



The effect of synthetic silver nanoparticle from hydroalcoholic extract *Digitalis nervosa* on CDH1, Bax, Bcl2 and P53 gene expressions in cervical cancer cell line (Hela)

Ahmadzadeh N1, Asghari Moghaddam N2, Keshtmand Z2*

1. Student, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Biological Laboratory of Central Tehran Branch, Islamic Azad University

Article Info

Article History:

received 7.10.2022
revised 8.9.2022
accepted 9.1.2022
onlin 9.11.2022

KeyWords:

Silver nanoparticles
Digitalis nervosa
apoptosis
Hela cell line.

*Corresponding author:

E-mail address
nazila.4a2z@gmail.com
moghaddam_na91@yahoo.com
zkeshtmand2001@gmail.com &
zah.keshtmand@iauctb.ac.ir

Abstract

Introduction: Nowadays, metal nanoparticles, especially silver, due to their special physical properties and anti-cancer effects have been considered. One of the methods of synthesis of these nanoparticles is the use of plant extracts.

Aim: The aim of this study was to investigate the anti-cancer effects of silver nanoparticles synthesized of the hydroalcoholic extract of *Digitalis nervosa* on the cancer cell line (Hela).

Material and methods: In this experimental study, the synthesis of silver nanoparticles was performed by adding the hydroalcoholic extract of *Digitalis nervosa* to the silver nitrate solution. Physical and chemical properties of synthesized nanoparticles were determined by UV-vis, TEM, SEM, EDX and XRD methods. Viability of Hela cancer cells by MTT method with different concentrations of synthesized silver nanoparticles (3.125 to 100 mg/ml) and the expression of Bax, Bcl2, P53 and CDH1 genes were evaluated using real time PCR technique in 24 hours. Data were analyzed using GraphPad software and one-way ANOVA test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The results showed that the results of cytotoxicity at different concentrations of silver nanoparticles showed that IC50 was $16.66 \mu\text{g/ml}$, respectively. Also, the expression of Bax, CDH1 and P53 apoptotic genes in concentration ($16.66 \mu\text{g/ml}$) increased and Bcl2 gene expression decreased compared to the reference gene, which showed the effects of cytotoxicity and changes in nanoparticle concentration.

Conclusion: Silver nanoparticles synthesized from the extract of the *Digitalis nervosa* plant have a cytotoxic effect and possibly induce apoptosis on Hela cancer cells.

Cite this article: Ahmadzadeh N, Asghari Moghaddam N, Keshtmand Z*. The effect of synthetic silver nanoparticle from hydroalcoholic extract *Digitalis nervosa* on CDH1, Bax, Bcl2 and P53 gene expressions in cervical cancer cell line (Hela). (Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(1): 19-30

doi 10.30495/ZISTI.2022.1962960.1127

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.3.3

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



تاثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa*) بر بیان ژن های $CDH1$ ، $Bcl2$ ، Bax و $P53$ در رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela)

نازیلا احمدزاده^۱، نسترن اصغری مقدم^۲، زهرا کشتمند^{۲*}

۱. دانشجو، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله</p> <p>دریافت ۱۴۰۱/۴/۱۹</p> <p>بازنگری ۱۴۰۱/۵/۱۸</p> <p>پذیرش ۱۴۰۱/۶/۱۰</p> <p>انتشار ۱۴۰۱/۶/۲۰</p>	<p>مقدمه: امروزه نانوذرات فلزی به ویژه نقره به دلیل ویژگی فیزیکی خاص و اثرات ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته که یکی از روش های سنتز این نانوذرات، استفاده از عصاره گیاهان می باشد.</p> <p>هدف: بررسی اثرات ضدسرطانی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (<i>Digitalis nervosa</i>) بر رده سلول های سرطانی (Hela) می باشد.</p> <p>مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی سنتز نانوذرات نقره با اضافه شدن عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه به محلول نیترات نقره انجام شد. خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات سنتز شده با روش های EDX، SEM، TEM، $UV-vis$ و XRD تعیین گردید. زنده مانی سلول های سرطانی با روش MTT با غلظت های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده (۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و بیان ژن های $Bcl2$، Bax، $P53$ و $CDH1$ با کمک تکنیک $Real\ time\ PCR$ ارزیابی شد.</p> <p>نتایج: داده ها با استفاده از نرم افزار گراف پد و آزمون واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل و $P > 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که سمیت سلولی در غلظت های مختلف نانوذرات نقره نشان داد که میزان ۵۰ درصد کشندگی $16/66$ میکروگرم در میلی لیتر می باشد. همچنین میزان بیان ژن های آپوپتوزی $CDH1$، Bax و $P53$ در غلظت ($16/66$ میکروگرم در میلی لیتر) در مقایسه با ژن رفرنس افزایش و میزان بیان ژن $Bcl2$ نسبت به ژن رفرنس کاهش را نشان داد.</p> <p>نتیجه گیری: نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گل انگشتانه دارای اثر سمیت سلولی و احتمالاً القا آپوپتوز بر سلول های سرطانی Hela است.</p>
<p>کلمات کلیدی</p> <p>نانو ذرات نقره گل انگشتانه آپوپتوز رده سلولی Hela</p>	
<p>* نویسنده مسؤل</p> <p>nazila.4a2z@gmail.com moghaddam_na91@yahoo.com zkeshtmand2001@gmail.com و zah.keshtmand@iauctb.ac.ir</p>	

شیوه آدرس دهی این مقاله : احمد زاده ن، اصغری مقدم ن، کشتمند ز*. تاثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa*) بر بیان ژن های $CDH1$ ، $Bcl2$ ، Bax و $P53$ در رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela). مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱؛ ۱۷(۱): ۳۰-۱۹

doi 10.30495/ZISTI.2022.1962960.1127

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.3.3

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۸ نویسنده گان: © حق مؤلف

مقدمه:

و مانع از وقوع جهش‌های سرطان‌زا می‌شود. هم‌چنین این پروتئین با افزایش بیان ژن آپوپتوزی (Bax و CDH۱) و کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی (Bcl-۲) موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان می‌گردد (۱۲).

روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات وجود دارد اما سنتز زیستی نانوذرات با استفاده از منابع زیستی از جمله گیاهان یکی از رویکردهایی می‌باشد که مورد توجه بوده و در مقایسه با روش‌های دیگر سنتز، ارزان‌تر، ساده‌تر و با سازگاری بیشتر با محیط است (۷،۸).

گیاهان حاوی مواد شیمیایی مهمی هستند که می‌توانند به عنوان یک درمان بالقوه برای بیماری‌های مختلف از جمله سرطان استفاده شوند. سنتز سبز نانوذرات نقره از عصاره قسمت‌های مختلف گیاه به دلیل خاصیت نوری و ساختاری منحصر به فرد، طیف وسیعی از علاقه‌مندان را در بین محققان بدست آورده است (۱۳).

گیاه گل انگشتانه از منابع مهم ترکیبات دارویی گلیکوزیدهای قلبی مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین می‌باشد که در نارسای‌هایی احتقانی قلب کاربرد درمانی دارند، دارای چندین گونه با ارزش است و تنها گونه بومی ایران گونه (Digitalis nervosa) است. تا کنون بیش از ۲۰۰ ترکیب که از ترکیبات مهم گلیکوزیدی است در گیاهان مختلف شناسایی شده است اما مهمترین آنها مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین و انواع ژیتالیس‌ها و ژیتوکسین بیشتر در گونه‌های گل انگشتانه تولید می‌شوند (۱۴).

با توجه به مزایای نانوذرات سنتز شده از گیاهان و تاثیر درمانی آن‌ها، هدف از پژوهش حاضر، سنتز نانوذرات نقره از گیاه گل انگشتانه و بررسی تاثیر آن بر درصد زنده ماندن و بیان ژن‌های آپوپتوزی CDH۱، P۵۳، Bcl۲ و Bax در رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم (Hela) می‌باشد.

یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان سرطان و سومین عامل مرگ زنان، سرطان دهانه رحم است (۱). از علل بروز سرطان می‌توان به عدم تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی، هم‌چنین استرس اکسیداتیو اشاره کرد که در اثر تولید و عدم مهار گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن رخ می‌دهد و می‌تواند سبب آسیب رساندن به ماکرومولکول‌ها و ایجاد اختلال متابولیکی و نهایتاً مرگ سلولی گردد (۲،۳). در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و عوارض روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی (۴)، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از نانوذرات بخصوص نانوذرات نقره است (۵).

نانوذرات به واسطه اندازه خود خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارند که از آن جمله خاصیت ضدسرطانی آنها می‌باشد (۶). از پرکاربردترین نانوذرات در حوزه درمان، نانوذرات نقره می‌باشند (۷) که مطالعات نشان داده است این نانوذرات با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی شده (۸)، و در آسیب به DNA، افزایش بیان مولکول‌های پروتئینی آپوپتوز و به راه‌انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلولی نقش دارند (۹)، بنابراین منجر به تکثیر سیگنال‌های مرگ می‌شوند که این امر در درمان سرطان دارای اهمیت است (۱۰). القاء مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز)، یکی از رویکردهای موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود که از طریق مسیر داخل‌یا واسطه واکنش لیگاند با گیرنده مرگ در سطح سلول یا مسیر خارجیتوسط طیف وسیعی از عوامل کنترل می‌شود (۱۱). یکی از مهمترین پروتئین‌های موجود در سلول سرکوبگرهای توموری می‌باشند و از مهم‌ترین آنها P۵۳ را می‌توان نام برد. ژن P۵۳ با تولید پروتئین P۵۳ چرخه سلولی را کنترل کرده

مواد و روش‌ها:

شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر گیاه گل انگشتانه به ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت. پودر جامد بدست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه

گیاه گل انگشتانه از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، گیاه را ابتدا در جریان هوا قرار داده، سپس در سایه کاملاً خشک و با آسیاب پودر گردید. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به روش سوکسله استفاده

سنتز نانوذرات نقره از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه

برای تهیه نانوذرات نقره، ۴ میلی لیتر از حجم عصاره، به غلظت ۰/۰۱ میلی مولار نیترات نقره اضافه شد. بعد 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 دور بر ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf ۵۸۰۴R آلمان) انجام شد. محصول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد طی ۴ ساعت قرار داده شد. جهت بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره سنتز شده از تکنیک‌های TEM، UV-vis، EDX، SEM و XRD استفاده گردید (۱۶).

بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از زمان واکنش و تغییر رنگ واکنش به قهوه‌ای تیره، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی (USA) Vis-UV (Spectrophotometer Agilent) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) استفاده شد. در میکروسکوپ SEM، یک قطره از نمونه سوسپانسیون نانوذرات نقره پس از پوشش‌دهی با پودر طلا در ولتاژ زیر ۳۰ کیلو وات و تحت فشار خلاء (۱۰۵ تور) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (مدل XL۳۰، شرکت فیلیپس، ساخت کشور ژاپن) مورد مطالعه قرار گرفت. در میکروسکوپ TEM، یک قطره از نمونه بر روی گرید قرار گرفته و پس از خشک شدن با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی (گذاره) مدل ۱۰۰ KV Zeiss، ساخت کشور آلمان) با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰ کیلو وات تصویر برداری شد، تجزیه و تحلیل ساختاری و تعیین ترکیب شیمیایی محلول سنتز شده با استفاده از انرژی پرتوی ایکس و تکنیک طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) انجام شد (۱۷). در این پژوهش به منظور استخراج صحت سنتز نانوذرات نقره، پی بردن به نوع شبکه کریستالی و اندازه نانوذرات

سنتز شده از طیف پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شده است.

تهیه رده سلولی Hela

از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیست ایران رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela) تهیه شد. بررسی اثر عصاره گیاه گل انگشتانه و نانوذرات حاصل از گیاه گل انگشتانه بر درصد زنده مانی رده سلولی Hela سلول‌های Hela در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک (Pen/Strep) کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ نگهداری شدند. پس از تکثیر سلول‌های Hela توسط Trypsin-EDTA از کف فلاسک جدا سازی شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل حاوی ۱۰۰۰۰ سلول به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند. نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد، سپس محیط کشت را تخلیه نموده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته شده اضافه گردید. بعد از آن، اضافه شدن رنگ MTT (سیگما، آلمان) انجام گرفت. مرحله بعد به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده اضافه شد. پس از سه ساعت ظرف کشت را از انکوباتور خارج کرده، محیط سلول‌ها تخلیه شده و سپس برای حل نمودن فورمازان تولید شده به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر (DMSO، مرک، آلمان) اضافه و ظرف کشت سی دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا فورمازان به خوبی حل گردد. در مرحله بعد جذب توسط دستگاه خوانشگر الیزا (Teknika Oraganon reader ELISA، هلند) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۹).

درصد زنده مانی رده سلولی Hela تیمار شده با نانوذرات سنتز شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار

$$\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار} = 100 \times \text{درصد زنده مانی}$$

میانگین جذب کنترل منفی

در نهایت غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد، به عنوان IC₅₀ در نظر گرفت شد (۱۹).

ارزیابی بیان ژن‌ها به روش Real time

برای این منظور ابتدا RNA رده سلولی Hela کنترل و تیمار شده با غلظت IC₅₀ نانوذرات نقره طبق روش ذکر شده در کیت Bioflux استخراج شد. در نهایت در راستای افزایش دقت و کارایی روش مورد استفاده در استخراج RNA، از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ استفاده گردید. در این روش میزان یک میکرولیتر از RNA استخراج شده را در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ مورد ارزیابی قرار داده شد. جهت تأیید یافته‌ها نیز می‌توان از روش الکتروفورز استفاده نمود. به علت حساسیت بیشتر و پایداری کمتر RNA نسبت به DNA، پس از استخراج RNA، باید به سرعت DNA از روی آن سنتز شود. برای سنتز cDNA، از کیت سنتز Fermentase و پروتکل موجود در آن استفاده گردید.

برای انجام واکنش‌های Real Time PCR از cDNA ساخته شده، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌ها که در جدول ۱ ذکر شده‌اند، استفاده شد. برای کنترل داخلی، از ژن بتا اکتین استفاده گردید. شرایط چرخه دمایی و زمانی شامل دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس برای ۴۰ چرخه، دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و در انتها اتصال پرایمر و طویل شدن در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ داده‌های حاصل از دستگاه Real time PCR آنالیز گردید (۲۰). Real time PCR به کمک دستگاه BioRad انجام شد. در انتها سیکل‌های تکثیر، منحنی دمای ذوب به منظور حصول اطمینان از اختصاصی بودن و عدم وجود محصول غیراختصاصی رسم شد.

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده در ریل تایم

ژن	توالی پرایمر	اندازه قطعات
Bactin	Forward: ۳'-AGAGCTATGAGCTGCCTGAC-۵' Reverse: ۳'-AATTGAATGTAGTTTCATGGATG-۵'	bp ۱۲۹
Bax	Forward: ۳'-GAGCTGCAGAGGATGATTGC-۵' Reverse: ۳'-AAGTTGCCGTCAGAAAACATG-۵'	bp ۹۲
Bcl2	Forward: ۳'-ATTGGGAAGTTTCAAATCAGC-۵' Reverse: ۳'-CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG-۵'	bp ۱۵۰
Po3	Forward: ۳'-CCCCTCCATCCTTTCTTCTC-۵' Reverse: ۳'-ATGAGCCAGATCAGGGACTG-۵'	bp ۱۲۳
CDH1	Forward: ۳'-GCAGAACTGTCCCTGTCCCAG-۵' Reverse: ۳'-GAACAGCACGTACACAGCCCT-۵'	bp ۷۷

آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این بررسی از نرم افزار گراف پد ورژن ۹، روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی استفاده گردید. اطلاعات به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش و $P > 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

تست‌های بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

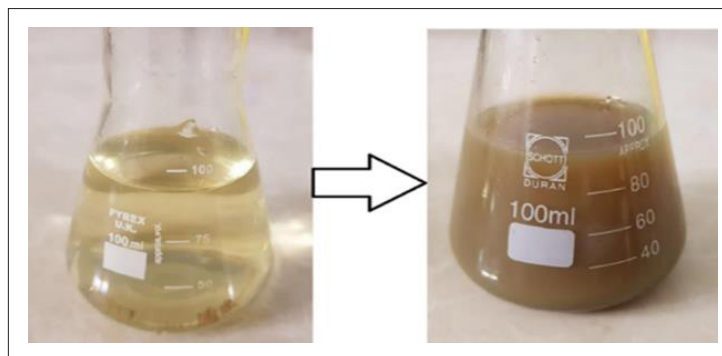
نانوذرات نقره سنتز شده

بیوسنتز نانوذرات نقره با تغییر رنگ محلول طی یک ساعت

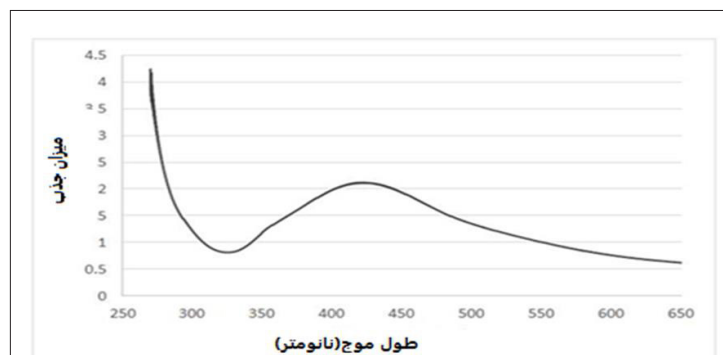
از زمان واکنش صورت گرفت. رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی گل انگشتانه به محلول نیترات نقره از بی‌رنگ به رنگ مایل به قرمز طی ۳۰ دقیقه و به تدریج در طی ۶۰

و میانگین اندازه نانوذرات ۳۳/۵ نانومتر تعیین گردید (شکل ۴ الف). نتایج میکروسکوپ TEM نشان داد که نانوذرات سنتز شده ساختار کروی دارند (شکل ۴ ب). تصویر EDS وجود عنصر نقره را در نانوذره سنتز شده نشان می‌دهد (شکل ۶) سنتز نانوذرات نقره با روش زیستی با استفاده از روش EDX مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آنالیز EDX نشان داد که در واکنش سنتزی میزان ۹۰ درصد نقره وجود دارد که نشان دهنده تایید سنتز نانوذره نقره می‌باشد پیک قوی موجود در نقاط ۱، ۳، کیلو وات نشان دهنده بیشترین میزان عنصر نقره در عصاره مشاهده شد. سیگنال‌های ضعیف موجود دیگر از قبیل Na، Cl، و طلا در نمودار EDS نشان دهنده ترکیبات آلی و معدنی موجود در عصاره گیاه هستند (شکل ۶).

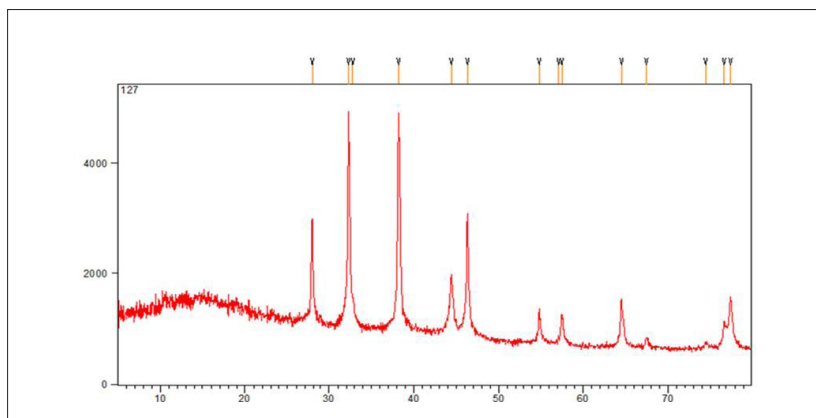
دقیقه از زمان واکنش، به قهوه‌ای تیره تغییر یافت. تغییر رنگ نشان‌دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است (شکل ۱) و وجود پیک در طول موج ۴۳۸ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف‌سنجی vis-UV طی زمان‌های مختلف واکنش تایید شد (شکل ۲). به منظور تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات نقره از پخش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد. اندازه کریستال‌های نانو ذرات نقره در ۴ پیک مجزا در ۴ زاویه مشخص شد که در پیکهای ۱۱۱ و ۲۰۰ و ۲۲۰ و ۳۱۱ زوایای ۷۷ و ۶۴ و ۴۴ و ۳۸ درجه می‌باشد (شکل ۳). تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، اندازه نانوذرات سنتز شده را در محدوده بین ۲۴/۵ تا ۴۰/۵ نانومتر نشان داد



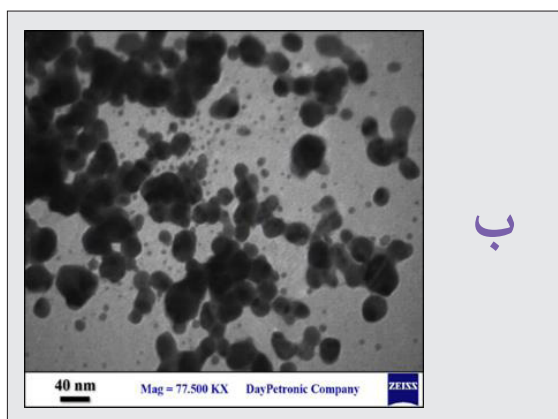
شکل ۱- سنتز نانوذرات نقره. همانطور که ملاحظه می‌شود پس از افزودن عصاره گیاه به نیترات نقره محلول حاصل از شفاف به زرد و سپس قهوه‌ای تیره تغییر رنگ می‌دهد .



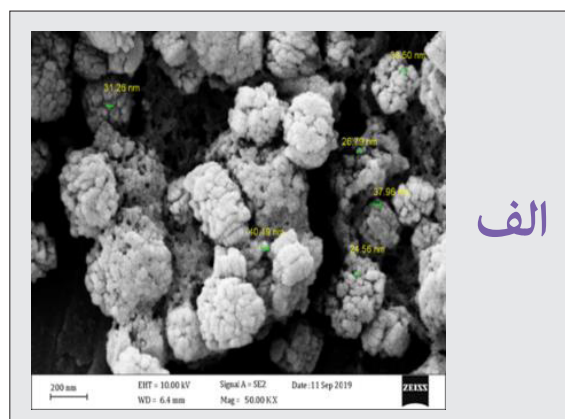
شکل ۲- طیف سنجی UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده. وجود پیک در طول موج ۴۳۸ نانومتر سنتز نانوذره نقره را تایید می‌کند.



شکل ۳- الگوی پراش اشعه ایکس به دست آمده از نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه

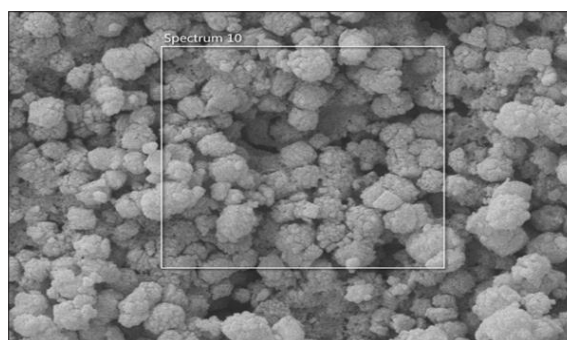


ب

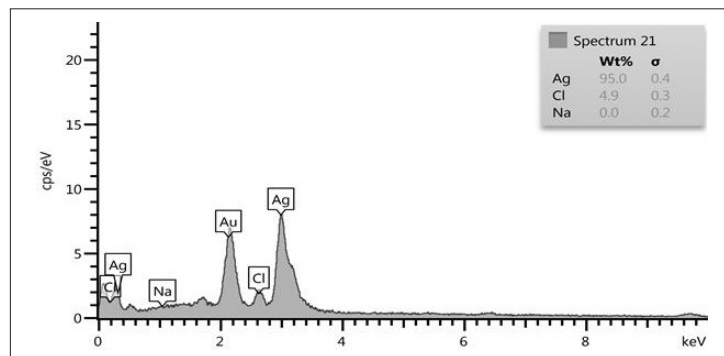


الف

شکل ۴- نتایج میکروسکوپ الکترونی (الف) نگاره: (SEM) همانطور که مشاهده می‌شود نانوذرات سنتز شده دارای ساختاری کروی و دارای میانگین اندازه ۳۳/۵ نانومتر میباشد. (ب) گذاره: (TEM)



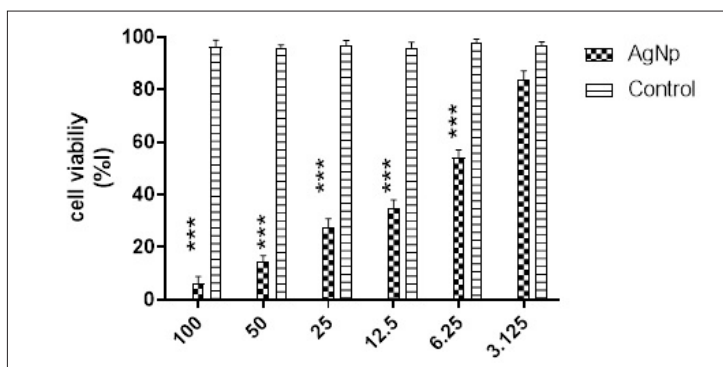
شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه.



شکل ۶- نتایج تصویر میکروسکوپ الکترونی EDX از نانوذرات نقره سنتز شده: میزان بازدهی تولید نانوذرات نقره ۹۵ درصد می باشد.

شد. نتایج حاصل از MTT نشان داد بیشترین تأثیر مهار رشد سلول‌های سرطانی مربوط به غلظت ۱۰۰ و کمترین مربوط به ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که از لحاظ آماری معنی دار بودند ($P > 0.001$) غلظت ۵۰ درصد کشندگی نانوذرات نقره سنتز شده ۱۶/۶۶ میکروگرم بر میکرولیتر تعیین شد.

بررسی درصد زنده مانده سلولی Hela تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره و عصاره گیاه گل انگشتانه بررسی درصد زنده مانده سلولی Hela تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر از نانوذره نقره با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام



نتایج براساس میانگین \pm انحراف معیار
 * : $P > 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل
 ** : $P > 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل
 *** : $P > 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل

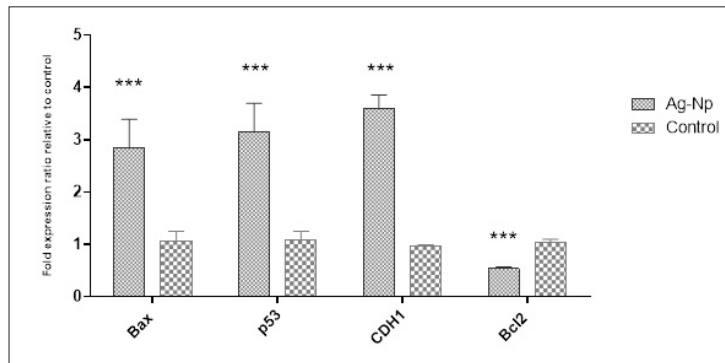
نمودار ۱- مقایسه غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر درصد زنده مانده سلول‌های سرطانی Hela پس از ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی.

MTT

بررسی در این تحقیق در گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل تغییراتی را نشان داده است. همچنین بیان ژن‌های $Po3$ ، Bax و $CDH1$ در گروه‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره غلظت (۱۶/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با ژن رفرنس کاهش در حالیکه بیان ژن $Bcl2$ افزایش معناداری را نشان داد.

بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی

در این مطالعه جهت ارزیابی بیان ژن‌های $CDH1$ ، Bax ، $Po3$ و $Bcl2$ در غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50}) در سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره از روش Real Time PCR استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بیان ژن‌های مورد



نتایج براساس میانگین \pm انحراف معیار
 * : $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل
 ** : $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل
 *** : $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل

نمودار ۲- مقایسه بیان ژنهای P53، CDH1، Bcl2، Bax و β -actin در سلولهای تیمار شده با غلظت 50 درصد کشندگی نانوذرات نقره (16/66 میکروگرم بر میکرولیتر)

بحث:

استفاده قرار می‌گیرد (۲۴). نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک به راحتی وارد سلول شده و عملکرد اجزای سلولی را به طرق مختلفی از جمله تأثیر بر پتانسیل غشایی میتوکندری و عملکرد سلول تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵،۲۶).

مطالعات بسیاری در زمینه سنتز نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاهان به انجام رسیده و تا کنون گزارش‌های مختلفی اثرات نانوذرات نقره را در رده‌های سلولی مختلف نشان داده است.

Baharara و همکارانش در بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ آویشن شیرازی بر ژنهای کاسپاز ۳/۹ و P53 بر سلولهای سرطان دهانه رحم گزارش دادند که نانوذرات نقره درصد زنده مانی سلولهای سرطانی را کاهش داده و باعث تقویت مرگ برنامه ریزی شده سلول در سلولهای تحت درمان می‌شود. آپوپتوز از طریق مسیر فعال سازی کاسپاز ۹/۳ القا شد باعث فعال شدن P53 و مرگ سلول می‌شود (۲۶).

Adebay و همکارانش اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه *Detarium microcarpum* بر رده‌های سلولی، سرطانی لوزالمعده (PANC-1) و دهانه گردن رحم (Hela) را گزارش دادند (۲۷).

یوسفی و همکاران با بررسی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه تاج خروس بر ژنهای Bcl2 و Bax سرطان پستان نتایج از MTT نشان داد این نانو ذره باعث مهار تکثیر سلولهای سرطانی به طور وابسته به غلظت و زمان شده‌اند و نتایج

در این پژوهش تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروآلکلی گیاه بومی گل انگشتانه بر رده سلول سرطانی دهانه رحم (Hela) بررسی شد. همچنین غلظت 50 درصد کشندگی برای نانو ذرات نقره 16/66 میکروگرم بر میلی‌لیتر 24 ساعت تعیین شد. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که نانوذرات نقره می‌توانند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش درصد زنده مانی سلولها شوند. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت بیان برخی ژنهای آپوپتوزی P53، Bax و Bcl2 در سلولهای سرطانی رده Hela تیمار شده با نانوذرات نقره بود.

سرطان دهانه رحم سومین عامل مرگ میر در میان زنان در سراسر جهان است (۱) و در ایران پس از سرطان پستان شایع‌ترین سرطان بوده است و پس از سرطان تخمدان دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد (۲۱). سویه‌های مختلف ویروس پاپیلوما ی انسانی، یک عفونت منتقله از طریق مقاربت جنسی، در ایجاد بیشتر موارد سرطان دهانه رحم نقش دارد (۲۲). روش‌های درمانی گران و عوارض جانبی شدید، مشکلاتی را برای بیماران ایجاد کرده است (۲۳). بنابراین تولید داروهای ضد سرطانی جدید و کارآمد به یک مسئله مهم تبدیل شده و نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود مانند خصوصیات الکترونیکی، نوری، مکانیکی، کاتالیزوری و بیولوژیکی نظر پژوهشگران زیادی را به خود جلب کرده است. در میان نانوذرات، نانوذرات نقره یکی از ترکیبات امیدوار کننده‌ای است که در پزشکی مورد

مشخص کرد بیان ژن Bax در سلول‌های تحت تیمار با نانوذره افزایش یافته و بیان ژن Bcl2 کاهش یافت، همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره باعث آسیب به DNA و تولید رادیکال‌های گونه‌های اکسیژن می‌شود (۲۸). در ۲۰۱۸ پژوهش انجام شده توسط Sathiyamoorthi و همکارانش فعالیت ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره gallnut بر چهار رده سلولی سرطان دهانه رحم، یعنی ME180، SiHa، Hela و CaSki را نشان دادند (۲۹).

در این تحقیق نیز، نتایج نشان داد القای مرگ سلولی وابسته به دوز بوده و در غلظت ۵۰ درصد کشندگی (۱۶/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی و القا آپوپتوز مشاهده شد. بنابراین نتایج پژوهش حاضر و مطالعات دیگر تایید کننده اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده و القا آپوپتوز در رده‌های مختلف سرطانی به ویژه رده سلولی Hela می‌باشد.

تحقیقات مختلف نشان داده است نانوذرات به دلیل ریز بودن قادرند به درون سلول‌ها نفوذ کرده و سبب القا

تغییرات در عملکرد سلول‌های سرطانی شوند (۳۰،۳۱). نتایج مطالعات، مکانیسم‌های احتمالی مختلفی را برای اثرگذاری نانوذرات نقره بر سلول‌های سرطانی پیشنهاد داده است. نانوذرات نقره می‌توانند با القا آسیب به DNA، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، القای اتوفاجی، تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری، نشد-LDH، اثرگذاری بر محتوای MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، رشد سلول‌های سرطانی را مهار کنند (۳۲،۳۳). همچنین نانوذرات نقره می‌توانند در رده‌های سلول سرطانی آپوپتوز را القا کنند که این مسیر می‌تواند همراه با فعالسازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول که با آزاد سازی سیتوکروم c شروع شده و افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز، تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی و در نهایت القاء مرگ سلولی باشد (۳۴،۳۵). به طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود که به نظر می‌رسد نانوذرات نقره می‌توانند جایگزین مناسب برای درمان باشند.

نتیجه‌گیری:

در این پژوهش اثر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه بر میزان بقای سلول‌ها و همچنین بیان ژن Bcl2، CDH1، Bax و P53 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم رده Hela مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت، زیست پذیری سلول‌ها را کاهش داده، همچنین نتایج تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در غلظت IC50 مشخص کرد که نانوذرات نقره

بیان ژن آپوپتوزی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. به نظر می‌رسد القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده توسط نانومواد یکی از رویکردهای جذاب در حوزه نانویوتکنولوژی و در درمان سرطان به شمار می‌رود و به طور کلی یکی از راهکارهای موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود و احتمالاً می‌تواند یک روش امیدبخش در درمان سرطان باشد که با مطالعات بیشتر در آینده به عنوان یک پیشنهاد، جهت اهداف درمانی سرطان استفاده نمود.

تقدیر و تشکر:

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد با کدپایان‌نامه ۱۰۱۲۹۰۰۶۷۴۶۰۴۲۹۱۳۹۹۱۶۲۲۹۷۱۶۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است.

تعارض منافع:

نویسندگان اعلام می‌کنند که تعارض در منافع وجود ندارد.

References

- Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*,182-169;(10167)393;2019 . **Doi:** 10.1016/S-32470(18)6736-0140X.
- Vafaeinezhad Z, Kazemi Z, Mirmoeini M, Piroti H, Sadeghian E, Mohammad Ali-Vajari M, et al. Trends in cervical cancer incidence in Iran according to national cancer registry. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*,114-108 :(161)28 .;2018.
- Ghadimi F, Mirzale A, Arasteh J. Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using Erica carnea extract on breast cancer cell line (MCF7-) and analysis of its apoptotic effects. *Razi Journal of Medical Sciences*,94-84:(6)26;2019.
- Rogers L, Siu SSN, Luesley D, Bryant A, Dickinson H O. Radiotherapy and chemoradiation after surgery for early cervical cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*,5(5;16):CD007583. **Doi:** 14651858/10.1002.CD007583.pub3.
- Shirjang S, Mansoori B, Asghari S, Duijf PH, Mohammadi A, Gjerstorff M, et al. MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*,11-1 :(2018)9. **Doi:** 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.017.
- Hage-Sleiman R, Esmerian M O, Kobeissy H, Dbaibo G. p53 and ceramide as collaborators in the stress response. *International journal of molecular sciences*,5012-4982:(3)14;2013. **Doi:** 10.3390/ijms14034982.
- Baharara J, Ramezani T, Hosseini N, Mousavi M. Silver nanoparticles synthesized coating with Zataria Multiflora leaves extract induced apoptosis in Hela cells through p53 activation. *Iranian journal of pharmaceutical research*,639-627:(2)17;2018. **Doi:** 10.22037/IJPR.2018.2191.
- Chugh H, Sood D, Chandra I. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artificial Cells. Nanomed. and Biotechnol* ,126-115 :(1)46;2018. **Doi:** 21691401.2018.1449118/10.1080.
- De Matteis V, Cascione M, Toma C C, Leporatti S. Silver nanoparticles: synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease. *Nanomaterials (Basel)* , 319 :(5)8;2018. **Doi:** 10.3390/nano8050319.
- Barabadi H, Vahidi H, Damavandi Kamali K, Rashedi M, Saravanan M. Antineoplastic biogenic silver nanomaterials to combat cervical cancer: a novel approach in cancer therapeutics. *Journal of Cluster Science*,.672-659 :(4)31;2020
- Jeyaraj M, Rajesh M, Arun R, MubarakAli D, Sathishkumar G, Sivanandhan G, et al. An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using Podophyllum hexandrum on human cervical carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,;102;2013 717- 708. **Doi:** 10.1016/j.colsurfb.2012.09.042.
- Kavoosi S , Yaghoubi H. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Green Method of Plant Extract European Marjoram (*Origanum majorana*) and Their Antibacterial Effects. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* ,173-161 :(2)30;2017.
- Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Al-Massarani S M, Saquib Q, Wahab R, et al Anticancer potential of green synthesized silver nanoparticles using extract of *Nepeta deflersiana* against human cervical cancer cells (Hela). *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 9390784::2018 ;2018. **Doi:** 9390784/2018/10.1155.
- Maroufi A, Salimi V, Majidi M. Isolation of Δ -5 3β -hydroxysteroid dehydrogenase involved in the biosynthetic pathway of cardenolides and its expression level under the influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors in foxglove (*Digitalis nervosa* L). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*..110-97 :(1)25;2017 **Doi:**10.22092/IJRFPGR.2017.109824.
- Chegini S, Tafvizi F, Noorbazargan H. Effect of *Valeriana Sysimberfolia* Extract on VEGF Expression in A549 Cell Line. *Journal of Babol University of Medical Sciences* , 228-222 :(1)22.**Doi:** 10.22088/jbums.22.1.222
- Shrivastav A, Kim HY, Kim YR. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed research international*,2013. **Doi:**581684/2013/10.1155.
- Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanic*, a leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*,4;2018 6(sup5)10-499:(1.**Doi:** 21691401.2018.1430697/10.1080.
- Khatami, M, and Pourseyedi, S. Phoenix dactylifera (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET nanobiotechnology*,.190-184:(4)9,;2015 **Doi:** 10.1049/iet-nbt.2014.0052.
- Mishra, A, and Sardar, M. Alpha-amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. *Science of*

References

- Advanced Materials, 146-13:(1)4 ,2012 **Doi:** 10.1166/sam.2012.1263.
20. Keshmand Z, Akbaribazm M, Bagheri Y, Oliaei R. The ameliorative effects of *Lactobacillus coagulans* and *Lactobacillus casei* probiotics on CCl₄-induced testicular toxicity based on biochemical, histological and molecular analyses in rat. *Andrologia*, 2021 1)53);e.13908 **Doi:** 10.1111/and.13908.
21. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Cervical cancer in Iran: integrative insights of epidemiological analysis. *BioMedicine*, 44-37 : (3)2018,8. **Doi:** 10.1051/bmdcn/2018080318.
22. Zhang Z, Zhang D, Xiao BB, Zhang R, Bai HH, Dong HY, et al. Primary study on the relationship between high-risk HPV infection and vaginal cervical microbiota. *Zhonghua fu Chan ke za zhi*, 480-471 :(7)53;2018 **Doi:** 10.3760/cma.j.issn.567-0529x.2018.07.006.
23. Verstappen C C, Heimans J J, Hoekman K, Postma T J. Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer. *Drugs*, 1563-1549:(15)63;2003 **Doi:** 00003-200363150-00003495/10.2165.
24. Lee SH, Jun, B H. (Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*, 865 :(4)20;2019. **Doi:** 10.3390/ijms20040865.
25. Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Bio interfaces*, 286-276 :128;2015. **Doi:** 10.1016/j.colsurfb.2015.01.052.
26. Panzarini E, Mariano S, Vergallo C, Carata E, Fimia G M, Mura F, et al. Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in Hela cells. *Toxicology In Vitro*, 74-64 :41;2017 **Doi:** 10.1016/j.tiv.2017.02.014.
27. Baharara J, Ramezani T, Hosseini N, Mousavi M. Silver nanoparticles synthesized coating with *Zataria Multiflora* leaves extract induced apoptosis in Hela cells through p53 activation. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 639-627:(2)17 ;2018. **Doi:** 10.22037/IJPR.2018.2191.
28. Adebayo IA, Arsad H, Gagman H A, Ismail N Z, Samian M R. Inhibitory effect of eco-friendly naturally synthesized silver nanoparticles from the leaf extract of medicinal *Detarium microcarpum* plant on pancreatic and cervical cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 1252-1247 :(5)21 ;2020. **Doi:** 10.31557/APJCP.2020.21.5.1247.
29. Rad HY, Neamati A, Ardalan T. Study of Apoptotic Properties of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using *Amaranthus cruentus* Extract in Breast Cancer Cells (MDA). *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* , 58-53 : (2) 11;2019. **Doi:** 10.29252/nkjmd110208-.
30. Sathiyamoorthi E, Iskandarani B, Salunke B. K, Kim BS. Biomedical potential of silver nanoparticles biosynthesized using gallnut extract. *Green Materials*, 57-48 :(2)6;2018. **Doi:** 10.1680/jgrma.17.00032.
31. Sarkar S, Kotteeswaran V. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous leaf extract of Pomegranate (*Punica granatum*) and their anticancer activity on human cervical cancer cells. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 025014:(2)9;2018.
32. Srekanth TVM, Pandurangan M, Kim DH, Lee YR. . Green synthesis: in-vitro anticancer activity of silver nanoparticles on human cervical cancer cells. *Journal of Cluster Science*, 681-671 :(2)27 ;2018 **Doi:** 10.1007/s9-0964-015-10876.
33. Saleh S, Shandiz S A S, Ghanbar F, Darvish M R, Ardestani MS, Mirzaie A, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *International journal of nanomedicine*, 1846-1835 :(11);2016. **Doi:** 10.2147/IJN.S99882.
34. Salehzadeh A, Sadat Shandiz A, Naeemi AS. Cytotoxicity effectiveness of biosynthesized silver nanoparticles on breast cancer T47D cell line, using macro algae *Laurencia caspica* extract. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 61-52 :(1)26;2018 **Doi:** 10.29252/sjim.26.1.52.
35. Behboodi S, Baghbani-Arani F, Abdalan S, Sadat Shandiz SA. Green engineered biomolecule-capped silver nanoparticles fabricated from *Cichorium intybus* extract: in vitro assessment on apoptosis properties toward human breast cancer (MCF7-) cells. *Biological trace element research*, 402-392 :(2)187;2019 **Doi:** 10.1007/s0-1392-018-12011.