Research Article

**Nova Biologica Reperta** 8(2): 95-103 (2021)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.2.95

مقاله پژوهشی

**یافته‌های نوین در علوم زیستی**

جلد ۸، شماره ۲، صفحات ۹۵ الی ۱۰۳ (۱۴۰۰)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

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

**مهرداد غیاثوند[۱]، علی مخدومی[۱]، مریم مقدم متین[۲،۱] و جمیل واعظی[۱]**

[۱]گروه زیست شناسی، داتشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ [۲]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 شمال‌شرق ایران، شناسایی ترکیبات ضدسرطانی جدید برای سرکوب این بیماری ضروری است. امروزه اثبات گردیده که تولید بسیاری از متابولیت‌های گیاهی با فعالیت میکروارگانیسم‌های اندوفیت در ارتباط است. در این پژوهش توانمندی باکتری‌های اندوفیت گیاه دارویی افدرا در مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) ارزیابی شد. ۵۴ سویه باکتری اندوفیت (از ۷۴ جدایه اولیه) از دو گیاه دارویی *Ephedra intermedia* و *Ephedra foliata* پس از استریل کردن سطح آن‌ها به‌دست آمد. باکتری‌ها در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) تلقیح و پس از ۷۲ ساعت متابولیت‌های تولید شده با استفاده از کلروفرم استخراج گردید. اثر عصاره خام سویه‌های منتخب بر روی رده سلولی سرطان مری KYSE-30 با آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی گردید. در نهایت سویه مورد نظر با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شد. بر اساس نتایج آزمون MTT سویه A1 دارای فعالیت ضدسرطانی بر روی رده سلولی KYSE-30 با مقادیر $IC_{50}$ برابر با ۳۴۶/۴، ۱۹۲/۸ و ۱۲۱/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بود. بر اساس شناسایی مولکولی، باکتری مذکور به *Microbacterium maritypicum* شباهت داشت. با توجه به توانایی جدایه A1 در مهار تکثیر و زنده مانی KYSE-30 استفاده از ترکیبات طبیعی 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، میکروباکتریوم، همزیستی

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

**Mehrdad Ghiasvand[1], Ali Makhdoumi[1], Maryam Moghaddam Matin[1, 2] & Jamil Vaezi[1]**

[1]Department of biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; [2]Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Correspondent author: Ali Makhdoumi, 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 theses 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 $IC_{50}$ amounts of this strain against KYSE-30 cell lines were equaled (µg/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%

Received 09.07.2020/ Revised 31.08.2020/ Accepted 19.11.2020/ Published 01.07.2021

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۹/ اصلاح: ۱۳۹۹/۰۶/۱۰/ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۹/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۴/۱۰



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]

[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]

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

## مقدمه

سرطان مری با توجه به نرخ مرگ‌ومیر بالا، امروزه یکی از مشکلات جدی پزشکی در جهان بوده و در مجموع هشتمین سرطان رایج و ششمین عامل مرگ‌و میر وابسته به سرطان در کل دنیا محسوب می‌شود (Smyth et al., 2017). این سرطان دارای انواع کارسینومای سلول سنگفرشی 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 به‌دست‌آمده است، میزان بقای ۵ ساله این بیماران حدود ۲۰-۱۵درصد است (Napier et al., 2014). کمربند جغرافیایی سرطان‌های مری و معده از کشور چین تا نواحی شمالی ایران امتداد یافته است، به‌طوری‌که در شمال کشور ایران و در استان گلستان نرخ بروز سرطان مری به ترتیب ۱۰۸/۸ و ۱۷۴/۱ نفر به ازای هر صد هزار نفر مرد و زن گزارش شده است (Aghababaei-Ziarati et al., 2013). علاوه‌بر روش‌های جراحی، شیمی-درمانی با استفاده از داروهایی مانند هرسپتین، کربوپلاتین و ایرینوتکان در درمان سرطان مری به‌کار 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. آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها از جمله مهمترین ترکیبات فعال زیستی جدا شده از گیاهان دارویی هستند (Shweta et al., 2013). ترکیب ضدسرطانی هوموهارینگتونین توسط گیاه سرخدار آلو (*Cephalotaxus 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 است (Yang et al., 2018). به‌علاوه خطر انقراض، گیاهان دارویی یک منطقه را به دنبال برداشت‌های بی‌رویه تهدید می‌کند. به‌عنوان مثال در یک دوره درمان سرطان تخمدان با ترکیب تاکسول نیاز به قطع ۶ درخت ۱۰۰-۶۰ ساله سرخدار 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 جانوارن علف‌خوار به گیاه میزبان خود سود می‌رسانند. در حدود ۸۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی امروزه در دنیا شناخته شده است. این گیاهان هرکدام 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 برخی از این میکروارگانیسم‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه منسوب به گیاهان دارویی به تنهایی و یا در همکاری با گیاه به خوبی نشان داده شده است. کامپتوتسین که برای درمان انواع سرطان‌های پستان، تخمدان و روده به‌کار می‌رود مثالی از ترکیبات ضد-سرطانی تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیت است (Pu et al., 2015; Seca & Pinto, 2018).

افدرا 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 آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها نشان داده شده است (Corina et al., 2019). از این روی در پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیبات ضدسرطانی جدید از باکتری‌های اندوفیت گیاه افدرا، باکتری‌ها جداسازی و توانمندی آن‌ها در مهار تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی سرطان مری KYSE-30 با استفاده از آزمون MTT انجام شد.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]

## مواد و روش‌ها

**جمع آوری گیاه افدرا**

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 نمونه ها به ترتیب ۱۳۰۰۹ و ۱۳۰۰۸ است.

**استریل سطحی نمونه‌های گیاهی**

به منظور استریل کردن سطحی، ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو 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 (ژال تجهیز، ایران) با استفاده از تیغ استریل ساقه‌های گیاهان مورد نظر به قسمت‌های کوچک یک سانتی‌متری برش داده شده و از هاون استریل جهت سابیدن (خورد شدن قطعات گیاهی) استفاده گردید. همچنین به‌منظور 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.

**جداسازی 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 آزما گستر، ایران) به مدت یک ماه نگهداری شدند. کلنی‌های تشکیل‌شده 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 هیدرولازی) 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 براث (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 ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا و به آن حجم مساوی حلال کلروفرم افزوده شد. در نهایت از دستگاه روتاری (Labtech، امریکا) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به منظور تقطیر حلال در شرایط خلأ و استخراج عصاره میکروبی استفاده گردید. عصاره‌های حاصل با کمک فریز درایر (Christ، آلمان) به پودر خشک تبدیل شدند.

**ارزیابی اثرات مهاری سویه های اندوفیت بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE-30)**

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

**کشت رده سلولی سرطان مری KYSE-30**

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 $CO_2$ نگهداری شدند. پس از بررسی روزانه وضعیت رشد سلول‌ها در صورت نیاز محیط کشت ۳-۲ بار در هفته تعویض گردید. سلول‌های رده سلولی KYSE-30 با نسبت ۱:۳ و غلظت ۰/۲۵ درصد تریپسین – EDTA در یک میلی‌مولار پاساژ داده شدند (Shi et al., 2018).

**بررسی اثر ضد سرطانی متابولیت اندوفیت ها**

پس از شمارش سلول‌های KYSE-30 با استفاده از لام نئوبار، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتیگراد با میزان ۵ درصد $CO_2$ 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 سلول‌هایKYSE-30 افزوده شد. از تیمار آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل استفاده شد. زنده‌مانی سلول‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۲۰ 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 طول‌موج ۵۴۰ نانومتر میزان جذب چاهک‌ها اندازه‌گیری و زنده‌مانی سلول‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد (Maheswarappa et al., 2013).

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

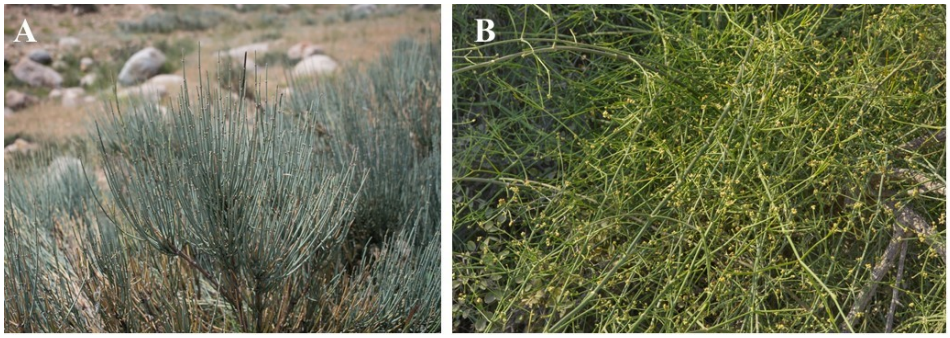
AT = میزان جذب تیمار

AC = میزان جذب کنترل حلال

V= درصد زنده مانی سلول

در انتها با استفاده از نرم‌افزار گرف پد پریسم ۶ مقادیر $IC_{50}$ محاسبه و نمودار نیمه لگاریتمی(دوز-پاسخ) ترسیم شد (Deng et al., 2013).

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]




**شکل ۱**- گیاهان دارویی **A**. افدرا اینترمدیا و **B**. افدرا 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 foliate* collected from Khorassan Razavi Province, Iran -Arefi village. Photo by A.A. Basiri 2017.

**شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت**

شناسایی سویه منتخب با بیشترین سمیت سلولی با روش مولکولی بر مبنای توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. DNA ژنومی با کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استخراج گردید. تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی27F 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 NCBI و Ez-Biocloud مقایسه و ارتباط فیلوژنی آن با سایر باکتری‌های شناخته‌شده 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 افدرا 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**

پس از کشت سویه‌های منتخب، متابولیت‌های 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 ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار را دارد. میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌های KYSE-30، نمودار نیمه لگاریتمی دوز-پاسخ و مقادیر $IC_{50}$ در سه بازه زمانی به ترتیب در جدول ۱، شکل ۴ و جدول ۲ نشان داده شده است.

اثرات ضدسرطانی سویه A1 وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت و همین‌طور زمان مجاورت ترکیب با سلول افزایش یافته است. افزایش زمان به ۷۲ ساعت به‌طور 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 به‌طوری‌که این میزان در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب معادل ۳۴۶/۴، ۱۹۲/۸ و ۱۲۳/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

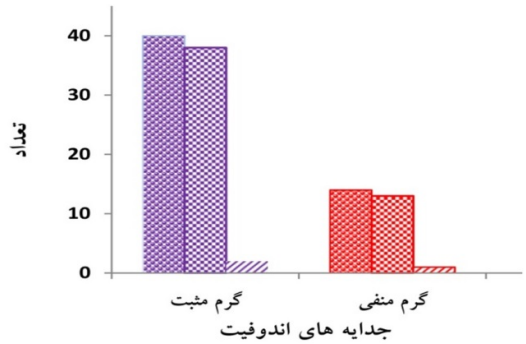
پس از تیمار سلول‌های KYSE-30 با عصاره جدایه A1 تغییرات ریخت‌شناختی این سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس نیز مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول‌ها با عصاره باکتری اندوفیت A1 باعث تغییر شکل آن‌ها از حالت طبیعی و تبدیل آن‌ها به سلول‌های کروی و گرانوله گردید (شکل ۵).

**شناسایی مولکولی سویه A1**

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

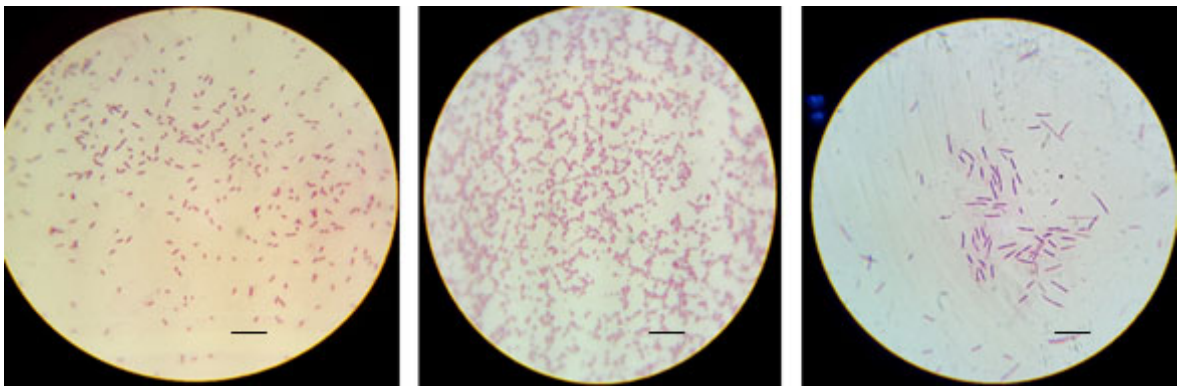


[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]




**شکل ۲**- ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های به‌دست آمده از گیاه افدرا. دایره: کل سویه‌ها، مربع: باکتری‌های میله ای، 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 جداشده از گیاه افدرا. از چپ به راست: کوکوباسیل، کروی و میله‌ای. مقیاس در شکل‌ها معادل ۲ میکرومتر است.

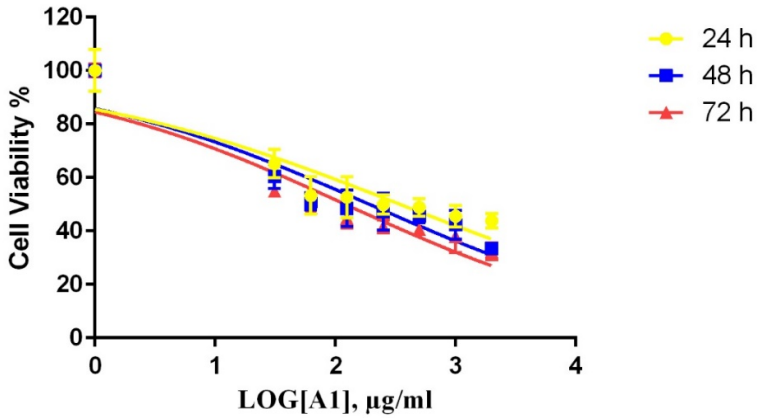
**Figure 3.** Gram-staining microscopic images of some endophytic bacteria isolated from the *Ephedra* plants. From left to right: coccobacillus, coccus and bacillus. Bars, 2 µm.

**جدول ۱**- درصد زنده‌مانی سلول‌های KYSE-30 تیمار شده با عصاره جدایه 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.

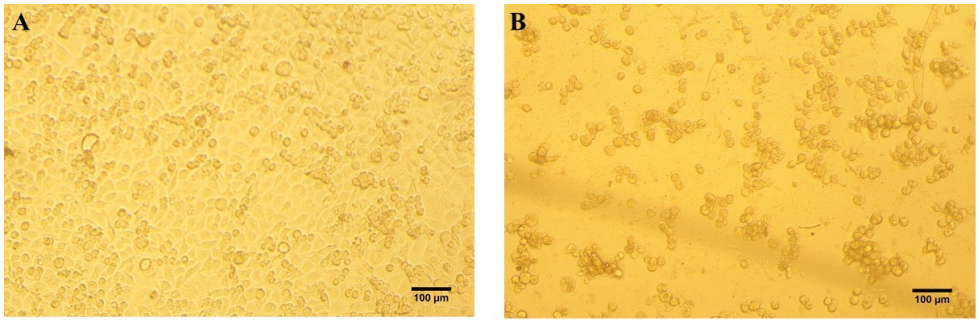
| غلظت (µg/ml) / زنده‌مانی (درصد) | ۲۰۰۰ | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۱۲۵ | ۶۲/۵ | ۳۱/۲۵ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **۲۴ ساعت** | ۴۳/۸ | ۴۵/۵ | ۴۸/۸ | ۴۹/۸ | ۵۲/۶ | ۵۳/۲ | ۶۵/۱ |
| **۴۸ ساعت** | ۳۳/۴ | ۴۲/۳ | ۴۵/۵ | ۴۷/۲ | ۴۸/۴ | ۵۱/۰ | ۶۰/۴ |
| **۷۲ ساعت** | ۳۲/۴ | ۳۸/۰ | ۴۰/۶ | ۴۱/۷ | ۴۴/۸ | ۴۸/۷ | ۵۴/۹ |

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]




**شکل ۴**- نمودار نیمه لگاریتمی دوز-پاسخ سلول‌های رده KYSE-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 هرغلظت به همراه انحراف معیار از میانگین هستند.

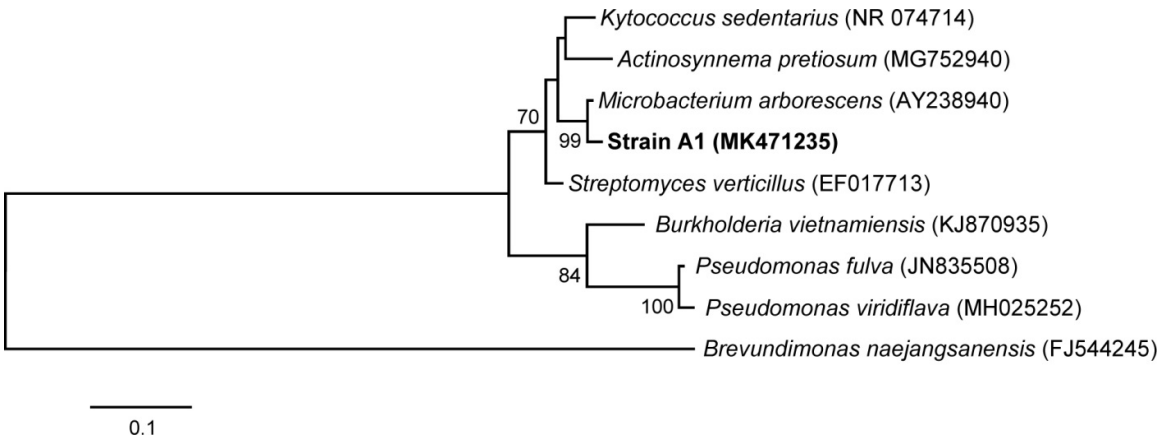
**Figure 4.** Semi-logarithmic dose-response diagram of KYSE-30 cells in different concentrations of A1 strain extract in the time periods of 24, 48 and 72 hours after treatment. Data is an average of three experiments with the standard deviation.




**شکل ۵**- تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های KYSE-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 فیلوژنتیکی سویه A1 بر اساس توالی ژنی 16s rRNA با استفاده از الگوی Neighbour-joining.

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



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]

## بحث

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 به‌عنوان یک منبع جدید برای به‌دست آوردن ترکیبات فعال زیستی مهم مانند ترکیبات ضدسرطانی توجه نمایند. در این پژوهش اثرات ضدسرطانی باکتری اندوفیت *Microbacterium* sp. A1 از گیاه دارویی افدرا نشان داده شد.

استفاده درمانی از گیاه افدرا با نام ماهانگ در طب سنتی چین در درمان تنگی نفس، افت فشار خون و یا بی‌اختیاری ادرار به ۵۰۰۰ سال قبل باز می‌گردد. عمده این اثرات به تولید ترکیبات آلکالوئید در گیاه نسبت داده شده است (Blumenthal & King 1995). در پژوهشی بر روی گونه‌های مختلف افدرا، حضور ترکیبات آلکالوئید، 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 شمال‌شرق 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. به‌عنوان مثال اثرات ضدسرطانی باکتری‌های اندوفیت کرینوم (*Crinum macowanii* Baker) بر روی رده سلولی سرطانی گلیوبلاستوما (U87MG) ارزیابی، و فعالیت مهارکنندگی قابل ملاحظه متابولیت‌های 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). اخیرا محققان توانایی باکتری اندوفیت LY214 جدا شده از درخت شاد (*Camptotheca acuminata* Decne.)، در تولید داروی ضدسرطانی با ارزش کامپتوتسین 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 دیوسژنین، گینکلوئید، هوپرزین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین نیز گزارش شده است.

پژوهش حاضر نیز توانایی باکتری اندوفیت گیاه افدرا در مهار تکثیر رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) را نشان داد.

اکتینوباکترها از جمله میکروارگانیسم‌های بسیار رایج در طبیعت هستند که به‌واسطه 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 اکتینوباکترها به‌دست آمده است. با این وجود عمده این ترکیبات (بیش از ۷۵ درصد) از یک سرده به‌خصوص به نام *Streptomyces* جداسازی شده است. اکتینومیست‌های کمیاب به گروهی از اکتینومیست‌ها گفته می‌شود که نرخ جداسازی آن‌ها از نرخ جداسازی سرده *Streptomyces* کمتر است. از اعضای این گروه می‌توان به سرده‌های *Micromonospora*، *Actinomadura*، *Amycolatopsis* 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 اکتینومیست‌های 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 به‌عنوان یک گزینه جذاب جهت جداسازی باکتری‌های اکتینومیست 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 افدرا، ۵۴ جدایه حاصل شد. بیشترین فراوانی باکتری‌های اندوفیت مربوط به باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت بود. باکتری اندوفیت A1 متعلق به سرده *Microbacterium* به‌عنوان یک نوع از اکتینومیست‌های 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.) (۱۵۰۰۰۰ µg/ml) و رنگدانه باکتری

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]

*Arthrobacter* (۱۳۲۱ µg/ml) در مهار تکثیر رده سلولی KYSE-30 به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر است (Afra et al., 2017; Karimi et al., 2017). بر اساس نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، تولید ترکیبات فعال زیستی توسط میکروارگانیسم‌های اندوفیت گیاه دارویی می‌تواند به‌عنوان 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 سلولی و مولکولی گروه زیست‌شناسی با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد (۳۴۲۹۷/۳) انجام شده است.

## REFERENCES

**Afra, S., Makhdoumi, 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 β-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

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]

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 Shahrekord 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-Okereafor, 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, MH. & 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., Ganeshaiah, 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., Makhdoumi, 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 افدرا. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱۰۳-۹۵.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.2.1.2 ]

[ DOI: 10.52547/nbr.8.2.95 ]