

ارزیابی بیان ژن MMP9 و اثر نانو ذرات نقره بر روی رده سلولی HT29 سرطان کولون

بهاره حسنی درخشنده M.Sc.، سید عطاءاله سادات شانديز Ph.D.*، مریم عباسی Ph.D.

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۵

چکیده

هدف: نانوذرات نقره یکی از مهم‌ترین نانو مواد تجاری محسوب می‌شود. از سوی دیگر سرطان یکی از چالش‌های بزرگ و پیچیده‌ای است که بشر با آن دست و پنجه نرم می‌کند و راه‌های رسیدن برای جلوگیری یا درمان آن بسیار مهم و ضروری است. بر این اساس در این مطالعه به بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره سنتز شده به‌روش زیستی بر روی سرطان کولون (HT29) و ارزیابی بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره انجام گرفت و با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخصه‌یابی شد. اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره بروی رده سلولی سرطانی کولون HT29 با روش رنگ‌سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، در این مطالعه با استفاده از روش real time PCR به ارزیابی میزان بیان ژن MMP9 پرداخته شد. **نتایج:** نتایج مشخصه‌یابی TEM نشان داد که نانوذرات اغلب شکل کروی داشته و میانگین اندازه آن‌ها ۲۲ نانومتر می‌باشند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره اثر کشندگی وابسته به‌دوز و زمان داشته و میزان بقای سلول‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهند ($p < 0/001$). همچنین بین اختلاف غلظت‌ها رابطه معنی‌داری دیده شد. بیان ژن MMP9 در سلول‌های سرطانی HT29 تیمار شده با نانوذرات نقره به‌میزان $0/00 \pm 0/4897$ ($p < 0/001$) نسبت به نمونه شاهد کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده به‌روش سبز می‌تواند راه‌کار امیدوارکننده‌ای در درمان سرطان روده بزرگ مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، متالوپروتئیناز ۹، سرطان کولون، HT29، سمیت

مقدمه

دانش نانوفناوری در قرن حاضر علم و زندگی روزمره انسان را تحت تاثیر قرار داده است (۲۰۱). این دانش شاخه‌های مختلف زیست فناوری و علوم زیستی، پزشکی، شیمی، فیزیک، الکترونیک و علم مواد را شامل می‌شود و به دلیل شکستن محدودیت‌ها و قابلیت استفاده از نانوذرات در کاربردهای صنعتی، پزشکی و الکترونیک مانند کاتالیزور و درمان سرطان توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۳). به طوری که یکی از جنبه‌های مهم در نانوفناوری سنتز نانومواد با اندازه، ویژگی‌های شیمیایی و ابعاد قابل کنترل در زیست شناسی است. در چند سال اخیر، تحقیقات بر روی سنتز نانوذرات با واسطه‌ی گیاهان (سنتز سبز)، به سبب مزیت‌های بیشتر این روش نسبت به روش‌های دیگر بیولوژیکی، در حال پیشرفت می‌باشد. از مهم‌ترین مزایای سنتز سبز نانوذرات نسبت به روش‌های بیولوژیکی، عدم نیاز به فرآیند پرزحمت و هزینه‌ی نگهداری کشت‌های سلولی و قابلیت استفاده‌ی این روش در مقیاس بزرگ و صنعتی می‌باشد. به علاوه گزارش شده که نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی، توسط لایه نازکی از مواد آلی داخل عصاره احاطه شده و بنابراین پایداری و ثبات این مواد تا ۴ هفته بعد از سنتز حفظ می‌شود. در حالی که این زمان در روش‌های شیمیایی بسیار کوتاه بوده و نانوذرات پس از مدتی دوباره دور هم تجمع یافته و دیگر خواص ویژه خود را ندارند (۴). در بین انواع مختلف نانوذرات، نانوذرات نقره از فواید گسترده‌ای در زمینه‌های نانوفناوری، زیست نانوفناوری و پزشکی برخوردارند. نانوذرات نقره دارای کاربردهای بالقوه‌ای در عرصه‌ی علوم پایه زندگی بشر به ویژه در پزشکی، شیمی مواد غذایی، علم پزشکی قانونی، کشاورزی و لوازم آرایشی است (۵). در این میان، مطالعات بیانگر آن است که نانوذرات نقره اثرات بیشتری در برابر باکتری‌ها و ویروس‌ها از خود نشان می‌دهند (۶).

سرطان بیماری بسیار پیچیده‌ای است که اغلب با به هم خوردن و از تنظیم خارج شدن تنظیمات هومئوستاتیک داخل و بین سلولی شروع می‌شود. در مراحل پیشرفته سرطان و متاستاز آن، بر هم خوردن مسیرهای مولکولی، هضم ترکیبات ماتریکس سلولی و بر هم کنش سلول مهاجم با بافت هدف برای جایگزینی آن و متاستاز به بافت جدید لازم است (۷). روش‌های درمانی فعلی برای سرطان عبارتند از شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی می‌باشد. با این حال، این روش‌ها، ویژگی خاصی در مورد سرطان ندارند. بسیاری از محققین متوجه شده‌اند که ترکیبی از دو یا سه روش درمان اغلب نتایج درمانی موثر و بهتری نسبت به یک روش واحد تنها دارد. این در حالی است که در بیشتر موارد سلول‌های سالم نیز دچار مرگ می‌شوند و می‌تواند عوارض جانبی در بیمار به همراه داشته باشد. بنابراین نیاز به جستجو در شیوه‌های نوین درمانی برای کنترل سرطان ضروری می‌باشد. پیشرفت سرطان به طور بسیار شدیدی بقای بیمار را به خطر می‌اندازد و راهکارهای درمانی را با شکست مواجه می‌کند. برای تهاجم سلول‌های سرطانی، سلول‌های اپیتلیال باید به داخل بافت پایه نفوذ کنند و سد بستره خارج سلولی را از بین ببرند. در این مرحله، آنزیم‌های پروتئاز دارای نقش بسیار مهمی دارند که با هضم بستره خارج سلولی و ترکیبات آن باعث تسهیل متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر می‌شوند (۷). تاکنون، به خوبی روشن شده است که سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های سالم میزان پروتئاز بیش تری تولید می‌کنند و ارتباط مثبت بین میزان تهاجم سلول‌ها و سطح پروتئاز آن‌ها هم در مدل‌های تومور آزمایشگاهی و هم در تومورهای بالینی انسانی به اثبات رسیده است (۸). نقش کلی پروتئازها و به خصوص ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) در متاستاز و تهاجم سلول‌های توموری کاملاً اثبات شده و مشخص شده که این آنزیم‌ها با تسهیل شکستن اتصالات بافت پیوندی و هضم ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به این فرآیند کمک می‌کنند (۹). ماتریکس

میتوکندریایی پرداخته شد. برای این منظور رده‌ی سلولی HT29 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 مکمل شده با ۱۰ درصد سرم FBS کشت داده شدند. سلول‌های HT29 برای مطالعات *in vitro* در مورد سرطان کولون سودمند می‌باشد، زیرا این رده سلولی چندین مشخصه‌ی اپی‌تلیوم پستانداران را داراست. علاوه بر این، در هنگام رشد در شرایط *in vitro* این رده سلولی توانایی تشکیل توده و رشد به صورت لایه‌ای را دارا می‌باشد. سپس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت ۵ درصد CO₂ در فلاسک کشت سلولی نگهداری شدند. سلول‌ها از فلاسک جمع‌آوری شدند و پس از افزودن محیط کشت، سوسپانسیون سلولی به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی و میزان ۱۰ هزار سلول منتقل شد و در شرایط کشت انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تخلیه شد و نانوذرات نقره با غلظت‌های ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. گروه شاهد در این تست، چاهک‌های حاوی سلول‌های تیمار نشده در نظر گرفته شد. پس از پایان انکوباسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT (نمک تترازولیوم) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تاریکی به هر چاهک افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. سپس به هر چاهک، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید Dimethyl Sulfoxide (DMSO) اضافه شد. جذب نوری نمونه‌ها با کمک دستگاه قرائت گر ایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. نتایج برحسب درصد سلول‌های زنده تیمار شده نسبت به تیمار نشده، از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های تیمار نشده} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده با نانوذرات}) = \text{درصد سلول‌های زنده}$
Real time PCR: به منظور انجام *real time PCR*، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام گرفت. استخراج RNA های کل سلول از کیت (Transgen Biotech

متالوپروتئینازها، خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشا پایه ایفای نقش می‌کنند و از این لحاظ در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت هستند. از بین این گروه -MMP9 تنها عضو این خانواده است که به‌خاطر دارا بودن ساختار سه تائی فیبرونکتین قادر به اتصال و هضم کلاژن به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب غشای پایه است و از این نظر تغییرات بیانی این ژن می‌تواند در سرطانی شدن سلول‌ها و متاستاز سلول‌ها نقش مهمی داشته باشد (۱۰). بر این اساس در این مطالعه به بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره سنتز شده به‌روش زیستی بر روی سرطان کولون (HT29) و ارزیابی بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات نقره: در این مطالعه تجربی سنتز نانو ذرات نقره از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره طبق روش کار مقاله‌ای که قبلاً گزارش شده بود (۱۱)، انجام گرفت. به‌منظور بیوسنتز نانو ذرات نقره، با افزودن ۶ میلی‌لیتر از حجم عصاره آبی برگ گیاه اکالیپتوس به ۱۰۰ میلی‌لیتر نیترات نقره (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار تحت شرایط همزدن و دمای آزمایشگاه در مدت زمان یک ساعت از زمان واکنش انجام گرفت. بیوسنتز نانوذرات نقره با تغییر رنگ واکنش مشاهده شد. به‌منظور شستشو و خالص‌سازی نانوذرات، مخلوط حاصل سه بار با آب مقطر در ۱۳۰۰۰ rpm دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به‌منظور 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 شدن، تصویر آن با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تهیه شد.

روش MTT: در روش MTT به‌بررسی زنده ماندن یا عدم زنده ماندن سلول‌ها در چرخه‌ی تنفسی

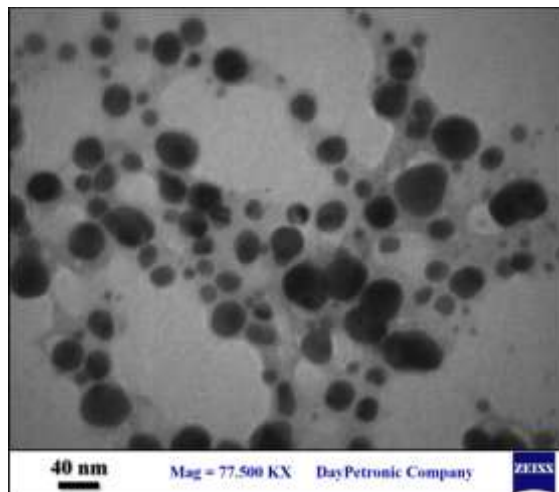
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct T - \Delta Ct C \quad RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

در این فرمول $\Delta Ct T$ اختلاف بین سیکل‌های آستانه ژن هدف و شاهد داخلی در نمونه مورد آزمون و Ct $\Delta control$ نیز اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن هدف و شاهد داخلی در نمونه کنترل می‌باشد. این روش کارایی پرایمرها را کامل در نظر گرفته، به این صورت که میزان محصول در تمام سیکل‌ها دو برابر می‌باشد.

روش توصیف و تجزیه تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد و جهت تعیین اختلاف معنی‌داری بین میانگین تیمارهای به کار گرفته شده از تجزیه واریانس (ANOVA) و بر اساس $p < 0.05$ محاسبه شد.

نتایج

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه در شکل ۱ نشان داده شده است.



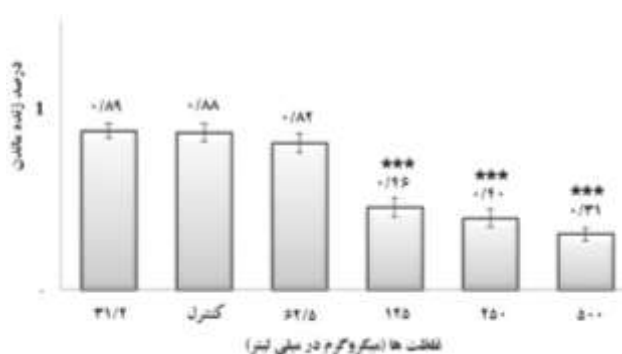
شکل ۱: تصویر میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات نقره استفاده شده در این مطالعه

با توجه به نتایج میکروگراف الکترونی نانوذرات نقره مشخص شد که میانگین اندازه آن‌ها ۲۲ نانومتر بوده و غالباً به شکل کروی دیده می‌شوند. بررسی میزان بقا سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که نانوذرات

(ER101-01) استفاده شد و تمامی مراحل طبق دستورالعمل کیت انجام شد. جهت سنتز cDNA نیز از کیت (Transgen Biotech AE301-02) استفاده شد و تمام مراحل طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. برای این منظور، ۱ میکروگرم از RNA به میکروتیوب عاری از RNase وارد نموده و ۱ میکرولیتر آنزیم DNaseI و ۱ میکرولیتر بافر این آنزیم به آن اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت جهت غیر فعال کردن آنزیم DNaseI، ۱ میکرولیتر از محلول EDTA 50 mM به آن افزوده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، تکنیک real time PCR با روش SYBR Green و با استفاده از کیت شرکت تاکارا (PrimeScript™ RT Reagent Kit با کمک دستگاه ABI ساخت کشور آمریکا انجام شد. واکنش Real Time PCR با هدف به دست آوردن سیکل آستانه (چرخه‌ای که در آن، سیگنال فلوروسنت دریافتی، از سیگنال زمینه بیشتر شود) و میزان تغییرات بیان ژن‌ها انجام گرفت. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش شامل ۱ میکرولیتر cDNA (۵۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر پرایمر (۲۰۰ نانومولار)، مسترمیکس سایبرگرین ۱۰ میکرولیتر و آب دیونیزه ۷ میکرولیتر بود. برنامه دمایی - زمانی دستگاه به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (داناتوراسیون موجود در چرخه)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (جهت اتصال پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت ساخت رشته انتهایی انجام گرفت. واکنش real time PCR را برای هر نمونه سه بار تکرار انجام گرفت. علاوه بر این، گروه کنترل منفی تست (NTC) آماده شد که در آن تمام مواد به غیر از الگو (cDNA) افزوده شد. در مرحله بعد آنالیز نتایج Real Time PCR با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ طبق فرمول‌های زیر صورت گرفت:

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

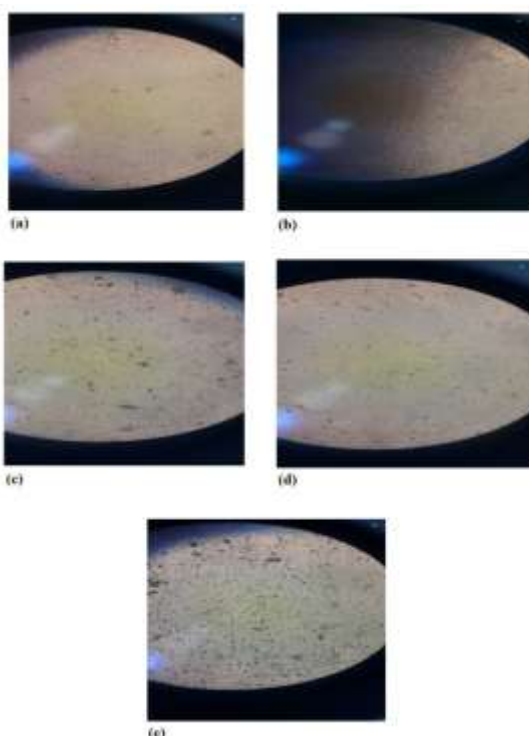
نقره ، تکثیر سلول های HT29 را به صورت وابسته به دوز و زمان در ۲۴ ساعت کاهش می دهند (شکل ۲).



شکل ۲: درصد بقای سلول های HT29 در برابر غلظت های مختلف نانوذرات نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت; نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های شاهد گزارش شده است (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$; $n=3$). (غلظت ها بر حسب میکروگرم در میلی لیتر می باشند)

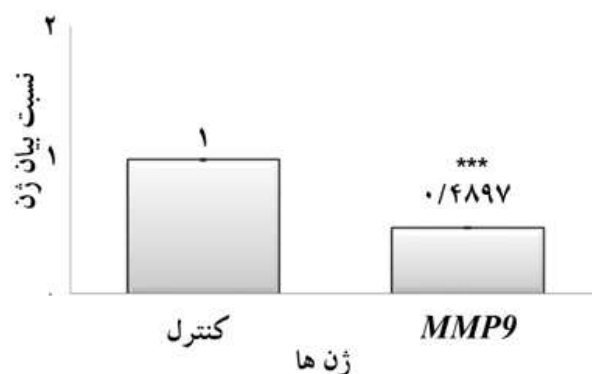
ریخت شناسی سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف نانوذرات نقره نیز انجام گرفت. همان طور که در شکل ۳ مشخص است، در غلظت های بالاتر، سلول ها یکپارچگی غشایی آن ها از بین رفته و به سمت واکوئله شدن پیش رفته اند که از نشانه های مرگ سلولی می باشد.

به طوری که بیشترین مهار تکثیر در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده که از لحاظ آماری معنی دار بود ($p < 0.001$). این در حالی بود که غلظت ۳۱/۲ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداده و از نظر آماری معنی دار نبوده است. تغییرات



شکل ۳: تغییرات ریخت شناسی سلول های سرطان کولون HT29 در پلیت های گروه کنترل (a) غلظت های ۶۲/۵ (b)، ۱۲۵ (c) ۲۵۰ (d) و ۵۰۰ (e) میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شده با نانوذرات نقره. همان طور که مشخص است، در غلظت های بالاتر، سلول ها یکپارچگی غشایی آن ها از بین رفته و به سمت واکوئله شدن پیش رفته اند که از نشانه های مرگ سلولی می باشد.

به میزان $0/۸۴۹۷ \pm 0/۰۰۶$ کاهش یافت که نشان دهنده تاثیر مثبت این نانوذرات در کاهش بیان ژن MMP9 می باشد (شکل ۴).



شکل ۴: میزان بیان ژن MMP9 نسبت به گروه کنترل: نسبت بیان ژن MMP9 به ژن مرجع GAPDH در رده سلولی سرطان روده بزرگ تیمار شده به میزان ۰/۴۸۹۷ کاهش طی ۲۴ ساعت مشاهده شد.

بحث

عصاره های گیاهان مختلف جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شده و اثرات زیستی آن ها مورد بررسی قرار گرفته است. خاتمی و همکارانش (۱۶) اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره هسته خرما روی سلول های سرطانی رده ۷-MCF به طور معنی داری انجام می گیرد. در این مطالعه تحلیلی غلظت نانوذرات نقره افزایش و میزان ماندگاری سلولی به طور معنی داری کاهش یافته بود که سمیت وابسته به غلظت را در رده سلولی مورد مطالعه نشان دادند.

ماتا و همکاران (۱۷) اثرات ضد سرطانی عصاره ی برگ گیاه *Abutilon indicum* را در رده سلولی سرطان روده بزرگ انسان (COLO 205) و نرمال کلیه (MDCK) مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج پژوهش آن ها نشان داد که نانوذرات نقره علاوه بر مهار وابسته به غلظت، منجر به تغییرات مورفولوژی مانند تغییرات در غشای سلول ها و تراکم کروماتین ها شده که این تغییرات باعث القای مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس) در این رده ی سرطانی می شود.

تغییر در بیان ژن MMP9 در سلول های HT29 تیمار شده با نانوذرات نقره با استفاده از روش real Time PCR بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن MMP9 به ژن مرجع در رده سلولی تیمار شده

امروزه مرکز توجه مطالعات سرطان بررسی عوامل سرطان با ضریب بالاتر و قابلیت پذیرش بیشتر برای بیماران می باشد. در این میان نانوذرات دارویی چشم انداز درمانی گسترده ای با کاهش سمیت از خود نشان داده اند (۱۲ و ۱۳). توسعه نانوذرات نقره به عنوان عامل ضد سرطان و ضد میکروبی در کانون توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در سال های اخیر راه کاری ساده، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان مطرح شده است. به نظر می رسد که مولکول های زیستی موجود در عصاره های گیاهی مانند فنل، فلاونوئیدها و تریپونوئید نقش موثری در احیای یون های نقره به شکل نانوذرات نقره بازی می کنند (۱۴ و ۱۵). به منظور سنتز نانوذرات فلزی، احیاکننده های مختلف شیمیایی در حلال های متفاوت طی پژوهش های اخیر گزارش شده است. کاربرد ترکیبات دارای منشا گیاهی کانون توجه فراوانی در سال های اخیر بوده است. تاکنون از

مایعات بدن است، اندازه‌گیری میزان ماتریکس متالوپروتئینازها در خون و ادرار، ابزاری مناسب برای بررسی تغییرات اتفاق افتاده در بافت‌ها شناخته شده است و کیت‌های تجاری زیادی مانند کیت‌های الیزا برای بررسی اختصاصی میزان این آنزیم‌ها در خون و ادرار تهیه شده است. در بین اعضای این خانواده، MMP-9 تنها عضو است که قابلیت هضم ژلاتین را که یکی از مهم‌ترین ترکیبات بافت غشای پایه است، دارد و تاکنون به‌عنوان یک مارکر سرطانی امید بخش برای بررسی وضعیت بیماران و پیشگیری از چندین سرطان شناخته شده است (۲۴). افزایش میزان این آنزیم در پلاسما یا سرم بیماران در بسیاری از سرطان‌ها از جمله: سرطان‌های پستان، روده، ریه، سر و گردن و معده گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد اثر کشندگی نانوذرات نقره بر روی سلول‌ها بستگی به غلظت و زمان دارد. همچنین، ارزیابی بیان ژن MMP9 با انجام تست real time PCR در سطح mRNA نشان داد که نانوذرات نقره منجر به کاهش معنادار در میزان بیان این ژن می‌شوند. بنابراین، استفاده از این نانوذرات می‌تواند در مهار متاستاز سرطان روده بزرگ مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه نویسنده اول است. بدین وسیله از شرکت دانش بنیان جاوید بیوتک و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Senapati S, Syed A, Moez S, Kumar A, et al. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. *Mat Let*. 2012; 79: 116-118.

در تحقیق حاضر، اثرات نانوذرات نقره سنتز شده به‌روش زیستی بر روی تکثیر سلول سرطانی روده (HT29) با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلول‌ها بستگی به‌زمان و غلظت نانوذرات دارد. همچنین، در مطالعه حاضر تصویر به‌دست آمده از میکروسکوپ TEM اندازه ذرات را در محدوده ۱ تا ۲۵ نانومتر گزارش داد. طیف میکروسکوپ الکترونی عبوری که حاکی از سنتز نانوذرات، با تحقیقات ویلیامز و کارتر (۱۸) مبنی بر اثبات سنتز نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مطابقت دارد.

امروزه جستجوی مارکرها برای ردیابی و پیگیری وضعیت درمان در افراد سرطانی، برای دانشمندان به‌عنوان یک هدف مطرح است. در مطالعات گذشته مشخص شده است که یکی از این نشانگرهای قابل توجه، MMP9 می‌باشد که در بیماران سرطانی افزایش می‌یابد. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی بیان ژن MMP9 با تیمار نانوذرات نقره سنتز شده به‌روش سبز انجام نگرفته است. اگر چه سودمندی MMP-9 به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی در این بیماران به‌اثبات رسیده است، ولی در چندین پژوهش که میزان این آنزیم را در سرم و پلاسمای خون بیماران اندازه گرفته‌اند، نتایج غیرهمسانی گزارش شده بود (۱۹). همچنین، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام شد، ارتباط معنی‌داری بین MMP های 2 و 9 با Basal cell carcinoma مشاهده شده بود. همچنین مطالعاتی به رابطه‌ی بین این دو MMP و بدخیمی‌های حنجره و تخمدان نیز اشاره نموده‌اند (۲۰-۲۲) در مطالعات گذشته، ترشح بیش از حد متالوپروتئینازهای مخاطی در بیماری التهابی روده مشخص شده است. براساس مطالعه Baugh و همکاران (۲۳) افزایش ترشح ماتریکس پروتئیناز ۱، ۲، ۳ به‌طور واضح در مخاط ملتهب بیماران مبتلا به کولیت نسبت به نواحی سالم مشاهده شده است. از آنجایی که تغییرات بافت‌ها بیشتر بازتاب تغییرات آنزیمی

2. Prasad TN, Kambala VSR, Naidu R. Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation. *J. Applied phycol.* 2013; 25(1): 177-182.
3. Cai F, Li J, Sun J, Ji Y. Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chem. Engin J.* 2011; 75(1): 70-75.
4. Song JY, Jang HK, Kim BS. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process. Biochem.* 2009; 44(10): 1133-1138.
5. Vanaja M, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanosci.* 2013; 3(3): 217-223.
6. Rekha A, Arya V. Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus *Aspergillus terreus* and its antibacterial activity. *Int J Nanomater Biostruc.* 2013; 2: 35-39.
7. Crowe DL, Tsang KJ, Shemirani B. Jun N-Terminal Kinase 1 Mediates Transcriptional Induction of Matrix Metalloproteinase 9 Expression. *Neoplasia.* 2001; 3(1): 27-32.
8. Gruss C, Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr. Opin. in Oncology.* 2001; 13(2): 117-123.
9. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3): 161-174.
10. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Res.* 2003; 92(8): 827-839.
11. Shandiz SAS, Shafiee Ardestani M, Shahbazzadeh D, Assadi A, et al. Novel imatinib-loaded silver nanoparticles for enhanced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017; 45(6):1082-1091.
12. Abbai R, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, et al. Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen: Siberian ginseng. *Int J Nanomed.* 2016; 11: 3131-3143.
13. Wan G, Ruan L, Yin Y, Yang T, et al. Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. *Int J Nanomed.* 2016; 11: 3789-3800.
14. Devi J, Bhimba B. Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* In vitro. *Sci Rep.* 2012; 1(4): 242.
15. Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *Int J Nanomed.* 2016; 11: 1835-1846.
16. Khatami M, Kharazi S, Kishani Farahani Z, Azizi H, et al. The anti-cancer effect of octagon and spherical silver nanoparticles on MCF-7 breast cancer cell line. *Tehran Univ Med J.* 2017; 75(1):72-76.
17. Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloid Surface B.* 2015; 128: 276-86.
18. Williams DB, Carter CB. X-ray Spectrometry. *Transmission Electron Microscopy.* 2009; 581-603.
19. Kirman I, Jain S, Cekic V, Belizon A, et al. Altered Plasma matrix metalloproteinase-9/tissue metalloproteinase metalloproteinase 1 concentration during the early postoperative period in patients with colorectal cancer. *Surg Endosc.* 2006; 20(3): 482-486.
20. Emara M, Cheung PY, Grabowski K, Sawicki G, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and-9 and conventional tumor markers (CEA and CA 19-9) in patients with colorectal and gastric cancers. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(8): 993-1000.

21. Ławicki S, Zajkowska M, Głazewska EK, Będkowska GE. et al. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2016; 9: 911-919.
22. Yulius S, Asroel HA, Aboet A, Zaluchu FJBMJ. Correlation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and bone destruction in Chronic Suppurative Otitis Media (CSOM) patients with cholesteatoma at Adam Malik General Hospital Medan-Indonesia. *Bali Med J.* 2018; 7: 195-200.
23. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1999; 117(4): 814-822.
24. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues: clinical and experimental applications. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 878: 212-227.

Evaluation of metalloproteinase matrix MMP9 gene expression and effect of silver nanoparticles toward Colon cancer cell line (HT29)

Hassani Derakhshandeh B, M.Sc, Sadat Shandiz SA, Ph.D*, Abbasi M Ph.D

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

* Email corresponding author: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Received: 16 Dec. 2018

Accepted: 13 Jan. 2019

Abstract

Aim: In this study, the toxicity effect of silver nanoparticles on colon cancer (HT29) was measured and evaluate the expression of the matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) genes.

Material and methods: In this study, the synthesized AgNPs were characterized by the transmission electron microscopy (TEM) analysis. The cytotoxicity effect of silver nanoparticles against the HT29 cell lines was investigated using MTT assay. Also, *MMP9* gene expression was measured using real time PCR technique.

Results: The TEM result showed that the fabricated AgNPs were mostly spherical in shape and having an average diameter of 22 nm. The results revealed that AgNPs significantly decreased the viability of cells in dose-and time dependent manner ($P < 0.001$). Also, there was a significant relationship between the differences in concentrations. *MMP9* gene expression levels in HT29 cells were decreased to 0.4897 ± 0.00679 ($P < 0.001$) compared with the control group.

Conclusion: According to the results, the green fabricated AgNPs can be considered as a promising strategy for the treatment of colon cancer.

Keywords: Silver nanoparticles, Matrix metalloproteinase 9, Colon Cancer, HT29, Toxicity