ORIGINAL ARTICLE

Investigating the Cytotoxic Effects of Penicillium Citrinum on Cancer Cell Lines (HepG2), (A549), (SKOV3), (MCF7) and Normal Cell Lines (LLCPK1), (CHO) by MTT Assay

Mahammad Shokrzadeh[1],
Hamid Badali[2],
Jamshid Yazdani Charati[3,4],
Zeinab Amiri[5],
Mahmood Omidi[6]

[1] Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Mycology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Biostatistics, Health Sciences Research Center, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Psychiatry & Behavioral Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MSc Student in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] MSc Student in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 3, 2012 ; Accepted August 7, 2012)

Abstract

Background and purpose: Penicilliums have high diversity among fungi species and some of them are found to be very useful. Some studies have evaluated their antimicrobial and cytotoxic effects. Penicillium citrinum is a genus of the penicilliums that produces mycotoxin citrinin. Therefore, it is worthy to assess its cytotoxic effect.

Materials and methods: The DNA of the fungus obtained from the soil samples from the campus of Mazandaran University of Medical sciences was extracted. Then DNA sequencing was done and the ethanolic extract including metabolites was taken out. The effect of different concentrations of test solution were evaluated on cancer cell lines of human liver (HepG2), lung (A549), ovary (SKOV3), and breast (MCF7) and also on kidney (LLCPK1) and ovary of Hamster (CHO) normal cell lines using MTT method. Cisplatin was considered as positive control. The data was analyzed using Prism Ver.3, ANOVA and t-test.

Results: The findings revealed significant differences between the levels of IC_{50} of fungus metabolites and cisplatin in all cell lines ($P< 0.005$). Also, the level of IC_{50} of fungus metabolites on normal cell lines was significantly different from that of the cancer cell lines ($P< 0.05$).

Conclusion: This study showed that ethanolic extract of P. citrinum metabolites did not have a considerable toxicity effect on cancer and normal cell lines. However, it increaesd the inhibitory effect of cancer cell proliferation.

Keywords: Penicillium citrinum, cancer cell lines, IC_{50}, MTT assay

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(92): 9-17 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۲ شهریور سال ۱۳۹۱ (۱۷-۹)

شناسایی و بررسی اثرات سمیت سلولی قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی HepG2، A549، SKOV3، MCF7 و نرمال LLC-PK1 و CHO به روش MTT assay

محمد شکرزاده[۱]
حمید بدلی[۲]
جمشید یزدانی چراتی[۳،۴]
زینب امیری[۵]
محمود امیدی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: پنیسیلیوم‌ها دارای تنوع فراوانی در گونه‌های قارچی هستند که برخی از آن‌ها دارای تأثیرات مفیدی می‌باشند. اثرات ضد میکروبی گونه‌های مختلف آن‌ها بررسی شده و مطالعاتی بر روی اثرات سمیت بعضی از گونه‌های آن‌ها انجام شده است. پنیسیلیوم سیترینوم یکی از انواع پنیسیلیوم‌ها می‌باشد که مایکوتوکسینی به نام سیترینین تولید می‌کند، لذا عصاره این قارچ نیز می‌تواند اثرات سمیت سلولی قابل ارزیابی داشته باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا DNA قارچ به دست آمده از خاک مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص) واقع درشهرستان ساری استان مازندران، استخراج و سپس توالی نوکلئوتیدی آن تعیین و مورد شناسایی قرار گرفت و عصاره اتانولی حاوی متابولیت‌های قارچ تهیه شد. سپس اثر این عصاره با غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2) و ریه (A549) و تخمدان (SKOV3) و سینه (MCF7) و نیز رده‌های سلولی نرمال کلیه (LLC-PK1) و تخمدان همستر (CHO) توسط روش MTT assay بررسی و داروی سیس پلاتین نیز به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محاسبات آماری برای مقایسه IC_{50} ها با استفاده از نرم‌افزار آماری انجام و مقایسه داده‌ها صورت پذیرفت.

یافته‌ها: بررسی‌ها نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میزان IC_{50} متابولیت قارچ و داروی سیس پلاتین در همه رده‌های سلولی مورد بررسی وجود دارد ($p <$ ۰/۰۰۵). همچنین میزان IC_{50} متابولیت قارچ برروی خطوط سلولی سرطانی با خطوط سلولی نرمال تفاوت معنی‌داری را نشان داده است ($p<$۰/۰۵).

استنتاج: این بررسی نشان داد که عصاره اتانولی متابولیت قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نرمال به‌کار رفته در این مطالعه، نسبت به داروی ضد سرطان سیس پلاتین نمی‌تواند اثرات سمیت قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان دهد ولی در دوزهای به‌کار برده شده اثرات مهار رشد سلول‌های سرطانی را بهتر از سلول‌های نرمال از خود نشان داده است.

واژه های کلیدی: پنیسیلیوم سیترینوم، رده سلولی سرطانی، IC_{50}، MTT assay

مقدمه

قارچ‌ها ارگانیسم‌هایی یوکاریوت بوده فاقد تاژک و غیر متحرک می‌باشند(۱). با استفاده از ویژگی‌های ژنتیکی و اطلاعات مولکولی، آن‌ها را در گروه‌های جنس، خانواده، راسته، رده و شاخه طبقه‌بندی می‌کنند(۲).

مولف مسئول: حمید بدلی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: badalii@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی/ فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. گروه قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. مرکز تحقیقات روان پزشکی و علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. دانشجوی کارشناسی ارشد سم شناسی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۱۲/۱۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۵/۱۷

پنیسیلیوم‌ها یکی از شایع‌ترین قارچ‌های گند روی طبیعت هستند که به آسانی در خاک، مواد گیاهی و غذایی در حال فساد رشد می‌کنند. شهرت اصلی این دسته از قارچ‌ها به علت انواع آنتی‌بیوتیک‌های ضد میکروبی و ضد قارچی است که از آن‌ها تهیه می‌شود(۳). فعالیت ضد میکروبی قارچ اولین بار در سال ۱۸۷۶ توسط تیندال شرح داده شد که اثرات آنتی‌میکروبیال گونه‌های مختلف پنیسیلیوم را روی باکتری نشان می‌داد(۴). یکی از انواع پنیسیلیوم‌ها، پنیسیلیوم سیترینوم است که به‌عنوان قارچ تولید کننده مایکوتوکسین سیترینین و آنزیم‌های مخرب سلولز مانند سلولاز و اندوگلوکاناز شناخته شده است(۵). همچنین عامل تولیدکننده اکراتوکسین و نیز عامل نکروز کبدی و کاهش رشد می باشد(۶). در مطالعه‌ای اثر توکسیسیته این قارچ بر دانه غلات و نیز پرندگان بررسی شد(۷). در مطالعه ای پیشنهاد شد که سیترینین که توسط ۱۰ نوع قارچ و از جمله پنیسیلیوم سیترینوم تولید می شود، استرس اکسیداتیو را در سلول‌های مخمر تحریک می‌کند(۸). درمطالعه Liu که در سال ۲۰۱۰ روی این قارچ انجام شد، دو دیمر جدید سیترینین به‌همراه سه مونومر شناخته شده سیترینین، از پنیسیلیوم سیترینوم جدا نمود که این دو ترکیب سمیت قابل ملاحظه‌ای را بر دو خط سلولی سرطانی مورد ارزیابی از خود نشان ندادند(۹). در این تحقیق پس از بررسی ساختاری و شناسایی این نوع قارچ جدا شده از خاک مناطق مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص) شهرستان ساری، به بررسی سمیت سلولی عصاره اتانولی متابولیت این قارچ بر روی رده سلولی سرطانی و نرمال پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

روش نمونه گیری از خاک و آماده سازی نمونه ها:

ابتدا از خاک مناطق کشاورزی مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص) دانشگاه علوم پزشکی استان مازندران در شهر ساری نمونه‌برداری به شکل نقطه‌ای از ۱۰ منطقه صورت گرفت. خاک مورد بررسی پس از جمع‌آوری، خشک نمودن و مخلوط کردن، از الک ۷۸۰ میلی میکرون عبور داده شد و سپس یک گرم از آن به ۱۰۰ سانتی‌متر مکعب آب آگار استریل شده افزوده شد تا محلول خاک تهیه گردد. یک سانتی‌متر مکعب از این محلول به پتری دیش حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل و به‌طور یکنواخت توزیع شد و پتری دیش‌ها به‌مدت یک هفته در اتاق کشت نگهداری شدند تا قارچ رشد و کلنی‌های رشد یافته به دست آمد.

کشت قارچ و روش تهیه عصاره اتانولی و غلظت‌های مختلف از آن:

نمونه قارچ پنیسیلیوم سیترینوم به پلیت حاوی محیط کشت جامد SDA (Sabouraud Dextrose Agar) انتقال داده شد و پس از سه روز مقداری از اسپورها جدا و به محیط کشت مایع SDB (Sabouraud Dextrose Barth) تلقیح و سپس در انکوباتور شیکر دار در دمای ۲۸ درجه به مدت ۳ هفته قرار گرفت تا کاملاً انکوبه شده و سوسپانسیون قارچی تهیه گردد(۱۰). پس از گذشت سه هفته سوسپانسیون تهیه شده که حاوی متابولیت قارچ می‌باشد، توسط فیلترهای میکروبیولوژی ۰/۲ میکرون صاف شده به لوله‌های فالکون استریل منتقل شد و سپس محتویات درون لوله‌ها به یک بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و از اتانول به‌عنوان حلال استفاده شد. سپس حاصل این عصاره توسط دستگاه روتاری تغلیظ و در نهایت توسط دستگاه دمای درایر نمونه به‌صورت پودر جامد ته نشین و برای مراحل بعدی در دمای $80^{o}C$- نگهداری شد(۱۱). در روز کاری در آزمایشگاه کشت از این عصاره ابتدا توسط اتانول محلول تهیه شده و سپس برای انجام MTT assay غلظت‌های مختلف (۵۰۰۰ µg/ml و ۲۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۵۰، ۵) از عصاره قارچ تهیه شد.

مطالعات مولکولی:

استخراج DNA: برای این منظور قارچ مورد مطالعه را بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار به‌صورت مخطط کشت داده شد. پس از رشد کلنی قارچ به اندازه کافی، استخراج DNA با استفاده از کیت تجارتی موبیو (MoBio laboratories, USA) مطابق دستورالعمل کارخانه انجام می‌گرفت. DNAی استخراج شده در دمای $-20\ ^{o}C$ درجه نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز PCR:

جهت تکثیر ناحیه ITS-RDNA آغازگرهای ITS1 و ITS4 مورد استفاده قرار می‌گرفت که این آغازگرها بخشی از ناحیه ۳َ زیر واحد کوچک DNAی ریبوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و 5.8S، ITS2 و بخشی ناحیه ۵َ از زیر واحد بزرگ DNAی ریبوزومی (LSU-rDNA) را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر می‌کنند. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم (0.5 mM Mgcl2)، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTP، ۵ پیکو مول از هر یک از آغازگرها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش بر روی درجه حرارت ۱۰ درجه برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و توسط دستگاه ژل داک بررسی شدند(۱۳-۱۱).

تعیین توالی Sequencing

واکنش تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده به عنوان محصول واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از کیت تجاری (BigDye terminator v. 3. 1) مطابق دستورالعمل سازنده کیت انجام گرفت. به این صورت که با استفاده از ddNTP هایی که فلورسانس یافته‌اند و تک پرایمرهای موجود از مرحله PCR و big dye مرحله سکانس ژنی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) در حرارت ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل ۹۶ درجه به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۰ درجه به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه به مدت ۴ دقیقه و در نهایت در دمای ۴ درجه نگه داری می‌شوند. محصولات واکنش Sequencing بر روی دستگاه سکانس ژنی (ABI system) افزوده و بررسی شدند(۱۲، ۱۳).

روش ارزیابی سمیت سلولی و تعیین IC_{50}:

اثر محلول‌های حاوی نمونه با غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2) و ریه (A549) و تخمدان (SKOV3) و سینه (MCF7) و نیز رده‌های سلولی نرمال کلیه (LLCPK1) و تخمدان همستر (CHO) توسط روش MTT بررسی شد. ابتدا هر یک از این رده‌های سلولی را با توجه به شماره بین‌المللی آن‌ها از انستیتو پاستور تهران خریداری نمودیم و در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی آن‌ها را در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 پاساژ داده تا به مرحله رشد صعودی خود برسند و سپس از این سوسپانسیون سلولی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت که حاوی 10^{5} عدد سلول از هر رده سلولی است، اضافه کرده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار دادیم سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های عصاره قارچی به ۳ چاهک اضافه شدند و به‌داخل انکوباتور منتقل تا انکوبه شدن سلول با

عصاره صورت پذیرد و سپس پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای را پس از ۲۴ ساعت مواجه از انکوباتور خارج و پس از شستشو به هر چاهک ۵۰ µL محلول MTT اضافه کرده پس از طی شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک‌ها را خارج و ۵۰ µL محلول DMSO رقیق شده با محیط کشت به هر چاهک افزوده شد و پس از ۱۵ دقیقه، آن را خارج و میزان جذب کلنی‌های سلولی رنگ گرفته در هر چاهک را با دستگاه ELISA reader در ۲ طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید.

در این مطالعه از داروی سیس پلاتین (داروی ضد سرطان و به شدت سمی) به‌عنوان کنترل مثبت با غلظت‌های مختلف (۵۰ µg/ml و ۱۰، ۵، ۰/۵، ۰/۱) مشابه عصاره قارچ بر روی همان خطوط سلولی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از قرائت مقادیر جذب در طول موج‌های مربوطه، جذب‌ها به نرم‌افزار Prism Ver.3 منتقل و توسط محاسبات رایانه‌ای و مقایسه با کنترل‌ها (سلول مواجه یافته با معرف MTT بدون حضور داروی سیس پلاتین و عصاره اتانولی قارچ) غلظت‌ها محاسبه و سپس بر اساس محاسبات ریاضی توسط نرم‌افزار مربوطه مقادیر IC_{50} (Inhibition Concentration) محاسبه و سپس میانگین و انحراف معیار غلظت‌های آن‌ها محاسبه گردید(۱۴).

روش آماری:

محاسبات آماری برای مقایسه میانگین و انحراف از معیار IC_{50} با استفاده رایانه با کمک نرم‌افزار Prism Ver.3 با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و آماره t-Test صورت گرفت و به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد ($p<0/05$).

یافته‌ها

۱- تعیین توالی قارچ مورد بررسی:

توالی‌های خام به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNAstar) بررسی و ویرایش شد. توالی‌های ایجاد شده در این بررسی با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI Blast Search) www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسه شد و زیر هم چینی جدایه ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 انجام گرفت و الگوی هم‌ترازی چند گانه بررسی وشناسایی در حد گونه انجام گرفت که با توجه به ارزیابی بیشترین hit تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL-W (1.83) صورت گرفت و توالی زیر به دست آمد که مربوط به قارچ پنیسیلیوم سیترینوم می‌باشد.

D3= *Penicillium citrinum* = dH 23095-soil-Iran
TCGGGCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCC
GAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGC
GCCCGCCGACGGCCCCCCTGAACGCTGT
CTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACG
AAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT
GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC
GGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
CTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGG
GCCCCGTCCCCCCCGCCGGGGGGACGGG
CCCGAAAGGCAGCCTCGAGCGTATGGGG
CTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGcCCGGCC
GGCGCCAGCCGACCCCCAACCTTcAATT
ATCTCAGGTGACCTCGATCA

۲- ارزیابی سمیت سلولی عصاره قارچ:

داده‌های IC_{50} عصاره قارچ و داروی ضد سرطان بر روی رده‌های سلولی نامبرده که حاصل میزان جذب قرائت شده توسط دستگاه Microplate-reader و اعلام شده توسط برنامه Prism می‌باشد، در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: میزان IC_{50} (میانگین ± انحراف معیار) محاسبه شده عصاره قارچ پنیسیلیوم سیترینوم و داروی سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی و نرمال بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر (µg/Ml)

	Concentration Cell lines	IC_{50} (µg/ml) Cisplatin	IC_{50} (µg/ml) metabolite	P value Cisplatin with metabolite
Cancer cell lines	HepG2	۳/۶۱ ±۰/۲۱	۳۲۱۹ ± ۱۰۴	۰/۰۰۱
	A549	۵/۳۷ ±۰/۳۵	۲۵۳۱ ±۲۷۸	۰/۰۰۱
	SKOV3	۴/۲۴ ±۰/۰۹	۱۷۲۶ ±۲۸	۰/۰۰۱
	MCF7	۶/۲۳ ±۰/۷۶	۲۶۴۸ ±۷۳	۰/۰۰۱
Normal cell lines	LLCPK1	۳/۱۴ ±۰/۱۷	۳۵۶۸ ±۱۴۸	۰/۰۰۱
	CHO	۱/۶۱ ±۰/۰۷	۴۰۱۸ ±۱۲۸	۰/۰۰۱

مقایسه داده‌های IC_{50} عصاره قارچ و داروی سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطانی کبد (HepG2)، ریه (A549)، تخمدان (SKOV3)، سینه (MCF7) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده‌ها وجود دارد (p =۰۰۱). مقایسه داده‌های IC_{50} عصاره قارچ و داروی سیس پلاتین بر روی رده سلولی نرمال کلیه (LLCPK1)، تخمدان همستر CHO) نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده‌ها وجود دارد (p =۰۰۱). مقایسه داده‌های IC_{50} عصاره قارچ بر روی رده‌های سلولی سرطانی و رده‌های سلولی نرمال نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین همه داده‌ها به‌طور کلی و نیز به‌طور جداگانه وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵) از طرف دیگر این تفاوت، تنها در میان رده‌های سلولی سرطانی ریه (A549) و رده سلولی سرطانی سینه (MCF7) و همچنین میان رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) و رده سلولی نرمال کلیه (LLCPK1) معنی‌دار نبود.

میزان IC_{50} متابولیت قارچ بر روی رده سلولی نرمال (دو رده نرمال در یک گروه) با میزان آن بر روی رده سلولی سرطانی (۴ رده سرطانی در گروه دیگر) تفاوت معنی‌دار داشت ($p <$ ۰/۰۵). مقایسه داده‌های IC_{50} داروی سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی سرطانی و رده‌های سلولی نرمال نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین همه داده‌ها (به‌طور کلی) وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵). میزان IC_{50} دارو برروی رده سلولی نرمال با میزان آن بر روی رده سلولی سرطانی تفاوت معنی‌دار داشت ($p <$ ۰/۰۵).

بحث

در ۵۰ سال اخیر، داروهای ضد سرطان موفقی از متابولیت‌های قارچی به دست آمده است و قارچ‌ها پتانسیل ویژه‌ای برای تولید ترکیبات مفید دارویی از جمله داروهای ضد سرطان و تنظیم کننده فعالیت ایمنی بدن دارند(۱۵). در این تحقیق به بررسی اثرات سایتوتوکسیک متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم پرداخته شد.

در مطالعه کشت سلولی، اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی حاوی متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2)، ریه (A549)، تخمدان (SKOV3) و سینه (MCF7) و نیز رده‌های سلولی نرمال کلیه (LLCPK1) و تخمدان همستر (CHO) بررسی گردید. با مشاهده نتایج به دست آمده می‌توان گفت که در بین تمامی رده‌های سلولی بیشترین میزان IC_{50} عصاره اتانولی حاوی متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم، مربوط به رده سلولی نرمال تخمدان همستر (CHO) (IC_{50} = ۴۰۱۲ ± ۲۸۶) و کمترین میزان آن مربوط به رده سلولی سرطانی تخمدان (SKOV3) (IC_{50}= ۱۷۲۸ ± ۷۹) بوده است که نشان‌دهنده اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره اتانولی حاوی متابولیت های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر روی رده سلولی سرطانی تخمدان (SKOV3) در مقایسه با رده‌های سلولی نرمال بوده است. همچنین میزان IC_{50} عصاره حاوی متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2) و ریه (A549) و سینه (MCF7)، کمتر از رده سلولی نرمال کلیه (LLCPK1) و تخمدان همستر (CHO) بوده است. یعنی به غلظت‌های کمتری از عصاره اتانولی پنیسیلیوم سیترینوم برای مهار رشد سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال نیاز است (یعنی سمیت این عصاره بر

رده‌های سلولی سرطانی بیشتر از نرمال می‌باشد). این امر می‌تواند نشأت گرفته از به هم خوردن توازن مکانیسم‌های سلولی و بروز اختلال در مکانیسم‌های دفاعی و حذفی (متابولیسم و دفع) سلول‌ها به دنبال سرطانی شدن و تکثیر بی‌رویه سلولی نسبت به سلول‌های سالم باشد(۱۶). از سوی دیگر، می‌توان IC_{50} بالای رده‌های سلولی نرمال را در مقایسه با رده‌های سلولی سرطانی ناشی از توانایی این سلول‌ها در خارج نمودن داروها و عصاره مورد نظر از سلول دانست. همچنین روش‌ها یا سرعت مقابله سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی در مواجهه با ترکیبات مختلف بدین ترتیب است که سلول‌های نرمال Pathway های مقابله با خصوصیات سمی ترکیبات را که منجر به مهار رشد می‌شود، با سرعت بیشتری راه‌اندازی می‌نماید. به عنوان مثال، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی از قبیل گلوتاتیون در مواجهه با ترکیبات سمی سبب حذف ترکیبات اکسیدانی قوی می‌گردد(۱۷).

در میان خطوط سرطانی، بیشترین میزان IC_{50} متابولیت، مربوط به رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) و کمترین میزان آن مربوط به رده سلولی رده سلولی سرطانی تخمدان (SKOV3) بوده است که می‌تواند بیانگر اثر نسبی این متابولیت بر خط سلولی سرطانی (SKOV3) باشد. میزان IC_{50} عصاره حاوی متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG2)، ریه (A549)، تخمدان (SKOV3)، سینه (MCF7) و نیز رده‌های سلولی نرمال کلیه (LLCPK1) و تخمدان همستر (CHO) در مقایسه با داروی ضد سرطان سیس پلاتین در تمامی رده‌های نامبرده بسیار بیشتر بوده است (حدود ۵۰۰ برابر) و احتمالاً عصاره تأثیر سایتوتوکسیسیته قابل ملاحظه‌ای نسبت به این ترکیب سمی و ضد سرطان بر این خطوط سلولی مورد بررسی نداشته است زیرا سیس پلاتین یک داروی شیمی درمانی است که اساس درمان بسیاری از سرطان‌ها از جمله مثانه، بیضه، مری، ریه، معده و تخمدان می‌باشد. همچنین گاهی در درمان سرطان سر و گردن استفاده می‌شود(۱۸). البته این اختلاف زیاد می‌تواند به ناخالص بودن عصاره هم مربوط باشد و چنانچه متابولیت‌ها خالص‌سازی می‌شدند و جداگانه مورد بررسی قرار می‌گرفتند، احتمالاً نتایج متفاوتی به دست می‌آمد. مقدار IC_{50} در مورد داروی سیس پلاتین که به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد، بر روی رده سلولی سرطانی سینه (MCF7) بیشترین و بر روی خط سلولی نرمال تخمدان همستر (CHO) کمترین مقدار است. پس از (MCF7)، خط سلولی سرطانی ریه (A549) و بعد از آن‌ها به ترتیب، رده‌های سلولی (SKOV3) و (HepG2) و (LLCPK1) قرار گرفته‌اند (یعنی سیس پلاتین اثر بخشی متفاوتی بر روی رده‌های سلولی مختلف از خود نشان می‌دهد).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ توسط Qureshi و همکاران انجام شد، ۵۱ قارچ از ۱۵ جنس مختلف جمع‌آوری و اثرات سایتوتوکسیسیته هر یک بر سلول‌های سرطانی مغز ماهی سنجیده شد. پنیسیلیوم سیترینوم با LC_{50} ۳/۷ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از جمله قارچ‌هایی بود که میزان مورتالیته بالایی بر مغز ماهی نشان داد(۱۵).

در تحقیقی که توسط Iwahashi و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد، اثرات سایتوتوکسیک سیترینین، ترکیبی که از ۱۰ نوع قارچ به دست آمد و اولین بار از پنیسیلیوم سیترینوم جدا شد، با مطالعه پاسخ‌های ژنومیک بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که مکانیسم عملکرد این توکسین محدود است. سیترینین استرس اکسیداتیو را در سلول‌های مخمر افزایش می‌دهد(۱۹). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط Yu Lu و همکاران بر روی عصاره اتیل استاتی پنیسیلیوم سیترینوم انجام شد، دو دیمر جدید سیترینین (پنیسیترینون و پنیسیترینول) جدا شدند. این ترکیبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقابل رادیکال‌های DPPH با IC_{50} ۰/۸ تا ۵۹ میکرو مولار از خود نشان دادند. ترکیبات بر رده سلولی (HL60) و (P388) با روش MTT و بر خطوط

سلولی (BEL-7402) و (A-549) با روش SRB انجام شد و اثرات سایتوکسیک در مقابل هیچ یک از این خطوط سلولی مشاهده نشد. IC_{50} بیش از ۵۰ میکرومولار بود در حالی‌که IC_{50} پاکلیتاکسل که به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، ۰/۹۳ میکرومولار بود(۲۰).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط Chen و همکاران صورت گرفت، ترکیبات پنیسیترینول(سه نوع)، سیترینین و دکربوکسی دی هیدروسیترینون از پنیسیلیوم سیترینوم جدا شدند. دو نوع از پنیسیترینول خاصیت توکسیسیته ضعیفی علیه رده سلولی (HL60) از خود نشان دادند(۲۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Du و همکاران انجام شد، سه دیمر سیترینون از پنیسیلیوم سیترینوم جدا گردید و اثر سایتوتوکسیسیته هر یک در مقابل چهار خط سلولی سرطانی سنجیده شد. این خطوط سلولی شامل (HL-60) و (MOLT-4) و (A-549) و (BEL-7402) بودند و اثرات با روش‌های MTT و SRB سنجیده شد. نتیجه این بود که نوعی از دیسیترینون چرخه سلولی سلول‌های رده (HL-60) را در فاز G_2/M متوقف می‌کند و لذا اثرات سمیت سلولی دارد(۲۲).

در مطالعه ای که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، دو دیمر جدید سیترینین، پنیدیسیترینین A و B به‌همراه سه مونومر شناخته شده سیترینین، از پنیسیلیوم سیترینوم جدا شدند که توکسیسیته در مقابل دو رده سلولی سرطانی نشان ندادند(۹).

در تحقیقی که توسط شکرزاده و همکاران بر روی رده سلولی (HepG2) انجام شد، IC_{50} برای گیاه پلم ۹۷/۰۳ (IC_{50} داروی استاندارد ۸/۳) به دست آمد که نشان دهنده اثرات سایتوتوکسیک این گیاه است. در تحقیقی که ما بر روی این خط سلولی انجام دادیم، IC_{50} برای قارچ پنیسیلیوم سیترینوم ۳۲۰۶ به‌دست آمد که نمایانگر عدم بروز خواص سایتوتوکسیک قابل ملاحظه این قارچ است(۱۴).

میزان IC_{50} عصاره حاوی متابولیت‌های قارچ پنیسیلیوم سیترینوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی و نیز رده‌های سلولی نرمال به‌کار رفته در این مطالعه، در مقایسه با داروی ضد سرطان سیس پلاتین در تمامی رده‌های نامبرده بسیار بیشتر بوده است و می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عصاره تأثیر سایتوتوکسیسیته نداشته است. لذا پیشنهاد می‌شود که با خالص‌سازی و جدا کردن مواد مؤثره عصاره قارچ مورد ارزیابی، سمیت این ترکیبات (از جمله سیترینین و مشتقات آن) بررسی و با داروهای ضد سرطان مقایسه شود. همچنین جداسازی و خالص‌سازی متابولیت‌های انواع دیگر پنیسیلیوم و بررسی خواص سایتوتوکسیک آن‌ها نیز توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق نتیجه پایان‌نامه دوره دکتری عمومی داروسازی خانم امیری در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. از کلیه افرادی که در به ثمر رسیدن این کار تحقیقاتی همکاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

References

1. Baron EJ, Bailey WR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 8th ed. The C.V. Philadelphia: Mosby Company; 1990. p. 682,686,705.
2. Driver F, Milner RJ. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi, In: Applications of PCR to Mycology, ed. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP. CAB International: New York; 1998.
3. Emami M, Kordbache P, Moghadami M, Zeiny F. Medical Mycology. 4th ed. Tehran: Tehran University Publication; 1994. p. 181-212.
4. Florey HW, Chain E, Heatley NG, Jennings MA, Sanders AG. Antibiotics: A survey of

penicllin, streptomycin, and other antimicrobial substance from fungi actinomycetes, bacteria and plants. Oxford: Oxford University Press; 1949.

5. Khan SA, Hamayun M, Yoon H, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, et al. Plant growth promotion and Penicilliumcitrinum. BMC Microbiol 2008; 8: 231.
6. Ghoshal G, Banerjee UC, Chisti Y, Shivharea US. Optimization of Xylanase Production from Penicillium citrinumin Solid-State Fermentation. Chem Biochem Eng Q 2012; 26(1): 61-69.
7. Roberts WT, Mora EC. Toxicity of Penicilliumcitrinum AUA-532 contaminated corn and citrinin in broiler chicks. Poult Sci 1978; 57(5): 1221-1226.
8. Iwahashi H, Kitagawa E, Suzuki Y, Ueda Y, Ishizawa Y, Nobumasa H, et al. Evaluation of toxicity of the mycotoxincitrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. BMC Genomics 2007; 8: 95.
9. Liu HC, Du L, Zhu TJ, Li DH, Geng MY, Gu QQ. Two New Citrinin Dimers from a Volcano Ash-Derived Fungus, Penicilliumcitrinum HGY1-5. Helvetica Chimica Acta 2010; 93(11): 2224-2230.
10. Mohseni R, Noorbakhsh F, Nasrollahiomran A, Rezaie S. Survey the Effect of Licorice extract on AspergillusParasiticusgrowth and aflatoxinproduction by MIC and HPLC technique. 2011. Available at: http://congress.sbmu.ac.ir/index.php/clc/4clc/paper/downloadSuppFile/718/16. Accessed Feb 5, 2012.
11. Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. Yeast 2005; 22(14): 1155-1169.
12. Mace ES, Buhariwalla KK, Buhariwalla HK, Croch JH. A high-throughput DNA Extraction protocol for tropical molecular breeding programs. Plant Mol Biol Rep 2003; 21(4): 459-460.
13. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40(1): 41-49.
14. Shokrzadeh M, SaeediSaravi SS, Mirzayi M. Cytotoxic Effects of Ethyl Acetate Extract of Sambucusebulus Compared With Etoposide on Normal and Cancer Cell Lines. Pharmacognosy Magazine 2009; 5(20): 316-319.
15. Qureshi SA, Hira, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. Cytotoxic potential of fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of wild and cultivated plants. Pak J Bot 2011; 43(6): 3025-3028.
16. Dosik GM, Barlogie B, Johnston D, Mellard D, Freireich EJ. Dose-dependent suppression of DNA synthesis in vitro as a predictor of clinical response in adult acute myeloblastic leukemia. Eur J Cancer 1981; 17(5): 549-555.
17. van Haaften RI, Evelo CT, Haenen GR, Bast A. No reduction of alpha-tocopherolquinone by glutathione in rat liver microsomes. Biochem Pharmacol 2001; 61(6): 715-719.
18. Alderden RA, Hall MD, Hambley TW. The Discovery and Development of Cisplatin. J Chem Educ 2006; 83(5): 728-734.
19. Iwahashi H, Kitagawa E, Suzuki Y, Ueda Y, Ishizawa YH, Nobumasa H, et al. Evaluation of toxicity of the mycotoxincitrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. BMC Genomics 2007; 8: 95.

20. Lu ZY, Lin ZJ, Wang WL, Du L, Zhu TJ, Fang YC, et al. Citrinin dimers from the halotolerant fungus Penicilliumcitrinum B-57. J Nat Prod 2008; 71(4): 543-546.
21. Chen L, Liu W, Hu X, Huang K, Wu JL, Zhang QQ. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus Penicilliumcitrinum. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2011; 59(4): 515-517.
22. Du L, Li D, Zhang G, Zhu T, Ai J, Gu Q. Novel carbon-bridged citrinin dimers from a volcano ash-derived fungus Penicilliumcitrinum and their cytotoxic and cell cycle arrest activities. Tetrahedron 2010; 66: 9286-9290.