

Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 cell line

Khorasani N¹, Baharara J^{2*}, Iranbakhsh AR³, Ramezani T⁴

1- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

2- Research Center for Animal Development Applied Biology and Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

Received June 20, 2015; Accepted October 19, 2015

Abstract:

Background: Silver nanoparticles (AgNPs) have antibacterial, anti-angiogenesis and anti-cancer activity. The purpose of this study was to examine the apoptotic effects of AgNPs coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 liver cancer cells.

Materials and Methods: HepG2 cancer cell lines were treated with different concentrations of AgNPs for 24 and 48 hours. The viability of the cells and inhibitory concentration (IC₅₀) were determined by the methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. To evaluate the ability of AgNPs to induce apoptosis in HepG2 cells, the 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), acridine orange-propidium iodide staining and flow cytometry analysis for annexin V- propidium iodide were used.

Results: The results of the MTT assay showed that AgNPs decreased the proliferation of HepG2 cells in dose- and time-dependent manner. The IC₅₀ during the incubation times of 24 and 48 hours were determined 40 and 30 µg/mL, respectively ($P < 0.05$). The results of DAPI staining showed that AgNPs can lead to break down of nuclear DNA. Moreover, the acridine orange-propidium iodide staining and annexin V-propidium iodide showed that the percentage of apoptotic cells was increased in the treated cells.

Conclusion: Silver nanoparticles covered with *Z. multiflora* leaf extract have the ability to induce apoptosis in cancer cells HepG2 and they can be considered as a promising strategy for the treatment of liver cancer.

Keywords: Silver nanoparticles, Cancer, Apoptosis, *Zataria multiflora*

* Corresponding Author.

Email: baharara78@gmail.com

Tel: 0098 513 843 7092

Fax: 0098 513 843 7092

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2016; Vol. 19, No 6, Pages 457-467

Please cite this article as: Khorasani N, Baharara J, Iranbakhsh AR, Ramezani T. Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 cell line. Feyz 2016; 19(6): 457-67.

بررسی اثرات آپوتوتیک نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با عصاره برگ آویشن شیرازی بر رده سلولی HepG2

نگار خراسانی^۱، جواد بهارآرا^{۲*}، علیرضا ایرانبخش^۳، طیبه رمضان^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: نانوذرات نقره (AgNPs) دارای فعالیت ضد باکتری، ضد رگ‌زایی و ضد سرطان می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آپوتوتیک AgNPs با پوشش عصاره برگ آویشن شیرازی بر سلول‌های سرطانی کبد، رده HepG2، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطانی رده HepG2 با غلظت‌های مختلف AgNPs در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان زیست‌پذیری سلول‌ها و غلظت مهاری (IC_{50}) با آزمون MTT محاسبه شد. جهت بررسی القای آپپتوز در سلول‌های HepG2 از روش‌های رنگ‌آمیزی DAPI، اکریدن اورنج-پروپیدیوم یداید و آنالیز فلوسایتومتری انکسین ۵-پروپیدیوم یداید استفاده شد.

نتایج: یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد AgNPs به‌صورت وابسته به غلظت و زمان باعث کاهش تکثیر سلول‌های HepG2 می‌شود. IC_{50} در طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۴۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد ($P < 0.05$). نتایج رنگ-آمیزی DAPI نشان داد AgNPs می‌تواند منجر به شکسته شدن DNA هسته‌ای شود. هم‌چنین، رنگ‌آمیزی اکریدن اورنج-پروپیدیوم یداید و آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یداید نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپپتوتیک در سلول‌های تحت تیمار بود.

نتیجه‌گیری: AgNPs پوشش داده شده با عصاره برگ آویشن شیرازی توانایی القای آپپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 را دارد. استفاده از AgNPs می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی امیدوارکننده در درمان سرطان کبد مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، سرطان، آپپتوز، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۴، صفحات ۴۶۷-۴۵۷

مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است؛ در سال ۲۰۰۸ بیش از ۷/۶ میلیون نفر در سراسر جهان به‌علت ابتلا به سرطان فوت کرده‌اند. هم‌چنین، بروز سرطان به‌دلیل رشد جمعیت جهان و عوامل سرطان‌زا به‌طور مداوم در حال افزایش است [۱، ۲]. سرطان رشد کنترل نشده سلول‌ها با توانایی حمله، متاستاز و گسترش به سلول‌های اطراف می‌باشد [۲].

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است؛ در سال ۲۰۰۸ بیش از ۷/۶ میلیون نفر در سراسر جهان به‌علت ابتلا به سرطان فوت کرده‌اند. هم‌چنین، بروز سرطان به‌دلیل رشد جمعیت جهان و عوامل سرطان‌زا به‌طور مداوم در حال افزایش است [۱، ۲]. سرطان رشد کنترل نشده سلول‌ها با توانایی حمله، متاستاز و گسترش به سلول‌های اطراف می‌باشد [۲].

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است؛ در سال ۲۰۰۸ بیش از ۷/۶ میلیون نفر در سراسر جهان به‌علت ابتلا به سرطان فوت کرده‌اند. هم‌چنین، بروز سرطان به‌دلیل رشد جمعیت جهان و عوامل سرطان‌زا به‌طور مداوم در حال افزایش است [۱، ۲]. سرطان رشد کنترل نشده سلول‌ها با توانایی حمله، متاستاز و گسترش به سلول‌های اطراف می‌باشد [۲].

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
^۳ استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۴ دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

*نشانی نویسنده مسئول:

مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری

تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲ | دهنویس: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲

پست الکترونیک: baharara78@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳۰ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۲۷

نقره کمک کند [۱۷]. تاکنون بسیاری از انواع گیاهان، برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده‌اند، مانند: گیاه مرزنجوش (*Origanum Vulgare*)، گاردنیا (*Gardenia jasminoides*)، عصاره میوه درخت جمبو با نام علمی (*Syzygium cumini*)، پلکترانتوس آمبوینیکاس (*Plectranthus amboinicus*)، گیاه ویتکس (*Vitex negundo*)، و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) [۱۹، ۱۸]. آویشن از جمله گیاهان دارویی است که بر مبنای اطلاعات حاصل از طب سنتی، اثرات درمانی گوناگونی را به آن نسبت می‌دهند. این اثرات شامل خواص ضد التهابی، ضد عفونی کننده، ضد سرفه، ضد اسپاسم، و خلط آور می‌باشند [۲۰]. آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) گیاه بومی ایران و افغانستان و از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. خانواده نعناعیان بیشترین پراکندگی را در جهان دارند و تاکنون حدود ۵۰۰۰ گونه از آن معرفی شده است [۲۱]. نعناعیان انواع ترکیب‌های ترپنوئیدی و معطر را تولید می‌کنند و این ترکیبات را به‌طور عمده در غدد اپیدرمی، برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند. ترکیبات اصلی تشکیل دهنده بخش‌های هوایی این گیاه شامل پاراسمین، گاماترپین، کارواکرول و تیمول است. ترکیب عمده موجود در آویشن تیمول می‌باشد؛ این ترکیبات دارای گروه‌های عاملی فعال می‌باشند که می‌توانند در بیوسنتز نانوذرات نقش مهمی داشته باشند [۲۲]. Mata و همکاران اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی برگ گیاه *Abutilon indicum* را در رده سلولی سرطانی COLO 205 (سرطان روده بزرگ انسان) در شرایط برون‌تنی بررسی کرده و مشاهده کردند که نانوذرات نقره به‌صورت وابسته به غلظت باعث مهار رشد سلول-های سرطانی رده COLO 205 می‌شوند. هم‌چنین، بیان کردند که در هسته سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره تغییرات موفولوژیکی مانند تراکم کروماتین‌ها و تغییرات در غشای سلول‌ها دیده می‌شود که این تغییرات در انتها منجر به القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود [۲۳]. Zheng و همکاران به بررسی مکانیسم و نقش نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در روند رشد سلول‌های سرطانی رده HepG2 در شرایط برون‌تنی پرداخته و دریافتند که هر دوی این نانوذرات باعث کاهش سلول‌های سرطانی رده HepG2 به‌صورت وابسته به غلظت می‌شوند، اما نانوذرات نقره دارای اثر مهاری قوی‌تری می‌باشند [۲۴]. Ortega و همکاران نیز به بررسی فعالیت ضد توموری نانوذرات نقره سنتز شده توسط مخمر در رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و T-47D و همین‌طور سلول‌های نرمال پستان رده MCF10-A پرداختند. نتایج بررسی سمیت سلولی و آزمون MTT در هر دو رده سلولی

۱۰ تا ۲۰ سال آینده دو برابر شود [۷]. سرطان کبد در بین مردان پنجمین و در بین زنان هفتمین سرطان شایع می‌باشد [۸]. چون این نوع سرطان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود، درمان‌های موجود برای بیماران مبتلا بسیار محدود است [۹]. ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر، نانوذرات نامیده می‌شوند. ویژگی نانوذرات در واکنش پذیری بیشتر آنها در مقایسه با ذرات دارای اندازه‌های بزرگتر است؛ هم‌چنین، نانوذرات از نظر شیمیایی و فیزیکی خصوصیات منحصر به‌فردی دارند که منجر به خواص مغناطیسی، الکتریکی، نوری و مکانیکی پیشرفته آن‌ها در مقایسه با مواد با اندازه بزرگتر می‌شود [۱۰، ۱۱]. تحقیقات در زمینه نانوفناوری به دلیل خواص منحصر به‌فردشان به‌سرعت در حال رشد می‌باشد و استفاده از آن‌ها در طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی در علوم مختلف مانند علوم زیستی، شیمیایی و صنعتی رو به گسترش می‌باشد [۱۲]. نقش نانوذرات برای استفاده در تشخیص، درمان سرطان و نیز طراحی سیستم‌های دارورسانی پیشرفته رو به افزایش است [۱۳]. نانوذرات می‌توانند یک جایگزین بالقوه برای درمان بیماری‌ها باشند [۱۴]. از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین این مواد، نانوذرات نقره می‌باشند [۱۱]. در حال حاضر اعتقاد بر این است که نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان یک عامل درمانی، علاوه بر استفاده در مبارزه با باکتری‌ها و اثر روی بهبود زخم، برای مبارزه با ایدز، ویروس‌ها و به‌خصوص سرطان نیز به‌کار برده شوند [۱۵]. اخیراً، استفاده از نانوذرات نقره به‌عنوان یک عامل ضد سرطان امیدوار کننده مورد توجه قرار گرفته است [۱]. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند باعث ایجاد آپوپتوز از طریق آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی شوند، هم‌چنین، اثرات ضد توموری، ضد تکثیری و اثرات ضد رگ‌زایی آنها در شرایط آزمایشگاهی نیز بررسی شده است [۱۶]. نانوذرات را می‌توان با روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی به‌دست آورد، اما در بین این روش‌ها سنتز نانوذرات با روش‌های زیستی به‌علت سازگاری با محیط زیست و نیز جنبه‌های اقتصادی آن، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. برای تولید نانوذرات به‌روش زیستی می‌توان از گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمر، باکتری‌ها و ویروس‌ها استفاده کرد [۲]. در میان منابع مختلف طبیعی، گیاهان و فرآورده‌های گیاهی بسیاری در دسترس هستند و می‌توان به راحتی از آن‌ها برای تسهیل در سنتز نانوذرات استفاده کرد، عصاره آبی برگ گیاهان شامل آلکالوئیدها، تانن، استروئیدها، فنل، ساپونین و فلاونوئیدها می‌باشد و بر اساس این ترکیبات موجود در عصاره انتظار داریم که پروتئین، پلی‌ساکارید و یا متابولیت‌های ثانویه حاصل از عصاره برگ بتواند به کاهش یون نقره به شکل نانوذرات

به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس، عصاره گیاهی با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

سنتز نانوذرات نقره

برای سنتز نانوذرات نقره نمک نترات نقره (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت ۵ میلی‌مولار با ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره مخلوط شد. تغییر رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره نشان دهنده تولید و سنتز نانوذرات بود. این فرآیند در pH=۷ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

روش‌های شناسایی نانوذرات نقره

تغییرات رنگ نمونه‌ها به صورت عینی ملاحظه گردید و طیف جذبی نمونه‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (Biotech EPOCH, US) در دامنه‌ای بین ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (CM-120, Philips) شکل و ابعاد نانوذرات سنتز شده شناسائی شد. و از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز (Fourier Transform Infrared: FT-IR) برای بررسی پوشش سطحی نانوذرات نقره استفاده گردید. به‌علاوه، از روش تفرق دینامیک نور (Dynamic Light Scattering: DLS) برای تعیین اندازه نانوذرات سنتز شده استفاده شد.

روش MTT جهت تعیین میزان بقا و تکثیر سلولی

MTT یکی از نمک‌های ترازولوم به رنگ زرد محلول در آب است که به‌وسیله دهیدروژنازهای موجود در میتوکندری-های فعال سلولی احیا می‌شود و سپس به شکل کریستال‌های فورمازان و غیرمحلول در آب، در سلول‌های زنده رسوب می‌نماید؛ این کریستال‌ها به رنگ بنفش هستند و میزان رنگ بنفش آن متناسب با فعالیت سلولی و تعداد سلول‌های زنده می‌باشد [۲۷]. برای انجام این آزمون، ابتدا در حدود 5×10^4 عدد سلول (بعد از شمارش توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو) در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس، با غلظت‌های ۶۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی گیاه آویشن شیرازی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از طی زمان‌های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck, Germany) اضافه شد. در نهایت پس از

سرطانی که تحت تیمار با نانوذرات نقره قرار داشتند نشان دهنده کاهش وابسته به غلظت در تعداد سلول‌ها بود، اما نانوذرات نقره اثر قابل توجهی در مهار رشد سلول‌های نرمال نداشتند که این مورد می‌توان به‌خاطر فعالیت درون سلولی بالاتر در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال باشد [۲۵]. Vasanth همکاران به بررسی فعالیت ضد سرطانی و توانایی القاء آپوپتوز نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره پوست ساقه گیاه *Moringa oleifera* بر روی سلول‌های سرطان گردن رحم انسان (Hela) پرداختند و مشاهده نمودند که درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش دارد [۲۶]. باتوجه به کاستی‌هایی که در درمان سرطان کبد وجود دارد، نرخ رشد سریع این نوع سرطان و عدم تشخیص به موقع که سبب محدود شدن روش‌های درمانی می‌شود و وجود شواهدی مبنی بر دارا بودن خاصیت ضد سرطانی، ضد تکثیر و آپوپتوزی نانوذرات نقره و از آنجایی که تاکنون اثر نانوذرات نقره پوشش شده با گیاه آویشن شیرازی بر رده سلولی HepG2 مورد بررسی قرار نگرفته است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آپوپتوتیکی و ضد تکثیری نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی بر سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سلول‌های رده HepG2

رده سلولی HepG2 از انستیتو پاستور ایران، تهران تهیه شد و در محیط کشت کامل، شامل محیط کشت DMEM (Bio Idea, Iran) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, USA) و نیز یک درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین-پنی‌سیلین (Gibco, USA)؛ درون فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی، کشت داده شد و در انکوباتور CO₂ دار (۵٪ CO₂، رطوبت ۹۵ درصد، و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

تهیه عصاره گیاهی

گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در هربا-ریوم دانشگاه فردوسی مشهد (با کد هرباریومی ۳۵۳۱۴) شناسایی شد. برای تهیه عصاره گیاهی، جهت سنتز نانوذرات نقره نمونه‌های گیاهی، با آب مقطر شست‌وشو داده شدند و به مدت یک هفته در دمای محیط خشک شده و سپس پودر شدند. برای تهیه عصاره‌های آبی مقدار ۵ گرم از پودر گیاهی توزین شده، پس از حل کردن در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، بر روی هات پلیت قرار داده شد و

فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون انکسین ۵- پروپیدیوم یداید جهت سنجش آپوتوز یکی از بیومارکرهای فرآیند آپوتوز، نفوذ فسفاتیدیل سرین از غشای داخلی به غشای خارجی پلاسمای می‌باشد [۳۳]. زمانی که فسفاتیدیل سرین در سطح سلول قرار گیرد، می‌تواند به وسیله رنگ آمیزی فلورسنت که با انکسین ۵ متصل می‌شود ردیابی گردد. لازم به ذکر است که از انکسین ۵ برای تشخیص فسفاتیدیل سرین موجود در غشای خارجی سلول استفاده می‌شود، درحالی که از ترکیب انکسین ۵- پروپیدیوم یداید برای تمایز بین سلول‌های آپوتوتیک و نکروتیک استفاده می‌شود. جهت انجام این آزمون از کیت انکسین ۵- پروپیدیوم یداید (Abcam, Germany) استفاده شد؛ بدین صورت که ابتدا رده سلولی HepG2 در پلیت ۶ خانه کشت داده شد. بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت سلول‌ها با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر (غلظت IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و به درون اپندروف منتقل شدند و سپس سانتریفوژ (RPM ۲۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. با حذف کردن محیط رویی، به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه شد و سپس ۵ میکرولیتر انکسین ۵ و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به هر نمونه اضافه گردید. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و با دستگاه فلوسیتومتر (BD, USA) بررسی شدند.

روش آماری

داده‌های کمی توسط نرم‌افزار SPSS و به کمک آزمون-های آماری ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

تولید نانوذرات در حدود ۴۰ دقیقه بعد از مخلوط کردن محلول نیترات نقره با عصاره آبی برگ گیاه شروع شد و بعد از گذشت ۴ ساعت فرآیند سنتز نانوذرات نقره کامل شد. این فرآیند در pH=۷ انجام شد. دمای مناسب برای سنتز نانوذرات نقره ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج مشاهدات عینی نشان دهنده تغییر رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به سمت قهوه‌ای تیره بود که نشانه‌ای برای سنتز نانوذرات می‌باشد. نتایج UV-VIS حاصل از واکنش کاهش یون‌های نقره در محلول نشان داد که نانوذرات نقره سنتز

گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری پلیت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Epoch, BioTek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد [۲۸]. هم‌چنین، غلظت مهاری (IC_{50}) نیز تعیین شد. جهت حصول نتیجه بهتر و اطمینان از صحت نتایج به دست آمده، هر کدام از آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

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

در صد سلول‌های زنده

رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI

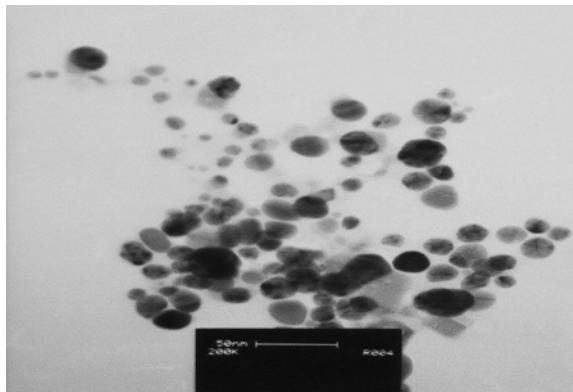
DAPI یک رنگ فلورسنت است که با قدرت به نواحی غنی از آدنین-تیمین در DNA متصل می‌شود [۲۹]. به وسیله این رنگ می‌توان سلول‌ها را از نظر مورفولوژی بررسی کرد. برای بررسی تأثیر نانوذرات نقره پوشش داده شده با گیاه آویشن شیرازی بر روی رده سلولی HepG2 سلول‌ها بعد از کشت بر روی لام‌های کوت شده با کلاژن در یک پلیت ۶ خانه با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره تیمار شدند. سپس، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این زمان، سلول‌ها با پارافرم آلدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند و در نهایت سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI قرار داده شدند و سپس تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Biomed, Korea) بررسی گردید [۳۰].

رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یداید

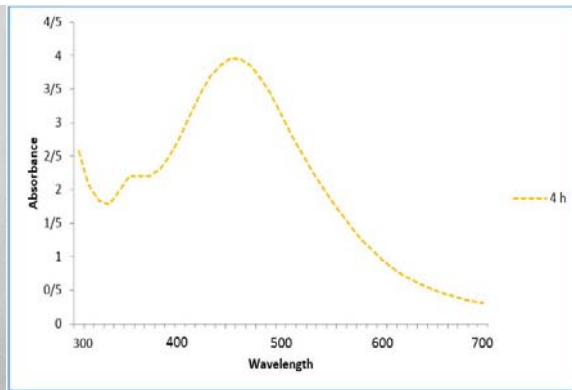
این روش به منظور بررسی تغییرات هسته سلول‌ها صورت می‌گیرد. در این روش هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز می‌باشد، درحالی که هسته سلول‌های آپوتوتیک اولیه به رنگ زرد تا نارنجی کم‌رنگ، هسته سلول‌هایی که دچار آپوتوز ثانویه شده‌اند به رنگ نارنجی تیره و هسته سلول‌هایی که دچار نکروز شده‌اند به رنگ قرمز تبدیل می‌شود [۳۲، ۳۱]. بنابراین از این روش به منظور تعیین نوع مرگ سلولی استفاده می‌شود. برای انجام این تست ابتدا سلول‌ها در یک پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و سپس با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره پوشش شده با گیاه آویشن شیرازی تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، سلول‌ها با تریسین جدا شدند و رنگ‌های اکریدین اورنج (Sigma, France) و پرو-پیدیوم یداید (Sigma, France) با نسبت مساوی (۱۰ میکرو-لیتر) به سوپانسیون سلولی اضافه گردید و با میکروسکوپ

ذرات نقره الگویی مشابه با طیف حاصل از عصاره گیاهی دارد که این امر نشان می‌دهد عصاره گیاهی به‌خوبی سطح نانوذرات را پوشش داده است. همچنین، نتایج روش تفرق دینامیک نور (DLS) نشان داد که نانوذرات نقره دارای اندازه‌هایی از حدود ۱۶ تا ۷۰ نانومتر با اندازه متوسط ۳۰ نانومتر هستند (شکل شماره ۱).

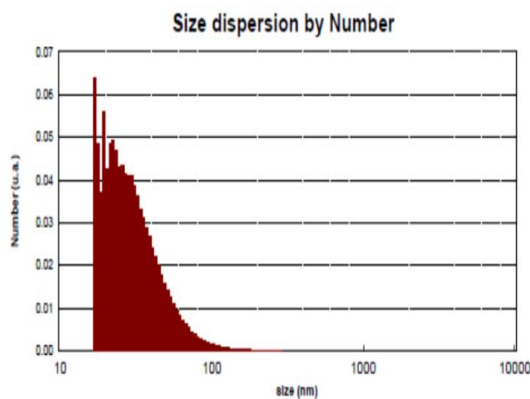
شده دارای یک حداکثر جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر می‌باشند. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM نیز نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی آویشن شیرازی اشکال مختلفی از جمله کروی و پنج وجهی دارند، اما اکثر ذرات سنتز شده به پنج وجهی شباهت داشتند. مطالعات طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) نشان داد که پوشش سطحی نانو



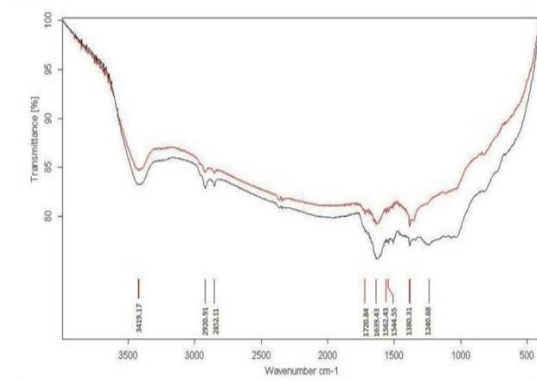
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل شماره ۱- نتایج سنتز نانوذرات نقره. الف- نتایج طیف سنجی نور مرئی-فرابنفش بعد از گذشت ۴ ساعت، ب- عکس میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه آویشن شیرازی، ج- نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز؛ طیف مربوط به نانوذرات نقره با رنگ سیاه و طیف مربوط به عصاره آویشن با رنگ قهوه‌ای مشخص شده است، د- نتایج DLS: نحوه توزیع اندازه ذرات نانوذرات نقره سنتز شده

سرطانی رده HepG2، توسط نانوذرات نقره نشان داد (نمودار شماره ۱).

رنگ‌آمیزی DAPI جهت بررسی آپوپتوز

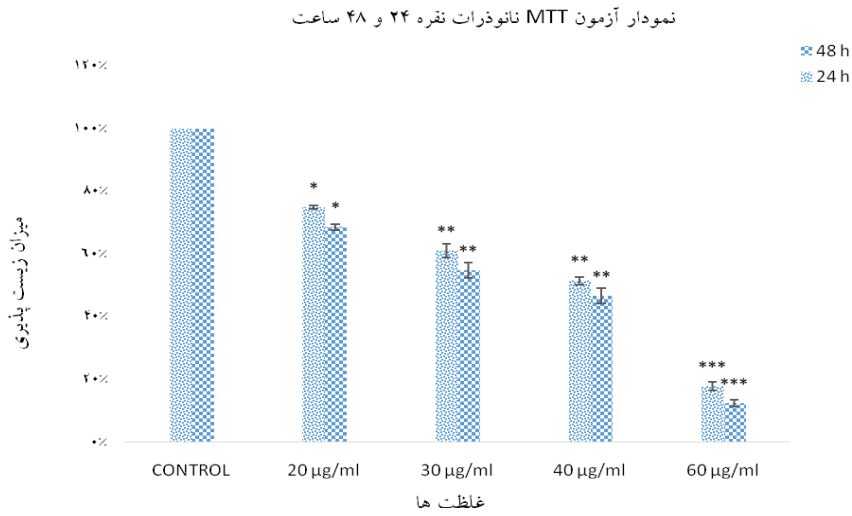
نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که در سلول‌های HepG2 پس از تیمار با نانوذرات نقره پوشش داده شده توسط عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هسته‌ها قطعه قطعه شده‌اند. شکل هسته‌ها از حالت نرمال (چند وجهی) خارج شده و گرد شدند که بیان‌گر وقوع آپوپتوزیس در این سلول‌ها بود. همچنین،

بررسی میزان سمیت سلولی با آزمون MTT

به‌منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی رده سلولی HepG2 از روش رنگ-سنجی MTT استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون MTT به‌صورت میزان بقای سلولی و IC_{50} گزارش گردید. با تعیین غلظت مهاری IC_{50} مشخص شد که غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است. نتایج حاصل از آزمون MTT مهار قوی به‌صورت وابسته به غلظت و زمان را در تکثیر سلول‌های

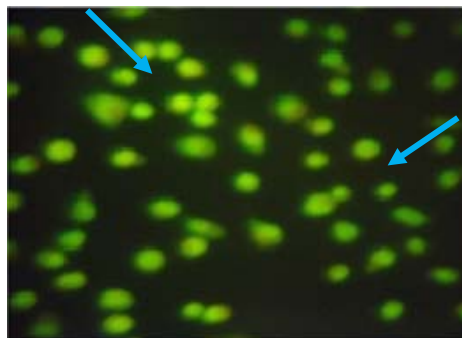
تغییرات مورفولوژیکی نشان دهنده آسیب سلولی پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار با نانوذرات نقره بود (شکل شماره ۲).

بررسی تغییرات مورفولوژیکی نشان داد که برخی از سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره فشردگی کروماتینی و هم‌چنین قطعه قطعه شدن کروماتینی قابل توجهی را دارا می‌باشند که این

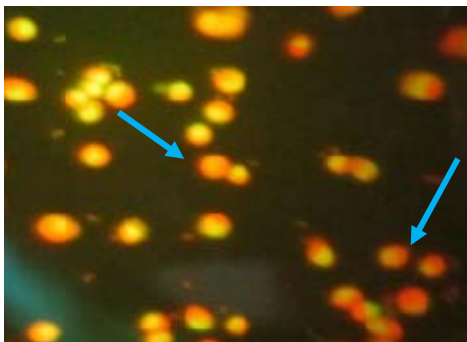


نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با گیاه آویشن در غلظت‌های مختلف ($P < 0.001$ ***) ($P < 0.01$ ***) ($P < 0.05$ *)

گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت دچار آپیتوز شده‌اند (شکل شماره ۳).



(الف)

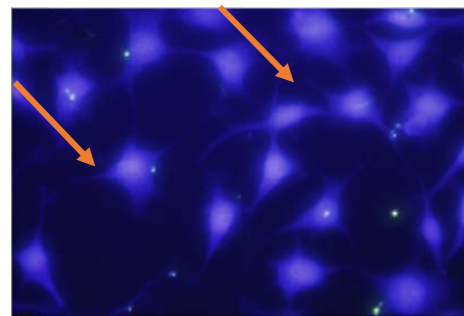


(ب)

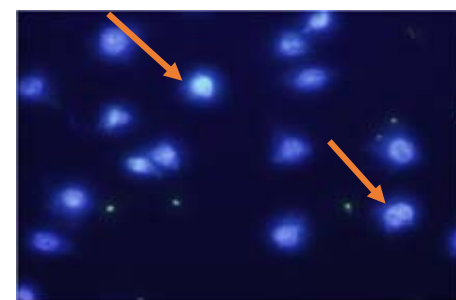
شکل شماره ۳- رنگ آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یداید

(درشت نمایی $400\times$)

الف- گروه کنترل؛ فلش‌ها سلول‌های سالم را نشان می‌دهند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ فلش‌ها القای مرگ سلولی توسط نانوذرات نقره را نشان می‌دهند.



(الف)



(ب)

شکل شماره ۲- رنگ آمیزی DAPI (درشت نمایی $400\times$)

الف- گروه کنترل؛ فلش‌ها سلول‌های سالم را نشان می‌دهند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ فلش‌ها سلول‌های قطعه قطعه شده را نشان می‌دهند.

رنگ آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یداید

بررسی نتایج حاصل از این تست نشان داد که سلول‌های HepG2 پس از تیمار با نانوذرات نقره پوشش شده توسط عصاره

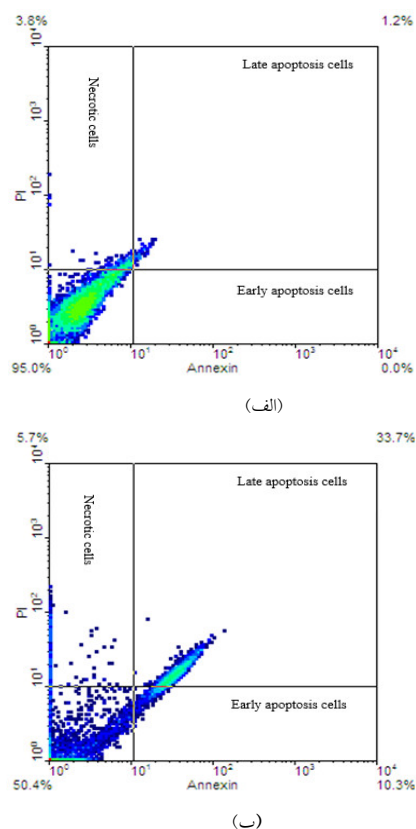
بحث

در این پژوهش تجربی نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی تولید گردید. عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی غنی از ترکیبات فنولی است که در کاهش یون‌های نقره مؤثر می‌باشد. هم‌چنین، این عصاره به‌عنوان عامل پوشش دهنده و پایدار کننده نانوذرات نقره عمل می‌کند. در نهایت اثر این نانوذرات بر میزان بقای سلول‌ها و هم‌چنین توانایی القای آپوپتوز این نانوذرات در سلول‌های سرطانی رده HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که این نانوذرات می‌توانند به‌صورت وابسته به غلظت و زمان منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها شوند. با محاسبه IC_{50} مشخص شد که غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت بررسی توانایی ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده HepG2 توسط نانوذرات نقره بود. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک مکانیسم بسیار مهم برای همه موجودات زنده پرسلولی جهت کنترل تکثیر سلول‌ها، حفظ هموستاز طبیعی بدن و نیز فرآیندی برای از بین بردن سلول‌های مضر و غیر ضروری می‌باشد. سلول‌هایی که دچار مرگ آپوپتوزی می‌شوند تغییرات مورفولوژیکی متعددی از خود نشان می‌دهند؛ از جمله: کوچک و جمع شدن سلول، انقباض سلولی، از دست دادن چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، تراکم کروماتین‌ها، از هم گسیختگی هسته و قطعه قطعه شدن هسته. به‌همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به داروها یا روش‌هایی که بتوانند مسیر سیگنالیک آپوپتوز را به سلول‌های سرطانی برگرداند و آن‌ها را از بین ببرد، شده است [۶]. در این پژوهش برای بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته به‌منظور بررسی توانایی نانوذرات نقره در القای آپوپتوز از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، توانایی القای آپوپتوز را در سلول‌های تیمار شده دارند؛ به‌نحوی که قطعه قطعه شدن هسته‌ها در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل به‌خوبی مشخص بود. هم‌چنین، در این مطالعه برای تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج-اتیدیوم پروماید استفاده شد. اکریدین اورنج تنها به سلول‌های زنده نفوذ می‌کند و هسته این سلول‌ها را به رنگ سبز در می‌آورد، درحالی‌که اتیدیوم پروماید فقط جذب سلول‌هایی که استحکام غشای خود را از دست داده باشند شده و هسته این سلول‌ها را نارنجی تا قرمز رنگ می‌-

همان‌طور که در تصاویر هم مشخص می‌باشد در گروه کنترل تمامی هسته‌ها به رنگ سبز می‌باشند که نشانه سالم و زنده بودن سلول‌ها می‌باشد، درحالی‌که در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره پوشش شده توسط عصاره گیاه آویشن شیرازی شاهد تغییر رنگ هسته سلول‌ها از رنگ سبز به سمت رنگ‌های زرد، نارنجی و نارنجی تیره هستیم که این تغییرات رنگ نشانه‌ای برای القای مرگ سلولی در سلول‌های تحت تیمار می‌باشد.

آزمون انکسین ۵- پروپیدیوم یداید

بررسی نتایج آزمون انکسین ۵- پروپیدیوم یداید نشان داد درحالی‌که درصد زنده بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۵ درصد می‌باشد، این درصد در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به ۵۰ درصد کاهش یافته است. در سلول‌های تحت تیمار در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده بودند، در حدود ۱۰ درصد سلول‌ها در حال آپوپتوز اولیه بودند و در حدود ۵ درصد سلول‌ها دچار مرگ نکروتیک شده بودند (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- نتایج آزمون Annexin V-FITC

الف- گروه کنترل؛ در حدود ۹۵ درصد سلول‌ها زنده و سالم می‌باشند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ همان‌طور که مشاهده می‌شود در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند.

Govender و همکاران اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاه *Albizia adianthifolia* را بر القای آپوتوز در سلول‌های سرطان ریه رده A549 بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده موجب کاهش زنده ماندن سلول‌ها (به- صورت وابسته به غلظت) و افزایش میزان آپوتوز از طریق مسیر درونی (میتوکندری) می‌شوند [۱]. Çiftçi و همکاران به مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپوتوزی نانوذرات نقره در رده سلولی MCF-7 پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که نانوذرات نقره بر روی زنده ماندن و بقای سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت اثر قابل توجه دارند. هم‌چنین، نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره باعث ایجاد آپوتوز و نکروز در سلول‌های مذکور می‌شوند [۳۶]. Hekmat و همکاران اثرات ضد تکثیری نانوذرات نقره را بر علیه رده‌های سلولی MCF7 و T-47D بررسی کردند. در این پژوهش برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی و نیز بررسی روند آپوتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. مشاهده هسته‌های قطعه قطعه شده نشانه‌ای برای وقوع آپوتوز در این سلول‌ها بود. هم‌چنین، برای تعیین نوع مرگ سلولی و محاسبه تعداد سلول‌های که دچار مرگ آپوتوتیک و مرگ نکروتیک شده بودند، از آزمون انکسین ۵- پروپیدیوم یداید استفاده شد. آنالیز این آزمون نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوتوتیک در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل بود [۱۵]. نتایج تمامی این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر هم‌سو می‌باشد و نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره بر روند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نیز توانایی القا آپوتوز در سلول‌ها توسط این نانوذرات می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه آزمایشگاهی نشان داد که نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی می‌توانند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی رده HepG2 را متوقف نموده و باعث القای آپوتوز در این سلول‌ها شوند. لذا، کاربرد این نانوذرات می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان کبد مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح با کد مصوب ۱۱۱۳۰۵۱۷۹۳۲۰۰۶ همکاری داشتند تشکر می‌شود.

کند. در نتیجه سلول‌های دارای هسته یکنواخت و سبز رنگ نشان دهنده سلول‌های زنده هستند، درحالی‌که سلول‌های دارای هسته- های زرد رنگ، نمایانگر آپوتوز اولیه می‌باشند و سلول‌هایی که در مرحله آپوتوز ثانویه هستند، دارای هسته قطعه قطعه شده و رنگ نارنجی تیره تا قرمز می‌باشند [۳۲،۳۱]. همان‌طور که در این پژوهش مشاهده کردیم سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات نقره به رنگ‌های زرد و نارنجی درآمده بودند که این امر نشان دهنده این است که مرگ القا شده در این سلول‌ها از نوع آپوتوزیس می‌باشد. نتایج آزمون انکسین ۵- پروپیدیوم یداید نشان دهنده توانایی القا آپوتوز توسط نانوذرات نقره در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت بود. تفسیر نمودار نشان داد درحالی‌که سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۵ درصد زنده هستند، سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره دچار آپوتوز شده و در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوتوز ثانویه شده‌اند. تمامی نتایج حاصل از این مطالعه باهم سازگاری دارد و نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره در سلول‌های سرطانی رده HepG2 می‌باشد. Faedmaleki و همکاران اثرات سمیت نانو- ذرات نقره را بر سلول‌های سرطانی رده HepG2 و سلول‌های طبیعی (سلول‌های اولیه کبد موش) بررسی کردند و دریافتند که نانوذرات نقره ۴۴ برابر بیشتر اثر مهار کنندگی بر روی رشد سلول- های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی دارد که این می‌تواند مربوط به اثرگذاری نانوذرات نقره بر روی سیستم اکسیداسیون سلول باشد و با توجه به اینکه فعالیت تنفسی میتوکندریال در سلول‌های رده سرطانی HepG2 بیشتر از سلول‌های سالم است، آنها بیان کردند که استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند یک روش بالقوه برای درمان سرطان باشد [۳۴]. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره بر روند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی رده HepG2 بود. Baharara و همکاران اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل‌های بومادران (*Achillea biebersteinii*) را در القای مرگ سلولی در سلول‌های رده MCF-7 بررسی کردند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های رده MCF-7 می‌شوند. هم‌چنین، برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که نوکلئیک اسیدهای هسته به وضوح تکه تکه شده‌اند که این امر نشانه ایجاد آپوتوز در سلول‌های رده MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره بود [۳۵]. نتایج حاصل از این پژوهش که نشان دهنده اثرات ضد تکثیری نانوذرات نقره می‌باشد، با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌سو می‌باشد.

References:

- [1] Govender R, Phulukdaree A, Gengan RM, Anand K, Chuturgoon AA. Silver nanoparticles of *Albizia adianthifolia*: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. *J Nanobiotechnology* 2013; 11(1): 1–9.
- [2] El Kassas HY, Attia AA. Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed *Pterocladia capillacea* on the HepG2 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(3): 1299–1306.
- [3] Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 1–22.
- [4] Jain M, Kasetty S, Khan S, Desai A. An Insight to Apoptosis. *J Res Pract Dent* 2014: 1–12.
- [5] 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.
- [6] 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): 2129–2144.
- [7] Lee JS. Genomic profiling of liver cancer. *Genomics Inform* 2013; 11(4): 180–5.
- [8] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893–917.
- [9] Wei Z, Doria C, Liu Y. Targeted therapies in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* 2013; 7: 87–102.
- [10] Heidary Shayesteh T, Khajavi F, Ghasemi H, Hossini Zijoud SM, Ranjbar A. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress, liver function in rat: hepatotoxic or hepatoprotective?. *Issues Biol Sci Pharmaceut Res* 2014; 2(5): 40–4.
- [11] Lee TY, Liu M, Huang L, Lue SI, Lin LC, Kwan AL, et al. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneally administration. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10(1): 1–13.
- [12] Amin M, Hameed S, Ali A, Anwar F, Shahid SA, Shakir I, et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and In Vivo and In Vitro Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis. *Bioinorg Chem Appl* 2014: 1–11.
- [13] Kennedy DC, Orts-Gil G, Lai CH, Müller L, Haase A, Luch A, et al. Carbohydrate functionalization of silver nanoparticles modulates cytotoxicity and cellular uptake. *J Nanobiotechnology* 2014; 12(1): 1–8.
- [14] Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. Toxicity study of silver nanoparticles synthesized from *Suaeda monoica* on Hep-2 cell line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(1): 35–9.
- [15] 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. *J Biomed Nanotechnol* 2012; 8(6): 968–82.
- [16] Gurunathan S, Raman J, Abd Malek SN, John PA, Vikineswary S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 4399–413.
- [17] Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett* 2014; 9(1): 1–17.
- [18] Nithya Deva Krupa A, Raghavan V. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aegle marmelos* (Bael) Fruit Extract and Its Application to Prevent Adhesion of Bacteria: A Strategy to Control Microfouling. *Bioinorg Chem Appl* 2014: 1–8.
- [19] Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Mohamad R. Anti-Angiogenesis Effect of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized Using *Saliva Officinalis* on Chick Chorioallantoic Membrane (CAM). *Molecules* 2014; 19(9): 13498–508.
- [20] Khodayar MJ, Taherzadeh E, Siahpoosh A, Mansourzadeh Z, Tabatabaei SA. Thymus *daenensis* extract and essential oils effects on morphine withdrawal signs in mice. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2014; 9(3): 1–5.
- [21] Dehkordi HS, Mobarakeh HI, Khodadadi M, Khamesipour F, Dehkordi MJ, Namjoo A. Effect of *zataria multiflora* bosis alcoholic extract on some components of complement system and serum IgM in rat. *Adv Stud Biol* 2014; 6(2): 57–66.
- [22] Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 2007; 18(7): 800–5.
- [23] Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015; 128: 276–86.
- [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(6): 569–75.
- [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 Nanomedicine* 2015; 10: 2021–31.

- [26] Vasanth K, Ilango K, MohanKumar R, Agrawal A, Dubey GP. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 117: 354-9.
- [27] Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. *PLoS One* 2012; 7(9): 1-7.
- [28] Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA. Portulaca oleracea Seed Oil Exerts Cytotoxic Effects on Human Liver Cancer (HepG2) and Human Lung Cancer (A-549) Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(8): 3383-7.
- [29] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995; 70(5): 220-33.
- [30] Biancardi A, Biver T, Secco F, Mennucci B. An investigation of the photophysical properties of minor groove bound and intercalated DAPI through quantum-mechanical and spectroscopic tools. *Phys Chem Chem Phys* 2013; 15(13): 4596-603.
- [31] Karimian H, Mohan S, Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Razavi M, Arya A, et al. Tanacetum polycephalum (L.) schultz-bip. Induces mitochondrial-mediated apoptosis and inhibits migration and invasion in MCF7 cells. *Molecules* 2014; 19(7): 9478–501.
- [32] Subramani T, Yeap SK, Ho WY, Ho CL, Omar AR, Aziz SA, et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *J Cell Mol Med* 2014; 18(2): 305–313.
- [33] Rosenbaum S, Kreft S, Etich J, Frie C, Stermann J, Grskovic I, et al. Identification of novel binding partners (annexins) for the cell death signal phosphatidylserine and definition of their recognition motif. *J Biol Chem* 2011; 286(7): 5708–16.
- [34] Faedmaleki F, H Shirazi F, Salarian AA, Ahmadi Ashtiani H, Rastegar H. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(1): 235–242.
- [35] Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. 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* 2015; 20(2): 2693–706.
- [36] Ciftci H, Türk M, Tamer U, Karahan S, Menemen Y. Silver nanoparticles: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. *Turk J Biol* 2013; 37(5): 573–81.