

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

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۶ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۳۱

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 به دنبال 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 پایورنز 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 $2/0 \pm 57/27$ (P=۰/۳۴) و $3/3 \pm 0/46$ (P=۰/۲۷) نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد که عصاره گیاه *T. cherleri* دارای اثرات ضد میکروبی 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 پلیمرز در زمان واقعی.

امیر میرزایی^{۱*}، علی اصغر باقری کشتلی^۱، حسن صاحب جمعی^۲، حسن نوربازرگان^۳، حسن رحمتی^۴، سید عطاالله سادات شاندریز^۵

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

۲- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین پشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- گروه میکروبی‌شناسی، 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: ۰۲۱-۷۶۵۰۵۸۹۱

E-mail: A.mirzaie@riau.ac.ir

مقدمه

آمریکا بی‌خطر و امن معرفی شده‌اند. همچنین اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، 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

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

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 ۴۰ g از پودر گیاه *T. cherleri* را وزن نموده و ۳۰۰ ml از الکل ۹۰٪ را به گیاه اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۹۰ rpm قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت از کاغذ صافی و فیلتر سرسنگ برای فیلتر کردن استفاده شد و در انکوباتور با در دمای ۳۷ °C قرار داده شد تا الکل آن به طور کامل تبخیر شود. آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry, Agilent 6890 MS دستگاه هگزانی گیاه *T. cherleri* با دستگاه 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 ۶ °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 گاز کروماتوگرافی اسپکترومتری جرمی (GC/MS) تزریق شد و سپس نتایج به دست 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. به منظور 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 به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودیالوژن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای برای باکتری‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، استرپتوکوکوس پایورنز ATCC 19615، سالمونلا انتریتیدیس ATCC 13076 و لیستریا مونوسیترنز ATCC 35152 انجام شد. عصاره از غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۴۰۰۰ mg/ml به داخل چاهک‌ها ریخته و با محیط کشت

به‌کارگیری عصاره‌های گیاهی مختلف که دارای اثرات ضد میکروبی 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.^۴ در واقع، در این نوع از سرطان مشخصه رشد کنترل نشده سلول در بافت‌های ریه انجام می‌گیرد.^۶ 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 آلدئیدها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و ترپن‌ویدها قرار می‌گیرند و گفتنی است که بیش از ۶۰٪ داروهای رایج ضدسرطانی برگرفته منابع طبیعی مانند عصاره گیاهان هستند.^۹ گیاه *Trifolium* متعلق به خانواده شبدرها است. جزء مهمترین گیاهان علف‌های خانواده Fabaceae مناطق معتدل و مرطوب است که از نظر علف‌های 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 ۵۴ 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

NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, از همه چاهک‌ها با مقدار $50 \mu\text{l}$ 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 رده سلولی سرطانی ریه A549 از روش MTT Assay استفاده شد. معرف MTT (۳-۴) و ۵- دی متیل تترازولیل (۲-۲) و ۵- دی فینیل 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 10^4 سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول ریخته شد. به دنبال آن غلظت‌های 0.78 ، 1.56 ، 3.12 ، 6.25 ، 12.5 ، 50 ، 100 از عصاره مدنظر تهیه شده و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی A549 تاثیر داده شد. پس از گذشت این مدت، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای برداشته شده و $20 \mu\text{l}$ 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 $100 \mu\text{l}$ Dimethyl sulfoxide (DMSO) به هر چاهک اضافه شد و جذب چاهک‌ها در طول موج 590 نانومتر با استفاده از ELISA Reader (Organon Teknika, ۵۹۰ Boxtel, The Netherlands) خوانده شد و میزان کشندگی سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ Cell inhibition} = 100 - \frac{(\text{At}-\text{Ab})}{(\text{Ac}-\text{Ab})} \times 100$$

جذب نمونه مورد تست، $\text{Ab} = \text{جذب نمونه بلانک}$ و $\text{Ac} = \text{جذب نمونه کنترل است}$.

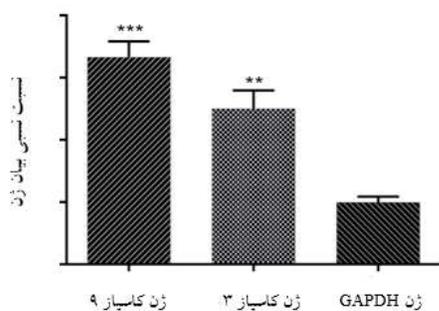
جهت ارزیابی بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ (*casp3* و *casp9*) از روش Real-Time PCR استفاده شد. به این منظور، ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار شده با عصاره با استفاده از RNA extraction kit (Sinnagene, Tehran, Iran) بر اساس دستورکار آن استخراج شد و غلظت RNA استخراج شده با استفاده

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 $5 \mu\text{l}$ بافر ۵x، یک میکروگرم rRNA، $0.5 \mu\text{l}$ پرایمرهای Random hexamer، $0.5 \mu\text{l}$ پرایمر RNase inhibitor، دو میکرولیتر dNTPs، 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 37°C ، 25 ، 60 دقیقه در دمای 42°C و پنج دقیقه در دمای 70°C و پنج دقیقه در دمای 4°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' و 5'-CGTACCAGAGCGAGATGACA-3' و 5'-GGCGGAGCTCATGATGTCTGTG-3' و 5'-TTCCGGTGTGCCATCTCCATCA-3' استفاده شد.

همچنین از ژن مرجع GAPDH با توالی پرایمری 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' 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) تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. نتایج تجربی به‌صورت انحراف از معیار $\pm \text{SEM}$ 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. مقایسه طیف‌ها با داده‌های کتابخانه National Institute of Standards and Technology (NIST) ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان



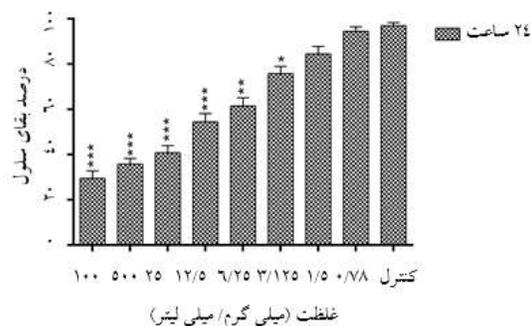
نمودار ۲: میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ نسبت به ژن کنترل (GAPDH). نسبت بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ به ژن مرجع در رده سلولی A549 تیمار شده با عصاره به میزان به میزان 2.05 ± 0.27 ($P < 0.05$) و 3.33 ± 0.46 ($P < 0.001$) افزایش طی ۲۴ ساعت مشاهده شد.

از عصاره *T. cherleri* انجام گرفت و سپس درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج سمیت سلولی نشان داد که تیمار سلول‌های A549 در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان 0.84 ± 0.83 ، 0.95 ± 0.51 ، 0.41 ± 0.77 ، 0.55 ± 0.15 ، 0.61 ± 0.64 ، 0.76 ± 0.97 ، 0.36 ± 0.34 ، 0.41 ± 0.77 ، 0.55 ± 0.15 ، 0.61 ± 0.64 ، 0.76 ± 0.97 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 ۲۴ ساعت و غلظت ۱۰۰ mg/ml بیشترین تاثیر سمیت سلولی را داشته ($P < 0.001$) و در مقابل، در مدت زمان ۲۴ ساعت، غلظت ۰/۷۸ mg کمترین تاثیر را بر روی سلول‌ها داشته که از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود ($P > 0.05$). 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 ۲۴ ساعت ارزیابی شد و آنالیز داده‌های آن بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست 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 $\Delta\Delta Ct$ (نسبت ژن هدف

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

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



نمودار ۱: درصد بقای سلول‌های A549 در برابر غلظت‌های مختلف عصاره *T. cherleri* در مدت زمان ۲۴ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($n=3$ ، $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$).

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 انترتیدیس ATCC 13076 و لیستریا مونوسیژنز ATCC 35152 با روش MIC انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه مدنظر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی دارد، به طوری که کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین مربوط بود با باکتری سالمونلا انترتیدیس (جدول ۱). ابتدا تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵، ۰/۷۸ mg/ml

به ژن مرجع (GAPDH) از طریق $2-\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Casp3* و *Casp9* نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی A549 به ترتیب به میزان $2/0 \pm 57/27$ ($P < 0/05$) و $3/0 \pm 3/46$ ($P = 0/34$) طی ۲۴ ساعت افزایش یافت (شکل ۲).

به طور کلی خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان دارویی بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر است که می‌تواند به دلیل وجود غشای پلی‌ساکاریدی خارجی باکتری‌های گرم منفی باشد که مانع نفوذ عصاره به درون سلول‌های میکروبی می‌شود.^{۱۱} یکی از مکانیسم‌های مهم ضد میکروبی عصاره *T. cherleri* می‌تواند خاصیت آنگریزی برخی از ترکیبات این عصاره باشد که موجب نفوذ آن به لیبیدهای غشای سلول‌های باکتری می‌شود و ساختمان سلولی را مختل می‌کند و موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود.^{۱۲} مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی 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 بوئییدی* کم تاثیر است.^{۱۸}

تاکنون طیف وسیعی از داروهای برگرفته از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای خواص ضدسرطانی و ضد میکروبی هستند.^{۱۱،۱۲} بنابراین مراحل مختلفی نیاز است تا ماده موثره یک گیاه به عنوان 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 2-Pentadecanone, و Hexadecanoic acid, ethyl ester (۲۰/۷٪) و 6,10,14-trimethyl (۱۹/۹٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند.

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 ۲۴ 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، به طوری که در این مطالعه مرگ سلولی از طریق فرآیند آپوپتوز توسط ژن‌های

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.^{۱۴} 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%)،

بحث

تاکنون طیف وسیعی از داروهای برگرفته از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای خواص ضدسرطانی و ضد میکروبی هستند.^{۱۱،۱۲} بنابراین مراحل مختلفی نیاز است تا ماده موثره یک گیاه به عنوان 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 2-Pentadecanone, و Hexadecanoic acid, ethyl ester (۲۰/۷٪) و 6,10,14-trimethyl (۱۹/۹٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند.

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 ۲۴ 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، به طوری که در این مطالعه مرگ سلولی از طریق فرآیند آپوپتوز توسط ژن‌های

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 ضد میکروبی و ضد سرطانی 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.

کاسپاز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که 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 پروتئینی 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 هیدروآلکلی گیاه *T. cherleri* در افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی ریه نقش دارد به‌طوری که می‌توان پیشنهاد نمود

References

- Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 2012; 6(11):1-5.
- 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;9:199.
- Asadi-Samani M, Kooti W, Aslani E, Shirzad H. A systematic review of Iran's medicinal plants with anticancer effects. *J Evid Based Complement Altern Med* 2016;21(2):143-53.
- Singh CR, Kathiresan K. Molecular understanding of lung cancers-A review. *Asian Pac J Trop Biomed* 2001;4(Suppl 1):S35-41.
- 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.
- de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am* 2012;50(5):863-76.
- 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.
- Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6(10):4103-12.
- Nascimento NC, Fett-Neto AG. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. *Methods Mol Biol* 2010;643:1-13.
- Sabudak T, Guler N. *Trifolium L.* A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytother Res* 2009;23(3):439-46.
- 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.
- Riddle JM. History as a tool in identifying "new" old drugs. *Adv Exp Med Biol* 2002; 505:89-94.
- 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.
- Sharaf M. Chemical constituents from the seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Nat Prod Res* 2008;22(18):1620-3.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

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 Sahebamee Ph.D.²

Hassan Noorbazargan Ph.D. Student³

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*.