بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی، خاصیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی عصاره گیاه *Trifolium cherleri* بر روی رده سلولی سرطان ریه (A549) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹

امیر میرزایی[۱*]، علی‌اصغر باقری کشتلی[۱]، حسن صاحب جمعی[۲]، حسن نوربازرگان[۳]، حسن رحمتی[٤]، سید عطاالله سادات شاندیز[۵]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.
۲- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
٤- گروه میکروب‌شناسی، آزمایشگاه بالینی دکتر ایزددوست، تهران، ایران.
۵- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: رودهن، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی رودهن.
تلفن: ۷٦۵۰۵۸۹۱ -۰۲۱
E-mail: A.mirzaie@riau.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹٦/۰۱/۱٦ ویرایش: ۱۳۹٦/۰۵/۲۰ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۵/۳۰ آنلاین: ۱۳۹٦/۰۵/۳۱

زمینه و هدف: گیاه *Trifolium cherleri* یکی از گونه‌های گیاهان علفی از خانواده Fabaceae می‌باشد که بومی آفریقا، آسیا و استرالیا می‌باشد. همچنین، این گیاه جزء مهمترین گیاهان علوفه‌ای خانواده Fabaceae در ایران است که از نظر طب سنتی دارای اهمیت است. هدف از این مطالعه، بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *T. cherleri*، اثرات ضدباکتریایی، اثرات ضدسرطانی این عصاره بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از مهر تا بهمن ماه ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی به انجام رسید. ابتدا ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *T. cherleri* با روش Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) شناسایی شد و به‌دنبال آن اثرات ضدباکتریایی آن با روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) بررسی شد. همچنین، اثرات ضدسرطانی آن بر روی رده سلولی سرطان ریه (A549) با روش رنگ سنجی (MTT) ارزیابی شد. سپس، بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: آنالیز ترکیبات فیتوشیمیایی نشان داد که عصاره گیاه دارای ۲۰ ترکیب می‌باشد که بیشترین آن مربوط به Hexadecanoic acid, ethyl ester (۲۰/۷٪) و Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-2 (۱۹/۹٪) بود. عصاره بیشترین تاثیر را روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* داشت. عصاره دارای سمیت سلولی وابسته به دوز بر روی رده سلولی A549 بود. همچنین، نتایج Real-Time PCR افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ را به ترتیب به میزان ۵۷/۲۷±۲/۰ (P=۰/۳٤) و ۳/۳±۰/٤٦ (P=۰/۲۷) نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، به‌نظر می‌رسد که عصاره گیاه *T. cherleri* دارای اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی چشمگیر می‌باشد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یکی از گیاهان بومی کشورمان پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد.

کلمات کلیدی: *Trifolium cherleri*، اثرات ضدباکتریایی، سمیت سلولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی.

مقدمه

گیاهان دارویی و عصاره‌های برگرفته از آن‌ها از دیرباز تاکنون مورد توجه پژوهشگران بوده است و بسیاری از ترکیبات تشکیل دهنده عصاره و اسانس‌های گیاهی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا بی‌خطر و امن معرفی شده‌اند. همچنین اثرات ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطانی و سایر خواص دارویی آن‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.[۱] در حال حاضر با توجه به گستردگی بروز مقاومت‌های میکروبی، یافتن داروی جایگزین با عوارض جانبی کمتر جهت درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.[۲] به همین علت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

به‌کارگیری عصاره‌های گیاهی مختلف که دارای اثرات ضدمیکروبی هستند، دارای اهمیت است.[۳] افزون بر مقاومت‌های میکروبی، بیماری سرطان نیز یکی از مهمترین علل مرگ و میر در سرتاسر دنیا به‌شمار می‌رود که در این میان سرطان ریه یکی از شایعترین سرطان‌ها محسوب می‌شود.[٤و٥] در واقع، در این نوع از سرطان مشخصه رشد کنترل نشده سلول در بافت‌های ریه انجام می‌گیرد.[٦] یکی از علل شایع سرطان ریه، قرار گرفتن در معرض دود دخانیات برای یک مدت طولانی است که دلیل ۹۰٪ از این نوع سرطان می‌باشد. در سراسر دنیا، سرطان ریه شایعترین دلیل مرگ و میر مربوط به سرطان در بین زنان و مردان به‌شمار می‌رود و بر اساس گزارش GLOBOCAN 2008 سرطان ریه مسئول ۱/۳۸ میلیون مرگ و میر در سال است.[۷]

امروزه درمان‌های رایج جهت درمان سرطان ریه روش‌های جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌باشد اما به‌تازگی گرایش بسیاری از پژوهشگران علم گیاه‌شناسی و زیست‌شناسی به سمت داروهای طبیعی ضدسرطان جهت پیدا کرده است.[۸] به‌طور کلی، ترکیبات گیاهی که خاصیت ضدتوموری دارند در گروه‌های شیمیایی آلدهیدها، آلکالوییدها، گلیکوزیدها، فلاوونوییدها، ترکیبات فنلی و ترپنوییدها قرار می‌گیرند و گفتنی است که بیش از ٦۰٪ داروهای رایج ضدسرطانی برگرفته منابع طبیعی مانند عصاره گیاهان هستند.[۹] گیاه Trifolium متعلق به خانواده شبدرها است. جزء مهمترین گیاهان علوفه‌ای خانواده Fabaceae مناطق معتدل و مرطوب است که از نظر علوفه‌ای و مرتعی دارای ارزش فراوانی است.

بر اساس بررسی‌های اخیر بانک ژن گیاهی و ذخایر توارثی موسسه پژوهش‌های اصلاح و تهیه نهال و بذر، تعداد گونه‌های شناخته شده شبدر در ایران حدود ٥٤ گونه است که از این تعداد گونه شبدر ایرانی به نام *Trifolium cherleri* به صورت وسیع کشت می‌شوند.[۱۰] بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی، خاصیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی عصاره گیاه *T. cherleri* بر روی رده سلولی سرطان ریه (A549) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که از مهر تا بهمن ماه ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن به انجام رسید، ابتدا پودر گیاه *T. cherleri* با شماره هرباریومی P1006678 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره به روش ماسراسیون یا خیساندن، ابتدا میزان ٤۰ g از پودر گیاه *T. cherleri* را وزن نموده و ۳۰۰ ml از الکل ۹۰٪ را به گیاه اضافه نموده و به مدت ۲٤ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۹۰ rpm قرار داده شد. پس از ۲٤ ساعت از کاغذ صافی و فیلتر سرسرنگ برای فیلتر کردن استفاده شد و در انکوباتور با در دمای ۳۷ °C قرار داده شد تا الکل آن به‌طور کامل تبخیر شود. آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS عصاره هگزانی گیاه *T. cherleri* با دستگاه Agilent 6890 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) انجام گرفت. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm بود و به منظور ردیابی، از سامانه پونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد.

برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ °C با سرعت افزایش دمای ٦ °C در دقیقه انجام گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪ و مقدار تزریق ۱ µl و سرعت جریان گاز ۱۵ ml در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ µl از عصاره گیاه به دستگاه گازکروماتوگرافی اسپکترومتری جرمی (GC/MS) تزریق شد و سپس نتایج به‌دست آمده از دستگاه با مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل طیف‌های GC-MS با استفاده از داده‌های موجود در بانک اطلاعاتی National Institute Standard and Technology (NIST) انجام شد. نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده مورد تایید قرار گرفت. به‌منظور ارزیابی میزان اثرات ضدباکتریایی عصاره گیاه *T. cherleri* از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration, MIC) استفاده شد. آزمایش MIC بر اساس استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) و به‌صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت‌های ۹٦ خانه‌ای برای باکتری‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *استرپتوکوکوس پایوژنز* ATCC 19615، *سالمونلا انتریتیدیس* ATCC 13076 و *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 35152 انجام شد. عصاره از غلظت‌های ٦۲/۵ mg/ml تا ٤۰۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته و با محیط کشت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

مولر هینتون براث (HiMedia, India) تا حجم ۱۰۰ µl رسانده شد. همه چاهک ها با مقدار ۵۰ µl از کشت میکروبی سویه‌ها با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به یادآوری است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به‌منظور محاسبه سمیت سلولی *T. cherleri* علیه رده‌ی سلولی سرطانی ریه A549 از روش MTT Assay استفاده شد. معرف MTT (۳-(٤ و ۵- دی متیل تترازولیل -۲)-۲و ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) مورد استفاده در این تست که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است، جذب میتوکندری و سلول‌های فعال متابولیک شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازان بنفش رنگ می‌دهد که در حلال مناسب حل شده و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. جهت انجام این آزمون، ابتدا تعداد یکسان ۱۰٤ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای مخصوص کشت سلول ریخته شد. به دنبال آن غلظت‌های ۰/۷۸ mg/ml، ۱/۵٦، ۳/۱۲، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۵۰، ۱۰۰ از عصاره مدنظر تهیه شده و در فاصله زمانی ۲٤ ساعت بر روی رده سلولی A549 تاثیر داده شد.

پس از گذشت این مدت، محتوای چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای برداشته شده و ۲۰ µl از محلول رنگ MTT (Sigma, Germany) به داخل هر چاهک اضافه شد و به مدت چهار ساعت انکوباسیون ادامه یافت. سپس رنگ MTT حذف شده و ۱۰۰ µl Dimethyl sulfoxide (DMSO) به هر چاهک اضافه شد و جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از ELISA Reader (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands) خوانده شد و میزان کشندگی سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه شد:

% Cell inhibition= 100- [(At-Ab)/(Ac-Ab)] × 100 که At= جذب نمونه مورد تست، Ab=جذب نمونه بلانک و Ac= جذب نمونه کنترل است.

جهت ارزیابی بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ (casp3 و casp9) از روش Real-Time PCR استفاده شد. به این منظور، ابتدا RNA کل سلول‌های تیمار شده با عصاره با استفاده از RNA extraction kit (Sinnagene, Tehran, Iran) بر اساس دستورکار آن استخراج شد و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) مشخص گردید. به‌دنبال آن، جهت سنتز cDNA از cDNA synthesis kit (Formentas, Vilnius, Lithuania) استفاده شد، به‌طوری که در سنتز cDNA از ۵ µl بافر 5x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ µl پرایمرهای Random hexamer، ۰/۵ µl از پرایمر Oligo dT، دو میکرولیتر dNTPs، یک میکرولیتر RNase inhibitor، یک میکرولیتر Reverse Transcriptase (۲۰ واحد در میکرولیتر) و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) استفاده گردید. در سنتز cDNA از برنامه دمایی پنج دقیقه در دمای ۲۵ °C، ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ °C و پنج دقیقه در دمای ۷۰ °C و پنج دقیقه در دمای ٤ °C استفاده شد. پس از سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ از پرایمرهای اختصاصی *casp3* و *casp9* به‌ترتیب با توالی‌های 5'- ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC -3'، 5'- CGTACCAGAGCGAGATGACA -3' و 5'- GGCGGAGCTCATGATGTCTGTG -3' و 5'- TTCCGGTGTGCCATCTCCATCA -3' استفاده شد.

همچنین از ژن مرجع GAPDH با توالی پرایمری 5'- CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' رفت و 5'- CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشتی استفاده شد. در نهایت، برای بررسی بیان ژن‌ها از روش Real-Time PCR (Bioneer, Korea) استفاده شد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه توسط SPSS software, version 22 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. نتایج تجربی به‌صورت انحراف از معیار ±SEM نشان داده شد و تمامی تست‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

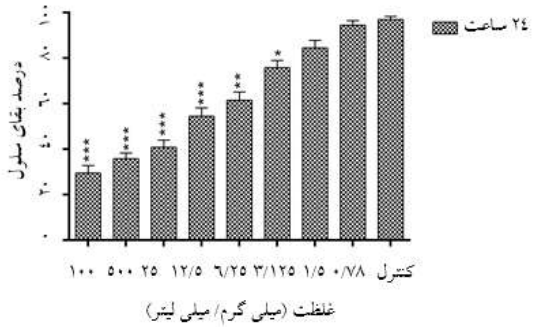
یافته‌ها

آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه ۲۰ پیک را نشان داد که وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه را مشخص نمود. با مقایسه طیف‌ها با داده‌های کتابخانه National Institute of Standards and Technology (NIST)، ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

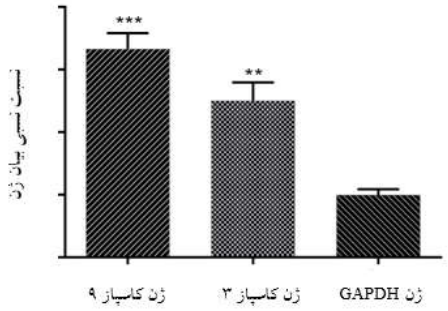
جدول ۱: نتایج MIC عصاره گیاه *T. cherleri* علیه باکتری‌های منتخب

نام باکتری	غلظت مهارکنندگی (mg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵
استرپتوکوکوس پایوژنز	۱۰۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۵۰
سالمونلا انتریتیدیس	۲۰۰



نمودار ۱: درصد بقای سلول‌های A549 در برابر غلظت‌های مختلف عصاره *T. cherleri* در مدت زمان ۲٤ ساعت. نتایج به‌صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، *** P<۰/۰۰۱، n=۳).

ترکیبات شناسایی شده Hexadecanoic acid, ethyl ester (۲۰/۷٪) و 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl (۱۹/۹٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند. اثرات ضدباکتریایی عصاره الکلی گیاه *T. cherleri* با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/ml برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *استرپتوکوکوس پایوژنز* ATCC 19615، *سالمونلا انتریتیدیس* ATCC 13076 و لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 35152 با روش MIC انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه مدنظر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی دارد، به‌طوری‌که کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین مربوط بود با باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (جدول ۱). ابتدا تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های ۰/۷۸ mg/ml، ۱/۵، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۵۰، ۱۰۰



نمودار ۲: میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ نسبت به ژن کنترل (GAPDH).
نسبت بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ به ژن مرجع در رده سلولی A549 تیمار شده با عصاره به‌میزان به میزان (P<۰/۰۵) ۲/۵۷±۰/۲۷ و (P<۰/۰۵) ۳/۳±۰/٤٦ افزایش طی ۲٤ ساعت مشاهده شد.

از عصاره *T. cherleri* انجام گرفت و سپس درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از مدت زمان ۲٤ ساعت بررسی شد. نتایج سمیت سلولی نشان داد که تیمار سلول‌های A549 در مدت زمان ۲٤ ساعت به‌ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان ۹۵/۷±۰/۵۱، ۸٤±۰/۸۳، ۷٦±۰/۹۷، ٦۱/۷±۰/٦٤، ۵۵/۷±۰/۱۵، ٤۱/۹±۰/۷۷، ۳٦/۵±۰/۳٤، ۲۹/٦۱±۰/۳۸ شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از مقایسه تست سمیت سلولی بین غلظت‌های مختلف عصاره در رده سلولی A549 نشان داد که عصاره در مدت زمان ۲٤ ساعت و غلظت ۱۰۰ mg/ml بیشترین تاثیر سمیت سلولی را داشته (P<۰/۰۰۱) و در مقابل، در مدت زمان ۲٤ ساعت، غلظت ۰/۷۸ mg کمترین تاثیر را بر روی سلول‌ها داشته که از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود (P>۰/۰۵). تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی *casp3* و *casp9* در سلول‌های A549 تیمار شده با غلظت IC50 عصاره گیاه *T. cherleri* با استفاده از روش Real-Time PCR پس از ۲٤ ساعت ارزیابی شد و آنالیز داده‌های آن بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به‌دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) محاسبه و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول ΔΔCt (نسبت ژن هدف

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

به ژن مرجع (GAPDH) از طریق 2–ΔΔCt محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Casp3* و *Casp9* نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی A549 به‌ترتیب به میزان (P<۰/۰۵) ۵۷/۲۷±۲/۰ و (P=۰/۳٤) ۳/٤٦±۳/۰ (P=۰/۲۷) طی ۲٤ ساعت افزایش یافت (شکل ۲).

بحث

تاکنون طیف وسیعی از داروهای برگرفته از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای خواص ضدسرطانی و ضدمیکروبی هستند.[۱۱و۱۲] بنابراین مراحل مختلفی نیاز است تا ماده موثره یک گیاه به‌عنوان داروی استاندارد با کمترین خطرات اثر جانبی معرفی شود که این فرآیند از روش‌های مختلف عصاره‌گیری آغاز شده و با انجام آزمایش‌ها بر روی سلول‌های میکروبی و سرطانی در محیط آزمایشگاه ادامه یافته و در نهایت با انجام مطالعات In vivo وارد بازار می‌شود.[۱۳]

در این پژوهش اثرات زیستی یکی از گیاهان کشور ایران به نام *Trifolium cherleri* که از خانواده Fabaceae است، مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، ابتدا عصاره گیاه *T. cherleri* توسط روش ماسراسیون تهیه گردید و سپس عصاره جهت شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی آن تحت آنالیز GC-MS قرار گرفت. آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه ۲۰ پیک را نشان داد که نشان دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه می‌باشد که با مقایسه طیف‌ها، ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان ترکیبات شناسایی شده Hexadecanoic acid, ethyl ester (۲۰/۷٪) و 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl (۱۹/۹٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند.

Sharaf M و همکارانش ترکیبات شیمیایی گیاه *Trifolium alexandrinum* را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ترکیبات Quercetin، Kkaempferol و Apigenin 7-O-beta-D-glucoside بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره این گیاه بودند.[۱٤] Ertaş A و همکارانش ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Trifolium angustifolium* var. angustifolium را با روش GC-MS شناسایی کردند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که Palmitic acid (29.8%), linoleic acid (18.6%) and oleic acid (10.5%) بیشترین میزان ترکیب را نشان می‌دهند.[۲۰] یکی از دلایلی که ممکن است ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های یک جنس از یک گیاه ولی گونه‌های مختلف متفاوت باشد، می‌تواند به دلیل نوع منطقه جغرافیایی و محل رشد این گیاه باشد.[۱۵] یکی دیگر از اهداف این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره *T. cherleri* بود به‌طوری که نتایج نشان داد که عصاره گیاه روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضدمیکروبی دارد، به‌طوری که کمترین غلظت مهارکنندگی در غلظت ۲۵ mg/ml از عصاره برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین آن در غلظت ۲۰۰ mg/ml برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* به‌دست آمد.

به‌طور کلی خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهان دارویی بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر است که می‌تواند به‌دلیل وجود غشای پلی‌ساکاریدی خارجی باکتری‌های گرم منفی باشد که مانع نفوذ عصاره به درون سلول‌های میکروبی می‌شود.[۱۶] یکی از مکانیسم‌های مهم ضدمیکروبی عصاره *T. cherleri* می‌تواند خاصیت آبگریزی برخی از ترکیبات این عصاره باشد که موجب نفوذ آن به لیپیدهای غشای سلول‌های باکتری می‌شود و ساختمان سلولی را مختل می‌کند و موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود.[۱۷] مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره جنس گیاه Trifolium انجام شده است. Khan و همکارانش خاصیت ضدباکتریایی عصاره گیاه *Trifolium alexandrinum* را بر روی برخی از پاتوژن‌ها مورد مطالعه قرار داد. نتایج نشان داد که عصاره دی‌کلرومتانلی رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس همولیتیکوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* را مهار می‌کند اما بر روی رشد باکتری‌های گرم منفی مانند *شیگلا بوئیدی* کم تاثیر است.[۱۸]

همچنین در بخش دیگر این مطالعه، ارزیابی سمیت سلولی عصاره *T. cherleri* بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که این عصاره در مدت زمان ۲٤ ساعت و غلظت ۱۰۰ mg/ml بیشترین تاثیر سمیت سلولی را داشته است. سمیت سلولی ناشی از ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه می‌تواند از مسیرهای مختلف موجب مرگ سلولی شود، به‌طوری که در این مطالعه مرگ سلولی از طریق فرآیند آپوپتوز توسط ژن‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

کاسپاز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در اثر تیمار سلول‌های A549، بیان ژن‌های *casp3* و *casp9* افزایش می‌یابد، بنابراین مرگ سلولی از طریق آپوپتوز بوده است.

در واقع اثرات سمیت سلولی عصاره، آزاد شدن سیتوکروم C و بیان پروتیینی کاسپاز ۳ را افزایش می‌دهد که در واقع باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به‌وسیله شروع مرگ سلولی میتوکندریایی بدون تغییرات شیمیایی و از طریق هدف قرار دادن میتوکندری می‌شود.[۱۹] به‌طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. در مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی گیاه *T. cherleri* در افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی ریه نقش دارد به‌طوری که می‌توان پیشنهاد نمود که این عصاره از طریق مسیر درونی با فعال نمودن کاسپاز ۹ باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه *T. cherleri* دارای اثرات بیولوژیکی ضدمیکروبی و ضدسرطانی می‌باشد و همچنین می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی A549 القا کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی این عصاره انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این عصاره بیشتر مشخص شود و بتوان در آینده به‌عنوان یک ترکیب کاندیدای دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه عنوان "بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی، اثرات ضدباکتریایی و ضدسرطانی عصاره گیاه *T. cherleri*" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی اجرا شده است.

References

1. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 2012; 6(11):1-5.
2. Egamberdieva D, Wirth S, Behrendt U, Ahmad P, Berg G. Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Front Microbiol* 2017:9;8:199.
3. Asadi-Samani M, Kooti W, Aslani E, Shirzad H. A systematic review of Iran's medicinal plants with anticancer effects. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2016;21(2):143-53.
4. Singh CR, Kathiresan K. Molecular understanding of lung cancers-A review. *Asian Pac J Trop Biomed* 2001;4(Suppl 1):S35-41.
5. von Dincklage JJ, Ball D, Silvestri GA. A review of clinical practice guidelines for lung cancer. *J Thorac Dis* 2013;5 Suppl 5:S607-22.
6. de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am* 2012;50(5):863-76.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893-917.
8. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015:6(10):4103-12.
9. Nascimento NC, Fett-Neto AG. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. *Methods Mol Biol* 2010;643:1-13.
10. Sabudak T, Guler N. Trifolium L. A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytother Res* 2009;23(3):439-46.
11. Mantle D, Lennard TW, Pickering AT. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 2000;19(3):223-40.
12. Riddle JM. History as a tool in identifying "new" old drugs. *Adv Exp Med Biol* 2002; 505:89-94.
13. Yildirim AB, Karakas FP, Turker AU. In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. *Asian Pac J Trop Med* 2013;6(8):616-24.
14. Sharaf M. Chemical constituents from the seeds of Trifolium alexandrinum. *Nat Prod Res* 2008;22(18):1620-3.
15. Ertaş A, Boğa M, Haşimi N, Abdullah Yılmaz M. Fatty acid and essential oil compositions of Trifolium angustifolium var. angustifolium with antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial Activities. *Iran J Pharm Res* 2015;14(1):233-41.
16. Omoruyi BE, Afolayan AJ, Bradley G. Chemical composition profiling and antifungal activity of the essential oil and plant extracts of Mesembryanthemum edule (L.) Bolus Leaves. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014;11(4):19-30.
17. Mohammadi A, Nazari H, Imani S, Amrollahi H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *J Mycol Med* 2014;24(2):e1-8.
18. Khan AV, Ahmed QU, Shukla I, Khan AA. Antibacterial activity of leaves extracts of Trifolium alexandrinum Linn. against pathogenic bacteria causing tropical diseases. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2(3):189-94.
19. Wang H, Khor TO, Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee JH, Tony Kong AN. Plants against cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;12(10):1281-305

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

TUMJ Tehran University Medical Journal, August 2017; Vol. 75, No. 5: 343-349 Original Article

Phytochemical composition, antibacterial and anticancer activities of *Trifolium cherleri* extract on lung cancer cell line (A549) and analysis of caspase 3 and caspase 9 apoptosis genes expression

Amir Mirzaie Ph.D.[1*]
Aliasghar Bagheri Kashtali Ph.D.[1]
Hassan Sahebjamee Ph.D.[2]
Hassan Noorbazargan Ph.D. Student[3]
Hassan Rahmati M.Sc.[4]
Seyed Ataollah Sadat Shandiz Ph.D.[5]

1- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.
2- Department of Biochemistry and Biophysics, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
3- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Microbiology, Izaddoost Medical Laboratory, Tehran, Iran.
5- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Biology, Roudehen Islamic Azad University, Roudehen, Iran.
Tel: +98- 21- 76505891
E-mail: A.mirzaie@riau.ac.ir

Abstract

Received: 05 Apr. 2017 Revised: 11 Aug. 2017 Accepted: 21 Aug. 2017 Available online: 22 Aug. 2017

Background: Medicinal plants have been identified and used from prehistoric times and these plants make many chemical compounds for biological functions. *Trifolium cherleri* is an herbaceous species belonging to the family of the Fabaceae to Africa, Eurasia and Australia. *T. cherleri* is an important member of the Fabaceae family that is well-known herbal medicine in Iran. The aim of this study was to investigate the phytochemical composition, antibacterial and anti-cancer activities of *T. cherleri* extract.

Methods: This experimental study was performed in Islamic Azad University, from December 2016 to February 2017. At first, the phytochemical constituents of *T. cherleri* extract were determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. Subsequently, the antibacterial activity of the extract was evaluated against some gram positive and negative pathogenic bacteria included *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 via minimum inhibitory concentration (MIC) method. Moreover, anticancer potential of extract was examined by colorimetric MTT assay toward lung cancer (A549) cell line. Then, the evaluation of caspase 3 and 9 apoptosis gene expression was determined using Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) technique. Moreover, the Real-Time PCR was performed using relative quantitative method.

Results: The phytochemical analyses of *T. cherleri* extract showed the 20 major components and the most frequent component was belonged to hexadecanoic acid, ethyl ester (20.7%) and 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl (19.9%). The extract had maximum antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. There was a dose dependent increase in the cytotoxicity effect of extract against A549 cancer cell. Moreover, the Real-Time PCR results indicated that the caspase 3 and caspase 9 gene expression was significantly up-regulated 2.57±0.27 ($P<0.05$), and 3.3±0.46 ($P<0.05$), respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the *T. cherleri* extract had significant anti-bacterial and anti-cancer effects and it appear that the extract has potential uses for pharmaceutical industries. Moreover, it could be considered as a promising source for novel drug compounds, but more studies are needed.

Keywords: anti-bacterial agents, cytotoxicity, real-time polymerase chain reaction, *Trifolium cherleri*.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]