مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی ـ پژوهشی)
جلد ۷، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵

شناسایی کمی و فعالیت ضدتکثیری برخی از آنتوسیانین‌های عصاره پوست لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تیمار میدان الکترومغناطیسی

سیمین تاجیک اسمعیلی .Ph.D*، احمد مجد .Ph.D، سعید آیریان .Ph.D، محمد نبیونی .Ph.D، فرخ قهرمانی نژاد .Ph.D

– دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: siminesmaeili90@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۵

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر تعیین کمی برخی از آنتوسیانین‌های عصاره پوست لوبیا قرمز تیمار شده با میدان الکترومغناطیسی و همچنین بررسی فعالیت ضدتکثیری عصاره‌های تهیه شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، گروه ۱ و ۲ (به‌ترتیب بذرهای خشک و مرطوب) به‌مدت ۴۵ دقیقه و گروه ۳ و ۴ (به‌ترتیب بذرهای خشک و مرطوب) دو بار، هر بار ۴۵ دقیقه و با فاصله زمانی ۱۲۰ دقیقه تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتند. سپس بذرها کشت شدند. پوست بذرهای برداشت شده هر گروه جدا شد و با حلال متانولی عصاره‌گیری شد. در عصاره‌ها دو گروه آنتوسیانین شامل سیانیدین و پلارگونیدین، توسط دستگاه HPLC (کروماتوگرافی) شناسایی و اندازه‌گیری شد. همچنین بررسی فعالیت ضدتکثیری به‌روش MTT بر روی لاین سلول‌های سرطان تخمدان (A۲۷۸۰ CP) صورت گرفت.

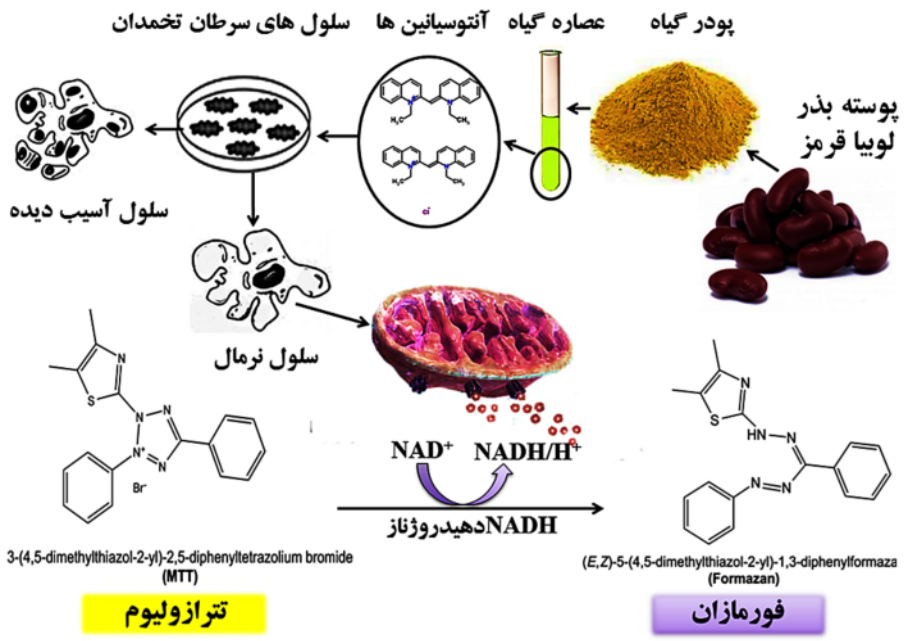
نتایج: در بین عصاره‌های مطالعه شده، به‌ترتیب گروه ۱ دارای محتوای بیشتری سیانیدین و گروه ۴ دارای محتوای بیشتری پلارگونیدین می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدتکثیری نشان داد که عصاره‌های متانولی پوست لوبیاهای قرمز تیمار شده با شدت ۴ میلی تسلا، دارای فعالیت ضدتکثیری سلولی بالایی بر روی سلول‌های سرطان تخمدان هستند (۷۸/۷۴ تا ۸۴/۴۴ درصد). همچنین در بین نمونه‌های تیمار شده، گروه ۲ با IC_{50}: ۷۲/۶۳ ± ۲/۲ فعالیت ضدتکثیری سلولی بالاتری را نشان داد.

نتیجه گیری: تیمار میدان الکترومغناطیسی در افزایش مقادیر آنتوسیانین‌های لوبیا قرمز موثر می‌باشد و عصاره پوست لوبیا قرمز می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی برای مکمل‌های غذایی و دارویی با خاصیت ضدتکثیری به‌شمار آید.

واژگان کلیدی: لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.)، آنتوسیانین، فعالیت ضدتکثیری، لاین سلول‌های سرطان تخمدان (A۲۷۸۰CP)

مقدمه

در ۵۰ سال گذشته، سرطان به‌عنوان یکی از علل شایع مرگ و میر در کشورهای صنعتی مطرح شده است. طبق گزارشی، سرطان بالای ۱۰ درصد از علت مرگ و میر بشر در سال‌های اخیر بوده است (۱). آمار سازمان بهداشت جهانی نشانگر این است که یک زن از بین هر ۵۵ زن در سن بالای ۵۵ سال مبتلا به بیمار سرطان تخمدان می‌شود. بسیاری از مواد غذایی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های متنوع می‌توانند تاثیر متفاوتی در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های تکثیری اعمال کنند (۲). یکی از عوامل شایع در القای سرطان رادیکال‌های آزاد می‌باشند. رادیکال‌های آزاد مانند گونه‌های فعال اکسیژن به‌طور طبیعی در سلول‌های زنده تولید می‌شوند و نقش مهمی در فرآیند علامت رسانی سلول‌ها دارند. همچنین در طبیعت برخی از مواد ممکن است رادیکال‌های آزاد داشته باشند یا سلول‌ها را برای تولید آن‌ها تحریک کنند (۳). مقادیر بالای این ترکیبات برای سلول‌ها خطرناکند و می‌توانند به ساختارهای سلولی از جمله: نوکلئیک اسیدها، فسفولیپیدها، پلی‌پپتیدها و غشاهای سلولی آسیب برسانند و نقش مهمی را در پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان دارند (۴). آنتی اکسیدانت‌ها ترکیبات مهمی هستند که می‌توانند برای پیشگیری و درمان این اختلالات مفید باشند. تحقیقات در زمینه پیشرفت بر روی شناسایی و کاربرد این ترکیبات در جلوگیری و درمان بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان متمرکز شده است (۵). آنتی اکسیدانت‌ها ممکن است به‌عنوان یک جاروب کننده، احیا کننده‌ی رادیکال‌های آزاد یا فعال کننده آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی سلول برای جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زیستی ایفای نقش کنند و یا حتی به‌عنوان سم برای سلول‌های تکثیری عمل کنند (۶-۸). گیاهان منبع طبیعی برای این ترکیبات هستند (۹). آنتی اکسیدانت‌های مهمی که در گیاهان وجود دارند عبارتند از: توکوفرون‌ها (ویتامین E)، فولیک اسید (ویتامین B_9)، آسکوربیک اسید (ویتامین C)، کاروتنوئیدها، فنیل آکریلیک اسیدها و فلاونوئیدها مانند آنتوسیانین‌ها که به‌عنوان بزرگترین گروه فنل‌های طبیعی می‌باشند. آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های طبیعی هستند که رنگ‌های بنفش تا قرمز را در بسیاری از گیاهان مانند انگور، کلم قرمز، زغال اخته و لوبیا قرمز و سیاه تولید می‌کنند. آنتوسیانین‌ها از نظر ساختاری مشتق کاتیون فالویلیوم می‌باشند. تاکنون حدود ۵۴۰ نوع آنتوسیانین از منابع مختلف گیاهی شناسایی شده است (۱۰). در مواد غذایی از جمله حبوبات چند نوع آنتوسیانین شامل پلارگونیدین، پئونیدین، مالویدین، سیانیدین و پتونیدین از اهمیت بیشتری برخوردارند که این ساختارها از نظر جایگاه قند در کربن سه و پنج و نوع قند می‌توانند متفاوت باشند (۱۱). لوبیا بعد از سویا پر اهمیت‌ترین حبوبات در دنیا می‌باشد (۱۲ و ۱۳). نتایج مطالعات نشان می‌دهند مهم‌ترین آنتوسیانین‌ها در لوبیا قرمز شامل سیانیدین ۳، ۵- دی گلیکوزید، دلفینیدین ۳-گلیکوزید، سیانیدین ۳- گلیکوزید، پتونیدین ۳- گلیکوزید و پلارگونیدین ۳- گلیکوزید می‌باشند (۱۴). گیاه لوبیا از طریق بذر و غلاف کشت می‌شود. به‌طور کلی میزان متابولیت‌های ثانویه هر گیاه به شرایط کشت و تیمار آن بستگی دارد. در میان تیمارهای مختلف، کاربرد مقادیر بهینه تیمارهای فیزیکی برای بذر و گیاه در محیط کشت، اثر ژنتیکی روی گیاه نداشته و به نسل بعد منتقل نخواهد شد. تحریک گیاهان با استفاده از تیمارهای فیزیکی مانند میدان‌های الکترومغناطیسی به‌عنوان راهی جهت افزایش کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه مانند آنتوسیانین‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶). در سال‌های اخیر، محققان در ارتباط با نقش آنتوسیانین‌ها در کاهش و بهبود بیماری‌های کرونری قلب، التهاب بافت، افزایش حد بینایی، مهار استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوزیس در سلول‌های تکثیری نتایجی را ارائه دادند (۱۷-۲۰). در تحقیق حاضر با توجه به تنوع و فراوانی آنتوسیانین‌ها در پوست لوبیای قرمز و نیز امکان افزایش آن‌ها تحت تاثیر میدان‌های الکترومغناطیسی به بررسی نقش این میدان‌ها در تغییرات کمی برخی آنتوسیانین‌های پوست لوبیای قرمز و خواص آنتی اکسیدانتی و فعالیت ضد تکثیری آن‌ها توجه شده است (شکل ۱).



شکل ۱: فرآیند تهیه عصاره و بررسی فعالیت ضدتکثیری به‌روش MTT را نشان می‌دهد.

موادها و روش‌ها

مواد شیمیایی و استانداردها: استانداردهای دو آنتوسیانین شامل سیانیدین کلراید و کالیستفین کلراید از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا تهیه شدند. حلال‌های آلی استفاده شده در این تحقیق از قبیل متانول با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان سفارش داده شدند.

مواد گیاهی: بذرهای لوبیا قرمز از مرکز تحقیقات لوبیای خمین تهیه شدند. بذرها برای بررسی به‌دو حالت خشک و مرطوب (۱۲ ساعت خیسانده شده در آب) تحت تاثیر میدان‌های الکترومغناطیسی قرار گرفتند.

تیمار میدان الکترومغناطیسی: به‌منظور بررسی تاثیر میدان الکترومغناطیسی بر محتوای آنتوسیانین‌ها و پتانسیل ضدتکثیری لوبیا قرمز، میدان الکترومغناطیسی با شدت یکسان (۴ میلی تسلا) و مدت زمان‌های مختلف ۴۵ و ۹۰ در نظر گرفته شدند. بذرهای برداشت شده در گروه‌های مختلف قرار گرفتند، گروه ۱ و ۲ به‌ترتیب شامل بذرهای خشک و مرطوبی بودند که تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی به‌مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. گروه ۳ و ۴ نیز به‌ترتیب شامل بذرهایی خشک و مرطوبی بودند که دو بار، هر بار ۴۵ دقیقه و با فاصله زمانی ۱۲۰ دقیقه تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتند. گروه شاهد شامل بذرهای بدون تیمار بودند. در پایان این مرحله بذرها کشت شدند و پس از رسیدن گیاهان به مرحله بذردهی، بذرها برداشت شدند و مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت بذرها: بذرها (شاهد و تیمار شده) در خاک، در دمای محیط (حدود ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و دوره نوری- تاریکی ۸ تا ۱۶ ساعتی کشت شدند. آبیاری به‌مدت دو و نیم ماه (خرداد تا شهریور) انجام شد و بعد از رسیدن لوبیاهای قرمز کشت شده به مرحله بذر برداشت انجام شد. بذر لوبیاهای قرمز برداشت شده از گیاه جدا شد و تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره: برای تهیه عصاره، بذرهای لوبیای قرمز به‌مدت کوتاهی در آب خیسانده و سریع از آن خارج شدند (به مقداری که آنتوسیانین پوست بذر در آب حل نشود و بذرها فقط مرطوب شوند)، سپس پوست بذرها جدا شد و پس از خشک شدن در معرض هوا، توسط آسیاب برقی، سه بار و در هر بار به‌مدت ۱۰ ثانیه آسیاب شد. استخراج عصاره از ۱۰ گرم پوست پودر شده به‌وسیله دستگاه استخراج کننده سوکسله و توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول با خلوص بالا به‌مدت ۶ ساعت انجام شد. به‌منظور حذف ذرات ریز عصاره از کاغذ صافی وات من استفاده شد و نمونه‌ها در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. عصاره‌های به‌دست آمده توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند. سپس تا زمان استفاده برای استخراج و شناسایی

ترکیبات مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی، در ظروف شیشه‌ای کوچک قهوه‌ای رنگ و داخل فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) ذخیره شدند.

استخراج آنتوسیانین‌ها از عصاره‌ها: برای استخراج حداکثر آنتوسیانین‌ها از عصاره‌های به‌دست آمده توسط دستگاه سوکسله و به‌منظور آماده سازی آن‌ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از روش استخراج مایع- مایع استفاده شد. آنتوسیانین‌ها توسط فاز متحرکی متشکل از دو محلول آبی فرمیک اسید ۱۰ درصد و محلولی شامل فرمیک اسید/آب/متانول (۱۰:۴۰:۵۰ حجمی/حجمی) با شیبی ملایم در مدت زمان ۵۰ دقیقه و با سرعت ۱/۲ میلی‌لیتر در دقیقه جدا سازی و توسط دستگاه کروماتوگرافی در طول موج ۵۲۰ نانومتر شناسایی شدند.

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: برای انجام این تحقیق از یک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت آمریکا شامل اچ پی با چهار پمپ و انژکتور دستی (مدل ۷۱۲۷، فئوداین، کوتاتی، سی ای) مجهز به جایگاه نمونه ۲۰ میکرولیتری استفاده شد. اطلاعات به‌وسیله یک اچ پی‌کایم استیشن ارائه شدند. ستون فاز معکوس ساخت آمریکا با مشخصات ۴/۶ میلی‌متر قطر و ۲۵۰ میلی‌متر طول با قطر ذرات ۵ میکرون استفاده شد.

شناسایی آنتوسیانین‌ها: برای شناسایی و تعیین مقدار آنتوسیانین‌ها، ابتدا به‌روش استاندارد خارجی منحنی استاندارد رسم شد و سپس پیک نمونه بر اساس مقایسه زمان بازداری آن با استاندارد متناظرش شناسایی شد و در نهایت بر اساس معادله خطی حاصل از منحنی درجه بندی استاندارد مربوطه تعیین مقدار شد. در جدول شماره ۱ و ۲ زمان بازداری پیک ترکیبات، مقدار سنجش شده و ضریب همبستگی وابسته نشان داده شده است.

جدول ۱: مقدار سیانیدین (برحسب میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) نمونه‌های تیمار شده، شاهد و استاندارد (سیانیدین کلراید) و برخی فاکتورهای کروماتوگرام.

پارامترها	نمونه ها					
	گروه ۲	گروه ۴	گروه ۱	گروه ۳	شاهد	استاندارد
زمان بازداری	۱۶/۶۳۵	۱۶/۲۷۷	۱۶/۶۰۷	۱۶/۷۴۱	۱۶/۴۷۵	۱۶/۹۶۸
مقادیر	۰/۰۱۶	۰/۰۱۷	۰/۰۹۹	۰/۰۱۷	۰/۰۱۴	۰/۰۲۱
ضریب همبستگی (r)	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۹

جدول ۲: مقدار پلارگونیدین (برحسب میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) نمونه‌های تیمار شده، شاهد و استاندارد (کالستیفن کلراید) و برخی فاکتورهای کروماتوگرام.

پارامترها	نمونه ها					
	گروه ۲	گروه ۴	گروه ۱	گروه ۳	شاهد	استاندارد
زمان بازداری	۲۰/۴۳۵	۲۰/۱۹۷	۲۰/۳۹۳	۲۰/۴۷۵	۲۰/۴۶۸	۲۰/۵۶۳
مقادیر	۰/۰۳۸	۰/۰۴۰	۰/۰۱۹	۰/۰۳۵	۰/۰۱۸	۰/۱۰۲
ضریب همبستگی (r)	۰/۹۹۵	۰/۹۹۸	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۷	۰/۹۹۹

بررسی فعالیت ضدتکثیری سلولی

کشت سلولی: ابتدا لاین سلول‌های سرطان تخمدان (A۲۷۸۰CP) از مرکز انستیتو پاستور تهیه شد و بر روی محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد، پنی سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریپسین یک درصدکشت داده شد. زمانی‌که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین- EDTA (اتیلن در تترا استیک اسید) از ته فلاسک جدا شده و در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به‌حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام

هموسیتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد (۲۱ و ۲۲).

سنجش میزان فعالیت ضدتکثیری سلولی: برای بررسی فعالیت ضدتکثیری عصاره‌ها از روش MTT استفاده شد (۲۲، ۲۳). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر پایه شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی استوار است. در این روش ۲۰۰ میکرو لیتر محیط حاوی 10^5 سلول در هر چاهک پلیت کاشته شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون غلظت‌های مختلف (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، از هر عصاره (حل شده در DMSO ۰/۱ درصد) به سلول‌ها اضافه شد و سپس ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها سه بار با بافر سالین فسفات شستشو شدند و مقدار ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۵ درصد به هر حفره اضافه شد. ۴ ساعت بعد از انکوباسیون، به چاهک‌ها محلول ۰/۰۴ مولار کلریدریک اسید / ایزوپروپانول اضافه شد. میزان جذب توسط دستگاه الایزا (Stat Fax-2100,USA) در طول موج‌های ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت ضد تکثیری سلولی و قدرت بقای سلول ها از فرمول‌های زیر استفاده شد و نتایج حاصل بر اساس درصد و IC_{50} بیان شد. IC_{50} غلظتی از عصاره می‌باشد که در آن غلظت رشد و تمایز ۵۰ درصد سلول‌های تکثیری در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل که تحت تأثیر عصاره قرار نگرفته‌اند مهار شود.

$$\text{درصد سمیت سلولی} = \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد زنده ماندن سلول} = \text{درصد سمیت سلولی} - \text{جذب نمونه‌ها}$$

آنالیز آماری:

داده‌های حاصل از آزمایش و رسم نمودارها با نرم‌های افزار SPSS و Exel انجام شد. سپس، مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن در سطح $p<۰/۰۵$ انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

آنتوسیانین‌ها

در جدول ۱ و ۲ آنتوسیانین‌های شناسایی شده در عصاره‌های مختلف (شاهد، استاندارد و تیمار شده) همراه با مقدار آن‌ها بر حسب میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره گیاه ارائه شده است. نتایج نشان دادند که از میان دو آنتوسیانین مطالعه شده، عصاره‌ها دارای محتوای پلارگونیدین (۰/۰۱۸ تا ۰/۰۴۰ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) بالاتری نسبت به سیانیدین (۰/۰۱۴ تا ۰/۰۹۹ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) هستند. در بین عصاره‌های مطالعه شده نمونه‌های حاصل از بذرهای گروه ۱ بیشترین محتوای سیانیدین (۰/۰۹۹ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) و نمونه‌های حاصل از بذرهای گروه ۴ بیشترین محتوای پلارگونیدین (۰/۰۴۰ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) را دارند. همه عصاره‌های مربوط به نمونه‌های تیمار شده با تیمارهای مختلف میدان الکترومغناطیسی محتوای آنتوسیانین بالاتری را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند.

فعالیت ضدتکثیری

در این مطالعه برای بررسی فعالیت ضدتکثیری عصاره‌ها از روش MTT استفاده شد. نتایج بررسی‌های فعالیت ضدتکثیری سلولی، بر روی رده سلول‌های سرطان تخمدان (A۲۷۸۰ CP) به‌صورت درصد و IC_{50} در جدول ۳ و ۴ و همچنین شکل ۲ نشان داده شده است. در تمامی تست‌ها میزان فعالیت بالا در IC_{50} کمتر مشخص می‌شود. میزان فعالیت ضدتکثیری سلولی عصاره‌ها بر حسب IC_{50} به‌ترتیب عبارت است از: شاهد > گروه ۴ ≤ گروه ۳ > گروه ۱ ≤ گروه ۲ > کنترل. درصد فعالیت ضدتکثیری سلولی و درصد بقای سلول‌ها که تحت تاثیر عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند، به‌ترتیب در جدول ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج نشان دادند که در بین عصاره لوبیاهای قرمز تیمار شده، نمونه‌های حاصل از بذرهای گروه ۴ بیشترین فعالیت ضد تکثیری سلولی و کمترین میزان بقای سلولی را در لاین‌های سلول سرطان تخمدان نشان می‌دهد (به‌ترتیب ۸۴/۴۴ و ۱۵/۵۶درصد).

جدول ۳: درصد فعالیت ضدتکثیری عصاره‌ها و استاندارد در غلظت‌های مختلف (۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان می‌دهد.

نمونه‌ها	غلظت (میکروگرم/میلی‌لیتر)				
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	میانگین
گروه ۲	۷۰/۶۰ ± ۱/۲^{b}	۸۲/۱۰ ± ۲/۲^{a}	۸۱/۳۳ ± ۰/۹^{a}	۸۰/۹۲ ± ۲/۶^{a}	۷۸/۷۴
گروه۴	۸۳/۸۰ ± ۱/۷^{a}	۸۴/۶۱ ± ۲/۰^{a}	۸۴/۰۰ ± ۰/۷^{a}	۸۵/۳۳ ± ۱/۵^{a}	۸۴/۴۴
گروه ۱	۷۶/۱۰ ± ۱/۱^{a}	۸۰/۷۰ ± ۱/۵^{a}	۸۰/۲۲ ± ۲/۳^{a}	۷۹/۴۵ ± ۰/۹^{a}	۷۹/۱۲
گروه۳	۸۲/۶۱ ± ۲/۲^{a}	۸۳/۱۱ ± ۳/۱^{a}	۸۳/۹۱ ± ۱/۶^{a}	۸۴/۲۰ ± ۱/۳^{a}	۸۳/۴۶
شاهد	۹۰/۵۱ ± ۲/۵^{a}	۹۰/۲۰ ± ۱/۲^{a}	۹۱/۰۰ ± ۰/۸^{a}	۹۲/۵۳ ± ۳/۰^{a}	۹۱/۰۶
سیانیدین کلراید	۳۲/۷۱ ± ۰/۴^{a}	۳۲/۷۰ ± ۰/۰^{a}	۳۵/۲۲ ± ۰/۵^{a}	۳۵/۶۱ ± ۰/۳^{a}	۲۷/۲۵

مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.

جدول ۴: درصد بقای سلولی در لاین‌های سلول سرطان تخمدان تیمار شده با غلظت‌های مختلف (در غلظت‌های ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها و استاندارد.

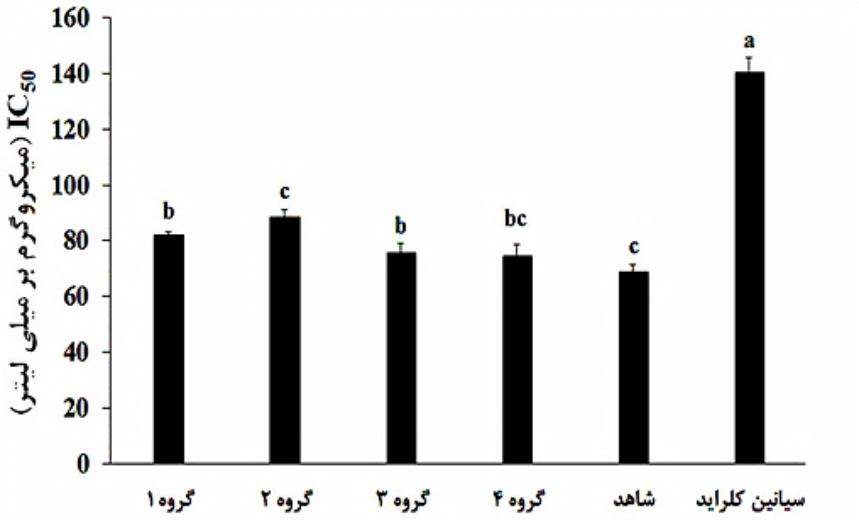
نمونه‌ها	غلظت (میکروگرم/میلی‌لیتر)				
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	میانگین
گروه ۲	۲۹/۴۰ ± ۰/۶^{a}	۱۷/۹۱ ± ۱/۲^{b}	۱۸/۶۷ ± ۰/۷^{b}	۱۹/۰۹ ± ۱/۱^{b}	۲۱/۴۷
گروه ۴	۱۶/۱۱ ± ۰/۷^{a}	۱۵/۴۰ ± ۱/۳^{a}	۱۶/۰۰ ± ۰/۹^{a}	۱۴/۶۷ ± ۰/۶^{a}	۱۵/۵۶
گروه ۱	۲۳/۱۰ ± ۱/۱^{a}	۱۹/۳۱ ± ۰/۵^{a}	۱۸/۸۰ ± ۱/۰^{b}	۲۰/۵۵ ± ۱/۴^{a}	۲۰/۴۴
گروه ۳	۱۷/۴۱ ± ۱/۱^{a}	۱۶/۹۱ ± ۰/۶^{a}	۱۶/۱۱ ± ۰/۸^{a}	۱۵/۸۰ ± ۰/۴^{a}	۱۶/۵۶
شاهد	۹/۵۱ ± ۰/۸^{a}	۹/۸۰ ± ۰/۲^{a}	۹/۰۰ ± ۰/۵^{a}	۷/۵۳ ± ۰/۰^{a}	۸/۹۶
سیانیدین کلراید	٦٧/٢٩ ± ۱/۲^{a}	۶۷/۳۰± ۱/۰^{a}	۶۴/۷۸ ± ۰/۵^{a}	۶۴/۳۹ ± ۱/۳^{a}	۵۲/۷۵

مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.

بحث

پلی‌فنل‌ها از جمله فلاونوئیدها در ساختار شیمیایی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل می‌باشند که دهنده قوی هیدروژن به‌حساب می‌آیند و به‌عنوان عوامل آنتی اکسیدانتی شناخته می‌شوند. این ترکیبات با توانایی احیا کنندگی بالا می‌توانند با گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن واکنش دهند و از خسارات تنش اکسیداتیو در بدن جلوگیری کنند (۲۴ و ۲۵). ساختار این ترکیبات دارای پتانسیل بالایی برای واکنش دادن با پروتئین‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها می‌باشند. به این دلیل آن‌ها می‌توانند باعث ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی مانند ایزوفرم‌های مختلف سیتوکروم P_{450}، سیکلواکسیژناز، لیپو اکسیژناز و زانتین اکسیداز شوند که در تولید رادیکال‌های آزاد دخالت دارند (۲۶). همچنین اثرات هم سو و غیر هم سوی پلی‌فنل‌ها با دیگر عوامل آنتی اکسیدانتی و سطوح گلوتاتیون (به‌عنوان عامل آنتی اکسیدانتی در جانوران، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند) درون سلولی نیز بررسی شده است (۲۷ و ۲۸). معمولا تفاوت در فعالیت زیستی مانند خاصیت سمیت سلولی می‌تواند مرتبط با انواع ترکیبات فنلی مانند ۷آنتوسیانین‌ها باشد نه لزوما مقدار آن‌ها (۲۹). آنتوسیانین-ها رنگدانه‌های طبیعی هستند که رنگ‌های مختلفی را در بسیاری از گیاهان مانند لوبیا تولید می‌کنند (۱۰). لوبیا

دارای واریته‌های مختلفی می‌باشد که از نظر اندازه، شکل و رنگ بذر با یکدیگر متفاوت هستند. تنوع رنگ در لوبیا خصوصیت مهمی به‌شمار می‌آید و رنگ‌های قرمز، سیاه، سفید، قهوه‌ای و مخطط در این گیاه متداول است (۳۰ و ۳۱). پلارگونیدین ۳- گلوکوزید، آنتوسیانین اصلی در لوبیای قرمز محسوب می‌شود که مسئول رنگ قرمز در این نوع لوبیا است (۱۴ و ۳۲). مطالعات نشان داده است که محتوای آنتوسیانین‌ها در هر گیاه به شرایط کشت و تیمار آن بستگی دارد. در میان تیمارهای مختلف، کاربرد بهینه تیمار میدان‌های الکترومغناطیسی به‌عنوان راهی جهت افزایش کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه مانند آنتوسیانین‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌های لوبیا قرمز دارای محتوای بالایی از سیانین و پلارگونیدین هستند. این نتایج موافق با نتایج حاصل از تحقیقات دیگر محققان بر روی آنتوسیانین‌های لوبیای قرمز می‌باشد (۱۴ و ۳۲). در بین عصاره‌ها، گروه ۱ دارای محتوای بیشتری از سیانیدین (۰/۰۹۹ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) و گروه ۴ دارای محتوای بیشتری از پلارگونیدین (۰/۰۴۰ میلی‌گرم در ۱۰ گرم وزن خشک عصاره) می‌باشد. همچنین با مقایسه عصاره گیاه شاهد و عصاره گیاه‌های تیمار شده مشخص شد که تیمار میدان الکترومغناطیسی باعث افزایش محتوای آنتوسیانین‌ها در گیاه می‌شود (جدول ۱ و ۲). اولین گزارش پیرامون محتوای آنتوسیانین‌ها در پوست لوبیا قرمز در سال ۱۹۶۰ ارائه شد، و به‌دنبال آن مطالعات دیگری مالیدین ۳- گلیکوزید، پتونیدین ۳- گلیکوزید، پتونیدین ۳، ۵ دی گلیکوزید، مالیدین ۳- گلیکوزید و دلفینین ۳- گلیکوزید، به‌عنوان آنتوسیانین‌های اصلی در لوبیا قرمز تعیین کردند (۱۴، ۳۳-۳۵). آنتوسیانین‌ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی و جاروب کنندگی رادیکال‌ها آزاد هستند و می‌توانند از خسارت ناشی از استرس اکسیداتیو مانند بیماری‌های قلبی، آلزایمر و سرطان جلوگیری کنند (۱۷-۲۰، ۳۶). تحقیقات نشان می‌دهد که سیانیدین بیشتر از سایر آنتوسانین‌ها جهت مهار رشد سلول‌های توموری و القا آپوپتوزیس در این سلول‌ها موثرند (۳۷، ۳۸). باتوجه به این که تاکنون اثر مقایسه‌ای ضدتکثیری عصاره پوست لوبیا قرمز تحت تیمار میدان الکترومغناطیسی گزارش نشده است، در این مطالعه فعالیت ضدتکثیری عصاره متانولی پوست لوبیا قرمز بر روی لاین سلول‌های سرطان تخمدان به‌روش MTT مورد مطالعه قرار گرفت. آمار سازمان بهداشت جهانی نشانگر این است سرطان تخمدان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان بالای ۵۵ سال است (۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌های مطالعه شده دارای توانایی بالایی در القای آپوپتوزیس در سلول‌های تکثیری هستند (جدول ۳ و ۴). مقایسه مقادیر IC_{50} نشان داد که در بین عصاره لوبیاهای تیمار شده با میدان الکترومغناطیسی، بذرهای حاصل از نمونه‌های گروه ۴ (۲/۶ ± ۷۴/۵۸ :IC_{50} میکروگرم در میلی‌لیتر) بیشترین سمیت سلولی را در مقابل سلول‌های سرطان تخمدان نشان می‌دهد. عصاره‌های مطالعه شده فعالیت ضدتکثیری بیشتری نسبت به کنترل مثبت (سیانیدین کلراید) نشان دادند و عصاره گیاهان شاهد در مقایسه با عصاره لوبیاهای تیمار شده IC_{50} کمتری نشان داد (شکل ۲). برخی از محققان اثبات کردند که یک همبستگی قوی بین محتوای پلی‌فنل‌ها و فعالیت‌های زیستی عصاره‌های گیاهی وجود دارد در حالی که در مطالعات دیگر هیچ همبستگی گزارش نشد (۳۹-۴۱). نتایج این مطالعه یک همبستگی ضعیف در بین محتوای سیانیدین ($r^2 > ۰/۲۴$) و پلارگونین ($r^2 > ۰/۱۱$) عصاره‌ها (شاهد و تیمار شده) با فعالیت ضدتکثیری وجود دارد. این نتایج ما در موافقت با دیگر محققان می‌باشد که فلاونوئیدها از جمله آنتوسیانین‌ها را کاملا مسئول تمام فعالیت زیستی عصاره‌های گیاهی نمی‌دانند، بلکه تاثیر دیگر ترکیبات مانند قندها، توکوفرول‌ها، کاروتوئیدها، ترپن‌ها و همچنین اثرات هم سو و غیر هم سو این ترکیبات را مورد توجه قرار داده‌اند (۴۲، ۴۳).



شکل ۲: مقایسه فعالیت ضدتکثیری عصاره‌ها بر حسب مقادیر IC_{50}. مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای مختلف میدان الکترومغناطیسی در افزایش محتوای آنتوسیانین‌های پوست لوبیا قرمز مطالعه شده موثر است و عصاره‌های تهیه شده دارای فعالیت ضدتکثیری سلولی بالای در مقابل لاین سلول‌های سرطان تخمدان هستند و می‌توانند به‌عنوان منابع امید بخشی در جهت تولید داروهایی برای جلوگیری و درمان اغلب بیماری‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو مانند سرطان‌ها بویژه سرطان تخمدان مورد توجه قرار گیرند.

منابع

1. Thun M.J. Epidemiology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D eds Cecil Medicine23 rd (eds) Philadelphia Pa Saunders Elsevier, chap; 2007; 185.

2. Abdullaev F, Riveron-Negretts L, Rotenburd-Belacortu V, Kasumov FJ. Saffron as chemopreventive agent. Food of 21st century: Food and resource technology environment. China: Ligh Industry Press; 2000; p: 185-95.

3. Aruoma OI, Cuppette SL. Antioxidant methodology, *in vivo* and *in vitro* concept. Champaign, IL: AOCS Press; 1997; 142-69.

4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007; 39(1): 44-84.

5. Zhang HY, Yang DP, Tang GY. Multipotent antioxidants: from screening to design. Drug Discovery Today. 2006; 11(15-16): 749-54.

6. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, et al. Antioxidant properties of cereal products. J. Food Chem. Sci. 2002; 67(7): 2600-2603.

7. Prior RL, Wu XM, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agricul. Food Chem. 2005; 53(10): 4290-302.

8. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh Pharmacological Society. 2006; 1(2): 35-41.

9. Walton NJ, Brown DE. Chemicals from plants perspectives on plant secondary products. London, UK: Imperial College Press1999; 1-25.

10. Anderson O, Jordheim M. The anthocyanins in Flavonoids chemistry, Biochemistry and application. CRC Press Boca, Raton, FL. 2006; pp. 471–473.

11. Clifford MN. Anthocyanins–nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000; 80(7): 1063-1072.

12. Takeoka GR, Dao LT, Full GH, Wong RY, et al. Characterization of black bean (*Phaseolus*

13. Tsuda T, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus Vulgaris* L. J. Agric. Food Chem. 1994; 42(2): 248-251.

14. Choung MG, Choi BR, An YN, Chu YH, et al. Anthocyanin Profile of Korean cultivated kidney bean (Phaseolus vulgaris L.). J. Agric. Food Chem. 2003; 51(24): 7040-7043.

15. Aladjadjiyan A. The use of physical methods for plant growing stimulation in Bulgaria. J. Central Europ. Agricul. 2007; 8(3): 369-380.

16. Dhawi F, Al-Khayri JM, Hassan E. Static magnetic field influence on elements composition in date palm (Phoenix dactylifera L.). Res. J. Agricul. Biol. Sci. 2009; 5(2): 161-166.

17. Tsuda T, Horio F, Osawa T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. Biofactors. 2000; 13(1-4): 133-139.

18. Miranda-Rottmann S, Aspillaga AA, Perez DD, Vasquez L, et al. Juice and phenolic fractions of the berry Aristotelia chilensis inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. J. Agric. Food. Chem, 2002; 50(26): 7542-7.

19. Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. J. Agric. Food Chem. 2005;53(18): 7320-9.

20. Kuo PL, Hsu YL, Lin TC, Lin LT, et al. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from Myrica rubra via Fas-mediated pathway. J. Pharm. Pharmacol. 2004; 56: 1399-406.

21. Ismail M, Bagalkotkar G, Iqbal S, Adamu HA. Anticancer properties and phenolic contents of sequentially prepared extracts from different parts of selected medicinal plants indigenous to Malaysia. Molecules. 2012; 17(5): 5745-5756.

22. Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi O, et al. Cytotoxic effects of Lagenaria siceraria Standl. extract on cancer cell line. J. Mazandaran. Univ. Med. Sci. 2013; 23(97): 225-230.

23. Mosmann TR, Bond MW, Coffman RL, Paul WE. T cell and mast cell lines respond to B cell stimulatory factor-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983; 83(15): 5654.

24. Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1992; 32(1): 67-103.

25. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, et al. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (Centaurium erythraea) infusion. A comparative study with green tea (Camellia sinensis). Phytomedicin. 2003; 10(6-7): 517-22.

26. Parr AJ, Bolwell JP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J. Sci. Food Agric. 2002; 80(7): 985-1012.

27. Seabra RM, Andrade PB, Valentao P, Fernandes E, et al. Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms. In: Fingerman M, Nagabhushanam R, editors. Antioxidant compounds extracted from several plant materials. Enfield, NH: Science Publishers; 2006. 115-74.

28. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. Am. J. Clin. Nutr. 1998; 68(5): 1081-7.

29. Shahidi F, Marian N. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRS Press; 2003; 144-50.

30. Tsuda T, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative pigments isolated from the seeds of Phaseolus Vulgaris L. J. Agric. Food Chem. 1994, 42(2): 248-251.

31. Mazza G, Miniati E. Legumes. In Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains; CRC Press: Boca Raton, FL. 1993; 249-251.

32. Lin LZ, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. The polyphenolic profiles of *Vulgaris* L.) anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 1997; 45(9): 3395-3400.

common bean (Phaseolus vulgaris L.). Food Chem. 2008; 107(1): 399-410.

33. Feenstra WJ. Biochemical aspects of seed coat colour inheritance in Phaseolus Vulgaris L. Meded. Land bouwhogesch. Wageningen. 1960; 60(2): 1-53.

34. Okita C, Kazuko S, Kazuko Y, Hamaguchi Y. Anthocyanins of Phaseolus Vulgaris, cv. Kurodanekinugasa. Eiyo To Shokuryo. 1972; 25: 427-430.

35. Stanton WR, Francis BJ. Ecological significance of anthocyanins in the seed coats of the Phaseoleae. Nature. 1966; 211: 970-971.

36. Renault JH, Thepenier P, Zeches-Hanrot M, Men Olivier LL, et al. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. J. Chromatogr. A 1997; 763: 345-352.

37. Close DC, Beadle CL. The ecophysiology of foliar anthocyanin. Bot. Rev. 2003; 69: 149-161.

38. Fimognar C, Berti F, Nusse M, Cantelli Forti G, et al. In Vitro Anticancer Activity of Cyanidin-3-O-,-Glucopyranoside: Effects on Transformed and Non-transformed T Lymphocytes. Anticancer res. 2005; 25(4): 2837-2840.

39. Siddique NA, Mujeeb M, Najmi AK, Akram M. Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of Aegle marmelos. Int. J. Plant Physiol. Biochem. 2010; 4(1): 001-005.

40. Cardozo ML, Ordonez RM, Alberto MR, Zampini IC, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of Ziziphus mistol ripe berries, exotic Argentinean fruit. Food Res. Inter. 2011; 44: 2063-2071.

41. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, , et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. J. Ethnopharmacol. 2008; 116: 144-151.

42. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. Int. J. Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-253.

43. Karamian R, Asadbegy M. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three Onobrychis Species from Iran. Pharm. Sci. 2016; 22: 112-119.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*

Winter 2017; 7(4)

Quantitative identification and antiproliferative activity of some isolated anthocyanin's of extract of coat *Phaseolus vulgaris* L. under electromagnetic field treatment

Esmaeili ST, Ph.D.*, Majd A, Ph.D., Irian S, Ph.D., Nabiuni M, Ph.D., Gharemaninejad F, Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Science, Kharazmi University, Tehran, Iran.
* Email corresponding author: siminesmaeili90@yahoo.com

Received: 10 Sep. 2016 Accepted: 15 Nov. 2016

Abstract

Aim: This investigation was conducted to determine the amount of isolated anthocyanins from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. under magnetic field treatment and also assess their antiproliferative activity of the extracts.

Material and method: Dry and soaked red bean seeds were subjected to different electromagnetic field treatments in four group. The seeds of groups 1(dry) and 2 (soaked) were treated for 45 min., while in groups 3 and 4 the dry and soaked seeds treated two times with 120 min. interval with electromagnetic field. Then, they were cultured and grown, and their produced seeds were collected. Seed coats from these beans were separated and coat extract was prepared. Two groups of anthocyanins, cyanidin and pelargonidin, were identified and measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The antiproliferative activity of the extract was determined by MTT assay against ovarian cancer cells (CP2780A).

Results: The bean coats of the control and the treated plants contain a high content of cyanidin and pelargonidin. Among the extracts, the samples of group 1 had the highest amount of cyanidin, while seeds of group 2 had the highest amount of pelargonidin. The results of the antiproliferative activity revealed that the methanol extract of the treated red beans under 4 mT were highly antiproliferative activity of the cell (78.74 to 84.44 %). Moreover, the seeds of group 2 showed the highest antiproliferative activity (IC_{50}: 72.63 ± 2.2).

Conclusion: The electromagnetic field treatment is the most effective in increasing the amounts of anthocyanins in red beans, and that the red bean coat can be used as a natural source of nutrition and drug supplement with antiproliferative properties.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., anthocyanin, antiproliferative activity, ovarian cancer cell line (CP2780A)