

Original Article**Cytotoxic effects of Zn oxide nanoparticles against breast cancer T47D cells and *NM23* gene expression**Ghodratpour F¹, Baghbani-Arani F^{2*}, Sadat Shandiz SA³

1- Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I. R. Iran.

2- Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2018/08/11 | Accepted: 2018/12/11

Abstract:

Background: Breast cancer is the second leading cause of cancer-related death worldwide among women. Nowadays, nanoparticles are interested as anti-cancer factors in studies related to cancer therapy. Therefore, the present study aimed to explore cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and to evaluate *NM23* gene expression in T47D breast cancer cells.

Materials and Methods: The cancerous T47D and normal HEK293 cell lines were treated with different concentration of ZnONPs for 24 hours and the cytotoxicity activity of ZnONPs was analyzed by the MTT assay. Then, the *NM23* gene expression was evaluated using the real-time PCR method.

Results: According to MTT results, the ZnONPs significantly decreased the viability of T47D cells in dose-dependent manner. Also, the results revealed that the mRNA level of *NM23* was up-regulated (7.8-fold) in cells treated with ZnONPs.

Conclusion: ZnONPs can destroy cancerous T47D cells compared to normal HEK293 cells. Furthermore, it seems that ZnONPs can modulate metastasis by enhancing the *NM23* gene expression level in breast cancer T47D cells. Thus, ZnONPs can be considered as a promising strategy for the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, ZnONPs, T47D, *NM23**** Corresponding Author.****Email:** fbaghbani@iauvaramin.ac.ir**Tel:** 0098 213 672 5011**Fax:** 0098 213 672 4767Conflict of Interests: *No**Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 22, No 6, Pages 589-594*

Please cite this article as: Ghodratpour F, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Cytotoxic effects of Zn oxide nanoparticles against breast cancer T47D cells and *NM23* gene expression. *Feyz* 2019; 22(6): 589-94.

بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و بیان ژن *NM23* در رده سلولی سرطان پستان T47D

فاطمه قدرت پور^۱، فهیمه باغبانی آرانی^{*۲}، سید عطااله سادات شانديز^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان پستان به عنوان دومین علت مرگ در زنان شناخته می‌شود. امروزه، نانوذرات به‌عنوان یک فاکتور ضد سرطانی در تحقیقات حوزه درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات سمیت نانوذرات فلزی اکسید روی (ZnONPs) و ارزیابی بیان ژن *NM23* روی رده سلولی سرطان پستان T47D می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی رده‌های سلولی سرطان پستان (T47D) و نرمال (HEK293) تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و اثر سمیت سلولی آن با کمک تست MTT بررسی شد. سپس، تغییر بیان ژن مهار کننده متاستاز *NM23* با استفاده از تکنیک Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج MTT نشان داد نانوذرات ZnONPs میزان زنده‌مانی سلول‌های T47D را به‌صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. همچنین، داده‌ها نشان داد سطح mRNA ژن *NM23* در سلول‌های تیمار شده با ZnONPs تا ۷/۶ برابر افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید روی توانایی نابود کردن سلول‌های سرطانی T47D را در مقایسه با رده نرمال HEK293 دارند. به‌علاوه، به نظر می‌رسد این نانوذرات با افزایش بیان ژن *NM23* در مهار متاستاز سلول‌های سرطانی پستان T47D مداخله می‌کنند. بنابراین، استفاده از این نانوذرات می‌تواند در درمان سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، نانوذرات اکسید روی، T47D، *NM23*

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۷، صفحات ۵۹۴-۵۸۹

مقدمه

امروزه فناوری نانوذره در تولید بسیاری از داروها قدم‌های بزرگی برداشته و تولید نانوذرات یکی از امیدها در درمان و تشخیص موثر بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان می‌باشد. چندی است که نانوذرات اکسید فلزات به‌عنوان یکی از کاندیدای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجاکه اکسید طبیعی فلزات در مقادیر بسیار زیادی در طبیعت وجود دارد، فرآوری و سنتز این نانوذرات جزء کم‌هزینه‌ترین پروتکل‌های سنتز می‌تواند باشد [۲]. نانوذرات اکسید روی یکی از انواع جدید ذرات معدنی پرکاربرد می‌باشد که به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و در عین حال دارای قدرت جذب بیشتری نسبت به دیگر ترکیبات محتوی روی می‌باشد. اکسید روی یکی از ترکیبات روی است که توسط وزارت غذا و داروی آمریکا به-عنوان یک ماده بی‌خطر شناخته شده است. نانوذرات اکسید روی یک نانوذره زیست‌سازگار و غیر سمی است که به‌عنوان مواد پرکننده پزشکی، مواد آرایشی و حامل مواد دارویی نیز استفاده شده است. از جمله خواص ویژه نانوذرات ZnO به پایداری شیمیایی بالا، ثابت دی الکتریک پایین، فعالیت کاتالیزوری بالا، جذب نور فرو سرخ و فرابنفش و از همه مهم‌تر خاصیت ضد باکتری آن می‌توان اشاره کرد. چنانچه اثر درمانی و ضد توموری این ترکیبات مورد تایید قرار گیرد، این مساله می‌تواند قدم به-سزایی در پیش‌برد روش‌های درمانی در سرطان باشد [۴،۳]. ژن

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بدخیم زنان در سراسر دنیا است که امروزه به یکی از معضلات سازمان‌های بهداشتی تبدیل شده است [۱]. سرطان پستان حدود ۲۵ درصد از سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. در درمان سرطان پستان با توجه به شرایط بیمار از روش‌های مختلفی همچون جراحی، شیمی-درمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود. با توجه به عوارض روش‌های درمانی مذکور و میزان تأثیر این روش‌ها بر درمان بیماران و از طرف دیگر هزینه بالای این روش‌ها، نیاز مبرمی به استفاده از تکنولوژی‌های نوین برای یافتن روش‌های جدید و پربازده با عوارض جانبی و هزینه کمتر برای درمان احساس می‌شود.

^۱ کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی واحد ورامین- پیشوا،

دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

^۲ استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا،

دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی

دوره‌نویس: ۰۲۱۳۶۷۲۴۷۶۷

تلفن: ۰۲۱۳۶۷۲۵۰۱۱

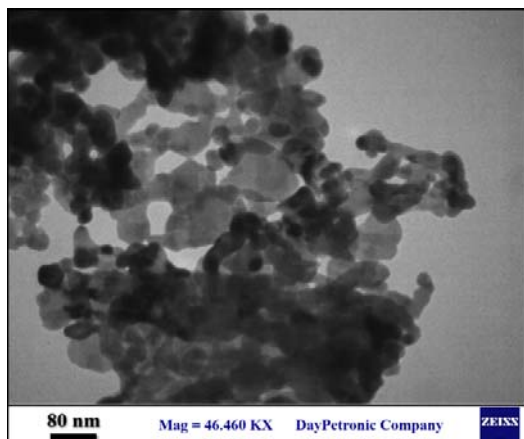
پست الکترونیک: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۹/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۰

100× (جذب نوری کنترل/جذب نوری تست) = میزان بقای سلولی در این تست برای هر غلظت 8 بار تکرار در نظر گرفته شد و میزان دوز IC50 نیز محاسبه گردید. در نهایت، برای بررسی اثر نانوذره روی بر القای بیان ژن ضد متاستازی NM23 از روش Real time PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا کل RNA سلول‌های سرطانی و نرمال تیمار شده با نانوذره با استفاده از کیت استخراج Trans Gene Biotech استخراج شد و سپس سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت انجام شد. به منظور اجرای واکنش PCR حجم نهایی هر میکروتیوب 20 میکرولیتر در نظر گرفته شد که حاوی 10 پیکومول از پرایمرهای بالادست و پایین دست مربوط به هر ژن، 40 نانوگرم cDNA، 10 میکرولیتر مسترمیکس و 7 میکرو-لیتر آب RNase free بود. در این واکنش ژن‌های NM23 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده در این واکنش در جدول شماره 1 نمایش داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق مقایسه چرخه آستانه صورت گرفت و اختلاف چرخه آستانه به دست آمده از سلول‌های تیمار شده با نانوذره و سلول‌های تیمار نشده با نانوذره محاسبه گردید و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مطابق با فرمول زیر محاسبه شد:

$\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ reference}$
 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ test sample} - \Delta Ct \text{ control sample}$
 Relative expression: $2^{-\Delta\Delta Ct}$
 داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه P با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 22 انجام شد. همچنین، مقدار $P < 0.05$ در هر تست معنی دار در نظر گرفته شد.



شکل شماره ۱- عکس میکروسکوپی الکترونی گذاره از نانوذرات روی

NM23 یکی از ژن‌های مهارکننده متاستاز است که یک نوکلئوزید دی فسفات کیناز بوده و در بازیابی ATP نقش دارد و برای اولین بار در رده سلولی ملانوما کشف شد. این ژن در سرطان پستان نقش مهمی دارد؛ به طوری که کاهش بیان یا موتاسیون آن می‌تواند پیش‌آگهی بیماری را متاثر کند. مطالعات نشان داده است که میزان بیان این پروتئین در افرادی که متاستاز غدد لنفاوی آنها منفی است، بسیار زیاد است [6,5]. با توجه به اینکه در تکنولوژی درمان‌های ملوکولی و هدف‌مند در داروسازی، رویکرد افزایش دادن بیان ژن‌های ضد توموری مطرح شده و از طرفی ژن NM23 یک ژن ضد متاستازی است، بنابراین اگر دارویی بتواند باعث افزایش بیان این ژن گردد، قطعاً انتخاب موثری در درمان سرطان پستان خواهد بود. لذا، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات سمیت نانوذرات اکسید روی در رده سلولی سرطانی پستان T47D پرداخته شده است. ضمن اینکه اثر این نانوذرات روی بیان ژن NM23 در رده سلولی مذکور نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی نانوذره اکسید روی به صورت پودر از شرکت US research nanomaterial با اندازه 10 تا 30 نانومتر تهیه گردید. جهت اطمینان از سایز و مورفولوژی نانوذرات عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906, Zeiss) (100 KV, Germany) انجام گردید (شکل شماره 1). رده‌های سلولی پستان T47D و نرمال HEK293 از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط DMEM high glucose غنی شده با 10 درصد سرم جنین گاوی در شرایط 5 درصد دی اکسید کربن و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. روش MTT جهت بررسی میزان سمیت نانوذره اکسید روی بر رده‌های سلولی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های 1، 10، 100 و 1000 میکروگرم از نانوذره تهیه شده و با استفاده از غلظت‌های به دست آمده از نانوذره، رده‌های سلولی سرطانی و نرمال در بازه زمانی 24 ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان فوق، محیط کشت سلولی پلیت 96 خانه‌ای به دقت خارج شده، رنگ MTT به هر چاهک اضافه گردید و پلیت به مدت 4 ساعت در شرایط 5 درصد دی اکسید کربن و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نتیجه پس از گذشت 4 ساعت باقی‌مانده رنگ MTT از پلیت خارج شد و کریستال‌های فورامازان تولید شده از طریق سلول‌های زنده، در ایزوپروپانول حل گردید. سرانجام، جذب نوری رنگ حاصله توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا در طول موج 570 نانومتر خوانده شد و میزان بقای سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

اندازه محصول	پرایمرها	نام ژن
۲۰۴ bp	forward: 5' ATGGCCAACTGTGAGCGTACC-3' reverse: 5'- CATGTATTTCCACGAGCCGGC-3'	NM23
۷۴ bp	forward: 5'- CCCACTCTCCACCTTTGAC-3' reverse: 5'- CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'	GAPDH

جدول شماره ۲- میانگین درصد بقای سلول‌های تیمار شده با

نانوذرات در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی MTT

رده سلولی/غلظت نانوذره	۱۰۰۰ μg/ml	۱۰۰ μg/ml	۱۰ μg/ml	۱ μg/ml
T47D	۹/۷۷±۰/۷۴	۴/۱۵۴±۱/۵۵	۶/۷۸۳±۲	۸۴/۱۲۸±۲
HEK293	۹/۷۲±۳/۵	۹/۷۵۰±۲/۴۴	۹/۷۵۸±۳/۰۸	۱۰۳/۹۱±۲/۲۴

مقادیر به دست آمده به صورت درصد بقاء در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به شکل میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

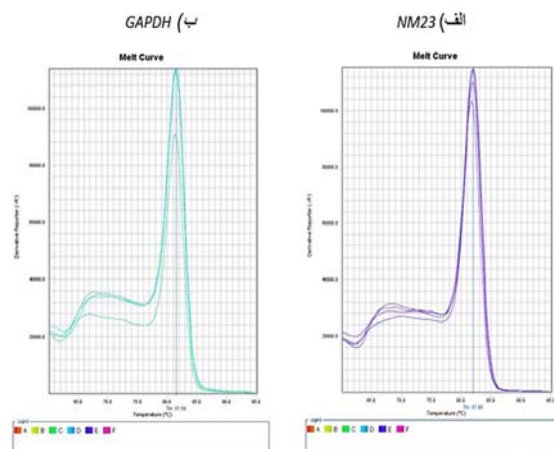
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

نتایج

برای بررسی اثرات نانوذره روی رده سلولی سرطانی T47D و HEK293 تحت تیمار با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و نتایج حاصل شده به صورت میزان درصد بقای سلول‌ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشخص است به جز غلظت ۱ μg/ml بقیه مقادیر نانوذره اثر سمی معنی‌داری روی رده سلولی سرطان پستان داشتند، در صورتی که در رده سلول‌های نرمال هیچ اثر سمی‌ای مشاهده نشد. اختصاصیت محصولات تکثیر شده درواکنش Real time PCR با بررسی منحنی ذوب انجام شد. تک قله بودن منحنی‌های مربوط به ژن‌های *NM23* و *GAPDH* نشان‌دهنده اختصاصیت تکثیر قطعه، صحت واکنش PCR و عدم وجود محصول غیراختصاصی، دایمر پرایمر و آلودگی بود (شکل شماره ۲). پس از مشخص شدن غلظت IC50 از طریق رگرسیون خطی معادل ۷۰ میکروگرم در میکرولیتر از نانوذره اکسید روی، رده سلولی T47D با این غلظت به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفت و سپس بیان ژن *NM23* در سلول‌های تیمار یافته بررسی گردید. نتایج PCR نشان داد که بیان ژن *NM23* در رده سلولی T47D پس از تیمار با نانوذره در مقایسه با سلول نرمال به میزان ۷/۶ برابر افزایش می‌یابد ($P < 0.001$).

بحث

استفاده از فناوری نانوذرات در تولید دارو یکی از حوزه‌های امیدوارکننده برای تشخیص و درمان موثر بسیاری از بیماری‌ها است [۸،۷]. بر اساس نتایج این پژوهش غلظت ۱۰ میکروگرم نانوذره اکسید روی باعث کاهش بقای حدود ۳۰ درصد از سلول‌ها رده T47D شده، غلظت ۱۰۰ میکروگرم باعث کاهش بقای ۶۰ درصدی و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم باعث کاهش بقای ۸۰ درصدی این رده سلولی شد. همچنین، در این مطالعه برای بررسی اثرات جانبی نانوذرات روی بر سلول‌های غیرسرطانی، رده سلولی HEK293 به عنوان کنترل انتخاب شد و نتایج MTT نشان داد که نانوذرات اکسید روی باعث مرگ سلول‌های HEK293 نمی‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره روی دارای اثرات جانبی کمی بر سایر سلول‌ها می‌باشد. تاکنون گزارش‌های مختلفی اثرات نانوذرات اکسید روی را در رده‌های سلولی مختلف بررسی کرده‌اند و نتایج مطالعه حاضر تا حد زیادی با نتایج قبلی هم‌خوانی دارد. برای مثال در سال ۲۰۱۵، Selvakumari و همکارانش روی اثر ضد توموری نانوذرات اکسید روی در رده سلولی MCF-7 به عنوان یک مدل سلولی سرطان پستان مطالعه‌ای انجام دادند و نتایج آن‌ها نشان داد به کارگیری ۳۱ میکروگرم از این نانوذره باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های توموری می‌شود [۹]. در یک بررسی دیگر نشان داده شد که نانوذره اکسید روی اثر ضد توموری قوی روی سلول‌های سرطانی گلیوما T98G داشته و در عین حال در سلول‌های نرمال HEK293 سمیتی دیده نشد که مشابه نتایج تحقیق حاضر است. به علاوه، نشان داده شد که نانوذرات روی با اثر ژنوتوکسیسیته باعث القای آپوپتوز در این سلول‌های توموری شده‌اند [۱۰]. همچنین، نتایج مطالعات دقیق‌تر نشان داده است که اثر نانوذرات اکسید روی در القای آپوپتوز از طریق فعال‌سازی مسیر ROS است [۱۱]. Wahab و همکاران رده‌های سلولی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و رده سلولی



شکل شماره ۲- منحنی ذوب ژن‌های NM23 (الف) و

GAPDH (ب)

روده می‌توانند جذب بدن شوند. این نانوذرات از طریق فعال سازی مسیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا ROS می‌توانند باعث حذف سلول‌های توموری شوند [۱۴،۱۳]. تاکنون اثر مستقیم نانوذرات اکسید روی بیان ژن‌های سرکوب‌گر متاستازی *NM23* بررسی نشده است. بدیهی است بررسی اثر مستقیم ضد متاستازی این نانوذرات می‌تواند در بالا بردن اطلاعات دقیق مکانیسم عمل این نانوذرات به‌عنوان دارو بسیار موثر باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر تأییدکننده اثرات سمی و کشنده نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطان پستان می‌باشند. همچنین، از آنجایی که نانوذرات اکسید روی بر مرگ رده سلولی HEK293 تاثیر نداشته است، می‌توان بیان کرد اثرات جانبی آن بسیار پایین می‌باشد. از طرف دیگر، با اثر مثبت روی بیان ژن دخیل در متاستاز (*NM23*) در رده سلول سرطان پستان، این نانوذره می‌تواند در طراحی داروهای کنترل تهاجم نیز مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدرانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک (دانشگاه آزاد واحد ورامین - پیشوا) می‌باشد. نویسندگان از معاونت پژوهشی واحد و پرسنل گرامی آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

- [1] Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007; 75(1): 56-63.
- [2] Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol* 2015; 34(12): 1318-21.
- [3] Buxton ILO, Yokdang N. extracellular NM23 signaling in breast cancer: Incommodus Verum. *Cancers* 2011; 3(3): 2844-57.
- [4] Duan S, Nordmeier S, Buxton IL. Exploring the metastatic potential of exosomal NM23 signaling using a triple negative breast cancer model in mice. *AACR* 2016.
- [5] Malika FA, Sanders AJ, Kayani MA, Jiang WG. Effect of expressional alteration of KAI1 on breast cancer cell growth, adhesion, migration and invasion. *Cancer Genomics-Proteomics* 2009; 6(4): 205-13.
- [6] Christgen M, Christgen H, Heil C, Krech T, Länger F, Kreipe H, et al. Expression of KAI1/-CD82 in distant metastases from estrogen receptor-

negative breast cancer. *Cancer Sci* 2009; 100(9): 1767-71.

- [7] Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(8): 526-35.
- [8] Yu MK, Park J, Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2012; 2(1): 3.
- [9] Selvakumari D, Deepa R, Mahalakshmi V, Subhashini P, Lakshminarayan N. Anti cancer activity of ZnO nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell). *JEAS* 2015; 10: 5418-21.
- [10] Wahab R, Kaushik NK, Kaushik N, Choi EH, Umar A, Dwivedi S, et al. ZnO nanoparticles induces cell death in malignant human T98G gliomas, KB and non-malignant HEK cells. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(7): 1181-9.

- [11] Wahab R, Dwivedi S, Umar A, Singh S, Hwang I, Shin H-S, et al. ZnO nanoparticles induce oxidative stress in Cloudman S91 melanoma cancer cells. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(3): 441-9.
- [12] Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, et al. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 117: 267-76.
- [13] Djurišić AB, Leung YH, Ng A, Xu XY, Lee PK, Degger N, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small* 2015; 11(1): 26-44.
- [14] 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.