

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 μ 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 نانوونقره تولید شده با روش سنتز زیستی بر میزان بیان ژن *HDAC8* در رده سلولی سرطان ریه (A549)

۱ طوبی رنجبر ، نسترن اصغری مقدم ، ۲ آزاده محمدقلی

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 می‌باید. در مطالعه حاضر تاثیر نانوذره 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 نانوذره نقره توسط عصاره گیاه اکالیپتوس کامالدوئنسیس انجام شد. به منظور بررسی غلاظت کشندگی (IC_{50}) سلول‌های کشت داده شده A549 با غلاظت‌های مختلف نانوذره نقره تیمار شدند و آزمون MTT انجام شد. در نهایت میزان تغییر بیان ژن *HDAC8* در سلول‌های تحت تاثیر غلاظت IC_{50} توسط PCR Real-time مورد ارزیابی گردید.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که نانوذره حاصل اثر کشندگی وابسته به دوز داشته و مقدار IC_{50} آن در مدت زمان ۲۴ ساعت با غلاظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین، بیان ژن *HDAC8* به میزان ۹ برابر در سلول‌های تیمار شده با نانوذره کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نانوونقره 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 ۴۴۲-۴۴۹

رویکرد اصلی تبدیل شده است که علت آن کمتر بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی و مماثع کنندگی ترکیب‌های برخی از گیاهان دارویی بر رشد سلول‌های سرطانی است [۸,۷]. ذرات نانوونقره بیشتر از سایر نانوذرات مورد علاقه دانشمندان هستند و به طور گسترده در تشخیص، درمان، تحويل دارو، پوشاننده 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 نانوونقره 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 [۱۱,۱۲]. یکی از گیاهان مهم با خاصیت احیاکنندگی اکالیپتوس است. اکالیپتوس متعلق به خانواده میرتساhe بوده و انسان این گیاه شامل مخلوط پیچیده‌ای از مواد آلی فرار، انواع ترکیب‌های مونوتربنی، فنول‌های آروماتیک و ترکیب‌های اتری، استری، آلدهیدی و کتونی است [۱۳] و مهم‌ترین آنها، ۸- سینثول یا اکالیپتوول است که تا حد زیادی مسئول انواع خواص انسان این گیاه می‌باشد [۱۴]. عصاره این گیاه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های ریوی استفاده می‌شود [۱۵]. مطالعات زیادی

مقدمه

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]. تا- میان سرطان‌ها، سرطان ریه به عنوان عامل اصلی مرگ در مردان و دومنین عامل اصلی مرگ در میان زنان شناخته می‌شود [۵,۶]. تا- کنون استراتژی قابل قبولی به منظور 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

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نیکلائو لمیسلنده مسکویه،

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

تلفن: ۰۲۱۴۶۰۰۱۸۴

دوره‌نامه: ۹۱۲۱۸۳۵۰۴۵

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

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۵/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۳

اکالیپتوس انجام شد. نانوذرات با افزودن ۲ میلی لیتر از عصاره به AgNO₃ تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی گراد و هم زدن ستز 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 مقطع 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 سانتی گراد قرار داده شد [۲۴]. بررسی ریخت‌شناصی 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 NCBIC131 از بانک سلولی انتستیو 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 جینین گاوی (۷/۷) ۱۰ درصد و ۱ درصد پنی‌سیلین (U/ml) (۱۰۰ µg/ml) (Biosera) کشت داده شدند. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ برای ۲۴ ساعت گرم‌گذاری گردیدند (شکل شماره ۲).

تست ارزیابی درصد سمیت نانوذره

برای تعیین غلظت کشنده ۵۰ درصدی (IC₅₀) نانو عصاره اکالیپتوس بر یقای رده سلولی A549 از روش ارزیابی MTT استفاده شد. برای اینکه مرگ سلولی به صورت کنترل شده رخدده، و غلظت بیش از حد ترکیبات عامل محدود کننده‌ای نباشد، از غلظت کمتر از IC₅₀ ترکیبات استفاده شد. رنگ‌سنجدی MTT با معرف ۴-۳ و ۵-دی متیل تیلیازول-۲-ئیل)-۲ و ۵-دی فنیل ترازوژلیوم بروماید (MTT) (Atocel) انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد (هر میلی لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰۰۰ سلول بود) و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرم‌گذاری شدند. سپس، نانو عصاره‌های ریقیق شده با مقادیر ۱، ۲، ۵، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر (با غلظت ۱۰۰ نانو گرم بر میکرولیتر) به سلول‌ها اضافه شده و گرم‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. در ادامه، محتوای چاهک‌ها بدقت تخلیه شد و ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به چاهک‌ها اضافه گردید. این تست عملکرد آنژیم دهیدروژنаз میتوکندری را در توانایی تجزیه ترازو-

تاشر ضد تکثیری عصاره این گیاه را بر سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [۱۶-۱۸]. کاربردهای نانوذرات نقره در تشخیص و درمان سرطان از طریق سیستم تحويل دارویی و یا برای غربال‌گری است. علاوه بر آن، امروزه به عنوان 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 وجود، تاکتون مطالعات انجام شده توانسته‌اند مسیر دقیق بیو-شیمیابی و مولکول‌های هدف نانو نقره را در ایجاد سمیت سلولی پیدا کنند [۹]. در مطالعه حاضر سمیت سلولی نانوذرات نقره احیاشده به روش سبز با عصاره گیاهی برگ اکالیپتوس کامالد-لنسیس بر سلول‌های سرطان ریه A549 بررسی شده است. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، چون مسیر بیو-شیمیابی اثر این نانوذره کاملاً شناسایی نشده است، ما به بررسی تاثیر نانو نقره 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؛ به‌طوری که در برخی از مقالات از آن تحت عنوان انکوژن یاد می‌شود [۲۰، ۱۹]. همین عامل سبب شده است تا یافتن مهار کننده‌های این هیستون داستیلاز خاص به عنوان هدفی برای درمان سرطان ریه مورد توجه قرار گیرد [۲۱]. در پژوهش حاضر برای اولین بار تاثیر نانوذره نقره ستز شده با استفاده از عصاره اکالیپتوس روی رده سلولی A549 که نمایان گر آدنوکارسینومای ریه می‌باشد، بررسی شده و در ادامه بیان ژن HDAC8 به عنوان یکی از علل اصلی ایجاد مقاومت دارویی نسبت به شیمی درمانی [۲۳، ۲۲] در حضور غلظت IC₅₀ نانو نقره ستز 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 نانو عصاره 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 تغیلیت گردید. در این مطالعه، به منظور ستز نانوذرات نقره زیستی با خلوص بالا از AgNO₃ (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 تیمارشده و تیمار نشده با نانوعصاره اکالیپتوس، به نسبت بیان ژن بتاکتین 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 نیترات نقره با عصاره اکالیپتوس کامالد-لنسیس رنگ مخلوط واکنش به قهقهه‌ای تغییر یافت، در صورتی که در محلول عصاره بدون نیترات نقره (شاهد) تغییر رنگی مشاهده نگردید. تغییر رنگ به عنوان شاخص ریخت‌شناصی 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 MTT حداقل غلظت کشندگی نانوذرات تولید شده از آزمون 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 ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره سنتز شده می‌تواند منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌های A549 طی ۲۴ ساعت گردد. برای نمونه سلولی تحت تاثیر غلظت IC₅₀ و نیز سلول‌های کشت شده بدون افزودن Real-Time PCR انجام شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش ۹ برابری میزان IC₅₀ بیان ژن *HDAC8* در سلول‌های A549 تیمار شده با غلظت نانوذره سنتز شده است که به لحاظ آماری این کاهش مقدار معنی‌دار (P<0/001) می‌باشد (شکل شماره ۴).

لبوم 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 Awareness (Awareness, USA) میزان جدآگانه تکرار شد و 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، به عنوان IC₅₀ در نظر گرفته شد. سه تکرار مستقل برای محاسبه مقدار استفاده گردید [۲۶]. IC₅₀

ارزیابی بیان ژن

برای این منظور ابتدا RNA رده سلولی A549 کنترل و تیمار شده با نانوذره نقره در غلظت IC₅₀ 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 ۰/۱ درصد بررسی گردید. واکنش رونویسی معکوس برای به-دست آوردن cDNA با دو میکروگرم RNA و با استفاده از آنزیم Revert Aid RT (Thermo Scientific) در حضور پرایمر-های هگزامر تصادفی مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت Revert Aid First Stand cDNA (Thermo Scientific) cDNA انجام شد. تولید شده برای انجام واکنش Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق ژن *ACTB* در نظر گرفته شد و از ژن بتا اکتین (ACTB) به عنوان 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 Exicycler™ 96 (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_r برای هر ژن گزارش گردید.

آنالیز آماری

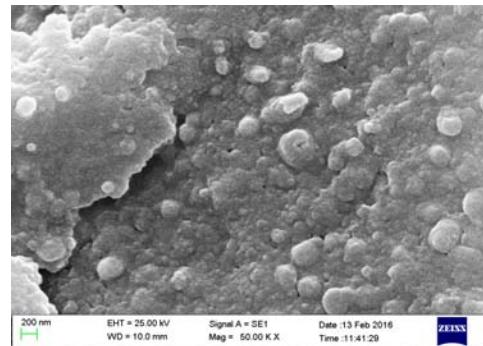
نتایج به دست آمده به نرمافزار SPSS ویرایش ۲۰ منتقل

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

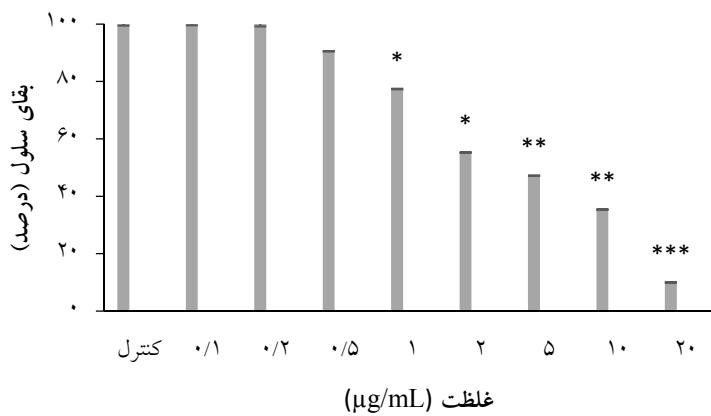
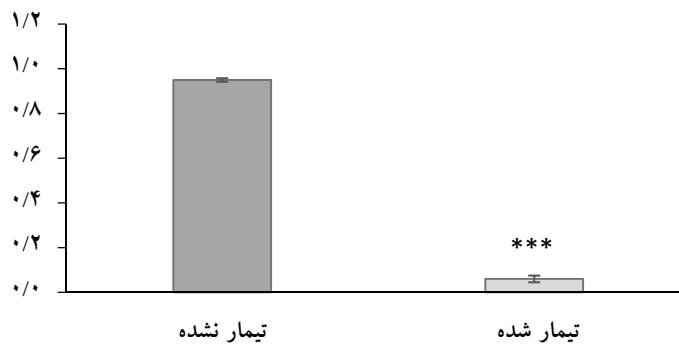
پرایمر	ژن	توالی	طول قطعه حاصل از تکثیر	دماهی اتصال
Forward	<i>HDAC8</i>	GCCCGGTCACTACCACG AACCTAGCCCATTTC	۱۸۹ bp	۰°C
Reverse	<i>B-ACTIN</i>	TCCTCCTGAGCGCAAGTAC CCTGCCTGCTGATCCACATCT	۱۵۵ bp	۰°C
<i>HDAC8</i>	<i>B-ACTIN</i>	TTTGATTGAAGCATATGCAC TGGAAGGTGGACAGCGAGGC		۰°C



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 اکالیپتوس

شکل شماره ۳- درصد بقای سلول‌های A549 در برابر غلوظت‌های مختلف نانوذره نقره احیا شده 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 رن 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 درنظر گرفتن $P < 0.001$ معنی‌دار می‌باشد.

منحصر به فرد نانوذرات در تحويل دارو، تشخيص 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 مرگ و میر 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 نانوتفرۀ حاصل غلظت $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ بود. بر این اساس، نتایج به دست آمده در تحقیق پیش رو توانسته اثر مثبت عصاره اکالیپتوس را بر افزایش میزان کشنده‌گی نانوذرات نفره نشان دهد. مشابه این نتیجه از تاثیر نانوذره ستر شده با عصاره اکالیپتوس علیه سلول‌های MCF-7 MCF-7 دیده شده است که در آن مقدار IC_{50} برابر با $3/04 \mu\text{g}/\text{ml}$ بوده است [۳۸]. به بیان کلی، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره اکالیپتوس برای ستر سبز می‌تواند میزان تاثیر سمیت سلولی نانوتفرۀ 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 این‌روز آن به عنوان یک هدف دارویی یاد می‌شود [۳۹]. 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 [۴۰]. در مطالعه حاضر میزان بیان این انکوژن در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانو عصاره اکالیپتوس معادل ۹ برابر کاهش داشت. لذا، می‌توان نتیجه گرفت که نانوتفرۀ ستر شده با عصاره اکالیپتوس تاثیر قابل ملاحظه‌ای 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 تاثیرگذار باشد.

نتیجه گیری

در مجموع می‌توان گفت اثر سمیت سلولی نانوتفرۀ ستر شده با استفاده از عصاره گیاه اکالیپتوس کامال‌لئسیس بر تکثیر سلول سرطانی ریه (A549) بستگی به غلظت آن دارد. همچنین، نانوتفرۀ حاصل بیان ژن *HDAC8* در رده سلولی مذکور را تا حدود ۹ 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 بعمل می‌آوریم. همچنین، نویسنده‌گان از پرسنل عزیز آزمایشگاه لیستر سپاسگزاری می‌نمایند.

نفره را بر توان زیستی و رشد سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [۳۰]. به عنوان مثال، Gurunathan و همکارانش تاثیر منفی نانوذرات بر بیان ژن‌های *VEGF* و *FGF-2* که نقش مهمی در رگ‌زایی دارند را نشان داده است [۳۱]. همین‌طور، نشان داده شده است که نانو-نفره رشد تومورها را مهار می‌کند [۳۲]. برای ستر نانوذرات نفره می‌توان از ۳ روش ستر فیزیکی، شیمیایی و زیستی (سبز) استفاده نمود. در دنیای امروز ستر سبز بسیار مورد توجه می‌باشد که در آن برای ساخت نانوذرات نفره بهروش سبز از گونه‌های مختلف باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان استفاده می‌گردد [۳۳، ۲۹]. در ستر 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. ستر سبز مشابه احیای شیمیایی است، اما عوامل پایدار کننده و احیا کننده از موجودات زنده به دست آمده است. به علاوه، این روش معمولاً سریع است و اغلب تنها چند دقیقه به طول می‌انجامد [۲۹]. در مطالعه حاضر ابتدا نانوذره نفره توسط عصاره گیاه اکالیپتوس ستر شد. علت استفاده از گیاه اکالیپتوس در این مطالعه، وجود ترکیبات احیا کننده قوی در عصاره این گیاه و در دسترس بودن آن در نقاط مختلف جهان است. مطالعات فیتوشیمیایی اکالیپتوس را مسئول عمدۀ خواص این گیاه معرفی کرده‌اند [۱۴، ۱۳]. برای بررسی سمیت سلولی نانوذره نفره 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 دومنی عامل در زنان است [۴]. رده سلولی A549 نماینده سرطان ریه سلول‌های غیر بزرگ است. یکی از مطالعات گسترده A549 توسط Valiahdi و همکارانش با استفاده از سلول‌های A549 انجام شده است. آنها اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی چندین ترکیب کومارینی و ترپنوتی‌ای موجود در گونه‌های گیاهی (خانواده رازیانه و انقوزه) را بر چند رده سلولی سرطانی *Ferula* بررسی نموده و نشان دادند استایلوزین می‌تواند رشد رده سلولی A549 سرطان ریه را به ترتیب در غلظت‌های کم به زیاد محدود کند [۳۴]. تاکنون مطالعات زیادی درباره تاثیر نانوذرات نفره روی این رده سلولی انجام شده است که همگی اشاره به واپسی به دوز بودن تاثیر نانوتفرۀ بر سلول‌های A549 دارند. به عنوان نمونه مطالعه Chairuangkitti و همکارانش نشان داده است که در سلول‌های تیمار شده، IC_{50} در غلظت $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ تعیین می‌شود [۳۵]. Wang و همکارانش نیز به همین غلظت موثر دست یافته‌اند [۳۶]. در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که در غلظت IC_{50} در غلظت $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ حاصل می‌شود [۳۷]. در مطالعه حاضر میزان IC_{50} دوماهنامه فیض | آذر و دی | ۱۳۹۷ | دوره ۲۲ | شماره ۵ ۴۴۷

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, Keramatinia 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, Bentzien 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] Iravani 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. Anti-proliferative 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.