار را به داخل سلول منتقل کنند (۱۴). CPP ها به طور گسترده‌ای برای بهبود فرمولاسیون واکسن‌ها، سیستم‌های تحویل دارو و انتقال DNA داخل سلولی استفاده شده‌اند. در میان CPPها، نونا-آرژنین غنی از هیستیدین (HR9: nona-arginine Histidine-rich)، یک پپتید غنی از آرژنین، عملکرد فوق‌العاده‌ای در انتقال DNA داخل سلول با حداقل سمیت نسبت به سایر پپتیدها نشان داده است. پپتید HR9 عمدتاً برای انتقال ژن‌های گزارشگر مانند پروتئین فلورسانس سبز استفاده شده است (۱۳).

در این مطالعه، سیستم کریسپر برای هدفگیری و غیرفعال سازی ژن E5 در سلول های توموری مرتبط با HPV به کار گرفته شده است. هدف این تحقیق، بررسی تأثیر غیر فعال سازی ژن E5 روی کاهش تکثیر تومور و القای آپوپتوز بود. بعلاوه، هدفگیری همزمان انکوژن E5 با دو انکوژن دیگر E6 و E7 توسط ویرایش ژنی به منظور بررسی اثرات ضد توموری ارزیابی شد. نتیجه حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که هدف‌گیری همزمان دو انکوژن E6 و E7 با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و انتقال آن توسط پپتید HR9، منجر به کاهش معنی‌دار رشد تومور و افزایش القای آپوپتوز در مدل موشی شد. این یافته‌ها، اثربخشی نسبی پایین‌تر ژن E5 در مقایسه با E6 و E7 را نیز نشان دادند و بر ضرورت بررسی بیشتر نقش مجزای آن تأکید دارند.

مواد و روشها

طراحی و ارزیابی sgRNA برای هدف‌گیری ژن‌های E5 ، E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶

با استفاده از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI: National Center for Biotechnology Information)، توالی‌های مرجع ژن E5 (NC_001526.4) ، E6 (NC_001526.4) و E7 (NC_001526.4)از HPV16 به دست آمد. کاندیداهای sgRNA برای ژن‌های E5، E6 و E7 در ابتدا با استفاده از ابزار طراحی CHOPCHOP شناسایی شدند. پس از آن، سه کاندیدای برتر با استفاده از CRISPOR، یک ابزار دیگر برای ایجاد sgRNA، به منظور تأیید نتایج ارزیابی شدند. بعلاوه، شناسایی مکان‌های احتمالی غیرهدف از طریق ابزار Cas-OFFinder برای تأیید کاندیداهای انتخاب شده، ارزیابی شد. پس از تحلیل دقیق داده‌های به‌دست‌آمده از ابزارهای CRISPOR، Cas-OFFinder و CHOPCHOP، یک sgRNA بالقوه برای هر ژن انتخاب شد. کاندیداهای انتخاب شده مؤثرترین و دقیق‌ترین گزینه‌ها بودند (جدول ۱).

تهیه نانوذرات DNA/ پپتید HR9 و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی

در ابتدا، توالی‌های gRNA با طول ۲۰ جفت باز (GenScript Biotech Co, USA) سنتز شد و به داخل مکان‌های هضم شده با

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

جدول ۱. توالی های راهنمای تعیین شده

نام ژن	توالی gRNA (۳'-۵')	توالی PAM (۳'-۵')	امتیاز CHOPCHOP	درصد GC	امتیاز CFD	شناسایی نواحی غیرهدف
E6	AAAGCACGCCAGTAATGTTG	TGG	2	45%	91	0
E6	GCAACAGTTACTGCGACGTG	AGG	1	55%	97	0
E7	TTCCTAGTGTGCCCATTAAC	AGG	3	45%	93	0

جدول ۲. گروه بندی های مورد مطالعه

گروه	جایگاه هدف	نوع تزریق	تزریق اول (۷ روز بعد از تلقیح)	تزریق دوم (۱۴ روز بعد از تلقیح)	تزریق سوم (۲۱روز بعد از تلقیح)
A1	HPV16 E5	داخل توموری	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A2	HPV16-E6 + HPV16-E7	داخل توموری	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9+ E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A3	HPV16-E6 +HPV16-E7 +HPV16-E5	داخل توموری	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A4	کنترل	داخل توموری	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9
A5	کنترل	داخل توموری	PBS	PBS	PBS

آنزیم *Bbs*I (New England Biolabs, USA)، وکتور پلاسمید PX460 و PX460 (Addgene, USA) کلون شدند. پلاسمیدهای نوترکیب (E6-PX460 ، E7-PX460 و E5-PX460) به داخل سلولهای مستعد DH5α ترنسفورم شدند و برای ۱۶ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. استخراج پلاسمیدها از کلونی های بدست آمده توسط کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) صورت گرفت و توسط توالی یابی سنگر تأیید شد. برای تهیه نانوذرات DNA/پپتید HR9، محلول پپتید (HR9, GenScript, USA) به یک میکروگرم از PX460، E5-PX460، E6-PX460 یا E7-PX460 در نسبتهای N/P (Nitrogen to Phosphate ratio) یعنی نسبت تعداد گروه‌های آمینی (N) در مناقل کاتیونی به تعداد گروه‌های فسفات (P) در مولکول DNA مختلف (۱:۱، ۲:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱) اضافه شد و تشکیل کمپلکس‌ها توسط الکتروفورز ژل تأخیری بررسی شد. سپس در نسبت تعیین شده تشکیل کمپلکس بر اساس الکتروفورز ژل تأخیری ، بار سطحی ذرات توسط زتا سایزر (Zetasizer Nano ZS device, England، Malvern Instruments) و اندازه آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (TESCAN / ZEISS, KYKY-EM3200 model, SEM Germany) ارزیابی شد.

ایجاد مدل حیوانی موش C57BL/6 مبتلا به تومور اپی‌تلیالی ناشی از سلول‌های C3

برای ایجاد مدل تجربی تومور اپی‌تلیالی مرتبط با HPV16، موش‌های ماده C57BL/6 در سن ۴ تا ۶ هفته (با وزن تقریبی ۱۵ تا ۲۰ گرم) از مرکز حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد حیوان‌خانه شامل دمای ثابت (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی ۵۵٪، و چرخه‌های ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. پس از یک دوره سازگاری ۷ روزه، موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل ۵ موش). برای القای تومور، ۱ × 10^5 سلول توموری C3 (HPV16-positive, murine epithelial tumor cell line) در حجم ۱۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate-buffered saline) به‌صورت زیرپوستی در ناحیه پهلوی راست بدن هر موش تزریق شد. در روز هفتم پس از تزریق، تومورهایی با حجم حدود ۵۰ میلی‌متر مکعب در ناحیه تزریق مشاهده شد که ورود به فاز درمان را ممکن ساخت (۴۳).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

تمامی مراحل تحقیق مطابق با اصول اخلاقی و دارای مجوز رسمی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی (شناسه : IR.IAU.SRB.REC.1403.022)، انجام گرفت.

بررسی اثرات ضدتوموری نانوذرات PX460/HR9 و ارزیابی بافت‌شناسی

برای بررسی اثرات ضدتوموری نانوذرات HR9/PX460حاوی وکتورهای CRISPR/Cas9، موش‌های ماده C57BL/6به‌صورت زیرپوستی با رده سلول توموری C3در ناحیه فلانک راست بدن، با غلظت ۱×10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS، تزریق شدند. پس از تشکیل تومور با حجم تقریبی ۵۰ میلی‌متر مکعب (در حدود روز هفتم)، تزریق‌های داخل‌توموری نانوذرات HR9/PX460در دوز ۱۰ میکروگرم DNAو نسبت N/Pبرابر ۲ در سه بازه زمانی ۳، ۷ و ۲۱ روز پس از تزریق سلول توموری انجام گرفت (مطابق جدول ۲).نانوذرات تهیه‌شده حاوی وکتور PX460دارای توالی‌های اختصاصی sgRNAبرای هدف‌گیری ژن‌های انکوژنیک E5، E6و E7ویروس HPV16بودند. در روز ۶۰ پس از تزریق سلول توموری و تکمیل مراحل درمان، موش‌ها قربانی شده و تومورهای برداشت‌شده برای تحلیل‌های بافت‌شناسی مورد پردازش قرار گرفتند.نمونه‌های بافتی ابتدا با فرمالین ۱۰٪ فیکس و سپس در پارافین قالب‌گیری شدند. از بلوک‌های پارافینه، برش‌های ۳ میکرومتری تهیه و اسلایدهای شیشه‌ای آماده گردید. برای رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (IHC: Immunohistochemistry)، ابتدا دپارافینه‌سازی با زایلن و سپس رقیق‌سازی‌های متوالی با اتانول جهت هیدراته‌سازی انجام شد. پس از آن، استخراج آنتی‌ژن (Antigen Retrieval) با استفاده از محلول بافر سیترات (pH=6)در دمای بالا انجام گرفت تا اپی‌توپ‌های پروتئینی جهت اتصال آنتی‌بادی در دسترس قرار گیرند.اسلایدها با آنتی‌بادی مونوکلونال خرگوشی ضد کاسپاز-۳ (Cleaved Caspase-3)تیمار و سپس با محلول مسدودکننده پراکسیداز به‌منظور حذف فعالیت آنزیمی غیراختصاصی و کاهش نویز زمینه‌ای، پیش‌پردازش شدند. از پلیمرهای ثانویه چندظرفیتی برای شناسایی آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. در رنگ‌آمیزی H&E (Hematoxylin and eosin stain) نیز از هماتوکسیلین جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها بهره گرفته شد که شدت رنگ‌پذیری آن با مقدار DNAدر هسته ارتباط مستقیم دارد.برای تحلیل کمی، از هر اسلاید پنج میدان تصادفی در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ X توسط میکروسکوپ نوری AmScope T490B (AmScope, USA)بررسی شد و تعداد سلول‌های مثبت با استفاده از نرم‌افزار تحلیل تصویری ImageJ (NIH, USA) شمارش و ثبت شد.

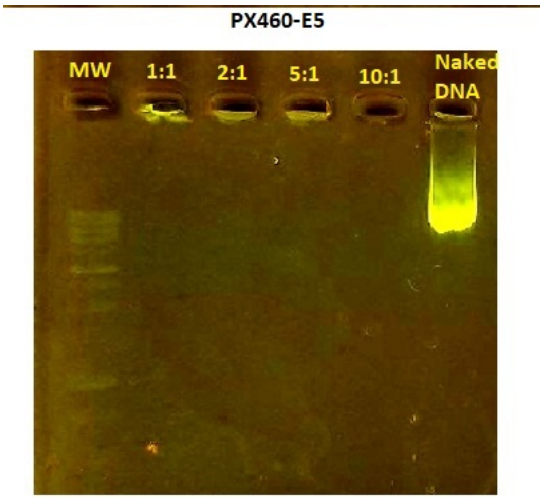
تحلیل آماری

نتایج آپوپتوز و کاسپاز بین گروه‌های مختلف مورد بررسی در این مطالعه، با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه (نرم‌افزار GraphPad Prism 9.0) تحلیل شد. تفاوت معنی‌دار آماری با p-value کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

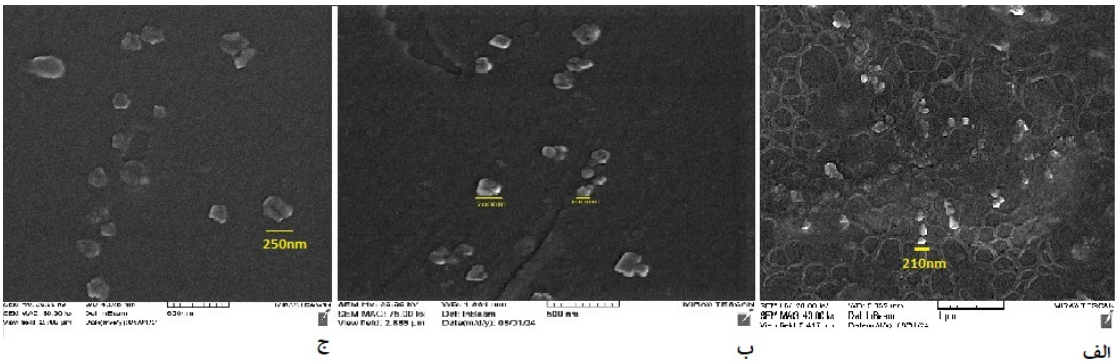
تشکیل کمپلکس‌های HR9/DNA و تعیین خواص فیزیکوشیمیایی

تشکیل کمپلکس بین پپتید HR9 و وکتورهای نوترکیب PX460 در نسبت‌های مختلف N/P مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که مولکول‌های DNA در نسبت N/P برابر با ۲ بر روی ژل آگارز مهاجرت نکردند که نشانگر تشکیل کمپلکس‌های پپتید/DNA است (شکل ۱). علاوه بر این، بارهای سطحی مثبت ۱۹/۴+، ۱۸/۹+ و ۱۸/۷+ میلی‌ولت برای HR9/E7-PX460، HR9/E6-PX460 و HR9/E5-PX460 به ترتیب توسط زتاسایزر به دست آمد، در حالی که بار منفی ۶/۷۹− میلی‌ولت برای وکتور خالی تعیین شد. اندازه نانوذرات HR9/E5-PX460 ، HR9/E7-PX460 و HR9/E6-PX460 بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر توسط میکروسکوپ الکترونی تعیین شد (شکل ۲).

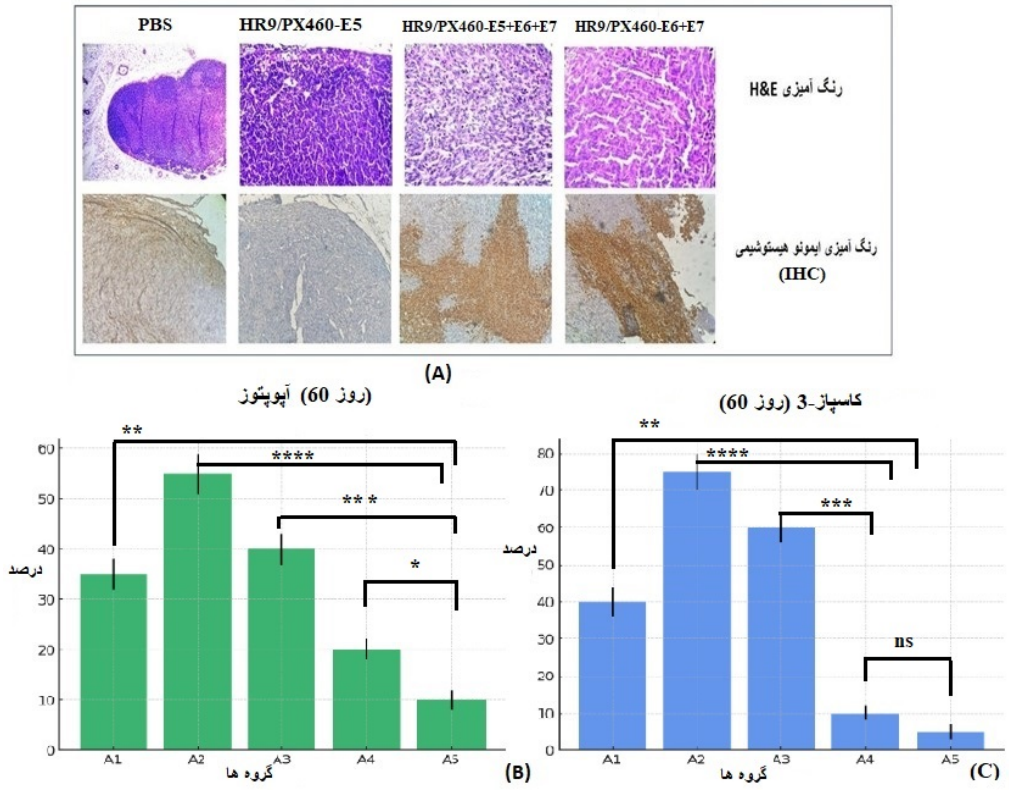


شکل ۱. تشکیل کمپلکس‌های با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز: چاهک شماره ۱: شاخص وزن مولکولی / چاهک های شماره ۲ الی ۵: کمپلکس‌های HR9/PX460-E5 در نسبت‌های N/P برابر با ۱:۱، ۲:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱/ چاهک شماره ۶: پلاسمید PX460-E5 (کنترل آزاد)؛ بر روی ژل آگارز ۱٪.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]



شکل ۲. تصویرSEM از نانوذرات (الف) HR9/PX460-E7، (ب) HR9/PX460-E5 و (ج) HR9/PX460-HR9/E5-PX460 با بزرگنمایی 7×10^4 . قطر نانوذرات در نسبت N/P برابر با 2، حدود رنج ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر بود.



شکل ۳. (A) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی مقاطع بافتی تومورهای حاصل از سلول‌های C3 در گروه‌های مختلف، با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد کاسپاز-۳ و هماتوکسیلین/ائوزین (H&E). به دلیل شباهت ظاهری بین گروه کنترل ۴ (وکتور خالی PX460) و گروه کنترل ۵ (PBS 1X)، تنها تصویر یکی از آن‌ها به نمایش درآمده است. (B) درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات CRISPR/Cas9 در روز ۶۰ بر اساس ارزیابی ایمنوهیستوشیمی. (C) میزان بیان کاسپاز-۳ فعال‌شده در بافت‌های توموری در گروه‌های درمانی مختلف (A1 تا A5) در روز ۶۰، به‌عنوان شاخصی از القای آپوپتوز. گروه‌ها: A1: HR9/PX460-E5، A2: HR9/PX460-E6+E7، A3: HR9/PX460-E5+E6+E7، A4: وکتور خالی PX460، A5:PBS. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) از سه تکرار مستقل گزارش شده‌اند. تحلیل آماری با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شده است. $p<0.05$*، $p<0.01$**، $p<0.001$***، $p<0.0001$****؛ ns: اختلاف آماری غیرمعنی‌دار.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

بررسی اثرات ضدتوموری نانوذرات HR9/PX460

تأثیر وکتورهای نوترکیب PX460/CRISPR-Cas9حاوی gRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌ها E6+E7، E5+E6+E7 و E5به‌تنهایی، بر رشد تومور و نرخ بقای موش‌ها، به‌مدت ۶۰ روز پس از تلقیح زیرپوستی سلول‌های توموری C3 (HPV16-positive) ارزیابی شد. زمانی‌که حجم تومور به حدود ۵۰ میلی‌متر مکعب رسید (تقریباً در روز هفتم پس از تزریق سلول)، تزریق داخل‌توموری نانوذرات حاوی ۱۰ میکروگرم DNA پلاسمیدی با پپتید HR9در نسبت N/P 2 =، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام گرفت .نتایج نشان داد که گروه درمانی A3 (E5+E6+E7-PX460/HR9) در ۲۱ روز اول پس از تلقیح هیچ نشانه‌ای از تشکیل تومور نشان نداد، اما رشد تومور از روز ۲۱ به بعد آغاز شد. در مقابل، گروه‌های کنترل A4 (وکتور خالی PX460) و A5 (PBS 1X) علائم رشد تومور را در هفته اول نشان دادند و تمامی حیوانات این دو گروه تا روز ۴۲ تلف شدند. در حالی‌که گروه‌های درمانی A1تا A3 همگی تا پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) زنده ماندند. تحلیل آماری نشان داد که گروه A2 (E6+E7-PX460/HR9) کاهش معنی‌دار آماری در اندازه تومور نسبت به سایر گروه‌ها داشت (p<۰/۰۰۰۱) و بهترین پاسخ درمانی را نشان داد. همچنین، تحلیل‌های هیستوپاتولوژیک (H&E) و ایمنوهیستوشیمی (IHC) نشان دادند که در گروه‌های درمانی، سلول‌ها از حالت چندهسته‌ای غیرطبیعی به سلول‌های تک‌هسته‌ای با هسته و سیتوپلاسم مشخص تبدیل شده‌اند. تغییرات بافتی مانند حضور سلول‌های استرومال آتروفیک، غدد کوچک با هایپرپلازی، سلول‌های اپی‌تلیال پراکنده و کاهش چگالی هسته‌ای در گروه‌های درمانی مشاهده شد. این در حالی است که گروه‌های کنترل، رشد تومور پیشرفته‌تری با سلول‌های چندهسته‌ای، هسته‌های متراکم، سلول‌های مکعبی بدخیم، و حضور واضح فیبروبلاست‌های کروی شکل با هسته‌های تیره نشان دادند. از نظر میزان القای آپوپتوز، گروه A2 (E6+E7-PX460/HR9) بالاترین میزان سلول‌های مثبت برای کاسپاز-۳ را داشت (p<۰/۰۰۰۱)، که به‌صورت معنی‌دار از سایر گروه‌ها بیشتر بود. پس از آن، گروه A3 (E5+E6+E7-PX460/HR9) با اختلافی کمتر، در رتبه دوم قرار گرفت (p<۰/۰۱). این نتایج بیانگر اثر معنی‌دار درمان‌های هدف‌مند بر کاهش رشد تومور و افزایش آپوپتوز در مقایسه با گروه‌های کنترل است (شکل۳).

بحث

سیستم CRISPR/Cas9 در درمان سرطان‌های مرتبط با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) مورد ارزیابی قرار گرفته است. با استفاده از CRISPR/Cas9 برای هدفگیری خاص انکوژن‌های E5، E6 و E7، محققان به طور مؤثری آپوپتوز را تحریک کرده و رشد سلول‌ها را هم در محیط آزمایشگاهی و هم در حیوانات زنده مهار کرده‌اند (۱۷-۱۴). نفوذ مؤثر CRISPR/Cas9 برای موفقیت این فناوری به عنوان یک ابزار درمانی ضروری برای این تحقیق است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که برداشت DNA خارجی با استفاده از پپتید HR9 برای ترنسفکت کردن سلول‌های توموری بهبود یافته است (۴۲). کارایی ترنسفکشن پلاسمیدهای CRISPR/Cas9 به دلیل اندازه بزرگ آن‌ها (بیش از ۹ کیلوباز) محدود است، به ویژه در سلول‌های توموری که ترنسفکت کردن آن‌ها دشوار است. بنابراین، پپتید HR9 برای تحویل مستقیم وکتورهای CRISPR/Cas9 نوترکیب به تومورها تحت شرایط درون تنی استفاده شد. در حال حاضر، تحقیقات جدیدی در حال انجام است تا مکانیزم‌هایی که سلول‌ها از طریق آن‌ها پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs) را برداشت می‌کنند، بررسی شود. علاوه بر این مشخص شده است که اکثر پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs) از روش‌های مختلفی برای ورود به سلول‌ها استفاده می‌کنند، همان‌طور که توسط تحقیقات مختلف نشان داده شده است (۲۳-۲۲). انتقال مستقیم غشایی، که به عنوان نفوذ مستقیم نیز شناخته می‌شود، یک مکانیزم سریع و مستقل از انرژی است، در حالی که اندوسیتوز که شامل فاگوسیتوز و پینوسیتوز می‌شود، یک فرآیند وابسته به انرژی است (۲۴).علیزاده و همکاران نشان دادند که حمل‌ونقل DNA کد کننده ژن NS3 هپاتیت C به داخل سلول‌های HEK-293T با استفاده از پپتید HR9 افزایش یافته است. علاوه بر این، نشان داده شد که هم پپتید HR9 و هم کمپلکس‌های HR9/DNA دارای سمیّت کم هستند (۲۷). در این مطالعه، کارایی درمان در موجودات زنده با تزریق رده سلول‌های توموری C3 به موش‌های C57BL/6 و انتقال وکتورهای CRISPR/Cas9 نوترکیب ارزیابی شد. رده سلولی C3 از بین مجموعه‌ای از رده های سلولی سرطان گردن رحم HPV16 انتخاب شد زیرا دارای کل ژنوم HPV16 شامل همان پروموتر و تمام ژن‌های اولیه مانند E5، E6 و E7 بود (۳۱-۲۸). نتایج تحقیق ما نشان داد که گروه درمان شده با E6+E7-PX460/HR9 کاهش قابل توجهی در حجم تومور نسبت به

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

سایر گروه‌ها داشت. به علاوه، با توجه به نتایج، پپتید HR9 توانست با تشکیل کمپلکس‌های پایدار با وکتورهای PX460 در نسبت N/P برابر با ۲ به طور مؤثری وارد سلول‌های توموری شود. اندرسون و همکاران تحقیقی انجام دادند که در آن آنزیم NfnB-Cys را با CPP HR9 ترکیب کردند که منجر به افزایش مرگ سلولی در آزمایش زنده‌مانی شد. پپتید HR9 تأثیر قابل توجهی در ورود NfnB-Cys داشت. علت این تأثیر ممکن است به بار مثبت بالای کمپلکس ایجاد شده نسبت داده شود (۳۳). ارزیابی‌های کمی متعدد نشان دادند که کارایی ترنسفکشن سه CPP غنی از آرژنین: HR9، PR9 و SR9 متفاوت بوده است (HR9>PR9>SR9). از بین تمام سلول‌ها/موجودات آزمایش شده، HR9 بالاترین کارایی ترنسفکشن را داشت. زیرا می‌تواند مستقیماً به غشاها نفوذ کند. تصور می‌شود که پپتید HR9 نقش منحصر به فردی در حمل‌ونقل سلولی دارد (۱۸, ۳۴, ۳۵). تحقیقات بیشتر نشان داد که DNA پلاسمیدی به طور مؤثر توسط CPPهای غنی از آرژنین (SR9، HR9 و PR9) به داخل سلول‌های Sf9 (مربوط به باکلوویروس) منتقل شد و سپس DNA در داخل سلول‌ها بیان شد (۳۵, ۳۶). مطالعه ما نشان داد که HR9 توانست وکتورهای CRISPR/Cas9 را وارد سلول‌های توموری C3 کند.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که پتانسیل زتا (Zeta potential) کمپلکس‌ها تأثیر عمده‌ای بر کارایی ترنسفکشن دارد. از سوی دیگر، نفوذپذیری سلولی تحت تأثیر اندازه ذرات قرار نمی‌گیرد. در این تحقیق، پپتید HR9 با وکتورهای خالی و نوترکیب CRISPR/Cas9 نانوذرات پایداری با نسبت N/P برابر با ۲ ایجاد کرد. کمپلکس‌های CRISPR/HR9 به اندازه ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر، دارای بار مثبت بودند. این نتایج نشان داد که اندازه کمپلکس PX460 CRISPR/HR9 و بارهای مثبت از اجزای مهم برای عبور پروتئین از غشای سلول‌های توموری هستند. نمازی و همکاران نشان دادند که pEGFP-Nef با بار منفی که با HR9 با بار مثبت ترکیب شده، کمپلکس‌های با بار مثبت تولید می‌کند که قادر به عبور از غشای سلولی هستند(۳۸). نتایج آن‌ها همچنین نشان داد که اندازه و بار مثبت کمپلکس‌های pEGFP-Nef/HR9 در تسهیل حمل‌ونقل از طریق غشای سلول‌های HEK-293T بسیار مهم است. علاوه بر این، سمیّت ناچیز کمپلکس‌های HR9/DNA در نسبت N/P مشخص برابر با ۲ را نشان دادند(۳۸). تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ ممکن است در محدود کردن رشد تومور حیاتی باشد (۴۰،۳۹). تجزیه و تحلیل داده‌های IHC نشان داد که علت اصلی کاهش حجم تومور مشاهده شده با وکتورهای نوترکیب، افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی است. سطوح رنگ‌آمیزی پروتئین کاسپاز-۳ در نواحی مرکزی و محیطی بدخیمی افزایش یافته است. گروه تیمار شده با E6+E7-PX460 (A2) به عنوان مؤثرترین درمان در میان گروههای تحت تیماردیگر و کنترل تعیین شد.

کمیت‌سنجی سلول‌های بدخیم نشان داد که گروه کنترل ۵ (PBS1X) بیشترین تعداد سلول‌های توموری را نشان داد که عدم مداخله درمانی را برجسته می‌کند. پس از آن گروه E5 (A1) قرار داشت، که نشان می‌دهد E5 به تنهایی تأثیر محدودی بر کاهش تکثیر تومور دارد. گروه E5+E6+E7 (A3) کاهش متوسطی در تکثیر تومور نشان داد. گروه E7+E6 (A2) بیشترین تأثیر درمانی را نشان داد. تجزیه و تحلیل سلول‌های آپوپتوتیک نشان داد که گروه E7+E6 بالاترین القای آپوپتوز را داشت. این امر نشان‌دهنده اثر قوی پروآپوتوتیک نانوذرات E6+E7-PX460/HR9 (A2) بر روی سلول‌های توموری است. این امر نشان‌دهنده اثر قابل‌توجه پروآپوتوتیک نانوذرات E6+E7-PX460/HR9 (A2) بر روی سلول‌های توموری است. این یافته با مسیرهای انکوژنیک شناخته‌شده همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که مهار پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) توسط E7 منجر به اختلال در چرخه سلولی، و تخریب پروتئین p53 توسط E6 مانع از القای طبیعی آپوپتوز می‌شود (۴۱). هرچند این نتایج اولیه نشان‌دهنده پتانسیل درمانی قابل‌توجه این ترکیب هستند، اما برای مقایسه قطعی آن با درمان‌های رایج مانند شیمی‌درمانی (از جمله سیس‌پلاتین)، انجام مطالعات بیشتر و جامع‌تر ضروری است.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، کارایی سیستم CRISPR/Cas9 در هدف‌گیری همزمان سه انکوپروتئین کلیدی ویروس HPV16 (E5، E6 و E7) در یک مدل توموری موش C57BL/6 بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از پپتید نفوذکننده HR9 برای انتقال نانوذرات حاوی وکتور PX460/CRISPR به‌طور مؤثر موجب انتقال ژن به بافت توموری در شرایط درون‌تنی گردید و این روش انتقال، از نظر زیستی، پایدار، کم‌سم و انتخاب‌گر عمل کرد. توانایی HR9 در عبور از غشای سلولی و تحویل مؤثر کمپلکس‌های نوترکیب بدون نیاز به ناقل‌های ویروسی، آن را به گزینه‌ای ارزشمند در توسعه روش‌های نوین درمان ژنی تبدیل می‌کند. بر اساس نتایج پاتولوژیکی و ایمنوهیستوشیمی، گروه درمانی دریافت‌کننده CRISPR هدف‌گیرنده ژن‌های E6+E7 (گروه A2) بیشترین القای

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

آپوپتوز و کاهش رشد تومور را نشان داد (p<۰/۰۰۰۱)، که پس از آن، گروه درمانی با ترکیب سه‌گانه E5+E6+E7 (A3) با کارایی نسبتاً پایین‌تر قرار گرفت. گروه هدف‌گیرنده E5 به‌تنهایی (A1) نیز نسبت به گروه‌های کنترل (A4 و A5) پاسخ بهتری داشت، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌دار کمتری نشان داد. در مجموع، این نتایج بیانگر آن است که هدف‌گیری همزمان E6 و E7 با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 انتقال‌یافته توسط HR9 می‌تواند یک راهکار درمانی مؤثر در کاهش رشد تومور و القای آپوپتوز باشد. با این حال، برای اعتبارسنجی این یافته‌ها در سایر مدل‌های حیوانی و همچنین بررسی عملکرد HR9 در ترکیب با دیگر بارهای ژنی، مطالعات گسترده‌تری مورد نیاز است.

REFERENCES

1. Choi S, Ismail A, Pappas-Gogos G, Boussios S. HPV and cervical cancer: A review of epidemiology and screening uptake in the UK. Pathogens 2023;12:298.

2. Na J, Li Y, Wang J, Wang X, Lu JL, Han S. The correlation between multiple HPV infections and the occurrence, development, and prognosis of cervical cancer. Front Microbiol 2023;14:1220522.

3. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol 2004;78:11451-60.

4. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer 2010;10:550-60.

5. Torres AD, Spurgeon ME, Bilger A, Blaine-Sauer S, Uberoi A, Buehler D, et al. The human papillomavirus 16 E5 gene potentiates MmuPV1-Dependent pathogenesis. Virology 2020;541:1-12.

6. Collins NB, Al Abosy R, Miller BC, Bi K, Zhao Q, Quigley M, et al. PI3K activation allows immune evasion by promoting an inhibitory myeloid tumor microenvironment. J Immunother Cancer 2022;10:e003402.

7. Scott ML, Woodby BL, Ulicny J, Raikhy G, Orr AW, Songock WK, et al. Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. J Virol 2020;94:e01582-19.

8. Brea EJ, Oh CY, Manchado E, Budhu S, Gejman RS, Mo G, et al. Kinase Regulation of Human MHC Class I Molecule Expression on Cancer Cells. Cancer Immunol Res 2016;4:936-47.

9. Bonami JR, Widada JS. Viral diseases of the giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii: a review. J Invertebr Pathol 2011;106:131-42.

10. Jendoubi-Ferchichi M, Satouri L, Ghoul F, Malek-Mellouli M, Derbel AM, Makni MK, et al. Phylogeny and classification of human papillomavirus (HPV) 16 and HPV18 variants based on E6 and L1 genes in Tunisian women with cervical lesions. Asian Pac J Cancer Prev 2018;19:3361.

11. Sausen DG, Shechter O, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R. Herpes simplex virus, human papillomavirus, and cervical cancer: Overview, relationship, and treatment implications. Cancers 2023;15(14):3692.

12. Zhang A, Zheng X, Chen S, Duan G. In vitro study of HPV18-positive cervical cancer HeLa cells based on CRISPR/Cas13a system. Gene 2024;921:148527.

13. Zhan X, Zhou J, Jiang Y, An P, Luo B, Lan F, et al. DNA tetrahedron-based CRISPR bioassay for treble-self-amplified and multiplex HPV-DNA detection with elemental tagging. Biosens Bioelectron 2023;229:115229.

14. Zhao Y, Chen D, Xu Z, Li T, Zhu J, Hu R, et al. Integrating CRISPR-Cas12a into a microfluidic dual-droplet device enables simultaneous detection of HPV16 and HPV18. Anal Chem 2023;95:3476-85.

15. Öktem M, Mastrobattista E, de Jong OG. Amphipathic cell-penetrating peptide-aided delivery of Cas9 RNP for in vitro gene editing and correction. Pharmaceutics 2023;15:2500.

16. Liu Q, Yang J, Xing Y, Zhao Y, Liu Y. Development of delivery strategies for CRISPR-Cas9 genome editing. BMEMat 2023;1:e12025.

17. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. PeerJ 2021;9:e11165.

18. Liu MJ, Chou JC, Lee HJ. A gene delivery method mediated by three arginine-rich cell-penetrating peptides in plant cells. Adv Stud Biol 2013;5:71-88.

19. Hasannejad-Asl B, Pooresmaeil F, Takamoli S, Dabiri M, Bolhassani A. Cell penetrating peptide: A potent delivery system in vaccine development. Front Pharmacol 2022;13:4834.

20. Sinclair F, Begum AA, Dai CC, Toth I, Moyle PM. Recent advances in the delivery and applications of nonviral CRISPR/Cas9 gene editing. Drug Deliv Transl Res 2023;13:1500-19.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]

[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]

21. Azadbakht N, Doosti A, Jami MS. CRISPR/Cas9-mediated LINC00511 knockout strategies, increased apoptosis of breast cancer cells via suppressing antiapoptotic genes. Biol Proced Online 2022;24:8.

22. Moret I, Esteban Peris J, Guillem VM, Benet M, Revert F, Dasi F, et al. Stability of PEI-DNA and DoTAP-DNA complexes: Effect of alkaline pH, heparin and serum. J Control Release 2001;76:169-82.

23. Sadeghian F, Hosseinkhani S, Alizadeh A, Hatefi A. Design, engineering and preparation of a multi-domain fusion vector for gene delivery. Int J Pharm 2012;427:393-9.

24. Zhen S, Li X. Oncogenic human papillomavirus: application of CRISPR/Cas9 therapeutic strategies for cervical cancer. Cell Physiol Biochem 2018;44:2455-66.

25. Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, Buonaguro FM. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents. Molecules 2018;23:295.

26. Hooshmand SE, Sabet MJ, Hasanzadeh A, Kamrani Mousavi SM, Haeri Moghaddam N, Hooshmand SA, et al. Histidine-enhanced gene delivery systems: The state of the art. J Gene Med 2022;24:e3415.

27. Alizadeh S, Irani S, Bolhassani A, Sadat SM. HR9: An important cell penetrating peptide for delivery of HCV NS3 DNA into HEK-293T cells. Avicenna J Med Biotechnol 2020;12:44.

28. Sahab Z, Sudarshan SR, Liu X, Zhang YY, Kirilyuk A, Kamonjoh CM, et al. Quantitative measurement of human papillomavirus type 16 e5 oncoprotein levels in epithelial cell lines by mass spectrometry. J Virol 2012;86:9465-73.

29. Paolini F, Amici C, Carosi M, Bonomo C, Di Bonito P, Venuti A, et al. Intrabodies targeting human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins for therapy of established HPV-associated tumors. J Exp Clin Cancer Res 2021;40:1-11.

30. Li LL, Wang HR, Zhou ZY, Luo J, Wang XL, Xiao XQ, et al. C3-Luc cells are an excellent model for evaluation of cellular immunity following HPV16L1 vaccination. PLoS One 2016;11:e0149748.

31. Jubair L, Lam AK, Fallaha S, McMillan NAJ. CRISPR/Cas9-loaded stealth liposomes effectively cleared established HPV16-driven tumours in syngeneic mice. PLoS One 2021;16:e0223288.

32. Liu BR, Lin MD, Chiang HJ, Lee HJ. Arginine-rich cell-penetrating peptides deliver gene into living human cells. Gene 2012;505:37-45.

33. Anderson SD, Hobbs RJ, Gwenin VV, Ball P, Bennie LA, Coulter JA, et al. Cell-penetrating peptides as a tool for the cellular uptake of a genetically modified nitroreductase for use in directed enzyme prodrug therapy. J Funct Biomater 2019;10:45.

34. Liu BR, Chiou SH, Huang YW, Lee HJ. Bio-membrane internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides in various species. Membranes 2022;12:88.

35. Huang YW, Lee HJ, Tolliver LM, Aronstam RS. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges. Biomed Res Int 2015;2015:834079.

36. Liu BR, Chen HH, Lo S, Huang YW, Lee HJ. Effects of surface charge and particle size of cell-penetrating peptide/nanoparticle complexes on cellular internalization. Cell Membranes 2013:43-57.

37. Laufer S, Restle T. Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems. Curr Pharm Des 2008;14:3637-55.

38. Namazi F, Bolhassani A, Sadat SM, Irani S. In vitro delivery of HIV-1 Nef antigen by histidine-rich nona-arginine and latarcin 1 peptide. J Med Microbiol Infect Dis 2019;7:107-15.

39. Mattern J, Volm M. Imbalance of cell proliferation and apoptosis during progression of lung carcinomas. Anticancer Res 2004;24:4243-6.

40. Khairkhah N, Bolhassani A, Rajaei F, Najafipour R. Systemic delivery of specific and efficient CRISPR/Cas9 system targeting HPV16 oncogenes using LL-37 antimicrobial peptide in C57BL/6 mice. J Med Virol 2023;95:e28934.

41. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Am J Transl Res 2019;11:3919-31.

42. Manteghi M, Can O, Kocagoz T. Peptosome: A New Efficient Transfection Tool as an Alternative to Liposome. Int J Mol Sci 2024;25:6918.

43. Kim JH, Park HS, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeting of HPV16 E6 and E7 induces apoptosis and growth inhibition in cervical cancer cells via p53 reactivation. Int J Mol Sci 2019;20:4763.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.4.5.7]
[DOI: 10.61882/iau.35.4.426]