مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۱۴-۲۰۷

سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه پیچ امین الدوله (Lonicera nummularifolia) و بررسی اثرات آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن علیه رده سلولی سرطان ریه (A549)

حسین رضایی (MSc)[۱]، سید محمد مهدی حمدی (PhD)[۱*]، امیر میرزایی (PhD)[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲-گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

دریافت: ۹۷/۷/۲۴، اصلاح: ۹۷/۱۱/۲۷، پذیرش: ۹۷/۱۲/۷

خلاصه

سابقه و هدف: به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می شود که یکی از این روش ها استفاده از نانوذرات بخصوص نانوذرات نقره است. امروز استفاده از گیاهان جهت سنتز نانوذرات نقره به دلیل کم هزینه بودن مورد توجه محققان قرار گرفته است، لذا هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه پیچ امین الدوله (*Lonicera nummularifolia*) و بررسی اثرات آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن علیه رده سلولی سرطان ریه می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، با استفاده از عصاره گیاه پیچ امین الدوله به عنوان یک عامل احیاکننده، نانوذرات نقره سنتز گردید. اثرات آنتی اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده با روش DPPH انجام گرفت و در انتها فعالیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن به ترتیب با ستفاده از روش های میکروبراپ دایلوشن و MTT در غلظت های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بر روی رده سلولهای سزطانی ریه در فاصله ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج روش DPPH نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثر آنتی اکسیدانی به میزان ۳۳/۷۷±۰/۸۳ بود. نتایج تست ضدمیکروبی نشان داد که اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر روی باکتری های گرم منفی بیشتر است. همچنین نتایج MTT نشان داد که میزان بقای سلول‌ها به ترتیب ۷۰/۳۳±۰/۲۱ ($p>0/05$)، ۵۱/۶۶±۰/۲۴ ($p<0/05$)، ۳۵/۷۵±۰/۳۵ ($p<0/01$)، ۲۰/۶۶±۰/۲۸ ($p<0/001$)، ۱۳/۵±۰/۳۱ ($p<0/001$) و ۷/۶±۰/۳۷ ($p<0/001$) بود. نتایج روش DPPH نشان داد که نانوذره نقره دارای اثرات آنتی اکسیدانی معنی داری می باشد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی نانوذرات نقره سنتز شده می توان از آن به عنوان یک کاندید دارویی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پیچ امین الدوله، نانوذرات نقره، اثرات آنتی اکسیدانی، اثرات ضدمیکروبی، اثرات ضدسرطانی، سرطان ریه.

مقدمه

فناوری نانو یا نانوتکنولوژی رشته ای از دانش کاربردی و فناوری است که محدوده وسیعی از علوم همچون داروسازی، طراحی دارو و زیست شناسی را در برمی گیرد (۱). در نانوتکنولوژی مواد در ابعاد کمتر از یک میکرومتر معمولا ۱ تا ۱۰۰ نانومتر مورد استفاده قرار می گیرند (۳و۲). به منظور سنتز نانوذرات روش های فیزیکی و شیمیایی از جمله احیا شیمیایی، لیتوگرافی، الکتروشیمیایی، لیزر و امواج میکروویو متفاوتی وجود دارد (۴). از معایب روش های شیمیایی که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می کنند، این است که در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می مانند و در نهایت موجب آلودگی شیمیایی محیط زیست می شوند (۵). از دیگر معایب این روش ها، تولید پایین و استفاده از فشار، دما و انرژی های بالا در طی فرایند واکنش است (۶). اخیرا سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط عوامل طبیعی و زیستی مانند باکتری ها، قارچ ها و گیاهان مورد توجه محققان قرار گرفته است. یکی از روش های زیستی، روش سنتز سبز است که در این روش، یون های فلزات با استفاده از ترکیبات گیاهی بدون نیاز به سورفکتانت و سایر ترکیبات پایدار کننده طی یک واکنش تک مرحله ای به نانوذره نقره تبدیل می شود (۸و۷). یکی از گیاهان بومی کشور ایران گیاه پیچ امین الدوله (Lonicera) می باشد. پیچ امین الدوله درختچه‌ای بالارونده و پیچنده از جنس بومی شرق آسیا (چین، تایوان، ژاپن و کره) می باشد. گل پیچ امین الدوله از ارزش بالای دارویی در طب سنتی چین برخوردار است. در درمان تب، آنفلوآنزا، سردرد، سرفه، عطش و گلو درد کاربرد دارد. یکی از کاربردهای بسیار مهم نانوذرات نقره استفاده از آنها در از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌باشد (۹). در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می شود که

▣ این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می باشد.

* نویسنده مسئول مقاله: دکتر سید محمد مهدی حمدی
آدرس: تهران، میدان پونک، بلوار هیلا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی. تلفن: ۰۲۱ -۴۴۶۰۰۱۳۰
E-mail: m.hamdi@iauctb.ac.ir

یکی از این روش ها استفاده از نانوذرات بخصوص نانوذرات نقره است (۱۲-۱۰). در سال‌های اخیر از عصاره گیاهان مختلف جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده نموده اند. Kavaz و همکارانش نشان دادند که نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره *Ficus ingens* دارای اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی می‌باشد (۱۳). با توجه به مقرون صرفه بودن و عدم وجود اثرات سمیت زیست محیطی عصاره های گیاهی جهت سنتز نانوذرات نقره و همچنین دارا بودن اثرات ضدسرطانی و ضدمیکروبی نانوذرات نقره، هدف از این مطالعه سنتز بیولوژیک نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه پیچ امین الدوله (*Lonicera nummularifolia*) و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن در رده سلولی سرطان ریه (A549) می باشد تا از نتایج آن بتوان در تصمیم گیری استفاده یا عدم استفاده از نانوذرات نقره در درمان عفونت های میکروبی و سرطان ریه استفاده نمود.

مواد و روش ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری: در این مطالعه تجربی که با کد اخلاق IR.IAU. TMB.REC. 22.341 به انجام رسید، ابتدا گیاه پیچ امین الدوله از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران (ایران-تهران) با شماره هرباریومی ۱۳۴۲ تهیه شد. برای تهیه عصاره از اندام هوایی گیاه، از حلال اتانولی و روش ماسراسیون استفاده گردید. عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان سنتز نانوذرات نقره نگهداری شد.

سنتز نانوذره نقره: برای سنتز نانو ذره نقره از روش رسوب‌گذاری با احیای یونهای نقره توسط عصاره انجام گرفت. میزان ۱۰ میلی لیتر از عصاره را با ۹۰ میلی لیتر از محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار مخلوط کرده و محلول به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاهی قرار داده شد. بعد از گذشت دو ساعت از زمان واکنش، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. تمام مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰rpmبه مدت ۲۰ دقیقه سانترفیوژ گردید. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت و محصول حاصل دردمای ۷۵ °C طی ۲ ساعت قرار داده شد(۱۴).

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات: آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-Vis (Agilent, Spectrophtometer, USA) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی ریخت شناسی و تایید اندازه نانوذرات نقره از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) استفاده شد. به منظور تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات نقره سنتز شده هم چنین اندازه گیری ثابتهای کریستالی نانوذرات نقره از الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نمونه ها استفاده شد. تفرق اشعه ایکس امکان شناخت نوع ساختار کریستالوگرافی نانوذرات نقره را فراهم می کند. در این مطالعه آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه XRD با تشعشع لامپ CuKa، در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه انجام شد و نقره تجاری به عنوان نمونه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین، جهت شناسایی پیوندهای شیمیایی ایجاد شده در ساختار نانوذره نقره که از عصاره گیاه پیچ امین الدوله نشات گرفته است، از دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR، Thermo Nicolet مدل Nexus 870، ساخت کشور آمریکا) با محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} استفاده شد.

بررسی خواص آنتی اکسیدانی به روش DPPH: در تست بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از ترکیب DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) استفاده شد، بطوری که محلول ۰/۱ میلی مولار از DPPH در متانول تهیه شد و ۱ میلی لیتر از آن را به ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون نانوذره در غلظت های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اضافه شد. سوسپانسیون حاصله در دمای اتاق ۳۰ دقیقه انکوبه شد و در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷nm در اسپکتروفتومتر خوانده شد. درصد جذب رادیکال آزاد توسط فرمول زیر محاسبه شد بطوری که A_0 جذب نمونه کنترل، A1 جذب نمونه مورد نظر بود (۱۵).

DPPH scavenging effect (%)= [(A0-A1)/A0] ×100

بررسی اثرات ضدمیکروبی: به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره نقره از روش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) استفاده شد. آزمایش MIC به روش رقیق سازی در میکروپلیت و به صورت ۳ بار تکرار در غلظت های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر انجام گرفت. در این تست از سویه‌های بیماری‌زای استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *باسیلوس سرئوس* ATCC 14579، *اشیرشیاکلی* ATCC 25922 و *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 39327 با غلظت نیم مک فارلند استفاده شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود (۱۶). لازم به ذکر است از آنتی بیوتیک آمپی سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

اثرات ضدسرطانی: به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی نانوذره نقره بر روی رده سلولی سرطانی ریه از روش رنگ سنجی MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی A549 تیمار شد. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ °C نگهداری شد. سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد: (۱۷).

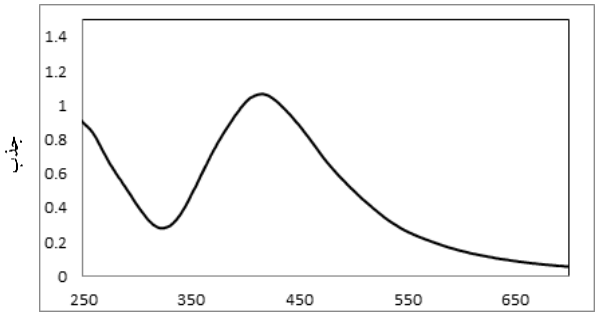
۱۰۰×(جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver20 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANNOVA) تجزیه و تحلیل شدند و P<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج تغییر رنگ محلول و طیف سنجی UV-Vis: در طی فرایند سنتز نانوذرات نقره، یون های Ag^+ در معرض ترکیبات احیا کننده عصاره قرار گرفته و از این طریق احیای نمک نیترات نقره شروع می شود. احیای کامل یون های Ag^+ به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی انجام شد. رنگ محلول با افزودن

عصاره گیاهی به محلول نیترات نقره از بی رنگ به رنگ قهوه ای طی ۱۲۰ دقیقه تغییر نمود. تغییر رنگ نشان دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است. همچنین وجود پیک در طول موج ۴۳۹ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-Vis طی زمان‌های مختلف واکنش تایید شد(شکل ۱).

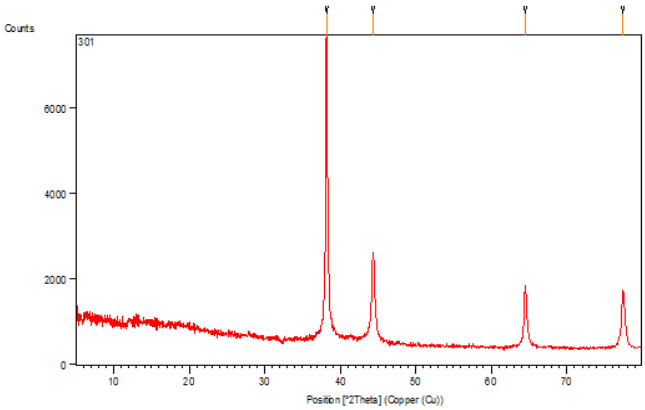


شکل ۱. طیف سنجی UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده. با توجه به نمودار، ماکزیم جذب UV نانوذرات نقره در طول موج ۴۳۸ نانومتر می باشد. نتایج تفرق اشعه ایکس (XRD) نانوذرات نقره

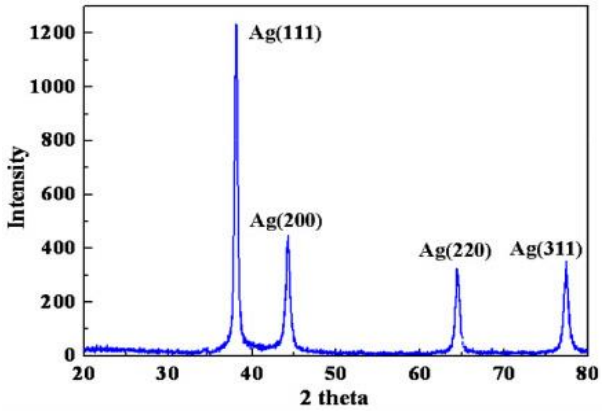
الگوی پیک های XRD مربوط به ساختار مکعبی مراکز سطحی (fcc) (Face-centered cubic) (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) در طیف نمونه نقره دیده می شود (شکل ۲الف و ۲ ب).

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR): در طیف سنجی FTIR نانوذرات نقره، باندهای جذبی در نواحی ۲۰۷۳ cm-1 و ۲۰۴۸ cm-1 مربوط به ترکیبات آلکین ستون و ۱۶۳۰ cm^{-1} مربوط به آلکن‌ها است که می تواند بر اثر واکنش با عصاره گیاهی ایجاد شده باشد. باند جذبی ۳۴۲۱ cm^{-1} در طیف سنجی نانوذرات نقره مربوط به ترکیبات هیدروکسیدی مربوط به عصاره گیاهی با نانوذرات نقره بوده است (شکل ۳).

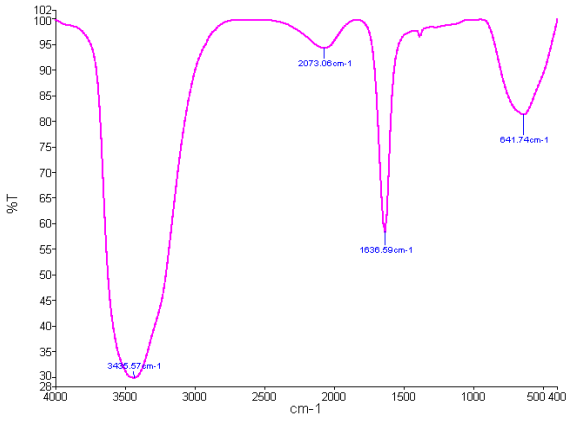
میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نگاره (SEM): نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای ساختار کروی می‌باشد. هم نتایج نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای میانگین سایز ۲۱/۲۰ نانومتر بود. (شکل ۴).



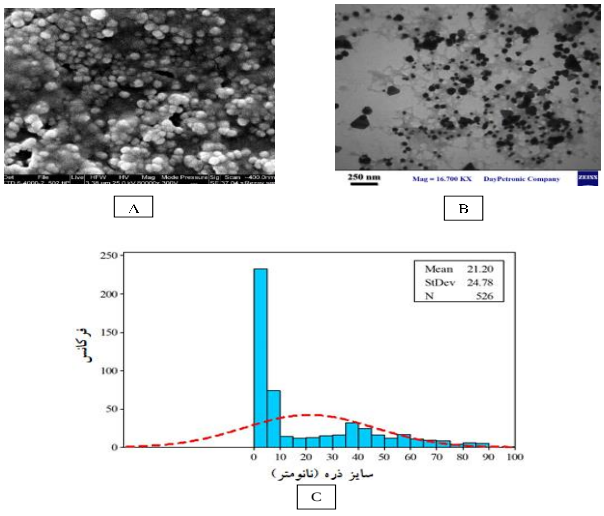
شکل ۲ الف. الگوی XRD نانوذرات نقره سنتز شده. الگوی پیک های XRD مربوط به ساختار face-centered cubic (fcc) در نواحی ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۲ و ۳۱۱ می باشد.



شکل ۲ ب. طیف نمونه استاندارد نانوکریستال های نقره.



شکل ۳. طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) نانوذرات نقره سنتز شده. باند های جذبی در نواحی $2073\ cm^{-1}$ و $2048\ cm^{-1}$ مربوط به ترکیبات آلکین ستون و باند $1630cm^{-1}$ مربوط به آلکن ها است که می تواند بر اثر واکنش با عصاره گیاهی ایجاد شده باشد. باند جذبی $3421\ cm^{-1}$ مربوط به ترکیبات هیدروکسیدی مربوط به عصاره گیاهی با نانوذرات نقره بوده است.



شکل ۴. میکروسکوپ الکترونی SEM (A) و TEM (B) و نمودار سایز نانوذره (C). همانطور که مشاهده می شود نانوذرات سنتز شده کروی شکل و دارای میانگین سایز ۲۱/۲۰ نانومتر می باشد.

نتایج DPPH: خاصیت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از تست DPPH به انجام رسید، بدین صورت که نانوذره مدنظر با استفاده از کاهش ظرفیت رادیکالی، رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) که یک ترکیب ارغوانی است، را به یک ترکیب دی فنیل پیکریل هیدرازین (ترکیب زرد رنگ) تبدیل می‌کند. نتایج نشان داد که نانوذره نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی (۳۷/۷۷±۰/۸۳) می باشد، بطوریکه با افزایش غلظت نانوذره نقره، قدرت آنتی‌اکسیدانی آن نیز بیشتر می شود (جدول ۱).

نتایج تست ضدمیکروبی: نتایج نشان داد که نانوذره نقره روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی دارد، به طوری که کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذره مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* و بیشترین مربوط بود با باکتری *باسیلوس سرئوس* بود(جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد که آنتی بیوتیک آمپی سیلین بیشترین تاثیر را بر روی باکتری اشرشیاکلی با کمترین غلظت MIC داشت.

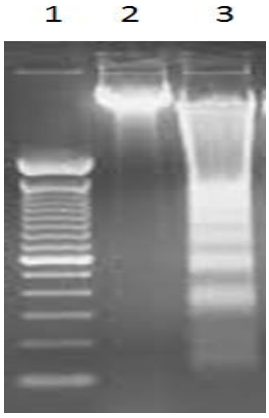
جدول ۱. اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده به روش DPPH. نتایج بصورت میانگین سه بار تکرار نشان داده شده است

درصد مهارکنندگی نانوذره نقره	غلظت نانوذره نقره (میکروگرم/میلی لیتر)
۲۵/۱۸±۰/۵۵	۵
۲۵/۶۷±۰/۲۹	۲۵
۲۶/۵۲±۰/۳۷	۵۰
۳۷/۷۷±۰/۸۳	۱۰۰

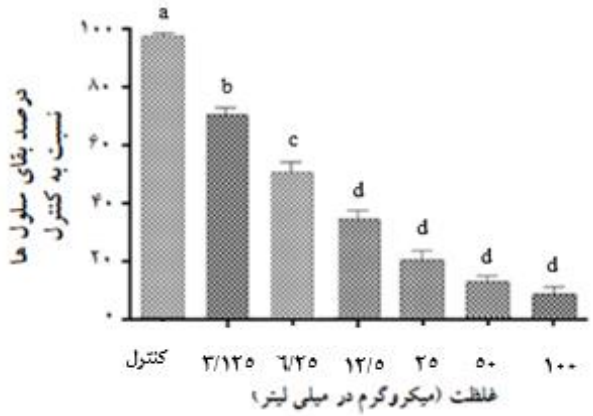
جدول ۲. بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و مقایسه آن با آنتی بیوتیک آمپی سیلین

نام باکتری	MIC (µg/mL) نانوذره نقره	MIC (µg/mL) آمپی سیلین
S. aureus ATCC 25923	۲۵	۱۲/۵
Bacillus cereus ATCC 14579	۵۰	۵۰
E. coli ATCC 25922	۶/۲۵	۳/۱۲۵
P. aeruginosa ATCC 39327	۱۲/۵	۶/۲۵

نتایج سمیت سلولی: تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های مختلف µg/ml ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ نانوذره نقره طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. تیمار سلول های A549 با غلظت های ذکر شده نشان داد که میزان بقای سلول‌ها به ترتیب ۷۰/۳۳±۰/۲۱ (p>۰/۰۵)، ۵۱/۶۶±۰/۲۴ (p<۰/۰۵)، ۳۵/۷۵±۰/۳۵ (p<۰/۰۱)، ۲۰/۶۶±۰/۲۸ (p<۰/۰۰۱)، ۱۳/۵±۰/۳۱ (p<۰/۰۰۱) و ۷/۶±۰/۳۷ (p<۰/۰۰۱) بود (نمودار ۱). نتایج حاصل از تیمار سلول های سرطانی با نانوذره نقره نشان داد که این نانوذره موجب القا قطعه قطعه شدن DNA ژنومی سلول های سرطانی A549 می شود. قطعه قطعه شدن DNA ژنومی که از خصوصیت سلول های آپوپتوتیک است، بر روی ژل آگارز ۲٪ تایید گردید (شکل ۵).



شکل ۵. تصویر ژل الکتروفورز از تست قطعه قطعه شدن DNA برای نشان دادن آپوپتوز. ۱: مارکر DNA، ۲: نمونه DNA کنترل، ۳: نمونه DNA تیمار شده با نانوذره. همکانطور که مشاهده می شود نمونه DNA تیمار شده با نانوذره قطعه قطعه شده است که نشانگر القا فرایند آپوپتوز می باشد.



نمودار ۱. درصد بقای سلول های A549 در برابر غلظت های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است (mean±SD).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای اندازه ۲۰/۲۲ نانومتر بوده و دارای ساختار کروی می باشد. مطالعات نشان می دهد عصاره گیاه پیچ امین الدوله دارای ترکیبات آمینواسیدی، فنولیک اسید و فلاوونوئیدها می باشد که سبب احیای نقره فلزی به نانوذرات نقره می شود و هم چنین مطالعات بسیاری نشان می دهد که پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در عصاره این گیاه نقش بسزایی در سنتز نانوذره نقره دارند (۱۹و۱۸). Varghese و همکارانش با استفاده از عصاره گیاه *Trigonella foenum-graecum* نانوذرات نقره سنتز کردند و اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که کمترین میزان MIC نانوذرات نقره به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود (۲۰). Behravan و همکارانش با روش سنتز سبز نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Berberis vulgaris* سنتز کردند و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه ای بین ۳۰ تا ۷۰ نانومتر می باشد و نانوذرات نقره نسبت به عصاره دارای اثرات ضدمیکروبی معنی

داری می باشد (۲۱). نقطه نظر مشابه تمامی این مطالعات با مطالعه حاضر این است که نانوذرات نقره می توانند به راحتی با استفاده از عصاره گیاهان سنتز شوند اما وجه تمایز تمامی این مطالعات سایز نانوذرات نقره سنتز شده می باشد که بسته به محتوای فیتوشیمیایی آن گیاه می تواند متفاوت باشد. نانوذرات نقره تولید شده در این مطالعه، دارای اثرات ضدمیکروبی معنی داری بر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت ها بود. که علت این امر ضخامت کمتر دیواره سلولی باکتری های گرم منفی و بار منفی آن می تواند باشد (۲۲). در این مطالعه نتایج تست DPPH نشان داد که درصد مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش می یابد. یکی از دلایل خاصیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره تولید شده می تواند وجود ترکیبات بیواکتیو در آن می باشد (۲۳). نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و دارای اثرات سمیت سلولی معنی داری می‌باشد. Satpathy و همکارانش نشان دادند که نانوذرات نقره سنتز شده دارای ساختار کروی بوده و دارای غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50) ۳/۸۵۹ میکروگرم در میلی لیتر علیه رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) می باشد(۲۴). Behboodi و همکارانش نشان دادند که نانوذره نقره سنتز شده از عصاره گیاه *cichorium intybus*، دارای اثرات سمیت سلولی معنی داری بر روی رده سلولی سرطان سینه می باشد و توانایی القای آپوپتوز را دارد (۲۵). نتایج تمامی محققین با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد، بطوریکه نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی معنی داری بر روی رده های سلولی سرطانی هستند و می توانند آپوپتوز را القا کنند. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه پیچ امین الدوله دارای پتانسیل بالایی در احیای یون های نقره و تبدیل آن به نانوذرات نقره می باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات ضدسرطانی وابسته به دوز هستند. با در نظر گرفتن داده های این مطالعه می توان نتیجه گیری کرد که نانوذره نقره ستز شده می تواند به عنوان یک کاندید دارویی جهت اهداف درمانی ضدمیکروبی و ضدسرطانی در نظر گرفته شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و آقای حسن نوربازرگان که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Extract of Lonicera Nummulariifolia and Investigating Its Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Effects Against Lung Cancer Cell Line A549

H. Rezaie (MSc)[1], S.M.M. Hamdi (PhD)*[1], A. Mirzaie (PhD)[2]

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

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 207-14
Received: Oct 16th 2018, Revised: Feb 16th 2019, Accepted: Feb 26th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Due to the increasing incidence of cancer-related deaths and the deficiencies of chemotherapy and radiotherapy in advanced forms of cancer, new approaches are needed to control cancer, and one of these techniques is the use of nanoparticles, especially silver nanoparticles. Nowadays, the use of plants for the synthesis of silver nanoparticles has attracted the attention of researchers due to their low cost. Therefore, the aim of this study was to investigate the green synthesis of silver nanoparticles using the extract of lonicera nummulariifolia and to study its antioxidant, antimicrobial and anticancer effects against lung cancer cell line A549.

METHODS: In this experimental study, silver nanoparticles were synthesized using the extract of lonicera nummulariifolia as a regenerative agent. The antioxidant effects of synthesized silver nanoparticles were evaluated by DPPH assay and finally its antimicrobial and anticancer activity were respectively evaluated by Broth Microdilution and MTT assays at concentrations of 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml on lung cancer cell line within 24 h.

FINDINGS: The results of DPPH assay showed that the synthesized silver nanoparticles at 100 µg/ml had an antioxidant effect of 33.77±0.83. Antimicrobial test results showed that the antimicrobial effects of silver nanoparticles were greater on gram negative bacteria. MTT results also showed that cell viability was 70.33±0.21 ($p>0.05$), 51.66±0.24 ($p<0.05$) 35.75±0.35 ($p<0.01$), 20.66±0.28 ($p<0.001$), 13.5±0.31 ($p<0.001$), and 7.6±0.37 ($p<0.001$), respectively. Results of DPPH assay showed that silver nanoparticles has significant antioxidant effects ($p<0.05$).

CONCLUSION: Considering the antimicrobial and anticancer effects of synthesized silver nanoparticles, it can be used as a drug candidate.

KEY WORDS: *Lonicera nummulariifolia, Silver nanoparticles, Antioxidant effects, Antimicrobial effects, Anticancer effects, Lung cancer.*

Please cite this article as follows:

Rezaie H, Hamdi SMM, Mirzaie A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Extract of Lonicera Nummulariifolia and Investigating Its Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Effects Against Lung Cancer Cell Line A549. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:207-14.

***Corresonding Author: S.M.M. Hamdi (PhD)**
Address: Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Hamila Blv., Poonak Sq., Tehran, I.R.Iran
Tel: +982144600130
E-mail: m.hamdi@iauctb.ac.ir

References

1.Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J Nanobiotechnology. 2018; 16(1):71.

2.Graciano RCD, Ribeiro JAT, Macedo AKS, de S Lavareda JP, de Oliveira PR, Netto JB, et al. Recent patents applications in red biotechnology: A mini-review. Recent Pat Biotechnol. 2019; 13(3):170-186.

3.Mishra M, Kumar P, Rajawat JS, Malik R, Sharma G, Modgil A. Nanotechnology: revolutionizing the science of drug delivery. Curr Pharm Des. 2018; 24(43):5086-107.

4.Sharma G, Sharma AR, Lee SS, Bhattacharya M, Nam JS, Chakraborty C. Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. Int J Pharm. 2019; 559:360-72.

5.Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. Int J Mol Sci. 2016; 17(9): 1534.

6.Jorge de Souza TA, Rosa Souza LR, Franchi LP. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. Ecotoxicol Environ Saf. 2019; 171:691-700.

7.Jha M, Shimpi NG. Green synthesis of zero valent colloidal nanosilver targeting A549 lung cancer cell: In vitro cytotoxicity. J Genet Eng Biotechnol. 2018; 16(1):115-24.

8.Rahman A, Al-Reza SM, Siddiqui SA, Chang T, Kang SC. Antifungal potential of essential oil and ethanol extracts of Lonicera japonica Thunb. against dermatophytes. EXCLI J. 2014;13:427–36.

9.de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2018;7(3):220–233.

10.Wang P, Aguirre A. New strategies and in vivo monitoring methods for stem cell-based anticancer therapies. Stem Cells Int. 2018; 2018.

11.Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. 2017; 17(1):20-37.

12.McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. J Food Drug Anal. 2014;22(1):116–27.

13.Kavaz D, Umar H, Shehu S. Synthesis, characterization, antimicrobial and antimetastatic activity of silver nanoparticles synthesized from Ficus ingens leaf. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(sup3):S1193-203.

14.Shehzad A, Qureshi M, Jabeen S, Ahmad R, Alabdalall AH, Aljafary MA, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using Rhazya stricta. Peer J. 2018; 6:e6086.

15.Mohanta Y, Panda S, Jayabalan R, Sharma N, Bastia A, Mohanta T. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by Leaf extract of Erythrina suberosa (Roxb.). Front Mol Biosci. 2017; 4:14-26.

16.Zhang L, Wu L, Si Y, Shu K. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to Azotobacter vinelandii: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. PLoS One. 2018; 13(12):e0209020.

17.Kaba SI, Egorova EM. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. Nanotechnol Sci Appl. 2015; 8: 19–29.

18.Kathiravan V, Ravi S, Ashokkumar S, Velmurugan S, Elumalai K, Khatiwada CP. Green synthesis of silver nanoparticles using Croton sparsiflorus morong leaf extract and their antibacterial and antifungal activities. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015;139:200-5.

19.Lu H, Zhang L, Huang H. Study on the isolation of active constituents in Lonicera japonica and the mechanism of their anti-upper respiratory tract infection action in children. Afr Health Sci. 2015; 15(4):1295-301.

20.Varghese R, Almalki MA, Ilavenil S, Rebecca J, Choi KC. Silver nanopaticles synthesized using the seed extract of Trigonella foenum-graecum L. and their antimicrobial mechanism and anticancer properties. Saudi J Biol Sci. 2019;26(1):148-54.

21.Behravan M, Hossein Panahi A, Naghizadeh A, Ziaee M, Mahdavi R, Mirzapour A. Facile green synthesis of silver nanoparticles using Berberis vulgaris leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. Int J Biol Macromol. 2019;124:148-54

22.Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Int Nano Lett. 2012;2:32-40.

23.Kokila T, Ramesh PS, Geetha D. Biosynthesis of AgNPs using Carica Papaya peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. Ecotoxicol Environ Saf. 2016; 134(Pt 2):467-473.

24.Satpathy S, Patra A, Ahirwar B, Delwar Hussain M. Antioxidant and anticancer activities of green synthesized silver nanoparticles using aqueous extract of tubers of Pueraria tuberosa. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(sup3):S71-85.

25.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 (MCF-7) Cells. Biol Trace Elem Res. 2019;187(2):392-402.