مطالعه سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شنبلیله با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست NIH/3T3

امید سبزواری،[1*] مینا عندلیبی،[1] ابوالحسن احمدیانی،[2] محمد کمالی‌نژاد،[3] محمد عبدالهی،[1] سیدناصر استاد[1]

۱- گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- گروه داروشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*نویسنده مسئول، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۶۶۴۹۴۹۹۴
email: omid@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۶/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: اطمینان از سلامت و ایمنی مصرف ترکیبات دارویی، آرایشی یا مکمل غذایی، پیش از ورود محصول به بازار دارویی ضروری می‌باشد. شنبلیله از سبزی‌های مفیدی است که در تهیه انواع غذاها به‌کار می‌رود و به‌عنوان یک گیاه دارویی نیز از قدیم مورد استفاده بوده است. گزارشات اخیر نشان می‌دهد که علاوه بر کاربردهای فراوان در طب سنتی، عصاره آبی برگ‌های شنبلیله دارای اثرات کاهنده قندخون، چربی خون و ضددردی در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد. با عنایت به اثرات درمانی فوق‌الذکر و در دسترس نبودن اطلاعات کافی در خصوص سمیت آن، در این تحقیق بر آن شدیم تا سمیت عصاره آبی برگ‌های شنبلیله را بر سلول‌های فیبروبلاست (NIH/3T3) بررسی نمائیم.
روش بررسی: تعداد ۵×۱۰۴ عدد سلول در هر چاهک از پلیت‌های ۲۴ خانه کاشته شدند و سپس مقادیر ۱۰-۰/۰۱ میلی‌گرم عصاره پس از گذشت یک روز از تاریخ کاشت سلول (حصول اطمینان از رشد سلول‌ها و عدم آلودگی) به آن اضافه گردید. متعاقباً عصاره مزبور به مدت پنج روز در مجاورت سلول‌ها قرار گرفت و پس از پایان این مدت محیط کشت توسط عمل مکش تخلیه و دو بار با بافر PBS شسته شد. سپس تعداد سلول‌های زنده و فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های مزبور به ترتیب با روش‌های Trypan blue exclusion assay و MTT assay ارزیابی گردید. ***یافته‌ها:*** به‌کمک روش‌های مورد استفاده در این تحقیق ID50 عصاره آبی شنبلیله برای روش‌های تریپان بلو و MTT assay بترتیب در حدود ۱/۲۵mg/ml و ۲/۵mg/ml به‌دست آمد. ***نتیجه‌گیری:*** شواهد موجود موید غیرسمی بودن عصاره آبی شنبلیله می‌باشد و سمیت سلولی مشاهده شده، احتمالاً اختصاصی نبوده و ممکن است ناشی از اختلالات غشایی باشد.

کلمات کلیدی: شنبلیله، فنوگریک، سلول‌های فیبروبلاست، سمیت سلولی، تریپان بلو، MTT Assay

مقدمه

گیاهان دارویی (Medicinal plants) از منابع بالقوه الهی هستند که در صورت توجه لازم می‌توانند کاربردهای مناسبی در زمینه‌های دارویی و درمانی، غذایی، آرایشی و بالاخص اقتصادی داشته باشند. به‌علاوه، بسیاری از گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنها به‌صورت خام از کشور صادر می‌شوند درحالی‌که فرآورده‌های حاصل از آنها با قیمت گزاف وارد می‌شوند. یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شنبلیله (Fenugreek) می‌باشد که عرب‌ها آنرا حلبه و ایتالیائی‌ها Trigonella می‌نامند.[1و2] شنبلیله در نواحی مختلف ایران نیز پرورش می‌یابد و از سبزی‌های مفیدی است که در تهیه اغذیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه خوراکی علاوه بر اثرات تغذیه‌ای، موارد استفاده درمانی فراوانی از جمله اشتهاآوری، پایین‌آورندگی قند و چربی خون، ضد دردی و ... را نیز دارا می‌باشد.[1و4و5] سابقه مصرف شنبلیله به مصر باستان بر می‌گردد که برای آسان کردن زایمان و افزایش شیر مادران استفاده می‌شده است و هنوز هم به‌وسیله زنان مصری در درد دوران قاعدگی به‌کار می‌رود. به‌علاوه به صورت ضماد در درمان نقرس، تورم غدد، تومورها، زخم‌ها، جراحات و التهابات پوستی متعدد به‌کار می‌رفته است.[3و6] تاکنون اثرات فارماکولوژیک متعددی از جمله اثرات کاهش قند خون (Hypoglycemic) و ضد دردی برای عصاره آبی برگ‌های گیاه و همچنین خاصیت کاهش چربی خون (Hypocholestrolemic) روی حیواناتی از جمله سگ و موش صحرایی گزارش شده است.[7-9] اثرات کاهش چربی خون

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]

عصاره به فراکسیون ساپونین و فیبر و اثر کاهش قند خون آن به فراکسیون غیر لیپیدی که حاوی تری گونلین، نیکوتینیک اسید و کومارین است، نسبت داده شده است.[۱۰] تجویز دانه‌های گیاه به بیماران دیابتی وابسته و غیر وابسته به انسولین باعث تنظیم گلوکز خون و پاسخ به انسولین شده است و کاهش غلظت گلوکز در ادرار را به‌دنبال داشته است. در این بیماران کاهش غلظت کلسترول خون نیز گزارش شده است.[۱۱و۱۰] در گزارشی اثرات پایین‌آورندگی قند و چربی خون ناشی از عصاره آبی برگ‌های گیاه به اثبات رسیده است. از آنجا که این اثرات درمانی ناشی از دانه شنبلیله به ساپونین‌ها، ۴-هیدروکسی ایزولوسین موجود در دانه نسبت داده می‌شود، وجود هر یک از ترکیبات فوق در برگ‌های گیاه نیز محتمل می‌باشد.[۱۴-۱۲] البته مکانیسم اثرات فارماکولوژی گیاه هنوز به خوبی مشخص نیست و تئوری‌های زیادی از جمله اثر فیبر روی کاهش جذب کربوهیدرات، اثر ساپونین‌ها به تنهایی یا همراه Diosgenin روی متابولیسم و جذب کلسترول و دفع اسیدهای صفراوی و اثر ۴ – هیدروکسی ایزولوسین بر افزایش ریلیز انسولین بیان شده است.[۱۴و۱۳] در حال حاضر عوارض جانبی شاخصی از این گیاه گزارش نشده است و با وجود مطالعات متعدد در خصوص اثرات فارماکولوژیک آن، اطلاعات کافی از سمیت گیاه در دسترس نمی‌باشد[۵و۴و۱] و تنها LD50 بعضی از ترکیبات آن در موش صحرایی اندازه‌گیری شده است: تری‌گونلین 5g/kg، نیکوتینیک اسید ۸/۸g/kg و کومارین ۰/۷۲g/kg.[۱۰] نظر به اینکه یکی از شرایط اصلی صدور مجوز برای ورود داروهای جدید، مواد آرایشی و مکمل‌های غذایی به بازار مصرف، اطمینان از سلامت و ایمنی آنها برای مصرف‌کنندگان است، اطلاع از توان ایجاد سمیت و عوارض سمی احتمالی آنها قبل از ورود به بازار الزامی می‌باشد. آزمون‌های بررسی سمیت معمولا" روی حیوانات آزمایشگاهی انجام می‌شود که با محدودیت‌های عاطفی- اخلاقی و اقتصادی همراه می‌باشد. در سال‌های اخیر تلاش‌هایی صورت گرفته که حتی‌المقدور بخشی از آزمایش‌های سیتوتوکسیسیتی در خارج از بدن و در محیط‌های کشت سلولی انجام شود. به‌کارگیری رده‌های سلولی پیوسته که به‌مدت طولانی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند، نیل به این هدف را تسهیل نموده است.[۱۵] سلول‌های یوکاریوت پستانداران به‌طور وسیع برای ارزیابی سمیت سلولی داروها و مواد شیمیایی به‌کار می‌روند، لذا در این تحقیق برای مطالعه سمیت عصاره آبی برگ‌های شنبلیله روی رده سلولی از سلول‌های فیبروبلاست NIH/3T3 (با منشاء جنین موش سوئیسی) که یک رده سلولی پیوسته از گروه سلول‌هایی با مهار رشد سلولی در اثر تماس می‌باشد، استفاده گردید. هر اثر سمی در این رده سلولی، بدون در نظر گرفتن منشاء سلولی، می‌تواند به‌عنوان سمیت برای سلول‌های پستانداران یا به عبارت دیگر سمیت برای سلول‌های تمایز نیافته محسوب گردد.[۱۹-۱۶] برای مطالعه شدت سمیت سلولی عصاره آبی برگ‌های گیاه شنبلیله آزمون‌های معمول سنجش سمیت سلولی ازقبیل Trypan blue و MTT Assaays به‌خدمت گرفته شدند.

روش بررسی

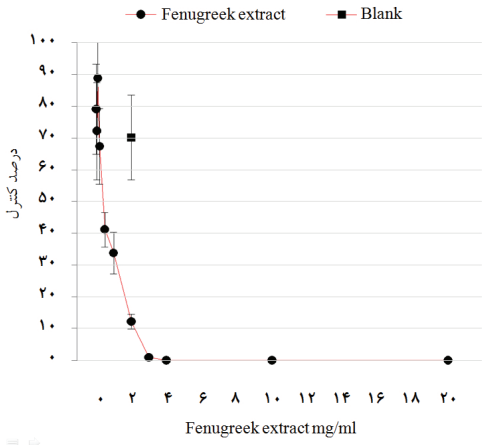
الف) مواد شیمیائی: سلول‌های فیبروبلاست فریز شده رده NIH/3T3 از مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهیه شد. MTT و تریپان بلو از شرکت سیگما خریداری شدند. محیط کشت DMEM، FCS و پنی‌سیلین– استرپتومایسین از شرکت گیبکو خریداری شدند. ب) آماده‌سازی محیط کشت و بافر PBSA: محیط کشت DMEM با FCS و پنی‌سیلین– استرپتومایسین در شرایط استریل مخلوط و در یخچال نگهداری شد و قبل از هر بار مصرف دمای آن به کمک دستگاه حمام آب گرم به $36/5^{\circ}C$ رسانیده می‌شد.[۲۰] محیط کشت DMEM مشتق شده از محیط کشت MEM می‌باشد که حاوی حداقل مواد لازم برای رشد سلول (اسید آمینه‌های ضروری، ویتامین‌ها و نمک‌ها) می‌باشد. بافر PBSA به‌صورت استریل و از اختلاط KCl، KH_2PO_2، NaCl و Na_2HPO_4 تهیه و به‌عنوان محلول شستشو قبل از جداسازی سلول‌ها و همچنین به عنوان رقیق‌کننده تریپسین مورد استفاده قرار گرفت. این بافر در یخچال نگهداری و قبل از مصرف به دمای $36/5^{\circ}C$ رسانیده شد.[۲۱] ج) آماده‌سازی عصاره گیاه: برگ خشک شنبلیله با آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. محصول پس از سرد شدن با صافی پارچه‌ای صاف و عصاره حاصل در ظروف متعدد تقسیم شد و به مدت سه روز با حرارت بن ماری تغلیظ گردید تا جایی که محتویات به صورت لایه بدون آبی در ظرف باقی ماند. محصول به‌دست آمده تا زمان استفاده، در یخچال نگهداری شد. د) روش آزمایش: سلول‌های فیبروبلاست فریز شده رده NIH/3T3 از مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهیه و به‌وسیله ظرف کوچک حاوی بخار ازت به آزمایشگاه کشت سلولی انتقال یافت و به‌هنگام استفاده محتویات

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]

کرایوتیوپ در بن ماری ذوب و تحت شرایط استریل (Laminar air flow) در فلاسک T-75 و در انکوباتور ۳۶/۵°C و CO2 ۵٪ کشت داده شدند. سلول‌ها هر روز برای بررسی میزان رشد و تکثیر و همچنین آلودگی‌های احتمالی یا تخریب سلولی زیر میکروسکوپ مشاهده شدند و محیط کشت آنها به هنگام لزوم (مثلا کاهش pH محیط و تغییر رنگ آن به زرد) تعویض گردید و هنگامی که سلول‌ها تقریبا ۹۰٪ سطح فلاسک را پوشاندند، پاساژ سلولی انجام و از پاساژ دهم سلول‌ها برای انجام مطالعات سیتوتوکسیسیتی آماده شدند. در این مدت چون احتمال آلودگی، تخریب و از دست رفتن سلول‌ها وجود داشت مقداری از آنها در تانک ازت ۱۹۶°C– با ثبت مشخصات کامل سلول فریز و نگهداری شدند. ه) MTT Assay: MTT نمک محلول در آب تترازولیوم است که تحت تاثیر آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال در اثر شکستن حلقه تترازولیوم به فرمازان نامحلول بنفش رنگ تبدیل می‌شود. این ترکیب در ایزوپروپانل اسیدی شده محلول است و شدت رنگ آن در طول موج ۶۰۰-۵۵۰nm بیشترین مقدار بوده و قابل اندازه‌گیری می‌باشد. پس از قرار دادن تعداد ۵×۱۰۴ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند.[۲۳] غلظت‌های مورد نظر عصاره استریل (توسط اتوکلاو) در مجاورت سلول‌ها قرار داده شد و پلیت‌ها برای مدت پنج روز به انکوباتور منتقل شدند و در این مدت هر روز وضعیت سلول‌ها زیر میکروسکوپ بررسی می‌شد. بعد از پنج روز انکوباسیون سلول‌ها با عصاره، محلول MTT به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها مجددا به مدت چهار ساعت انکوبه شدندجذب آنها با دستگاه Elisa-Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر ۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و پس از مقایسه با شاهد، نمودار مربوطه رسم گردید. و) Trypan blue assay: این آزمایش برآوردی تقریبی از Viability سلول‌ها می‌باشد که براساس عدم جذب بعضی رنگ‌ها از جمله تریپان بلو توسط سلول‌های زنده استوار است. در حالی‌که سلول‌های مرده نسبت به این رنگ نفوذپذیرند. این رنگ تمایل زیادی به پروتئین‌های موجود در سرم دارد به همین دلیل قبل از رنگ‌آمیزی باید سلول‌ها به خوبی با PBSA شسته شوند تا پروتئین‌های باقیمانده سرم کاملا" از محیط خارج شوند. با مقایسه تعداد سلول‌های زنده هر خانه با خانه شاهد، نمودار مربوطه رسم شد و نتایج با انجام آنالیز آماری به روش Student t-test (Unpairs) تفسیر شد.

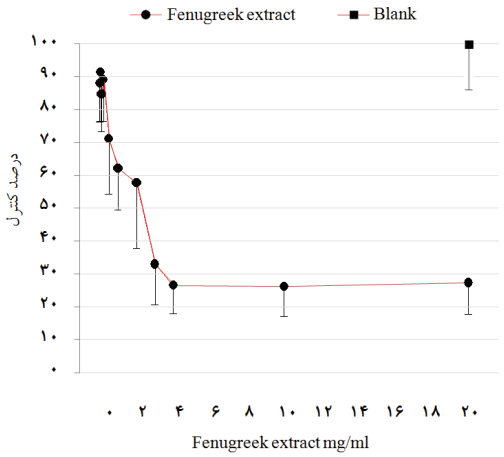
یافته‌ها

نتایج مجاورت سلول‌های فیبروبلاست با عصاره آبی برگ‌های شنبلیله به روش شمارش با تریپان بلو در نمودار ۱ نمایش داده شده است. در دوزهای پایین (حدود ۰/۰۱ میلی‌گرم) Viability سلول‌ها در حدود ۸۰٪ است که مشابه گروه شاهد می‌باشد. با افزایش میزان عصاره Viability سلول‌ها با روندی وابسته به غلظت (تا دوز ۳mg/well) کاهش می‌یابد و در این دوز و مقادیر بالاتر عملاً سلول زنده‌ای در محیط کشت وجود ندارد. Viability سلول‌های NIH/3T3 پس از پنج روز مجاورت با عصاره به روش MTT در نمودار ۲ آمده است. در حداقل غلظت که حدود ۰/۰۱mg می‌باشد Viability سلولی در حدود ۹۰٪ می‌باشد که با افزایش میزان عصاره در روندی وابسته به دوز کاهش می‌یابد. با افزایش دوز تا حدود ۴mg، فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری به حدود ۲۵٪ رسیده است و پس از آن ظاهراً افزایش دوز تاثیری در میزان فعالیت سلولی نداشت. با آزمون آماری Student's t-test (Unpair) مشخص گردید که در روش تریپان بلو از دوز ۰/۵mg/well و در MTT از دوز ۱mg/well به بالا بین دوزها و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود دارد (p<۰/۰۵). ID50 عصاره در روش تریپان بلو و با در نظر گرفتن شاهد در حدود ۱mg/well و در روش MTT حدود ۲/۴mg/well به‌دست آمد. در نمودار ۳ منحنی‌های ۱ و ۲ با هم مقایسه شده‌اند و با انجام آزمون آماری (Unpair) Student's t- test اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری بین جواب‌های حاصل از دو روش آزمایش وجود نداشت (p<۰/۰۵).

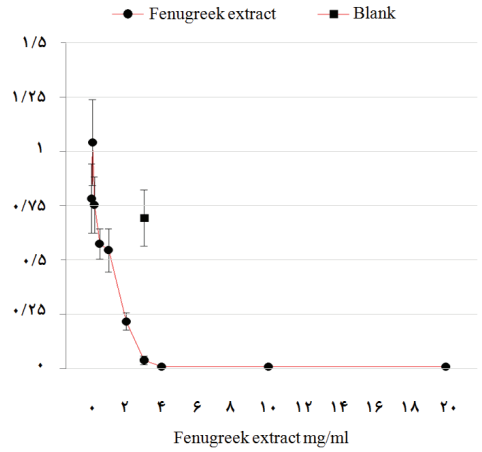


نمودار- ۱: اثر عصاره آبی برگ‌های گیاه شنبلیله بر Viability سلول‌های 3T3 فیبروبلاست موش به روش تریپان بلو (n=12, mean±SE)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]



نمودار- ۲: اثر عصاره آبی برگ‌های گیاه شنبلیله بر Viability سلول‌های 3T3 فیبروبلاست موش به روش MTT (n=12, mean±SE)



نمودار- ۳: منحنی مقدار- پاسخ عصاره‌آبی برگ‌های شنبلیله بر Viability سلول‌های 3T3 فیبروبلاست موش به روش‌های تریپان‌بلو و MTT (n=12, mean±SE)

بحث

از آنجا که سلول‌های فیبروبلاست موش به صورت رده سلولی پیوسته درآمده است از آن به عنوان الگوی سلول‌های یوکاریوتیک مشابه فیبروبلاست انسانی استفاده می‌گردد. به همین جهت در این پژوهش رده سلولی NIH/3T3 (فیبروبلاست موش سوئیسی) انتخاب و از پاساژهای P11–P14 استفاده شد. 3T3 کد این رده سلولی است که از دستور انتقال سه روزه سلول‌ها با تعداد ۳×۱۰۵ سلول گرفته شده است. برای تاثیر کامل عصاره، سلول‌ها به‌مدت پنج روز در مجاورت عصاره قرار گرفتند که یک آزمون معمول برای آزمایش‌های بررسی سمیت می‌باشد. متعاقبا با انجام پیش آزمون، محدوده مقادیر افزودنی عصاره ۱۰– ۰/۰۱ میلی‌گرم تعیین گردید و مطابق روش‌های استاندارد تعداد ۵×۱۰۴ سلول در هر چاهک قرار داده شد. گروه‌های کنترل حاوی سلول‌های کشت شده در محیط کشت به همراه بافر PBS و گروه‌های بلانک حاوی همان سلول‌ها به همراه آب مقطر می‌باشند.[۲۴] همانطور که در شکل ۱ ملاحظه گردید با افزودن عصاره، (حلال عصاره) به اندازه بالاترین حجم عصاره افزوده شده سمیت سلولی مشاهده شد که در مقایسه با کنترل، از دوز ۰/۵mg/well به بالا اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). علت تفاوت ضریب حیاتی گروه بلانک با گروه کنترل، احتمالاً عدم ایزوتونیک بودن حلال (آب مقطر) اضافه شده به گروه بلانک و تغییر حجم نسبتاً وسیع داخل محیط کشت است که این امر موجب تغییر فشار اسمزی، تغییر pH و سلول‌های شاهد در آزمون MTT (نمودار ۲) Viability حدود ۱۰۰٪ بوده و ارگان‌های داخل سلول از جمله میتوکندری همچنان دارای فعالیت حیاتی بوده‌اند. مقایسه نتایج منحنی‌های ۱ و ۲ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در وضعیت دو منحنی حاصل از روش‌های تریپان بلو و MTT، موید این است که احتمالاً سمیت سلولی غیراختصاصی بوده و بیشتر ناشی از تغییر غلظت ترکیب مربوطه در مجاورت سلول می‌باشد که منجر به مرگ سلولی ناشی از تداخلات در سطح غشا می‌شود. مقایسه ID50 به‌دست آمده از دو منحنی MTT و تریپان بلو و همچنین نسبت دوز با جدول کلاسیک ۱ نشان می‌دهد که این ترکیبات جزو مواد غیرسمی طبقه‌بندی می‌شوند. به‌هرحال تایید این نکته نیازمند مطالعات وسیع‌تر و دقیق‌تری می‌باشد زیرا گزارشی از میوپاتی ناشی از شنبلیله در نشخوارکنندگان در سال ۱۹۸۳ و گزارشی از نکروز کبدی ناشی از ساپونین‌های این گیاه در جوجه در سال ۱۹۹۱ وجود دارد.[۲۵و۲۶] گیاه شنبلیله حاوی ترکیبات متعددی می‌باشد، از میان آنها Trigonelline، coumarin، 4- nicotinamide، nicotinic acid، hydroxyisoleucine و غیره محلول در آب می‌باشند.[۲۷] LD50 برخی از این ترکیبات موجود در دانه گیاه به ترتیب ۵g/kg برای تری گونلین، ۸/۸g/kg برای نیکوتینیک اسید، ۰/۷۲g/kg برای کومارین می‌باشد که از این بین فقط کومارین جزو ترکیبات سمی طبقه‌بندی می‌گردد.[۲۸] معهذا، از میزان این ترکیبات در عصاره آبی برگ گیاه اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد. هر دسته از ترکیبات موجود در گیاه به تنهایی یا توام با یکدیگر ممکن است در بروز تغییرات مشارکت داشته باشند. از آنجا که هدف از انجام این مطالعه جداسازی ترکیبات

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]

موجود در عصاره و بررسی نقش هر یک از آنها نبوده است، نمی‌توان با تکیه بر نتایج حاصل به اظهارنظر قطعی پرداخت ولی مطالعات آتی به‌ویژه روی اجزا عصاره می‌تواند تصویر روشن‌تری از مکانیسم‌های احتمالی یا قطعی دخیل در بروز اثرات ارائه نماید. در مطالعه حاضر عصاره آبی برگ‌های شنبلیله مورد استفاده قرار گرفته است. نظر به اینکه تاکنون مطالعات زیادی در خصوص برگ این گیاه انجام نگرفته است اطلاعات چندانی از ترکیبات موجود در برگ در دسترس نمی‌باشد. لذا میزان حلالیت ترکیبات فوق در عصاره آبی مشخص نیست. برای مثال Apigenin به‌عنوان ترکیبی تقریباً نامحلول در آب شناخته می‌شود در حالی‌که در مطالعه‌ای که توسط Abu-zargo در سال ۱۹۹۵ انجام گرفت عصاره آبی گیاه Artemisia را حاوی این ماده دانسته‌اند.[۲۹] پژوهشی توسط Talwalker در سال ۱۹۶۳ روی برگ‌های شنبلیله صورت گرفت که در برگ‌ها مقادیر زیادی ویتامین C، کاروتن، پروتئین، کلسیم، آهن، تیامین و ریبوفلاوین یافت شده است و تغییرات فصلی روی محتویات آن غیر از ریبوفلاوین و تیامین بی‌اثر بوده است.[۳۰] اثرات کاهندگی قند و چربی خون عصاره آبی برگ‌های شنبلیله مورد تایید قرار گرفته است و از آنجا که این اثرات درمانی مشاهده شده از دانه شنبلیله به ساپونین ها یا ۴– هیدروکسی ایزولوسین و سایر ترکیبات موجود در دانه نسبت داده شده است که احتمال حضور هر یک از ترکیبات ذکر شده در برگ‌های گیاه نیز وجود دارد.[۴و۵] باوجود اینکه حضور ترکیبات فوق‌الذکر در برگ به‌اثبات نرسیده است، در پژوهش حاضر تست سمیت عصاره آبی تام گیاه شنبلیله به روش کلاسیک in vitro به عمل آمده است زیرا در حال حاضر گیاه شنبلیله و عصاره آن علاوه بر مصارف تغذیه‌ای، در درمان نیز کاربرد دارد. گرچه نتایج حاصل از این مطالعه در مجموع موید این واقعیت است که این عصاره سمی نمی‌باشد انجام مطالعات جهت کسب اطلاعات بیشتر از اثرات دراز مدت مصرف این عصاره با توجه به موارد کاربرد درمانی آن بسیار ضروری می‌باشد.

References

۱. زرگری علی. گیاهان داروئی، چاپ اول. تهران: موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۳۷۰.

2. Gruenwald J, Fleming T. PDR for Herbal Medicines. Montvale, NJ: Medical Economics; 1998.
3. D'Amelio FS. Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999.
4. Abdel-Barry JA, Abdel-Hassan IA, Al-Hakiem MH. Hypoglycaemic and Anti-hyperglycaemic effects of Trigonella foenumgraecum leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 1997; 53: 149-55.
5. Javan M, Ahmadiani A, Semnanian S. Kamalinejad M. Antinociceptive effects of Trigonella foenum-graecum leaves extract. *J Ethnopharmacol* 1997; 58: 125-9.
6. Ody P. The Herb Society's Complete Medicinal Herbal. London: Dorling Kindersley; 1993.
7. Khosla P, Gupta DD, Nagpal RK. Effect of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) on blood glucose in normal and diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1995; 39: 173-4.
8. Petit PR, Sauvaire YD, Hillaire-Buys DM, Leconte OM, Baissac YG, Ponsin GR, et al. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 1995; 60: 674-80.
9. Petit P, Sauvaire Y, Ponsin G, Manteghetti M, Fave A, Ribes G. Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat: metabolic-endocrine correlates. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 369-74.
10. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals. London, England: Pharmaceutical Press; 1998.
11. Bordia A, Verma SK, Srivastava KC. Effect of ginger (Zingiber officinale Rosc.) and fenugreek (Trigonella foenumgraecum L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56: 379-84.
12. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, et al. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes* 1998; 47: 206-10.
13. Sauvaire Y, Ribes G, Baccou JC, Loubatieères-Mariani MM. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids* 1991; 26: 191-7.
14. Stark A, Madar Z. The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (Trigonella foenum-graecum) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats. *Br J Nutr* 1993; 69: 277-87.
15. Freshney RI. Culture of Animal Cells. 3rd ed. New York: Wiley liss; 1994.
16. Alpar B, Günay H, Geurtsen W, Leyhausen G. Cytocompatibility of periodontal dressing materials in fibroblast and primary human osteoblast-like cultures. *Clin Oral Investig* 1999; 3: 41-8.
17. Vian L, Vincent J, Maurin J, Fabre I, Giroux J, Cano JP. Comparison of three in vitro cytotoixicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxicology in Vitro* 1995; 9: 185-90.
18. Fujita KI, Yamamoto S, Matsukawa A, Tanaka T, Taniguchi M. Selective cytotoxic effects of 5-fluorouridine 5'-diphosphate sugars on virus-transformed malignant cells of mouse fibroblast. J *Fermentation and Bioengineering* 1996; 81: 174-7.
19. Ostad SN. The teratogenic and toxicological effects of drugs delivered directly to female genital tract. Thesis for the Ph.D. degree, University of Brighton, 1996.
20. ATCC Catalogue. The passage number listed applies to material available for distribution as of September, 1991.
21. Freshney RI. Animal cell culture: a practical approach. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1992.
22. Celis JE. Cell Biology: A Laboratory Handbook. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1998.
23. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 474-80.
24. Ostad SN, Malhi JS, Gard PR. In vitro cytotoxicity and teratogenicity of norethisterone and levonorgestrel released from hollow nylon monofilaments. *J Control Release* 1998; 50: 179-86.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]

25. Nakhla HB, Mohamed OS, Abu IM, Fatuh AL, Adam SE. The effect of Trigonella foenum graecum (fenugreek) crude saponins on Hisex-type chicks. *Vet Hum Toxicol* 1991; 33: 561-4.
26. Shlosberg A, Egyed MN. Examples of poisonous plants in Israel of importance to animals and man. *Arch Toxicol Suppl* 1983; 6: 194-6.
27. Budavari S. The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 20th ed. New Jersey: Merck & Co. Inc; 1991.
28. Ballantyne B, Marrs T, Syversen T. General and applied toxicology. 2nd ed. London: Macmillian Reference Ltd; 1999.
29. Abu-Zarga M, Qauasmeh R, Sabri S, Munsoor M, Abdolla S. Chemical constituents of Artemisia arborescens and effect of the aqueous extract o rat isolated smooth muscle. *Planta Medica* 1995; 61: 242-5.
30. Talwalker RT. Patel SM. Chem Abstract. 1963; Vol 58: 7300.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 8, Nov 2008: 545-551

Cytotoxicity assay of fenugreek aqueous extract on NIH3T3 fibroblast cells

Sabzevari O[1*]
Andalibi M[1]
Ahmadiani A[2]
Kamalinejad M[3]
Abdollahi M[1]
Ostad SN.[1]

1-Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Tehran/Medical Sciences, Tehran
2- Department of Pharmacology, Faculty of Medicin
3- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Shahid BeheshtiUniversity of Medical Sciences

*Corresponding author:
Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Tehran Medical Sciences, Tehran-14155/6451, IRAN
Tel: +9821-6649 4994
email: omid@tums.ac.ir

Received: June 02, 2008 Accepted: August 27, 2008

Abstract

***Background*:** There is a growing interest in understanding the biological effects of time-tested folk medicinal plants including the green leafy vegetables, which supply minerals and vitamins to the diet. *Trigonella foenum-graecum* L (fenugreek) is a dietary vegetable and there are reports concerning its antinociceptive effects in Iranian traditional medicine. Its seeds are also known for their carminative, tonic, antidiabetic, antineoplastic and restorative properties. These reports and the hypoglycemic effect of fenugreek leaf extract encouraged us to assay fenugreek aqueous extract for cytotoxicity on NIH3T3 mouse fibroblast cells.

***Methods*:** The NIH3T3cell line was purchased from National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Iran. The cells were plated in 24-well microtiter plates with DMEM+F12 medium containing 10% fetal calf serum supplemented with 445 mg/L L-glutamine and maintained at 37°C with 5% CO_2/95% air. Following a 24-hr incubation period, various concentrations (0.01-20 mg) of the extract to the culture wells. Cell viability was assessed using trypan blue and MTT assays after five days of incubation.

***Results*:** The results show that the IC_{50} of the fenugreek extract as calculated from the trypan blue and MTT assays were 1.25 and 2.5 mg/mL, respectively.

Conclusions: Our findings, therefore, suggest that the aqueous extract of fenugreek is classified as nontoxic. This observed cytotoxicity is not specific and could be due to membrane disturbances.

Keywords: *Trigonella foenum-graecum*, fenugreek, cytotoxicity, NIH3T3, MTT assays, Trypan blue.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-07-03]