

سنتر سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه زرشک (*Berberis vulgaris*) و اثر آنها بر تکثیر سلولی و بیان ژن ODC1 در رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231

اکبر صفی پور افشار^{۱*}، فاطمه سعید نعمت پور^۲

۱. دانشیار، دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی- تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
۲. استادیار، دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی- تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱

زمینه و هدف سنتر سبز با استفاده از عصاره‌های گیاهی، روشی ساده و کم‌هزینه، به منظور تولید نانو ذرات نقره به شمار می‌رود. همچنین، یافتن تأثیرات درمانی جدید برای نانوذرات نقره، از زمینه‌های جذاب در تحقیقات سرطان محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر، سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه زرشک انجام شد. همچنین تأثیر نانوذرات سنتر شده بر در صد زنده‌مانی و میزان بیان ژن اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) در رده سلول سرطانی پستان انسان (MDA-MB-231) مطالعه شد.

مواد و روش‌ها آنالیز نانوذرات سنتر شده توسط طیف سنجی ماوراء بنفش و میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد. سلول‌های سرطانی، پس از کشت، تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات سنتر شده قرار گرفتند. در صد زنده‌مانی سلول‌ها از طریق سنجش MTT و آنالیز کمی بیان ژن ODC1 با استفاده از تکنیک Real Time – PCR انجام پذیرفت.

یافته‌ها تصاویر میکرو اسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات کروی نقره با میانگین اندازه‌های ۱۶ نانومتر سنتر شده است. سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتری با افزایش غلظت و زمان، بیشتر شد. میانگین IC₅₀ محاسبه شده، برابر ۱۶/۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. به علاوه، نانوذرات، میزان بیان ژن ODC1 را حدود ۴ برابر در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با نمونه کنترل، کاهش دادند.

نتیجه‌گیری به نظر می‌رسد نانوذرات نقره سنتر شده به روش سبز، با رهاسازی تدریجی یون‌های نقره در محیط اسیدی سلول‌های سرطانی و ایجاد رادیکال‌های اکسیژن و همچنین کاهش بیان ژن ODC1 سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شده‌اند.

کلیدواژه‌ها:

اورنیتین دکربوکسیلاز، زرشک، سنتر سبز، سمیت سلولی، نانوذرات نقره.

۱. مقدمه

اولین یکی از نویدبخش‌ترین نانوذرات در نانو تکنولوژی، نانوذرات نقره هستند که مطالعات بسیاری در تحقیقات بر آنها متمرکز شده است. از دیرباز، نقره در پزشکی، کاربرد وسیعی داشته و در تمدن باستان، از خاصیت ضد باکتریایی نقره استفاده شده است (۱). نانوذرات نقره به دلیل فعالیت ضد میکروبی قوی مورد توجه بودند. عقیده بر این است که

نانو ذرات نقره با اتصال به دیواره سلولی، سبب تغییر نفوذپذیری آن می‌شوند (۲). همچنین مطالعات اخیر، حاکی از تأثیر این نانوذره بر سلول‌های سرطانی و کاهش تکثیر آنها است (۳). بررسی‌ها نشان دادند که کاربرد نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتر می‌شوند می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای ضدقارچی و ضد میکروبی تجاری متداول باشد؛ زیرا عوارض ناشی از استفاده عوامل

* نویسنده مسئول: اکبر صفی پور افشار

نشانی: نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۵۱-۴۲۶۱۳۹۰۵

رایانامه: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-1566-9140

شناسه ORCID نویسنده دوم: 0000-0001-6571-634X

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۹، ص ۵۴۹-۵۵۸

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

سرطانی برای این داروها، نیاز فوری به توسعه روش‌های درمانی جدید با حداقل عوارض جانبی احساس می‌شود (۱۴). تحقیقات اخیر در نانوسرطان، منجر به تولید مواد، دستگاه‌ها و عوامل درمانی در مقیاس نانو شده است و در این بین، نانوذرات نقره به دلیل خواص آنتی‌باکتریال قوی می‌توانند گزینه مناسبی در درمان سرطان باشند (۱۵).

با توجه به اهمیت سنتز سبز نانوذرات و مطالعات اندک در زمینه تأثیر نانوذرات نقره بر سلول‌های سرطانی پستان که از موارد شایع در دنیا و ایران می‌باشد، در پژوهش حاضر از عصاره برگ گیاه زرشک برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد و پس از تأیید ذرات سنتز شده، تأثیر آنها بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و همچنین بر بیان ژن ODC1 بررسی گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه عصاره گیاهی

برای تهیه عصاره، ابتدا ۲۰ گرم از برگ‌های خشک شده گیاه زرشک، خرد شد و همراه با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، دو بار تقطیر در ارلن ریخته شد. ارلن در حمام آب گرم (بن‌ماری) با دمای 70°C - 60°C به مدت یک ساعت قرار داده شد. مخلوط حاصل، پس از سرد شدن، با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و عصاره به دست آمده برای مصارف بعدی در دمای 4°C نگهداری شد.

۲.۲. سنتز نانو ذرات نقره

به منظور سنتز سبز نانو ذرات نقره ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با ۹۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار مخلوط شد و روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد (۱۶). پس از گذشت حدود ۲ ساعت، محلول از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای پررنگ تغییر رنگ داد. این تغییر رنگ، اولین نشانه تشکیل نانوذرات نقره و احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره است. طیف‌سنجی محلول از ۱۰ دقیقه پس از شروع واکنش تا ۷۲ ساعت بعد از آن، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T80, PG Instruments, UK) در دامنه ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام و ثبت شد. بررسی ریخت‌شناسی و تأیید اندازه نانو ذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Jeol JEM-1220, JEOL, Japan) و

ضد قارچی تجاری؛ همچون تداخلات دارویی، سمیت و تأثیرات ناسازگار را ندارند (۴). نانوذرات نقره همچنین در صنایع نساجی و بسته‌بندی، به منظور مهار میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند (۵). به دلیل استفاده‌های متعدد، روش‌های مختلف تولید این نانوذره و ترکیب‌های مبتنی بر آن، توسعه یافته است (۶).

روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات وجود دارد اما حضور ترکیبات نامناسب و ناخواسته، از معایب این روش‌ها است که این مسئله به‌ویژه در مورد نانوذرات نقره به دلیل کاربرد زیستی و پزشکی، مشکل‌آفرین خواهد بود (۷). اخیراً با پیشرفت تکنولوژی، باور بر توسعه روش‌های دوستدار محیط‌زیست یا فرایندهای سبز در تولید محصولات است که این مورد به‌ویژه در علوم نانو و نانو تکنولوژی صادق است (۸). منابع زیستی بسیاری؛ از جمله باکتری‌ها، جلبک‌ها، قارچ‌ها، گیاهان ابتدایی و عالی و محصولات آنها می‌توانند در سنتز نانوذرات استفاده شوند. سنتز نانوذرات به وسیله مواد گیاهی از طریق احیای سریع یون‌های فلزی انجام می‌شود. احیای یون‌های فلزی توسط عصاره‌های گیاهی، سریع‌تر از هر سیستم زیستی دیگر صورت می‌گیرد و نانوذرات، فاقد ترکیبات مضر هستند (۹). بنابراین امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای تولید نانوذرات، توجه زیادی را به خود جلب کرده است و همچنان که اشاره شد این توجه می‌تواند به دلایل سریع بودن واکنش، اقتصادی بودن و سازگار بودن با محیط زیست باشد (۱۰).

زرشک^۱ گیاهی است که رویشگاه آن اروپا و آسیا به‌ویژه ایران (خراسان جنوبی) می‌باشد. از بخش‌های مختلف آن مانند ریشه، برگ و میوه در طب سنتی استفاده می‌شود. خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدتوموری و ضدباکتریایی برای آن گزارش شده است (۱۱ و ۱۲). از ترکیب‌های شیمیایی مهم موجود در این گیاه می‌توان به آلکالوئیدهای بربرین^۲، برامین^۳ و پالماتین^۴ اشاره کرد، که توانایی احیاکنندگی قابل توجهی دارد و به نظر می‌رسد در احیای یون‌های نقره و ایجاد نانوذرات نقره، مؤثر باشند (۱۳).

در حال حاضر، سرطان، یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان است و با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی مورد استفاده و مقاومت دارویی سلول‌های

3. Berbamine
4. Palmatine

1. *Berberis vulgaris*
2. Berberine

شدند و جذب محلول حاصل در دستگاه الیزا ریدر (Awareness, Palm City, FL, USA) و در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد (۱۸). درصد سلول‌های زنده در هر غلظت نانوذره، از تقسیم میانگین جذب‌های نوری سلول‌های تیمار شده با غلظت مورد نظر از نانوذره بر میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO و در نهایت، ضرب در ۱۰۰ حاصل شد. غلظت مؤثر عصاره دارای سمیت سلولی، با کمیتی به نام IC50 گزارش شد که نشان‌دهنده غلظتی است که در آن، نیمی از سلول‌ها زنده هستند.

۴.۲. اندازه‌گیری بیان نسبی ژن ODC1

برای این منظور، سلول‌ها در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌مترمکعب کشت و پس از رسیدن رشد مناسب آنها، غلظت‌های مختلف نانوذره (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در سه تکرار افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند و سپس RNA استخراج شد و پس از آن، سنتز cDNA صورت پذیرفت.

از روش Real Time PCR برای سنجش کمی بیان ژن ODC1 استفاده شد. از آغازگرهای ژن اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) و بتا اکتین (ACTB) بدین منظور استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. خصوصیات آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های ODC1 و actb

نام آغازگر	توالی 5' - 3'
ODC1-FW	GTGGGTGATTGGATGCTCTTTG
ODC1-RV	ACCAGGCTAACTACTCGCTCAA
ACT-FW	TCCATCATGAAGTGTGACGT
ACT-RV	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT

ثانیه انجام شد.

با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ داده‌های حاصل از دستگاه Real time PCR آنالیز گردید.

۵.۲. آنالیز آماری

برای تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثرات سمیت سلولی از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید. Ct‌های مربوط به واکنش qRT-PCR از نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR استخراج شد و پس از محاسبه پارامترهای مربوطه، آنالیزهای آماری انجام پذیرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

دستگاه پراش اشعه ایکس (PANalytical X'pert pro, Malvern Panalytical, UK) انجام شد (۱۷).

۳.۲. درصد زنده‌مانی سلول‌ها

در این پژوهش، از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 استفاده شد. سلول‌ها از پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند و در محیط DMEM (شامل مقادیر مشخص از نمک‌های معدنی، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، فنل قرمز، ۰/۶ گرم در لیتر ال-گلوتامین و ۴/۵ گرم در لیتر گلوکز) به همراه ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد رطوبت، کشت داده شدند. برای تعیین درصد فراوانی سلول‌های زنده و فعالیت سمیت سلولی عصاره، از روش سنجش MTT استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های کشت شده در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات سنتز شده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌های تیمار شده همراه با رنگ (دی‌متیل تیازول - ۲ و ۵ دی‌فنیل تترازولیوم برماید) به مدت ۴ ساعت گرماگذاری شدند. کریستال‌های نامحلول آبی‌رنگ فورمازان در ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO حل

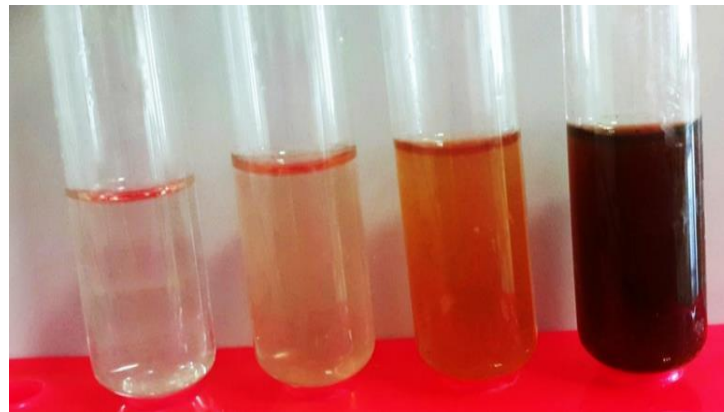
برای انجام واکنش‌های Real Time PCR، از cDNA ساخته شده، به عنوان الگو با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌ها، استفاده شد. برای کنترل داخلی، از ژن بتا اکتین استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر SYBER Green PCR Master Mix (ABI)، ۰/۴ میکرولیتر (از هر آغازگر)، ۶/۲ میکرولیتر آب و ۳ میکرولیتر cDNA است. شرایط چرخه دمایی و زمانی شامل دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس برای ۴۰ چرخه، دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در انتها اتصال پرایمر و طولیل شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰

۳. یافته‌های پژوهش

۱.۳. سنتز و طیف‌سنجی ماوراءبنفش - مرئی نانوذرات نقره

در سنتز سبز نانوذرات نقره، تغییر رنگ از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای پررنگ و طلایی در محلول در حال سنتز، نشان از تحریک و افزایش ارتعاش سطح پلاسمون در نانو ذرات نقره است (شکل ۱).

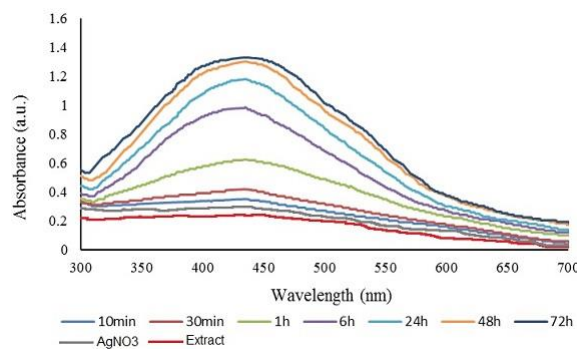
در سنتز سبز نانوذرات نقره، تغییر رنگ از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای پررنگ و طلایی در محلول در حال سنتز، نشان از



شکل ۱. تغییر رنگ محلول پس از شروع واکنش و احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره

از گذشت ۱۰ دقیقه از زمان واکنش، پیک محدود ۴۳۵ نانومتر نمایان می‌شود و هرچه از زمان واکنش می‌گذرد نقطه اوج جذبی حداکثر، نمایان‌تر می‌شود؛ به طوری که پس از ۱ ساعت، کاملاً مشخص و پس از ۷۲ ساعت گذشت از زمان واکنش، تقریباً به اوج خود می‌رسد (شکل ۲).

با توجه به اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط طیف‌سنجی ماوراءبنفش - مرئی، طیف‌ها نشان‌دهنده بیشترین جذب در حدود ۴۳۰ نانومتر برای نانوذرات سنتز شده بود. این نقطه اوج جذب با توجه به تابعی از زمان، در حال افزایش بود تا جایی که بعد از ۷۲ ساعت به فاز ثابتی از واکنش رسید. پس

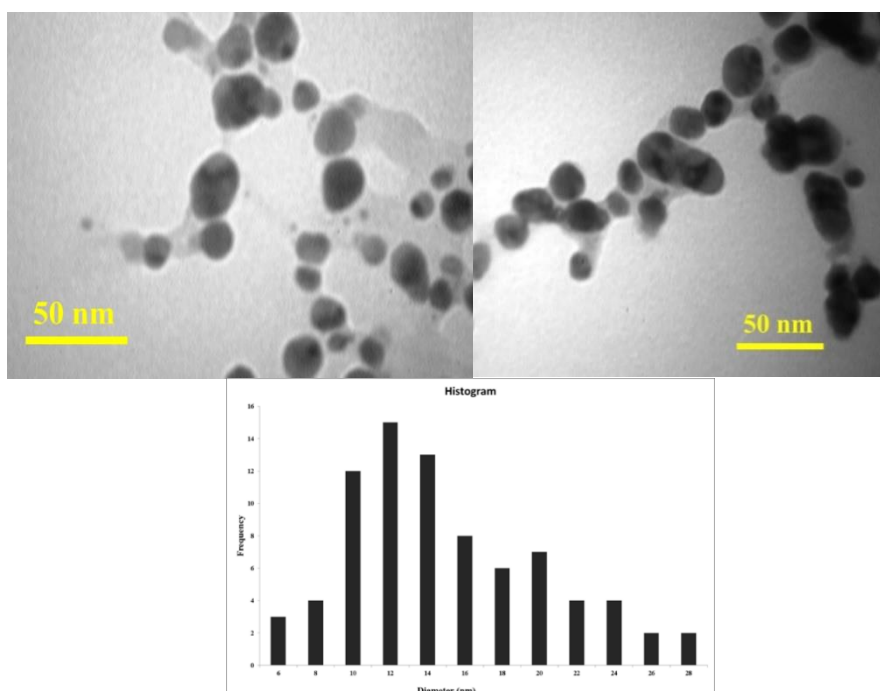


شکل ۲. تأثیر گذشت زمان بر سنتز نانوذرات نقره

عمدتاً کروی بود و تعداد کمی چندوجهی و شش‌وجهی نیز دیده شد. اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از ۱۰ تا ۴۵ نانومتر پراکنش یافته‌اند و میانگین اندازه این ذرات ۱۶ نانومتر بود (شکل ۳).

۲.۳. ویژگی‌های ریخت‌شناسی، اندازه و پراکنش نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری

ویژگی‌های ریخت‌شناسی نانوذرات نقره سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تعیین شد و شکل نانوذرات

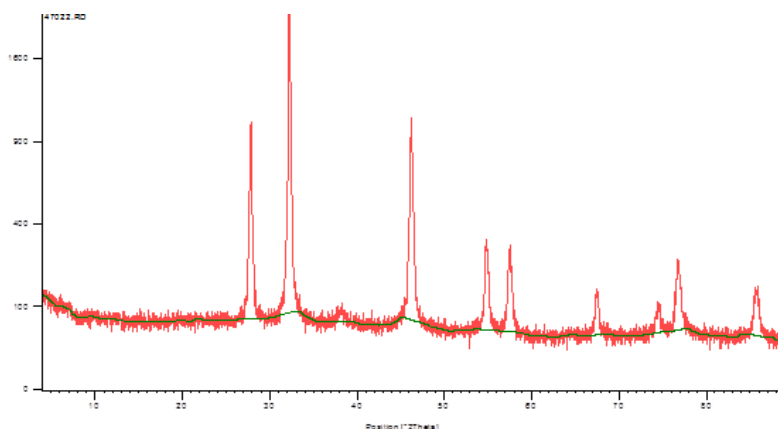


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانو ذرات نقره سنتز شده و نمودار پراکنش اندازه آن‌ها (نانوذرات، به کمک نرم‌افزار ImageJ ورژن ۱/۴۹ اندازه‌گیری و شمارش شد و با نرم‌افزار Excel ورژن ۲۰۱۳ نمودار ترسیم شد)

۳.۳. آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)

است و نشان کریستالی بودن آن‌ها با ابعاد متوسط ۱۶ نانومتر است.

نمودار پراش اشعه ایکس در $2\theta: 4-100$ در شکل ۴ مشاهده می‌شود. وجود پراش‌های قوی در $38/10$ ، $44/60$ ، $64/67$ ، $77/54$ و $81/50$ بیانگر ساختاری کروی برای نانوذرات نقره



شکل ۴. نمودار XRD نانوذرات نقره سنتز شده

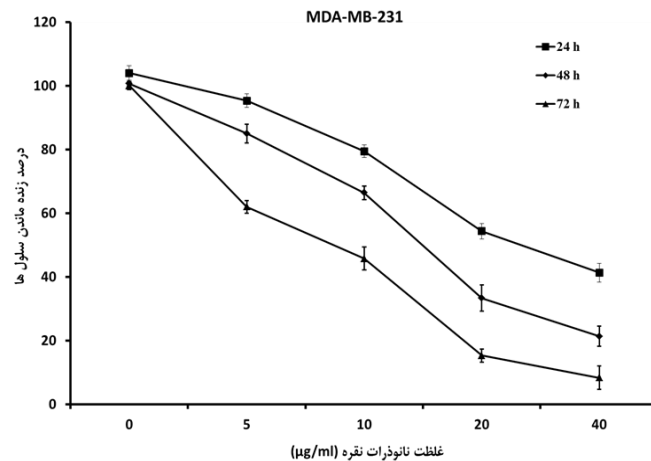
۴.۳. سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده

سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره و در زمان ۲۴ ساعت پس از تأثیر، درصد سلول‌های زنده از ۱۰۰ درصد

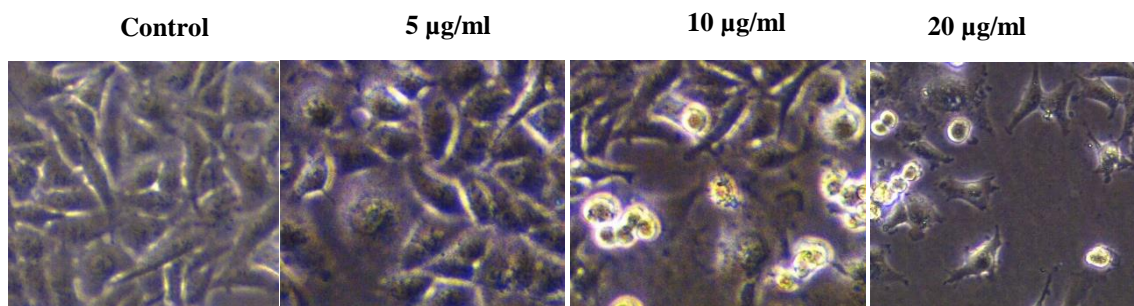
مقایسه میانگین‌های تأثیرات غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر درصد زنده ماندن سلول‌ها بیانگر آن است که با افزایش غلظت و زمان تأثیر نانوذرات نقره، درصد زنده ماندن

مانند کوچک شدن اندازه و تخریب سلولی با افزایش غلظت نانوذرات است (شکل ۶). همچنین مقدار IC_{50} نانوذرات نقره برای زمان ۲۴ ساعت، معادل ۲۷/۲ میکروگرم در میلی لیتر، برای زمان ۴۸ ساعت معادل ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر و برای زمان ۷۲ ساعت معادل ۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید.

در غلظت صفر به ۵۴ درصد و در زمان ۴۸ ساعت به ۳۳/۳۲ درصد کاهش می یابد. همچنین در زمان ۷۲ ساعت، این مقدار به ۸/۳ درصد تقلیل پیدا می کند. شایان ذکر است که از غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره به بعد، شدت سمیت به ویژه در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت، افزایش می یابد (شکل ۵). مطابق با نتایج سمیت سلولی، تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست حاکی از تغییرات ریخت شناسی



شکل ۵. نمودار منحنی تغییرات تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات نقره بر درصد زنده ماندن سلول ها (داده ها میانگین ۳ بار تکرار در هر غلظت به همراه انحراف معیار است).

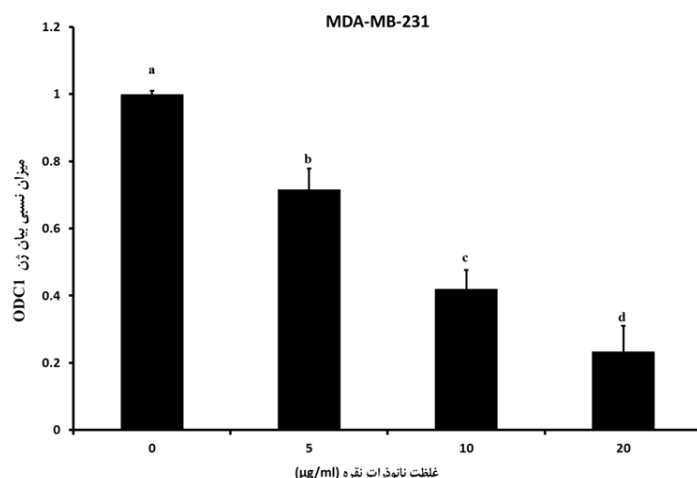


شکل ۶. تغییرات ریخت شناسی سلول های MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت های مختلف نانوذرات نقره به مدت ۴۸ ساعت (x۵۰۰).

۵.۳. بیان نسبی ژن ODC1

این ژن حدود چهار برابر نسبت به شاهد، کاهش یافته است. همچنین بین غلظت های مختلف نانوذرات، اختلاف معنی داری از نظر بیان ژن ODC1 مشاهده می شود (شکل ۷).

مقایسه میانگین اثر غلظت های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده به روش سیز بر میزان بیان نسبی ژن ODC1 در رده سلولی MDA-MB-231 بیانگر آن است که با افزایش غلظت نانوذرات، میزان بیان این ژن، کاهش یافته است؛ به طوری که در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات، میزان بیان



شکل ۷. تغییرات بیان ژن ODC1 در رده سلولی MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار در هر غلظت به همراه انحراف معیار است).

از نظر جذب به سطوح بالاتر می‌رود (۱۵). شکل نانو ذرات سنتز شده توسط عصاره برگ زرشک، عمدتاً کروی بود. اندازه نانوذرات سنتز شده بین ۵ تا ۳۰ نانومتر متغیر بود و میانگین اندازه نانوذرات ۱۶ نانومتر گزارش شد. در مطالعه دیگر، پاکروان و همکاران (۲۰۱۸) اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه زرشک را بین ۳۰ تا ۷۰ نانومتر گزارش کردند که این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع عصاره و شرایط واکنش باشد؛ به طوری که در تحقیق ذکر شده، از عصاره ریشه و برگ و غلظت ۳ میلی‌مولار نیترات نقره در واکنش استفاده شده است (۱۹).

نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره بر رده سرطانی پستان در محدوده غلظتی به کار رفته، دارای اثرات سمیت سلولی هستند؛ به طوری که IC_{50} محاسبه شده برای رده MDA-MB-231 در مجموع سه زمان برابر ۱۶/۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. سلول‌های MDA-MB-231 که به‌عنوان رده سه‌گانه منفی ER/PR/HER2 شناخته می‌شود، به‌عنوان مدلی مناسب برای مطالعات مهار رشد سلولی ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود و معمولاً به دلیل عدم پاسخ به استروژن، تأثیرپذیری بیشتری از مواد مهارکننده رشد سلولی دارند (۲۰). به علاوه، نتایج این تحقیق نشان داد که میزان سمیت نانو ذرات، از یک الگوی وابسته به دوز و زمان پیروی می‌کند؛ به طوری که با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری سلول‌ها، درصد زنده ماندن سلول‌ها کاهش یا به عبارت دیگر، سمیت نانوذرات، افزایش می‌یابد. در مورد سمیت سلولی نانوذرات فلزی و به‌ویژه نانوذرات نقره، مطالعات متعددی انجام و مشخص شده

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، عصاره برگ گیاه زرشک برای سنتز زیستی خارج سلولی و احیای یون‌های نقره مورد استفاده قرار گرفت. با گذشت زمان، رنگ محلول به قهوه‌ای تیره متمایل می‌شود که رنگ نهایی وابسته به افزایش زمان است. این تغییر رنگ در حالی صورت می‌گیرد که در عصاره بدون نیترات نقره هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. پدیدار شدن رنگ قهوه‌ای ناشی از برانگیختن ارتعاش پلاسمون سطحی و همچنین نشانه‌ای از شکل‌گیری نانوذرات نقره است (۱۰). با استفاده از طیف‌سنجی ماوراءبنفش - مرئی فرایند واکنش در محلول حاوی عصاره برگ زرشک به همراه نیترات نقره در بازه‌های زمانی مختلف ثبت شد که طیف‌های ثبت شده از محلول در حال واکنش در بازه زمانی ۶ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ گزارش شد که به صورت منحنی‌های جداگانه رسم شد. اوج جذب از ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر با گذشت زمان افزایش پیدا کرد که نشان‌دهنده روند رو به رشد واکنش است. فرایند جذب در محلول با توجه به گذشت زمان، افزایش تعداد نانوذرات نقره را نشان می‌دهد که این روند با نتایج Hema و همکاران (۲۰۱۶) در استفاده از عصاره گیاه ذرت در سنتز سبز نانوذرات نقره، همخوانی دارد (۱۰). واکنش بعد از گذشت حدود ۷۲ ساعت به اوج و تقریباً به تعادل رسید. محلول تشکیل شده پس از نگهداری، بعد از یک ماه هیچ تغییری نکرد و بسیار پایدار بود. میزان جذب به اندازه، شکل و ترکیب نمونه وابسته است. هرچه ذرات کوچک‌تر باشند، میزان جذب کمتر است، یعنی به‌مرور زمان و با پیشرفت واکنش، نمودار

با فعالیت خود و افزایش پلی آمین ها منجر به رشد و بزرگ شدن تومور می گردد. از آن جایی که بیان بالای ژن ODC1 برای تغییر سلول ها به حالت سرطانی ضروری است پیشنهاد شده است که میزان فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز به عنوان شاخص زیستی در تخمین رشد و پیشرفت تومور در نظر گرفته شود. لذا در تحقیقات ضدسرطان، کاهش میزان بیان ژن ODC1 یا مهار فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز، راهکاری مناسب برای جلوگیری از رشد و تکثیر سلول های سرطانی است (۲۶).

در پژوهش حاضر، بنابر موارد پیش گفته، تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده بر بیان ژن ODC1 در رده سرطانی پستان (MDA-MB-231) ارزیابی گردید. برای این که کاهش بیان این ژن، ناشی از کم شدن تعداد سلول ها در نتیجه سمیت سلولی نانو ذرات نباشد از غلظت های کمتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. نتایج، بیانگر کاهش بیان این ژن در سلول های سرطانی به روش وابسته به دوز است؛ یعنی با افزایش غلظت نانوذرات، کاهش بیان بیشتر رخ داده است؛ به طوری که کاهش حدود ۴ برابری در بیان این ژن در رده MDA-MB-231 و در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات دیده می شود. بنابراین به نظر می رسد بخشی از فعالیت ضدسرطانی و مهار تکثیر سلول های سرطانی نانوذرات نقره از طریق کاهش بیان ژن ODC1 و در نتیجه آن، کاهش پلی آمین های مورد نیاز سلول های سرطانی باشد. در این تحقیق، تأثیر سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز بر رده سلولی سرطان پستان و همچنین اثر این نانو ذرات بر بیان ژن ODC1 بررسی شد. نتایج، بیانگر کاهش معنی دار درصد زنده ماندن سلول های سرطانی در اثر تیمار با نانو ذرات نقره بود. به علاوه بیان ژن ODC1 در سلول های سرطانی، تحت تیمار نانوذرات کاهش یافت. به نظر می رسد نانوذرات نقره با رهاسازی تدریجی یون های نقره در محیط اسیدی سلول های سرطانی و ایجاد رادیکال های اکسیژن، سبب مرگ سلولی شده اند. یکی دیگر از دلایل کاهش درصد زنده ماندن سلول های سرطانی می تواند در نتیجه کاهش بیان ژن ODC1 که نقش اساسی در تأمین پلی آمین های مورد نیاز سلول های سرطانی دارد، باشد.

است که سمیت نانوذرات نقره، بیشتر از حالت غیرنانو یا توده مواد نقره است (۲۱) اما هنوز اثرات نانوذرات بر سلامتی انسان یا به طور کلی بر محیط زیست، محل بحث می باشد و نیازمند تحقیق و مطالعه بیشتر است. همچنین مطالعات نشان داده است که نانوذرات فلزی در سطح سلولی، ریزسلولی و مولکولی مانند پروتئین ها و ژن ها می توانند تأثیرگذار باشند (۲۲). ارزیابی نانوذرات نقره روی مدل های سلولی و جانوری، بیانگر آن است که این ذرات با القای تولید گونه های انفعالی اکسیژن سبب سمیت سلولی می شوند. در این راستا کاهش مقدار گلوکاتینون، افزایش میزان اکسیژن های انفعالی و بالا رفتن پراکسیداسیون لیپیدها در نمونه های تیمار شده با نانوذرات نقره گزارش شده است (۶). بنابر نتایج این تحقیق، نانوذرات نقره بر سلول های سرطانی، اثر سمی دارند که این می تواند به دلیل محیط نسبتاً اسیدی سلول های توموری باشد که آزاد شدن یون های نقره از نانو ذرات نقره، سریع تر در آن ها رخ می دهد (۲۳). به علاوه، تأثیرات سمی نقره بر سلول های سرطانی می تواند به دلیل برهم کنش اتم های نقره با گروه های عملکردی پروتئین ها، همچنین بازهای نیتروژنی و فسفات ملکول DNA باشد. دیگر تأثیر نانوذرات نقره بر سلول های سرطانی مهار رشد، از طریق ممانعت از تقسیم سلولی است که نتیجه برهم کنش آن ها با ساختار و سازمان اسکلت سلولی اکتینی است (۲۴). شواهد و نتایج تحقیقات متعددی، حاکی از القای آپاپتوز در نتیجه استفاده از نانوذرات نقره در سلول های سرطانی است. به نظر می رسد این اتفاق از طریق تولید اکسیژن های واکنش گر رخ دهد؛ بدین ترتیب که سطوح فعال نانوذرات نقره با رهاسازی یون های نقره، رادیکال های آزاد تولید می کنند که این رادیکال های آزاد با تخریب DNA و به ویژه غشای میتوکندری، سبب رهاسازی سیتوکروم c و القای آپاپتوز از مسیر میتوکندریایی را باعث می شوند (۱). یکی از ترکیبات مهم در تقسیم، تمایز و مرگ سلولی و نیز در سنتز و پایداری، ماکرومولکول های زیستی پلی آمین ها هستند. در سلول ها و بافت های سرطانی؛ از جمله در سرطان پستان نیز پلی آمین ها تجمع میابند و برای رشد و تکثیر، ضروری هستند. گزارش های متعددی حاکی از کاهش رشد تومورهای سرطانی در نتیجه استفاده از مهارکننده های سنتز زیستی پلی آمین ها است (۲۵). آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) که اورنیتین را به پوترسین، دکربوکسیله می کند،

References

[1]. Malik P, Mukherjee TK. Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers. *Int J Pharm.* 2018; 553(1-2):483-509.

[2]. Duran N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride

- nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(15):6555-70.
- [3]. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol In Vitro*. 2017;38:179-92.
- [4]. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
- [5]. McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Total Environ*. 2016;575:231-46.
- [6]. Marin S, Vlasceanu GM, Tiplea RE, Bucur IR, Lemnar M, Marin MM, et al. Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(16):1596-604.
- [7]. Poulouse S, Panda T, Nair PP, Theodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(2):2038-49.
- [8]. Pareek V, Gupta R, Panwar J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Mater Sci Eng C*. 2018;1(1):739-749.
- [9]. Ovais M, Khalil AT, Raza A, Khan MA, Ahmad I, Islam NU, et al. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(23):3157-77.
- [10]. Hema JA, Malaka R, Muthukumarasamy NP, Sambandam A, Subramanian S, Sevanan M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Zea mays* and exploration of its biological applications. *IET Nanobiotechnol*. 2016;10(5):288-94.
- [11]. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. *Berberis Vulgaris* and Berberine: An Update Review. *Phytother Res*. 2016;30(11):1745-64.
- [12]. Hoshyar R, Mahboob Z, Zarban A. The antioxidant and chemical properties of *Berberis vulgaris* and its cytotoxic effect on human breast carcinoma cells. *Cytotechnology*. 2015;68(4):1207-13.
- [13]. Srivastava S, Srivastava M, Misra A, Pandey G, Rawat A. A review on biological and chemical diversity in *Berberis* (*Berberidaceae*). *Excli j*. 2015;14:247-67.
- [14]. Sorlie T. The Impact of Gene Expression Patterns in Breast Cancer. *Clin Chem*. 2016;62(8):1150-1.
- [15]. Alam F, Naim M, Aziz M, Yadav N. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. *Indian J Cancer*. 2015;52(1):1-9.
- [16]. Ramesh AV, Devi DR, Battu G, Basavaiah K. A Facile plant mediated synthesis of silver nanoparticles using an aqueous leaf extract of *Ficus hispida* Linn. f. for catalytic, antioxidant and antibacterial applications. *S Afr J Chem Eng*. 2018;26: 25-34.
- [17]. Rao NH, N L, Pammi SV, Kollu P, S G, P L. Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros paniculata* and their antimicrobial activities. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;62:553-7.
- [18]. He Y, Li X, Wang J, Yang Q, Yao B, Zhao Y, Zhao A, Sun W, Zhang Q. Synthesis, characterization and evaluation cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by Chinese herbal *Cornus officinalis* via environment friendly approach. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;(56):56-60.
- [19]. Behravan M, Panahi AH, Naghizadeh A, Ziaee M, Mahdavi R, Mirzapour A. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *Int J Biol Macromol*. 2019;124:148-54.
- [20]. Carlisle SM, Trainor PJ, Yin X, Doll MA, Stepp MW, States JC, et al. Untargeted polar metabolomics of transformed MDA-MB-231 breast cancer cells expressing varying levels of human arylamine N-acetyltransferase 1. *Metabolomics*. 2016;12(7).
- [21]. Raj S, Mali SC, Trivedi R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Encostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4): 2814-9.
- [22]. Alsammarraie FK, Wang W, Zhou P, Mustapha A, Lin M. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids Surf. B*. 2018;171:398-405.
- [23]. Sweeney SK, Luo Y, O'Donnell MA, Assouline I. Nanotechnology and cancer: improving real-time monitoring and staging of bladder cancer with multimodal mesoporous silica nanoparticles. *Cancer Nanotechnol*. 2016;7:3.
- [24]. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J*. 2014;55(2):283-91.
- [25]. Murray-Stewart TR, Woster PM, Casero RA, Jr. Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention. *Biochem J*. 2016;473(19):2937-53.
- [26]. Muthukumaran S, Bhuvanasundar R, Umashankar V, Sulochana KN. Insights on ornithine decarboxylase silencing as a potential strategy for targeting retinoblastoma. *Biomed Pharmacother*. 2018; 28(98):23-8.

Green synthesis of silver nanoparticles by *Berberis vulgaris* leaf extract and their effects on cell proliferation and ODC1 gene expression in MDA-MB-231 cell line

Safipour Afshar A.^{1*}, Saied Nematpour F.²

1. Associate Professor, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran
2. Anesthesiologist, Assistant Professor, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

Abstract

Introduction: Green synthesis of silver nanoparticles is a simple and low-cost method. In addition, finding new therapeutic effects for silver nanoparticles is considered as an attractive field in cancer research. In the present study, synthesis of silver nanoparticles was performed by aqueous leaf extract of barberry. The effects of Ag nanoparticles were evaluated on cell viability and expression levels of ODC1 gene of the human breast cancer cell line (MDA-MB-231).

Materials and Methods: The synthetic nanoparticles were analyzed by UV-vis spectrophotometry and Transmission Electron Microscopy. The cultured cancer cells were treated under different concentrations of synthesized nanoparticles. The viability of the cells was analyzed by MTT assay and relative expression of ODC1 gene by Real-Time PCR.

Results: TEM photomicrographs showed that the spherical silver nanoparticles have been synthesized with an average size of 16 nm. The results showed cytotoxicity of silver nanoparticles in a time and dose-dependent manner. The average IC₅₀ calculated was 16.48 µg/ml. The results also showed that silver nanoparticles decreased ODC1 gene expression levels about 4 folds at 20 µg/ml nanoparticles compared to control.

Conclusion: It seems that green synthesized silver nanoparticles through the gradual release of silver ions in the acidic environment of the cancer cells and production of oxygen radicals, as well as reduction of ODC1 gene expression cause diminish of cancer cell viability.

Received: 2018/11/05

Accepted: 2019/01/21

Keywords: *Berberis vulgaris*, Cytotoxicity, Green synthesis, Ornithine decarboxylase, Silver nanoparticles.