Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

An Evaluation of the Effect of Graphene Oxide-Gold Nanocomposite on HepG2 Cell Line

Sh. Kazemian (MSc)[1], S. R. Mohebbi (PhD)[*2], T. Naji (PhD)[3], H. Asadzadeh Aghdaei (MD)[1], M. R. Zali (MD)[2]

1.Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
2.Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
3.Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran.

Article Type
Research Paper

Received:
Oct 9th 2021
Revised:
Feb 21st 2022
Accepted:
Apr 16th 2022

ABSTRACT

Background and Objective: One of the most important effects of nanomaterials on cells is the induction of programmed cell death (apoptosis). The aim of this study is to investigate the toxicity of graphene oxide-gold nanoparticles and to evaluate the expression of caspase 3 gene in HepG2 liver cancer cell line.

Methods: In this experimental study, hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) was prepared from Pasteur Institute of Iran. Cells were treated with concentrations of 10 to 500 µg/ml Gold-rGO and untreated cells were used as control. The level of caspase 3 gene expression and cell viability were investigated and compared within 24 and 48 hours in three groups of A, B and control (C). The effect of concentration was investigated by XTT method and acridine orange ethidium bromide staining. Caspase 3 gene expression was measured by relative quantification using real time PCR test.

Findings: Based on XTT results, EC20, EC50, EC80 values were calculated as 386.420, 90.680, 24.151 µg/ml in 24 hours and 358.146, 89.536, 22.384 µg/ml in 48 hours. Examining the level of caspase 3 gene expression change in these concentrations compared to untreated cells showed mean fold changes (mean±SEM) of 3.436±1.022 in 24 hours and 4.054±0.02 in 48 hours, according to which the level of gene expression changes significantly. The viability of control cells (C) compared to cells treated with concentrations higher than 50 µg/ml (B) has a relative increase, which was statistically significant ($p<0.0001$). Examination with AO/EB staining to determine the level of apoptosis showed a higher level of apoptosis with increasing dose.

Conclusion: The results of the study showed that shorter times and lower concentrations should be used in the application of this nanoparticle.

Keywords: *Cytotoxicity, Biocompatibility, Graphene, Gold-Graphene, Caspase 3.*

Cite this article: Kazemian Sh, Mohebbi SR, Naji T, Asadzadeh Aghdaei H, Zali MR. An Evaluation of the Effect of Graphene Oxide-Gold Nanocomposite on HepG2 Cell Line. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 482-91.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

***Corresponding Author: S. R. Mohebbi (PhD)**
Address: Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Ayatollah Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 (21) 22432525. **E-mail:** sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

ارزیابی اثر ترکیب اکسید گرافن–گلد بر روی رده سلولی HepG2

شبنم کاظمیان (MSc)[1]، سید رضا محبی (PhD)[2*]، طاهره ناجی (PhD)[3]،
حمید اسدزاده عقدایی (MD)[1]، محمد رضا زالی (MD)[2]

۱. مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۷
اصلاح: ۱۴۰۰/۱۲/۲
پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهم ترین تاثیرات نانو مواد بر سلول ها، القای فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سمیت نانو ذره اکسید گرافن–طلا و ارزیابی بیان ژن کاسپاز ۳ در رده سلول های سرطانی کبد HepG2 می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی رده سلولی هپاتو سلولار کارسینوما (HepG2) از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. از سلول های تیمار شده با غلظت های ۱۰ µg/ml تا۵۰۰ از Gold-rGO و تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده گردید. میزان بیان ژن کاسپاز ۳ و میزان زنده مانی سلول ها در سه گروه کنترل C، گروه A و B در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و مقایسه شد. اثر غلظت به روش XTT و رنگ آمیزی آکریدین اورنج اتیدیوم بروماید بررسی شد. سنجش بیان ژن کاسپاز ۳ به صورت کمی Relative quantification با استفاده از تست Real time PCR انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج XTT مقادیر EC20، EC50، EC80 در زمان ۲۴ ساعت به ترتیب ۳۸۶/۴۲۰ µg/ml، ۹۰/۶۸۰، ۲۴/۱۵۱ و در زمان ۴۸ ساعت ۳۵۸/۱۴۶ µg/ml، ۸۹/۵۳۶، ۲۲/۳۸۴ محاسبه شد. بررسی میزان تغییر سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در این غلظت ها در مقایسه با سلول های تیمار نشده در زمان های ۲۴، ۳/۴۳۶±۱/۰۲۲ =Difference between means fold change±SEM و ۴۸ ساعت ۴/۰۵۴±۰/۰۲ نشان داد که به صورت معنی داری میزان سطح بیان ژن تغییر می کند. میزان زنده ماندن سلول های کنترل (C) در مقایسه با سلول های تیمار شده با غلظت های بالاتر از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (B) افزایش نسبی دارد که از لحاظ آماری معنی دار است (p<۰/۰۰۰۱). بررسی با رنگ آمیزی AO/EB برای تعیین میزان آپوپتوز با بیشتر شدن دوز میزان آپوپتوز بیشتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که در کاربرد این نانو ذره باید از زمان های کوتاه تر و غلظت های پایین تر استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، زیست سازگاری، گرافن، گلد–گرافن، کاسپاز ۳.

استناد: شبنم کاظمیان، سید رضا محبی، طاهره ناجی، حمید اسدزاده عقدایی، محمد رضا زالی. ارزیابی اثر ترکیب اکسید گرافن–گلد بر روی رده سلولی HepG2. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۹۱-۴۸۲.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰۱ پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر سید رضا محبی
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان آیت اله طالقانی، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد. تلفن: ۲۲۴۳۲۵۲۵-۰۲۱ رایانامه: sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

مقدمه

نانو ذرات، ذراتی هستند که ابعاد کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر داشته و دارای ترکیبات، اندازه، شکل و خصوصیات شیمیایی سطحی منحصر به فرد می باشند. اهمیت نانوتکنولوژی به خاطر داشتن ابعاد کوچک افزایش یافته است. توسعه و پیشرفت در زمینه ساخت نانو بیوسنسورهای بسیار حساس برای تشخیص باکتری‌ها، پاتوژن های قارچی، ویروس ها و سلول های سرطانی در پزشکی بیولوژیکی، بالینی و مواد غذایی ضروری است. نانو ذره طلا در زمینه کاربردهای پزشکی مانند تحویل دارو و ژن، عکسبرداری غیر تهاجمی بدن و درمان سرطان تاثیر زیادی داشته است (۱). داشتن خصوصیاتی مانند اندازه فوق العاده کوچک، خواص عالی لومینسانس، پایداری شیمیایی بالا و زیست سازگاری عالی توجه زیادی را به این نانو ذره جلب کرده است (۲).

گرافن یکی از آلوتروپ های نانو مواد کربن است که دارای خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی مانند نسبت سطح به حجم بالا، هدایت الکتریکی و حرارتی فوق العاده و قدرت مکانیکی قوی است. سازه های ترکیبی ساخته شده از گرافن و نانو ذرات فلزی می توانند خواص جدیدی مانند کاهش اکسیداسیون فلزی، کاهش مقاومت در برابر صفحات و اثرات مثبت سینرژیک را با ترکیب خواص گرافن و نانو ذرات فلزی در بر داشته باشد (۳).

امروزه با توسعه نانو بیوتکنولوژی نانو مواد به محیط زندگی انسان و اکوسیستم وارد شده اند. با توجه به افزایش تولید نانو مواد و حضور آن ها در محیط زندگی انسان توجه به تاثیرات آن ها موضوعی مهم است. تحقیقات نشان داده است که نانو مواد می توانند اثرات منفی روی رشد و بقای سلول داشته باشند و باعث بروز طیف گسترده ای از اثرات حاد و مزمن شوند. از این رو ارزیابی میزان سمیت این مواد مهم است تا از ایجاد آسیب های انسانی ناشی از این مواد جلوگیری شود.

علی رغم مزایای بالقوه نانو ذرات، سمیت نانو مواد نگرانی در مورد تاثیر آن بر سلامت بدن را افزایش داده است. مشتقات گرافن به طور چشمگیری بیان ژن های مختلف را که مسئول ساختار و عملکرد غشا سلول هستند کاهش می دهد (۴). این مشتقات از طریق روش های گوناگون به سلول منتقل شده و منجر به تولید ROS، افزایش LDH و انتشار کلسیم شده سپس موجب انواع آسیب های سلولی مانند آسیب غشا سلول، التهاب، آسیب DNA، اختلالات میتوکندری، آپوپتوز و نکروز می شوند (۵).

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است. کبد یکی از ارگان های داخلی بدن است که در سم زدایی و دفع مواد زائد بدن نقش مهمی دارد، بنابراین بررسی اثر نانو مواد بر روی کبد اهمیت زیادی دارد. یکی از بیماری های عمده ای که جوامع پزشکی با آن درگیر هستند و پنجمین سرطان شایع می باشد، سرطان کبد است. درمان این عارضه و دارو رسانی به این سلول‌ها دارای محدودیت هایی است. یکی از راه های انتقال دارو استفاده از نانو مواد است. مطالعات صورت گرفته مشخص کرده اند که برخی از مواد نانو می توانند اثرات نامطلوبی مانند التهاب کبد داشته باشند (۶).

مکانیسم آپوپتوز یکی از اصلی ترین راه های حذف سلول های ناخواسته است و در آن تحریک های داخلی و خارجی باعث خودکشی سلول می شوند. سلول آپوپتوزی مشخصات مورفولوژیکی خاصی دارد که مشخص ترین آن ها اجسام آپوپتوزی است. سه مسیر عمده برای آغاز آپوپتوز شناخته شده است. این مسیرها به وسیله گیرنده های مرگ (مسیر خارج سلولی)، میتوکندری (مسیر داخل سلولی) و یا شبکه آندوپلاسمی کنترل می شوند.

در مرکز فرآیند آپوپتوز خانواده ای از پروتئازها به نام کاسپازها (caspase) قرار دارند. این پروتئازها در شروع (initiation) و اجرای (execution) آپوپتوز دخیل هستند و می توانند از دو طریق داخل سلولی (intrinsic) و خارج سلولی (extrinsic) فعال گردند. طی سیگنال های استرس، تخریب DNA و یا نقص در مسیرهای سیگنالینگ سلولی، مسیر داخلی فعال می گردد و تکامل و پردازش سیستم ایمنی مسیر خارجی را فعال می کند (۷).

امروزه حدود ۱۴ نوع کاسپاز شناخته شده که یازده نوع آن‌ها منشأ انسانی دارند. با تقسیم بندی بر اساس عملکرد (function)، این پروتئازها به سه زیر خانواده مشخص تقسیم می شوند: ۱-کاسپازهای شروع کننده (initiator) که شامل کاسپازهای ۲، ۸، ۹ و ۱۰ می باشند. ۲-کاسپازهای اجرا کننده (executioner) و یا اثر کننده (effector) که شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ می باشند. ۳-کاسپازهای التهابی (inflammatory) که شامل کاسپازهای ۱، ۴، ۵، ۱۱، ۱۲ و ۱۴ می باشند و در واکنش های التهابی و پردازش و بلوغ سایتوکاین ها دخالت دارند.کاسپاز ۳ که از دو واحدِ ۱۷ و ۱۲ کیلو دالتونی تشکیل شده‌است، توسط کاسپاز ۸، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۱۰ فعال شده و خود به نوبه خود، کاسپاز ۶ و کاسپاز ۷ را فعال می کند.

در یک مطالعه که توسط Xiang و همکارانش به روی سلول های اولیه اپیتلیوم قرنیه و سلول های اپیتلیوم ملتحمه در سال ۲۰۱۶ انجام شد، توانستند سمیت و مکانیسم پتانسیل گرافن اکساید را کشف کنند (۸).

در خصوص نانو ذرات طلا به تنهایی هم اخیراً Lopez-Chaves و همکارانش بر روی رده های سلولی HT-۲۹ و HepG2 به صورت In vitro و بر روی مدل حیوانی رت به صورت In vivo بررسی نموده اند و تأثیر وابسته به اندازه ذره را گزارش کرده اند (۹).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

در سال ۲۰۲۱ یک مطالعه که توسط Yuan و همکاران بر روی نانوکامپوزیت های اکسید گرافن–نانوذرات نقره (GO-AgNPs) انجام شد، سمیت سلولی و وضعیت تغییر اپی ژنتیکی با واسطه GO-AgNP در سلول های فیبروبلاست جنین بز (CFFCs) مورد بررسی قرار گرفت و داده ها نشان داد که GO-AgNPs به صورت وابسته به دوز باعث سمیت سلولی می‌شوند (۱۰).

سوابق و مطالعات کافی در خصوص نانو ماده ترکیبی گرافن اکساید تغییر یافته به همراه طلا وجود ندارد. به همین خاطر این مطالعه به منظور به دست آوردن اطلاعاتی در خصوص اثر القایی آپوپتوزی این ماده بر روی رده سلولی HepG2 طراحی شده است.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات آپوپتوزی و سیتوتوکسیک نانو ذرات گرافن–طلا با استفاده از سلول های کبدی انسانی Human HepG2 است. مکانیسم های سمیت سلولی با استفاده از پارامترهای حیاتی مانند زنده ماندن سلول و آپوپتوز در سلول های HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، سطح بیان ژن آپوپتوزی کاسپاز ۳ با روش Real time بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.98 سنتز نانو ذرات Gold-rGO از روش رسوب گذاری با احیای یون‌های طلا طبق روش کار مطالعات قبلی، انجام گرفت (۱). نانو ذرات طلا از طریق کاهش مستقیم شیمیایی اسید کلرو آوریک (NAUCL4) توسط سدیم بو رو هیدرید NaBH4 روی نانو ذرات اکسید گرافن قرار داده شدند. به طور خلاصه، به تدریج ۲۰۰ میلی لیتر HAUCL4 (۲۰۰ میلی گرم) به محلول GO (۱ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای محیط هم زده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر NaBH4 به آرامی درون مخلوط ریخته شده و هم زدن به مدت ۱ ساعت دیگر در دمای اتاق ادامه پیدا کرد و در انتها نمونه بارها با آب مقطر شستشو داده شد. بعد از خشک شدن تصویر آن با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تهیه شد.

رده سلولی HepG2 از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. محیط کشت مورد استفاده RPMI کمپانی Gibco غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گوساله (Sigma-Aldrich) FBS، ۱٪ اسید آمینه غیر ضروری (Gibco) NEAA و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین–استرپتومایسین و ۱٪ L گلوتامین بود. سلول‌ها چندین نسل در فلاسک های مخصوص T25 با تریپسین–EDTA ۰/۲۵٪ پاساژ داده شد و در درجه حرارت ۳۷ °C و ۵٪ CO2 قرار گرفت.

از سلول های تیمار شده با غلظت های ۱۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰ ، ۵۰۰ µg/ml از Gold-rGO و تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده گردید. میزان بیان ژن کاسپاز ۳ و میزان زنده مانی سلول ها (پس از تیمار با gold-rgo) در سه گروه سلولی شامل کنترل C، گروه A که دارای اختلاف معنی داری با کنترل نمی باشد و گروه B که دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل است، در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و مقایسه شد.

برای بررسی میزان زنده ماندن سلول ها پس از تاثیر نانو ذره از کیت cell proliferation kit ll (XTT) کمپانی Roche استفاده گردید. این تست بر اساس شکست نمک زرد رنگ تترازولیوم XTT و تشکیل رنگ نارنجی فورمازان از طریق سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول های زنده اتفاق می‌افتد. فورمازان محلول در آب است و به طور مستقیم در دستگاه Elisa reader مقدار آن محاسبه و در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت می شود. مدت زمان انکوباسیون XTT Mixture برای کامل شدن تست، ۱۸ تا ۲۴ ساعت می باشد، که در این تست سلول ها به مدت ۲۴ ساعت با محلول XTT در دمای ۳۷ °C و اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ انکوبه شدند.

هشت گروه سلول برای تیمار با نانو ذره در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۵۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر و یک گروه کنترل تیمار نشده و یک گروه تیمار شده با DMSO در نظر گرفته شد و تمامی تست ها با دو بار تکرار انجام گرفت. به منظور انجام تست XTT، سلول ها پس از رشد کامل در فلاسک های کشت سلول به پلیت های ۹۶ خانه ای انتقال داده شدند. برای هر نمونه، دو چاهک در نظر گرفته شد. تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول در هر خانه seed شد و مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر حجم نهایی در هر خانه محاسبه شد. قبل از تیمار سلولی ابتدا سلول ها با PBS شستشو داده شد و سپس محیط جدید حاوی نانو ذره به آن اضافه شد.

نتایج حاصل از تست XTT برای به دست آوردن مقادیر غلظت EC20، EC50 وEC80 استفاده شد. میزان EC50 بیانگر غلظتی از نانو ذره که ۵۰٪ رشد سلول ها را در مقایسه با کنترل مهار کند و همچنین میزان EC20 که در آن ۸۰٪ سلول ها زنده مانده اند و EC80 که ۲۰٪ سلول ها زنده مانده‌اند محاسبه شد و این مقادیر برای بررسی بیان ژن استفاده شد. برای بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ مراحل زیر انجام شد:

RNA به کمک کیت RNasy Plus mini kit کمپانی Qiagen طبق پروتوکل استخراج شد.

قبل از سنتز cDNA به روش RT-PCR، غلظت های RNA تخلیص شده با خواندن OD آنها توسط دستگاه Nano Drop تعیین گردید و در تمام واکنش ها غلظت های مشابهی از RNA نمونه های مختلف استفاده شد، اصطلاحاً عمل RNA adjusting (normalizing) انجام گرفت.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

cDNA به کمک کیت Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo fisher scientific) با مقادیر میکس ۱ شامل رندوم هگزامر ۱ µl و آب دیونیزه ۶/۵ µl و RNA و میکس ۲ شامل بافر 4 µl آب دیونیزه ۶/۵ µl آنزیم ۱ µl و dNTP Mix ،10 mM۲ µl و ۰/۵ µl RiboLock RNase Inhibitor و شرایط انجام واکنش 65˚C زمان ۵ دقیقه، 25˚C زمان ۱۰ دقیقه، 45˚C زمان ۴۵ دقیقه و 70˚C زمان ۷۰ دقیقه سنتز شد.

ژن دخیل در القای آپوپتوز (کاسپاز ۳) در سطح نسخه برداری و ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس به کمک روش Real-time PCR توسط دستگاه ABI ۷۵۰۰ و به روش SYBR GREEN با مستر میکس کمپانی Takara بررسی شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است (۱۱). واکنش با حجم نهایی ۲۰ µl که شامل مستر میکس سایبر ۱۰ µl و هر کدام از پرایمرها ۰/۴ µl، آب دیونیزه ۷/۱۲ µl و ۰/۰۸ µl ROX انجام شد. شرایط دمایی واکنش شامل 95˚C زمان ۱۰ دقیقه، 95˚C زمان ۱۵ ثانیه و 60˚C زمان ۱ دقیقه است.

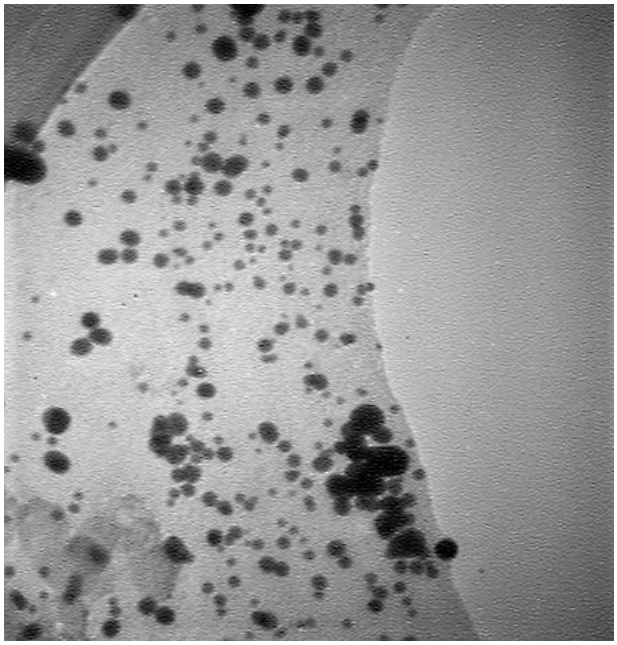
داده ها با استفاده از تست های آماری Anova و T-test student تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به Caspase 3 و GAPDH

عنوان پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول
Caspase3-F	5- CCA GAG TCCATTGATTCGCT -3	280 bp
Caspase3-R	5- GCTATTGTGAGGCGGTTGTA -3	280 bp
GAPDH-F	5- GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC -3	220 bp
GAPDH-R	5- ACGACCAAATCCGTTGACTC -3	220 bp

یافته ها

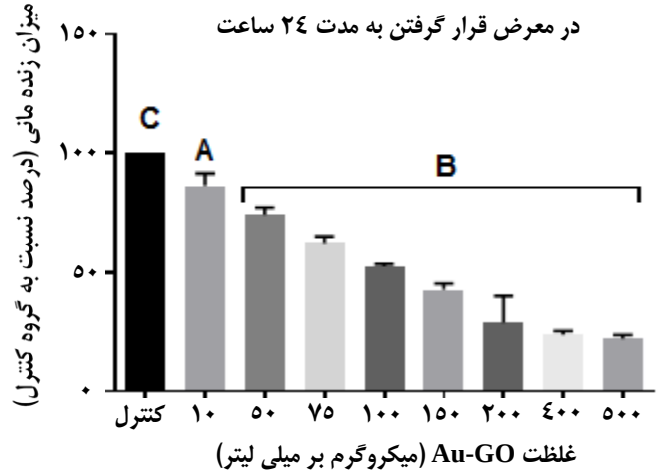
به منظور مطالعه ساختار گرافن احیا شده با پوشش طلا از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. تصاویر تهیه شده حضور پوشش های طلا را به صورت نقطه های سیاه بر روی نانو ذره نشان می دهد (شکل ۱).



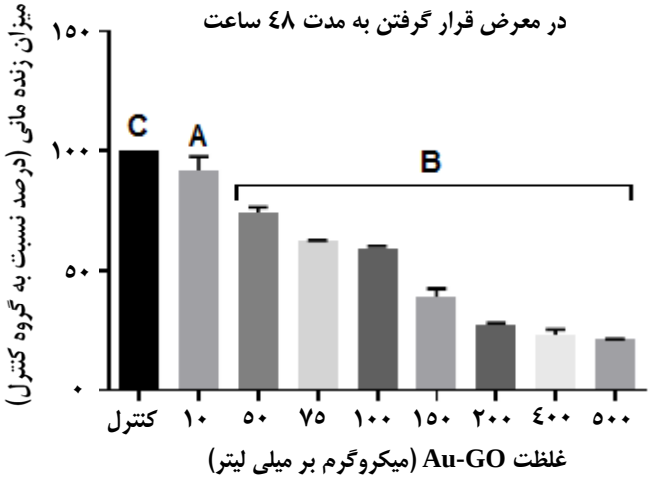
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانو ذره Gold-rGo. نقاط سیاه رنگ نشان دهنده ذرات gold هستند.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

اثر سیتوتوکسیسیتی Gold-rGO بر روی رده سلولی HepG2 با استفاده از آزمون XTT در ۸ غلظت تهیه شده از Gold-rGO با دو بار تکرار در چاهک های حاوی سلول های تمایز داده شده طی مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد (نمودارهای ۲و۱).



نمودار ۱. اثر سیتو توکسیسیتی Gold-rGO بر سلول های HepG2 در مدت ٢٤ ساعت (p<۰/۰۰۰۱). در غلظت ۱۰ µg/ml (A) اختلاف نسبت به کنترل (C) دیده می شود ولی این اختلاف معنی دار نیست. از غلظت ۵۰ µg/ml (B) اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل (C) دیده می شود.

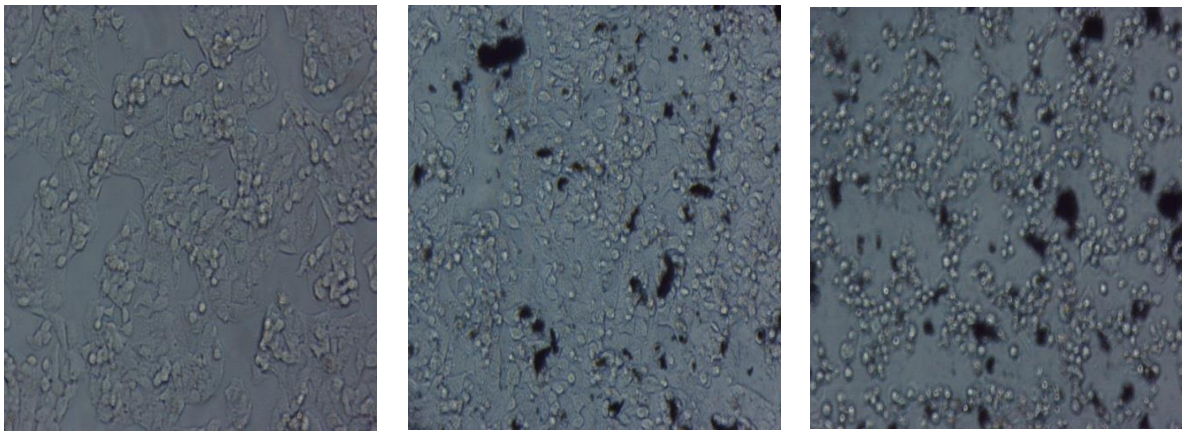


نمودار ۲. اثر سیتو توکسیسیتی Gold-rGO بر سلول های HepG2 در مدت ٤٨ ساعت. در زمان ٤٨ ساعت همان غلظت های قبلی مورد آزمایش قرارگرفتند و میزان زنده ماندن سلول ها در مقایسه با سلول کنترل تیمار نشده در نمودار آمده است (p<۰/۰۰۰۱).

نتایج نشان داد که میزان زنده ماندن سلول های کنترل (C) در مقایسه با سلول های تیمار شده با غلظت های بالاتر از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (B) افزایش نسبی دارد (p<۰/۰۰۰۱). مقادیر EC20 (۸۰٪ سلول ها زنده هستند) EC50 و EC80 (۲۰٪ سلول ها زنده باشند) در مدت زمان ۲۴ ساعت اثر نانو ذره محاسبه شد و به ترتیب ۲۴/۱۵۱، ۹۰/۶۸ و ۳۸۶/۴۲۰ میکروگرم در میلی لیتر است. مقادیر EC20، EC50 و EC80 در زمان ۴۸ ساعت اثر نانو ذره بر روی سلول ها نیز محاسبه شد که به ترتیب ۳۸۴/۲۲، ۵۳۶/۸۹ و ۱۴۶/۳۵۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. غلظت های EC20، EC50 و EC80 در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت به عنوان غلظت های قابل اطمینان و سمی برای استفاده در تست های بعدی انتخاب شدند. نتایج مربوط به مورفولوژی نشان

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

داد سلول های سرطانی رده HepG2 نرمال عمدتاً دارای مورفولوژی کشیده هستند (شکل ۲a). این مورفولوژی طی انکوباسیون سلول ها با مقادیر بالای نانو ذره دچار تغییر شده و به سمت کروی شدن می رود (شکل ۲b) به طوریکه در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر همه سلول ها به شکل کروی در آمده اند (شکل ۲c).

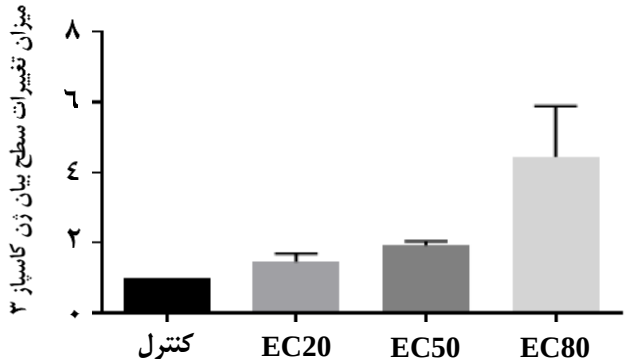


a b c

شکل ۲. تصویر سلول های تیمار شده با مقادیر مختلف. a) سلول های کنترل تیمار نشده: در حالت نرمال مورفولوژی سلول ها به صورت کشیده است. b) سلول های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر: مورفولوژی طی انکوباسیون سلول ها با مقادیر ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانو ذره دچار تغییر شده و به سمت کروی شدن می رود. c) سلول های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر: در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر همه سلول ها به شکل کروی در آمده اند.

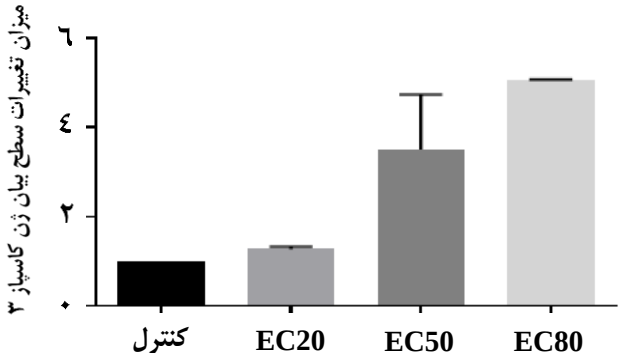
همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بخش عمده مرگ سلولی حاصل از انکوباسیون سلول ها با نانو ذره Gold-Rgo در رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین اورنج (EtBr/Ao) بصورت آپوپتوزی می باشد و تعداد سلول های آپوپتوزی با بیشتر شدن غلظت بیشتر می شوند.

نتایج ارزیابی تست Real time PCR به روش Relative quantification: ارزیابی میزان تغییرات بیان این ژن ها از مقایسه سلول های تیمار شده با سلول های کنترل بر اساس Relative quantification انجام می گیرد. آنالیز نتایج پس از نرمال شدن با نتایج ژن رفرنس با روش Delta Delta Ct و نرم افزار ABI 7500 انجام گردید. تغییر سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در غلظت های EC20، EC50 و EC80 در مقایسه با سلول های تیمار نشده در دوز و زمان ۲۴، ۳/۴۳۶±۱/۰۲۲ =Difference between means fold change±SEM در نمودار ۳ و ۴۸ ساعت ۴/۰۵۴±۰/۰۲ =Difference between means fold change±SEM در نمودار ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۳. تغییرات سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ۲۴ ساعت. تغییرات سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ۲۴ ساعت در سلول های تیمار شده با غلظت های EC20 و EC50 و EC80. کالیبراتور: سلول های تیمار نشده ۳/۴۳۶±۱/۰۲۲ =Difference between means fold change±SEM

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]



نمودار ٤. تغییرات سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ٤٨ ساعت. تغییرات سطح بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ٤٨ ساعت در سلول های تیمار شده با غلظت های EC20، EC50 و EC80. کالیبراتور: سلول های تیمار نشده ٤/٠٥٤±٠/٠٢ =Difference between means fold change±SEM

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی میزان زنده ماندن سلول ها توسط تست XTT عمدتاً حاکی از اثرات سیتوتوکسیسیتی وابسته به دوز و زمان بود. اختلاف غلظت و زمان، عوامل موثر در ایجاد سمیت نانو ذرات بر سلول های سرطانی در این مطالعه بوده است.

محققان در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی بررسی سیتوتوکسیسیتی از رده سلولی HepG2 استفاده می کنند. کارسینوم سلول های کبدی از سرطان های مهم و شایع در سرتاسر جهان است (۱۲). یکی از مهم ترین تاثیرات نانو ذرات بر سلول ها القا فرآیند مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) است (۱۳).

نتایج حاصل از بررسی میزان زنده ماندن سلول ها توسط تست XTT عمدتاً حاکی از اثرات سیتوتوکسیسیتی وابسته به دوز و زمان می باشد. اختلاف غلظت و زمان عوامل موثر در ایجاد سمیت نانو ذرات بر سلول های سرطانی در این مطالعه بوده است.

مطالعه Yang و همکارانش در رابطه با اثر سمیت گرافن اکساید احیا شده بر روی رده سلولی HepG2 تاثیر وابسته به دوز و زمان را بر DNA سلولی، استرس اکسیداتیو و در نهایت کشندگی سلول نشان می دهد (۱۴). که این یافته ها در مطالعه حاضر در رابطه با نانو ذره Gold-rGO در رده سلولی HepG2 تایید شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، میزان کشندگی نانو ذره در غلظت های بالا نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و همچنین بیشتر شدن مدت زمان انکوباسیون نانو ذره با سلول ها نیز باعث افزایش میزان کشندگی بود.

Vallabani و همکارانش سمیت گرافن اکساید را در زمان ها و غلظت های مختلف بر روی رده سلولی (BEAS-2B) بررسی کردند و نتایج آزمون XTT در این مطالعه کاهش معنی داری را در سطح زنده ماندن سلول ها نشان می داد که وابسته به دوز و زمان افزایش می یافت (۱۵).

نتایج به دست آمده در بررسی سلول های تیمار شده با نانو ذره توسط میکروسکوپ Invert هم راستا با نتایج حاصل از تست XTT بود و هر چقدر میزان غلظت نانو ذره و زمان تاثیر آن بیشتر می شد تعداد واکوئل های بیشتری دیده شد و تعداد سلول های زنده کاهش یافت.

تست آکریدین ارنج اتیدیوم بروماید (EtBr/AO) نشان داد که نانو ذره Gold-rGO در غلظت های بالا القا مرگ آپوپتوزی در سلول های سرطانی HepG2 بر جای گذاشته است. در مطالعه Siddique و همکاران اثر آپوپتوزی ماده گرافن زینک اکساید بوسیله تست (EtBr/AO) بررسی شد (۱۶). با افزایش بیان ژن کاسپاز ۳، سلول ها از طریق آپوپتوز به سمت مرگ می روند. کاسپاز ۳ در هر دو مسیر میتوکندریایی و خارجی کاسپاز انتهایی است. مقایسه نتایج بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ در این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان دوز نانو ذره و مدت زمان بیشتر، بیان ژن کاسپاز ۳ بیشتر شد که این عامل باعث بالا رفتن میزان آپوپتوز شد و مرگ و میر سلولی بیشتر شد (۱۷).

Chatterjee و همکارانش دو ماده گرافن اکساید و گرافن اکساید احیا شده را در غلظت ها و زمان های مختلف بر روی سلول ها اثر داده و میزان بیان ژن کاسپاز ۳ را در آن ها بررسی کردند نتایج بررسی، افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و در نتیجه آپوپتوز را با بالا رفتن غلظت و زمان نشان داد که این تاثیر گذاری غلظت و زمان با نتایج حاصل از مطالعه ما در یک راستا است (۱۸).

ارزیابی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانو ماده Gold-rGO مورد استفاده می تواند در غلظت بالاتر از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر گروه (B) با افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ تاثیر سمی بر سلول های رده HepG2 بگذارد. بنابراین در موارد کاربردهای درمانی و تشخیصی باید این مورد مد نظر قرار گیرد و از زمان های کوتاه تر و غلظت های پایین تر این نانو ذره استفاده کرد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

تضاد منافع: هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا مرکز حامی تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت های مالی و همچنین آقای دکتر امیدی برای حمایت و کمک در این تحقیق قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]

References

1.Yadegari A, Omidi M, Yazdian F, Zali H, Tayebi L. An electrochemical cytosensor for ultrasensitive detection of cancer cells using modified graphene–gold nanostructures. RSC Adv. 2017;7(4):2365-72.
2.Yang X, Gan L, Han L, Li D, Wang J, Wang E. Facile preparation of chiral penicillamine protected gold nanoclusters and their applications in cell imaging. Chem Commun (Camb). 2013;49(23):2302-4.
3.Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. Nat Mater. 2007;6(3):183-91.
4.Staggers N, McCasky T, Brazelton N, Kennedy R. Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. Nurs Outlook. 2008;56(5):268-74.
5.Xu M, Zhu J, Wang F, Xiong Y, Wu Y, Wang Q, et al. Improved In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Graphene Oxide through Surface Modification: Poly(Acrylic Acid)-Functionalization is Superior to PEGylation. ACS Nano. 2016;10(3):3267-81.
6.Liu Y, Luo Y, Wu J, Wang Y, Yang X, Yang R, et al. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. Sci Rep. 2013;3:3469.
7.Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. J Inflamm Dis (J Qazvin Univ Med Sci). 2013;17(3):48-57. [In Persian]
8.Xiang P, He RW, Han YH, Sun HJ, Cui XY, Ma LQ. Mechanisms of housedust-induced toxicity in primary human corneal epithelial cells: Oxidative stress, proinflammatory response and mitochondrial dysfunction. Environ Int. 2016;89-90:30-7.
9.Lopez-Chaves C, Soto-Alvaredo J, Montes-Bayon M, Bettmer J, Llopis J, Sanchez-Gonzalez C. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. Nanomedicine. 2018;14(1):1-12.
10.Yuan YG, Cai HQ, Wang JL, Mesalam A, Md Talimur Reza AM, Li L, et al. Graphene Oxide–Silver Nanoparticle Nanocomposites Induce Oxidative Stress and Aberrant Methylation in Caprine Fetal Fibroblast Cells. Cells. 2021;10(3):682.
11.Chen Q, Zhou W, Du SQ, Gong DX, Li J, Bi JB, et al. Overexpression of SNHG12 regulates the viability and invasion of renal cell carcinoma cells through modulation of HIF1α. Cancer Cell Int. 2019;19:128.
12.Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. Gene. 2013;518(2):335-45.
13.Li Y, Liu Y, Fu Y, Wei T, Le Guyader L, Gao G, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. Biomaterials. 2012;33(2):402-11.
14.Yang S, Zhi L, Tang K, Feng X, Maier J, Müllen K. Efficient Synthesis of Heteroatom (N or S)-Doped Graphene Based on Ultrathin Graphene Oxide-Porous Silica Sheets for Oxygen Reduction Reactions. Adv Funct Mater. 2012;22(17):3634-40.
15.Vallabani NV, Mittal S, Shukla RK, Pandey AK, Dhakate SR, Pasricha R, et al. Toxicity of graphene in normal human lung cells (BEAS-2B). J Biomed Nanotechnol. 2011;7(1):106-7.
16.Siddique YH, Khan W, Khanam S, Jyoti S, Naz F, Rahul, et al. Toxic potential of synthesized graphene zinc oxide nanocomposite in the third instar larvae of transgenic Drosophila melanogaster (hsp70-lacZ)Bg9. Biomed Res Int. 2014;2014:382124.
17.Wu W ,Yan L, Wu Q, Li Y, Li Q, Chen S, et al. Evaluation of the toxicity of graphene oxide exposure to the eye. Nanotoxicology. 2016;10(9):1329-40.
18.Chatterjee SG, Chatterjee S, Ray AK, Chakraborty AK. Graphene-metal oxide nanohybrids for toxic gas sensor: a riview. Sens Actuators B Chem. 2015;221:1170-81.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.57.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.482]