مجلة جامعة النهرين المجلد ١٧ العدد(٣) أيلول، ٢٠١٤ ص ٣٤-٤٠
العلوم

تأثير المستخلص المائي للأجزاء الخضرية لنبات البربين *Portulaca oleracea* في بعض الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية

اسراء صكر سلمان ، انتصار عبد الله حسن و نور نعيم جاسم
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات.

الخلاصة

تم اختبار تاثير السمية الخلوية للمستخلص المائي الخام لنبات البربين .*Portulaca oleraceae* L خارج الجسم الحي في خلايا سرطان عنق الرحم (Hela) وسرطان الحنجرة البشري (Hep-2) وسرطان الغدة اللبنية الفاري (AMN-3) وتاثيره في خلايا الـ MEF الطبيعية عند التراكيز (100،200،400،600،800) مايكروغرام/ ملليتر. اظهرت النتائج وجود فروقات معنوية في استخدام التراكيز الواطئة (100،200،400) مايكروغرام/ ملليتر للخلايا السرطانية Hela و AMN-3 في حين لم تعطي التراكيز العالية اي تاثير واضح على الخلايا. على العكس في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 كانت التراكيز العالية (600 ،800) مايكروغرام/ ملليتر لها تاثير سمي واضح مقارنة مع التراكيز الواطئة خلال فترات التعريض (24 و 48) ساعة، بينما اظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية خلال فترة التعريض ٤٨ ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة لخلايا الـ MEF.

الكلمات المفتاحية: البربين، الخطوط السرطانية، الخط الخلوي الطبيعي.

المقدمة

يعد نبات البربين من النباتات الطبية، وهو نبات عشبي حولي ينتمي الى العائلة Portulaceceae. ينتشر بشكل واسع في جميع انحاء العالم في اوربا وافريقيا والولايات المتحدة والصين والهند وكذلك يوجد في استراليا [1]. يبلغ ارتفاع النبات حوالي 40 سم، اوراقه طرية بيضوية الشكل الى ملعقي، الساق اسطوانية تبلغ حولي 30سم، ازهاره متباينة من حيث اللون [2]. يعد البربين مصدر للعديد من المغذيات والمركبات الفعالة بيولوجيا منها الـ Alkaloidsو Oxalic acid و fatty acids و Coumarins و Proteins و Flavonoids و Glycosides و Carbohydretes [3]. كما يحوي النبات علىC Vitamin و Saponin و Caroteneو Tannins و Triterpenoids و α- linolic acid [4]. يستخدم نبات البربين في الامارات العربية المتحدة واليمن ومناطق مختفلة من الدول العربية كوجبة غذائية، حيث تستخدم مع السلطات وعمل المرق، كما استخدموا النبات في علاج الكثير من الحالات المرضية مثل عضة الافعى والحشرات وفي تقرحات الفم وفي معالجة الاسهال[5]. لنبات البربين الكثير من الاستخدامات الطبية والعلاجية فهو يستخدم في علاج الكثير من الامراض مثل التقليل من الكوليسترول كما يعمل على نقص او التقليل من الشحوم في الدم hypolipidemic وكمضا للاكسدة Antioxidant ويستخدم في علاج السعال وفي التهاب القولون التقرحي [6].

لهذا هدفت الدراسة الى دراسة التاثير السمي لنبات البربين في الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

تحضير المستخلص النباتي

حضر المستخلص الخام لنبات البربين وذلك بوزن 50 غرام من الاوراق والسيقان الطرية السليمة والتي غسلت جيداً بماء الحنفية ثم اضيف اليها 150 ملليتر من الماء المقطر، وبعد ذلك وضعت في خلاط كهربائي لمدة 20 دقيقة مع مراعاة اطفاء الخلاط كلما بدات درجة حرارة المخلوط بالارتفاع، ثم رشح المستخلص النباتي باستخدام الشاش الطبي وعند ذلك وزع في انابيب اختبار 10 ملم ثم نبذت هذه الانابيب بسرعة 2500 دورة/ دقيقة لمدة

10 دقائق للحصول على مستخلص رائق. جفف المستخلص الرائق في الحاضنة المزودة بمروحة عند درجة حرارة 37مْ [7]. بعد ان جفف المستخلص اذيب 0.1 غم من المستخلص الجاف في 10 مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 الخالي من المصل، بعد الحصول على المحلول الاصل حضرت منه تخافيف باستخدام الوسط الزرعي نفسه وعقم بعد ذلك من خلال ترشيحه بورق ترشيح Nalgen filter ذات ثقوب بفتحات قطر 0.22um.

تاثير المستخلص الخام للاجزاءالخضرية لنبات البربين *Portulaca oleracea* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية

لقد تم الحصول على الخطوط الخلوية السرطانية (الخط الخلوي السرطاني لعنق الرحم Hela عند التمريرة (232) والخط الخلوي السرطاني للغدة اللبنية الفاري (AMN-3) عند التمريرة (186) والخط الخلوي السرطاني لسرطان الحنجرة (Hep-2) عند التمريرة (239) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية. وتم الحصول على الخط الخلوي الطبيعي لجنين الفار MEF عند التمريرة (4) وذلك بعد تشريح فار حامل في مختبر زراعة النسج الحيوانية– قسم علوم الحياة، واخذت الاجنة بعمر 10-12 يوم عمل منها مزرعة اولية وذلك بزرع الخلايا بالوسط الزرعي RPMI-1640 (16.4g من مسحوق الوسط: 7.2g sodium bicarbonate :antibiotic 0.2ml : serum 100ml ثم يكمل الحجم الى 1 لتر)، وبعد نجاح المزرع الاولية عمل منها مزرعة ثانوية للحصول على عدة تمريرات passages [8].

اختبار سمية المستخلص الخام (الاوراق والسيقان) لنبات البربين في نمو الخطوط الخلوية

حُضرت خمسة تراكيز مخففة وفقا لـ [9] من المستخلص الخام وكالاتي 800 ،600 ، 400،200 ، 100 مايكروغرام/ مليليتر واستعملت انيا: جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة وعاء الزرع النسجي بحجم 25 سم بمحلول التربسين– فرسين المعقم (Trypsin- 1g Versen: PBS 100ml) بعد التخلص من الوسط القديم، ثم اضيف له 20 مل من الوسط الزرعي الجديد، مزج عالق الخلايا ونقل 0.2 مل الى حفر طبق معايرة الزرع النسجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة، تركت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لحين التصاق الخلايا في الحفر بعدها يتم التخلص من الوسط القديم في الحفر واضيف له 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقا للمستخلص النباتي وبواقع 3 مكررات لكل تركيز فضلا عن مكررات السيطرة (وسط زرعي خالي من المصل فقط) حضنت الاطباق على درجة حرارة 37مْ. بعد مرور مدة التعريض المحددة للخطوط الخلوية السرطانية 24 و 48 ساعة ومدة التعريض 48 ساعة للخط الخلوي الطبيعي. اخرجت الاطباق من الحاضنة وازيل الوسط الزرعي والمستخلص بعدها اضيف له ملون البنفسج البلوري (5g من مسحوق الملون :50ml فورمالين: 200ml ميثانول: يكمل الى 1L من الماء المقطر) للحفر الحاوية على الخلايا جميعها وبحجم 0.2 مايكروليتر لكل حفرة، اعيدت الاطباق مرة ثانية الى الحاضنة لتحضن لمدة 20 دقيقة بعدها اخرجت من الحاضنة وازيلت محتوياتها وغسلت بالماء المقطر لحين زوال الصبغة، جففت الاطباق لتهيئتها للقراءة بوساطة جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانوميتر لقراءة امتصاصية الخلايا بعدها حولت قيم التاثير السم (الامتصاصية) للخلايا الى نسب مئوية وفق المعادلة الاتية [10]:

النسبة المئوية لحيوية الخلايا = قراءة امتصاصية الخلايا المعاملة لكل تركيز/ قراءة امتصاصية خلايا السيطرة × 100.

التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي

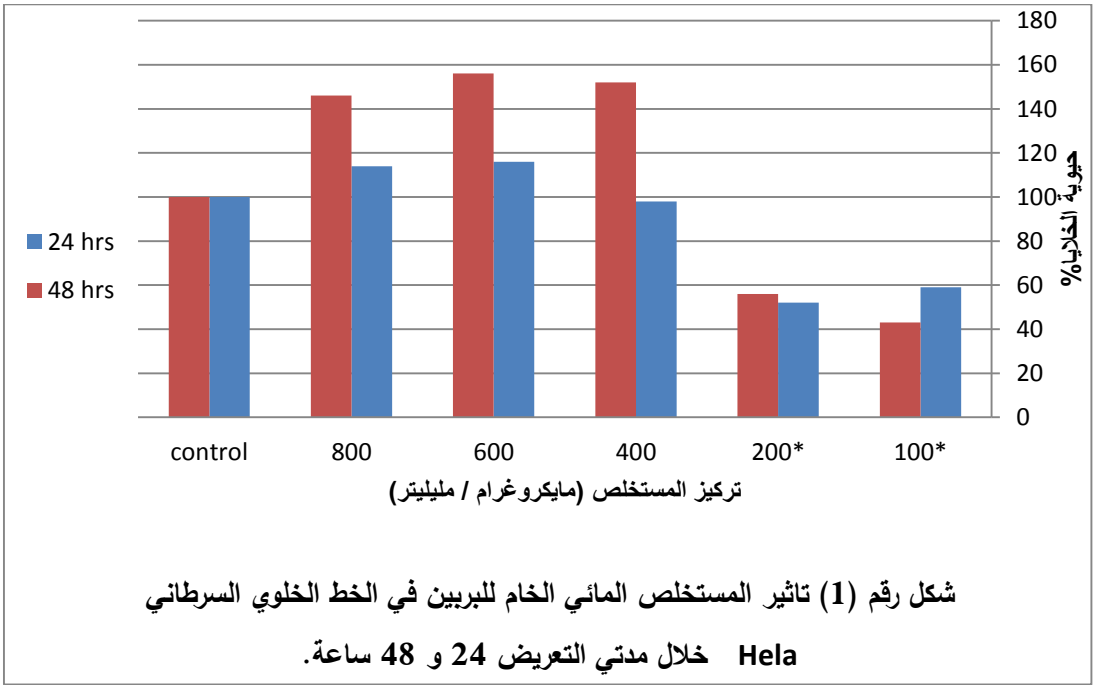
صممت التجربة وفق البرنامج الاحصائي Statistical analysis system SAS (2004) في التحليل الاحصائي للبيانات لدراسة تاثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD) وباحتمالية 5 %[11].

النتائج

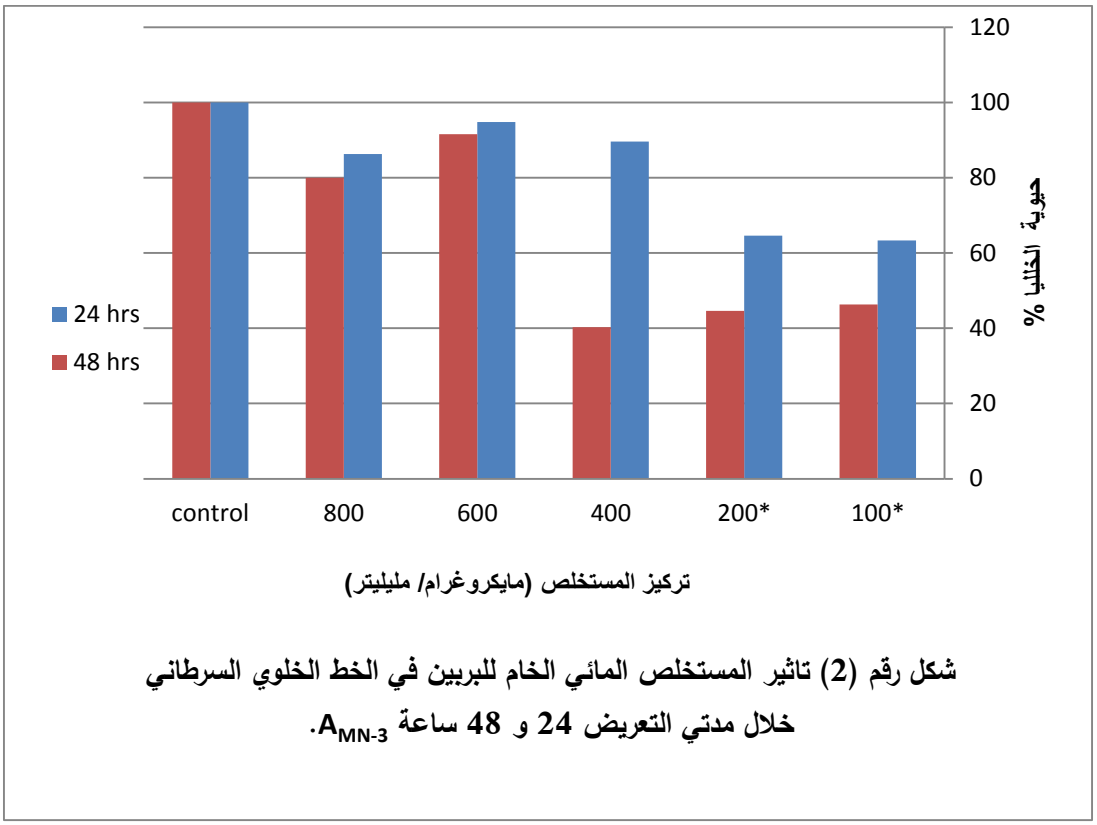
تاثير المستخلص المائي الخام للاجزاء الخضرية في الخطوط الخلوية السرطانية Hela و AMN-3 و Hep-2 والخط الخلوي الطبيعي MEF

توضح الاشكال ١، ٢، ٣ تاثير المستخلص المائي الخام لنبات البربين في الخطوط الخلوية السرطانية الثلاث قيد الدراسة باستخدام التراكيز 800،600، 400،200، 100 مايكروغرام/ مليليتر عند مدتي تعريض 24 و 48 ساعة، حيث لوحظ تباين في التاثير السمي للمستخلص النباتي في الخطوط الخلوية السرطانية بمستوى احتمالية $P \leq 0.05$، التراكيز العالية من المستخلص اعطت فروق معنوية في النسب المئوية لحيوية الخلايا بالنسبة للخط الخلوي السرطاني Hela ادت الى زيادة في النسب المئوية لحيوية الخلايا وبمعدلات عالية جدا مقارنة بالسيطرة بينما اعطت التراكيز الواطئة (100 و 200) مايكروغرام/ مليليتر انخفاض في حيوية الخلايا اي ازدات فيها نسب تثبيط الخلايا. وفي تاثير المستخلص النباتي في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ادت جميع التراكيزانخفاض في النسب المئوية لحيوية الخلايا وخصوصا عند التراكيز الواطئة مقارنة بالسيطرة. اما عند الخط الخلوي السرطاني Hep-2 حيث كان التاثير السمي واضحا عند التراكيز العالية (600 و800) مايكروغرام/ مليليتر مقارنة مع التراكيز الواطئة.

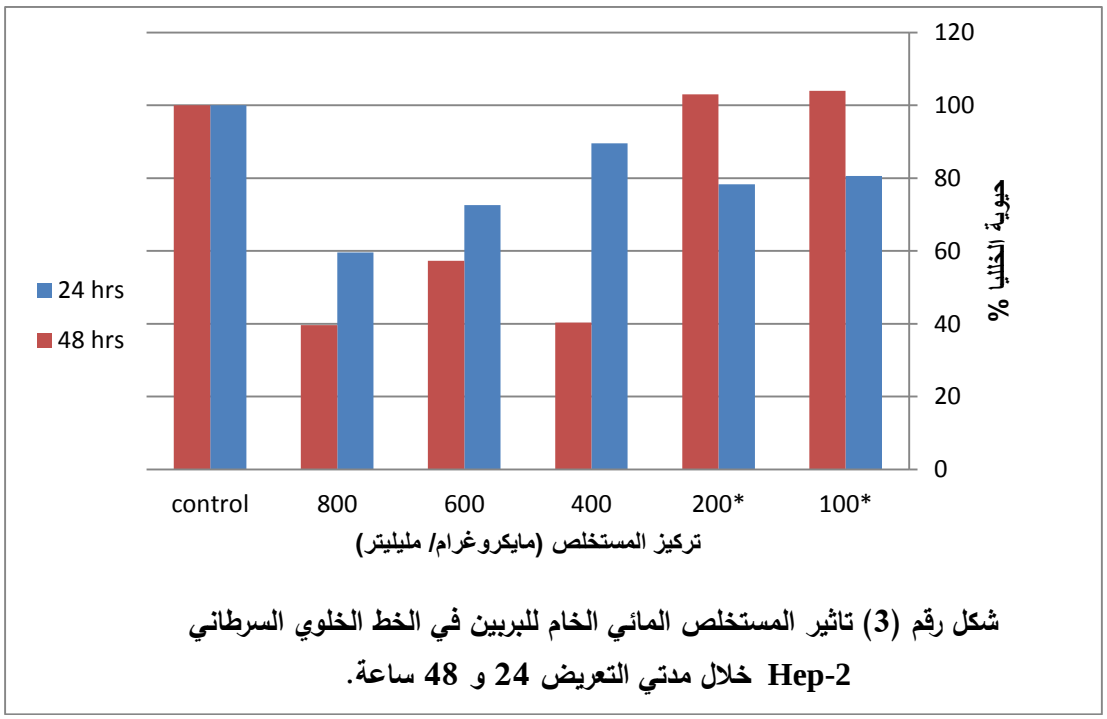
اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بسيط بمستوى احتمالية $P \leq 0.05$ بين مدتي التعريض للخطوط الخلوية السرطانية الثلاث، حيث كانت مدة التعريض 48 ساعة للمستخلص النباتي في الخطوط السرطانية هي الاكثر تاثيراً مقارنة مع مدة التعريض 24 ساعة.



شكل رقم (1) تاثير المستخلص المائي الخام للبربين في الخط الخلوي السرطاني Hela خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة.

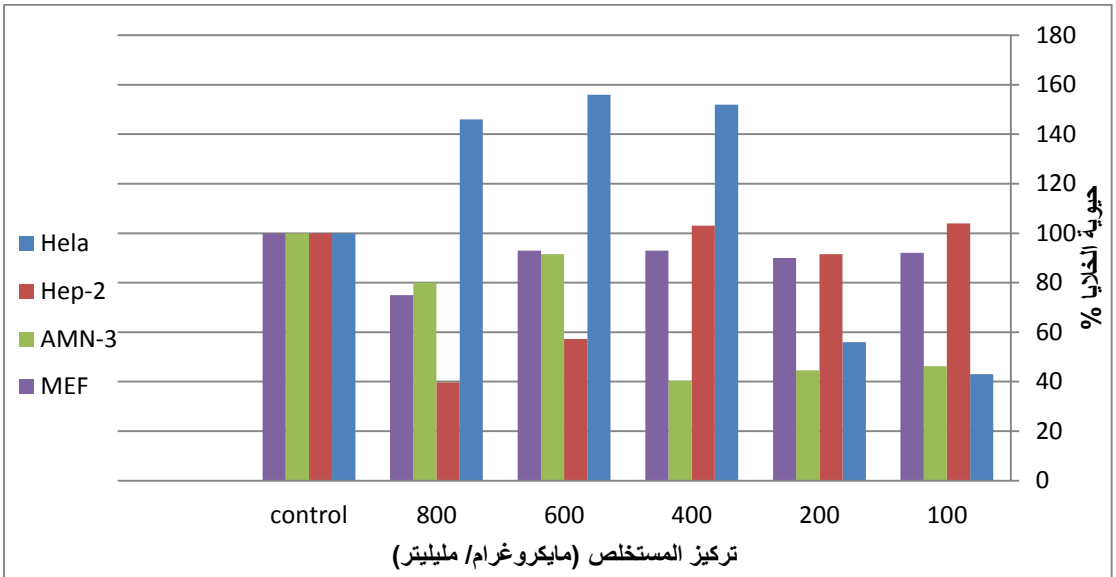


شكل رقم (2) تاثير المستخلص المائي الخام للبربين في الخط الخلوي السرطاني A_{MN-3} خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة.



شكل رقم (3) تاثير المستخلص المائي الخام للبربين في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة.

اما شكل (٤) يوضح المقارنة بين الخطوط الخلوية السرطانية الثلاث والخط الخلوي الطبيعي MEF عند مدة التعريض 48 ساعة، حيث اظهر المستخلص المائي الخام للبربين تاثير واضح ومعنوي بمستوى احتمالية $P\leq0.05$ في الخطوط السرطانية ولم يظهر اي تاثير سمي واضح في الخط الخلوي الطبيعي عند مدة التعريض 48 ساعة.



شكل في (4) تاثير المستخلص المائي الخام للبربين في الخطوط الخلوية السرطانية والخط الخلوي الطبيعي لمدة التعريض 48 ساعة.

المناقشة

أوضحت النتائج ظهور تاثيرات سمية عالية متباينة للمستخلص المائي الخام للاجزاء الهوائية لنبات البربين في الخطوط الخلوية السرطانية Hela و Hep-2 و AMN-3 ويعزى سبب ذلك الى شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة [12]. حيث كان تاثير المستخلص المائي للبربين في الخط الخلوي السرطاني Hela عند التراكيز الواطئة ذات تاثير تثبيطي بينما في التراكيز العالية لوحظ زيادة في النسب المئوية لحيوية الخلايا وبمعدلات عالية جدا عند مدتي تعريض 24 و48 ساعة وهذه الحالة تسمى بالتضادية في تاثير الجرعات (Hormetic effect) وهي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم وتتميز بوجود تعاكس لعمل الجرعات الواطئة بالمقارنة مع الجرعات العالية[13]. وفي تاثير المستخلص في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 حيث كان التاثير عند التراكيز الواطئة مقارنة مع التراكيز العالية لمدتي التعريض 24 و48 ساعة ان السبب في ذلك قد يعود الى تحرر مركبات معينة عند تخفيفها فتكون اكثر اختراقا وتاثيرا في الخلايا في حين تكون تلك المركبات والمواد الفعالة مركزة ومعقدة عند التراكيز العالية [14]. اما تاثير المستخلص المائي الخام في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 فقد ادت التراكيز العالية تثبيطا واضحا في الخلايا مقارنة بالتراكيز الواطئة حيث اعتمد التاثير على عاملي الوقت والجرعة (dose and time dependent)، اي كلما ازداد مدة التعريض والتركيز ازداد التاثير السمي في الخلايا وهذا يؤكد لما جاء به [15] في دراسة تاثير المستخلص الخام لنبات البربين في الخطوط الخلوية السرطانية RD و Hep-2 و Hela و A549 حيث اعتمد تاثير مستخلص نبات البربين في هذه الخطوط على الوقت والجرعة.

وفي حالة تاثير المستخلص المائي الخام للاجزاء الهوائية لنبات البربين في الخط الخلوي الطبيعي MEF فلم يلاحظ اي تاثير سمي واضح للخلايا، وربما يرجع السبب في تاثير المستخلص في الخلايا السرطانية دون تاثيرها في الخلايا الطبيعية الى عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية مثل الطبيعة الايضية لتكوين الاوعية الدموية الجديدة وكذلك الى شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة في سطح الخلية السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة والتاثير في الخلية وكذلك الى شكل شريط الـ DNA للخلية الطبيعية فقد تكون الاواصر بين القواعد النايتروجينية قوية مقارنة في الخلية السرطانية [16].

ان سبب تاثير المستخلص المائي الخام في الخطوط الخلوية السرطانية ربما يعزى الى احتواء النبات الى عدد من المركبات الفعالة بايولوجيا ومنها القلويدات والفلافونيدات والصابونينات والتانينات والفيتامينات (3). حيث ان لهذه المركبات دور مضاد للاورام ففي دراسة للمركبات الفلافونويدية واشباه الفلافونويدات الموجودة في نبات البربين وجد لها تاثير مضاد للخطوط الخلوية السرطانية خارج الجسم الحي [17]. كما تلعب المركبات الفعالة الموجودة في النبات وهي السكريات المتعددة دور في تسمم الخطوط الخلوية السرطانية من خلال توقف الخلايا في طور S phase لدورة حياة الخلية [18].

هنالك بحوث كثيرة توكد تاثير المستخلص الخام لنبات البربين في الخطوط الخلوية السرطانية، ففي دراسة قام بها [19] في تاثير المستخلص الخام في الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان المعدة KATOIII وسرطان القولون Calo320HSR وسرطان الرئة للخطين L929 و W138. كما بين [20] في دراسة تاثير المستخلص الميثانولي الخام لنبات البربين دورمضاد للاكسدة Antioxidant ومضاد للسرطان خارج الجسم. وفي دراسة اخر تاثير المستخلص الخام لنبات البربين في الفئران المختبرية حيث وجد ان هذا المستخلص له تاثير مضاد للاكسدة من خلال كنس الجذور الحرة مثل Peroxidase و superoxide [21] .

نستنتج من هذا ان المستخلص المائي الخام للاجزاء الخضرية لنبات البربين ذات تاثير واضح في جميع الخطوط السرطانية Hela و AMN-3 و Hep-2 رغم تباين هذا التاثير من خط الى اخر, في حين لم يكن لهذا المستخلص اي تاثير سمي واضح في الخط الخلوي الطبيعي MEF.

References

[1]. Sini, K.R.; Rajasekaran, A; Karpakavalli, M. and Sangeetha, P.T. Acomprehensive Review on the Genus *Portulaca* with special Refrence to *Portulaca oleracea*. J. PRCP, 1(2):109-120.2011.

[2]. Zhang, J; Lin, J; Iuo, JH; Meng, Cy. and Zhang, LD. The extraction and identification of the total flavanone of baises puralane by ultraspnic wave (in Chinese) .Int, J. Mol, Sci. 18:1714-1715. 2007.

[3]. Ezemkwe, Michael, Omara, Alwala Thomas, R. and Membrahtue Tedesse. Nutritire characterization of Purulence accessions an influenced by plating date, plant foods for human nutrition Dordrecht, 54(3):183-191. 1999.

[4]. Pardiamunian, J; Lavakumar, S; Johan, P.J.; Somasundaram, G. and Subash, K.R. Evaluation of anxiolytic of pet-ether extract pf Portulaca oleracea (LINN) in mice. I J.ABPT, 3(4):0976 – 4550. 2012.

[5]. El-Ghonemy, A. A. Encyclopeadia of medicinal plants of the United Arab Emirates. University of United ArabEmirates Press, U.A.E.P.568. 1993.

[6]. Ghazanfar, S.A. and Sabahi, A.M. Medicinal plants of northern central Oman (Arabia). Economic Botany .47(1):89-98. 1993.

[٧].يعقوب، سمارة نزار. دراسة التاثيرات الوراثية لبعض النباتات الطبية العراقية في نماذج حيوانية ونباتية. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات– جامعة بغداد. ٢٠٠٧.

[8]. Freshney, R.I. Culture of animal cells. Amanual for basic technique (5th ed) Willey- liss. A Juhn wiley & sons. Pup. New York. 2005.

[9]. Abdul-Majeed, M.R. 2000. Induction & characterization of SU-99 plasmacytoma cell line & its effect on mice immune response. PhD. Thesis, AL-Nahrain University.

[10]. Betancur-Glavis, LA.; Saez, J.; Granadas, H.; Salazae, A. and Ossa, J.E. Antitumor & antiviral activity of Colombian plant extract. Men. Inst. Oswaldo crez, 94:531-535. 1999.

[11]. SAS. Statistical analysis system, users Guide. Statistical. Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C.USA. 2004.

[12]. Shoieb, A.M.; Elgayyar, M.; Dudrick, P.; Bell, E. and Titn of, P.K. Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquinol. Int. Oncology, 22:107-113. 2003.

[13]. Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. Defining hormesis. Hum. Exp. Toxical. 21:91-97. 2002.

[١٤]. سلمان، اسراء صكر. تاثير المستخلصات الخام لحبوب الكلغان Silybum marianum على

الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.2008.

[15]. Wei, Y.Z.; Jun, Y.; Hua, L. and Chunli, Z Purslane active ingredient in vivo anticancer effects of the initial screening. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 8(3): Abstract. 2010.

[16]. Moteki, H.; Hibasmai, H.; Yamada.; Katsuzaki, H.; Imai, K. and Komiya, T. Specific of apoptosis 1,8-cineole in two human leukemia cell line, but not in ahuman stomach cancer cell lines. Oncology Reports, 9:757-760. 2002.

[17]. Yan, J.; Sun, LR.; Zhon, ZY.; Chen, YC.; Zhany, WM.; Dai, HF. And Tan, JW. Homoisoflavonoids from the medicinal plant Portulaca oleracea. J. phytochmi -stry, 80:37-41. 2012.

[18]. Chen, T.; wang, J.; Li, Y.; Zhao, T. and Zhang, H. Sulfated modification and cytotoxicity of Portulaca oleracea L. polysaccharides. Glycoconjugate.J.,27 (6): 635-642. 2010.

[19]. Yoon, J.; Ham, SS. And Jun, H.S. Portulaca oleracea and tumor cell growth. U.S. Patent, 9(5): 869-060. 1999.

[20]. Sanja, S.D.; Shrth, N.R.; Patel, N.K.; Patel, D. and Patel, B. Characteriz- ation and evaluation of antioxidant activity of Portulaca oleracea. IJ.PPS, 1(1):74-80. 2009.

[21]. Dkhil, M.A.; Moniem, A.E.; Quraishy, S. and Saleh, R.A. Antioxidant effect of Purslane (Portulaca oleracea) and its mechanism of action.J.Med.plant. Res, 5(9):1589-1563. 2011.

against the cancer cell line Hela (cervical carcinoma), cancer cell line Hep-2 (larynex carcinoma), cancer cell line AMN-3 (Murine mammary) and the normal cell line MEF (Mouse Embryo Fibroblast) at concentrations 100, 200, 400, 600, 800 µg/ ml. The results showed the existence of significant differences in the use of concentrations of low-lying (400 200 100) micrograms / ml of cancer cells Hela and AMN-3 while not giving high concentrations of any obvious effect on the cells. On the contrary, in-line cell cancerous Hep-2 were high concentrations (600, 800) micrograms / ml have a toxic effect and a clear comparison with low-lying concentrations during the exposure periods (24 and 48) hours. While the extract showed no significant effect during the period time of exposure as compared with contact against MEF cells.

Abstract

The cytotoxic effect of the aqueous extract of *Potulaca oleraceae* L. was tested *in vitro*