دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۱، صفحه ۱۲۶-۱۱۵ (۱۳۹۴)

تغییر ترکیب محیط کشت به‌عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیکی در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *Linum album* Ky. ex Boiss.

منصور افشار محمدیان[1*]، فرشاد تشکری[2] و مظفر شریفی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، پست الکترونیک: afshar@guilan.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

۳- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲

چکیده

Linum album Ky. ex Boiss.، یکی از گونه‌های انحصاری در ایران است که ترکیب‌های لیگنانی مهمی را ازجمله پودوفیلوتوکسین (PTOX) تولید می‌کند. این ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان به نام‌های تنیپوساید، اتوپوساید و اتوپوفوز می‌باشد. سنتز شیمیایی این ترکیب‌ها بسیار پیچیده است و از نظر تجاری تولید آن مقرون به‌صرفه نیست. در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین از راهبردهای گوناگونی مانند تغییر رژیم غذایی، بکار بردن الیسیتور، مهندسی ژنتیک و غیره استفاده می‌شود. بهینه‌سازی محیط کشت یکی از راهبردهای مهم در افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی است. با توجه به اهمیت زیاد پودوفیلوتوکسین به‌عنوان ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان، در این تحقیق تأثیر نسبت‌های مختلف آمونیوم و نیترات در محیط کشت بر رشد سلول‌ها و برخی متابولیت‌های ثانویه ازجمله تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیت آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) بررسی شد. میزان رشد سلول‌ها در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم نسبت به تیمارهای دیگر افزایش معنی‌داری داشت. بیشترین میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوییدی در نمونه کنترل بدست آمد که کمترین میزان وزن تر را داشت و بیشترین مقدار فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیوم به نیترات مشاهده شد. بیشترین میزان سنتز پودوفیلوتوکسین در نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات ایجاد شد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL به‌ترتیب در سه نمونه ۲:۱ و ۳:۱ نیترات به آمونیوم و ۳:۱ آمونیوم به نیترات ایجاد شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییر ترکیب محیط کشت یک فاکتور مؤثر در افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های *L. album* بود.

واژه‌های کلیدی: نیتروژن، پودوفیلوتوکسین، *Linum album* Ky. ex Boiss.، کشت سلول، ضدسرطان.

مقدمه

سرده *Linum*، از خانواده Linaceae، دارای ۲۳۰ گونه است که در سراسر جهان و در محدوده وسیع و متنوعی از زیستگاه‌ها وجود دارد (Kartal *et al.*, 2004). طبقه‌بندی بین‌گونه‌ای جنس *Linum* از طریق تفاوت‌های مورفولوژیکی، سیتولوژیکی و ویژگی‌های بیوشیمیایی صورت می‌گیرد. پودوفیلوتوکسین (PTOX) یکی از ترکیب‌های لیگنانی است که اولین بار از *Podophyllum peltatum* در سال ۱۸۸۰ جداسازی شد. دو گونه از جنس *Podophyllum* شامل *P. hexandrum* در هند و نپال و

P. peltatum در آمریکا منبع تجاری پودوفیلوتوکسین هستند (Stahelin & Wartburg, 1991). تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن گیاهانی که دارای محتوی لیگنانی بالا بوده و نیز از سرعت رشد خوبی برخوردار باشند، انجام شد و نشان داده شد که خانواده Linaceae، به‌خصوص گونه‌های *Linum* متعلق به گروه Syllinum از مقدار قابل‌توجهی پودوفیلوتوکسین برخوردارند و احتمالاً منبع مناسبی برای تولید این ترکیب‌ها می‌باشند (Fuss, 2003). پودوفیلوتوکسین در میان لیگنان‌ها به این علت که خود دارای خاصیت سلول‌کشی و ضدویروسی بسیار بالایی است و در درمان تومورها و زگیل‌های تناسلی به‌صورت موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد و همین‌طور پیش‌سازی برای تولید سه ماده ضدسرطان مهم به‌نام‌های etoposide، teniposide و etopophose (etoposide phosphate) می‌باشد (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012؛ Yong *et al.*, 2009)، مورد توجه زیادی قرار گرفته است و به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این لیگنان به علت سمّیت سلولی بسیار بالایی که از خود نشان می‌دهد، به طور مستقیم و سیستمیک استفاده نمی‌شود، زیرا باعث مرگ ارگانیسم زنده می‌شود، به همین دلیل مشتقات آن تغییر در رژیم غذایی به‌عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیکی در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *L. album* مورد استفاده قرار می‌گیرند که در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان و تومورهای مغزی مصرف می‌شوند (Kumar *et al.*, 2011؛ Farkya *et al.*, 2004). برخلاف پودوفیلوتوکسین که از طریق اتصال به دایمرهای توبولینی و تشکیل کمپلکس پودوفیلوتوکسین–دایمر توبولین باعث جلوگیری از پلیمریزاسیون دایمرهای آلفا و بتا و تخریب اسکلت سلولی می‌شود، ترکیب های ضدسرطانی مشتق از آن با اتصال به آنزیم توپوایزومراز II مانع از باز شدن پیچ DNA و جلوگیری از همانندسازی مولکول DNA می‌شوند (Farkya *et al.*, 2004). مهندسی مسیرهای متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول به‌وسیله تغییر پارامترهای محیط کشت در جهت بهینه سازی تولید متابولیت مورد نظر ازجمله راهبردهای مهم در این تکنیک است. این تغییرات شامل ایجاد تغییر در منبع کربن (سوکروز)، منبع نیتروژن، فیتوهورمون ها (کینتین، نفتالن استیک اسید) و اسیدیته محیط می‌باشند. مثلاً تغییر در منبع نیتروژن، هم می تواند شامل تغییر در غلظت نیتروژن کل و هم تغییر در نسبت های آمونیوم به نیترات در یک غلظت یکسان باشد. کشت گیاهان در شیشه ممکن است چندین مزیت نسبت به جمع آوری و کشت گیاهان در مزرعه داشته باشد. در کشت بافت می‌توان متابولیت‌هایی مانند لیگنان‌ها را مستقل از فاکتورهایی مثل آب و هوا و شرایط جغرافیایی تولید نمود (Fuss, 2003). همچنین کشت سلول، سیستم تولیدی مشخص با ذخایر مستمر و کیفیت یکنواخت از محصول را ارائه می‌دهد. به‌علاوه اینکه گیاهان تولید شده در سیستم کشت بافت، عاری از هر گونه آلودگی میکروبی و قارچ هستند (Verpoorte *et al.*, 2002).

با توجه به اهمیت قابل‌توجه تولید پودوفیلوتوکسین به‌عنوان ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان و در عین حال تحقیقات کمی که متأسفانه در این مورد انجام شده است، هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف منابع نیتروژنی در محیط کشت بر رشد سلول‌ها و برخی متابولیت‌های ثانویه ازجمله تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیت آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در گیاه *L. album* بود.

مواد و روشها

محیط کشت کالوس

برای انجام آزمایش‌های کشت سلول *L. album*، از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با هورمون‌های نفتالین استیک اسید ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر و کینتین ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی

بذرهای *L. album* از منطقه سوهانک (N ۱۹ ´۴۸ °۳۵، E ″۲۲ ´۳۲ °۵۱) تهران جمع‌آوری شد و پس از شستشوی سطحی با آب به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم

۱٪ قرار گرفتند. سپس ۳ بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند و به دنبال آن ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳٪ قرار داده شدند. مجدداً ۳ بار با آب سترون شستشو شدند و در مرحله آخر ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند و با آب مقطر سترون آبکشی شدند. بذرهای سترون به‌مدت یک ساعت در محلول ۰/۵ گرم در لیتر جیبرلین (Hasanloo *et al.*, 2008) قرار گرفتند و بعد در محیط پایه MS فاقد هر گونه هورمون، کشت داده شدند. بذرها مدت دو هفته در دمای ۳۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (فتوپریود) قرار گرفتند و گیاهچه‌های حاصل برای تشکیل کالوس استفاده شدند.

تکثیر جوانه و تولید کالوس

به‌منظور تکثیر گیاه، بعد از جوانه‌زنی بذرها در محیط MS، بخش ساقه حاصل از بذرها به‌صورت قطعاتی با اندازه‌های یکسان جدا شدند و مجدداً از سمت قاعده در محیط کشت MS وارد شدند. با رشد قطعات جدید، عمل تکثیر قطعات جداکشت، هر ۴ هفته یکبار انجام شد. قطعات یک سانتی‌متری از اندام هوایی (ساقه همراه با برگ) گیاهچه‌ها به‌طور یکسان تهیه شد و در هر ظرف پتری حاوی محیط کشت جامد تعداد سه قطعه قرار داده شد. جداکشت‌ها به‌مدت چهار هفته در فیتوترون در تاریکی قرار داده شدند تا کالوس تشکیل شود.

منحنی رشد

بدست آوردن منحنی رشد سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا از چگونگی روند رشد و زنده بودن سلول‌های *L. album* در محیط کشت اطلاع دقیقی حاصل شود تا بدانیم در چه زمانی باید این سلول‌ها را تحت تیمار قرار داده و در چه زمانی آنها را از محیط برداشت کنیم. برای بدست آوردن دوره رشد سلول‌های *L. album* به‌ترتیب در روزهای ۲، ۴، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ از دوره رشد سلول، سلول‌ها را به‌وسیله قیف بوخنر و دستگاه مکش برداشت کرده و آنها را وزن و بعد منحنی رشد سلول‌ها تعیین شد.

همگن‌سازی سلول‌ها

به‌منظور همگن‌سازی، سلول‌های حاصل را به محیط‌های کشت جدید انتقال داده تا پس از ۹ بار واکشت (هر ۱۰ روز یک‌بار)، برای تیمار آماده‌سازی شوند.

تیمار سلول‌ها

با توجه به اینکه در این آزمایش از تیمار تغذیه‌ای نیتروژن استفاده شد، بنابراین در درست کردن محیط کشت از تمامی محلول‌های پایه MS به غیر از پایه ماکرو استفاده شد و عناصر ماکرو NH_4NO_3 و KNO_3 را طبق جدول ۱ به‌صورت جداگانه وزن و از آن برای تهیه محلول کشت استفاده شد. پس از درست کردن محلول‌های تیمار طبق جدول ۱، سلول‌های جمع‌آوری شده از محیط قبلی به این محیط (در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً سترون) واکشت شدند. پس از انجام واکشت، ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۲۰rpm، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به‌مدت ۱۱ روز تحت تیمار قرار گرفتند. آنگاه سلول‌ها را به‌وسیله دستگاه مکش برداشت کرده و درون تانک نیتروژن مایع ریخته و در نهایت در فریزر با دمای ۸۰°C– نگهداری شدند تا برای آنالیز و استخراج نمونه‌ها از آنها استفاده شود.

جدول ۱– محیط‌های کشت MS با نسبت‌های متفاوت از آمونیوم/ نیترات

NH_4CL/KNO_3 (ml)	Nitrogen total concentration	$NH_4:NO_3$ ratio
5/5	30/30	1:1
6.7/3.35	40/20	2:1
2.5/7.5	45/15	3:1
3.35/6.7	20/40	1:2
7.5/2.5	15/45	1:3

اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها (FW)

پس از ۱۱ روز تیمار، سلول‌ها را به‌وسیله قیف بوخنر، نایلون مش و پمپ خلأ برداشت کرده و هر کدام از نمونه‌ها

را قبل از گذاشتن در تانک نیتروژن مایع به سرعت با ترازوی دیجیتال وزن کرده و وزن تر آنها ثبت گردید.

استخراج پودوفیلوتوکسین

استخراج به روش ذکر شده توسط Koulman و Konuklugil (۲۰۰۴) بشرح زیر انجام شد:

۲ گرم از سلول‌های حاصل از هر تکرار در ۴ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ ساییده شد تا به‌صورت همگن درآمد. مخلوط حاصل در فالکون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به‌مدت ۱تا ۱/۵ ساعت در حمام فوق صوت (اولتراسونیک) قرار گرفتند. در ادامه ۴ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید، پس از سانتریفوژ با ۷۵۰۰ دور، به‌مدت ۱۰دقیقه، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۳ فاز کاملاً از هم جدا شد. فاز زیرین توسط سمپلر برداشته شد و به‌وسیله هوادهی کاملاً خشک شده و پس از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر متانول، در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به‌مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۳۵۰۰rpm سانتریفوژ شدند. بخش رویی نمونه‌ها برای سنجش پودوفیلوتوکسین توسط دستگاه HPLC (در طول موج۲۹۰ نانومتر) استفاده شدند.

سنجش فنل کل، فلاونویید، فلاونول، پروتئین و فعالیت آنزیم PAL

روش استخراج و سنجش فنل کل

۰/۵ گرم از سلول‌های *L. album* را در ۸ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به خوبی ساییده تا هموژن شود، عصاره متانولی یک ساعت در سونیکاتور سونیکیت شد، نمونه‌ها را در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده (روش استخراج فلاونویید و فلاونول نیز تا این مرحله یکسان است)، از هر نمونه ۳ میلی‌لیتر برداشته و خشک شد، نمونه‌های خشک شده را در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل کرده، ۲ میلی‌لیتر از معرف فولین دنیس به آن اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ به آن افزوده شد و بعد از ۱۵ دقیقه به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب نمونه‌ها، در طول موج ۷۰۰ نانومتر سنجیده شد.

روش استخراج و سنجش فلاونوییدها

از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی برداشته، سپس ۲۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ به همراه ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار به این عصاره متانولی اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها به‌وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش استخراج و سنجش فلاونول کل

از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی برداشته، ۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ به همراه ۳ میلی‌لیتر محلول سدیم استات ۵٪ به این عصاره متانولی اضافه و جذب نمونه‌ها پس از ۲/۵ ساعت در طول موج ۴۴۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفوتومتر سنجش شد.

روش استخراج پروتئین

۰/۲ گرم از سلول‌های *L. album* در ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH=۸)، دارای ۱۴ میکرولیتر مرکاپتو اتانل کاملاً سائیده شد تا به حالت هموژن درآید. مخلوط همگن حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت به‌وسیله سمپلر جدا و برای سنجش غلظت پروتئین و نیز فعالیت آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت.

روش سنجش فعالیت آنزیم PAL

به منظور سنجیدن فعالیت آنزیمی از روش Garden و Alfermann (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات استفاده شد. در یک لوله آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنیل‌آلانین ۰/۱ مولار در بافر پتاسیم فسفات (pH=۸)، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده و ۶۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات بافر ۰/۱ مولار (pH=۸) اضافه شد و نمونه شاهد تمام ترکیب ها بجز پروتئین استخراج شده را شامل می‌شد. نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl (۶M) برای غیرفعال کردن

آنزیم به نمونه ها اضافه شد. شستشو با ۳ میلی لیتر اتیل استات در ۳ مرحله انجام شد. سپس نمونه ها خشک و به رسوب ۱ میلی لیتر از NaOH (۰/۰۵M) اضافه شد و محلول در طول موج ۲۹۰nm با اسپکتروفتومتر قرائت شد. به منظور بدست آوردن فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیمی، منحنی استاندارد سینامیک اسید رسم شد. در نمونه های مجهول نیز براساس مقادیر جذب حاصل از نمونه ها و منحنی استاندارد، مقدار سینامیک اسید تولید شده در مدت یک دقیقه محاسبه شد. از آنجایی‌که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که در طی یک دقیقه، یک میکرومول محصول را تولید می‌کند، بنابراین فعالیت آنزیم را بر حسب واحد آنزیمی با µmol /min cinamic acid و فعالیت ویژه آنزیم به‌صورت mg µmol cinamic acid/protein/min بیان شد.

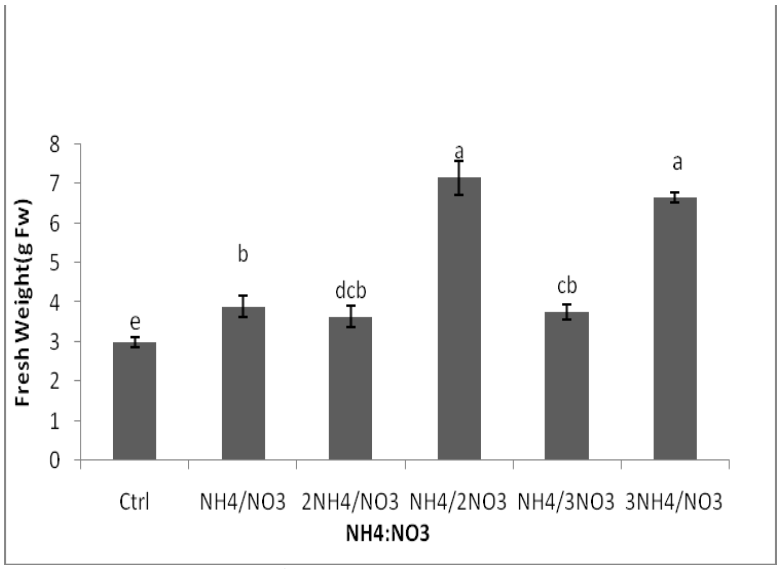
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

اثر نسبت‌های مختلف نیترات/آمونیوم بر روی رشد سلولی (وزن تر)

بیشترین وزن تر سلول‌ها، در نسبت‌های ۲:۱ نیترات به آمونیوم به میزان ۷/۱۶ گرم و ۳:۱ آمونیوم به نیترات به میزان ۶/۷۴ گرم در تاریکی ایجاد شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. کمترین میزان رشد سلول‌ها هم در نمونه کنترل به میزان ۳ گرم مشاهده شد (شکل ۱).

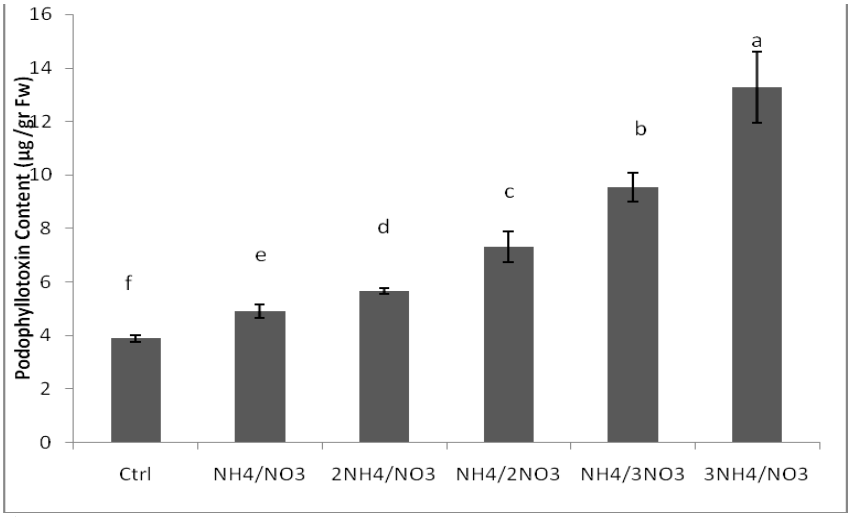


شکل ۱- تغییرات وزن تر سلول‌ها در حضور نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم در مدت زمان ۱۱ روز تیمار در تاریکی

(حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین وزن سلول‌ها در سطح $p\leq0.05$ است.)

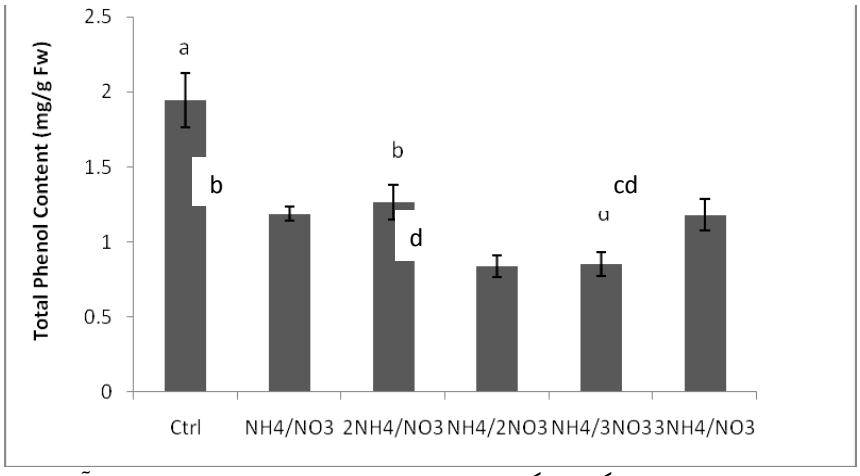
اثر نسبت‌های مختلف نیترات/آمونیوم بر روی بیوسنتز پودوفیلوتوکسین

بیشترین مقدار تولید پودوفیلوتوکسین در کشت *L. album*، در نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات، به میزان ۱۳/۳ میکروگرم بر گرم وزن تر بود و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیوم هم بعد از این تیمار بیشترین میزان (۹/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) را نشان داد. در حالی‌که میزان پودوفیلوتوکسین در کشت کنترل، ۳/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین (میکروگرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است.)



شکل ۳- تغییرات میزان تولید فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

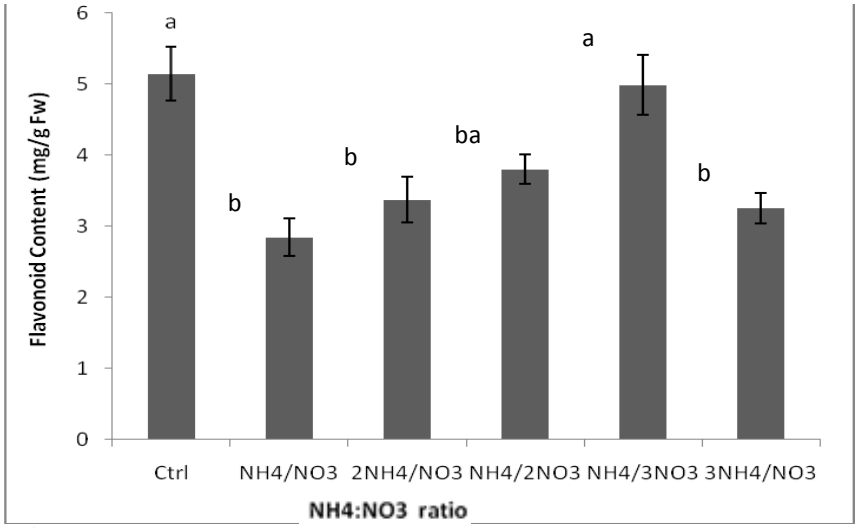
(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است.)

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فنل کل

بالاترین میزان تولید فنل متعلق به نمونه کنترل به میزان ۱/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. کمترین میزان فنل هم در تیمار شماره ۳ یعنی نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم به میزان ۰/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۳).

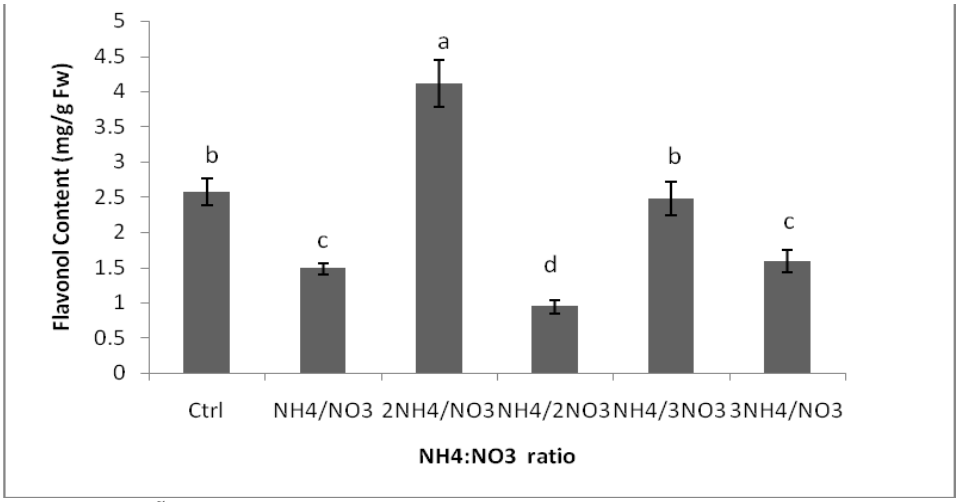
اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فلاونوییدها

بیشترین میزان فلاونویید در نمونه کنترل به میزان ۵/۱۴ میلی گرم بر گرم وزن تر و نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیوم به میزان ۴/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن تر ایجاد شد و با سایر تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۴).



شکل ۴- تغییرات میزان تولید فلاونویید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است.)



شکل ۵- تغییرات میزان فلاونول (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است.)

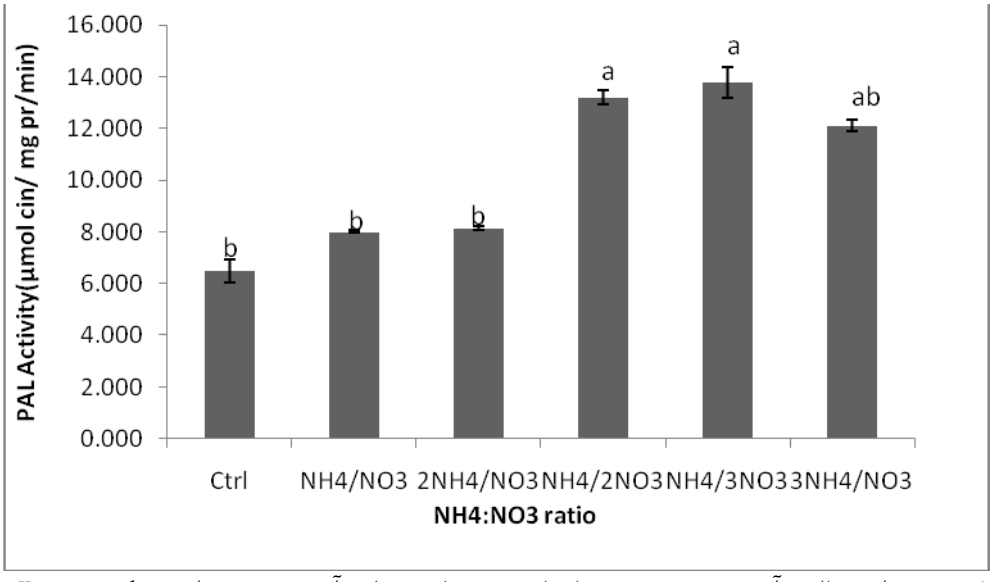
اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فلاونول کل

بیشترین مقدار فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیوم به نیترات به مقدار ۴/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. کمترین میزان فلاونول نیز در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم به مقدار ۰/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر دیده شد (شکل ۵).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم روی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

با توجه به نقش کلیدی آنزیم PAL در ابتدای مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و ارتباط مؤثر و مثبت این آنزیم با میزان تولید این ترکیب‌های سلولی، میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های *L. album* مورد

سنجش قرار گرفت. تیمارها باعث تغییر در فعالیت آنزیم PAL شدند (شکل ۶). بیشترین میزان فعالیت در سه نمونه (۱:۲) ۳، (۱:۳) ۴ و (۳:۱) ۵ مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت هم در تیمارهای کنترل (۱:۱) ۱ و (۲:۱) ۲ مشاهده شد. این تغییرات در فعالیت آنزیم کاملاً با روند تغییرات در میزان تجمع و تولید پودوفیلوتوکسین مطابقت دارد.



شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم PAL تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است.)

بحث

تولید پودوفیلوتوکسین

از آنجایی که متابولیت‌های ثانویه برای هر گونه گیاهی ممکن است مختص آن گیاه باشد، بنابراین راهکارهایی که برای بهینه‌سازی محیط و شرایط کشت برای رشد سلول و افزایش تولید متابولیت ثانویه بکار می‌رود، باید براساس خصوصیات رشد و نموی آن گیاه صورت بگیرد (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al.*, 2011). برای سلول‌های مختلف گیاهی، محیط‌های مناسب گوناگونی برای کشت موجود است، بنابراین هیچ محیط ثابتی برای کشت کلیه سلول‌ها وجود ندارد. از این‌رو در تحقیقی که به‌وسیله Chattopadhyay و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد، سلول‌های *Podophyllum hexandrum* در محیط‌های B5، Eriksson، MS، Nitsch، Stree و White کشت شدند و در نهایت بهترین محیط از نظر رشد و مقدار ماده ضدسرطان پودوفیلوتوکسین محیط MS بود. بیشترین میزان وزن خشک بدست آمده در محیط MS و به میزان ۸/۳ گرم بر لیتر و کمترین میزان وزن خشک در محیط White و به مقدار ۴/۵ گرم بر لیتر گزارش شد.

تغییر در منبع نیتروژن، هم شامل تغییر در غلظت نیتروژن کل و هم شامل تغییر در نسبت‌های نیترات و آمونیوم می‌تواند باشد. البته تغییر در منبع نیتروژن می‌تواند شامل تغییر در نمک‌های نیترات و آمونیوم هم باشد. در تحقیقی اثر تغییر در غلظت نیتروژن کل روی رشد و میزان پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *Podophyllum hexandrum* بررسی شد. غلظت‌های مختلف به‌ترتیب ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار از نیتروژن کل بود. در این میان، بیشترین وزن خشک در غلظت ۳۰ میلی‌مولار و بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت ۶۰ میلی‌مولار تولید شد (Chattopadhyay *et al.*, 2003). در پژوهش

حاضر که از غلظت ۶۰ میلی‌مولار نیتروژن کل در کشت کنترل و تیمار استفاده شده بود، بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین تولید شده در کشت با نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات (۱۳/۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) بود، در حالی‌که میزان پودوفیلوتوکسین در کشت کنترل، ۳/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر بود.

همچنین تحقیق Chattopadhyay و همکاران (۲۰۰۳)، بر روی رشد سلولی و محتوای پودوفیلوتوکسین نشان داد که در نسبت ۱:۲ آمونیوم به نیترات بیشترین رشد سلولی و محتوای پودوفیلوتوکسین ایجاد می‌شود. کمترین میزان رشد و پودوفیلوتوکسین در نسبت ۱:۰ آمونیوم به نیترات مشاهده شد. در تحقیق حاضر، بیشترین میزان رشد سلولی در نسبت ۱:۲ آمونیوم به نیترات (۷/۱۶ گرم وزن تر) بدست آمد، یعنی زمانی که نیترات دو برابر آمونیوم در دسترس سلول‌ها قرار بگیرد، رشد سلولی به بالاترین مقدار خود می‌رسد. از طرفی کمترین میزان رشد نیز در نمونه کنترل به مقدار ۳ گرم وزن تر بدست آمد. نسبت ۱:۱ آمونیوم/نیترات هم بعد از کنترل کمترین میزان رشد سلولی را دارا بود. بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات بود. نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیوم بعد از نسبت ذکر شده بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین را تولید کرد. از این نتیجه می‌توان به این رابطه رسید که وقتی از تیمار ۳ به ۱ استفاده می‌شود، نسبت ۳ برابر آمونیوم نتیجه بهتری می‌دهد و میزان متابولیت مورد نظر بیشتر است. نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم از نسبت ۲:۱ و نسبت ۱:۱ آمونیوم به نیترات و همین‌طور نمونه کنترل بیشتر است. این نتیجه، نتایج تحقیق قبلی را در این مورد تأیید می‌کند.

تولید فنل کل

براساس نتایج حاصل از تحقیق Duke و Hoagland (۱۹۷۸)، میزان بیوسنتز و تجمع ترکیب‌های فنلی در سلول‌ها با میزان رشد سلول‌ها نسبت عکس دارد و هر چه میزان این ترکیب‌ها بیشتر باشد، میزان فعالیت آنزیم PAL هم بیشتر خواهد بود. در تحقیقی که توسط یوسف‌زادی (۱۳۹۰) انجام شد، میزان ترکیب‌های فنلی (فنل کل، فلاونوئید و فلاونول) سلول‌های گیاه *L. album* تحت تیمار الیسیتور سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فنل کل در ۲۴ ساعت اولیه بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید دیده شد.

در تحقیق حاضر، بیشترین میزان فنل کل در نسبت کنترل (۱/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد و کمترین میزان آن در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم (۰/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. بیشترین مقدار وزن تر و رشد سلولی در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم و کمترین میزان رشد در نسبت کنترل مشاهده شد، بنابراین می‌توان گفت بین رشد و مقدار سنتز و تجمع فنل در سلول رابطه معکوس وجود دارد. این نتیجه، نتایج تحقیق قبلی را تأیید می‌کند. طبق نتایج تحقیق حاضر، میزان استفاده از آمونیوم با میزان تولید و تجمع فنل در سلول ارتباط مستقیمی دارد، به این معنا که هر چه نسبت آمونیوم به نیترات زیادتر شود، به همان اندازه میزان فنل هم افزایش می‌یابد و بعکس.

تولید فلاونوئید

براساس تحقیقات پایان‌نامه یوسف‌زادی (۱۳۹۰) بر روی تغییرات میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی گیاه *L. album* تحت تیمار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان فلاونوئید در ۷۲ ساعت بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید در سلول‌ها مشاهده شد. در تحقیق حاضر با توجه به نتایج آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فلاونوئیدها می‌توان به رابطه مستقیم بین استفاده از نیترات و میزان بیوسنتز و تجمع فلاونوئیدها اشاره کرد. به‌نحوی که هر چه نسبت نیترات به آمونیوم بالاتر برود، به همان اندازه میزان فلاونوئیدها در سلول بالا می‌رود و بعکس.

تولید فلاونول

براساس نتایج حاصل از تحقیق یوسف‌زادی (۱۳۹۰) بر روی میزان تغییرات فلاونول سلول‌های *L. album* تحت تیمار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان فلاونول سلول‌ها در ۷۲ ساعت بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در پژوهش حاضر، بیشترین میزان تولید و

تجمع فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیوم به نیترات (۴/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان آن در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم (۰/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. همانند فنل کل در اینجا هم کمترین میزان مربوط به نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم است که بیشترین وزن تر را دارا بود. در بررسی فنل و فلاونوئید، بیشترین میزان این ترکیب‌ها در نمونه کنترل بدست آمد که کمترین وزن تر را دارا بود. در مورد فنل و فلاونول هم کمترین میزان ترکیب‌ها در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم بدست آمد که دارای بیشترین وزن تر بود. این نتیجه هم نتایج تحقیقات قبلی را در مورد وجود رابطه معکوس بین تجمع ترکیب‌های فنلی و رشد سلولی تأیید می‌کند.

فعالیت آنزیم PAL

آنزیم PAL یکی از مهمترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیب‌های فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر بیوسنتزی این ترکیب‌ها به‌شمار می‌رود (Dixon & Paiva, 1995). یکی از دلایل مهم برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL، نقش این آنزیم و ارتباطی است که این آنزیم با متابولیسم اولیه و ثانویه دارد. آنزیم PAL اسید آمینه آروماتیک فنیل‌آلانین را با حذف گروه آمین به ترانس سینامیک اسید تبدیل کرده و به‌عنوان پلی بین متابولیت‌های اولیه و ثانویه عمل می‌کند (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر با توجه به اینکه سلول‌ها تحت تیمار آمونیوم/ نیترات قرار داشت و گمان می‌رفت که این تیمار در روند سنتز فنیل‌آلانین تغییراتی را بوجود می‌آورد، فعالیت آنزیم کلیدی PAL اندازه‌گیری شد. از طرف دیگر این آنزیم در سنتز ترکیب‌های فنلی ازجمله فنیل پروپانوئیدها هم نقش مؤثر و کلیدی ایفا می‌کند. براساس تحقیقی، مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم PAL در ساعت اول پس از تیمار متیل جاسمونات تغییری نداشته است، اما پس از ۶ ساعت فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد. پس از ۱۲ ساعت میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد، به‌طوری که شاهد و تیمار تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند. مجدداً فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت افزایش می‌یابد و پس از ۴۸ ساعت فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد و پس از ۷۲ ساعت فعالیت آنزیم مجدداً افزایش می‌یابد (فخاری، ۱۳۸۹). براساس تحقیقی دیگر مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم PAL در ۲۴ ساعت اولیه تیمار توسط سالیسیلیک اسید به بیشترین مقدار خود خواهد رسید، سپس این میزان، بتدریج در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تیمار کاهش خواهد یافت (یوسف‌زادی، ۱۳۹۰). در تحقیق حاضر از روش دوره‌های زمانی مختلف (Time course) برای سنجش متابولیت‌ها یا فعالیت آنزیم استفاده نشد، زیرا هدف بدست آوردن محیط بهینه برای رشد و تولید متابولیت بوده‌است، بنابراین سلول‌ها باید تا موقع برداشت در این محیط رشد داده شوند. از طرفی، تیمار تغذیه‌ای به‌عنوان یک الیسیتور یا استرس ناگهانی برای سلول‌ها محسوب می‌شود و به‌طور ناگهانی رشد یا تولید متابولیت را افزایش یا کاهش نمی‌دهد، به همین دلیل است که سلول‌ها را اصولاً از روز اول کشت، تحت تأثیر الیسیتور قرار نمی‌دهند، ولی در مورد تیمار نیترات/آمونیوم، سلول‌ها از روز اول در این محیط قرار دارند و تحت این شرایط تا روز برداشت رشد می‌کنند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم با تیمار تغذیه‌ای نیترات/آمونیوم در این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم PAL با میزان سنتز و تجمع پودوفیلوتوکسین رابطه مثبتی دارد. سه نسبت ۲:۱ و ۳:۱ نیترات به آمونیوم و ۳:۱ آمونیوم به نیترات، بیشترین میزان فعالیت آنزیم را نشان داد. این سه تیمار بیشترین میزان تولید و تجمع پودوفیلوتوکسین را هم نشان دادند. نمونه کنترل و دو تیمار ۱:۱ و ۲:۱ آمونیوم به نیترات کمترین میزان فعالیت آنزیم و نیز کمترین میزان تولید پودوفیلوتوکسین را داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل افزایش یا کاهش میزان این متابولیت ثانویه، تغییر در فعالیت و عملکرد آنزیم PAL است. همچنین می‌توان گفت، شاید تغییر نسبت‌های آمونیوم و نیترات و همچنین تغییر منبع نیتروژن و استفاده از نمک NH_4CL به جای NH_4NO_3 باعث تغییراتی در میزان

سنتز آمینواسید آروماتیک فنیل آلانین شده و احتمالاً همین امر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز را دستخوش تغییر کرده‌است. در نهایت، با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که تغییر ترکیب محیط کشت، یک فاکتور مؤثر در افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های *L. album* است.

منابع مورد استفاده

- فخاری، ص.، ۱۳۸۹. بررسی تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین در پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و متیل جاسمونات در کشت کالوس و گیاهچه *Linum album*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- یوسف‌زادی، م.، ۱۳۹۰. بررسی اثر تیروزین، تریپتوفان، نور و سالیسیلیک اسید بر میزان پودوفیلوتوکسین، فعالیت آنزیمی و بیان ژن برخی از آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین در گیاه *Linum album*. پایان‌نامه دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- Chattopadhyay, S., Mehra, R.S., Srivastava, A.K., Bhojwani, S.S. and Bisaria, V.S., 2003. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(5): 541-546.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell, 7(7): 1085-1097.
- Duke, S.O. and Hoagland, R.E., 1978. Effects of glyphosate on metabolism phenolic compounds induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark- grown maize roots. Plant Science Letters, 11(3-4): 185-190.
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaei, N., Murata, J., Yamagaki, T. and Satake, H., 2011. Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnology Report, 5(4): 367-373.
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Behmaneshb, M., Safaei, N., Murata, J., Arakid, R., Yamagaki, T. and Satake, H., 2012. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. Journal of Plant Physiology, 169(5): 487-491.
- Farkya, S., Bisaria, V.S. and Sirvastava, A.K., 2004. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(5): 504-519.
- Fuss, E., 2003. Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. Phytochemistry Reviews, 2(3): 307-320.
- Garden, H. and Alfermann, A.W., 2003. Influence of oxygen supply and medium composition on the production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures in an airlift-bioreactor. International Meeting Phytochemistry and Biology of Lignans, Bornheim-Walberberg, Germany, Dusseldorf, 6-9 April: 28.
- Hasanloo, T., Khavari-Nejad, R.A., Majidi, E. and Shams Ardakani, M.R., 2008. Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybum marianum*. Pharmaceutical Biology, 46(12): 876-882.
- Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. and Alfermann, A.W., 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35(3): 441-447.
- Koulman, A. and Konuklugil, B., 2004. Lignan profile of *Linum meletonis*. Biochemical Systematics and Ecology, 32: 91-93.
- Kumar, A., Kumar, V., Alegria, A.E. and Malhotra, S.V., 2011. Synthetic and application perspectives of azapodophyllotoxins: alternative scaffolds of podophyllotoxin. Current Medicinal Chemistry, 18(25): 3853-3870.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Rojas-Sepúlveda, A.M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M.Y.A., Salas-Vidal, E., Marquina, S., Villarreal, M.L., Puebla, A.M., Delgado, J.I. and Alvarez, L., 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. Molecules, 17(8): 9506-9519.
- Stahelin, H.F. and Wartburg, A.V., 1991. The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide. Cancer Research, 51: 5-15.
- Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1: 13-25.
- Yong, Y., Shin, S.Y., Lee Y.H. and Lim, Y., 2009. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from Anthriscus sylvestris: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 19(15): 4367-4371.

Feeding as a biotechnological approach for improvement of podophyllotoxin production in *Linum album* Ky. ex Boiss. cell culture

M. Afshar Mohammadian[1*], F. Tashakori[2] and M. Sharifi[3]

1*- Corresponding author, Department of Plant Sciences, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran
E-mail: afshar@guilan.ac.ir
2- Department of Plant Sciences, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran
3- Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: January 2013 Revised: August 2013 Accepted: August 2013

Abstract

Linum album Ky. ex Boiss., one of the endemic species in Iran, produces lignans such as podophyllotoxin (PTOX). This compound is precursor for three important anticancer drugs including etoposide, teniposide and etopophose. Chemical synthesis of these compounds is very complicated and this process is not economical. Improvement of PTOX production is possible by different strategies such as feeding, elicitation, genetic engineering, etc. Medium optimization is one of the strategies for increasing the production of secondary metabolites in cell culture. Regarding the remarkable value of PTOX as a precursor for three important anticancer drugs, in this study, the effect of different ratios of NH_4^+/NO_3^- in MS medium on cell growth and some of the of secondary metabolites including PTOX biosynthesis and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity were investigated. Results indicated that the cell growth was significantly increased when treated with 2:1 ratio of NO_3/NH_4^+. The most phenolic and flavonoid content was obtained in control culture, having minimum biomass production. The 2:1 ratio of NH_4^+/NO_3^- resulted in highest production of flavonols. The highest production of PTOX was achieved by 3:1 ratio of NH_4^+/NO_3^-. Meanwhile, the highest PAL activity was observed in 2:1 and 3:1 ratio of NO_3/NH_4^+ and 3:1 ratio of NH_4^+/NO_3^-, respectively. Therefore, it can be concluded that changing nutrient diet is an effective factor increasing the secondary metabolites in *L. album*.

Keywords: Nitrogen, podophyllotoxin, *Linum album* Ky. ex Boiss., cell culture, anticancer.