

بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره با پوشش کورمین

بر سلول‌های سرطانی تخمدان A2780

طیبه رضانی^{۱*} Ph.D. Student، محمد نبیونی^۲ Ph.D.، جواد بهار آرا^۳ Ph.D.، کاظم پریور^۴ Ph.D.، فریده نامور^۴ Ph.D.

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
 ۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
 ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، مشهد، ایران
 ۴- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: tayeberamezani@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۶

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر اثر، نانوذرات نقره پوشش دار شده با کورکومین بر القای مرگ سلولی بر رده سلول‌های سرطان تخمدان A2780 بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از کورکومین انجام شد. سپس سلول‌های رده A2780 با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره تیمار شدند. اثرات سمی نانو ذرات نقره با روش MTT و اثرات آپوپتوزیس این نانو ذرات با روش‌های رنگ آمیزی DAPI و اکریدین اورنج-پروپودیوم یداید و اندازه گیری فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ بررسی شد. تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با روش Real Time PCR آنالیز شد.

نتایج: نتایج نشان داد این نانو ذرات باعث مهار تکثیر سلول‌های A2780 به‌طور وابسته به غلظت شده‌اند، غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به مرگ پنجاه درصد سلول‌ها در ۲۴ ساعت شد. نتایج رنگ آمیزی DAPI و اکریدین اورنج-پروپودیوم یداید نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزیس در گروه‌های تیماری بود. مطابق نتایج حاصل از Real Time PCR بیان ژن Bax در سلول تحت تیمار افزایش در حالی که بیان ژن Bcl-2 در این سلول‌ها کاهش نشان داد.

نتیجه گیری: نانوذرات نقره پوشش دار شده با کورکومین باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی A2780 می‌شود و استفاده از این نانو ذرات می‌تواند به‌عنوان استراتژی امیدوارکننده در درمان سرطان تخمدان مورد توجه قرار گیرد.
واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، سرطان، آپوپتوزیس، کورکومین

مقدمه

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 سرطان‌ها شیمی درمانی می‌باشد. نکته مهم در درمان سرطان با روش‌های شیمی درمانی، مقاومت اکتسابی تومور به داروهای است و این مسئله مشکلات عمده‌ای را برای درمان سرطان به وجود آورده است. از آنجا که میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی بسیار بالاست و تغییرات ژنی به سرعت در آن‌ها انجام می‌گیرد، این سلول‌ها نسبت به داروها مقاومت پیدا می‌کنند. بنابراین پژوهش بیشتر در زمینه کشف استراتژی‌های درمانی نوین برای غلبه بر مقاومت دارویی سرطان‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱). در این میان نانو تکنولوژی زمینه امیدوارکننده‌ای در حیطه درمان سرطان به وجود 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 نانو ذرات نقره می‌تواند به‌عنوان عامل بالقوه ضد سرطانی محسوب گردد (۲ و ۳). اما حلال‌های آلی مورد استفاده برای تولید این نانو ذرات سمی هستند و می‌توانند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند. از این‌رو تمایل زیادی برای استفاده از روش‌های سالم برای سنتز نانو ذرات نقره وجود دارد (۴). اخیراً مطالعات تحت عنوان شیمی سبز آغاز شده است که به جستجوی روش سازگار با محیط زیست برای سنتز نانو ذرات می‌پردازد. در سال‌های اخیر، نانو ذرات نقره به‌روش خارج سلولی و با استفاده از عصاره‌های مختلف گیاهی و میکروبی سنتز گردیده است. به‌عنوان نمونه نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره‌های گیاهانی مانند زیتون، بومادران و آلورا با موفقیت سنتز شده است (۵، ۶ و ۷). به‌علاوه مطالعات زیادی در زمینه بررسی خواص ضد باکتری، آنتی اکسیدانت و فعالیت‌های ضد تومور این محصولات طبیعی در جریان است. در این راستا Sathish و همکاران اثرات آنتی باکتریایی نانو ذرات نقره، سنتز شده با روش زیستی را بررسی نمودند (۸). همچنین Reddy و همکاران اثرات آنتی اکسیدانتی، آنتی باکتریال و ضد سرطانی نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره گیاه *Piper longum* را بررسی نمودند (۹). کورکومین یکی از پلی فنل‌های غذایی شناخته شده است که از ریزوم گیاه زرد چوبه (*Curcuma*

longa) به‌دست می‌آید. این پودر زرد رنگ سال‌ها در طب سنتی برای درمان آکنه، پسوریازیس، آماس پوست استفاده می‌شود. اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانتی و ضد میکروبی کورکومین به‌خوبی شناخته شده است. همچنین این ماده مجموعه‌ای از اهداف مولکولی و مسیره‌های سیگنالینگ، مانند: AKT / mTOR, NF- κ B و HIF-1A را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در نتیجه در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، متاستاز، رگ‌زایی و هم چنین القای آپوپتوزیس نیز نقش ایفا می‌کند (۱۰). بنابراین در این تحقیق جهت افزایش اثر گذاری نانو ذرات نقره، هم‌چنین افزایش دسترسی زیستی کورکومین از این ماده به‌عنوان کاهنده و پایدارکننده نانو ذرات نقره استفاده شد. سپس اثرات ضد سرطانی آن بر سلول‌های سرطان تخمدان A278 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی در سال ۹۵-۹۴ در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی- تکوین جانوری وابسته به دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد انجام شد.

سنتز زیستی نانو ذرات نقره و شناسایی آن: تولید نانوذرات نقره با روش زیستی: محلول ۰/۵ مولار نیترات نقره (Merck, Germany) در آب با حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد و میزان ۱ میلی‌لیتر کورکومین (Sigma, Uk) با غلظت ۱۰ میلی‌مولاری در DMSO در دمای اتاق و pH= ۷/۲ به آن اضافه شد. تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به قهوه‌ای نشان دهنده آغاز تشکیل نانو ذرات در نظر گرفته شد.

طیف سنجی نور مرئی- فرابنفش: برای ثبت طیف جذبی نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین در ناحیه نور مرئی- فرابنفش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را در یک پلیت ۹۶ قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در دامنه ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biotek, US) اندازه‌گیری شد. همچنین برای شناسایی شکل و ابعاد نانو ذرات تولید شده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Hitachi, Japan) استفاده شد. این مشاهدات با قرار دادن یک قطره از نمونه بر گرید مس پوشش داده شده با یک فیلم کربن، انجام گرفت (۱۱).
طیف سنجی نور پویا (Dynamic light scattering (DLS): اندازه متوسط نانو ذرات با استفاده از دستگاه DLS

بررسی مورفولوژیک تغییرات سلول‌های تحت تیمار با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید: برای این رنگ آمیزی، سلول‌های سرطانی در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با تریپسین از چاهک‌ها جدا و سانتریفیوژ شدند سپس با ۱۰ میکروگرم محلول آکریدین اورنج و ۱۰ میکروگرم پروپودیوم یداید (Merck, Germany) به سلول‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول سلولی بر داشته و بر روی اسلاید قرار داده شد و با میکروسکوپ فلوروسانس (Biomed, Korea) آنالیز شد. در هر بار مشاهده حداقل ۱۰۰ سلول شمارش و درصد سلول‌ها ی آپوپتوتیک با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$100 \times \text{تعداد کل سلول‌های آپوپتوزیس و نرمال} / \text{تعداد کل سلول‌های آپوپتوزیس} = \text{درصد سلول‌های آپوپتوزیس}$

بررسی تغییرات مورفولوژی هسته در سلول‌های تیماری با رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI: برای بررسی اثرات نانو ذره نقره سنتز شده با کورکومین بر روی هسته سلول‌های سرطان تخمدان A2780 از رنگ آمیزی DAPI (Sigma, UK) استفاده شد. سلول‌ها بعد از کشت بر روی لام‌های کوت شده با کلاژن در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس با پارا فرم آلدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI قرار داده شدند در نهایت پس از شستشو با میکروسکوپ فلورسانس (Biomed, Korea) بررسی شدند.

تعیین مسیر آپوپتوزیس با استفاده از کیت کاسپاز ۳ و ۹: سلول‌های A2780 در ۲ فلاسک کشت سلول متوسط کشت داده شدند. سپس با نانو ذرات نقره سنتز شده با کورکومین با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها تریپسینه و سانتریفیوژ شدند و پس از آن محتوی پروتئین سلول‌ها استخراج شد. غلظت پروتئینی با روش بردفورد اندازه‌گیری شد. سپس ۵۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه جدا و بر اساس پروتوکل کیت کاسپاز ۳ و ۹ (Abcam, Germany)

(Cordovan, Vaso particle, France) تعیین شد. بر پایه نتایج طیف سنجی نور مرئی- فرابنفش بهترین نمونه برای آنالیز DLS انتخاب شد. این بررسی در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از زاویه ثابت ۹۰ درجه و در طول موج ۶۵۷ نانومتر انجام شد.

طیف مادون قرمز برای نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین و کورکومین تجاری به تنهایی با استفاده از دستگاه (Perkin Elmer, US) انجام گرفت. قبل از انجام آنالیز به منظور حذف هر گونه باقی مانده کورکومین آزاد بدون اتصال به نانو ذرات، نانو ذرات نقره ۳ بار با آب مقطر شسته و محصول در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس با دستگاه انجماد خشک پودر شدند. نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین با پودر KBr (Merck, Germany) مخلوط و طیف مادون قرمز در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ نانومتر به دست آمد ثبت شد (۱۱).

بررسی اثرات ضد سرطانی نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین: رده سلولی سرطان تخمدان A2780 از انیسیتوپاستور تهران تهیه و با محیط کشت RMP1640 (Sigma, UK) حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (Sigma, UK) و یک واحد پنسیلین-استرپتومایسین (Sigma, UK) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش سمیت نانو ذرات نقره با روش آزمون (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): تعداد $10^4 \times 5$ سلول در چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد پس از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات نقره تیمار شدند. سلول‌های تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از این مدت به هر پلیت ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Merck, Germany) اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شدند. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد تا بلورهای فورمازان حاصل حل شد. جذب نوری توسط دستگاه میکرواسپکتوفتومتر (Biotek, US) در ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار و درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد.

$100 \times (\text{میانگین جذب نمونه کنترل} / \text{میانگین جذب نمونه تیمار}) = \text{درصد زنده های سلول}$

برای تهیه cDNA بر اساس پروتکل شرکت (Thermo, Germany) ۱۰ میکرولیتر از محلول RNA را در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوبه شد سپس بافر PCR به آن اضافه شد. محلول حاصله را ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد برای توقف واکنش، نمونه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. جهت انجام مراحل PCR کیفی از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و مسترمیکس حاوی رنگ سایبرگرین (Pars tous, Iran) استفاده شد. چرخه PCR ۴۰ مرحله و توسط دستگاه Real Time PCR (Bio rad, US) انجام شد.

فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار شد.

بررسی تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl-2: سلول‌های A2780 در ۲ فلاسک کشت سلول متوسط کشت داده شدند و با نانو ذره نقره سنتز شده با کورکومین با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها تریپسین و سانتریفوژ شدند. برای استخراج، RNA با توجه به پروتکل کیت (Roche, Germany) لیز سلول‌ها انجام شد. بعد از لیز شدن کامل سلول‌ها، استخراج به کمک کلروفورم و ایزوپروپانل انجام گرفت تا رسوب RNA به دست آید. در نهایت پس از شستشو با اتانول ۷۵ درصد، RNA حاصل در آب حل شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Sequence
BCL-2F	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC
BCL-2R	CAGATAGGCACCCAGGGTGAT
BAXF	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA
BAXR	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT
GAPDHF	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
GAPDHR	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

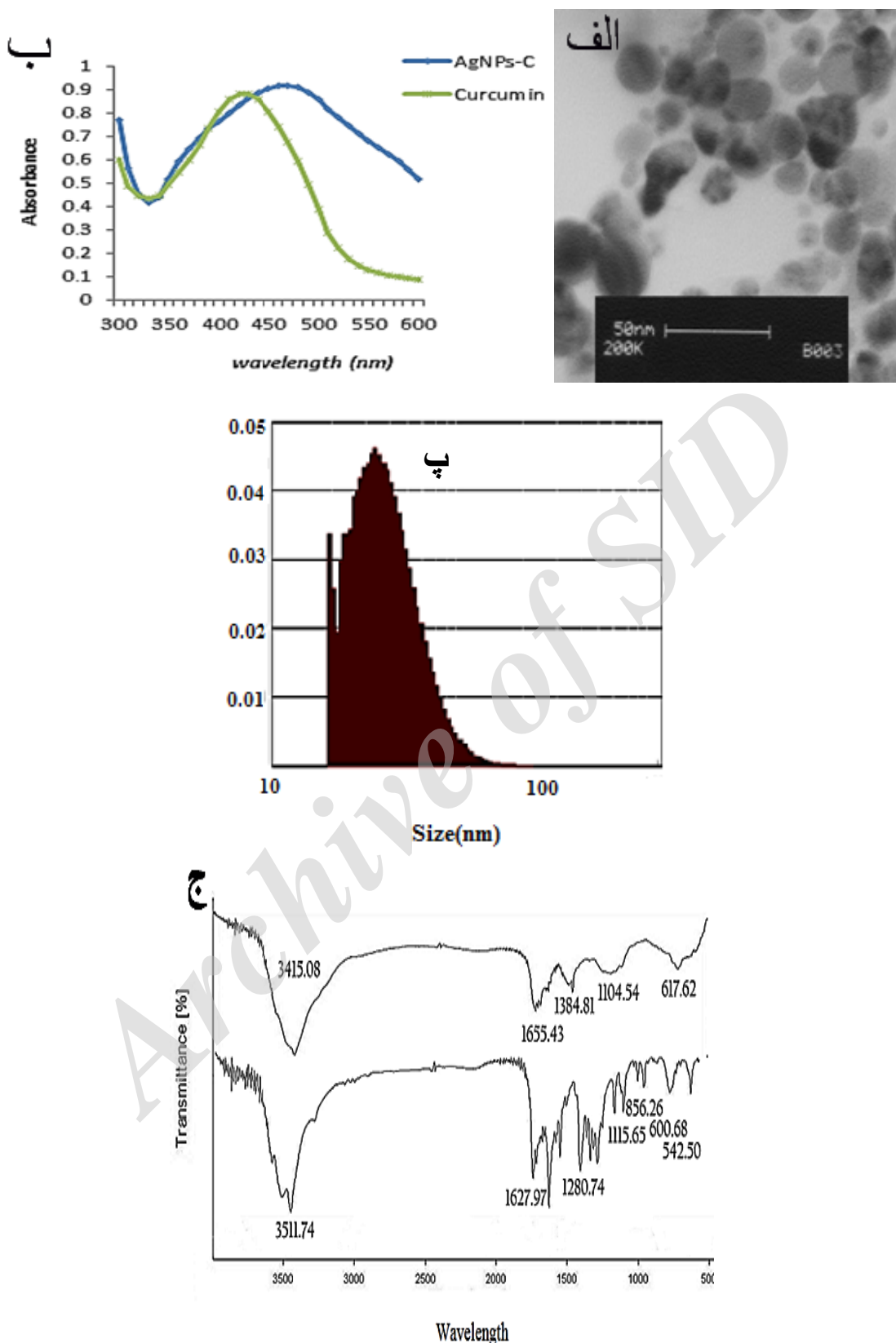
نتایج حاصل از سنجش سمیت نانو ذرات نقره با روش آزمون MTT نانوذرات نقره تا غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر فاقد هر گونه اثر معنی‌داری در زیست پذیری سلول‌ها بودند، در حالی که در غلظت‌های ۴ میکروگرم بر میلی لیتر سطح معنی‌داری بین کنترل و نمونه‌های تیمار افزایش می‌یابد و غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰ درصد سلول‌ها (IC50) دچار مرگ سلولی شده اند و از نظر زیست شناسی می‌توان عنوان کرد که در غلظت‌های زیر ۱ مهار تکثیر سلول‌ها رخ می‌دهد و غلظت‌های بیشتر منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود. در حالی که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر لیز سلولی در اکثر سلول‌ها نشان می‌دهد (شکل ۲).

آنالیز آماری: جهت مشخص نمودن اختلاف بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست Tukey استفاده شد. نتایج توسط نرم افزار SPSS 16 آنالیز و نمودارها با نرم افزار Excell ترسیم شدند.

نتایج

سنتز نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین و تعیین مشخصات آن

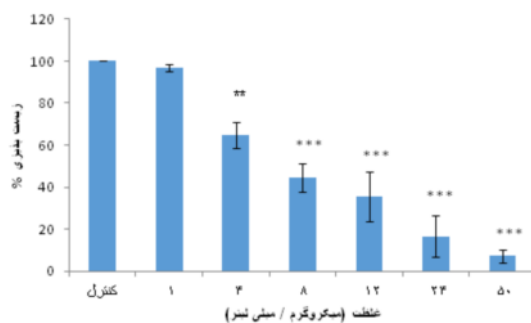
سنتز نانوذرات نقره در حضور کورکومین در زمان ۲۴ ساعت صورت گرفت. اندازه متوسط این نانو ذرات در حدود 2 ± 40 بود و ماکزیمم جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر مشخص شد. مطالعات طیف سنجی نور مادون قرمز نشان داد که نمودارهای حاصل از کورکومین تجاری و نانو ذرات الگوی یکسانی را در پیک‌های جذبی در ناحیه ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ دارند. این موضوع نشان می‌دهد که کورکومین سطح نانوذرات نقره را پوشش داده است (شکل ۱، ب و ج).



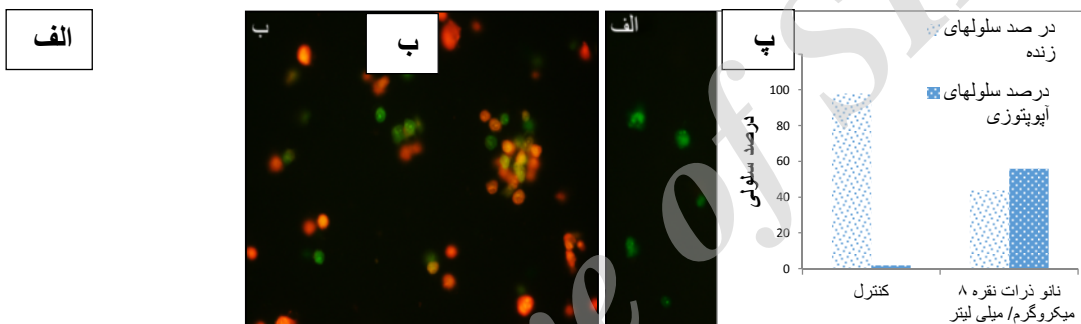
شکل ۱: الف) میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبزه، ب) میزان جذب نوری را برای نمونه‌های نانو ذرات سنتز شده با کورکومین که نشان دهنده حداکثر جذب نانو ذرات در ۴۵۰ نانومتر می‌باشد، پ) نمودار توزیع نانوذره از نظر اندازه با توجه به آنالیز سایز نانوذرات نقره با دستگاه DLS، ج) نتایج حاصل از طیف مادون قرمز از کورکومین (۱) و نانو ذرات سنتز شده (۲) این دو طیف بسیار به یکدیگر شباهت دارند که نشان می‌دهد کورکومین بر سطح نانوذرات نقره اتصال یافته‌اند.

بررسی مورفولوژیک تغییرات سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / پروپودیوم یداید

در رنگ آمیزی آکریدین اورنج سلول‌های زنده به رنگ سبز دیده می‌شود. در حالی که سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوزیس قرار دارند نارنجی رنگ مشاهده می‌شوند. در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات درصد سلول‌ها با رنگ نارنجی افزایش چشم‌گیری در مقایسه با کنترل داشتند. شمارش سلول‌های زنده در مقابل سلول‌های آپوپتوزیس نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوزیس در گروه تیمار در حدود ۵۶ درصد بود، درحالی‌که این درصد در گروه کنترل کمتر از ۲ درصد کل سلول‌ها بود (شکل ۳).



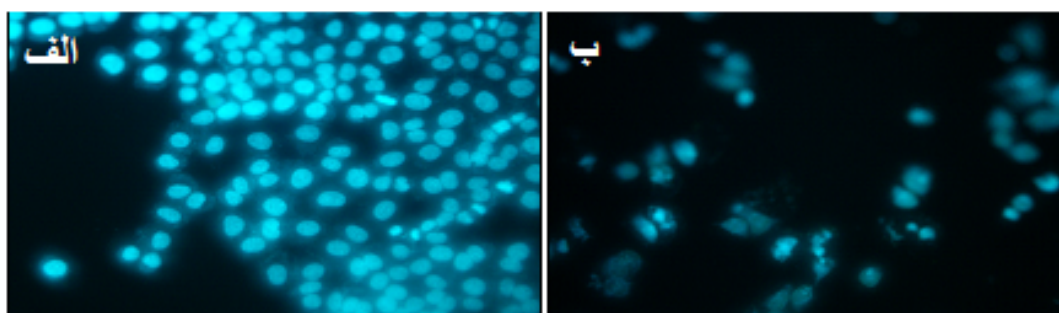
شکل ۲: درصد زیست پذیری سلول‌های A2780 را در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نشان می‌دهد (Mean±S.D). (**p < 0.01, ***p < 0.001).



شکل ۳: الف) شکل حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج / پروپودیوم یداید. در گروه کنترل بیشتر سلول‌ها سبز رنگ می‌باشند و در حالت نرمال قرار دارند، ب) در حالی که در گروه تیماری بیشتر سلول‌ها به رنگ نارنجی هستند و در مرحله آپوپتوزیس قرار دارند، پ) شمارش تعداد سلول‌های زنده و آپوپتوزیس در گروه کنترل و تیمار نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوزیس در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است، (بزرگنمایی ×۴۰۰).

نانوذرات نقره بودند بعد از ۲۴ ساعت دارای کروماتین فشرده و یا قطعه قطعه می‌باشند. این تغییرات که از خصوصیات سلول‌های آپوپتوزیس می‌باشد نشان دهنده آغاز روند مرگ سلول‌ها در گروه تیماری می‌باشد (شکل ۴).

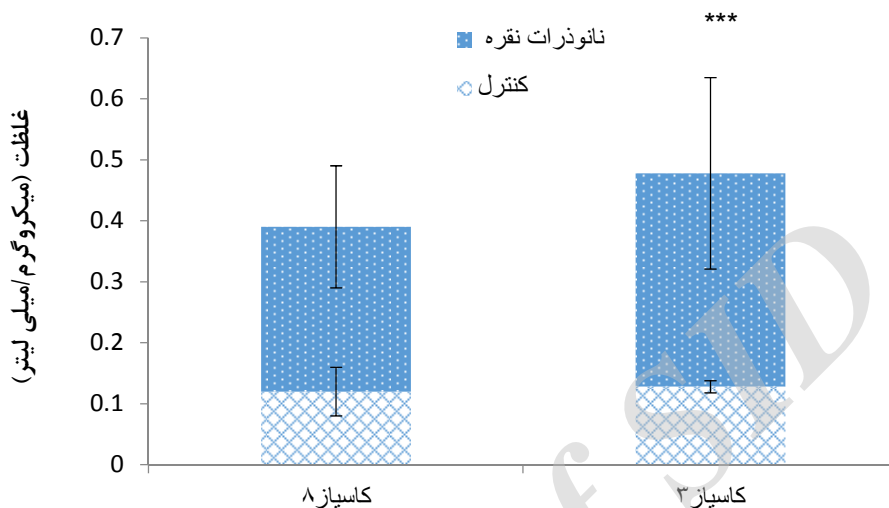
بررسی تغییرات مورفولوژی هسته با رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI سلول‌های که تحت تیمار با ۸ میکروگرم بر میلی لیتر



شکل ۴: الف) شکل حاصل از رنگ آمیزی DAPI، گروه کنترل با هسته، ب) گروه تیمار با نانو ذرات نقره که کروماتین قطعه قطعه شده در آن نمایان می‌باشد. (بزرگنمایی ×۴۰۰).

میلی لیتر نسبت به گروه تیمار نشده افزایش یافته است. بنا براین می توان گفت که نانوذرات نقره منجر به آغاز روند مرگ سلولی در سلول های A278 از مسیر وابسته به کاسپاز شده است (شکل ۵).

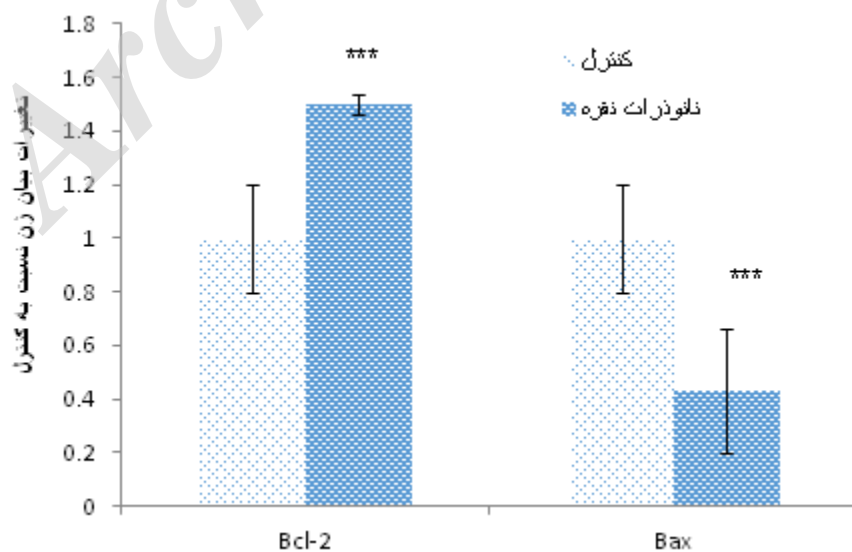
تعیین مسیر آپوپتوزیس با استفاده از کیت کاسپاز ۳ و ۹ خانواده آنزیمی کاسپاز از واسطه های اصلی آپوپتوزیس هستند و در طی روند آپوپتوزیس فعالیت آنها افزایش می یابد. نتایج بررسی فعالیت کاسپاز نشان داد که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تیمار شده با ۸ میکرو گرم بر



شکل ۵: مقایسه فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تیمار با نانو ذرات نقره و کنترل. فعالیت این آنزیم در گروه های تیماری نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشته است (Mean±S.D., $p < 0.001$ ***).

نسبت به کنترل افزایش یافته است، در حالی که بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 نسبت به کنترل کاهش یافته است (شکل ۶).

بررسی تغییرات بیان ژن های Bax و Bcl-2: در این جهت مطالعه تغییرات بیان ژن های آپوپتوزیس در سلول های تیمار و کنترل از روش PCR کمی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن پرو آپوپتوتیک Bax در گروه تیمار



شکل ۶: تغییرات بیان ژن های Bcl-2 و Bax در گروه تیمار با نانو ذرات نقره و گروه کنترل. نتایج نشان داد که بیان ژن Bax افزایش و بیان ژن Bcl-2 نسبت به کنترل به صورت معنی داری کاهش یافته است. (Mean±S.D., $p < 0.001$ ***).

بحث

استفاده از ترکیبات طبیعی برای تولید نانو ذرات رویکرد جدیدی است که توجهات زیادی را به خصوص برای تولید نانو ذرات فلزی جلب نموده است تاکنون گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از عصاره‌های گیاهی، قارچی و باکتریایی برای تولید نانو ذرات فلزی از جمله نانو ذرات نقره منتشر شده است. به عنوان مثال بهارآرا و همکاران (۱۲) از عصاره گیاه مریم گلی برای سنتز نانو ذرات نقره استفاده نمودند. هم‌چنین در مطالعه دیگری از برگ‌های زیتون برای سنتز نانو ذرات نقره استفاده نمودند (۱۳). در این پژوهش تجربی نیز، نانو ذرات نقره با استفاده از کورکومین خالص تهیه شد. کورکومین ترکیب فنولی است که توانایی احیا یون‌های نقره به نانو ذرات نقره را دارد. هم‌چنین کورکومین به عنوان عامل پوشش دهنده و پایدار کننده نانو ذرات نقره عمل نیز می‌کند. سپس اثرات نانو ذرات نقره تولید شده با روش سبز بر القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی رده A2780 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی نشان داد که این نانو ذرات می‌توانند به صورت وابسته به غلظت، منجر به کاهش زیست پذیری سلول‌ها شوند. با محاسبه IC_{50} مشخص شد که غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است. در این زمینه بهارآرا و همکاران (۶) نانو ذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه بومادران زرد تولید نمودند و سپس اثرات سمی آن بر رده سلولی سرطانی MCF-7 مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات این گروه نشان داد که نانو ذرات نقره با پوشش گیاهی قادر به مهار تکثیر سلولی سرطانی سینه به صورت وابسته به دوز بودند. IC_{50} گزارش شده توسط این گروه برابر با ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت بود که این عدد از IC_{50} (۸ میکروگرم بر میلی لیتر) گزارش شده در تحقیق حاضر بیشتر بود که می‌تواند به علت قرار گرفتن کورکومین بر سطح نانو ذرات و در نتیجه افزایش اثر گذاری نانو ذرات باشد. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، کورکومین دارای اثرات ضد سرطانی قوی می‌باشد و قرار گیری آن بر سطح نانو ذرات می‌تواند علت افزایش اثر گذاری آن‌ها قلمداد شود. این فرضیه نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. با توجه به این موضوع که آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی روند مهمی در جهت کنترل تکثیر سلول‌ها، حفظ هوموستاز طبیعی

بدن و از بین بردن سلول‌های مضر و سرطانی می‌باشد (۱۴). در مرحله بعد توانایی ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی رده A2780 توسط غلظت IC_{50} از نانوذرات نقره بررسی شد. تغییرات ظاهری هسته و ایجاد شکست در کروماتین سلول یکی از نشانه‌های بارز آغاز روند مرگ سلولی است. در این پژوهش تغییرات مورفولوژیک هسته، در سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین با رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI بررسی شد. نتایج نشان داد که در سلول‌های تیماری تغییرات هسته‌ای از جمله فشرده شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن آن نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. هم‌چنین در این مطالعه برای تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج-پروپودیوم یداید استفاده شد. نتایج نشان داد که در سلول‌ها تیمار شده با نانوذرات نقره تعداد سلول‌های آپوپتوزیس افزایش یافت. از مجموعه بررسی‌های مورفولوژی با رنگ آمیزی DAPI و اکریدین اورنج/پروپودیوم یداید می‌توان دریافت که نانو ذرات نقره با پوشش کورکومین منجر به فعال شدن روند آپوپتوزیس در سلول‌های A2780 می‌شوند (۱۵). هم‌چنین کاسپازها از واسطه‌های مهم در فرآیند آپوپتوزیس هستند. در طی فرآیند مرگ سلولی برنامه ریزی شده ابتدا در اثر محرک آپوپتوزیس کاسپاز ۳ فعال می‌شود سپس این کاسپاز با شکست‌های پروتئولیتیک منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ و ۹ می‌شود که این کاسپازها مسئول آغاز فعالیت مولکول‌های افکتور دیگر برای پیشرفت روند آپوپتوزیس هستند. در این تحقیق نشان داده شد که تیمار سلول‌های سرطانی A2780 با نانو ذرات نقره پوشش‌دار با کورکومین منجر به افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ می‌شوند. در مطالعات گذشته نیز اثرات آپوپتوزیس نانو ذرات نقره تولید شده با روش زیستی بر رده‌های سلولی مختلف بررسی شده است به عنوان مثال اثرات نانو ذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه *Albizia adianthifolia* بر سلول‌های سرطانی ریه بررسی شد. نتایج این مطالعات نشان داد که نانوذرات نقره موجب مهار تکثیر و افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی ریه می‌شود. این نانو ذرات از طریق مسیر درونی (میتوکندری) مرگ برنامه ریزی شده سلولی را آغاز می‌کنند (۱۵). هم‌چنین حکمت و همکاران (۱۶)

حالی که بیان ژن آنتی آپوپتوزیس Bcl-2 کاهش یافت. در تحقیقی مشابه نیز نشان داده شد که نانو ذرات نقره سنتز شده با روش سبز منجر به مهار ژن های Bcl-2 و افزایش بیان ژن Bax می شود (۶). این نتایج هم سو با یافته های پژوهش حاضر می باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره پوشش دار شده با کورکومین منجر به مهار تکثیر و القای آپوپتوزیس از مسیر وابسته به کاسپاز در سلول های A2780 می شود.

تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی- تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، صمیمانه سپاسگزاری می شود.

اثرات نانو ذرات نقره در القای آپوپتوزیس در رده سلول های T-47D و MCF-7 را بررسی و گزارش نمودند که نانو ذرات نقره منجر به افزایش تراکم هسته و شکست کروموزومی در هسته های سلول های تیماری می شوند. Jeyaraj و همکاران (۴) اثرات نانو ذرات نقره سنتز شده با واسطه عصاره گیاه *Podophyllum hexandrum* را بر روند آپوپتوزیس در سلول های سرطانی دهانه رحم بررسی نمودند و نتایج تحقیقات این گروه نشان داد که این نانو ذرات منجر به القای مرگ سلولی در سلول های مذکور به صورت وابسته به کاسپاز می شوند. این یافته ها با نتایج تحقیق حاضر هم سو می باشد. هم چنین در این مطالعه جهت بررسی مسیر مولکولی وابسته به مرگ سلولی تغییرات بیان ژن های آپوپتوزیس Bax و Bcl-2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن پرو آپوپتوزیس Bax در سلول های تیماری افزایش یافت. در

منابع

1. Baharara J, Hosseini N, Farzin TR. Extremely low frequency electromagnetic field sensitizes cisplatin-resistant human ovarian adenocarcinoma cells via P53 activation. *Cytotechnology*; 2015; 68(4):1403-13.
2. Castiglioni S, Caspani C, Cazzaniga A, Maier JA. Short- and long-term effects of silver nanoparticles on human microvascular endothelial cells. *World journal of biological chemistry*. 2014; 5(4): 457-64.
3. Satapathy S, Mohapatra P, Preet R, Das D, et al. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. *Nanomedicine*. 2013; 8(8): 1307-22.
4. Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanandhan G, MubarakAli D, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2013; 106: 86-92.
5. Khalil MMH, Ismail EH, El-Magdoub F. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012; 5(4): 431-7.
6. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, et al. Silver nanoparticles biosynthesized using *Achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2015; 20(2): 2693-706.
7. Medda S, Hajra A, Dey U, Bose P, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. *Applied Nanoscience [Internet]*. Springer Berlin Heidelberg; 2015; 5(7): 875-80.
8. Sathish M, Kumar M, Sneha K, Won S, et al. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 37: 332-8.
9. Reddy NJ, Nagoor Vali D, Rani M RS. Unbound MEDLINE: Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Materials science & engineering, C, Materials for biological applications*. 2014; 34:115-22.
10. Yanyan L, Zhang T. Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications. *Cancer letters [Internet]*. Elsevier Ireland Ltd; 2014; 346(2): 197-205.
11. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Hosseini N, et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Achillea biebersteinii* Flower Extract and Its Anti-Angiogenic Properties in the Rat Aortic Ring Model. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014 Jan; 19(4): 4624-34.
12. Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, et al. Anti-Angiogenesis Effect of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized Using *Salvia officinalis* on Chick Chorioalantoic Membrane (CAM). *Molecules*. 2014; 19: 13499-508.
13. Khalil MMH, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014; 7(6): 1131-9.
14. Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor- α , and NF- κ B in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer [Internet]*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002; 95(7): 1463-71.
15. Govender R, Phulukdaree A, Gengan RM, Anand K, et al. Silver nanoparticles of *Albizia adianthifolia*: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. *Journal of nanobiotechnology*. 2013; 11(1): 5-17.
16. Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The Effects of Silver Nanoparticles and Doxorubicin Combination on DNA Structure and Its Antiproliferative Effect Against T47D and MCF7 Cell Lines. *Journal of Biomedical Nanotechnology [Internet]*. American Scientific Publishers; 2012; 8(6): 968-82.

Anti-cancerous effects of silver nanoparticles coated with curcumin on A2780 ovarian cancerous cells

Ramezani T, Ph.D. Student.^{1*}, Nabiuni M¹, Ph.D.², Baharar J, Ph.D.³, Parivar K, Ph.D.², Namvar F, Ph.D.⁴

1. Ph.D. Student in Animal Developmental Biology, Department of Animal Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Developmental Biology, Department of Animal Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

3. Developmental Biology, Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad, Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

4. Master in Animal Developmental Biology, , Department of Animal Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: tayeberamezani@gmail.com

ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 28 Jun. 2016

Accepted: 5 Mar. 2017

Abstract

Aim: In this study, the effects of curcumin-coated silver nanoparticles were examined on induction of apoptosis in ovarian cancer A2780 cell.

Material and Methods: Silver nanoparticles coated with curcumin were biosynthesized, then A2780 cells were treated with different concentration of silver nanoparticles. Cytotoxicity effects of silver nanoparticles in A2780 cells were assessed by MTT assay and apoptotic effects of these nanoparticles were examined using DAPI and acridine orange/ propidium iodide staining and caspase 3/9 activation assay. Changes in Bax and Bcl-2 gene expression were analyzed by Real Time PCR.

Results: Findings showed that silver nanoparticles inhibit A2780 cells proliferation in a dose dependent manner. 8 µg/ml 50% decreased cell viability at 24 hours, DAPI and, acridine orange propidium iodide staining represent that percentage of apoptotic cells in the treated groups was increased. The results of Real Time PCR showed that Bax gene expression in cells treated with silver nanoparticles increased, while Bcl-2 gene expression in the treated cells was decreased.

Conclusion: Silver nanoparticles coated with curcumin induce apoptosis in A2780 cancer cells. The use of the nanoparticles should be considered a promising strategy for the treatment of ovarian cancer.

Key Words: Silver Nanoparticles, Cancer, Apoptosis, Curcumin