

# بررسی خواص ضد سرطانی نانوذرات نقره بر روی سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه در مقایسه با سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293)

ساجده داعی، رقیه عباسعلی پورکبیره، نسرین ضیاءمجیدی\*

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶

## چکیده

**زمینه و هدف:** نانوتکنولوژی یک حوزه تحقیقاتی جدید همراه با کاربردهای گسترده در مدیریت سرطان می‌باشد. از میان نانوذرات فلزی مختلف، نانوذرات نقره به دلیل دارا بودن پتانسیل ضد توموری بالا، در درمان بسیاری از سرطان‌ها استفاده شده است. علی‌رغم مزایای بالقوه این نانوذرات، میزان تأثیر آن‌ها بر روی سلول‌های نرمال به یک چالش تبدیل شده است. علاوه بر این، تا کنون اثرات ضد سرطانی آن‌ها بر روی سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه به خوبی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره بر میزان بقای سلول‌های توموری ۵۶۳۷ سرطان مثانه در مقایسه با سلول‌های نرمال کلیه جنینی HEK-293 بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، بقای سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه و سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293) ۲۴ ساعت پس از تیمار با نانوذرات نقره ۵۰-۳۰ نانومتری با غلظت‌های (۱۲۵-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به وسیله آزمایش MTT (دی متیل تیازول-دی فنیل تترازولیوم بروماید) بررسی گردید. همچنین تغییرات مورفولوژیکی به وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. سطح بیان ژن VEGFA و میزان مهاجرت سلولی به ترتیب با روش‌های واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی و تست خراش مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری شاپیرو وایک، آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه، تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش میزان بقای سلول‌های ۵۶۳۷ و HEK-293 پس از تیمار با نانوذرات نقره به صورت وابسته به دوز بوده، که این کاهش در سلول‌های توموری ۵۶۳۷ به صورت قابل توجهی بیشتر از سلول‌های نرمال HEK-293 بوده است ( $p < 0/05$ ). علاوه بر این، تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره منجر به کاهش قابل توجه در بیان ژن VEGFA ( $p < 0/05$ ) و مهار مهاجرت سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه گردید ( $p < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات نقره می‌توانند بقای سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه و سلول‌های نرمال HEK-293 را کاهش دهند، به طوری که اثرات مهاری آن‌ها بر بقای سلول‌های توموری ۵۶۳۷ نسبت به سلول‌های نرمال به طور قابل توجهی بیشتر می‌باشد. همچنین نانوذرات نقره سبب کاهش مهاجرت سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه نیز می‌شوند.

**واژه‌های کلیدی:** نانوذرات نقره، روش MTT، سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه، سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK-293)

\*نویسنده مسئول: نسرین ضیاءمجیدی، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه بیوشیمی بالینی

Email: n\_ziamajidi@yahoo.com

## مقدمه

جایی که میزان بروز آن در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است، به نظر می‌رسد بار بهداشتی در سطح جهانی به وسیله این سرطان در آینده افزایش یابد (۷ و ۶). علی‌رغم پیشنهادها و درمان‌های اخیر به منظور درمان این سرطان، میزان عود تومور زیاد است که به همین علت شیمی درمانی نیز استفاده می‌شود. بنابراین، برای درمان سرطان و همچنین کاهش عود آن، نیاز چشمگیر به فناوری‌های جدید وجود دارد. اخیراً یک پنجره درمانی امیدوار کننده با واسطه نانوذرات برای درمان‌های مؤثرتر ارائه شده است (۹ و ۸). در طی دهه گذشته نانوتکنولوژی با کاربردهای متفاوت و جدید به سرعت توسعه یافته است. با توجه به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد نانوذرات که ممکن است با انواع حجیم آن‌ها متفاوت باشد، چشم‌اندازهای جدیدی از کاربردهای تجاری و علمی با واسطه نانوذرات فراهم شده است. در زمینه پزشکی، فناوری نانو پیشرفت‌های امیدوار کننده‌ای را در استراتژی‌های تشخیص و درمان سرطان از جمله از بین بردن تومور و هدف قرار دادن آن، از خود نشان داده است (۱۰). بسیاری از مزیت‌های نانوذرات فلزی پیرامون تکنولوژی و کاربردهای پزشکی به طور فزاینده‌ای در حال نمایان شدن هستند. نانوذرات فلزی به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم زیاد و محدودیت فضایی دارای خصوصیات ویژه‌ای از جمله ویژگی‌های نوری، الکترونیکی، حرارتی و کاتالیزوری هستند (۱۱). در میان

سرطان یک بیماری پیچیده می‌باشد که در آن سلول‌های نرمال بدن به سلول‌های غیر طبیعی تبدیل شده و رشد کنترل نشده‌ای از خود نشان می‌دهند، بنابراین بافت غیرنرمالی تشکیل می‌شود که تومور نام دارد (۲ و ۱). طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی، سالانه ۱۴ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان شناسایی می‌شود و طبق پیش‌بینی‌ها، تا سال ۲۰۳۰ این عدد به ۲۶ میلیون خواهد رسید (۲). سرطان مثانه شایع‌ترین نئوپلاسم بدخیم دستگاه ادراری بوده که از نظر بافت‌شناسی و نشانه‌های بالینی یک بیماری هتروژن شناخته می‌شود. تقریباً ۳ درصد از تمام تشخیص‌های جدید سرطان و ۲/۱ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان به دلیل سرطان مثانه است (۳). به علاوه، این بدخیمی پنجمین سرطان شایع در مردان ایرانی است. میزان شیوع این سرطان در جمعیت ایرانی ۳۳/۲ در هر ۱۰۰۰۰ نفر می‌باشد که این میزان در مردان ۴/۸ برابر بیشتر از زنان است (۴). حدود ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به این سرطان در زمان تشخیص مبتلا به نوع غیر تهاجمی هستند و ۳۰ درصد باقیمانده از سرطان مثانه از نوع مهاجم به عضله است که حتی پس از جراحی و درمان سیستمیک با خطر بالای متاستاز و پیشرفت همراه است (۵). شیوع سرطان مثانه از همه بدخیمی‌های ارولوژیک بالاتر است. در طول سه دهه گذشته شیوع این سرطان به طور قابل توجهی رو به افزایش است. از آن

پروآنژیوژنیک کلیدی مشتق شده از تومور است که در عملکردهای مختلفی نقش دارد مثل (تحریک آنژیوژنز، واسکولوژنیز، التهاب و نفوذپذیری عروق) (۱۹). از آن جایی که مهار رونوشت‌های VEGF-A به میزان قابل توجهی زنده ماندن سلول‌های سرطانی مثانه را کاهش می‌دهد، بنابراین می‌تواند نقش اساسی در پیشرفت سرطان مثانه داشته باشد (۲۰). پژوهش‌های گزارش کرده‌اند که نانوذرات نقره باعث مهار تکثیر سلولی ناشی از VEGF، مهاجرت و بقای سلولی از طریق مسیر وابسته به PI3K/Akt می‌شوند (۲۱). همچنین گزارش شده است نانوذرات نقره در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم سمیت بیشتری ایجاد می‌کنند که به دلیل تفاوت در شرایط سلولی آن‌ها می‌باشد (۲۲ و ۲۳). اخیراً در علم نانوفناوری و پزشکی تقاضا برای نانوذرات نقره به دلیل ماهیت بسیار مؤثر آن بیشتر شده است (۲۴). با وجود داشتن طیف گسترده‌ای از کاربردهای پزشکی، مشخصات ایمنی نانوذرات نقره به خوبی مشخص نشده است و نیاز به بررسی دارد. به همین دلیل، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات نقره بر روی سلول‌های توموری ۵۶۳۷ مثانه در

نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره (Ag NPs) به عنوان یکی از متداول‌ترین نانومواد با کاربردهای گسترده شناخته می‌شوند (۱۲). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که مکانیسم سمیت سلولی نانوذرات نقره شامل اختلال در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و قطع سنتز ATP است که به نوبه خود باعث آسیب به DNA می‌شود (۱۳). چندین مکانیسم مختلف به ویژه تولید بیش از حد ROS، در سمیت ناشی از نانوذرات نقره مشارکت می‌کند. از آن جایی که سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های عادی نسبت به سطوح افزایش یافته ROS حساس هستند (۱۴). مرگ سلولی ممکن است به دنبال افزایش سطح ROS در حضور داروهای ضدسرطانی در سلول‌های توموری القا شود (۱۵ و ۱۶).

به تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق پیشین، آنژیوژنز یا رگ‌زایی گفته می‌شود که در شرایط پاتولوژیک از جمله رشد و متاستاز تومور و همچنین در برخی از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند ترمیم زخم و تولید مثل نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۷). تنظیم افزایشی محرک‌های آنژیوژنیک همراه با کاهش بیان مهارکننده‌های آن می‌تواند مسیرهای هدایت آنژیوژنز را تسهیل و در نتیجه به رشد بیشتر تومور کمک می‌کند (۱۸). در حقیقت تومورها چندین فاکتور رشد پروآنژیوژنیک را ترشح می‌کنند که در میان آن‌ها فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)<sup>(۱)</sup> یک فاکتور

1-Vascular Endothelial Growth Factor

مقایسه با سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293) بود.

جنینی (HEK-293) با استفاده از سنجش MTT (دی‌متیل‌تيازول - ۲ و ۶ دی‌فنیل تترازولیوم برمید) بررسی شد.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، رده سلولی ۵۶۳۷ سرطان مثانه و رده سلولی کلیه جنینی انسان (HEK-293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های خریداری شده در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (KFBS100) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin) (BI-1203) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ °C و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۲ تا ۳ روز با استفاده از تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد پاساژ داده شده و همه آزمایشات از پاساژ دوم تا دهم انجام شد. نانوذرات نقره با شکل کروی و با ابعاد تقریبی ۳۰-۵۰ نانومتر و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان، نانوشانی (مشهد، ایران) خریداری شده و رقت‌های مورد آزمایش با استفاده از محیط کشت RPMI و به صورت تازه تهیه گردید. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)<sup>(۱)</sup> مربوط به نانوذرات نقره در شکل ۱ نشان داده شده است.

بدین منظور سلول‌های ۵۶۳۷ و HEK-293 به ترتیب با تراکم  $2 \times 10^4$  و  $11 \times 10^3$  سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از رسیدن به درجه اشباع مورد نظر، با غلظت‌های (۰، ۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۵) از نانوذرات نقره تیمار شدند. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۴-۳ ساعت انکوباسیون انجام شد. سپس محیط رویی هر چاهک خارج گردید و به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازان ۱۰۰ میکرو لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها با استفاده از Elisa reader (RT-2100C Microplate Reader, China) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که ابتدا میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک از چاهک‌های دیگر کم شده و درصد بقای سلول‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه تیمار شده}}{\text{جذب کنترل}} = \text{درصد بقای سلولی}$$

جهت تعیین اثرات نانوذرات نقره بر شکل سلول‌ها، تغییرات مورفولوژیک نیز ارزیابی شد. برای این کار ابتدا سلول‌های ۵۶۳۷ و HEK-293 به ترتیب با تراکم  $3 \times 10^4$  و  $2 \times 10^4$  در پلیت ۶ خانه رشد داده

اثر نانوذرات نقره بر میزان بقای سلول‌های سرطانی ۵۶۳۷ سرطان مثانه و سلول‌های نرمال کلیه

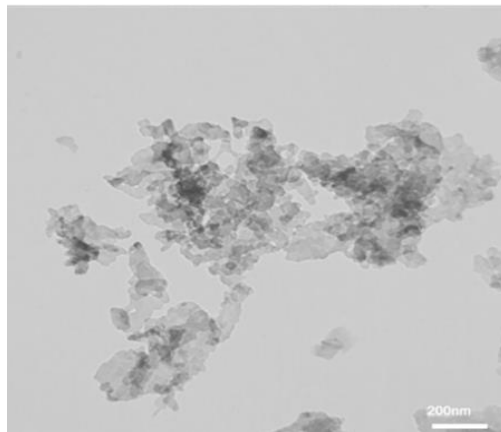
اطمینان نسبی از اندازه مورد انتظار محصولات PCR در طول آزمایش‌های ابتدایی، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

در این تحقیق به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره بر مهاجرت سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه از تست خراش یا Wound-healing assay استفاده شد. به طور خلاصه، سلول‌های ۵۶۳۷ با تراکم  $2 \times 10^5$  سلول در هر چاهک در پلیت شش خانه کاشته شدند. در طول مدت کشت میزان FBS در محیط کشت از ۱۰ درصد به ۲ درصد کاهش یافت. پس از رسیدن به تراکم سلولی مناسب، خراش با استفاده از یک سرسمپلر زرد در وسط چاهک‌ها ایجاد شد. پس از آن، سلول‌ها با غلظت‌های (۶۰، ۵۰ و ۰) تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. فضای ایجاد شده به وسیله میکروسکوپ معکوس ( Nikon Eclipse TS 100) در زمان ۰ و ۲۴ ساعت بررسی شد. سرانجام، مساحت فضای باقی مانده نسبت به زمان صفر با استفاده از نرم افزار Image J محاسبه شده و درصد مهاجرت نسبت به کنترل بیان گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Graph Pad Prism و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک، آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه، تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن به درجه اشباع مورد نظر، سلول‌ها با غلظت برابر از نانوذرات تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تغییرات مورفولوژیک به وسیله میکروسکوپ نوری معکوس (Nikon Eclipse TS 100) و با بزرگنمایی  $\times 10$  ارزیابی گردید.

در این مطالعه اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن VEGFA مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا RNA کل از سلول‌های ۵۶۳۷ به وسیله محلول کیازول (کیازیسیت، ایران) استخراج گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده به ترتیب از نانودراپ و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سپس از طریق واکنش رونویسی معکوس و به وسیله کیت شرکت بایوفکت (BioFact™ RT Series cDNA synthesis kit , Korea)، cDNA ساخته شد. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ACTB و VEGFA به کمک نرم‌افزار primer3 طراحی و سپس با استفاده از نرم‌افزار primer blast تأیید شدند. جهت انجام واکنش qRT-PCR، از Syber Green محصول شرکت AMPLIQON و دستگاه time-PCR Real Light Cycloer® 96 (Roche Life science) مدل استفاده شد. در نهایت، تغییرات بیان ژن VEGFA نسبت به بیان ژن بتا اکتین (ژن رفرانس) و با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید (۲۶). همچنین برای



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات نقره برگرفته از شرکت نانو مواد ایرانیان (نانوآنی)

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

| Gene           | Forward              | Reverse              | Product size(bp) |
|----------------|----------------------|----------------------|------------------|
| $\beta$ -actin | AAGATCAAGATCATTGCT   | TAACGCAACTAAGTCATA   | 177              |
| VEGFA          | CTTGCCTTGCTGCTCTACCT | GTGATGATTCTGCCCTCCTC | 81               |

#### یافته‌ها

بقای سلول‌های کلیه جنینی HEK-293 در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره پس از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب به ۷۷/۲۲±۲۲/۴۱، ۷۰/۶۶±۲/۳۱ و ۵۹/۰۸±۵/۰۴۸ درصد نسبت به سلول‌های تیمار نشده (۱۰۰ درصد زنده‌مانی) کاهش یافت. در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵/۶، ۷/۸ و ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت میزان بقای سلول‌ها بالای ۸۰ درصد بوده است (شکل ۲-ب).

با توجه به شکل ۳ اثرات مهاري نانوذرات نقره بر بقای سلول‌های HEK-293 بسیار بیشتر از سلول‌های HEK-293 می‌باشد. بین دو نمودار حاصل از میزان بقای سلول‌های HEK-293 و HEK-293 در حضور نانوذرات نقره اختلاف معناداری وجود دارد ( $p < 0.001$ ). نتایج حاصل از مقایسه بین دو نمودار حاکی از حساسیت بیشتر سلول‌های توموری HEK-293

همان‌طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود، بقای سلول‌های HEK-293 در تیمار با غلظت‌های ۱۲۵، ۶۲/۵، ۱۵/۲۵، ۳۱/۲۵ و ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، کاهش معنی‌داری پیدا کرده است ( $p < 0.001$ ). غلظت مهاري ۵۰ درصد (IC50) از نتایج حاصل از آزمایش MTT و با استفاده از نرم‌افزار گرف پد پریسم ۹، ۴۹/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

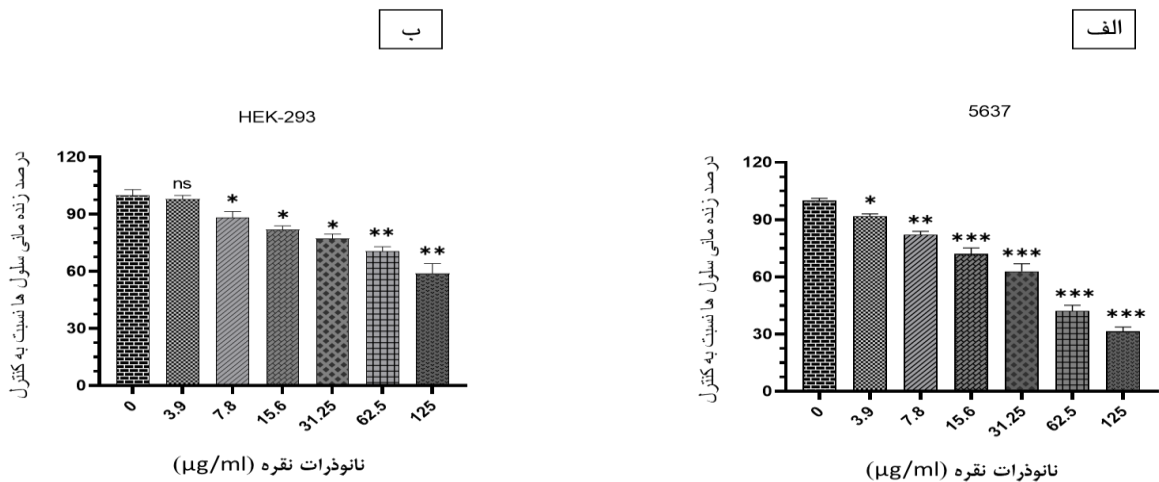
اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر زنده‌مانی سلول‌های نرمال کلیه جنینی HEK 293 در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده با استفاده از آزمایش MTT در زمان ۲۴ ساعت حاکی از کاهش بقای سلول‌های HEK-293 به صورت وابسته به دوز می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از MTT، درصد

با توجه به نتایج حاصل از qRT-PCR پس از تیمار با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره اختلاف معنی‌داری در بیان ژن VEGFA نسبت به سلول‌های تیمار نشده مشاهده نشد (شکل ۵) ( $p > 0.05$ ). اگرچه در تیمار با غلظت نزدیک به  $IC_{50}$  (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش ۲ برابری ( $p = 0.01$ ) و در تیمار با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش ۳/۴ برابری ( $p = 0$ ). نسبت به سلول‌های تیمار نشده مشاهده گردید (شکل ۵).

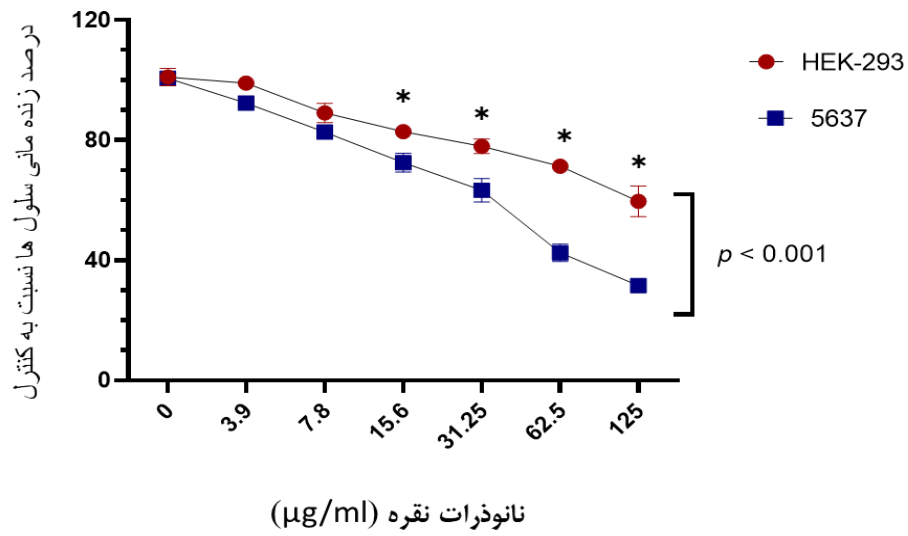
همان‌طور که در شکل ۶ قسمت الف و ب نشان داده شده است، پس از گذشت ۲۴ ساعت از ایجاد خراش میزان مهاجرت سلول‌ها در گروه‌های دریافت کننده ۶۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره به مقدار قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $p < 0.001$ ).

نسبت به سلول‌های HEK-293 در برابر نانوذرات نقره می‌باشد.

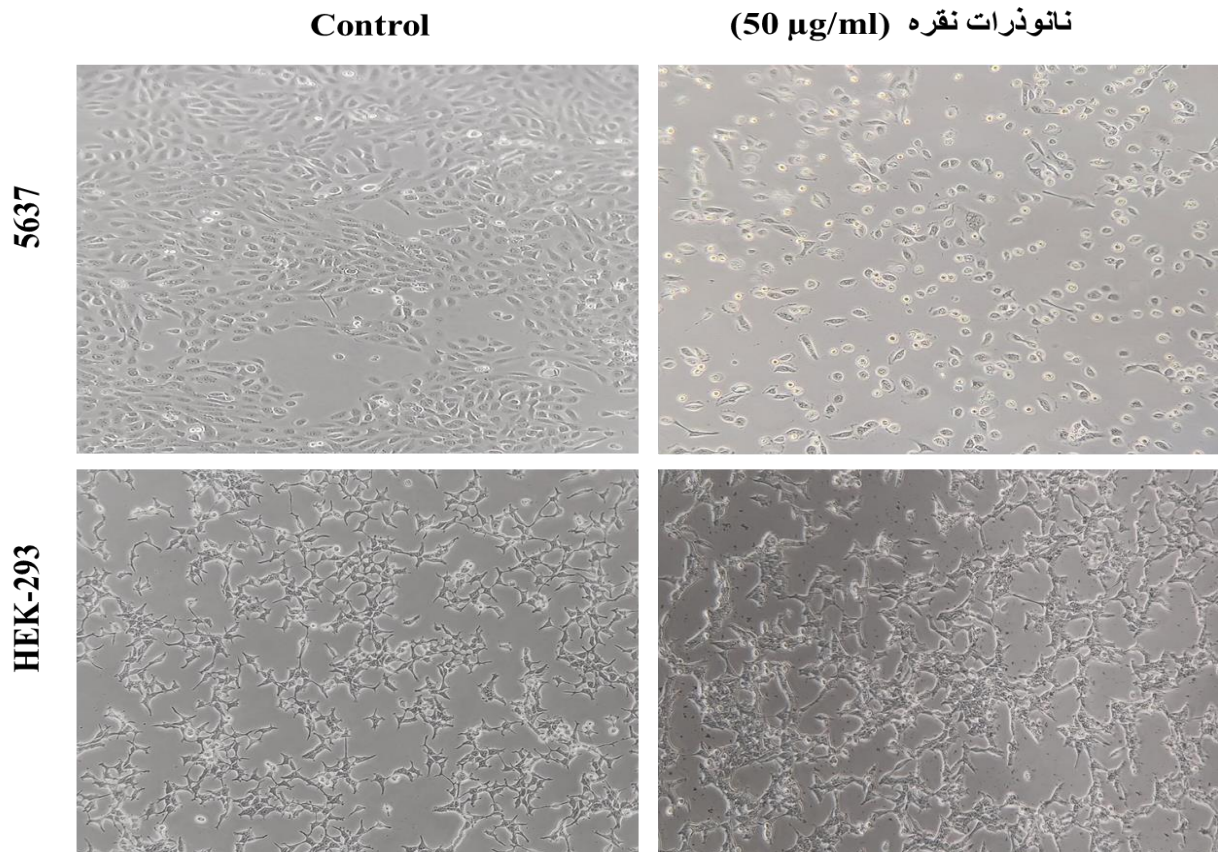
همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، پس از تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های ۵۶۳۷ تغییرات مورفولوژیکی واضحی نسبت به سلول‌های تیمار نشده مشاهده می‌شود به طوری که پس از تیمار با نانوذرات نقره تعداد سلول‌های ۵۶۳۷ کاهش یافته و سلول‌ها از حالت طبیعی خارج شده‌اند. شکل سلول‌های ۵۶۳۷ از حالت اپی‌تلیالی به حالت دایره‌ای تغییر پیدا کرده است. تغییرات مورفولوژیکی ایجاد شده در رده سلولی نرمال HEK-293 نسبت به سلول‌های توموری ۵۶۳۷ در غلظت برابر نانوذرات بسیار کمتر می‌باشد، زیرا شکل طبیعی سلول‌ها تا حد زیادی حفظ شده و تغییر قابل توجهی در تعداد سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل مشاهده نشد.



شکل ۲: اثرات نانوذرات نقره بر بقای سلول‌های الف) ۵۶۳۷ سرطان مثانه و ب) نرمال کلیه جنینی (HEK-293) با استفاده از آزمایش MTT. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) نشان داده شده است  
 $p < 0.05$ ، \*  $p < 0.01$ ، \*\*  $p < 0.001$ ، \*\*\*: اختلاف معنی‌دار با سلول‌های تیمار نشده (کنترل) (تعداد=۳)

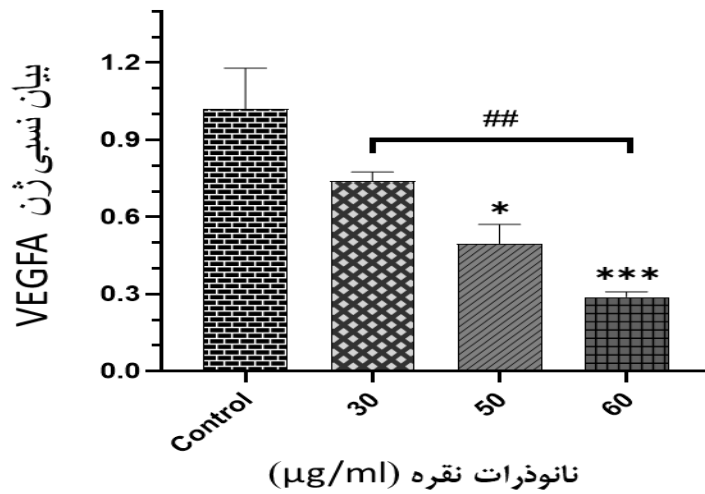


شکل ۳: مقایسه اثرات نانو ذرات نقره بر بقای سلول‌های توموری ۵۶۳۷ و سلول‌های نرمال HEK-293  
 \*p < ۰/۰۰۵ مقایسه بین رده سلولی نرمال و توموری



شکل ۴: مقایسه تغییرات مورفولوژیک در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ و سلول‌های HEK-293 در حضور نانو ذرات نقره (Ag NPs)

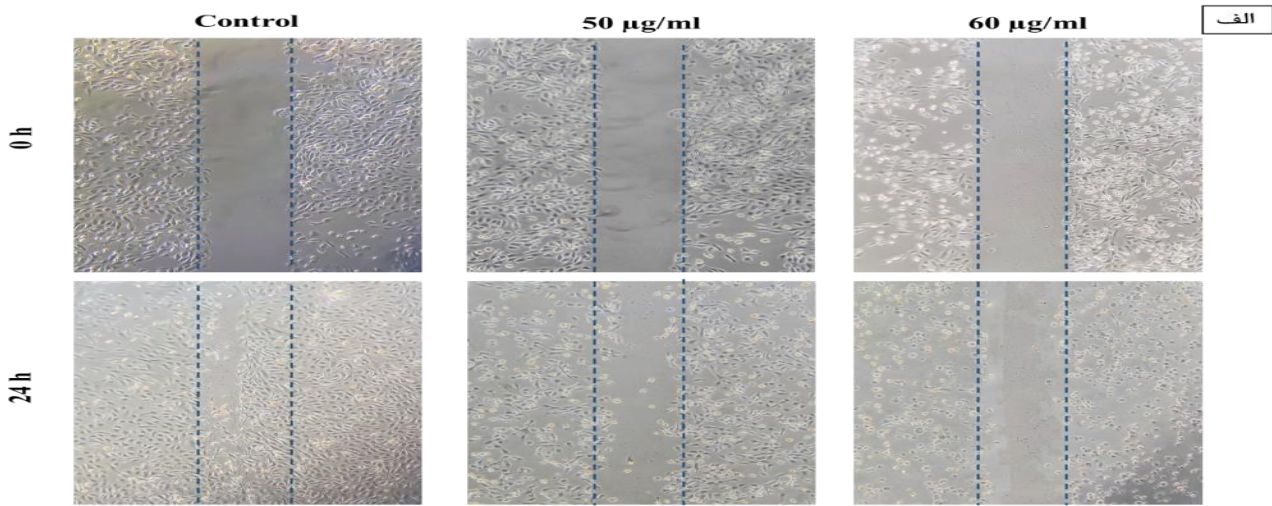




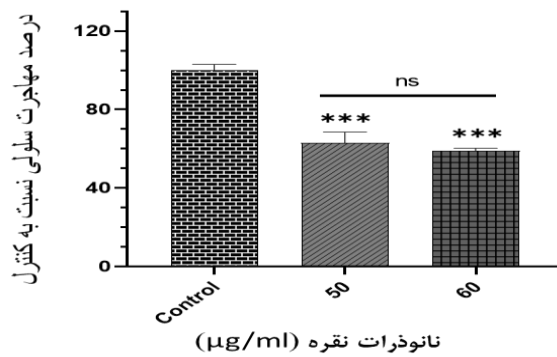
شکل ۵: اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن VEGFA در سلول‌های ۵۶۳۷

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SD نشان داده شده‌اند.

$p < 0.05$  \* و  $p < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل (n=3).



ب



شکل ۶: اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره بر مهاجرت سلول‌های ۵۶۳۷

$p < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل.

ns: عدم معنی‌داری بین گروه‌های مختلف.

## بحث

سرطان به عنوان یک نگرانی بهداشت جهانی در دنیا شناخته می‌شود. علی‌رغم استفاده از چندین روش درمانی از جمله جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی، یا ترکیبی از آن‌ها، شیوع این بیماری به سرعت رو به افزایش است. بنابراین، کشف ترکیبات جدید به منظور کاهش عوارض جانبی درمان‌های رایج مهم شناخته شده است. در این زمینه، فناوری نانو نقشی حیاتی در مدیریت محدودیت‌های رایج پزشکی ایفا می‌کند (۲۸ و ۲۷). هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره بر میزان بقای سلول‌های توموری ۵۶۳۷ سرطان مثانه در مقایسه با سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293) بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره استفاده شده، اثرات سمی قابل توجهی بر روی سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه دارند در حالی که اثرات سمی آن‌ها بر سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293) بسیار کمتر است. در همین راستا، احمدیان و همکاران گزارش کرده‌اند که نانوذرات نقره با سایز تقریبی ۳۰ نانومتر اثرات سمی قابل توجهی بر روی سلول‌های کارسینومای کبدی (HepG2) پس از گذشت ۴۸ ساعت داشته و میزان IC50 ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (۲۵). در حالی که در تحقیق آنان غلظت زیر ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت اثرات سمی قابل توجهی را بر روی سلول‌های سرطانی کبد نشان نداده است. در مطالعه‌ای (۲۹) مشابه با نتایج تحقیق حاضر بقای

سلول‌های HEK-293 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بالای ۵۰ درصد گزارش شده است. برخی از محققان گزارش کرده‌اند که بقای سلولی بالای ۵۰ درصد پس از تیمار با نانوذرات حاکی از غیرسمی بودن آن‌ها می‌باشد در حالی که بقای سلولی زیر ۵۰ درصد نشان‌دهنده سمیت سلولی نانوذرات استفاده شده است (۳۰). در مطالعه‌ای دیگر نیز پتانسیل سمیت اختصاصی نانوذرات نقره با سایز ۲-۲۰ نانومتر را در رده‌های سلولی MCF-7 (آدنوکارسینومای پستان)، A431 (سرطان پوست) و HepG2 (هپاتوما) نسبت رده سلولی نرمال HEK-293 بررسی شد. نتایج تحقیق آنان نشان می‌دهد که سمیت نانوذرات نقره بر روی سلول‌های سرطانی به صورت وابسته به دوز بوده، اما بر سلول‌های نرمال HEK-293 تأثیر قابل توجهی ندارد (۳۱). علاوه بر این، سمیت نانوذرات نقره‌ی ساخته شده به روش زیستی و با سایز ۵۰-۲۰ نانومتر بر روی سلول‌های نرمال (CHANG) و سرطان کبد (HuH-7) بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره تکثیر سلول‌ها را به روشی وابسته به غلظت مهار می‌کنند و سلول‌های HuH-7 نسبت به سلول‌های CHANG حساسیت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات نقره نشان دادند (۳۰). علاوه بر این، در تحقیق حاضر و مطالعه حاجبی و همکاران (۳۲) نشان داده شده که نانوذرات نقره سبب تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی از جمله کاهش سایز و تعداد سلول‌ها در سلول‌های سرطانی می‌شوند که حاکی از اعمال اثرات

منجر به کاهش قابل ملاحظه بیان ژن VEGF در رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB231) می‌شوند و تأکید کرده‌اند که نانوذرات نقره پتانسیل خوبی برای سرکوب سرطان پستان دارند (۳۴). همچنین، در تحقیق بهارآرا و همکاران نیز همانند مطالعه حاضر نشان داده شد که تیمار با نانوذرات نقره منجر به کاهش بیان ژن VEGFA در سلول‌های سرطان دهانه رحم (Hella) می‌شود (۳۵).

فرآیند آنژیوژنز خون‌رسانی به سلول‌های سرطانی را تسهیل کرده و به پیشرفت تومور، حمله و متاستاز کمک می‌کند. کشف مواد ضد آنژیوژنز (عدم تأمین خون‌رسانی) منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی به منظور درمان سرطان می‌شود. مکانیسم اصلی عملکرد داروهای آنتی‌آنژیوژنیک اتصال به فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است، بنابراین مانع از هرگونه اتصال فاکتورهای رشد به گیرنده‌های مربوطه مانند گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR) می‌شوند. پیوند بین فاکتور رشد و گیرنده آن اصلی‌ترین روشی است که باعث ایجاد رگ‌های خونی جدید می‌شود. با توجه به این واقعیت که VEGFA یک محرک حیاتی برای آنژیوژنز در سلول‌های توموری است (۲۷)، به نظر می‌رسد ساخت عوامل ضد سرطان مبتنی بر VEGFA برای جلوگیری از پیشرفت سرطان از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود.

کاهش بیان ژن VEGFA و سرکوب مهاجرت سلولی در این مطالعه نشان داد که این نانوذرات

سمی به وسیله نانوذرات بر سلول‌های سرطانی می‌باشد. همچنین، هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای تغییرات مورفولوژیکی و کاهش تراکم سلولی در رده‌های سرطانی مشاهده شد که این تغییرات در رده نرمال کلیه جنینی HEK-293 بسیار کمتر بوده است (۳۱).

نتایج مطالعه حاضر و پژوهش‌های ذکر شده بیان می‌کنند که نانوذرات نقره در سلول‌های سرطانی تا حد زیادی به صورت اختصاصی عمل کرده که بیانگر پتانسیل مناسب این نانوذرات برای به کارگیری به عنوان یک ماده ضد سرطانی است. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های مشاهده شده در اثرات مهاری تا حدی به تفاوت در اندازه یا روش سنتز آن‌ها مربوط است و حتی ممکن است به پاسخ‌های متفاوت فیزیولوژیکی در سلول‌های مختلف نیز بستگی داشته باشد. جذب نانوذرات نقره نیز در سلول‌های مختلف، متفاوت است، اما اندوسیتوز و فاگوسیتوز دو روش اساسی جهت جذب نانوذرات نقره در سلول بیان شده‌اند که محدوده جذب به سایز نانوذره و نوع سلول بستگی دارد (۳۳).

در نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشاهده گردید که نانوذرات نقره بیان ژن VEGFA، یکی از فاکتورهای مهم در فرآیند آنژیوژنز، را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. علاوه بر این، نتایج تست خراش حاکی از آن است که نانوذرات نقره استفاده شده به صورت قابل توجهی میزان مهاجرت سلول‌های توموری ۵۶۳۷ را نیز کاهش می‌دهند. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، حاجبی و همکاران گزارش نموده‌اند که نانوذرات نقره

صورت معنی‌داری بیشتر است. علاوه بر این، نانوذرات نقره می‌توانند بیان ژن VEGFA و مهاجرت سلولی را در سلول‌های سرطانی ۵۶۳۷ کاهش دهند.

### تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1399.203 می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی این مطالعه تشکر و قدردانی نمایند.

می‌توانند مهاجرت در سلول‌های ۵۶۳۷ سلول را کاهش دهند. اگرچه پیشنهاد می‌شود پروتئین VEGFA در لیزات و یا سوپرناتانت سلولی اندازه‌گیری شود که می‌توان آن را یکی از محدودیت‌های این مطالعه دانست. هم چنین با توجه به اثرات آپوپتوتیک این نانوذرات در سلول‌های سرطانی (۳۶)، پیشنهاد می‌شود که اثرات آپوپتوتیک آن در رده سلولی ۵۶۳۷ با استفاده از پارامترهای مختلف از جمله اندازه‌گیری پروتئین Bax<sup>(۱)</sup> و Bcl-2<sup>(۲)</sup> ارزیابی شود. به علاوه، بر اساس مشاهدات تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد حساسیت سلول‌های سرطانی در برابر نانوذرات نقره بیشتر از سلول‌های نرمال کلیه جنینی (HEK-293) است. اگرچه بهتر است سمیت اختصاصی این نانوذرات در رده سلولی ۵۶۳۷ به طور هم‌زمان با سلول‌های سالم مثانه مقایسه شود. همچنین، آزمایشات حیوانی نیز به منظور به کارگیری این نانوذرات در درمان سرطان مثانه و یا دیگر سرطان‌ها پیشنهاد می‌شود. علی‌رغم تلاش‌های تحقیق حاضر برای یافتن اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره بر روی سلول‌های سرطانی مثانه، پژوهش‌های بیشتری برای بررسی مسیرهای مرتبط با آنژیوژنز در سرطان مثانه نیاز است.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، بقای سلول‌های ۵۶۳۷ سرطان مثانه در حضور نانوذرات نقره کاهش می‌یابد به طوری که میزان این کاهش در مقایسه با سلول‌های نرمال کلیه جنینی HEK-293 به

## REFERENCES

1. Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Molecules and Cells* 2011; 31(4): 295-302.
2. Thun M, DeLancey J, Center M, Jemal A, Ward E. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 100-10.
3. Richters A, Aben KK, Kiemeny LA. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World Journal of Urology* 2020; 38(8): 1895-904.
4. Farmanfarma KK, Mahdavi N, Salehiniya H. Bladder cancer in Iran: an epidemiological review. *Research and Reports in Urology* 2020; 12: 91.
5. Isharwal S, Konety B. Non-muscle invasive bladder cancer risk stratification. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India* 2015; 31(4): 289.
6. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology* 2013; 63(2): 234-41.
7. Wong MC, Fung FD, Leung C, Cheung WW, Goggins WB, Ng C. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 1-12.
8. Rouanne M, Loriot Y, Lebret T, Soria JC. Novel therapeutic targets in advanced urothelial carcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016; 98: 106-15.
9. Liu Y, Crawford BM, Vo-Dinh T. Gold nanoparticles-mediated photothermal therapy and immunotherapy. *Immunotherapy* 2018; 10(13): 1175-88.
10. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* 2011; 201(1): 27-33.
11. Reddy NV, Satyanarayana BM, Sivasankar S, Pragathi D, Subbaiah KV, Vijaya T. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Flemingia wightiana*: spectral characterization, antioxidant and anticancer activity studies. *SN Applied Sciences* 2020; 2(5): 1-10.
12. Lee YS, Kim DW, Lee YH, Oh JH, Yoon S, Choi MS, et al. Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC $\zeta$ -dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology* 2011; 85(12): 1529-40.
13. Arora S, Jain J, Rajwade J, Paknikar K. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology Letters* 2008; 179(2): 93-100.
14. Tong L, Chuang CC, Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters* 2015; 367(1): 18-25.
15. Daei S, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Khanaki K, Bahreini F. Anticancer effects of gold nanoparticles by inducing apoptosis in bladder cancer 5637 cells. *Biological Trace Element Research* 2021; 30: 1-11.
16. Mukherjee S, Dasari M, Priyamvada S, Kotcherlakota R, Bollu VS, Patra CR. A green chemistry approach for the synthesis of gold nanoconjugates that induce the inhibition of cancer cell proliferation through induction of oxidative stress and their in vivo toxicity study. *Journal of Materials Chemistry B* 2015; 3(18): 3820-30.
17. Ruhrberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Journal of Cell Science* 2001; 114(18): 3215-6.
18. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 2006; 2(3): 213.
19. Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *In Seminars in perinatology* 2000; 24(1): 75-8.
20. Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, et al. Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology* 2008; 32(5): 1049-56.
21. Kalishwaralal K, Banumathi E, Pandian SRK, Deepak V, Muniyandi J, Eom SH, et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 73(1): 51-7.
22. Sambale F, Wagner S, Stahl F, Khaydarov RR, Scheper T, Bahnemann D. Investigations of the toxic effect of silver nanoparticles on mammalian cell lines. *Journal of Nanomaterials* 2015; 2015.
23. de Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* 2012; 32(11): 867-79.

24. Quadros ME, Marr LC. Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air & Waste Management Association* 2010; 60(7): 770-81.
25. Ahmadian E, Dizaj SM, Rahimpour E, Hasanzadeh A, Eftekhari A, Halajzadeh J, et al. Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Materials Science and Engineering: C* 2018; 93: 465-71.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
27. Mukherjee S, Patra CR. Therapeutic application of anti-angiogenic nanomaterials in cancers. *Nanoscale* 2016; 8(25): 12444-70.
28. Moloney JN, Cotter TG, editors. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2018:30.
29. Ramdath S, Mellem J, Mbatha LS. Anticancer and Antimicrobial Activity Evaluation of Cowpea-Porous-Starch-Formulated Silver Nanoparticles. *Journal of Nanotechnology* 2021; 10; 2021.
30. Bin-Jumah M, Monera AA, Albasher G, Alarifi S. Effects of green silver nanoparticles on apoptosis and oxidative stress in normal and cancerous human hepatic cells in vitro. *International Journal of Nanomedicine* 2020; 15: 1537.
31. Danagoudar A, Pratap G, Shantaram M, Chatterjee B, Ghosh K, Kanade SR, et al. Cancer cell specific cytotoxic potential of the silver nanoparticles synthesized using the endophytic fungus, *Penicillium citrinum* CGJ-C2. *Materials Today Communications* 2020; 25: 101442.
32. Hajebi S, Homayouni Tabrizi M, Nakhaei Moghaddam M. The antiangiogenic and cytotoxic properties of green synthesized Silver nanoparticles using liquid extract of Rapeseed Flower Pollen. *Studies in Medical Sciences* 2019; 30(4): 268-80.
33. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research* 2018; 9: 1-16.
34. Hajebi S, Tabrizi MH, Moghaddam MN, Shahraki F, Yadamani S. Rapeseed flower pollen bio-green synthesized silver nanoparticles: A promising antioxidant, anticancer and antiangiogenic compound. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2019; 24(3): 395-404.
35. 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: IJPR* 2018; 17(2): 627.
36. Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2018; 46(1): 499-510.

# Evaluation of Anti-cancer Properties of Silver Nanoparticles on 5637 Bladder Cancer Cells in Comparison with Normal Embryonic Kidney Cells(HEK-293)

Daei S, Abbas Ali Pourkabireh R, Zia Majidi N\*

Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 23 Jul 2021 Accepted: 27 Nov 2021

## Abstract:

**Background & aim:** Nanotechnology is a new research field with wide applications in cancer management. Among the various metal nanoparticles, silver nanoparticles have been used to treat many cancers due to their high antitumor potential. Despite the potential benefits of these nanoparticles, the extent to which they affect normal cells has become a challenge. In addition, their anti-cancer effects on 5637 bladder cancer cells have not been well established. The aim of the present study was to determine the anti-cancer effects of silver nanoparticles on the survival of 5637 bladder cancer tumor cells in comparison with normal embryonic kidney cells HEK-293.

**Methods:** In the present experimental study performed in 2021, the survival of 5637 cells of bladder cancer and normal cells of embryonic kidney (HEK-293) 24 hours after treatment with 30-50 nm silver nanoparticles with concentrations (0-125). Micrograms per milliliter was evaluated by MTT(dimethyl thiazole-diphenyltetrazolium bromide) test. Morphological changes were also assessed by light microscopy. VEGFA gene expression level and cell migration rate were evaluated by quantitative polymerase chain reaction and scratch testing, respectively. The collected data were analyzed using Shapiro-Wilk statistical tests, one-way and two-way analysis of variance, Tukey post hoc test.

**Results:** The results of the present study indicated that the reduction in survival in 5637 and HEK-293 cells after treatment with silver nanoparticles was dose-dependent, which significantly decreased in 5637 tumor cells. HEK-293 was more than normal cells ( $p < 0.05$ ). In addition, treatment with concentrations of 50 and 60  $\mu\text{g} / \text{ml}$  silver nanoparticles significantly reduced VEGFA gene expression ( $p < 0.05$ ) and inhibited the migration of 5637 bladder cancer cells ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** AgNPs could reduce the viability of 5637 and HEK-293 cells as their inhibitory effects on 5637 cells viability were significantly more than HEK-293. Furthermore, AgNPs suppressed the 5637 cells migration.

**Keywords:** Silver nanoparticles, MTT method, 5637 bladder cancer cells, Human fetal kidney cells (HEK-293)

---

**Corresponding Author:** Zia Majidi N, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran  
**Email:** n\_ziamajidi@yahoo.com

**Please cite this article as follows:** 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.