



بررسی بیان ژن DNase فعال شونده توسط کاسپاز (CAD) در رده ی سلولی سرطان پستان MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره زیستی

فاطمه محرمی، سید عطا اله سادات شاندیز*، ارس رفیعی

گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه

سرطان پستان رایج ترین سرطان در میان زنان و دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان ها می باشد. به علت مقاومت اکتسابی سلول های سرطانی به درمان های رایج و عود مجدد بیماری پس از درمان، استراتژی های درمانی نوین براساس راه اندازی مجدد آپوپتوز مطرح شدند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثرات سمیت نانوذرات نقره زیستی و ارزیابی بیان ژن CAD (DNase فعال شونده توسط کاسپاز) بر روی سلول های سرطانی پستان (MCF-7) می باشد.

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره اتانولی برگ گیاه درمنه آرتمیزیا کوتنسیس مطابق مطالعات گذشته انجام گرفت. اندازه و ریخت شناسی نانوذرات با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد. رده سلولی MCF-7 در غلظت های مختلف ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تیمار ۲۴ ساعته نانوذرات نقره سنتز شده انجام گرفت و با کمک روش MTT ارزیابی و میزان ۵۰ درصد کشتندگی IC_{50} محاسبه شد. میزان بیان ژن CAD با روش Real time PCR ارزیابی شد.

یافته ها

اندازه متوسط نانوذرات با کمک میکروسکوپ TEM حدود $4/86 \pm 9/13$ نانومتر بدست آمد. نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت به صورت وابسته به دوز بر روی رده سلولی MCF-7 بود. میزان IC_{50} نانوذرات نقره ۴۹ $\mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. میزان بیان ژن CAD در نمونه تیمار نسبت به کنترل به میزان ۰/۷۷ برابر کاهش ($P < 0/05$) نشان داد.

نتیجه گیری

ارزیابی نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره اثرات سمیت قابل قبولی بر روی رده سرطانی پستان دارد و نیاز به انجام آزمایشات بیشتر در مدل های حیوانی می باشد.

کلیدواژه ها

آپوپتوز، سرطان پستان، CAD، نانوذرات نقره، Real time PCR، سمیت سلولی

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۹

*نویسنده مسئول: سید عطا اله سادات شاندیز، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تلفن: ۲۲۴۸۱۷۷۱

پست الکترونیک:

Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir



مقدمه

سرطان پستان یک بیماری به شدت ناهمگن بوده که در اثر تقابل عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیش رونده تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک منجر می‌شود. اگر چه شواهد اپیدمیولوژیک، بر وجود عوامل خطر ویژه مانند سن، چاقی، مصرف الکل و برخورد با استروژن در طول زندگی تأکید دارند؛ تقریباً ۲۰ درصد همه سرطان‌های پستان را انواع خانوادگی تشکیل می‌دهند و از نظر بیماری‌زایی وابستگی خاصی به ژن مستعد کننده ویژه این بیماری دارند (۱). سرطان پستان دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان بوده (۲، ۳) و در حدود ۲۳ درصد کل بد خیمی‌ها را شامل می‌شود (۴). مطابق با گزارشات سازمان جهانی بهداشت فراوانی این نوع سرطان سالانه به میزان ۲ درصد افزایش می‌یابد (۵). در ایران نیز عامل حدود ۲۱٪ کل بد خیمی‌ها در زنان می‌باشد (۶) سن بروز سرطان پستان در زنان ایرانی دست کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است و میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است (۸). شش تغییر اساسی در فیزیولوژی سلول که در نهایت می‌تواند زمینه رشد سلول‌های بدخیم را فراهم کند به عنوان نشانه‌های تمام سرطان‌ها پذیرفته شده است که عبارتند از خود کفایی در سیگنال رشد، عدم حساسیت در همانندسازی، توانایی رگ‌زایی، قابلیت متاستاز و مقاومت به آپوپتوز است (۹). آپوپتوز عبارت است از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فرآیندی که در آن فعالیت‌های یک سلول در جهت تخریب خود سلول پیش می‌رود، که موجود زنده را قادر سازد تا تعداد سلول‌های خود را حفظ کرده و سلول‌های ناخواسته که بقای موجود را تهدید می‌نماید، حذف کند (۱۰، ۱۱). نقص در مکانیسم‌های فیزیولوژیکی آپوپتوز ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های مختلف نظیر سرطان

در انسان‌ها شود در نتیجه امروزه بسیاری از استراتژی‌های درمانی براساس راه‌اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی استوار است (۱۲). مقاومت به آپوپتوز نیز از نشانه‌های سلول‌های سرطانی بوده است و کاهش حساسیت به آپوپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیکی مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی می‌شود (۱۳). سرطان پستان به عنوان یک بیماری هتروژن با ویژگی‌های بیولوژیکی و فنوتیپی متفاوت همراه است و این ویژگی‌ها تشخیص و در نتیجه درمان این بیماری را چالش برانگیز کرده است (۱۴). در حال حاضر درمان‌هایی که برای سرطان پستان مطرح است بسته به شدت و درجه بدخیمی شامل جراحی قسمت یا تمام پستان، شیمی درمانی، پرتودرمانی، ایمونوتراپی و درمان‌های جدید ژن درمانی، نوردرمانی و رادیوایمونوتراپی است (۱۵). با وجود پیشرفت‌های فراوان در زمینه کنترل و درمان بیماری‌ها، مسئله سرطان هنوز یکی از چالش‌های جهانی در زمینه سلامت انسان‌ها باقی مانده است. معمول‌ترین روش برای درمان سرطان، شیمی درمانی می‌باشد. درمان موفق زمانی است که حتی یک سلول سرطانی بعد از درمان هم باقی نماند، چون همین تک سلول می‌تواند دوباره کل مجموعه را بازسازی و احیا نماید. از آنجا که میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی بسیار بالاست و تغییرات ژنتیکی به سرعت در آنها انجام می‌شود، این سلول‌ها نسبت به دارو‌ها مقاومت پیدا می‌کنند. بنابراین پژوهش در زمینه کشف استراتژی‌های درمان نوین برای غلبه بر مقاومت دارویی سرطان‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱۶). در این میان نانو تکنولوژی زمینه امیدوار کننده‌ای در حوزه سرطان بوجود آورده است. در سال‌های اخیر اثرات ضد سرطانی و ضد رگ‌زایی نانو ذرات نقره مورد توجه قرار گرفته



است و نتایج نشان داده است که نانوذرات نقره می‌تواند به عنوان عامل بالقوه ضد سرطانی محسوب شود.

علیرغم کاربردهای گسترده نانوذرات نقره، تحقیقات محدودی در مورد اثر آن بر روی محیط و سلامتی انسان انجام گرفته است. مکانیسم سمیت آن تاکنون به طور کامل روشن نیست. نتایج پژوهش‌ها نشانگر آن است که اثرات توکسیک نانوذرات نقره به اندازه، غلظت، زمان تیمار و عوامل محیطی بستگی دارد. نانوذرات نقره با پروتئین‌های غشا سلولی بر هم کنش می‌کند و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را فعال می‌کند که این امر منجر به آسیب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شده که در نهایت منجر به شروع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) و مهار تکثیر سلولی می‌شود. همچنین مطالعات اخیر نشان می‌دهند که خاصیت سلول کشی نانوذرات نقره ناشی از آزاد سازی کم Ag^+ می‌باشد (۱۷، ۱۸). جهت سنتز نانوذرات، حلال‌های آلی، مورد استفاده برای تولید نانو ذرات سمی هستند و می‌توانند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند از این رو تمایل زیادی برای استفاده از احیا کننده‌های گیاهی در جهت سنتز نانو ذرات وجود دارد (۱۹). مزایای روش زیستی مانند هزینه کمتر، سرعت بیشتر، مقیاس بالای تولید و عدم تهدید محیط زیست باعث شده که در حال حاضر استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر بیشتر مورد توجه قرار گیرد. از جمله مزیت استفاده از گیاهان در سنتز نانو ذرات می‌توان، استفاده آسان، امنیت زیستی، غیر سمی بودن و ارزانی و دارا بودن تنوع وسیعی از متابولیت‌ها که در کاهش یون دخیل هستند را نام برد. گیاه درمنه از این نظر می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت سنتز نانوذرات باشد چرا که غنی از ترکیبات متنوع نظیر کومارین، پورین، استروئیدها، فنول، تری ترپنوئیدها، الیفاتیک‌ها، فلاونوئیدها

و آرتمیسینین بوده و از آنجایی که این گیاه بیشتر حاوی ترکیبات ترپنوئیدی و فلاونوئیدی می‌باشد به نظر می‌رسد که توانایی احیای نمک نقره را دارا بوده بنابراین بکارگیری عصاره‌ی گیاه درمنه جهت سنتز نانو ذرات فلزی رویکرد مناسبی به نظر می‌رسد (۲۰).

ژن DNase فعال شونده توسط کاسپاز بر روی کروموزوم یک و بازوی کوتاه آن (1p36.32) قرار دارد و یکی از ژن‌های درگیر در مراحل انتهایی وقایع هسته‌ای مربوط به آپوپتوز می‌باشد که تغییرات بیان این ژن تحت اثر نانو ذرات نقره می‌تواند شناخت بیشتر یکی از ژن‌های مسیر آپوپتوزی را موجب شود. از این رو، انجام پژوهش‌هایی در راستای شناسایی مسیرهای عملکردی و مکانیسم آپوپتوزی مرتبط با این ژن ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات سمیت و ضد آپوپتوزی نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز بر روی رده‌ی سلولی سرطانی پستان (MCF-7) از طریق تنظیم بیان ژن CAD بوده است.

مواد و روش‌ها

سنتز و مشخصه‌یابی نانو ذرات نقره

با افزودن ۶ سی سی از حجم عصاره اتانولی برگ گیاه درمنه *Artemisia qutensis Podlech* به ۱۰۰ سی سی نیترات نقره (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۰۱ میلی مولار تحت شرایط همزدن و دمای آزمایشگاه در مدت زمان یک ساعت از زمان واکنش، مطابق مطالعه گذشته (۷) انجام گرفت. بیوسنتز نانوذرات نقره با تغییر رنگ واکنش مشاهده شد. به منظور شستشو و خالص سازی نانوذرات، مخلوط حاصل سه بار با آب مقطر در ۱۳۰۰۰ rpm دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به منظور مشخصه‌یابی، دو تا سه قطره از نانوذرات نقره سنتز شده را سونیکه نموده و بر روی توری مسی پوشش داده شده با کربن قرار داده و بعد از خشک

^۱ Artemisia



شدن، تصویر آن با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تهیه شد.

کشت سلولی و شرایط نگهداری سلول‌ها

رده سلولی سرطانی MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در ابتدا، انتقال سلول‌ها و محیط کشت RPMI1640 حاوی (FBS ۱۰% و ۱% (v/v) پنی سیلین /استرپتومایسین) به فلاسک کشت سلولی انجام گرفت. کلیه مراحل در شرایط کاملاً استریل و زیر هود لامینار کلاس ۲ در اتاق مخصوص کشت انجام گرفت. طی یک هفته تعویض محیط کشت به صورت روزانه انجام گرفت، تا سلول‌ها از نظر رشد به وضعیت پایداری برسند. زمانی که سلول‌ها به تراکم سلولی مناسب یعنی ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، با اضافه کردن تریپسین به محیط کشت سلول‌ها را از کف ظرف جدا کرده و سپس شمارش سلولی توسط لام نتوبار انجام گرفت. اگر تعداد سلول‌ها به ۱۰۰۰۰۰۰ رسیده بودند، زمان مناسبی برای انتقال سلول‌ها به پلیت برای تست MTT می‌باشد.

سنجش سمیت نانوذرات نقره با تست MTT:

سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه‌ای با سمپلر استریل انتقال داده شد. به هر یک از چاهک‌های سلولی به میزان ۱۰۰۰۰ سلول افزوده شد. پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ از نظر زنده بودن سلول‌ها بررسی شدند. به منظور اینکه ذرات نانوذرات به صورت کاملاً جدا و محلول درآیند، ابتدا نانوذرات به مدت ۱۰ دقیقه قبل از محلول‌سازی اولتراسونیک شدند. سپس غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره را تهیه کرده و غلظت‌های بعدی را به صورت نصف غلظت قبلی به همین ترتیب تا غلظت ۶/۲۵ آماده سازی شد. نانوذرات بدست آمده با محیط کشت مخلوط شد و پس از کمی ورتکس، به چاهک‌های حاوی سلول با غلظت‌های مورد نظر اضافه شد و شش غلظت به ترتیب به سلول‌های هر ردیف با سه بار تکرار

اضافه شد و سه چاهک انتهایی غلظت صفر یا کنترل است که هیچ مقداری از نانوذره به محیط کشت سلولی آن اضافه نگردیده است (کنترل). در این مرحله پلیت آماده شده در مرحله قبل در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ رطوبت گذاشته شد و به مدت ۲۴ ساعت زمان برای تیمار در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، پلیت‌ها را از داخل انکوباتور بیرون آورده و در زیر هود ۱۰۰ میکرو لیتر از ماده‌ی MTT را که ماده‌ی بی رنگ متمایل به زرد است به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد (قبل از افزودن ماده‌ی MTT، محیط کشت مخلوط با نانوذره با سمپلر از هر کدام از چاهک‌ها خارج شد)، سپس به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (الایزا) جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج ۵۷۰ نانومتر برای هر یک از غلظت‌ها، بدست آورده شد و سپس با کمک نرم افزار Pharm-PCS میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC₅₀) اقدام شد.

بررسی تغییرات بیان در ژن CAD تحت اثر نانوذرات

پس از بدست آوردن غلظت IC₅₀، یک فلاسک سلولی از رده سلولی مورد مطالعه مجدداً طی یک هفته کشت داده شد و در پایان هفته که سلول‌ها به تراکم سلولی مناسب رسیدند به دو میکرو ویال انتقال یافتند و یکی از آنها با غلظت IC₅₀ از نانوذره تیمار ۲۴ ساعته و هر دو در انکوباتور گذاشته شدند (ضمناً قبل از استفاده از نانوذره در این مرحله نیز ۱۰ دقیقه اولتراسونیک شد) و بعد از آن نمونه تیمار شده و کنترل درون میکروتیوب‌های کوچک با دمای ۷۰- سانتی گراد نگهداری شد تا پرایمر ژن مدنظر، سنتز و آماده شود. اولین مرحله برای انجام ریل تایم PCR، استخراج RNA می‌باشد در این پژوهش از روش استخراج دستی با استفاده از معرف ترایزول انجام شد. مراحل استخراج طبق پروتکل کیت انجام گرفت. بعد از استخراج



RNA و با توجه به اینکه RNA خیلی سریع از بین می‌رود، سنتز cDNA بلافاصله مطابق با جدول ۱ انجام گرفت.

جدول ۱- مواد مورد استفاده در ساخت cDNA

نمونه	مقدار مورد استفاده
RNA تخلیص شده+آب	۴/۵ میکرولیتر (۱ میکروگرم)
پرایمر الیگو (dT)	۰/۵ میکرولیتر (۵۰ میکرومولار)
تر موسایکلر	دمای ۶۵ درجه (۵ دقیقه) و ۱ دقیقه (روی بخ)
مستر میکس	۵ میکرولیتر
تر مو سایکلر	۵۵ درجه (۴۵ دقیقه) و ۸۵ درجه (۵ دقیقه) و ۲۵ درجه (۵ دقیقه)

جدول ۲- برنامه دمایی و زمانی واکنش Real-time-PCR

زمان	دما	مراحل
۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	فعال شدن اولیه
	۴۰ سیکل	
۱۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	واسرشت سازی
۶۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتی‌گراد	اتصال پرایمر به الگو
۱۵ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	ادامه

حجم ۱۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی-زمانی دستگاه در جدول ۲ نشان داده شده است. گروه بدون الگو (cDNA) به عنوان گروه کنترل منفی NTC در طول واکنش استفاده شد. آنالیز نتایج Real time PCR با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ طبق فرمول‌های زیر صورت گرفت:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_T - \Delta Ct_C$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

پس از پایان هر واکنش تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های تکثیر و منحنی ذوب صورت گرفت. اجزا و دماهای واکنش در مراحل *set up* مقدماتی تحقیق به گونه‌ای تنظیم گردید که بهینه‌ترین نتایج حاصل شده و حتی الامکان از اشتباهاتی که تفسیر نتایج را با مشکل مواجه می‌کنند (مانند تشکیل پرایمر دایمر) جلوگیری شود.

تجزیه تحلیل آماری

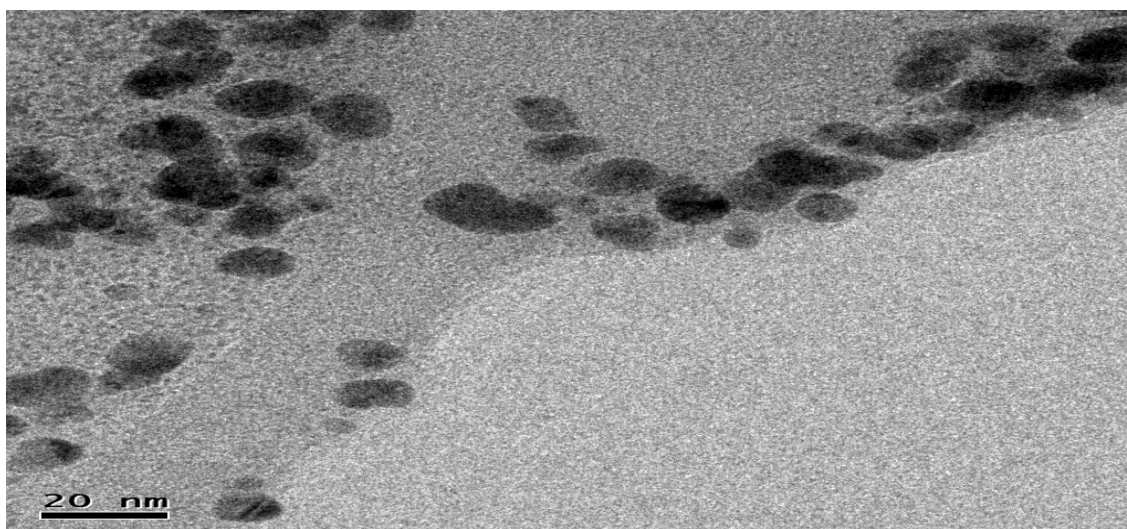
آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ و آزمون one way ANOVA میانگین نمونه‌ها با یکدیگر مقایسه گردید و معنی دار بودن اختلاف هریک از گروه‌ها با گروه کنترل بررسی شد ($P < 0.05$)

یافته‌ها

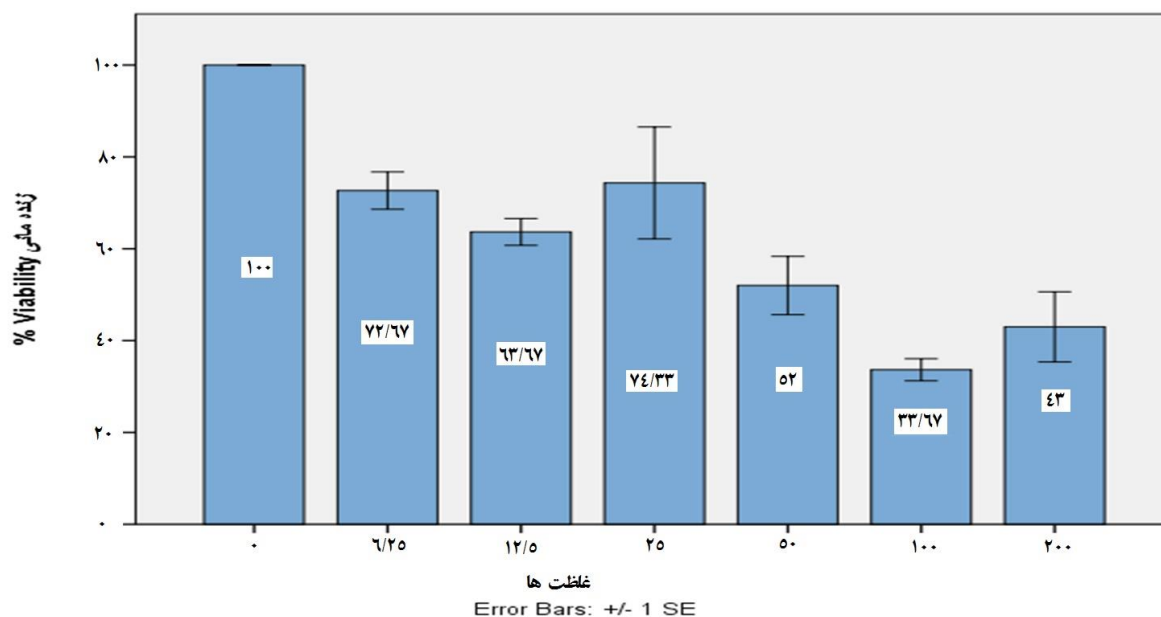
با توجه به نتایج میکروگراف الکترونی نانوذرات نقره مشخص شد که اندازه نانوذرات بین ۵ تا ۲۵ نانومتر و میانگین سایز آنها $4/86 \pm 9/13$ نانومتر بوده و غالباً به شکل کروی دیده می‌شوند (شکل ۱).

Real time PCR: علاوه بر ژن CAD، ژن خانه‌دار تحت عنوان GAPDH هم جهت ارزیابی میزان بیان مورد استفاده قرار گرفت. وظیفه‌ی این ژن نشان دادن صحت ساخت cDNA، میزان خلوص RNA بدست آمده، صحت انجام تست PCR و نیز نرمال سازی بیان سایر ژن‌ها می‌باشد. در این پژوهش، تکنیک real time PCR با روش سایبرگرین و با کمک کیت شرکت تاکارا (PrimeScript™ RT Reagent Kit) با استفاده از دستگاه ABI ساخت کشور امریکا انجام شد. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس سایبر گرین، ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر و مابقی آب (۶ میکرو لیتر) تا

¹ Non Template Control



شکل ۱- عکس میکروسکوپی الکترونی (TEM) از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی.

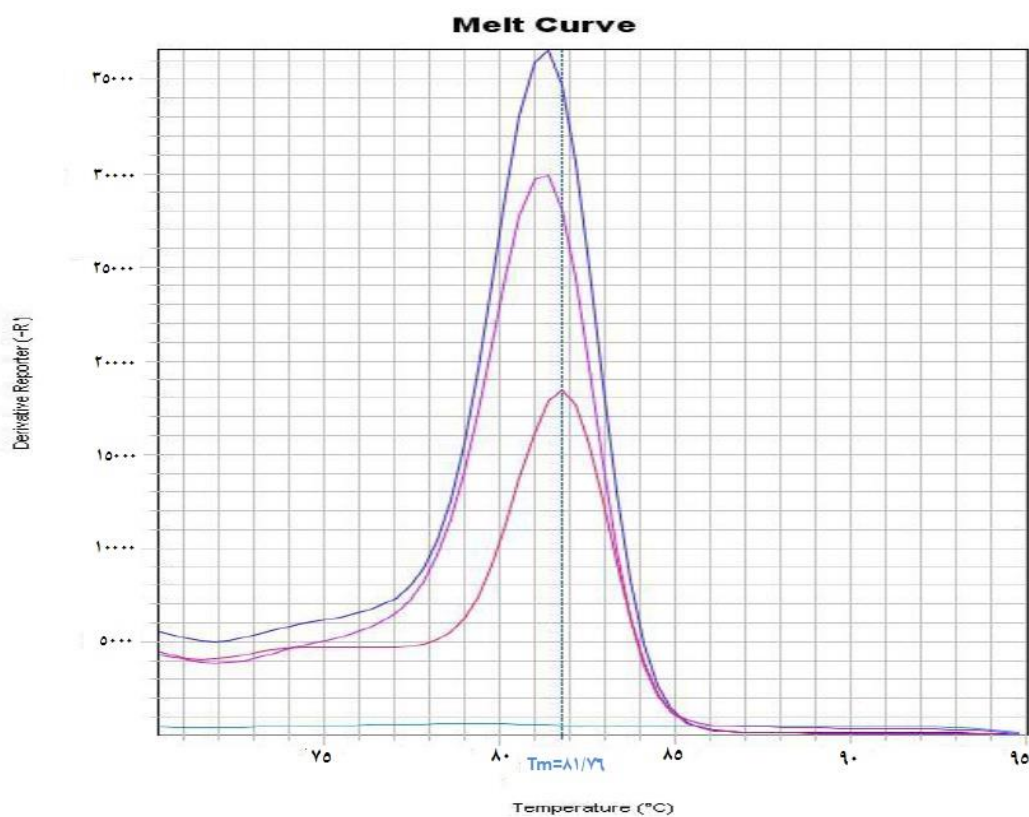


شکل ۲- نمودار مقایسه درصد زنده مانی (Viability) نمونه کنترل در مقایسه با نمونه های تیمار تحت اثر غلظت های مختلف نانو ذرات نقره بر رده سلولی سرطانی (MCF-7) ($P < 0.05$).

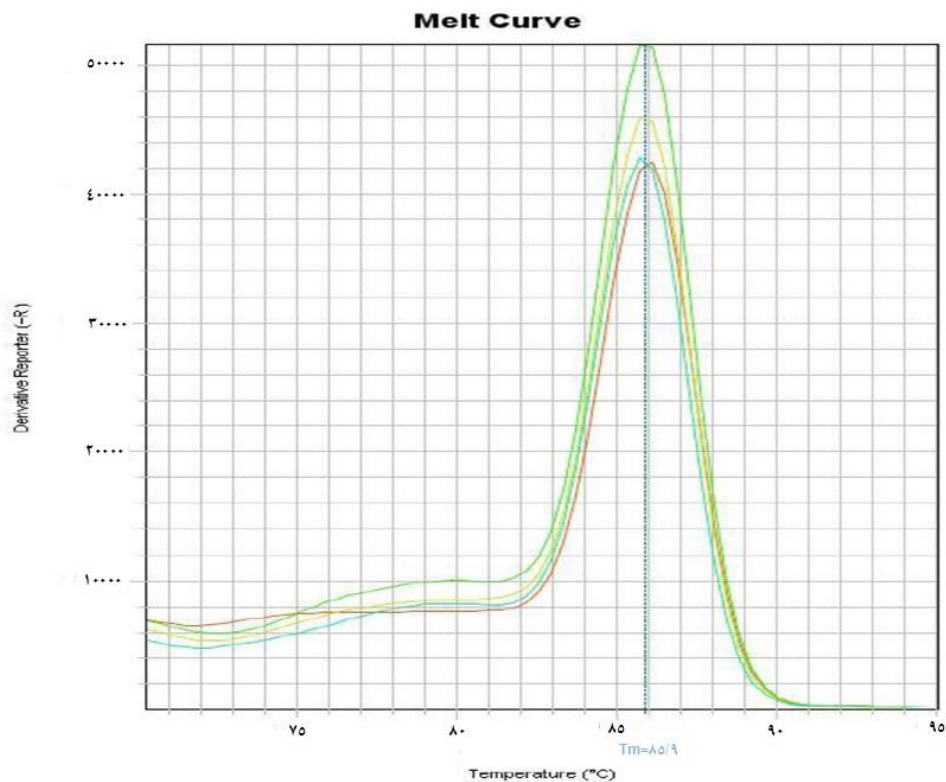


منحنی که همان T_m یا دمایی است که دو رشته از یکدیگر جدا می‌شوند (طبق نمودار $T_m = 81/76$) نشان داده می‌شود. قله منحنی یا همان T_m طبق نمودار $85/9$ است. این منحنی مربوط به ذوب ژن مرجع یا GAPDH است.

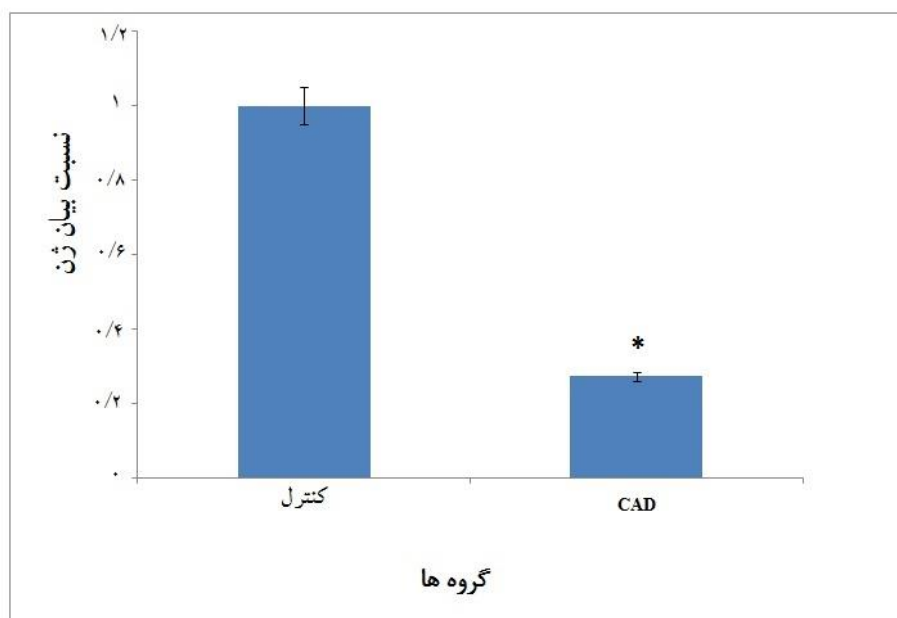
میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT نشان داد که نانوذرات نقره تکثیر سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهند (شکل ۲). به طوری که بیشترین مهار تکثیر در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ بود ($P < 0.05$). شکل ۳ منحنی ذوب مربوط به CAD می‌باشد که قله



شکل ۳- منحنی ذوب ژن CAD $T_m = 81/76$



شکل ۴- منحنی ذوب ژن GAPDH / ۹ / $T_m = 85.9$



شکل ۵- نمودار مقایسه نسبت بیان ژن CAD در نمونه کنترل (C) و تیمار تحت اثر غلظت $IC_{50} = 49 \mu g/ml$ از نانوذره نقره زیستی (T). علامت * نشان دهنده اختلاف معناداری با گروه کنترل با $(P < 0.05)$ است.



میزان بیان ژن *CAD* در نمونه تیمار تحت نانو ذرات نقره ۰/۲۳ برابر نسبت به گروه کنترل بدست آمد. کاهش ۰/۷۷ برابری در بیان ژن *CAD* در نمونه تیمار نسبت به ژن کنترل نشانگر این است که این نانو ذرات از مسیر دیگری در القای آپوپتوز بر روی این رده سلولی نقش داشته است.

بحث

تاکنون عصاره‌های متعددی از گیاهان جهت ساخت نانوذرات نقره و اثرات بیولوژیکی آنها مورد بررسی قرار گرفته شده است. چرا که راهکار ساده، سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه برای سنتز این نانوذرات می‌باشد. نانو ذرات نقره مورد استفاده در مدت زمان ۲۴ ساعت در یک دوز پایین در این مطالعه نقش به سزایی در القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطانی پستان (MCF-7) داشته و می‌تواند پس از بررسی‌های بیشتر، به عنوان یکی از استراتژی‌های درمان نوین در صنایع دارویی پزشکی مد نظر قرار گیرد.

در مقاله منتشر از Saraniya نانو ذرات نقره با اندازه در دامنه ۲۰ تا ۵۶ نانومتر با استفاده از گیاه *Ulvalactuca* سنتز و سمیت سلولی آن را روی سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 مطالعه و میزان IC_{50} را $12/5 \mu g/ml$ محاسبه کردند (۲۱). Ramar نیز نانو ذرات نقره با اندازه در دامنه $12/5$ تا $41/9$ نانومتر را با استفاده از گیاه *Ulvalactuca* سنتز و سمیت سلولی آن را روی سلول‌های سرطانی پستان، رده MCF-7 مطالعه نمودند و میزان IC_{50} را به طور تقریبی $30 \mu g/ml$ بدست آوردند (۲۲).

Mata و همکاران اثرات سایتو توکسیک نانو ذرات نقره با عصاره آبی برگ گیاه *Abutilon indicum* را در رده سلولی سرطانی Colo205 (سرطان روده بزرگ انسان) در شرایط برون تنی بررسی کردند و مشاهده کردند که نانو ذرات نقره به صورت وابسته به دوز باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی روده می‌شوند. همچنین بیان کردند در هسته سلول‌های

تیمار با نانو ذرات نقره تغییرات مورفولوژیکی مانند تراکم کروماتین و تغییرات در غشای سلول‌ها دیده می‌شود که این تغییرات در انتها منجر به القای آپوپتوز می‌شود (۲۳). Zheng و همکاران به بررسی مکانیسم و نقش نانوذرات نقره و طلا در روند رشد سلول‌های سرطانی رده HepG2 در شرایط برون تنی پرداخته، دریافتند که هردوی این نانو ذرات باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی رده HepG2 به صورت وابسته به دوز می‌شوند، اما نانو ذرات نقره دارای اثر مهارتی قوی‌تری هستند (۲۴).

Ortega و همکاران نیز به بررسی فعالیت ضد توموری نانو ذرات نقره سنتز شده توسط مخمر در رده‌های سلولی سرطان پستان (MCF-7, T47D, MCF10A) پرداختند و نتایج بررسی سمیت سلولی و آزمون MTT در هر دو رده سلولی سرطانی که تحت تیمار با نانو ذرات نقره قرار داشتند، نشان دهنده کاهش وابسته به غلظت در تعداد سلول‌ها بوده است اما نانو ذرات نقره اثر قابل توجهی در مهار رشد سلول‌های نرمال نداشتند که این مورد می‌تواند به علت فعالیت درون سلولی بالاتر در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال باشد (۲۵).

در سال ۲۰۱۶، صالحی و همکارانش نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia marschallina* با اندازه متوسط حدود ۸ نانومتر سنتز نمودند و اثرات آپوپتوزی این نانوذرات را بر روی رده‌ی سلولی سرطانی معده مطالعه نمودند و به این نتایج دست یافتند که این نانوذرات اثرات مرگ سلولی آپوپتوزی بالاتری نسبت به نکرور سلول‌ها دارند (۲۶). در مطالعات انجام شده پیشین غلظت ۵۰ درصدکنندگی را برای این رده‌ی سلولی تقریباً مشابه غلظتی که در این پژوهش یافته شد، بیان کرده بودند و در همه مطالعات گذشته به مهار رشد یا القای آپوپتوز به صورت وابسته به دوز اتفاق نظر داشتند و بیان کردند که هر چه



سرطانی پستان MCF-7 داشته است. همچنین در این مطالعه، میزان بیان ژن (mRNA ترنسکرپت از ژن CAD) با کمک روش real time PCR انجام گرفت. تاکنون مطالعه مشابهی بر روی اثرات نانوذرات نقره بر روی ارزیابی بیان ژن CAD صورت نگرفته است.

ژن CAD توسط مهارکننده‌ی ICAD (Inhibitor of Caspase activated DNase) غیر فعال است و زمانی که مسیر آبشار کاسپازها تحت محرک‌های آپوپتوزی آغاز گردد، کاسپاز اجرایی ۳ فعال شده و مهار کننده ژن CAD را غیر فعال می‌کند. ژن CAD فعال شده موجب آغاز تجزیه DNA در هسته‌ی سلول‌ها می‌شود.

در این مطالعه، گروه تیمار نسبت به گروه کنترل ۰/۷۷ برابر کاهش داشته است. احتمالاً این نانوذرات از مسیر دیگری در القای آپوپتوز روی این رده‌ی سلولی سرطانی (MCF-7) نقش داشته است و احتمالاً در زمان بیشتری موجب افزایش بیان ژن CAD می‌شود. با توجه به تجزیه تحلیل نتایج و مطالعات آماری به نظر می‌رسد که نانو ذرات مدنظر در ایفای نقش القای آپوپتوز بر روی این رده‌ی سلولی موثر و بر روی دیگر رده‌های سلولی سرطانی پستان هم موثر واقع شود. در مورد مطالعه اثر نانو ذرات بر بیان ژن CAD مطالعات پیشین کمتر پرداخته شده است و تغییرات بیان این ژن تحت نانوذرات مورد بررسی قرار نگرفته است.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه درمنه *Artemisia quttensis Podlech* برای اولین بار بر روی بیان ژن CAD در سلول سرطانی پستان با روش real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی بیان ژن CAD در نمونه تیمار و کنترل نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در کاهش بیان ژن نمونه کنترل نسبت به نمونه تیمار بدست آمد. بنابراین به منظور کاربردهای

غلظت افزایش می‌یابد، اثر مهارى رشد یا القای آپوپتوزی بیشتر می‌شود. در مطالعه سال ۲۰۱۳ نانوذرات نقره سنتز شده با کمک احیای عصاره برگ گیاه *Eucalyptus chapmaniana* انجام گرفت و سمیت علیه رده سلولی لوسمی میلوئیتیک (HL-60) و خواص ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه آنها نشان داد سمیت نانوذرات منجر به کشندگی ۸۵ درصدی این رده سلولی سرطانی شده بودند (۲۷).

همچنین در مطالعه‌ای دیگر، Devi و همکارانش در سال ۲۰۱۲ سنتز نانو ذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva Lactuca* با اندازه بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را گزارش نمودند و اثرات ضد سرطانی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کبد HepG-2، کولون HT29، پستان MCF-7 و سلول نرمال Vero را نشان دادند. ارزیابی اثرات سمیت نانوذرات با مقدار IC_{50} برابر ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده‌های سرطانی دیگر و رده سلولی نرمال در مشاهده آنها، نشان داده شد (۲۸). در این تحقیق ارزیابی زنده مانی نانوذرات در برخی از غلظت‌ها (۲۵ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) منجر به افزایش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و این امر نشان دهنده‌ی این است که اندازه، بار و شکل متفاوت نانوذرات نقره سنتز شده در این مطالعه تاثیر به سزایی در ورود آنها به سلول‌ها و به راه‌اندازی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی داشته است.

با وجود این حقیقت در مطالعه حاضر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 نسبت به نانوذرات نقره در بسیاری از غلظت‌ها حساس بوده‌اند. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که نانوذرات نقره اثرات سمیت و کشندگی بر سلول‌ها داشته‌اند که در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین اثر مهار کنندگی رشد و تکثیر سلول‌های رده



عملی این نانو ذرات، نیازمند انجام پژوهش‌های متعدد روی مدل‌های حیوانی و بررسی نتایج تست‌ها تا دست یافتن به قطعیت بیشتر ضروریست. پیشنهاد می‌گردد بیان این ژن در دیگر رده‌های سلولی سرطانی پستان و در رده‌های سلولی سرطانی دیگر تومورها بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه نویسنده اول است. بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافعی توسط نویسندگان این مقاله منتشر نشده است.

References

1. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006; 25(43): 5898-905.
2. Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to breast cancer. *Cancer*. 2008; 112 (10): 2130-42.
3. Moore KL Clinically Oriented Anatomy, 3rd Ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1992
4. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, et al. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 100-110.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
6. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *BioMed Res Int*, 2013(2):928562.
7. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan, Jalali M, Salehi S, Sadat Shandiz SA; Antioxidant, antibacterial and anti-cancer properties of phyto-synthesized *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnol* 2017; 11(4):485-492.
8. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 27(7): 1-22.
9. Jain M, Kasetty S, Khan S, Desai A. An Insight to Apoptosis. *J Res Pract Dent* 2014;2104; doi: 10.5171/2014.372284
10. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(1): 238-59.
11. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16 (6): 2144-2129.
12. Boughey JC, Gonzalez RJ, Bonner E, Kuerer HM. Current Treatment and Clinical Trial Developments for Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Oncologist* 2007; 12(11) 1276-87.
13. Valle PM, Mosegui GB, Vianna CM, Araújo RL, Felicissimo T, Lima IJ. Trastuzumab Emtansine for Her² Positive Breast Cancer Patients: an Updated Systematic Review. *Value Health* 2015;18(7): 816.
14. Roy N, Barik A. Green synthesis of silver nanoparticles From The Unexploited Weed Resources. *Int J Nanotechnol Appl* 2010; 4(2): 95-101
15. Boughey JC, Gonzalez RJ, Bonner E, Kuerer HM. Current Treatment and Clinical Trial Developments for Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Oncologist* 2007; 12(11) 1276-87.
16. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*. 2006;10 (6):515-27.
17. Unrine JM, Colman BP, Bone AJ, Gondikas AP, Matson CW. Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of Ag nanoparticles. Part 1. Aggregation and dissolution. *Environ Sci Technol* 2012;46 (13):6925-6933.
18. Gorth DJ, Rand DM, Webster TJ. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. *Int J Nanomed* 2011; 6:343-50.



19. Satapathy S, Mohapatra P, Preet R, Das D, et al. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. *Nanomed* 2013; 8(8): 1307–22.
20. Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanandhan G, Mubarak Ali D, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 106: 86–92.
21. Sharma H, Mishra PK, Talegaonkar S, Vaidya B. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov Today* 2015; 20 (9):1143-51.
22. Ramar M, Manikandan B, Marimuthu PN, Raman T, Mahalingam A, Subramanian P, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015; 140: 223-228.
23. Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 128: 276-286.
24. Zheng Q, Yang H, Wei J, Tong J long, Shu YQ. The role and mechanisms of nanoparticles to enhance radiosensitivity in hepatocellular cell. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(7): 24 -72.
25. Ortega FG, Fernández-Baldo MA, Fernández JG, Serrano MJ, Sanz MI, Diaz-Mochón JJ, et al. Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. *Int J Nanomed* 2015; 10: 2021-2031.
26. Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, Shafiee Ardestani M, Mirzaie A, Jafari M. Phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial parts extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *Int J Nanomed* 2016; 11: 1835-1846.
27. Mohammad Sulaiman Gh. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3: 58-63.
28. Saraniya Devi J, Valentin Bhimba B. Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* in vitro. *SciRep* 2012; 1(4): 242. doi:10.4172/scientific-reports.242



Assessment of caspase activated DNase (CAD) gene expression on MCF-7 breast cancer cell line treated by biosynthesized silver-nano particles

Fatemeh Moharrami, Seyed Ataollah Sadat Shandiz*, Aras Rafiee

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Original Article

Received: 1 Aug 2019

Accepted: 8 Feb 2020

***Corresponding Author:** Seyed
Ataollah Sadat Shandiz &
Department of Biology, Central
Tehran Branch, Islamic Azad
University, Tehran, Iran
TEL: 22481771
Email:
Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Breast Cancer is the most prevalent type of cancer among women and is also the second major cause of cancer. Due to the acquired resistance of cancer cells against conventional therapies and recurrence of the sickness after treatment, new therapeutic strategies based on triggering apoptosis have been proposed. The purpose of the present study is to introduce a cytotoxic effect of biological silver nanoparticles toward breast cancer MCF-7 cells and evaluation of the caspase-activated DNase (CAD) gene expression at mRNA level.

Materials and Methods

Silver nanoparticles were synthesized according to the recent biosynthesis method. Afterward, the Silver nanoparticles were inspected using transmission electron microscopy (TEM) analysis. Different concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 µg/ml of Nanosilver particles were treated on MCF-7 cells for 24 hours and the results were evaluated using the MTT assay and IC₅₀ were measured. The level expression of CAD gene was evaluated using real-time PCR.

Results

Silver nanoparticles were mostly spherical, having an average size of 9.13±4.86 nm. Silver nanoparticles demonstrated a dose-dependent toxic effect toward MCF-7 cells. The IC₅₀ value of silver nanoparticles was measured 49µg/mL. In addition, the expression of CAD decreased by 0.77 fold, compared to the control group.

Conclusion

The results of the present study demonstrated that the silver nanoparticles can induce cytotoxicity against breast cells and it is necessary to perform more tests against animal models.

Keywords

Apoptosis, Breast cancer, CAD, Silver nano particles, real time PCR, Cytotoxicity.

► **Please cite this article as:** Moharrami F, Sadat Shandiz A, Rafiee A. Assessment of caspase activated DNase (CAD) gene expression on MCF-7 breast cancer cell line treated by biosynthesized silver-nano particles. J Neyshabur Univ Med Sci 2020;8(2):46-58.