

## **Investigating the effect of biosynthetic nano-silver on *HDAC8* expression in lung cancer A549 cell line**

**Ranjbar T, Asghari-Moghaddam N\*, Mohammadgholi A**

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

Received: 2018/02/2 | Accepted: 2018/08/18

### **Abstract:**

**Background:** Currently nanoparticles have encouraged a broad range of investigations in cancer therapy and diagnosis. The gene *HDAC8* is responsible for repression of transcription in cells and it has been shown that its expression increases in lung cancer. The aim of this study was to determine the effect of nanoparticles synthesized by the eucalyptus extract on the expression of the *HDAC8* gene in lung cancer A549 cell line.

**Materials and Methods:** In this experimental study, green synthesis of silver nanoparticles was performed using the extract of *Eucalyptus camaldulensis*. In order to evaluate the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ), cultured A549 cells were treated by different concentrations of synthesized nanoparticles and the MTT assay was performed. Finally, the *HDAC8* expression change of cells treated with the half maximal inhibitory concentration was determined by real-time PCR.

**Results:** Results from the MTT assay revealed that the obtained nanoparticles decreased the viability of cells in concentration-dependent manner. The  $IC_{50}$  value of silver nanoparticles in 24 hours against A549 cells was 2  $\mu\text{g/ml}$ . Also, the *HDAC8* expression showed a 9-fold decrease in the treated cells.

**Conclusion:** According to the results, nano-silver particles produced by the eucalyptus extract can cause apoptosis by decreasing the *HDAC8* expression. Hence, they can be considered as an agent with promising aspects to treat lung cancer.

**Keywords:** Silver nanoparticles, Eucalyptus extract, Lung cancer, Cell line A549, *HDAC8*

### **\* Corresponding Author.**

**Email:** nas.asgharimoghaddam@iauctb.ac.ir

**Tel:** 0098 912 183 5045

**Fax:** 0098 214 460 0184

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2018; Vol. 22, No 5, Pages 442-449*

Please cite this article as: Ranjbar T, Asghari-Moghaddam N, Mohammadgholi A. Investigating the effect of biosynthetic nano-silver on *HDAC8* expression in lung cancer A549 cell line. *Feyz* 2018; 22(5): 442-9.

# بررسی اثر نانوقره تولید شده با روش سنتز زیستی بر میزان بیان ژن HDAC8 در رده سلولی سرطان ریه (A549)

طوبی رنجبر<sup>۱</sup>، نسترن اصغری مقدم<sup>۲\*</sup>، آزاده محمدقلی<sup>۲</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** امروزه نانوذرات طیف گسترده‌ای از مطالعات را برای درمان و تشخیص سرطان به خود اختصاص داده‌اند. ژن HDAC8 به عنوان مهارکننده رونویسی در سلول نقش دارد و نشان داده شده است که مقدار بیان آن در سرطان ریه افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر تاثیر نانوقره نقره سنتز شده با عصاره اکالیپتوس بر میزان بیان ژن HDAC8 در رده سلولی سرطان ریه (A549) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی سنتز سبز نانوقره نقره توسط عصاره گیاه اکالیپتوس کاملدولنسیس انجام شد. به منظور بررسی غلظت کشندگی (IC<sub>50</sub>) سلول‌های کشت داده شده A549 با غلظت‌های مختلف نانوقره نقره تیمار شدند و آزمون MTT انجام شد. در نهایت میزان تغییر بیان ژن HDAC8 در سلول‌های تحت تاثیر غلظت IC<sub>50</sub> توسط Real-time PCR اندازه‌گیری گردید. **نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد که نانوقره حاصل اثر کشندگی وابسته به دوز داشته و مقدار IC<sub>50</sub> آن در مدت زمان ۲۴ ساعت با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین، بیان ژن HDAC8 به میزان ۹ برابر در سلول‌های تیمار شده با نانوقره کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** نانوقره تولید شده با عصاره اکالیپتوس می‌تواند رده سلولی سرطان ریه (A549) را از طریق کاهش بیان HDAC8 به سمت آپوپتوز ببرد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات نقره، عصاره اکالیپتوس، سرطان ریه، رده سلولی A549، HDAC8

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۵، آذر و دی ۹۷، صفحات ۴۴۹-۴۴۲

## مقدمه

رویکرد اصلی تبدیل شده است که علت آن کم‌تر بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی و ممانعت کنندگی ترکیب‌های برخی از گیاهان دارویی بر رشد سلول‌های سرطانی است [۸،۷]. ذرات نانوقره بیشتر از سایر نانوذرات مورد علاقه دانشمندان هستند و به‌طور گسترده در تشخیص، درمان، تحویل دارو، پوشاندن تجهیزات پزشکی و برای استفاده شخصی-بهداشتی کاربرد دارند. نانوذرات نقره در دوزهای پایین برای انسان غیرسمی هستند و دلیل آن را می‌توان به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی نانوقره نسبت داد [۹]. نانوذرات نقره با روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی (سبز) ساخته می‌شوند که در روش اخیر از عصاره گیاهان برای احیای زیستی نانوذرات استفاده می‌شود [۱۰]. امروزه روش سنتز سبز با استفاده از عصاره گیاهان به دلیل کم‌هزینه بودن، غیرسمی بودن و سازگاری با محیط زیست بیشتر مورد توجه و کاربرد قرار گرفته است [۱۲،۱۱]. یکی از گیاهان مهم با خاصیت احیاکنندگی اکالیپتوس است. اکالیپتوس متعلق به خانواده میرتاسه بوده و اسانس این گیاه شامل مخلوط پیچیده‌ای از مواد آلی فرار، انواع ترکیب‌های مونوترپنی، فنول‌های آروماتیک و ترکیب‌های اتری، استری، آلدیدی و کتونی است [۱۳] و مهم‌ترین آنها ۱، ۸-سینئول یا اکالیپتول است که تا حد زیادی مسئول انواع خواص اسانس این گیاه می‌باشد [۱۴]. عصاره این گیاه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های ریوی استفاده می‌شود [۱۵]. مطالعات زیادی

امروزه سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان و در ایران است [۲،۱]. درمان‌های رایج برای سرطان دارای اثرات جانبی ناخوشایند و تهدیدکننده حیات بالایی هستند؛ از این رو دست‌یابی به دارویی با اختصاصیت بالا برای سلول‌های سرطانی، سمیت کم برای سلول‌های نرمال و نیز ارزان بودن تولید آن از اولویت‌های تحقیقات داروشناسی در جهان می‌باشد [۳]. از میان سرطان‌ها، سرطان ریه به‌عنوان عامل اصلی مرگ در مردان و دومین عامل اصلی مرگ در میان زنان شناخته می‌شود [۵،۴]. تاکنون استراتژی قابل قبولی به‌منظور جلوگیری از مقاومت به شیمی‌درمانی برای این بیماری مطرح نشده است [۶]. لذا، یافتن داروهای درمانی جدید علیه سرطان ریه یکی از اهداف اصلی مطالعات داروسازی است. در این مورد استفاده از گیاهان به یک

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۸۳۵۰۴۵ | دورنویس: ۰۲۱۴۴۶۰۰۱۸۴

پست الکترونیک: nas.asgharimoghaddam@iauctb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۵/۲۷

اکالیپتوس انجام شد. نانوذرات با افزودن ۲ میلی‌لیتر از عصاره به  $AgNO_3$  تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و هم زدن سنتز شدند. احیای کامل یون‌های نقره به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط انجام شد. پس از سپری شدن یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. تمامی مراحل شستشو با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت، شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت. محصول طی ۲ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۲۴]. بررسی ریخت‌شناسی و اندازه نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM, KYKY, Japan) انجام شد (شکل شماره ۱).

#### کشت سلول‌های رده A549

سلول‌های رده A549 با شماره NCBI131 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها براساس روشی که پیش‌تر ذکر شده بود [۲۵] رشد داده شدند. به‌طور خلاصه، سلول‌های A549 در محیط RPMI 1640 (Biosera) غنی شده با سرم جنین گاوی (v/v) ۱۰ درصد و ۱ درصد پنی‌سیلین (U/ml) ۱۰۰-استرپتومایسین ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) (Biosera) کشت داده شدند. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد  $CO_2$  برای ۲۴ ساعت گرماگذاری گردیدند (شکل شماره ۲).

#### تست ارزیابی درصد سمیت نانوذره

برای تعیین غلظت کشنده ۵۰ درصدی ( $IC_{50}$ ) نانوعصاره اکالیپتوس بر بقای رده سلولی A549 از روش ارزیابی MTT استفاده شد. برای اینکه مرگ سلولی به‌صورت کنترل شده رخ دهد، و غلظت بیش از حد ترکیبات عامل محدود کننده‌ای نباشد، از غلظت کمتر از  $IC_{50}$  ترکیبات استفاده شد. رنگ‌سنجی MTT با معرف ۳-۴ (۴ و ۵-دی متیل تیلتازول-۲-تیل)-۲ و ۵-دی فنیل ترازولیوم بروماید (MTT) (Atocel) انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد (هر میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰۰۰ سلول بود) و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس، نانوعصاره‌های رقیق شده با مقادیر ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) به سلول‌ها اضافه شده و گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. در ادامه، محتوای چاهک‌ها به‌دقت تخلیه شد و ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به چاهک‌ها اضافه گردید. این تست عملکرد آنزیم دهیدروژناز میتوکندری را در توانایی تجزیه ترازو-

تاثیر ضد تکثیری عصاره این گیاه را بر سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [۱۸-۱۶]. کاربردهای نانوذرات نقره در تشخیص و درمان سرطان از طریق سیستم تحویل دارویی و یا برای غربال‌گری است. علاوه بر آن، امروزه به‌عنوان یک مولکول با توانایی‌های بالا در نظر گرفته می‌شود که اثرات ضد سرطانی آن علیه سلول‌های سرطانی مختلفی نظیر A549 سرطان ریه، سلول‌های MCF-7 سرطان سینه و سلول‌های Hela سرطان سرویکس نشان داده شده است. با این-وجود، تاکنون مطالعات انجام شده نتوانسته‌اند مسیر دقیق بیوشیمیایی و مولکول‌های هدف نانونقره را در ایجاد سمیت سلولی پیدا کنند [۹]. در مطالعه حاضر سمیت سلولی نانوذرات نقره احیاشده به‌روش سبز با عصاره گیاهی برگ اکالیپتوس کامالد-لنسیس بر سلول‌های سرطان ریه A549 بررسی شده است. همان-طور که پیش‌تر ذکر شد، چون مسیر بیوشیمیایی اثر این نانوذره کاملاً شناسایی نشده است، ما به بررسی تاثیر نانونقره تولید شده بر بیان ژن هیستون داستیلاز ۸ ( $HDAC8$ ) پرداختیم. ژن‌های داستیلاز هیستون‌ها اهمیت زیادی در تنظیم چرخه سلولی دارند.  $HDAC8$  از هیستون داستیلازهای کلاس یک می‌باشد که در تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان ژن‌ها تاثیر داشته و مطالعات نشان داده‌اند در تعدادی از سرطان‌ها، از جمله سرطان ریه، بیان آن افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که در برخی از مقالات از آن تحت عنوان انکوژن یاد می‌شود [۱۹، ۲۰]. همین عامل سبب شده است تا یافتن مهار کننده‌های این هیستون داستیلاز خاص به‌عنوان هدفی برای درمان سرطان ریه مورد توجه قرار گیرد [۲۱]. در پژوهش حاضر برای اولین بار تاثیر نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره اکالیپتوس روی رده سلولی A549 که نمایان‌گر آدنوکارسینوما می‌باشد، بررسی شده و در ادامه بیان ژن  $HDAC8$  به‌عنوان یکی از علل اصلی ایجاد مقاومت دارویی نسبت به شیمی درمانی [۲۳، ۲۲]، در حضور غلظت  $IC_{50}$  نانونقره سنتز شده مطالعه شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه نانوذرات نقره

گیاه اکالیپتوس از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه گردید و در شرایط مساعد نگهداری شد. برای تهیه نانوعصاره هیدروالکلی اکالیپتوس، ابتدا ۲۰۰ گرم از گیاه آسیاب شده *Eucalyptus camaldulensis* را به اتانول ۹۵ درصد اضافه کرده، عصاره در دستگاه تقطیر در خلاء برای خروج کامل حلال منتقل شده و تغلیظ گردید. در این مطالعه، به منظور سنتز نانوذرات نقره زیستی با خلوص بالا از  $AgNO_3$  (Merck, Germany) و روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره توسط عصاره برگ گیاه

شد و از one way ANOVA برای پردازش داده‌ها استفاده گردید. میزان تغییرات بیان ژن *HDAC8* در نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با نانوعصاره اکالیپتوس، به نسبت بیان ژن بتا اکتین در همان نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST2009 بررسی گردید. حداقل سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

پس از تیمار نیترا نقره با عصاره اکالیپتوس کاملد- لسیس رنگ مخلوط واکنش به قهوه‌ای تغییر یافت، در صورتی که در محلول عصاره بدون نیترا نقره (شاهد) تغییر رنگی مشاهده نگردید. تغییر رنگ به‌عنوان شاخص ریخت‌شناسی برای تایید سنتز نانوذرات نقره می‌باشد که آن را به نوسانات جمعی الکترون‌های آزاد القا شده توسط برهم‌کنش با میدان الکترومغناطیسی نسبت می‌دهند. در مرحله بعد رای تعیین اندازه و ساخت نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد. برای پیدا کردن اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره اکالیپتوس بر تکثیر سلول‌های سرطانی ریه A549 و نیز تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذرات تولید شده از آزمون MTT استفاده شد. اثر سمیت سلولی در غلظت‌های متفاوت ۱ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) پس از ۲۴ ساعت تیمار گزارش گردیدند. درصد توان بقای سلول‌ها در شکل شماره ۳ گزارش شده است. مقایسه میانگین بقای سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت نانوذرات مهار قوی وابسته به غلظت را پس از ۲۴ ساعت نشان داد. مشخص شد که غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره سنتز شده می‌تواند منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌های A549 طی ۲۴ ساعت گردد. برای نمونه سلولی تحت تاثیر غلظت  $IC_{50}$  و نیز سلول‌های کشت شده بدون افزودن نانوذره (نمونه شاهد)، سنجش بیان ژن *HDAC8* به‌روش Real-Time PCR انجام شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش ۹ برابری میزان بیان ژن *HDAC8* در سلول‌های A549 تیمار شده با غلظت  $IC_{50}$  نانوذره سنتز شده است که به لحاظ آماری این کاهش مقدار معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) می‌باشد (شکل شماره ۴).

لیوم می‌سنجد [۲۶]. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون و اطمینان از حل شدن ذرات رنگ، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader (Awareness, USA) خوانده شد. هر غلظت سه بار در سه چاهک جداگانه تکرار شد و غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد شده بود، به‌عنوان  $IC_{50}$  در نظر گرفته شد. سه تکرار مستقل برای محاسبه مقدار  $IC_{50}$  استفاده گردید [۲۶].

### ارزیابی بیان ژن

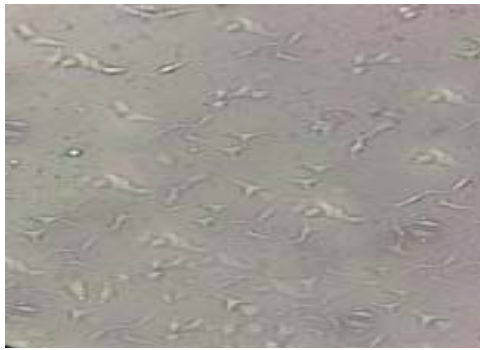
برای این منظور ابتدا RNA رده سلولی A549 کنترل و تیمار شده با نانوذره نقره در غلظت  $IC_{50}$  طبق روش ذکر شده در کیت Bioflux استخراج شد. به‌منظور بررسی کمیت RNA استخراج شده از میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر توسط نانودراپ استفاده شد و کیفیت RNA کل استخراج شده با الکتروفورز در ژل ۱/۵ درصد بررسی گردید. واکنش رونویسی معکوس برای به‌دست آوردن cDNA با دو میکروگرم RNA و با استفاده از آنزیم Revert Aid RT (Thermo Scientific) در حضور پرایمر-های هم‌گام تصادفی مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت Revert Aid First Stand cDNA (Thermo Scientific) Synthesis انجام شد. cDNA تولید شده برای انجام واکنش Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق ژن هدف ما *HDAC8* در نظر گرفته شد و از ژن بتا اکتین (*ACTB*) به‌عنوان ژن مرجع خانه‌داری استفاده شد. پرایمرها و پروب‌ها توسط برنامه AlleleID 6.0 (Premier Biosoft) طراحی شد (جدول شماره ۱). واکنش Real-Time PCR در دستگاه 96 Exicycler™ (Bioneer, South Korea) انجام گردید. واکنش در ۳۵ سیکل تکرار شد. مراحل هر سیکل به شرح زیر بود: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی برای ۳ دقیقه. واکنش برای هر نمونه انجام شد و  $C_t$  برای هر ژن گزارش گردید.

### آنالیز آماری

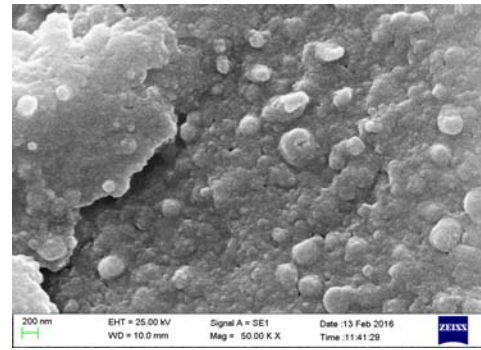
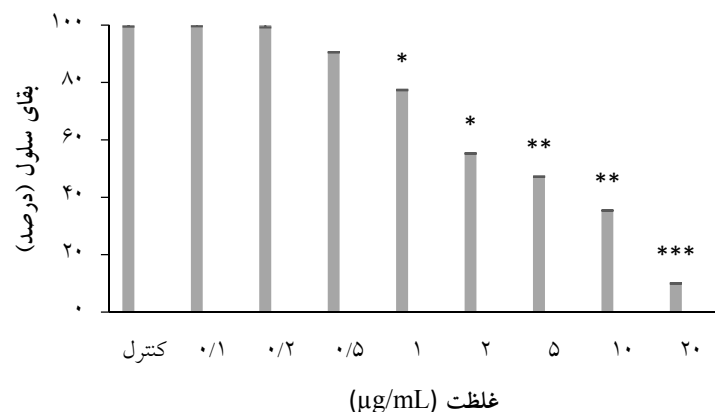
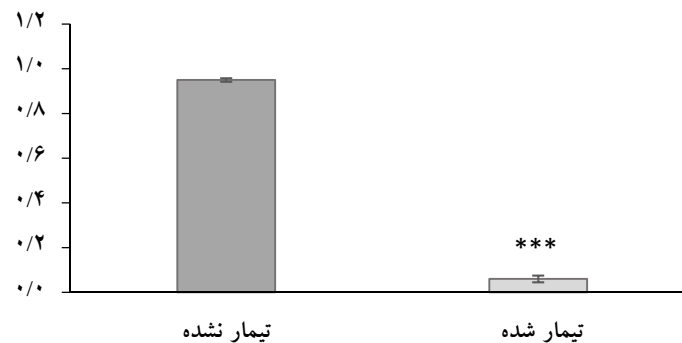
نتایج به‌دست آمده به نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ منتقل

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

| ژن             | پرایمر         | توالی                 | طول قطعه حاصل از تکثیر | دمای اتصال |
|----------------|----------------|-----------------------|------------------------|------------|
| <i>HDAC8</i>   | Forward        | GCCCGGTCATACCACG      | ۱۸۹ bp                 | ۶۰°C       |
|                | Reverse        | AACCTAGCCCATATTC      |                        |            |
| <i>B-ACTIN</i> | Forward        | TCCTCCTGAGCGCAAGTAC   | ۱۵۵ bp                 | ۶۰°C       |
|                | Reverse        | CCTGCTTGCTGATCCACATCT |                        |            |
| پروب           | <i>HDAC8</i>   | TTTGATTGAAGCATATGCAC  |                        | ۶۰°C       |
|                | <i>B-ACTIN</i> | TGGAAGGTGGACAGCGAGGC  |                        |            |



شکل شماره ۲- سلول‌های کشت شده رده سلولی A549

شکل شماره ۱- بررسی اندازه و شکل نانوذرات نقره تولید شده به-  
روش سنتز سبز با عصاره اکالیپتوسشکل شماره ۳- درصد بقای سلول‌های A549 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره احیاشده با اکالیپتوس در مدت زمان ۲۴ ساعت  
نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ; n=3).شکل شماره ۴- مقایسه بیان ژن HDAC8 در سلول‌های تیمار شده با نانوذره و تیمار نشده در سلول‌های A549.  
نتایج در سه تکرار و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. کاهش بیان حدوداً ۹ برابری در سلول‌های تیمار شده مشاهده می‌شود که با در نظر گرفتن  $P < 0.001$  معنی‌دار می‌باشد.

منحصر به فرد نانوذرات در تحویل دارو، تشخیص و تصویر برداری، توسعه ساخت واکسن‌ها و نیز طبیعت درمانی برخی از نانوذرات است [۲۸]. یکی از محبوب‌ترین نانوذرات در میان پژوهشگران این عرصه نانوذره نقره است که به دلیل فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد التهابی آن می‌باشد [۲۹]. در کنار این موضوع، مطالعات مختلف تاثیر منفی نانوذرات

## بحث

امروزه سرطان دلیل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است [۱]. تحقیقات انجام شده طی دو دهه اخیر درک ما را از زیست‌شناسی سرطان بالا برده و به تدریج یافته‌های به دست آمده برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۷]. کاربرد در حال افزایش نانوتکنولوژی در سرطان به طور گسترده‌ای مربوط به ویژگی‌های

برای نانوقره حاصل غلظت  $2 \mu\text{g/ml}$  بود. بر این اساس، نتایج به- دست آمده در تحقیق پیش رو توانسته اثر مثبت عصاره اکالیپتوس را بر افزایش میزان کشندگی نانوذرات نقره نشان دهد. مشابه این نتیجه از تاثیر نانوذره سنتز شده با عصاره اکالیپتوس علیه سلول‌های MCF-7 دیده شده است که در آن مقدار  $\text{IC}_{50}$  برابر با  $1 \mu\text{g/ml}$   $3/04$  بوده است [38]. به بیان کلی، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره اکالیپتوس برای سنتز سبز می‌تواند میزان تاثیر سمیت سلولی نانوقره را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. نشان داده شده است که بیان ژن *HDAC8* در سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک و رده سلولی A549 افزایش می‌یابد. در چند نوع سرطان مهار بیان ژن *HDAC8* با جلوگیری از پیشرفت بیماری همراه بوده و از این رو از آن به‌عنوان یک هدف دارویی یاد می‌شود [39]. امروزه تولید و یافتن مهارکننده‌هایی که از بیان هیستون داستیلازهای نوع یک که *HDAC8* نیز از اعضای آن است می‌کاهند، یکی از اهداف درمان سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک است [40]. در مطالعه حاضر میزان بیان این انکوژن در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانوعصاره اکالیپتوس معادل 9 برابر کاهش داشت. لذا، می‌توان نتیجه گرفت که نانوقره سنتز شده با عصاره اکالیپتوس تاثیر قابل ملاحظه- ای در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان در غلظت پایین دارد. این موضوع از آن جهت حائز اهمیت است که می‌تواند از سمیت ناشی از غلظت بالای نانوذرات صرف نظر کند. همین‌طور با کاهش بیان این ژن، که شاخص انکوژنی سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک است، می‌توان به نوعی اشاره نمود که این دارو می‌تواند در فرآیند اپی‌ژنتیکی پیش‌برنده سرطان تاثیر گذار باشد.

#### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت اثر سمیت سلولی نانوقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *اکالیپتوس کامالدانسیس* بر تکثیر سلول سرطانی ریه (A549) بستگی به غلظت آن دارد. همچنین، نانوقره حاصل بیان ژن *HDAC8* در رده سلولی مذکور را تا حدود 9 برابر کاهش می‌دهد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم طوبی رنجبر برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی است. بدین‌وسیله از دانشکده علوم پایه و نیز از همه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آوریم. همچنین، نویسندگان از پرسنل عزیز آزمایشگاه لیستر سپاسگزاری می‌نمایند.

نقره را بر توان زیستی و رشد سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [30]. به‌عنوان مثال، Gurunathan و همکارانش تاثیر منفی نانوذرات بر بیان ژن‌های *VEGF* و *FGF-2* که نقش مهمی در رگ‌زایی دارند را نشان داده است [31]. همین‌طور، نشان داده شده است که نانوقره رشد تومورها را مهار می‌کند [32]. برای سنتز نانوذرات نقره می‌توان از 3 روش سنتز فیزیکی، شیمیایی و زیستی (سبز) استفاده نمود. در دنیای امروز سنتز سبز بسیار مورد توجه می‌باشد که در آن برای ساخت نانوذرات نقره به‌روش سبز از گونه‌های مختلف باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان استفاده می‌گردد [33، 29]. در سنتز سبز عوامل کاهنده و پایدارکننده مواد تولید شده توسط موجودات زنده هستند و در آن از رها شدن مواد سمی و حلال‌های نامناسب در محیط زیست جلوگیری می‌شود. سنتز سبز مشابه احیای شیمیایی است، اما عوامل پایدارکننده و احیاکننده از موجودات زنده به‌دست آمده است. به‌علاوه، این روش معمولاً سریع است و اغلب تنها چند دقیقه به طول می‌انجامد [29]. در مطالعه حاضر ابتدا نانوذره نقره توسط عصاره گیاه اکالیپتوس سنتز شد. علت استفاده از گیاه اکالیپتوس در این مطالعه، وجود ترکیبات احیاکننده قوی در عصاره این گیاه و در دسترس بودن آن در نقاط مختلف جهان است. مطالعات فیتوشیمیایی اکالیپتول را مسئول عمده خواص این گیاه معرفی کرده‌اند [14، 13]. برای بررسی سمیت سلولی نانوذره نقره تولید شده از رده سلولی A549 استفاده شد. از مهم‌ترین سرطان‌هایی که انسان‌ها را تهدید می‌کند، سرطان ریه می‌باشد که عامل اصلی مرگ‌ومیر در اثر سرطان در مردان و دومین عامل در زنان است [4]. رده سلولی A549 نماینده سرطان ریه سلول‌های غیر بزرگ است. یکی از مطالعات گسترده توسط Valiahdی و همکارانش با استفاده از سلول‌های A549 انجام شده است. آنها اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی چندین ترکیب کومارینی و تریپتوئیدی موجود در گونه‌های گیاهی *Ferula* (خانواده رازیانه و انقوزه) را بر چند رده سلولی سرطانی بررسی نموده و نشان دادند استایلوژین می‌تواند رشد رده سلولی A549 سرطان ریه را به‌ترتیب در غلظت‌های کم به زیاد محدود کند [34]. تاکنون مطالعات زیادی درباره تاثیر نانوذرات نقره روی این رده سلولی انجام شده است که همگی اشاره به وابسته به دوز بودن تاثیر نانوقره بر سلول‌های A549 دارند. به‌عنوان نمونه مطالعه Chairuangkitti و همکارانش نشان داده است که در سلول‌های تیمار شده،  $\text{IC}_{50}$  در غلظت  $200 \mu\text{g/ml}$  تعیین می‌شود [35]. Wang و همکارانش نیز به همین غلظت موثر دست یافته‌اند [36]. در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که  $\text{IC}_{50}$  در غلظت  $20 \mu\text{g/ml}$  حاصل می‌شود [37]. در مطالعه حاضر میزان  $\text{IC}_{50}$

## References:

- [1] Wong MCS, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14300.
- [2] Abachizadeh K, Keramatnia A. Anticipating Cancer Rates of Iran in 2025. *Com Hea* 2016; 3(1): 66-73.
- [3] Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Stock RS. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *Int J Biomed Sci* 2009; 5(1): 1-11.
- [4] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893: 1-19.
- [5] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(5): 584-94.
- [6] Eckardt JR, Bentsion DL, Lipatov ON, Polyakov IS, Mackintosh FR, Karlin DA, et al. Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(12): 2046-51.
- [7] Kim YH, Mishima M. Second-line chemotherapy for small-Cell Lung Cancer (SCLC). *Cancer Treat Rev* 2011; 37(2): 143-50.
- [8] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15(10): 7313-52.
- [9] Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 2399-407.
- [10] Irvani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem* 2011; 13(10): 2638-50.
- [11] Kim YH, Mishima M. Second-line chemotherapy for small-Cell Lung Cancer (SCLC). *Cancer Treat Rev* 2011; 37(2): 143-50.
- [12] Das RK, Borthakur BB, Bora U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. *Mater Lett* 2010; 64(13): 1445-7.
- [13] Maciel MV, Morais SM, Bevilacqua CM, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, et al. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet Parasitol* 2010; 167(1): 1-7.
- [14] Gilles M, Zhao J, An M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem* 2010; 119(2): 731-7.
- [15] Kumari SP, Yesudas L. Anticancer activity of eucalyptus crude extract of globulus and *tinospora* Cordifolia on MCF-7 cell line. *Int J Bioassays* 2014; 3(1): 1699-707.
- [16] Bhagat M, Sharma V, Saxena AK. Antiproliferative effect of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* against human cancer cells in vitro and in vivo. *Indian J Biochem Biophys* 2012; 49(6): 451-7.
- [17] Vuong QV, Hirun S, Chuen TL, Goldsmith CD, Munro B, Bowyer MC, et al. Physicochemical, antioxidant and anti-cancer activity of a *Eucalyptus robusta* (Sm.) leaf aqueous extract. *Ind Crops Prod* 2015; 64: 167-74.
- [18] Döll-Boscardin PM, Sartoratto A, Lameiro de Noronha Sales Maia BH, Padilha de Paula J, Nakashima T, Farago PV, et al. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. *Evid Based Complement Altern Med* 2012; 2012.
- [19] Van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, Neefs J, Verhasselt P, Luyten WH, et al. Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett* 2000; 478(1-2): 77-83.
- [20] Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 2007; 17(3): 195-211.
- [21] Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6(10): a026831.
- [22] Wang L, Liu X, Ren Y, Zhang J, Chen J, Zhou W, et al. Cisplatin-enriching cancer stem cells confer multidrug resistance in non-small cell lung cancer via enhancing TRIB1/HDAC activity. *Cell Death Dis* 2017; 8(4): e2746.
- [23] Zuco V, Cassinelli G, Cossa G, Gatti L, Favini E, Tortoreto M. Targeting the invasive phenotype of cisplatin-resistant Non-Small Cell Lung Cancer cells by a novel histone deacetylase inhibitor. *Biochem Pharmacol* 2015; 94(2): 79-90.
- [24] Singh H, Du J, Yi TH, Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016; 45(7): 1310-6.
- [25] Kaplan A, Akalin Ciftci G, Kutlu HM. The apoptotic genomic studies on A549 cell line induced by silver nitrate. *Tumor Biol* 2017; 39(4): 1-12.
- [26] Mishra A, Sardar M. Alpha-amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. *Sci Adv Mater* 2012; 4(1): 143-6.
- [27] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(1): 20-37.
- [28] Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release* 2015; 200: 138-57.
- [29] Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 2399-407.
- [30] Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH.

Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2009; 30(31): 6341-50.

[31] Kalishwaralal K, Banumathi E, Ram Kumar Pandian S, Deepak V, Muniyandi J, Eom SH, et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 73(1): 51-7.

[32] Nallathamby PD, Xu XH. Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. *Nanoscale* 2010; 2(6): 942-52.

[33] Ong C, Lim JZZ, Ng CT, Li JJ, Yung LYL, Bay BH. Silver Nanoparticles in Cancer: Therapeutic Efficacy and Toxicity. *Curr Med Chem* 2013; 20(6): 772-81.

[34] Valiahdi SM, Iranshahi M, Sahebkar A. Cytotoxic activities of phytochemicals from *Ferula* species. *Daru* 2013; 21(1): 39.

[35] Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Kulthong K, et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(1): 330-8.

[36] Wang J, Che B, Zhang LW, Dong G, Luo Q, Xin L. Comparative genotoxicity of silver nanoparticles in human liver HepG2 and lung epithelial A549 cells. *J Appl Toxicol* 2017; 37(4): 495-501.

[37] Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol* 2011; 85(7): 743-50.

[38] Jannathul Firdhouse M, Lalitha P. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater* 2015; 4(2-4): 113-21.

[39] Lopez G, Bill KLJ, Bid HK, Braggio D, Constantion D, Prudner B, et al, HDAC8, A Potential Therapeutic Target for the Treatment of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST). *Plos One* 2015; 10(7): e0133302.

[40] Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Inhibition of class I histone deacetylases in non-small cell lung cancer by honokiol leads to suppression of cancer cell growth and induction of cell death in vitro and in vivo. *Epigenetics* 2013; 8(1): 54-65.