



بررسی اثر نانوذرات کلرید نقره بر بیان *GAS 5 Lnc RNA* در سلول‌های سرطانی کبد (HepG2)

آناهیتا آقازاده طرانی: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
سید عطا اله سادات شاندیز: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir
نسترن اصغری مقدم: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

نانوذرات کلرید نقره،
آپوپتوز،
سرطان کبد،
LncRNA GAS5

زمینه و هدف: سرطان کبد یکی از سرطان‌های کشنده و شایع در جهان به شمار می‌رود. هدف از این تحقیق، ارزیابی اثرات ضد سرطانی نانوذرات کلرید نقره و ارزیابی بیان ژن *LncRNA GAS 5* در سلول‌های سرطانی کبد می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2) و نرمال (HEK293) تحت تیمار با نانوذرات کلرید نقره با غلظت‌های مختلف طی ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در صد زنده مانده نانوذرات بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نرمال با روش رنگ سنجی (MTT(3-(4, 5-Dimethyltetrazolium Bromide) بررسی شد. در نهایت، بیان کمی ژن *LncRNA GAS 5* نسبت به ژن مرجع با تکنیک real time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که نانوذرات کلرید نقره میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال به طور معنی داری کاهش می‌دهد. پس از تیمار سلول‌های سرطانی HepG2 با غلظت‌های متفاوت میزان (Half IC50 (maximal inhibitory concentration) برای نانوذرات ۴۹ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. همچنین، این برای رده‌ی سلولی نرمال HEK293 به میزان ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. همچنین، بیان ژن *LncRNA GAS 5* بعد از تیمار با نانوذرات به میزان $4/6 \pm 0/34$ ($P < 0/001$) نسبت به ژن کنترل داخلی افزایش یافت.

نتیجه گیری: اثر غلظت‌های نانوذرات کلرید نقره بر سلول‌های سرطانی HepG2 و سلول‌های نرمال HEK293 نشان دهنده اثر سمیت بالای نانوذرات کلرید نقره می‌باشد. همچنین افزایش بیان *LncRNA GAS 5* نشان دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های HepG2 می‌باشد. بنابراین، استفاده از این نانوذرات می‌تواند در درمان سرطان کبد مورد توجه قرار گیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Aghazadeh Tarani A, Sadat Shandiz SA, Asghari Moghaddam N. Effect of Silver Chloride Nanoparticles on Expression of LncRNA GAS5 Gene in Liver Cancer Cells (HepG2). Razi J Med Sci. 2023;30(6): 116-126.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

Effect of Silver Chloride Nanoparticles on Expression of *LncRNA GAS5* Gene in Liver Cancer Cells (HepG2)

Anahita Aghazadeh Tarani: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Seyed Ataollah Sadat Shandiz: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
(*Corresponding author) Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Nastaran Asghari Moghaddam: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Liver cancer is one of the deadliest cancers and the most common cancers worldwide. Nanoparticles due to their wide applications in diagnostics, imaging and drug delivery, have attracted significant attentions (6). Upon a previous studies, the green-route mediated production of metal nanoparticles inhibits the progression of cancer cell lines (9, 10). In previous study the inhibition of the breast cancer cells were conducted by silver chloride nanoparticles synthesized by *Onopordum acanthium* L. extract through inducing apoptosis pathway (11).

Lnc RNA GAS5 is a tumor suppressor, it's an expression in some malignant tumors decrease. In liver Cancer Cells (HCC) The *GAS5* gene Expression is reduced, which identifies the poor prognosis of this gene (5). However, a limited number of reports have been investigated on the cytotoxic effect of silver chloride nanoparticles on cancer cells, so in this study, we aimed to investigate it. In our study, we investigated the silver chloride nanoparticles synthesized by *O. acanthium* L. extract, as well as its anticancer effects on liver cancer and normal cell lines. The aim of this study was investigating the cytotoxicity effect of silver chloride nanoparticles and evaluation of *LncRNA GAS 5* gene expression in liver cancer cells.

Methods: Briefly, 100 mL of a solution of 1 mM silver nitrate was prepared in distilled water. Then, 5 mL of solution of *O. acanthium* L. extract (4 mg/mL) and KCl salt (1 mM) were drop wise added to the stirred silver nitrate solution. Subsequently, the resulted solution was stirred at room temperature for 24 hours. This solution was then centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes; the supernatant was discarded and then centrifuged again with distilled water (11). In this study, HepG2 and HEK293 cells were obtained from the Pasteur Institute Cell Bank of Tehran and treated with silver chloride nanoparticles after 24 hours. Cell viability percentage of nanoparticles were determined by MTT (3-(4, 5-Dimethyltetrazolium Bromide) assay toward HepG2 and HEK293 cells. The HepG2 and HEK293 cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Scotland) medium with 10% FBS serum and 1% streptomycin antibiotic (Gibco, Scotland). The cells were then stored at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified cell culture. To evaluate the *in vitro* cell viability, the colorimetric MTT method was assessed for investigating the appropriate lethal dose of silver chloride nanoparticles. Afterward, they were treated with silver chloride nanoparticles in various concentrations (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL) for 24 hours. Nanoparticles were added to the cells (1 × 10⁴ cells per well) cultured on 96-well plate, which were incubated an overnight at 37 °C. Thereafter, MTT solution (100 µl of 0.05 mg/well) was added to the plate. Subsequently, dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent we added of to each well to solubilize the formazan crystals. Finally, the optical density of the treated and untreated cells was evaluated with the ELISA reader (Eppendorf, Germany) at the wavelength of 570 nm.

Keywords

Silver chloride Nanoparticles, Apoptosis, Liver cancer, *GAS5* gene

Received: 08/07/2023

Published: 09/09/2023

Finally, the viability of the cells was calculated according to the following formula: percentage of cell viability (%) = OD value of sample / OD value of control × 100.

Levels of *LncRNA GAS5* gene expression in HepG2 liver cancer cell were quantified using quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) technique. To assess the qRT-PCR method, total cellular RNA extraction was carried out using the RNA extraction kit based on to the instructions in the Qiagen kit (Qiagen, Germany). To synthesis of transcriptional complementary DNA (cDNA), PrimeScript™ RT Kit (Takara, Japan) was carried out (12). *GAS5* and *GAPDH* primers were then conducted using NCBI primer blast in this study (Table 1). Subsequently, qRT-PCR method was evaluated by 100 ng of cDNA, SYBER Green PCR Master Mix (2X), followed by 2mM each of reverse and forward primers in final volume to 20 µL with nuclease free water. Also, the data was investigated by ABI StepOne using the Applied Biosystems qRT-PCR (ABI 7300 system, Applied Biosystems). Statistical significance between treatment and untreated groups were evaluated by One-way analysis of variance (ANOVA) with SPSS software version 22 and the Tukey post hoc. Data were expressed as mean ± the standard deviation of three replicates from three independent experiments. and P <0.05 was considered significance level.

Results: The results showed that silver chloride nanoparticles decrease significantly the cell viability of cancerous HepG2 cells as compared to normal HEK293 cell line. In this regard, silver chloride nanoparticles were able to increase cell toxicity in a dose-dependent manner, as shown in Figure 1 and 2. Also, IC₅₀ concentration of silver chloride nanoparticles toward HepG2 and HEK293 cells was 49 and 160 µg/mL, respectively. To conduct the effect of IC₅₀ dose of nanoparticles on cell lines, we investigated HepG2 and HEK293 cells treated with 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL of nanoparticles for overnight using MTT assay. At concentration of 12.5, 25, 50, 100, 200, and 400 µg/mL of silver chloride nanoparticles, the viability of HepG2 was reduced to (79.85±6.44)%, (63.68±7.05)%, (46.87 ± 4.7)%, (31.83 ± 4.44)%, (18.63± 6.1)%, and (18.63± 6.1) (P < 0.001), respectively (Figure 1). At concentration of 50, 100, 200, and 400 µg/mL of silver chloride nanoparticles, the viability of HEK293 was reduced to (80.28±6.1)%, (69.91±6.13)%, (43.67 ± 7.76)%, and (24.99 ± 4.42)% (P < 0.001), respectively (Figure 2). In order to determine the effect of silver chloride nanoparticles on cancerous cells, alterations in the mRNA expression levels of *LncRNA GAS5* gene in HepG2 cells were carried out using qRT-PCR technique followed by the exposure to nanoparticle. According to our study, the results of real time PCR displayed that the expression of *LncRNA GAS5* was up-regulated by a 4.6±0.34 (p<0.001) fold as compared to control gene.

Conclusion: In summary, the effect of silver chloride nanoparticles against HepG2 and HEK293 cells showed that these nanoparticles have high cytotoxicity. Also, increase in *LncRNA GAS5* gene expression level reveals the triggering apoptosis in HepG2 cells. silver chloride nanoparticles can be considered as a promising strategy for the treatment of liver cancer. Thus, for the liver cancer therapy, further *in vivo* investigations are required to determine the efficacy of the silver chloride nanoparticles.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Aghazadeh Tarani A, Sadat Shandiz SA, Asghari Moghaddam N. Effect of Silver Chloride Nanoparticles on Expression of *LncRNA GAS5* Gene in Liver Cancer Cells (HepG2). Razi J Med Sci. 2023;30(6): 116-126.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

سرطان کبد یکی از فراوان‌ترین سرطان‌های بدخیم در میان مردان تشخیص داده شده است. بر اساس گزارش‌ها در سال ۲۰۰۸، مجموعاً ۷۴۸۳۰۰ مورد جدید سرطان کبد و ۶۹۵۹۰۰ مرگ ناشی از آن در سراسر جهان گزارش شد. انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۰ تقریباً تا ۲۰ میلیون مورد جدید ابتلا به این بیماری افزایش پیدا کند (۱).

جراحی، یک راه پیشگیری برای پیشرفت سرطان کبد است. در بیماران که تومور شناسایی می‌شود، استراتژی‌های مختلفی مانند درمان هدفمند، هورمون درمانی، پرتو درمانی، جراحی و شیمی درمانی استفاده می‌شود (۲). عوارض جانبی نامطلوب درمان سرطان کبد یکی از فاکتورهای موثر دریافتن روش‌های جایگزین است. با توجه به بالا بودن میزان مرگ مبتلا به سرطان کبد افزایش نرخ ابتلا به این سرطان در دهه اخیر، اهمیت مطالعه پیرامون این سرطان مشخص می‌شود. علاوه بر این روش، داروهای موثر بر سرطان کبد نیز اهمیت ویژه‌ای دارد؛ چرا که بسیاری از بیماران پس از درمان با یک دارو یا روش خاص دچار مقاومت به آن شده و بیماری عود می‌کند (۳).

در سال‌های اخیر نانو تکنولوژی به عنوان یکی از اهداف بزرگ در درمان سرطان‌ها مطرح شده است. از مزایای آن در طراحی دارو می‌توان به افزایش حساسیت به رادیو درمانی، محافظت از آثار سوء رادیو درمانی و افزایش سلول کشی تومورها اشاره کرد (۴). در این میان نانوذرات کلرید نقره توجه زیادی را برای درمان سرطان به خود اختصاص داده است. نقره به مقادیر فراوانی در طبیعت وجود دارند و تولید آن‌ها هزینه زیادی ندارد. لذا، پژوهش در این زمینه را به سمت تولید فرآورده‌های دارویی مقرون به صرفه پیش می‌برد و فرآوری و سنتز این نانوذرات جزء کم هزینه ترین دستورات عمل‌های سنتز می‌باشد (۵). نانوذرات کلرید نقره در سال‌های اخیر به دلیل اثرات آن در درمان سرطان مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (۶). این ترکیب به واسطه برداشت بیشتر یون‌های نقره توسط سلول‌های سرطانی، اثرات درمانی خود را اعمال می‌کند (۷). ژن *GAS 5* یک ژن غیر کد کننده پروتئینی در کروموزوم ۱۷ (1q25.11) است که فرایندهای سلولی مانند تکثیر (۸)، آپوپتوز، و تهاجم را

تنظیم می‌کند (۹). طی آن می‌تواند به‌عنوان یک سرکوبگر تومور عمل کند. البته بیان این ژن مستلزم تنظیم شدن می‌باشد؛ زیرا بیان بیش از حد یا بیان کم آن منجر به نتیجه عکس می‌شود و شاخص‌هایی از بالا رفتن استرس اکسیداتیوها (reactive oxygen species-ROS)، و القا کننده آپوپتوز می‌باشد (۱۰).

در این تحقیق اثرات سمیت نانوذرات کلرید نقره در رده‌های سلولی سرطانی کبد و نرمال مقایسه شده است. همچنین با توجه به ضروری بودن تعیین عامل القا کننده آپوپتوز ناشی از نانوذرات کلرید نقره، به بررسی میزان بیان ژن *LncRNA GAS 5* در سطح mRNA با تکنیک real time PCR پرداخته شده است.

روش کار

سنتز نانو ذرات کلرید نقره: در این تحقیق تجربی - آزمایشگاهی سنتز نانو ذرات کلرید نقره مطابق پژوهشی که در سال ۲۰۲۲ ارائه شده مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). برای این منظور، ۱۰۰ میلی لیتر محلول یک میلی مولار از نیترات نقره در آب مقطر تهیه شد. سپس ۵ میلی لیتر از محلول ۴ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه خارپنبه و یک میلی مولار نمک KCL را به صورت قطره قطره به محلول نیترات نقره در حال هم خوردن اضافه شد و سپس محلول به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در حالت هم خوردن در دمای اتاق انکوبه شد تا رنگ محلول از سفید به رنگ بنفش تغییر پیدا کند. پس از این مدت، محلول به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، محلول روئی را خالی کرده، و مجدداً با آب مقطر سانتریفیوژ شد.

کشت سلولی: در این پژوهش رده سلولی سرطان کبد (HepG2) و رده سلولی نرمال (HEK293) استفاده گردید که از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط DMEM مکمل شده با ۱۰ درصد سرم FBS برای کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت انکوباتور تیمار شد. درصد سلول‌ها با رنگ آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین شد. هنگامی که تعداد سلول‌ها در داخل فلاسک به تراکم در حدود ۸۰ درصد رسید، پاساژ داده شدند.

سلول) انجام گرفت که طی آن در پلیت ۶ خانه با اضافه کردن ۵۰۰۰۰۰ سلول در چاهک کنترل و تیمار و انکوباسیون پس از ۲۴ ساعت به اضافه کردن دوز IC50 به گروه تیمار و انکوباسیون ۲۴ ساعته نوبت به ترپسینه و انتقال به میکروتیوب های فاقد RNase و سانتی فیوژ و افزودن تریازول و کلروفورم گردید. پس از سانتی فیوژ و انتقال فاز رویی حاوی RNA به میکروتیوب های دیگر و افزودن ایزوپروپانول، سانتی فیوژ و شستشو با الکل ۷۵٪ و افزودن آب DEPC انجام شد و RNA به فریزر -۸۰ انتقال داده شد. غلظت تمامی RNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر کمپانی شرکت اپندورف با طول موج A230/A260 مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور سنتز cDNA، از مولکول های RNA استخراج شده با کمک دستورالعمل کیت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۵ میکرو لیتر پرایمر هگزامر تصادفی، ۵ میکرو لیتر بافر واکنش 5x، یک میکرو گرم RNA، ۰/۵ میکرو لیتر پرایمر الیگو (dT)، و یک میکرو لیتر مهار کننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرو لیتر)، ۱ میکرو لیتر آنزیم MulV-M، دو میکرو لیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، و آب عاری از آنزیم DNase (تا حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر) به همراه لوله اضافه شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس بلافاصله در یخ گذاشته و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

جهت طراحی پرایمرهای مورد استفاده از پایگاه اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov و برنامه های Gene Runner, Become Designer, primer express استفاده شد (جدول ۱). توالی پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار BLAST در توالی ژنوم انسان

آزمون MTT: روش رنگ سنجی MTT یکی از آزمون هایی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیم به وسیله آنزیم سوک سینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود. ارزیابی زنده مانی سلول های سرطانی و نرمال مورد بررسی قرار گرفت. بعد از کشت سلولی، سوسپانسیون سلولی (۱۰^۴ سلول در هر میلی لیتر) در میکرو پلیت های ۹۶ خانه قرار گرفت. به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شدند. سپس غلظت های مختلف تهیه شده از نانوذرات کلرید نقره به چاهک های حاوی سلول ها اضافه شد. از محیط کشت حاوی DMSO ۱ درصد (دی متیل سولفوکساید) بدون تیمار نانو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. چاهک های حاوی سلول و نانوذرات به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT (سیگما آلدریج، آلمان) (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO اضافه شد و برای حل کردن رسوب بنفش MTT، پلیت کشت به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس توسط قرائت گر الیزا جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد میزان زنده مانی سلول ها نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

$$ODT / ODC = (\%) \times 100$$

OD_T: جذب نوری سلول های تیمار شده با نانو ذرات کلرید نقره

OD_C: جذب نوری سلول های تیمار شاهد

ارز یابی بیان ژن GAS5 با تکنیک Real time PCR: استخراج RNA کل سلول با کشت (تعداد ۱۰^۶)

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای این پژوهش

ژن	توالی آغازگرها
GAPDH	Forward: 5'- CCCACTCCTCCACCTTTGAC -3' Reverse: 5'- CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA -3'
GAS5	Forward: 5'- TGCTGGGTGCGGATGC -3' Reverse: 5'- CTGTCTAATGCCTGTGTGCCAAT -3'

به عنوان سطح معنی داری مورد استفاده قرار گرفت. $P < 0.05$

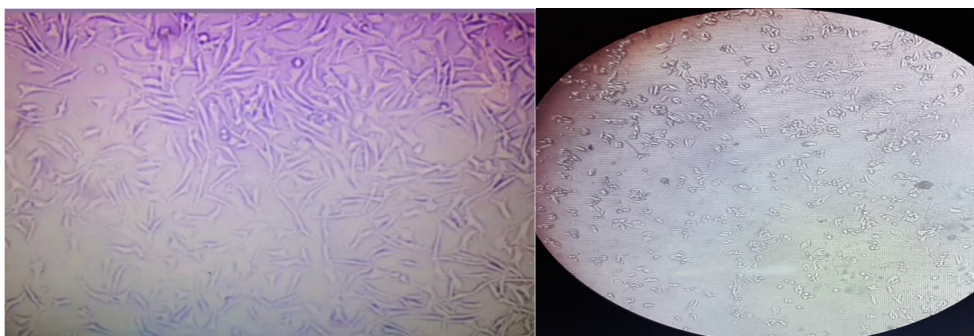
یافته‌ها

بررسی ریخت شناسی اثر نانو ذرات کلرید نقره با کمک میکروسکوپ در رده سلولی سرطانی کبد HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ریخت شناسی حاصل از اثر نانو ذرات کلرید نقره بر روی رده سلولی HepG2 نشان داد که تعداد و اندازه سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است، که نشان دهنده اثرات توکسیک نانو ذرات کلرید نقره با عصاره هیدروالکلی خارپنبه بود. در تصویر ۱ نشان داده شده که با اثر نانو ذرات کلرید نقره با عصاره هیدروالکلی خارپنبه، علاوه بر کاهش تعداد سلول‌ها، تغییراتی مانند کاهش سیتوپلاسم سلولی نیز مشاهده می‌شود. به منظور بررسی اثر سمیت نانو ذرات کلرید نقره ابتدا سلول‌ها کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف از نانو ذرات تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان زنده مانی سلول‌ها با کمک آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نمودار ۱ نتایج سمیت به دست آمده برای رده سلولی HepG2 حاکی از آن است که نانو ذرات کلرید نقره پس از بازه زمانی ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثر کاهنده‌ای بر بقای سلولی در رده سلولی HepG2 دارند؛ به طوری که غلظت ۴۹ میکروگرم در میلی لیتر از نانو ذرات کلرید نقره با عصاره

جستجو شد تا از ویژگی توالی و یکتا بودن محل اتصال آن‌ها اطمینان حاصل شود. در این پژوهش از ژن گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

روش کمی‌ت سنجی ژن‌ها با کمک دستگاه روش کمی‌ت سنجی ژن‌ها با کمک دستگاه (Foster, Biosystems Applied مدل RealTime PCR (ABI 7300 (USA, CA, City) انجام گرفت. محلول واکنش شامل ۵ میکرولیتر cDNA، ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR حاوی سایبرگرین(-SYBER) (Green PCR Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (جلویی و برگشتی) و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه زمانی-گرمایی دستگاه برای تکثیر ژن‌ها شامل باز شدن اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه طی تکرار ۴۰ چرخه، اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و طولی شدن رشته الگو در مدت زمان ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، اختلاف چرخه آستانه (C_t) سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با نانو ذرات به دست آمد. همچنین با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_t$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ محاسبه شد.

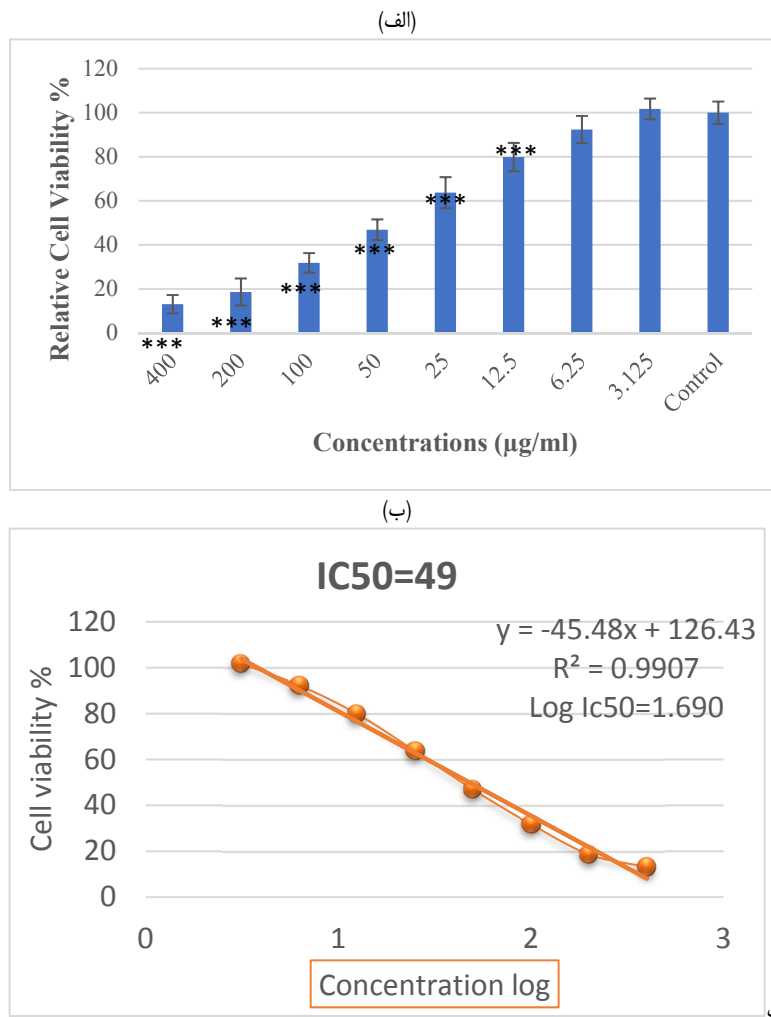
تحلیل آماری: داده‌های این تحقیق با کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آنالیز آماری داده‌ها از آزمون T استفاده شد و



(الف)

(ب)

تصویر ۱- بررسی ریخت شناسی اعمال اثر سمیت نانو ذرات کلرید نقره با کمک میکروسکوپ: سلول‌های رده سرطان کبد HepG2 قبل از تیمار (الف) و بعد از تیمار ۲۴ ساعت با نانو ذرات کلرید نقره (ب)



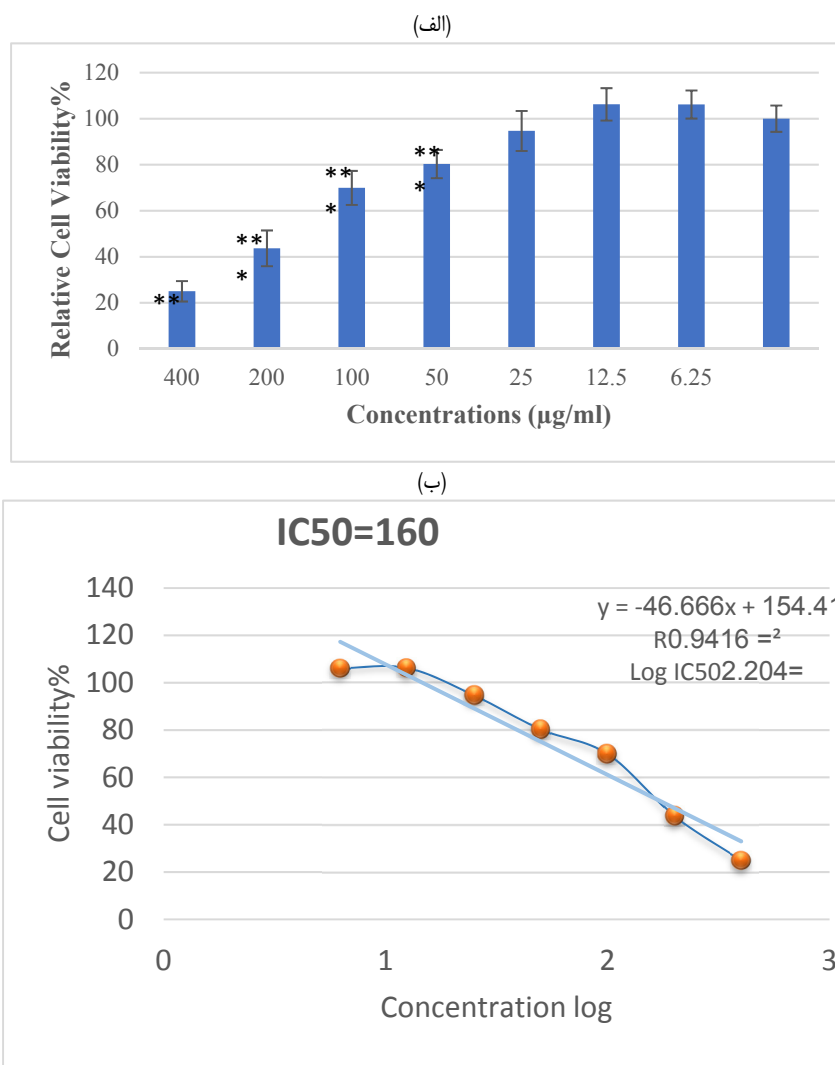
نمودار ۱- درصد زنده ماندن سلول‌ها در رده سلولی سرطانی کبد HepG2. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (n=3, p < 0.001, ***, p < 0.01, **). ۵۰ میلی‌لیتر سمیت وابسته به دوز و زمان این نانوذره را نشان می‌دهد (ب).

هیپدروالکلی خارپنبه باعث مرگ حدود ۵۰ درصد از سلول‌های HepG2 سرطانی گردید و از لحاظ آماری معنی دار بوده است (نمودار ۱). غلظت ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات کلرید نقره باعث مرگ حدود ۵۰ درصد از سلول‌های نرمال HEK293 گردید که اختلاف معنی داری نشان می‌دهد (نمودار ۲).

بررسی میزان بقا سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که نانو ذرات کلرید نقره رشد سلول‌های HepG2 را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. به منظور تایید اینکه آیا قطعات ژنی به صورت اختصاصی، بدون آلودگی و دایمر پرایمر تکثیر شده است، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. طبق نمودار ۳ وجود تنها یک پیک برای ژن‌های *GAS5* و *GAPDH* در دمای ذوب ویژه آنها، تاییدکننده اختصاصی بودن محصول تکثیر واکنش می‌باشد.

تغییر در بیان ژن *GAS5* در سلول‌های HepG2 تیمار شده با نانو ذرات کلرید نقره با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۴). بدین ترتیب نسبت بیان ژن *GAS5* به ژن

تغییر در بیان ژن *GAS5* در سلول‌های HepG2 تیمار شده با نانو ذرات کلرید نقره با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۴). بدین ترتیب نسبت بیان ژن *GAS5* به ژن



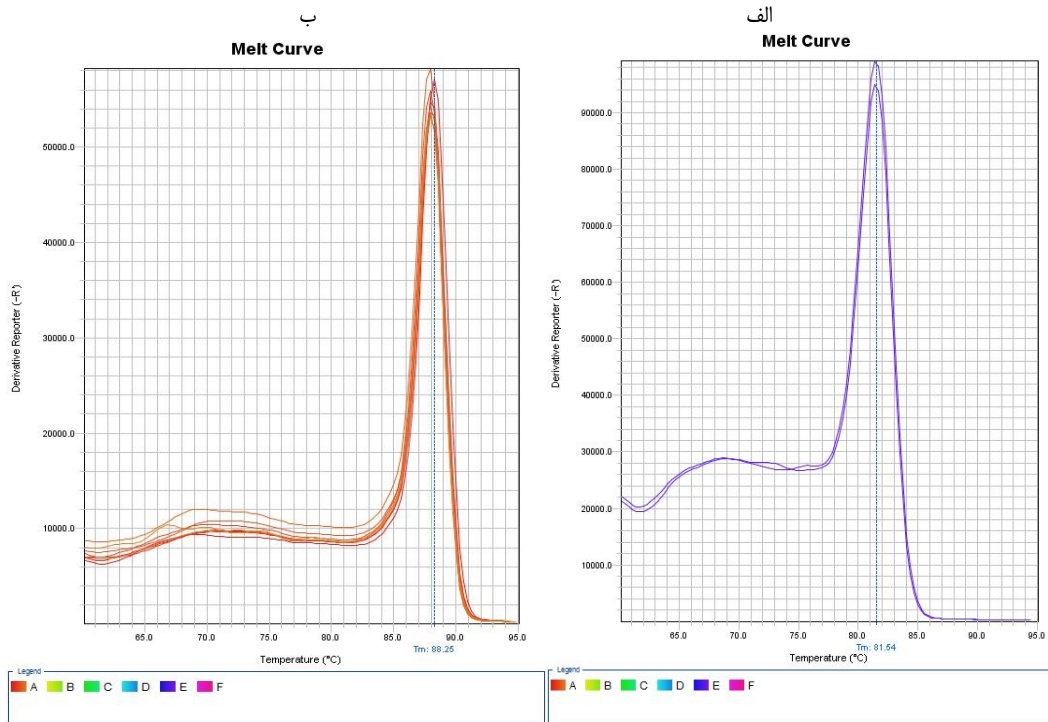
نمودار ۲- درصد زنده ماندن سلولی نرمال HEK293. $p < 0.05$: **, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***. میزان ۵۰ درصد کشندگی نانوذرات تیمار شده با رده سلولی نرمال IC₅₀=160 میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (ب).

مقاومت دارویی، شکست درمان و اثر بخشی کم بر گسترش سلول های سرطانی مقاوم به دارو می شود (۱۲). از طرفی، اثرات ضد سرطانی ترکیبات نانو ذرات کلرید نقره در سال های اخیر به دلیل اثرات آن در درمان مشخص شده است (۱۳). نتایج حاصل از آزمون MTT سلول های HepG2 این تحقیق نشان داد که نانو ذرات کلرید نقره علیه این سلول ها سمی و کشنده بوده و هر چقدر که غلظت این ترکیب بیشتر می شود، میزان بقای سلول ها کاهش می یابد و نیز این ترکیب برای سلول های

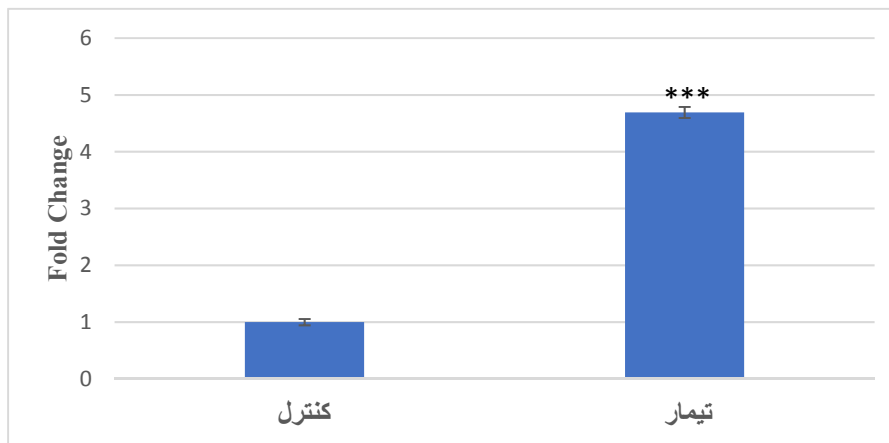
کنترل داخلی در رده سلولی HepG2 به میزان ± 0.36 $4/6$ (p < 0.01) برابر افزایش یافت که نشان دهنده تاثیر مثبت نانوذرات کلرید نقره در افزایش بیان *LncRNA GAS5* می باشد.

بحث

امروزه، شیمی درمانی یکی از بیشترین روش های درمان است که برای جلوگیری از پیشرفت سرطان ها مورد استفاده قرار گرفته است، که دارای اثرات جانبی تهدید کننده برای بیمار بوده و از طرفی منجر به



نمودار ۳- منحنی ذوب ژن‌های *GAPDH* و *GAS 5* وجود یک نقطه حداکثری که عدم اتصال پرایمر دایمر و خلوص بالای واکنش‌ها را تایید می‌کند. الگوی منحنی ذوب ژن *GAS5* (نمودار راست) در دمای ۸۸/۲۵ درجه سانتی گراد نشان می‌دهد. همچنین الگوی منحنی ذوب ژن *GAPDH* (نمودار چپ) در دمای ۸۱/۵۴ درجه سانتی گراد نشان می‌دهد. محور افقی دما و محور عمودی مشتق سیگنال فلورسانس را نشان می‌دهد.



نمودار ۴- میزان بیان ژن *GAS 5* نسبت به گروه کنترل داخلی

که ناشی از رهائش یون نقره و افزایش استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز بوده که با پژوهش حاضر مشابه بود (۱۴). طی تحقیقات شالی و همکاران مشخص شد که نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه انجبار باعث القای آپوپتوز در سلول‌های HepG2 می‌شود (۱۱). در پژوهشی که حسنی و همکاران در سال

نرمال، سمی و کشنده می‌باشد. این موضوع در تحقیقات مشابه مورد اشاره و حتی اثبات شده است. برای مثال می‌توان به تحقیق رضانی و همکاران اشاره نمود که نشان دادند اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* در سلول‌های سرطانی A2780 به ترتیب افزایش و کاهش یافت

۱۳۹۷ انجام دادند، اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) در رده سلولی کولون HT29 کاهش معنی دار ۰/۰۴۶ را نشان داد که این امر با ایجاد افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از یون های نقره و در نهایت آپوپتوز همراه بوده است (۱۵).

سونسکا و همکاران به تولید نانو کامپوزیت های ضد میکروبی حاوی نانو ذرات نقره و کیتوزان برای کاربردهای بالقوه پزشکی پرداختند (۱۶). نتایج پژوهش گوماسی و همکاران در ۲۰۲۰ نشان داد که نانو ذرات کلرید نقره از عصاره پوسته میوه *Tamarindus indica* بر رده سلولی MCF-7 ممکن است یک عامل درمانی بالقوه برای درمان سرطان پستان انسان باشد (۱۷).

طی تحقیق صفی پور و همکاران که به سنتز نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه زر شک پرداختند، کاهش تاثیر بیان ژن *ODC1* در سلول های MDA-MB-231 مشاهده شد. همچنین ایجاد رادیکال های اکسیژن سبب کاهش درصد زنده مانی سلول های سرطانی شده اند (۶). طی تحقیقات حاجبی و همکاران مشاهده شد که نانوذرات نقره با عصاره کلزا بر سلول های HepG2 باعث مهار رشد سلول های سرطانی کبد شده است (۱۸).

طی تحقیق شریفی و همکاران سنتز نانوذرات نقره با عصاره زیره سیاه بر رده های سلولی گلیوبلاستوما A-172 و سرطان پستان MCF-7 باعث مهار رشد سلول های سرطانی پستان وابسته به غلظت شد (۱۹). طی پژوهش داعی و همکاران اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره بر سلول های سرطان مثانه در مقایسه با سلول های رده نرمال HEK293 باعث مهار رشد سلول های سرطانی وابسته به غلظت شد که نانوذرات مشابه و رده های سلولی متفاوت با زنده مانی کمتری نسبت به این پژوهش می باشند (۲۰).

همچنین سنتز سبز نانوذرات نقره با کمک عصاره *Thymus vulgaris* توسط شیرمردی و همکاران در سال ۲۰۲۳ گزارش شد که اثر ضد سرطانی مطلوب این نانوذرات را بر رده سلولی لوسمی های لنفوئیدی حاد Molt-4 در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت با آزمون های MTT و آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید نشان داده شد (۲۱).

تاکنون اثر مستقیم نانو ذرات کلرید نقره بر بیان ژن

LncRNA GAS5 بررسی نشده است. بدیهی است بررسی اثر مستقیم ضد سرطانی این نانو ذرات می تواند در بالا بردن اطلاعات دقیق مکانیسم عمل این نانوذرات به عنوان دارو بسیار موثر باشد؛ بنابراین در پژوهش حاضر، اثرات سمیت غلظت های مختلف نانو ذرات کلرید نقره بر رده سلولی سرطان کبد (HepG2) و سلول نرمال HEK293 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی زنده ماندن رده سلولی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تیمار نانو ذرات کلرید نقره باعث کاهش معنی دار زنده مانی سلول های سرطانی تحت تاثیر نانو ذرات شدند. همچنین در سلول های نرمال تیمار شده با غلظت های مختلف نانو ذرات، اختلاف معنی داری مشاهده شد. مطابق بیشتر پژوهش ها، نانوذرات نقره در درمان سرطان های مختلف مورد استفاده قرار گرفته شده است. نتایج این یافته نیز توانست همین عمل را نشان دهد. در این پژوهش علاوه بر سمیت نانو ذرات کلرید نقره، ارزیابی بیان ژن *GAS5* در رده سلولی HepG2 انجام گرفت که به طور معنی داری افزایش نشان داد، که شاخص هایی از بالا رفتن ROS و یا استرس اکسیداتیو بوده و القا کننده آپوپتوز در سلول می باشد. فعالیت سیستم گلوکوتایون با افزایش میزان ROS افزایش می یابد تا با حذف آن ها از آسیب بیشتر به سلول ها جلوگیری کند. بنابراین، افزایش بیان ژن *GAS5* به عنوان مارکر در نظر گرفته می شود.

نتیجه گیری

در این پژوهش اثرات ضدتوموری نانو ذرات کلرید نقره در افزایش بیان ژن در *LncRNA GAS5* رده سلولی سرطان کبد (HepG2) نشان داده شد. این افزایش به عنوان مارکری برای افزایش تولید ROS و متعاقب آن آپوپتوز می باشد. بنابراین، رویکرد بالقوه دارویی نانو ذرات نیازمند توجه بیشتر در تحقیقات مدل های حیوانی و داروسازی می باشد که می تواند جهت کمک درمانی در زمینه های مختلف درمانی از جمله سرطان باشد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاصل پایان نامه نویسنده اول است. بدین

cancer diagnosis. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20721–20727.

13. Shahoon H, Hamedi R, Golgonia P, Yadegari Z. Evaluation of Nano silver particles' cytotoxicity on L929 fibroblast cells by MTT assay: an in vitro Study. *J Res Dent Sci.* 2011;8(2):53-59.

14. Ramezani T. Anti-cancers effects of silver nanoparticles coated with curcumin on a2780 ovary cancers cells. *Cell Death Differ.* 2016;20(11):1558–1568.

15. Hassani Derakhshandeh B, Shandiz SAS, Abbasi M. Evaluation of metalloproteinase matrix MMP9 gene expression and effect of silver nanoparticles toward Colon cancer cell line (HT29). *J Cell Tissue.* 2019;9(4):344–353.

16. Sonseca A, Madani S, Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M, Peponi L, Leonés A, et al. Biodegradable and Antimicrobial PLA-OLA Blends Containing Chitosan-Mediated Silver Nanoparticles with Sh Memory Properties for Potential Medical Applications. *Nanomaterials.* 2020;10(6):1065.

17. Gomathi AC, Xavier Rajarathinam SR, Mohammed Sadiq A, Rajeshkumar S. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of Tamarindus indica on MCF-7 human breast cancer cell line. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;55:101376.

18. Hajebi S, Homayouni Tabrizi M, Moghaddam M N. The antiangiogenic and cytotoxic properties of green synthesized Silver nanoparticles using liquid extract of Rapeseed Flower Pollen. *J Urmia Univ Med Sci.* 2019;30(4):268–280.

19. Sharifi F, Mohamadi N, Soltanian S, Doostmohammadi M. Synthesis of Silver Nanoparticles using Methanol Extract of Bunium Persicum and the Evaluation of its Cytotoxic, Antileishmanial, and Antimicrobial Activities. *J Ilam Uni Med.Sci.* 2022;30(6):9-20.

20. Daei S, Abbas Ali Pourkabireh R, Zia Majidi N. Evaluation of Anti-cancer Properties of Silver Nanoparticles on 5637 Bladder Cancer Cells in Comparison with Normal Embryonic Kidney Cells (HEK-293). *Armaghane-danesh.* 2022;27(1):27-41.

21. Shirmardi S, Zare Mehrjardi H. Effect of cytotoxicity of silver nanoparticles synthesized with Thymus vulgaris extract on MOLT-4 leukemia cell line. *Stud Med Sci.* 2022;33(6):412.

وسيله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌شود.

References

1. Fu Jand Wang H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China. *Cancer Lett.* 2018;412:283–288.

2. Esmaili M, Zandi M. The consequences of transcatheter arterial chemoembolization in patients with liver cancer. *Govaresh.* 2020;25(2):87–92.

3. Zarringol M. A review on regulation of autophagy by Reactive Oxygen Species. *Razi J Med Sci.* 2018;24(164):93-105.

4. Kumar DJ, Santhi R. Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of Morinda pubescens leaves in human liver cancer cell line. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5(5):362–366.

5. Natsuki J. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties, and Applications. *Int J Mater Sci Appl.* 2015;4(5):325-332.

6. Afshar AS, Saied Nematpour F. Green synthesis of silver nanoparticles by Berberis vulgaris leaf extract and their effects on cell proliferation and ODC1 gene expression in the MDA-MB-231 cell line. *Nanotechnology.* 2020;32(11):549-558.

7. Khatami M, Kharazi S, Kishani Farahani Z, Azizi H, Lima Nobre MA. The anti-cancer effect of an octagon and spherical silver nanoparticles on MCF-7 breast cancer cell line. *Tehran Univ Med J.* 2017;75(1):72–76.

8. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, Guo B. Long noncoding RNA (LncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5758.

9. Pickard MR, Williams GT. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes (Basel).* 2015;6(3):484–499.

10. Işın M, Uysaler E, Özgür E, Köseoğlu H, Şanlı O, Yücel OB, et al. Exosomal lncRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Front Genet.* 2015;6:168.

11. Shahcheraghi SN, Shandiz SAS, Pakpour B. An Eco-friendly Fabrication of Silver Chloride Nanoparticles (AgClNPs) using Onopordum acanthium L. extract Induces Apoptosis in Breast Cancer MDA-MB-232 Cells. *BioNanoScience.* 2022;12(2):339-350.

12. Li C. Tumor-derived exosomal lncRNA GAS5 as a biomarker for early-stage non-small-cell lung