

Cytotoxic Effect and Antioxidant Capacity of Different Extracts of *Centaurea virgate* Lam.

Saeideh Ghafari¹,
Sahar Behzad^{2,3},
Arya Maskookian⁴

¹ PhD in Traditional Pharmacy, Traditional Medicine and Materia Medica Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Evidence-based Phytotherapy and Complementary Medicine Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁴ Doctor of Pharmacy, Student Research Committee, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 22, 2020 ; Accepted October 6, 2020)

Abstract

Background and purpose: *Centaurea virgate* Lam. (Gole-Gandome-Booteii or Gole-Gandome-Tarkeii in Persian) from Asteraceae, is one of the medicinal plants which is used in numerous regions, including western regions of Iran. This study aimed at investigating the cytotoxic activity and antioxidant capacity of *C. virgate* extracts.

Materials and methods: Petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts were prepared from plant aerial parts. Using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay, cytotoxic effects of different concentrations of extract were investigated on HepG2, MCF7, HT-29 and A549 cancerous cell lines. The antioxidant capacity of the extracts was measured by 2,2-Diphenyl- Picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP) assays.

Results: According to the DPPH test, ethyl acetate extract showed moderate antioxidant activity compared to other extracts. The highest cytotoxic activity was found in dichloromethane extract (IC₅₀ = 54.44 µg/ml) against A549 cell line, while other extracts did not show considerable toxicity.

Conclusion: According to several reports on cytotoxicity and antioxidant effects of *Centaurea* plant group, further phytochemical and pharmacological studies are needed to clarify these results.

Keywords: *Centaurea virgate*, cytotoxicity, DPPH, FRAP, antioxidant activity

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (190): 119-125 (Persian).

* Corresponding Author: Sahar Behzad - School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: s.bhzad@sbmu.ac.ir)

اثرات سمیت سلولی و آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف *Centaurea virgata* Lam. اندام هوایی گیاه

سعیده غفاری¹سحر بهزاد^{2و3}آریا مسکوکیان⁴

چکیده

سابقه و هدف: گونه *Centaurea virgate* Lam. با نام فارسی گل گندم بوته ای یا ترکه ای از خانواده ی *Astraceae* یکی از گیاهان دارویی مورد استفاده در مناطق متعدد از جمله نواحی غربی ایران می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت سلولی و اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه *C. virgata* می باشد.

مواد و روش ها: عصاره های پترولیوم اتری، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی به ترتیب از اندام هوایی گیاه به روش خیساندن تهیه و با استفاده از روش تقطیر در خلاء خشک شدند. سپس با استفاده از آزمون MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) اثر سمیت سلولی آن ها در غلظت های متفاوت بر رده های سلولی سرطانی نظیر HepG2، MCF7، A549 و HT-29 مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به وسیله ی دو روش DPPH (2,2-Diphenyl- Picrylhydrazyl) و FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential) اندازه گیری شد.

یافته ها: در آزمون DPPH عصاره اتیل استاتی گیاه اثر بهتری نسبت به سایر عصاره ها از خود نشان داد. هم چنین از میان نتایج آزمون MTT بر رده های سلولی مورد بررسی، بیشترین اثر سمیت سلولی مربوط به تیمار رده ی A549 با عصاره ی دی کلرومتانی *C. virgata* با مقدار IC_{50} معادل $54/44 \mu g/ml$ بود. در حالی که سایر عصاره ها سمیت سلولی چشم گیری از خود نشان ندادند.

استنتاج: با توجه به گزارش های متعدد آثار سمیت سلولی و آنتی اکسیدانی چشم گیر از اغلب گونه های جنس *Centaurea*، لازم است آزمایشات تکمیلی فیتوشیمیایی و فارماکولوژیکی جهت تفسیر این نتایج به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: *Centaurea virgata*، سمیت سلولی، DPPH، FRAP، آنتی اکسیدان

مقدمه

ایران با دارا بودن بالغ بر 8000 گونه گیاهی و 1730 گونه انحصاری که بیش از 2300 گونه از آن ها دارای خواص دارویی، عطری، ادویه ای و آرایشی - بهداشتی هستند، واجد ظرفیتی کم نظیر در صنایع مرتبط با گیاهان

مؤلف مسئول: سحر بهزاد؛ تهران، تقاطع خیابان ولی عصر (عج) و بزرگراه حجه الاسلام هاشمی رفسنجانی، دانشده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی E-mail: s.behzad@sbmu.ac.ir

1. دکترای تخصصی داروسازی سستی، مرکز تحقیقات طب سستی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات گیاه درمانی و طب مکمل مبتنی بر شواهد، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

4. دکترای داروسازی، کمیته پژوهشی دانشجویان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/4/2 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/5/12 تاریخ تصویب: 1399/7/15

دارویی محسوب می‌شود. توجه روزافزون جامعه به استفاده از ترکیبات طبیعی و داروهای گیاهی فرصت مغتنمی به‌منظور استفاده هر چه بیش‌تر از ظرفیت موجود به شمار می‌رود (1). در این میان گیاهان جنس گل‌گندم (*Centaurea*) همواره به دلیل ارزش دارویی بالا و مصارف متعدد در طب سنتی، در مطالعات فیتوشیمیایی و بیولوژیکی در خانواده Asteraceae بسیار مورد توجه بوده‌اند. آثار بیولوژیکی بارزی از جمله ضد التهاب، ضد درد، ضد پلاکت، بهبود دهنده زخم، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد انگل، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی از این جنس گزارش شده است (2). گیاه *Centaurea virgate*، با نام فارسی گل‌گندم بوته‌ای یا ترکه‌ای یکی از گیاهان سنتی مورد استفاده در ترکیه و غرب ایران است که در درمان ورم ملتحه چشم، درمان جوش‌ها و آکنه و به عنوان ادرار آور قوی، ضدسرفه و ضد رماتیسم در برخی مناطق از قبیل زاگرس مورد استفاده قرار گرفته است (3). با توجه به موارد مصرف سنتی گیاه و الزام بررسی‌های سلامت و ایمنی نمونه‌های این گیاه برای ورود به بازار دارویی، انجام بررسی‌های سمیت سلولی و اطلاع از عوارض احتمالی ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر این با توجه به گزارشات متعدد حضور ترکیبات فنولی در جنس گل‌گندم و آثار آنتی‌اکسیدانی چشم‌گیر سایر گونه‌های این جنس، بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این مطالعه، به بررسی آثار فوق‌الذکر عصاره‌های مختلف این گونه برای اولین بار پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی - کاربردی، با کد اخلاق SBMU.PHARMACY.REC.1396.242 مورد تأیید قرار گرفته است. اندام هوایی گیاه *Centaurea virgate* در اواخر بهار 97 در فصل گل‌دهی از استان همدان، حوالی روستای شهرستانه جمع‌آوری شد و یک نمونه هرباریومی از گیاه پس از شناسایی

توسط کارشناس مرکز تحقیقات منابع طبیعی، در هرباریوم مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان کردستان با شماره هرباریومی 195 نگهداری شد. نمونه گیاهی در سایه و در معرض جریان هوا خشک و سپس آسیاب شد. عصاره‌های پترولیوم اتری، دی‌کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی با افزودن حلال به پودر خشک شده گیاهی توسط روش خیساندن همراه با به‌هم‌زدن به مدت 72 ساعت تهیه شدند. سپس عصاره‌های به دست آمده به کمک دستگاه تقطیر در خلاء، تغلیظ و خشک و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت ارزیابی سمیت سلولی عصاره‌های تهیه شده، رده‌های سلولی سرطانی نظیر HepG2 (کارسینومای هیپاتوسلولار انسانی)، MCF7 (آدنوکارسینومای سینه انسان)، A549 (کارسینومای ریه انسان) و HT-29 (آدنوکارسینومای کولون انسان) پس از تهیه از انسیتو پاستور تهران در محیط‌های کشت مربوطه کشت داده شدند. برای سلول‌های A549 و HepG2 از محیط کشت RPMI 164 حاوی 10 درصد FBS (سرم جنین گاوی) و برای سلول‌های MCF7 و HT-29 از محیط کشت DMEM حاوی 5 درصد و 10 درصد FBS استفاده شد. همه رده‌های سلولی با 1 درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین در انکوباتور CO₂ 5 درصد در رطوبت کافی و دمای 37°C کشت داده شدند. بررسی اثر سمیت سلولی توسط روش رنگ سنجی MTT در پلیت‌های 96 خانه انجام شد. بدین ترتیب که با توجه به منحنی رشد سلول‌ها، برای رده‌های سلولی HT-29 تعداد 5000 سلول، A549 تعداد 8500 سلول، HepG2 تعداد 10000 سلول و MCF7 تعداد 9000 سلول در هر چاهک پلیت کاشته شد. پس از 24 ساعت انکوباسیون و پس از اطمینان از رشد 80 درصد سلول‌ها، محیط کشت رویی آن‌ها تخلیه شد و سپس محیط کشت تازه به همراه غلظت‌های مورد نظر از عصاره‌های گیاهی (100 µg/ml، 50، 25، 12/5، 6/25، 3/125) به هر چاهک اضافه

قرار دادن جذب هر نمونه در معادله منحنی، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی آن به صورت ارزش FRAP بر حسب میکرومولار $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ محاسبه شد (6). محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از برنامه Graphpad Prism 8 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد و P value کوچکتر از 0/05 به عنوان مرز معنی داری در نظر گرفته شد. در روش های سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی منحنی لگاریتم غلظت - درصد مهار آنتی اکسیدان و میزان IC_{50} برای هر نمونه از عصاره ها و استاندارد و در سنجش اثر سمیت سلولی منحنی لگاریتم غلظت - درصد مانی (viability) برای نمونه ها و همچنین میزان IC_{50} رسم و محاسبه شد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.

یافته ها و بحث

در این مطالعه برای اولین بار اثرات سمیت سلولی چهار عصاره (متانولی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و پترولیوم اتری) گیاه *C. virgata* با بهره گیری از آزمون MTT و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاه به کمک دو روش FRAP و DPPH مورد بررسی قرار گرفت. از 100 گرم پودر خشک گیاه، درصد بازدهی برای عصاره پترولیوم اتری 1/18 درصد، برای عصاره دی کلرومتانی 0/2 درصد، برای عصاره اتیل استاتی 0/05 درصد و برای عصاره متانولی 1/85 درصد محاسبه شد. در مطالعه ی حاضر در بررسی اثر سمیت سلولی گیاه مذکور به کمک روش MTT، مقدار IC_{50} محاسبه شده برای عصاره ی دی کلرومتانی بر روی رده A549، $54/44 \mu\text{g/ml}$ بوده و این مقدار برای دیگر عصاره ها بر روی رده های سلولی مورد آزمایش بیش تر از $100 \mu\text{g/ml}$ اندازه گیری شد (نمودارهای شماره 1-4). با توجه به منابع موجود مبنی بر ارزیابی سمیت عصاره های گیاهی، می توان نتیجه گیری کرد که از بین عصاره های مورد مطالعه، تنها اثر عصاره ی دی کلرومتانی بر رده ی A549 را می توان به عنوان سمیت سلولی متوسط در نظر گرفت و دیگر عصاره ها از این جهت آثار قابل قبولی از خود نشان ندادند (7).

گردید. برای رقیق سازی عصاره ها از DMSO استفاده شد و غلظت نهایی آن به کم تر از 0/1 درصد رسید تا برای سلول ها سمی نباشد. برای هر عصاره 3 ستون چاهک و برای هر غلظت یک عصاره 3 چاهک و هم چنین یک ستون به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت 72 ساعت، با تخلیه محیط کشت قبلی، محلول MTT به آن ها اضافه شد و پس از 4 ساعت انکوبه شدن، با حذف محیط روی هر چاهک، کریستال های فورمازان حاصله در DMSO حل شده و جذب نمونه با دستگاه الیزاریدر در طول موج 570 nm خوانده شد. درصد بقای سلولی با تقسیم جذب نوری نمونه های مورد آزمون بر جذب نوری کنترل در برابر غلظت عصاره حاصل شد. ترکیب 5FU به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (4). جهت سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی از روش های DPPH و FRAP استفاده شد. در روش اول به 200 میکرولیتر از هر یک از رقت های تهیه شده از عصاره ها و BHT مقدار 2 میلی لیتر محلول DPPH اضافه شد. محلول کنترل از DPPH و محلول بلانک از عصاره ها و BHT به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. سپس جذب آن ها در طول موج 518 نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis اندازه گیری شد. برای هر محلول درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (5).

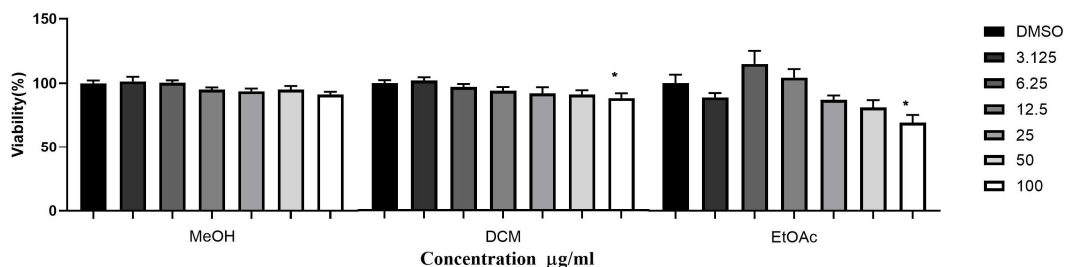
$$\text{درصد مهار رادیکال DPPH} = 100 * \frac{\text{ODc} - (\text{ODs} - \text{ODb})}{\text{ODc}}$$

ODc: میزان جذب کنترل

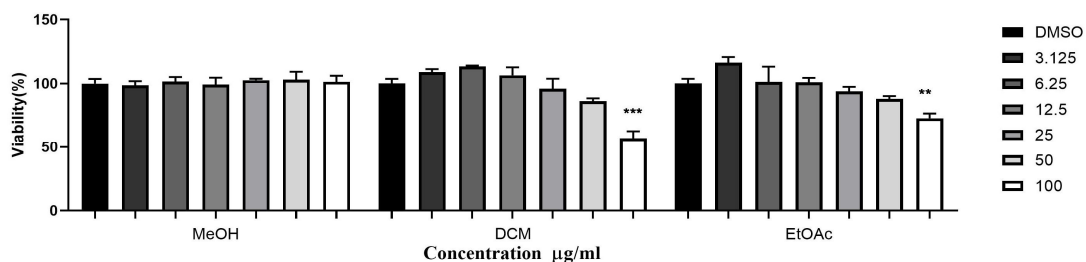
ODs: میزان جذب نمونه

ODb: میزان جذب بلانک

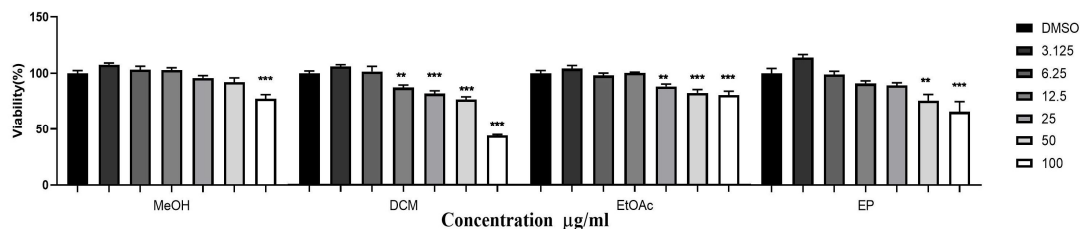
برای انجام آزمایش FRAP، به نمونه های عصاره داخل هر یک از چاهک های مشخص شده پلیت 24 خانه محلول FRAP، افزوده شد. با خواندن جذب پلیت ها در طول موج 593 نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر، منحنی کالیبراسیون $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ رسم شد و با



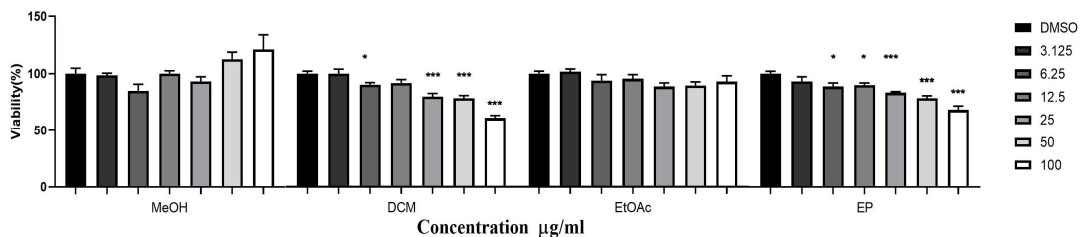
نمودار شماره 1: تأثیر غلظت‌های مختلف (3/125-100 µg/ml) 3 عصاره‌ی گیاه *Centaurea virgata* بر زیست‌پذیری رده سلولی HepG2 توسط تست MTT. * : $P < 0/05$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.



نمودار شماره 2: تأثیر غلظت‌های مختلف (3/125-100 µg/ml) 3 عصاره‌ی گیاه *Centaurea virgata* بر زیست‌پذیری رده سلولی MCF7 توسط تست MTT. ** : $P < 0/01$ در مقایسه با کنترل می‌باشد. *** : $P < 0/001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.



نمودار شماره 3: تأثیر غلظت‌های مختلف (3/125-100 µg/ml) 4 عصاره‌ی گیاه *Centaurea virgata* بر زیست‌پذیری رده سلولی A549 توسط تست MTT. ** : $P < 0/01$ در مقایسه با کنترل می‌باشد. *** : $P < 0/001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.



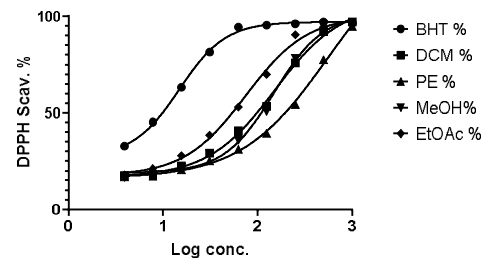
نمودار شماره 4: تأثیر غلظت‌های مختلف (3/125-100 µg/ml) 4 عصاره‌ی گیاه *Centaurea virgata* بر زیست‌پذیری رده سلولی H-T29 توسط تست MTT. * : $P < 0/05$ در مقایسه با کنترل می‌باشد. *** : $P < 0/001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.

عصاره ترکیبات سزکویی ترپنی (8 α -hydroxysonchucarpolide)، 8 α -(3,4-dihydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-dehydromelitsensine و (cnicin)، فلاونوئیدهایی از قییل فلان (apigenin، hispidulin، salvigenin، eupatorin) (3'-methyleupatorin) و فلاونول (isokaempferide) جداسازی و خالص سازی شده است. در این میان ترکیبات سزکویی ترپنی و فلاونوئیدی که حاوی گروه متوکسی بر کربن شماره 7 بودند، بر مهار آنزیم گزانتین اکسیداز اثری نداشتند. هم چنین ظرفیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی جدا شده توسط روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت، که نتایج حاکی از این بود که هیچ کدام از این ترکیبات آثار آنتی اکسیدانی از خود نشان ندادند (8). علاوه بر این برخی ترکیبات جدا شده از این گیاه نیز اثر سمیت سلولی بازرزی بر رده های سلولی سرطانی از خود نشان نداده اند. به عنوان مثال، دو ترکیب salvigenin و hispidulin که از گیاه *Gardenia sessiliflora* جدا شده بودند بر هیچ یک از رده های سلولی MCF7، A549 و HT-29 اثر سمیت سلولی از خود نشان ندادند (9). در نهایت به نظر می رسد که گزارشات قبلی با نتایج مطالعه حاضر نیز همخوانی دارند. عصاره های مختلف این گیاه همچنین آثار آنتی باکتریال متنوعی بر سوش های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* از خود نشان داده است که آن را به کاندیدای مناسبی به عنوان ضد باکتری طبیعی در محصولات درمانی و آرایشی پوستی با توجه به مصرف سنتی گیاه تبدیل می نماید (10). در تکمیل مطالعات صورت گرفته بررسی های سمیت حاد، تحت مزمن و آثار ضد التهابی گیاه به صورت درون تن نیز پیشنهاد می شود.

References

1. Amiri Aghdaie S, Zare Zardeini H. Investigating effective factors on improvement and development of medicinal Plants in Iran (case

هم چنین در مطالعه ظرفیت آنتی اکسیدانی این گونه، عصاره اتیل استاتی با مقدار $IC_{50} = 74/80 \mu g/ml$ و 3 عصاره دیگر با مقدار IC_{50} بالای $100 \mu g/ml$ ، نسبت به BHT به عنوان کنترل با $IC_{50} = 14/90 \mu g/ml$ آثار چشم گیری از خود نشان ندادند (نمودار شماره 5 و جدول شماره 1).



نمودار شماره 5: منحنی غلظت پاسخ (درصد مهار رادیکال آزاد DPPH) عصاره های مورد مطالعه گیاه *C. virgata* و مقایسه آن با BHT

جدول شماره 1: مقدار IC_{50} (محدوده قابل اطمینان 95%) عصاره های مورد مطالعه گیاه *C. virgata* و ترکیب استاندارد BHT

عصاره/ترکیب	$IC_{50}(\mu g/ml)$
دی کلرومتانی	151/6 (118/8 - 218/8)
پترولیوم اثری	552/9 (306/8 - 957/2)
متانولی	148/9 (111/3 - 225/5)
اتیل استاتی	74/8 (58/1 - 96/1)
BHT	14/9 (13 - 17/4)

جدول شماره 2: مقدار (μM) یون $Fe(III)$ کاهش یافته به $Fe(II)$ در مجاورت عصاره متانولی و مقایسه آن با BHT

ترکیب	مقدار (μM) یون $Fe(III)$ کاهش یافته به $Fe(II)$
BHT	2207/43
عصاره متانولی	556/18

در مطالعات پیشین، عصاره دی کلرومتانی این گیاه اثر متوسطی بر مهار آنزیم گزانتین اکسیداز ($IC_{50} = 98/9 \pm 15/8 \mu g/ml$) از خود نشان داده است. از این

- study Isfahan city). New Marketing Research 2014; 4(1): 195-214 (Persian).
2. Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and

- biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research* 2012; 84(3): 398-416.
3. Delfan E, Khodayari H, Azizi K. Ethnobotany of endemic medicinal plants in Zaghe and Beyranshahr districts, Lorestan province, Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants* 2019; 28(4): 1-13 (Persian).
 4. Azizsoltani A, Piri K, Behzad S, Soleimani M, Nekouei M, Mahmoudi Z, et al. Ethyl acetate extract of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) enhances proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2018; 17(3): 1057-1067.
 5. Zaabat N, Hay AE, Michalet S, Skandrani I, Chekir Ghedirac L, Dijoux Franca MG, et al. Chemical Composition, Antioxidant, Genotoxic and Antigenotoxic Potentials of *Phlomis Bovei De Noé* Aerial Parts. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2020; 19(1): 282-291.
 6. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 2006; 94(4): 550-557.
 7. Teicher BA, Andrews PA. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval* 2004.
 8. Tuzun BS, Hajdu Z, Orban Gyapai O, Zomborszki ZP, Jedlinszki N, Forgo P, et al. Isolation of chemical constituents of *centaurea virgata* lam. And xanthine oxidase inhibitory activity of the plant extract and compounds. *Medicinal Chemistry* 2017; 13(5): 498-502.
 9. Thanasansurapong S, Tuchinda P, Reutrakul V, Pohmakotr M, Piyachaturawat P, Chairoungdua A, et al. Cytotoxic and anti-HIV-1 activities of triterpenoids and flavonoids isolated from leaves and twigs of *Gardenia sessiliflora*. *Phytochemistry Letters* 2020; 35: 46-52.
 10. Moghaddam NS, Eryilmaz M, Altanlar N, Yıldırım O. Antimicrobial screening of some selected Turkish medicinal plants. *Pak J Pharm Sci* 2019; 32(3): 947-951.