

## مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) توسط متابولیت‌های ثانویه باکتری‌های اندوفیت افدررا

**مهرداد غیاثوند<sup>۱</sup>، علی مخدومی<sup>۱</sup>، مریم مقدم متین<sup>۱،۲</sup> و جمیل واعظی<sup>۱</sup>**

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ <sup>۲</sup>پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مسئول مکاتبات: علی مخدومی، a.makhdomi@um.ac.ir

چکیده. با توجه به افزایش نرخ بروز سرطان مری در برخی کشورهای آسیایی از جمله مناطق شمال و شمال شرق ایران، شناسایی ترکیبات ضدسرطانی جدید برای سرکوب این بیماری ضروری است. امروزه اثبات گردیده که تولید بسیاری از متابولیت‌های گیاهی با فعالیت میکروگانیسم‌های اندوفیت در ارتباط است. در این پژوهش توانمندی باکتری‌های اندوفیت گیاه دارویی افدررا در مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) (از ۷۴ سویه باکتری اندوفیت (از ۷۴ جدایه اولیه) از دو گیاه دارویی *Ephedra intermedia* و *Ephedra foliata* پس از استریل کردن سطح آن‌ها به دست آمد. باکتری‌ها در محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) تلقيق و پس از ۷۲ ساعت متابولیت‌های تولید شده با استفاده از کلروform استخراج گردید. اثر عصاره خام سویه‌های منتخب بر روی رده سلولی سرطان مری KYSE-30 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی گردید. در نهایت سویه مورد نظر با استفاده از تکثیر و توالی یافی ژن rRNA 16S شناسایی شد. بر اساس نتایج آزمون MTT سویه A1 دارای فعالیت ضدسرطانی بر روی رده سلولی KYSE-30 با مقادیر IC<sub>50</sub> با مقادیر میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بود. بر اساس شناسایی مولکولی، باکتری مذکور به تولید شده توسط این باکتری برای درمان سرطان مری امکان‌پذیر است. هرچند جهت تایید این نتایج آزمایش‌های بیشتری پس از خالص‌سازی مواد موجود در عصاره و همچنین انجام مطالعات در مدل‌های جانوری سرطانی ضروری است.

واژه‌های کلیدی. اکتینوباکتر، سمیت سلولی، گیاهان دارویی، میکروب‌باکتریوم، همزیستی

## Inhibition of esophageal cancer cell line (KYSE-30) proliferation using secondary metabolites of *Ephedra* endophyte bacteria

**Mehrdad Ghiasvand<sup>1</sup>, Ali Makhdoomi<sup>1</sup>, Maryam Moghaddam Matin<sup>1, 2</sup> & Jamil Vaezi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; <sup>2</sup>Institute of

Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Correspondent author: Ali Makhdoomi, a.makhdomi@um.ac.ir

**Abstract.** Regarding the rising rate of esophageal cancer in some parts of Asia, including northern and northeastern regions of Iran, the identification of new anti-cancer compounds is essential to combat the disease. The relation between some plants metabolites and these endophytic microorganisms are well characterized. In the current study, the potentials of *Ephedra* endophyte bacteria for the inhibition of esophageal cancer cell line (KYSE-30) proliferation were investigated. A total of 54 endophyte bacteria (out of 70) were obtained from the sterilized surfaces of two medicinal plants, i.e., *Ephedra intermedia* and *Ephedra foliata*. Bacterial strains were then cultured in Tryptic soy broth (TSB) medium and, after 72 h incubation, the produced secondary metabolites were extracted by chloroform. Anticancer effects of secondary metabolites from these bacteria on esophageal cancer cell line KYSE-30 were evaluated after 24, 48 and 72 h by MTT method. MTT assay results showed that only strain A1 had a cytotoxic effect on KYSE-30 cells. The IC<sub>50</sub> amounts of this strain against KYSE-30 cell lines were equalled ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to 346.4, 192.8 and 121.3 after 24, 48, and 72 hours, respectively. The molecular identification of strain A1 revealed that *Microbacterium maritypicum* (99.8%

similarity) was the closest identified taxon to the strain studied. According to the promising ability of strain A1 to inhibit the growth of KYSE-30 cell line, the use of natural compounds produced by this bacterium to treat esophageal cancer was found to be applicable. However, more experiments are needed to confirm these results after purifying the ingredients, as well as conducting studies in animal cancer models.

**Key words.** *Actinobacter*, cytotoxic effect, medicinal plant, *Microbacterium*, symbiosis

است (Yang et al., 2018). به علاوه خطر انقراض، گیاهان

دارویی یک منطقه را به دنبال برداشت‌های بی‌رویه تهدید می‌کند. به عنوان مثال در یک دوره درمان سرطان تخدمان با ترکیب تاکسول نیاز به قطع ۶ درخت ۱۰۰-۶۰ ساله سرخادر است (Nasiri-Madiseh et al., 2010).

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌های ساکن در بافت‌های مختلف گیاه شامل ریشه، ساقه و برگ هستند. به‌واسطه دوره تکامل طولانی با گیاه میزبان خود رابطه همزیستی برقرار نموده و دارای بسیاری از مسیرهای متابولیکی مشترک با گیاه میزبان با دریافت اطلاعات ژنتیکی از گیاه هستند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید ترکیبات فعال زیستی برای مقابله گیاه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، حشرات و جانواران علف‌خوار به گیاه میزبان خود سود می‌رسانند. در حدود ۸۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی امروزه در دنیا شناخته شده است. این گیاهان هر کدام می‌توانند میزبان چندین میکروارگانیسم اندوفیت باشند. با توجه به اینکه جداسازی میکروارگانیسم‌ها از اکوسیستم‌های کمتر شناخته شده مورد توجه است، ارزیابی توانایی اندوفیت‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات ضد سرطانی مهم است. امروزه نقش برجسته از این میکروارگانیسم‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه منسوب به گیاهان دارویی به تنها یک و یا در همکاری با گیاه به خوبی نشان داده شده است. کامپیوتاسین که برای درمان انواع سرطان‌های پستان، تخدمان و رود به کار می‌رود مثالی از ترکیبات ضد-سرطانی تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیت است (Pu et al., 2015; Seca & Pinto, 2018).

افدراء از گیاهان پرسابقه در طب سنتی و از جمله فلور طبیعی در نواحی وسیعی از ایران است. بررسی‌های شیمیایی و فارماکولوژی مختلفی بر روی این گیاه صورت گرفته است. در این گزارش‌ها حضور ترکیبات فعال زیستی مختلف از قبیل آلالوئیدها، ترپنئیدها و فلاونئیدها نشان داده شده است (Corina et al., 2019). از این روی در پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیبات ضدسرطانی جدید از باکتری‌های اندوفیت گیاه افراء، باکتری‌ها جداسازی و توانمندی آن‌ها در مهار تکثیر و زندگانی سلول‌های رده سلولی سرطان مری KYSE-30 با استفاده از آزمون MTT انجام شد.

## مقدمه

سرطان مری با توجه به نرخ مرگ‌ومیر بالا، امروزه یکی از مشکلات جدی پزشکی در جهان بوده و در مجموع هشت‌تین سرطان رایج و ششمین عامل مرگ و میر وابسته به سرطان در کل دنیا محسوب می‌شود (Smyth et al., 2017). این سرطان دارای انواع کارسینومای سلول سینه‌فرشی مری و آدنوکارسینومای مری است که خصوصیات و علل بروز متفاوتی دارند که می‌تواند به سبک زندگی، شرایط محیطی و استعداد ژنتیکی افراد وابستگی داشته باشد. با وجود پیشرفتها و اطلاعات گسترده‌ای که در زمینه تشخیص و کنترل سرطان مری بدست‌آمده است، میزان بقای ۵ ساله این بیماران حدود ۲۰-۱۵ درصد است (Napier et al., 2014). کمربند جغرافیایی سرطان‌های مری و معده از کشور چین تا نواحی شمالی ایران امتداد یافته است، به طوری که در شمال کشور ایران و در استان گلستان نرخ بروز سرطان مری به ترتیب ۱۰/۸/۸ و ۱۷۴/۱ نفر به ازای هر صد هزار نفر مرد و زن گزارش شده است (et al., 2013) (Aghababaei-Ziarati et al., 2013). علاوه‌بر روش‌های جراحی، شیمی‌درمانی با استفاده از داروهایی مانند هرسپتین، کربوپلاتین و ایرینوتکان در درمان سرطان مری به کار می‌رود (Smyth et al., 2017). با این وجود هزینه بالا، اثرات جانبی خطرناک و ایجاد مقاومت در سلول‌های سرطانی استفاده از این داروها را محدود ساخته است. از این رو امروزه توجه به ترکیبات طبیعی جهت کاربرد در شیمی‌درمانی گسترش یافته است.

قلمرو گیاهان با تولید بیش از ۲۰۰۰۰۰ ترکیب شیمیایی شناخته شده از گزینه‌های اصلی جهت شناسایی ترکیبات ضد سرطانی است. آلالوئیدها، ترپنئیدها و استروئیدها از جمله مهمترین ترکیبات فعال زیستی جدا شده از گیاهان دارویی هستند (Shweta et al., 2013). ترکیب ضدسرطانی *Cephaelotaxus fortune Hook.* مثالی از این گروه است. با وجود پتانسیل بالای گیاهان دارویی در تولید ترکیبات ضدسرطانی جدید، عواملی مانند حاصلخیزی خاک، میزان و کیفیت تابش نور، وابستگی فصلی و دوره کشت طولانی استفاده از گیاهان جهت تولید ترکیبات فعال زیستی را با محدودیت‌هایی همراه ساخته

با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به منظور تقطیر حلال در شرایط خلا و استخراج عصاره میکروبی استفاده گردید. عصاره‌های حاصل با کمک فریز درایر (Christ, آلمان) به پودر خشک تبدیل شدند.

ارزیابی اثرات مهاری سویه‌های اندوفیت بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE-30)

به منظور ارزیابی اثرات ضد سرطانی سویه‌های اندوفیت از رده سلولی سرطانی مری 30 KYSE-30 استفاده گردید.

#### KYSE-30 کشت رده سلولی سرطان مری

برای کشت این رده‌ی سلولی از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS استفاده شد و سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با مقدار ۵ درصد  $\text{CO}_2$  نگهداری شدند. پس از بررسی روزانه وضعیت رشد سلول‌ها در صورت نیاز محیط کشت KYSE-2-۳ بار در هفته تعویض گردید. سلول‌های رده سلولی- 30 با نسبت ۱:۳ و غلظت ۰/۲۵ درصد تریپسین - EDTA در یک میلی‌مolar پاساز داده شدند (Shi et al., 2018).

#### بررسی اثر ضد سرطانی متابولیت اندوفیت ها

پس از شمارش سلول‌های KYSE-30 با استفاده از لام نفوبار، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میزان ۵ درصد  $\text{CO}_2$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. غلظت‌های مختلف از عصاره‌های میکروبی که با حل کردن مقدار مناسب از پودر خشک شده در آب تهیه و با کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردیده بود، به محیط کشت سلول‌های KYSE-30 افزوده شد. از تیمار آب مقطر استریل به عنوان کنترل استفاده شد. زندمانی سلول‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور میکرولیتر رنگ MTT به هریک از چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول رویی هر یک از چاهک‌ها دور ریخته شده و مقدار ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به آنها افزوده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Awareness, امریکا) در طول موج ۵۴۰ نانومتر میزان جذب چاهک‌ها اندازه‌گیری و زندمانی سلول‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد (Maheswarappa et al., 2013).

$$\text{رابطه ۱: } V(\%) = \frac{\text{AT}}{\text{AC}} \times 100$$

AT = میزان جذب تیمار

AC = میزان جذب کنترل حلال

V = درصد زنده مانی سلول

در انتهای استفاده از نرم‌افزار گرف پد پریسم ۶ مقادیر  $\text{IC}_{50}$  محاسبه و نمودار نیمه لگاریتمی (دوز-پاسخ) ترسیم شد (Deng et al., 2013).

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری گیاه افردا

گیاهان دارویی. *E. intermedia* Schrenk & C.A.Mey. و *E. foliata* Boiss. ex C.A.Mey. از استان خراسان رضوی، روستای عارفی با موقعیت جغرافیایی N: 360731.9-E: 593148.1 جمع‌آوری و توسط متخصصان هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تعیین گونه شدند (شکل ۱). شماره کد هرباریومی این نمونه‌ها به ترتیب ۱۳۰۰۸ و ۱۳۰۰۹ است.

استریل سطحی نمونه‌های گیاهی به منظور استریل کردن سطحی، ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و ۳ دقیقه با آب‌ژاول ۵ درصد شسته و در نهایت به منظور شستشوی نهایی از آب مقطر استریل استفاده گردید (Preveena & Bhore, 2013).

### آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

در زیر هود میکروبی (زال تجهیز، ایران) با استفاده از تیغ استریل ساقه‌های گیاهان مورد نظر به قسمت‌های کوچک یک سانتی‌متری برش داده شده و از هاون استریل جهت ساییدن (خورد شدن قطعات گیاهی) استفاده گردید. همچنین به منظور یکنواخت شدن نمونه‌ها در ازای هر گرم از قطعات گیاهی خرد شده، ۹ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات استریل با pH برابر با ۷/۱ به لوله‌های آزمایش افزوده شد.

### جadasازی باکتری‌های اندوفیت

پس از تهیه سری رقت‌های مختلف از بافت گیاهی یکنواخت شده (هموژن شده) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها بر روی پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار تلقیح شد (Zinniel et al., 2002). محیط‌های کشت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد (پارس آزمایشگاه، ایران) به مدت یک ماه نگهداری شدند. کلنی‌های تشکیل شده با کشت‌های خطی پی‌درپی در پلیت‌های ۶ سانتی‌متری خالص‌سازی شدند. جدایه‌های بدست آمده بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، شکل و رنگ کلنی، شکل میکروسکوپی و برخی آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، اکسیداز، اندول، تولید آنزیم‌های هیدرولазی) مورد بررسی اولیه قرار گرفته و انواع غیر تکراری برای مراحل بعد انتخاب شدند.

### استخراج متابولیت‌ها از باکتری‌های اندوفیت

سویه‌ها در محیط کشت تریپتیک سوی برا (TSB) تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور چرخان با دور ۱۵۰ rpm نگهداری شدند. مایع رویی کشت با استفاده از سانتریفیوژ (MSE, انگلستان) با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا و به آن حجم مساوی حلال کلروفرم افزوده شد. در نهایت از دستگاه روتاری (Labtech, امریکا)



شکل ۱- گیاهان دارویی **A.** افردا اینترمیدیا و **B.** افردا فولیاتا جمع آوری شده از استان خراسان رضوی- روستای عارفی. عکس: علی اصغر بصیری ۱۳۹۶.

**Figure 1.** Medicinal plants studied, **A.** *Ephedra intermedia* and **B.** *Ephedra foliata* collected from Khorassan Razavi Province, Iran -Arefi village. Photo by A.A. Basiri 2017.

پس از کشت سویه‌های منتخب، متabolیت‌های ثانویه تولیده شده با کمک کلروفرم استخراج و خشک گردید. اثر غلظت‌های مختلف از عصاره‌های میکروبی بر روی رده سلولی با آزمون MTT نشان داد که تنها جدایه A1 توانایی مهار تکثیر سلول‌های رده سلولی سرطان مری KYSE-30 در بازه‌های زمانی ۴۸، ۷۲ ساعت پس از تیمار را دارد. میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌های KYSE-30 در سه بازه زمانی به ترتیب در جدول ۱، پاسخ و مقادیر IC<sub>50</sub> در سه بازه زمانی به ترتیب در جدول ۱، شکل ۴ و جدول ۲ نشان داده شده است.

اثرات ضدسرطانی سویه A1 باسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت و همین‌طور زمان مجاورت ترکیب با سلول افزایش یافته است. افزایش زمان به ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری اثرات سمیت سلولی ترکیب را افزایش داده است ( $p < 0.05$ ). میزان غلظت لازم برای قابلیت مهارکنندگی ۵۰ درصدی عصاره خام سویه A1 نیز با افزایش زمان کاهش یافته به طوری که این میزان در زمان‌های ۴۸، ۷۲ ساعت به ترتیب معادل ۳۴۶/۴، ۱۹۲/۸ و ۱۲۳/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

پس از تیمار سلول‌های KYSE-30 با عصاره جدایه A1 تغییرات ریخت‌شناختی این سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مکوس نیز مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول‌ها با عصاره باکتری اندوفیت A1 باعث تغییر شکل آن‌ها از حالت طبیعی و تبدیل آن‌ها به سلول‌های کروی و گرانوله گردید (شکل ۵).

#### شناسایی مولکولی سویه A1

تعیین توالی محصول واکنش تکثیر ژن 16S rRNA ۱۶ نشان داد که جدایه A1 به باکتری *Microbacterium maritipicum* شباهت دارد. ارتباط فیلوجنتیکی این سویه با باکتری‌های شناخته شده نشان داد این باکتری به گروه اکتینوباكترها تعلق دارد (شکل ۶).

#### شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت

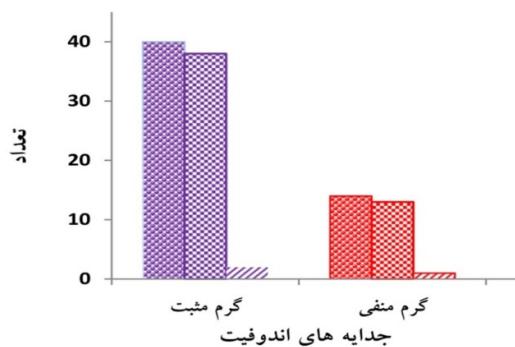
شناسایی سویه منتخب با بیشترین سمیت سلولی با روش مولکولی بر مبنای توالی‌بایی ژن 16S rRNA انجام شد. ژنومی با کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استخراج گردید. تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی F 27F و 1492R در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام و محصول PCR جهت اطمینان از خلوص روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. تعیین توالی ژن توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام گردید. توالی حاصل با توالی‌های موجود در پایگاه‌های Ez-NCBI و Biocloud مقایسه و ارتباط فیلوجنتی آن با سایر باکتری‌های شناخته شده با استفاده از الگوی Neighbour-joining و نرم‌افزار مگا ۶ ترسیم گردید (Kumar et al., 2016).

#### نتایج

##### جداسازی و خالص‌سازی اندوفیتها

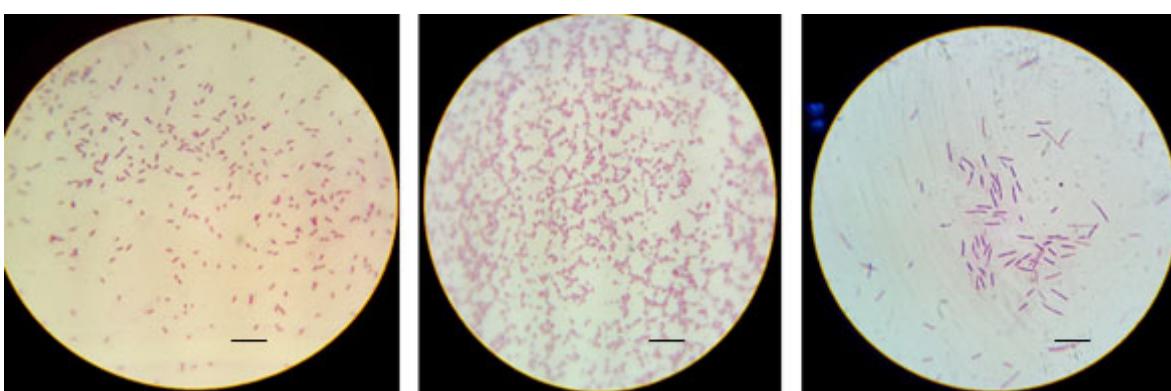
در این پژوهش تعداد ۷۰ کلنی باکتری اندوفیت از گیاه افردا جداسازی و با انجام کشت خطی خالص‌سازی شدند. در ادامه خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۵۴ باکتری که از لحاظ شکل میکروسکوپی و شکل کلنی متفاوت بودند برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شدند. نتایج این بررسی‌ها در شکل‌های ۲ و ۳ خلاصه گردیده است. از جدایه‌های به‌دست آمده ۴۰ سویه گرم مثبت و ۱۴ سویه گرم منفی بودند. تعداد ۳۸ باکتری گرم مثبت و ۱۳ باکتری گرم منفی میله‌ای بودند. تنها ۲ سویه گرم مثبت و یک باکتری گرم منفی به شکل کوکسی مشاهده شدند.

بررسی توانمندی جدایه‌ها در مهار رشد سلول‌های سرطانی KYSE-30



شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی جذایه‌های به دست آمده از گیاه افردا. دایره: کل سوبیه‌ها، مریع: باکتری‌های میله‌ای، هاشور: باکتری‌های کروی.

**Figure 2.** The morphological features of the isolates obtained from the *Ephedra* plants. Circle: whole strains, square: rod bacteria, diagonal: spherical bacteria



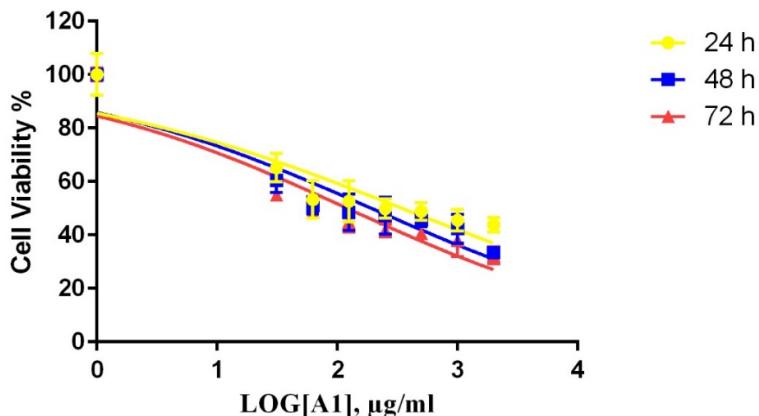
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم برخی از باکتری‌های اندوفیت جداده از گیاه افردا. از چپ به راست: کوکوباسیل، کروی و میله‌ای. مقیاس در شکل‌ها معادل ۲ میکرومتر است.

**Figure 3.** Gram-staining microscopic images of some endophytic bacteria isolated from the *Ephedra* plants. From left to right: coccobacillus, coccus and bacillus. Bars, 2  $\mu\text{m}$ .

جدول ۱- درصد زنده‌مانی سلول‌های KYSE-30 تیمار شده با عصاره جذایه A1 در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

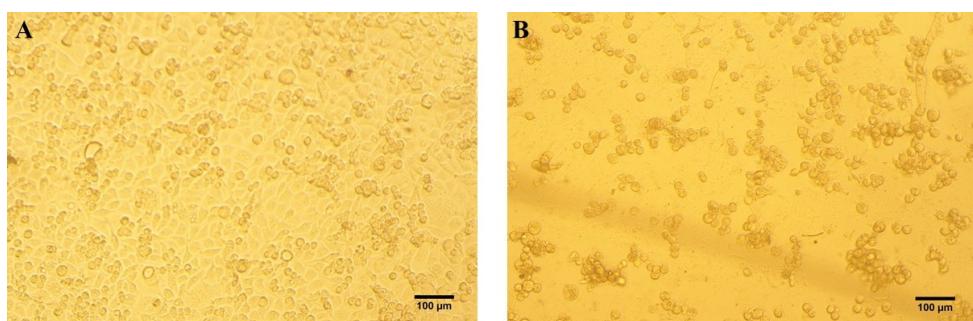
**Table 1.** Viability of KYSE-30 cells treated by strain A1 extract after 24, 48 and 72 hours.

۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	غلظت ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
زنده‌مانی (درصد)							
۶۵/۱	۵۳/۲	۵۲/۶	۴۹/۸	۴۸/۸	۴۵/۵	۴۲/۸	ساعت ۲۴
۶۰/۴	۵۱/۰	۴۸/۴	۴۷/۲	۴۵/۵	۴۲/۳	۳۳/۴	ساعت ۴۸
۵۴/۹	۴۸/۷	۴۴/۸	۴۱/۷	۴۰/۶	۳۸/۰	۳۲/۴	ساعت ۷۲



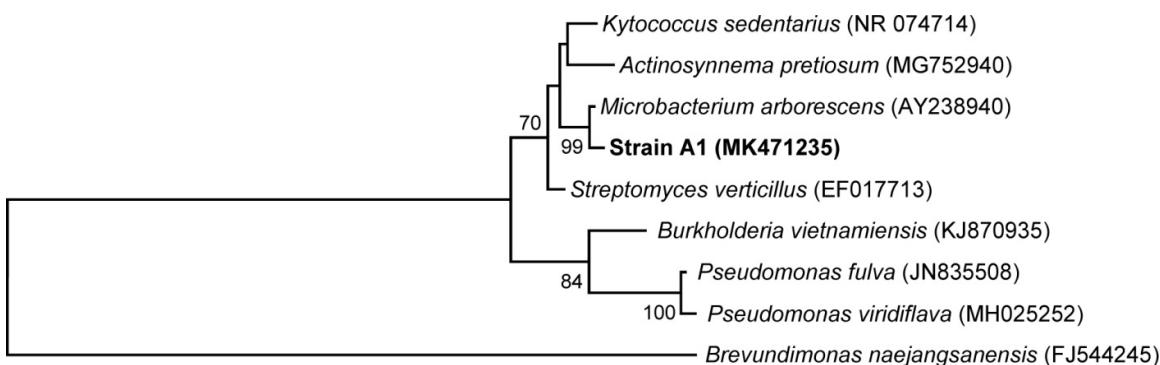
شکل ۴- نمودار نیمه لگاریتمی دوز-پاسخ سلول‌های رده KYSSE-30 در غلظت‌های مختلف عصاره جدایه A1 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، داده‌ها میانگین سه بار تکرار زنده‌مانی سلول‌ها در هر غلظت به همراه انحراف میانگین هستند.

**Figure 4.** Semi-logarithmic dose-response diagram of KYSE-30 cells in different concentrations of A1 strain extract in the time periods of 24, 48 and 72 hours after treatment. Data is an average of three experiments with the standard deviation.



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های KYSSE-30، ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت ۱۲۵ µg/ml از عصاره جدایه A1. سلول‌های تیمار نشده (A) و سلول‌های تیمار شده (B).

**Figure 5.** Light microscopic images of treated KYSE-30 cells with strain A1 extract (125 µg/ml) after 72 h. A: untreated cells B: treated cells.



شکل ۶- درخت فیلوجنتیکی سوبه A1 بر اساس توالی ۱۶s rRNA با استفاده از الگوی Neighbour-joining.

**Figure 6.** Neighbour-joining phylogenetic tree of strain A1 based on 16S rRNA gene sequence.

## بحث

پژوهش حاضر نیز توانایی باکتری اندوفیت گیاه افдра در مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) را نشان داد. اکتینیوباکترها از جمله میکروارگانیسم‌های بسیار رایج در طبیعت هستند که به واسطه دارا بودن ژنوم بزرگ از جمله مهمترین موجودات در تولید ترکیبات فعال زیستی با اثرات دارویی مانند آنتیبیوتیک‌ها و ضدسرطان‌ها هستند. تاکنون بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب فعال زیستی از اکتینیوباکترها به دست آمده است. با این وجود عمدۀ این ترکیبات (بیش از ۷۵ درصد) از یک سرده به خصوص به نام *Streptomyces* جداسازی شده است. اکتینیومیستهای کمیاب به گروهی از اکتینیومیست‌ها گفته می‌شود که نرخ جداسازی آن‌ها از نرخ جداسازی سرده *Streptomyces* کمتر است. از اعضای این گروه می‌توان به *Actinomadura* سرده‌های *Micromonospora* و *Microbacterium* اشاره نمود. با توجه به نیاز به متابولیت‌های فعال زیستی جدید از یک سو و کاهش شناسایی این ترکیبات از سرده *Streptomyces* توجه به اکتینیومیستهای کمیاب به عنوان گزینه‌های نویدبخش جهت شناسایی ترکیبات فعال زیستی جدید در حال افزایش است. در پژوهش حاضر باکتری *Microbacterium* sp. A1 با فعالیت ضدسرطانی از ساقه گیاه دارویی *E. intermedia* جداسازی گردید. از این روی می‌توان میکروارگانیسم‌های اندوفیت را به عنوان یک گزینه جذاب جهت جداسازی باکتری‌های اکتینیومیست کمیاب پیشنهاد نمود.

فعالیت ضدسرطانی باکتری‌های سرده *Microbacterium* بر رده‌های سلولی سرطان روده، سرطان دهانه، رحم سرطان ملانوما و سرطان پستان گزارش شده است (Azman et al., 2017; Cui et al., 2017). با این وجود در پژوهش حاضر برای اولین بار اثرات مهارکنندگی تکثیر بر روی رده سلولی KYSE-30 توسط اعضای سرده *Microbacterium* مشاهده شد. در این پژوهش با نمونه‌گیری از ساقه گیاه دارویی افدراء، ۵۴ میله ای از مهارکنندگی تکثیر بر روی رده سلولی LY214 متعلق به باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت بود. باکتری اندوفیت A1 متعلق به سرده *Microbacterium* به عنوان یک نوع از اکتینیومیستهای کمیاب توانایی مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) را داشته و باعث تغییر ریخت‌شناختی سلول‌ها شد. میزان زنده‌مانی ۵۰ درصد عصاره خام این باکتری ۱۲۳/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. این میزان در مقایسه با اثرات گزارش شده عصاره گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) ۱۵۰۰۰  $\mu\text{g}/\text{ml}$  و رنگدانه باکتری

توجه به نقش مهم گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از یک سو و شناسایی نقش میکروارگانیسم‌های اندوفیت در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از سوی دیگر، محققان را بر آن داشته است که به میکروارگانیسم‌های اندوفیت گیاهان به عنوان یک منبع جدید برای به دست آوردن ترکیبات فعال زیستی مهم مانند ترکیبات ضدسرطانی توجه نمایند. در این پژوهش اثرات ضدسرطانی باکتری اندوفیت *Microbacterium* sp. A1 از گیاه دارویی افدراء نشان داده شد. استفاده درمانی از گیاه افدراء با نام ماهانگ در طب سنتی چین در درمان تنگی نفس، افت فشار خون و یا بی‌اختیاری ادرار به ۵۰۰۰ سال قبل باز می‌گردد. عمدۀ این اثرات به تولید ترکیبات آکالوئید در گیاه نسبت داده شده است (Blumenthal & King 1995). در پژوهشی بر روی گونه‌های مختلف افدراء، حضور ترکیبات آکالوئید، فنولیک و فلاونوئید در این گیاه نشان داده شد. تحقیقات اخیر اثرات زیستی این ترکیبات از جمله تاثیرات ضدسرطانی آن‌ها را اثبات نموده است (Ibragic & Sofić 2015). استان خراسان رضوی به لحاظ غنای گونه‌ای یکی از مناطق با تنوع نسبی بالا در کشور است (Ghahremaninejad et al. 2005). با توجه به فراوانی این گیاه در شمال شرق کشور و پتانسیل بالای آن در تولید متابولیت‌های ثانویه دارای فعالیت زیستی، این گیاه برای شناسایی باکتری‌های با توانایی مهار سلول‌های سرطانی انتخاب گردید.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت با توانایی مهار تکثیر سلول‌های سرطانی در چندین مطالعه نشان داده شده است. به عنوان مثال اثرات ضدسرطانی باکتری‌های اندوفیت کرینوم (*Crinum macowanii* Baker) بر روی رده سلولی سرطانی گلیوبلاستوما (U87MG) ارزیابی، و فعالیت مهارکنندگی قابل ملاحظه متabolیت‌های ثانویه این باکتری‌ها مشخص گردید (Sebola et al., 2019). توانایی عصاره آبی و اتانولی ناز سفید (*Sedum album* L.) در مهار سلول‌های سرطانی معده نشان داده شده است (Meimandi & Yaghoobi, 2019). اخیراً محققان توانایی باکتری اندوفیت LY214 جدا شده از درخت شاد (*Camptotheca acuminata* Decne.) در تولید داروی ضدسرطانی با ارزش کامپتوسین که کاربرد گسترده‌ای در درمان سرطان‌های رحم، تخمدان، روده و ریه دارد را گزارش نمودند (Pu et al., 2015). توانایی باکتری‌های اندوفیت در تولید متابولیت‌های فعال زیستی دیگری مانند دیوسئنین، گینکلولئید، هوپرزین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین نیز گزارش شده است.

## REFERENCES

- Afra, S., Makhdoomi, A., Matin, M.M. & Feizy, J. 2017. A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity. Journal of Applied Microbiology 123: 1228-1236.
- Aghababaei-Ziarati, A., Ghorbani, H. & Hosseinalizadeh, M. 2013. Evaluate the relationship between spatial distribution of esophageal and gastric cancers and soil conditions at the Golestan Province. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 22: 180-193. (In Persian).
- Azman, A.S., Othman, I., Fang, C.M., Chan, K.G., Goh, B.H. & Lee, L.H. 2017. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare *Actinobacteria* from mangrove forest soils. Indian Journal of Microbiology 57: 177-187.
- Blumenthal, M. & King, P. 1995. Ma Huang: Ancient herb, modern medicine, regulatory dilemma. A review of the botany, chemistry, medicinal uses, safety concerns, and legal status of *Ephedra* and its alkaloids. HerbalGram 34: 22-26.
- Corina, D., Delia, M., Ersilia, A., Claudia, F., Istvan, O., Andrea, B., Minda, D., Proks, M., Buda, V., Hancianu, M., Cioanca, O., Soica, C., Popescu, P. & Dehelean, C.A. 2019. Phytochemical characterization and evaluation of the antimicrobial, antiproliferative and pro-apoptotic potential of *Ephedra alata* Decne. Hydroalcoholic extract against the MCF-7 breast cancer cell line. Molecules 24: 13.
- Cui, C.H., Kim, D.J., Jung, S.C., Kim, S.C. & Im, W.T. 2017. Enhanced production of gypenoside LXXV using a novel ginsenoside-transforming  $\beta$ -glucosidase from ginseng-cultivating soil bacteria and its anti-cancer property. Molecules 22: 844.
- Deng, L., Ren, Z., Jia, Q., Wu, W., Shen, H. & Wang, Y. 2013. Schedule-dependent antitumor effects of 5-fluorouracil combined with sorafenib in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 13: 363.
- Ghahremaninejad, F., Joharchi, M.R. & Vitek, E. 2005. New plant records for Khorassan province, Iran. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie B 106: 255-293.
- Ibragic, S. & Sofić, E. 2015. Chemical composition of various *Ephedra* species. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences 15: 21-27.
- Karimi, N., Rashedi, J., Mahdavi Poor B., Arabi, S., Ghorbani, M., Tahmasebpour, Nahideh. & Asgharzadeh, M. 2017. Cytotoxic effects of rosemary extract on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench 10: 102-107.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.
- Maheswarappa, G., Kavitha, D., Vijayarani, K. & Kumanan, K. 2013. Prodigiosin as anticancer drug Produced from bacteria of termite gut. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research 1: 257-266.
- Meimandi, K. & Yaghoobi, M.M. 2019. The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Sedum album* L. on
- پژوهش حاضر، تولید ترکیبات فعال زیستی توسط میکروگانیسم‌های اندوفیت گیاه دارویی می‌تواند به عنوان یک راهکار با ارزش برای پاسخگویی به نیاز روز افزون به این ترکیبات در درمان سرطان‌ها باشد.

## سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی کاربردی و محیطی و آزمایشگاه سلوی و مولکولی گروه زیست‌شناسی با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد (۳۴۲۹۷/۳) انجام شده است.

- human stomach and breast carcinoma cell lines in vitro. Nova Biologica Reperta 6: 10-19. (In Persian).
- Napier, K.J., Scheerer, M. & Misra, S.** 2014. Esophageal cancer: A review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. World Journal of Gastrointestinal Oncology 6: 112-120.
- Nasiri-Madiseh, Z., Mofid, M., Ebrahimi, M., Khyam-Nekouee, S.M. & Khosravi-Ahahli, M.** 2010. Isolation of taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). Journal of Shahrood University of Medical Sciences 11: 101-106. (In Persian).
- Preveena, J. & Bhore, S.J.** 2013. Identification of bacterial endophytes associated with traditional medicinal plant *Tridax procumbens* Linn. Ancient Science of Life 32: 173-177.
- Pu, X., Chen, F., Yang, Y., Qu, X., Zhang, G. & Luo, Y.** 2015. Isolation and characterization of *Paenibacillus polymyxa* LY214, a camptothecin-producing endophytic bacterium from *Camptotheca acuminata*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 42: 1197-1202.
- Sebola, T.E., Uche-Okeke, N.C., Tapfuma, K.I., Mekuto, L., Green, E. & Mavumengwana, V.** 2019. Evaluating antibacterial and anticancer activity of crude extracts of bacterial endophytes from *Crinum macowanii* Baker bulbs. Microbiology Open 8: 914.
- Seca, A. & Pinto, D.** 2018. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. International Journal of Molecular Sciences 19: 263.
- Shi, Y., Liu, X., Fredimoses, M., Song, M., Chen, H., Liu, K., Lee, M.H. & Dong, Z.** 2018. FGFR2 regulation by picrasidine Q inhibits the cell growth and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. Journal of Cellular Biochemistry 119: 2231-2239.
- Shweta, S., Bindu, J.H., Raghu, J., Suma, H., Manjunatha, B., Kumara, P.M., Ravikanth, G., Nataraja, K.N., Ganeshiah, K.N. & Shaanker, R.U.** 2013. Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (Icacinaceae). Phytomedicine 20: 913-917.
- Smyth, E.C., Lagergren, J., Fitzgerald, R.C., Lordick, F., Shah, M.A., Lagergren, P. & Cunninghamet, D.** 2017. Oesophageal cancer. Nature Reviews Disease Primers 3: 17048.
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F. & Wang, Q.** 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules 23: 762.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., KuczmarSKI, D. & Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. Vidaver, A.K.** 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 2198-2208.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Ghiasvand, M., Makhdoomi, A., Moghaddam Matin, M. & Vaezi, J.** 2021. Inhibition of esophageal cancer cell line (KYSE-30) proliferation using secondary metabolites of *Ephedra* endophyte bacteria. Nova Biologica Reperta 8: 95-103. (In Persian).

غیاثوند، م.، مخدومی، ع.، مقدم متین، م. و واعظی، ج. ۱۴۰۰. مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) توسط متابولیت‌های ثانویه باکتری‌های اندوفیت افدر. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۹۵-۱۰۳.