مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال یازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و یکم، تابستان ۱۴۰۱ (۴۴-۳۱)

DOI: 10.30473/eab.2023.55590.1804

مقاله پژوهشی:

بررسی میزان تولید کاتچین در عصاره برگ و ریشه مویین تراریخته گیاه *Hibiscus sabdariffa* و تأثیر آن بر سلول‌های سرطانی کبد HepG2

نجمه ملکی[۱]، مهدی دادمهر[۲*]، محمد علی کریمی[۳]

۱. کارشناس ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲. دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳. استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۰/۱٤)

چکیده

در این پژوهش به منظور ارزیابی ترکیبات مؤثر موجود در عصاره گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) و تأثیر آن بر رشد سلول‌های سرطانی رده HepG2 مقایسه‌ای بین میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره بافت برگ گیاه و عصاره ریشه مویین تراریخته آن انجام گرفت که در آن میزان آنتوسیانین‌ها و فلاونوییدها و فنل کل در هر دو اندازه‌گیری شد. در طی انجام سنجش پلی‌فنل‌ها با دستگاه HPLC میزان غلظت فلاونویید کاتچین در عصاره ریشه مویینه تراریخته به میزان ۲۲/۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک تعیین شد که چندین برابر مقدار ۰/۹ میلی‌گرم بر گرم در نمونه عصاره برگی چای ترش ماده خشک بود و این نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در غلظت این متابولیت ثانویه مؤثر نسبت به سایر متابولیت‌های ثانویه در طی فرایند تولید ریشه مویین تراریخته می‌باشد. سپس عصاره نمونه‌های برگی وریشه مویین در غلظت‌های مختلف صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌های سرطانی کبد HepG2 در آزمایشگاه اضافه شدند ودرصد زنده‌ماندن سلول‌ها به‌روش MTT محاسبه شد. میزان زنده‌ماندن سلول‌ها در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره ریشه مویین تراریخت کمتر از نمونه چای ترش بود که به احتمال زیاد به‌دلیل وجود غلظت بالاتری از کاتچین در نمونه ریشه مویین تراریخته می‌باشد و بهترین غلظت عصاره‌های نمونه چای ترش و ریشه مویین تراریخته که بالاترین درصد آپاپتوز (مرگ سلولی) سلول‌ها را نشان داد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: چای ترش، ریشه‌های موئین تراریخته، سلول‌های سرطانی HepG2، کاتچین، متابولیت‌های ثانویه.

Evaluation of Catechin Production in Leaf and Transgenic Hairy Root Extract of *Hibiscus sabdariffa* and its Effect on HepG2 Liver Cancer Cells

Najmeh Maleki[1], Mehdi Dadmehr[2*], Mohammad Ali Karimi[3]

1. M.A., Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Associate professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: Oct. 12, 2020 - Accepted: Jan. 4, 2023)

Abstract

In this research, a comparison was made between the concentration of secondary metabolites of *Hibiscus sabdariffa* content in its leaves and induced transgenic hairy roots. The levels of anthocyanins and flavonoids and total phenol were measured in both samples. In the next step, polyphenols were measured by HPLC. The concentration of catechin flavonoids in the transgenic hairy root extract was 22.8 mg/g dry matter which was several times higher than that of 0.9 mg/g in leaf extract of dry matter. The obtained results clearly demonstrated that, the rate of concentration of secondary metabolites during the process of induction of transgenic hairy root was increased. Then, the extracts of leaf and transgenic hairy root samples at various concentrations of 0, 25, 50, 50, 100, 200, 400 mg / ml were added to HepG2 liver cancer cell lines and the percentage of cell survival was calculated by MTT method. The cell survival rate in the sample treated with transgenic hairy roots samples was less than the leaf extract samples, which was most likely due to the higher concentration of Catechin in the transgenic hairy roots extract. The best concentrations of extracts of transgenic hairy root extract showed that, the highest percentage of cell apoptosis was 100 mg/ ml.

Keywords: Catechin, HepG2 cancer cells, *Hibiscus sabdariffa*, HPLC, Secondary metabolites, Transgenic hairy roots.

* نویسنده مسئول: مهدی دادمهر Email: mdadmehr@pnu.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی به گیاهانی گفته می‌شود که تمامی یا بخشی از آن، حاوی مواد مؤثری باشد که بدون طی‌کردن مراحل ساخت صنعتی، بتواند تأثیرات درمانی مفیدی برای بدن داشته باشد و با تنظیم فعالیت اندام‌های مختلف بدن به درمان بیماری‌ها کمک کند. گیاهان دارویی به اشکال مختلف مانند گیاه تازه، خشک یا پودرشده، دم‌شده، جوشانده، شربت، روغن‌های گیاهی و اسانس‌های فرآوری‌شده مصرف می‌شوند. اخیرا سازمان بهداشت جهانی اعلام نموده که بیش از ۸۰ درصد مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می‌نمایند. تقریباً یک‌چهارم داروهای تولیدشده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از موادگیاهی به‌دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Tripathi & Tripathi, 2003). گیاهان حاوی متابولیت‌های اولیه می‌باشند که طی فرآیند فتوسنتز تولید شده و سپس در ساخت ترکیبات سلول نقش‌آفرینی می‌کنند. این ترکیبات در حجم زیاد و با ارزش اقتصادی پایین تولید می‌شوند و به‌عنوان ماده خام صنعت، مواد غذایی و افزودنی‌ها کاربرد دارد. همچنین گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را نیز تولید می‌کنند که پراکنش محدودی در سلسله گیاهان دارند. این ترکیبات معمولاً دارای وزن مولکولی پایینی (کمتر از ۱۵۰ کیلودالتون) هستند و تاکنون بیش از ده‌ها متابولیت ثانویه شناسایی شده‌اند و هنوز هم تعداد بیشتری در حال اضافه‌شدن و بررسی هستند (Caldentey & Inzé, 2004). متابولیت‌های ثانویه در فرآورده‌های صنعتی نیز کاربرد فراوانی دارند و در ساخت دارو، صابون، اسانس، رنگ‌ها، صمغ‌ها، رزین، کائوچو، چاشنی غذا و نوشیدنی و غیره به‌کار می‌روند. این متابولیت‌ها در خود گیاه نیز دارای وظایف مهمی مانند هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد، رفع آلودگی میکروبی، جذب عوامل گرده‌افشان و همچنین دورکردن علف خواران و حشرات می‌باشند که به این واسطه موجب کاهش خسارت حیوانات و حشرات شده و به گیاهان برای بقا در اکوسیستم خود کمک می‌کنند.

گیاه چای ترش که یکی از گیاهان دارویی بسیار مهم می‌باشد دارای ۳۰۰ گونه از گیاه یکساله و چند ساله به‌صورت درختچه و درخت بوده و امروزه به‌طور گسترده‌ای در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مانند هند، عربستان سعودی، چین، مالزی، اندونزی، فیلیپین، ویتنام، سودان، مصر، نیجریه و مکزیک کشت می‌شود (Wang *et al*., 2012).

کاربرد خوراکی چای ترش در هند، افریقا مکزیک و سنگال استفاده از دم‌کرده برگ یا کالیس چای ترش به‌دلیل مدر بودن برای کاهش فشار خون و غلظت خون و افزایش حرکات حلقوی روده می‌باشد، در هند از عصاره جوشانده دانه آن برای ازبین‌بردن درد در دفع ادرار و سوء هاضمه استفاده می‌شود. در برزیل معتقدند ریشه‌های این گیاه خواص نرم‌کنندگی و اشتهاآور دارند. در طب سنتی چین برای درمان اختلالات کبدی استفاده می‌شود (Ismail *et al*., 2008).

در بسیاری از کشورها نیز چای ترش به‌عنوان دارویی برای کاهش فشار خون مصرف می‌شود (Mckay, 2009).

یکی از متابولیت‌های ثانویه مهم در این گیاه کاتچین می‌باشد که از دسته ترکیبات فلاونوییدی بوده و در مواد غذایی مانند چای سبز، شکلات سیاه، خرمالو، سیب و انگور چای ترش وجود دارد. کاتچین یکی از فلاونوییدهای چای ترش می‌باشد پلی‌فنل‌هایی چون کاتچین و کوئرستین با داشتن گروه‌های هیدروکسیل، رایج‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های مواد غذایی هستند (Mudgal *et al*., 2010). فعالیت‌های مهارکنندگی کاتچین‌های چای علیه سرطان‌زایی و رشد سلول‌های سرطانی در مطالعات و آزمایش‌های مختلف نشان داده شده است (Yang *et al*., 2004; Yang *et al*., 2011; Higdon *et al*., 2009; Crespy *et al*., 2003).

همچنین نتایج استفاده از دوزهای پایین‌تر کاتچین در فرایند القای اپاپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول امیدوارکننده نشان داده شده است (Kumazoe *et al*., 2013).

کاتچین‌ها همچنین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی، ضد التهاب، محافظت‌کننده نورون ها، محافظت‌کننده دستگاه قلب و عروق و محافظت‌کننده سلولی عمل می‌کنند (Kaszkin *et al*., 2004).

به‌طور خاص، کاتچین‌های چای سبز به‌عنوان عوامل پیشگیرانه سرطان به‌علت کاهش سمیت و همچنین اثرات پیشگیرانه در برابر سرطان‌ها در انسان موردتوجه قرار گرفته‌اند (Lee *et al*., 1997; Shimizu *et al*., 2008;Khan *et al*., 2009;Suganuma *et al*., 2011; Bettuzzi *et al*., 2006).

در مطالعات سلولی و روی سلول‌های کشت‌شده در آزمایش‌های *in vitro* اثر کاتچین‌های چای سبز بر مهار رشد و القای آپوپتوز در بسیاری از سلول‌ها دیده شده است (Nishikawa *et al*., 2006; Yamauchi *et al*., 2009; Li *et al*., 2000).

در یک مطالعه دیگر تأثیر کاتچین چای سبز بر روی لاین های سلولی سرطانی و سالم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم می‌شود. مکانیسم این نتایج به این صورت می‌باشد که کاتچین باعث تخریب پروتئین بازدارنده IκBα از مسیر فسفریلاسیون شده که به‌طور خاص باعث فعال‌سازی NF-κB می‌شود و در نتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اپیدرموید A431 را باعث می‌شود (Ahmad *et al*., 2000).

با این‌حال، نتایج آزمایش‌های *in vivo* همچنان محدود هستند و هیچ نتیجه‌گیری قطعی نشده است. مشاهدات نشان می‌دهد که چای سبز می‌تواند به‌عنوان عامل ضدتومور مفید باشد تا اثربخشی درمان سرطان را افزایش دهد (Sonoda *et al*., 2014).

در بررسی اثرات ضد سرطانی کاتچین اثر ضد سرطانی کورکومین و کاتچین به صورت ترکیبی نیز بر روی کولون انسان مورد بررسی قرار گرفت اگرچه هر دو کرکومین و کاتچین رشد هر دو آدنوکارسینوما و حنجره را مهار می‌کنند با این حال، ترکیبی از هر دو این داروها مهار قوی تر رشد و تکثیرسلول‌ها را نشان دادند. فعالیت ضد سرطانی آنها با القای آپوپتوز و توسط علائم مشخصی از تکه تکه شدن هسته، تراکم، و تجزیه DNA مشخص شد (Manikandan *et al*., 2012).

با توجه به این‌که در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند بوده و مدت زمان طولانی برای تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه ضروری به‌نظر می‌رسد (Asghari *et al.,* 2015).

انتقال ژن یک ابزار قوی جهت افزایش بازدهی و تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای است که محدودیت بازدهی دارند (Omidi & Farzin, 2013). با توجه به این‌که روش معمول اصلاح و بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی شامل کاشت آنها در مزرعه، سپس برداشت و استخراج این مواد به روشهای شیمیایی و غیره با مشکلات متعددی نظیر شرایط محیطی و زراعی، صرف زمان، هزینه و استفاده از نیروی کار زیاد، عدم ثبات سیاسی برخی از کشورهای تولیدکننده و همچنین خطر نابودی برخی از گیاهان دارویی کمیاب مواجه می‌باشد، لازمه استفاده از روش‌های نوین امروزی ضرورت می‌یابد. امروزه با پیشرفت‌های به‌دست‌آمده از این روش راندمان تولید متابولیت‌های دارویی در برخی از این گیاهان به مقدار قابل‌توجهی افزایش یافته است (Krumov *et al.,* 2009).

کشت ریشه‌های مویین به‌عنوان یک روش مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی که دارای ارزش داروئی وصنعتی هستند، به‌کار می روند. ریشه‌های مویین تولیدشده به‌واسطه آگروباکتریوم دارای

ویژگی‌هایی چون سرعت رشد بالا، فقدان زمین‌گرایی و انشعابات فرعی فراوان می‌باشند. این ریشه‌ها دارای پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی بوده و به‌علاوه این ریشه‌های تغییر ژنتیک یافته، در مقایسه با ریشه‌های معمول گیاه، سطوح بالاتری از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که از آن‌ها می‌توان به‌عنوان منبع مداومی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با اهمیت استفاده کرد. همچنین دارای قابلیت رشد در بیوراکتور بوده و می‌توانند برای تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد (Omidi & Farzin, 2013). برای مثال در یکی از مطالعات انجام‌شده می‌توان افزایش غلظت الکالوییدها را در ریشه مویینه تراریخته گیاه *Catharanthus roseus* L. مشاهده کرد از جمله آنها دو آلکالویید مهم، وین کریستین و کاترارانتین یافت شد (Srivastava *et al*., 2007).

در تحقیقی دیگر القای ریشه‌های موئین تراریخته در *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski باعث افزایش غلظت پلی‌فنل‌هایی از قبیل کافئیک اسید و *p*- کوماریک اسید و فرولیک اسید و همچنین افزایش غلظت فلاونوییدها از جمله روتین در ریشه موئینه تراریخته نسبت به خود گیاه شده است (Hanafy *et al*., 2016).

در این پژوهش میزان ترکیبات مؤثر در عصاره برگی و ریشه موئین گیاه چای ترش مورد آنالیز و بررسی قرار کرفت و در ادامه تأثیرگذاری این عصاره‌ها روی سلول‌های سرطانی HepG2 مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

ابتدا نمونه‌های برگ چای ترش وریشه موئین تراریخته که به روش تلقیح با آگروباکتریوم رایزوژنز تهیه شده بود در آون خشک شده و سپس نمونه‌ها پودر گردید. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها به نسبت ۱:۴۰ با آب داغ اضافه شد و سپس در حمام بن‌ماری Memert مدل WB14 با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دو ساعت قرار داده شد. سپس عصاره آبی به روش تحت خلأ با دستگاه روتاری Heidolph مدل ۴۰۰۱ در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر و سپس فیلتر شد. عصاره‌های باقیمانده با روش فریز درایر و به‌وسیله دستگاه ScanVac مدل CoolSafe کاملاً خشک شد و پودر به‌دست‌آمده تا زمان استفاده در یخچال با دمای۲۰- نگهداری گردید.

روش‌های آنالیز عصاره

در ابتدا غلظت سه نوع ماده مؤثره در نمونه چای ترش وریشه مویینه آن طبق روش‌های زیر اندازه‌گیری شد.

پلی‌فنل‌ها

غلظت پلی‌فنل‌های کل طبق روش Folin-Ciocalteau (Kundu *et al*., 2018) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۰/۱ گرم ماده خشک را در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ریجنت Folin-N Ciocalteau ۲ اضافه شده و به‌طور کامل مخلوط شد. پس از یک وقفه سه دقیقه‌ای ۳ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد Na_2CO_3 به آن اضافه و مخلوط شد و برای ۱۵ دقیقه به‌طور متناوب به هم زده شده و در ادامه ساکن گذاشته شد. جذب محلول نمونه و استانداردهای اسید گالیک در طول موج ۷۵۰ نانومتر با دستگاه اندازه‌گیری اسپکتروفتومتر ثبت شده و منحنی استاندارد رسم و غلظت پلی‌فنل‌ها تعیین شد. منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق سطوح مختلف محلول‌های استاندارد اسید گالیک در شکل ۱ نشان داده شده است. این منحنی دارای معادله خط Y=389.64X-14.341 و ضریب همبستگی R^2=0.9483 می‌باشد.

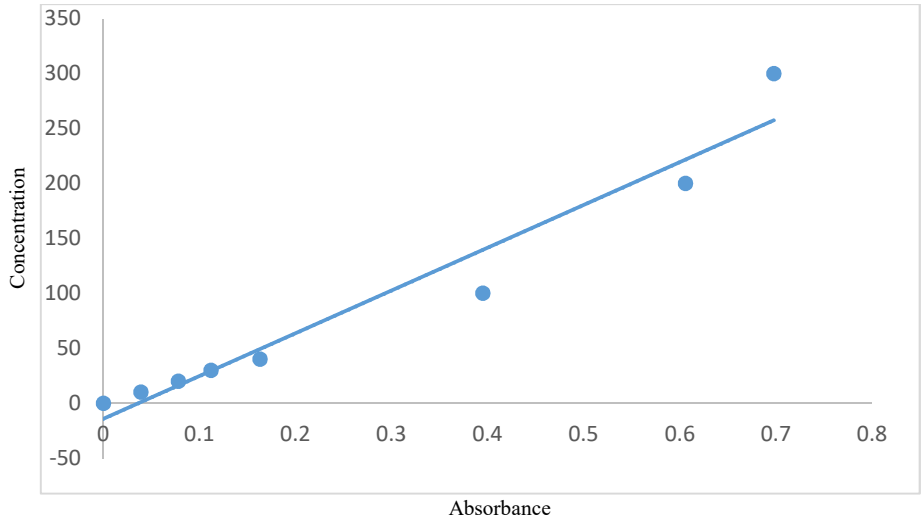
فلاونوییدها

برای اندازه‌گیری فلاونوییدهای کل از روش Zhishen *et al*. (1999) به‌عنوان استاندارد استفاده

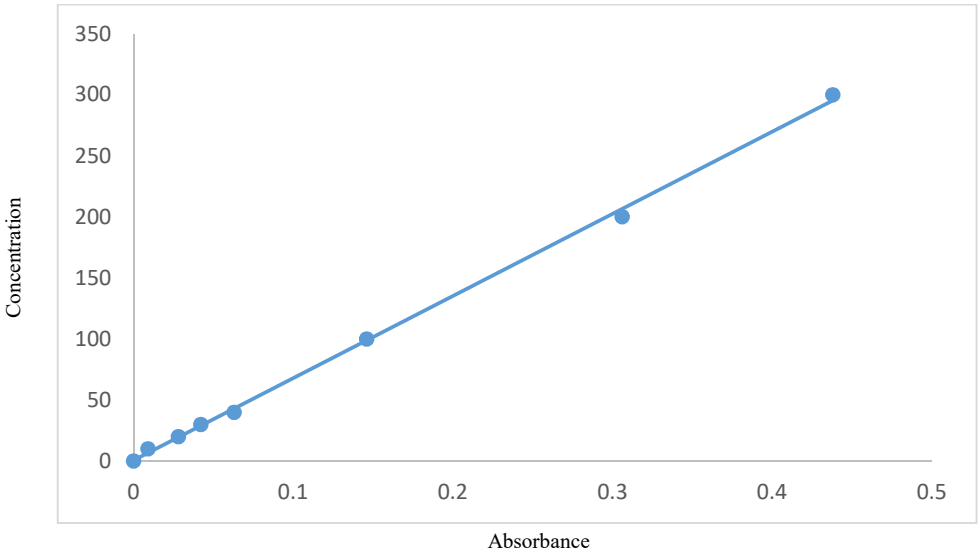
شد. در ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیترکه با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌شده برداشته، ۷۵ میکرولیتر از محلول $NaNO_2$ ۵ درصد به مخلوط اضافه گردید. بعد از ۶ دقیقه ۱۵۰ میکرو لیتر محلول $AlCl_3.6H_2O$ ۱۰ درصد به محلول اضافه شده و برای پنج دقیقه انکوباسیون انجام شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول NaOH ۱ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و مخلوط گردید و جذب آن بلافاصله پس از تهیه در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق سطوح مختلف محلول‌های استاندارد در شکل ۱ نشان داده شده است. این منحنی دارای معادله خط $Y=673.06X+0.6751$ و ضریب همبستگی $R^2=0.9483$ می‌باشد.

آنتوسیانین‌ها

برای تعیین مقدار آنتوسیانین‌های کل از روش Fuleki & Francis (1968) استفاده می‌شود. در این روش ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را با ۵۰ میلی‌لیتر بافر با pH ۱ و ۴/۵ مخلوط می‌شود و جذب آن را در ۵۳۵ نانومتر قرائت می‌شود. اختلاف جذب به‌دست‌آمده از تفاوت جذب pH ۱ و ۴/۵ مقدار آنتوسیانین کل را تعیین می‌کند.



شکل ۱. منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق سطوح مختلف محلول‌های استاندارد اسید گالیک برای تعیین غلظت پلی‌فنل‌ها

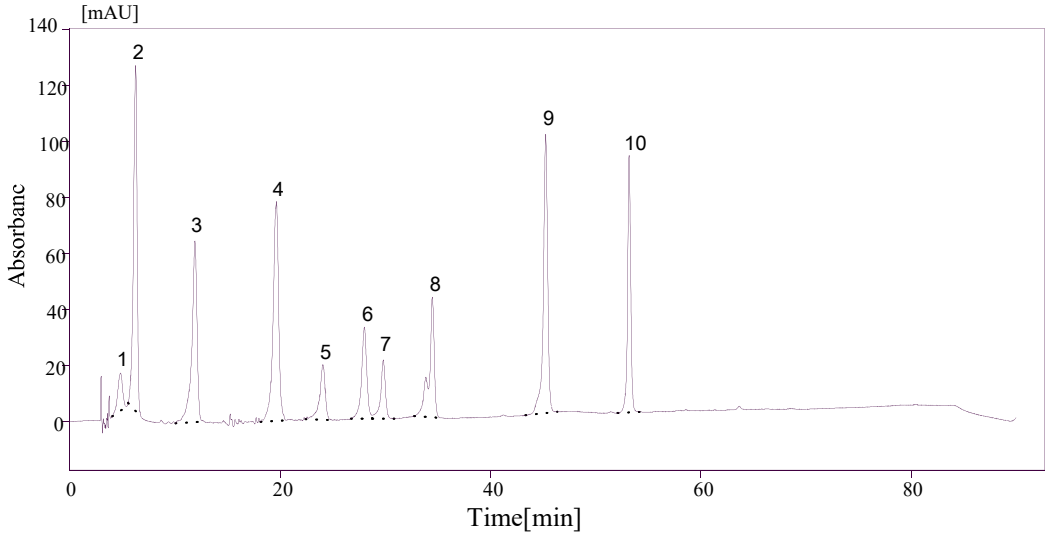


شکل ۲. منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق سطوح مختلف محلول‌های استاندارد برای تعیین غلظت فلاونوییدها

شناسایی و تعیین میزان کاتچین توسط دستگاه HPLC

کاتچین از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان دارند. رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای سیتوپلاسمی سلول و نابودکردن آن، به DNA داخل سلول دسترسی می‌یابند و از طریق تغییر DNA باعث بیماری سرطان می‌شوند. هر قدر تعداد گروه‌های هیدروکسیل بیشتر باشد، توانایی آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها افزایش می‌یابد.

با استفاده از دستگاه HPLC مدل (Knauer, Berlin, Germany)، مجهز به آشکارساز (UV-Vis photodiode-array) مدل (DAD 2. one langmuir, Knauer) و پمپ LC مدل (P 6.1L) جداسازی پلی‌فنل‌ها با استفاده از ستون فاز معکوس ۵ODS3 میکرومتر (250×4.6 mm; Phenomenex, USA) انجام شد. حلال A آب/ استیک‌اسید، به نسبت ۳:۹۷ (v/v) و حلال B متانول تعیین شد. اندازه‌گیری تحت شرایط گرادیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان و حجم تزریق به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و ۲۰ میکرو لیتر بود. طیف‌های UV در گستره طول‌موج ۱۹۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت شدند. شناسایی پیک مبتنی بر مقایسه زمان بازداری و داده‌های طیفی با استانداردهای خالص بود. برای تأیید هویت پیک، عصاره چای ترش وریشه مویین تراریخته با مقادیر مناسب از هر استاندارد افزایش یافت از روش افزایش استاندارد در کنترل داخلی صحت کار دستگاه استفاده شده است. محدوده غلظت این استانداردها از ۲۰ تا ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این اندازه‌گیری با سه بار تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار minitab و Excel بررسی شد و سطح معنی‌داربودن اختلاف P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



شکل ۳. جداسازی ۱۰ نوع پلی‌فنل (که اسامی آنها در جدول ۱ آمده است.)

جدول ۱. اسامی ۱۰ نوع استاندارد پلی‌فنل که توسط دستگاهHPLC جداسازی شده‌اند

Compounds	Peak	Reten. Time [min]	λ_{max}
Phloroglucinol	1	4.833	280
Gallic acid	2	6.283	268
Protocatechuic acid	3	11.917	260
4-hydroxybenzoic acid	4	19.667	280
Catechin	5	24.067	280
Vanillic acid	6	28.017	260
Chlorogenic acid	7	29.817	280
Epicatechin	8	34.483	280
Eriodictyol-7-O	9	45.250	280
Naringin	10	53.183	280

نتایج

تعیین غلظت پلی‌فنل‌ها

اطلاعات به‌دست‌آمده از تعیین غلظت ترکیبات مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. غلظت پلی‌فنل‌ها در برگ چای ترش ۴۵/۶۶ میلی‌گرم بر گرم اندازه‌گیری شد و مقدار به‌دست‌آمده در ریشه مویینه تراریخته نیز ۸/۸۱ میلی‌گرم بر گرم بود. تفاوت غلظت پلی‌فنل‌ها در برگ چای ترش و ریشه موئین تراریخته تفاوت معنی‌داری دارند، $P<۰/۰۵$ می‌باشد. اما با توجه به نتاج ارائه‌شده به نظر می‌رسد تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله پلی‌فنل‌ها در ریشه مویینه تراریخته محقق شده هر ند غلظت آن نسبت به گیاه اصلی کمتر است اما می‌توان براساس این تحقیق انجام شده گفت که اگروباکتریوم رایزوژنز باعث افزایش غلظت تعداد مشخصی از پلی‌فنل‌ها شده است.

تعیین غلظت فلاونوییدها

همان‌طور که در جدول ۲ آمده است غلظت پلی‌فنل‌ها در برگ چای ترش۳۶/۳۴ میلی‌گرم بر گرم می‌باشدکه مقدار آن در ریشه مویینه تراریخته ۳/۲۳ میلی‌گرم بر گرم می‌باشد. تفاوت غلظت فلاونوییدها در برگ چای ترش و ریشه موئین تراریخته تفاوت معنی‌داری دارند، $P<۰/۰۵$ می‌باشد. اما با توجه به نتاج ارائه‌شده به نظر می‌رسد تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله پلی‌فنل‌ها در ریشه مویینه تراریخته محقق شده هر چند غلظت آن نسبت به گیاه اصلی کمتر است، اما می‌توان براساس این تحقیق انجام‌شده می‌توان گفت که اگروباکتریوم رایزوژنز باعث افزایش غلظت تعداد مشخصی از فلاونوییدها شده است.

تعیین غلظت آنتوسیانین‌ها

براساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۲ غلظت آنتوسیانین‌ها در برگ چای ترش ۰/۰۵۵ میلی‌گرم بر گرم می‌باشد و مقدار آن در ریشه مویینه تراریخته ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر گرم برآورد شده است. تفاوت غلظت آنتوسیانین‌ها در برگ چای ترش و ریشه موئین تراریخته تفاوت معنی‌داری دارند، $P<۰/۰۵$ می‌باشد. اما با توجه به نتایج ارائه‌شده به‌نظر می‌رسد تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله آنتوسیانین‌ها در ریشه مویینه تراریخته انجام شده هرچند غلظت آن نسبت به گیاه اصلی کمتر است. می‌توان نتیجه گرفت که روش عصاره‌گیری با آب داغ برای جداسازی و افزایش یکسان همه آنتوسیانین‌ها روش کاملی نباشد.

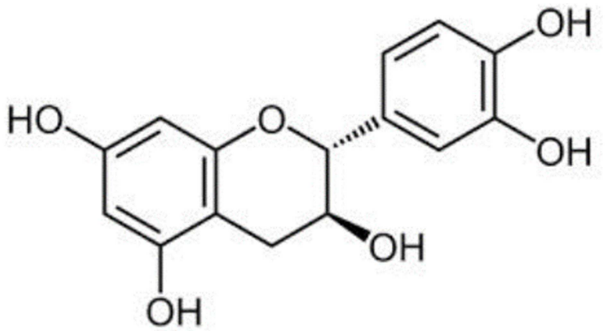
نتایج بررسی متابولیت‌های ثانویه به روش اسپکترومتری و HPLC

نتایج بررسی و اندازه‌گیری پلی‌فنل‌ها و فلاونوییدها و آنتوسیانین‌ها نمونه برگ چای ترش و ریشه مویینه تراریخته در جدول ۱ آمده است. که با توجه به شرایط آب وهوایی و شرایط کشت و برداشت و نگهداری نمونه مقادیر متفاوتی از میزان این ترکیبات در مطالعات قبلی گزارش شده است. در بررسی تکمیلی در این مطالعه نمونه‌ها طبق روش بالا تحت اندازه‌گیری HPLC قرار گرفتند و پلی‌فنل‌ها طبق روش بالا مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بین پلی‌فنل‌ها میزان کاتچین که پیک شماره ۵ می‌باشد با کمک نرم‌افزار اکسل منحنی استانداردهای کاتچین در غلظت‌های مختلف رسم و سطح زیر پیک نمونه‌ها به نمودار داده شد و غلظت کاتچین در نمونه‌ها به‌دست آمد. کاتچین در نمونه ریشه مویین به میزان قابل‌توجهی افزایش پیدا کرده بود. میزان کاتچین در نمونه برگ چای ترش، ۰/۰۵± ۰/۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود در صورتی‌که میزان آن در ریشه مویین ۰/۱۵±۲۲/۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به‌دست آمد.

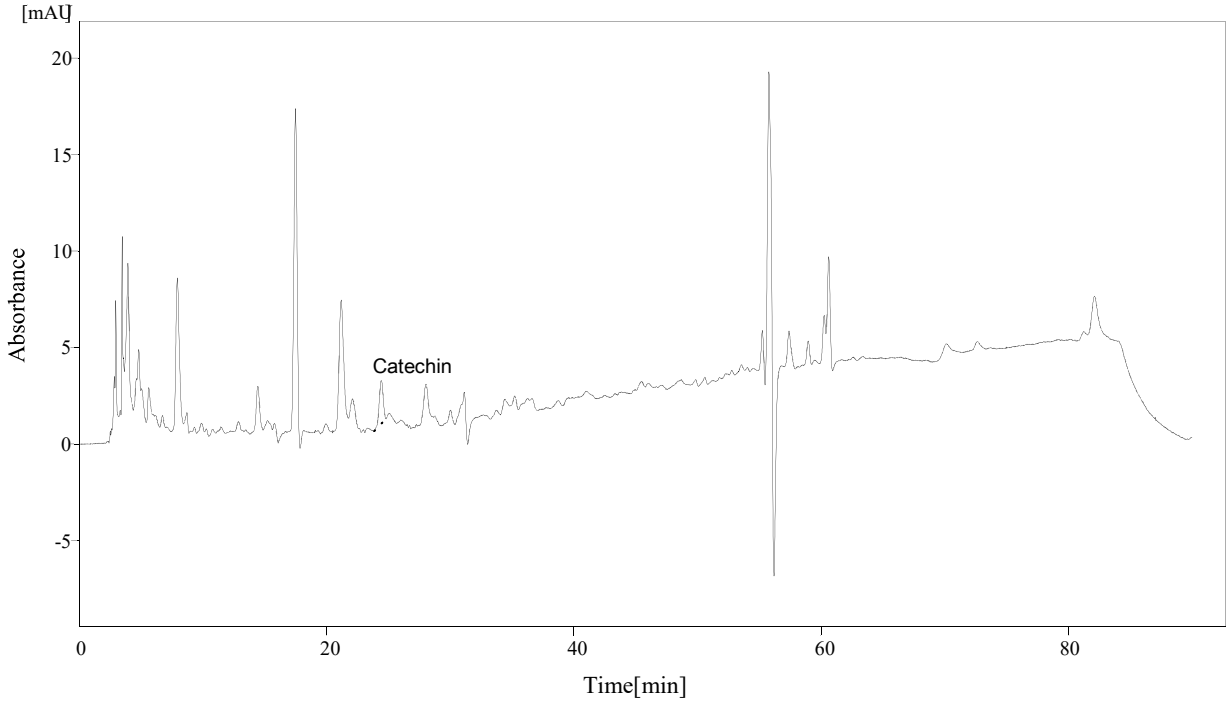
جدول ۲. تعیین میزان انواع متابولیت‌های ثانویه در برگ و ریشه‌های موئین القاشده

Sample	Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method) mg/g	Total flavonoid (Jia method) mg/g	Total anthocyanin (Fuleki and Francis method) mg/g
Hibiscus sabdariffa leaf	45.66±0.19	36.34±0.27	0.055±0.008
Transgenic hairy roots	8.81±0.08	3.23±0.15	0.0040±0.0002

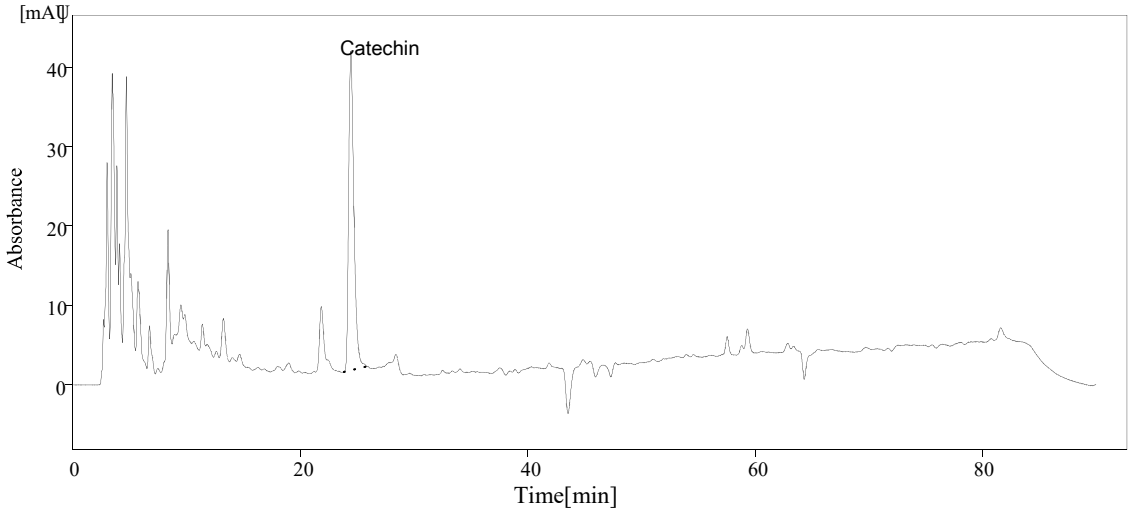
تفاوت غلظت کاتچین در برگ چای ترش و ریشه موئین تراریخته تفاوت معنی‌داری دارند، P<۰/۰۵ می‌باشد. نتیجه به‌دست‌آمده خود تاکیدی بر افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه در ریشه مویینه تراریخته می‌باشد. کاتچین با ساختار چندحلقه‌ای (شکل ۴) از دسته ترکیبات فلاونوییدی بوده که در مواد غذایی مانند چای سبز، شکلات سیاه، خرمالو، سیب و انگور وچای ترش وجود دارد. پلی‌فنل کاتچین با داشتن گروه‌های هیدروکسیل، یکی از رایج‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های مواد غذایی هستندکه از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان دارند رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای سیتوپلاسمی سلول و نابودکردن آن، به DNA داخل سلول دسترسی می‌یابند و از طریق تغییر DNA باعث بیماری سرطان می‌شوند. هر قدر تعداد گروه‌های هیدروکسیل بیشتر باشد، توانایی آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها نیز افزایش می‌یابد.پیک مربوط به نمونه ریشه مویین تراریخته نیز نشان‌دهنده غلظت بالای کاتچین در این نمونه می‌باشد.



شکل ٤. ساختار مولکولی کاتچین



شکل ۵. کروماتوگرام HPLC عصاره برگی گیاه چای ترش (پیک شماره ۵ طبق جدول شماره ۱ پیک کاتچین می‌باشد.)



شکل ٦. کروماتوگرام HPLC عصاره ریشه موئین گیاه چای ترش (پیک شماره ۵ طبق جدول شماره ۱ پیک کاتچین می‌باشد.)

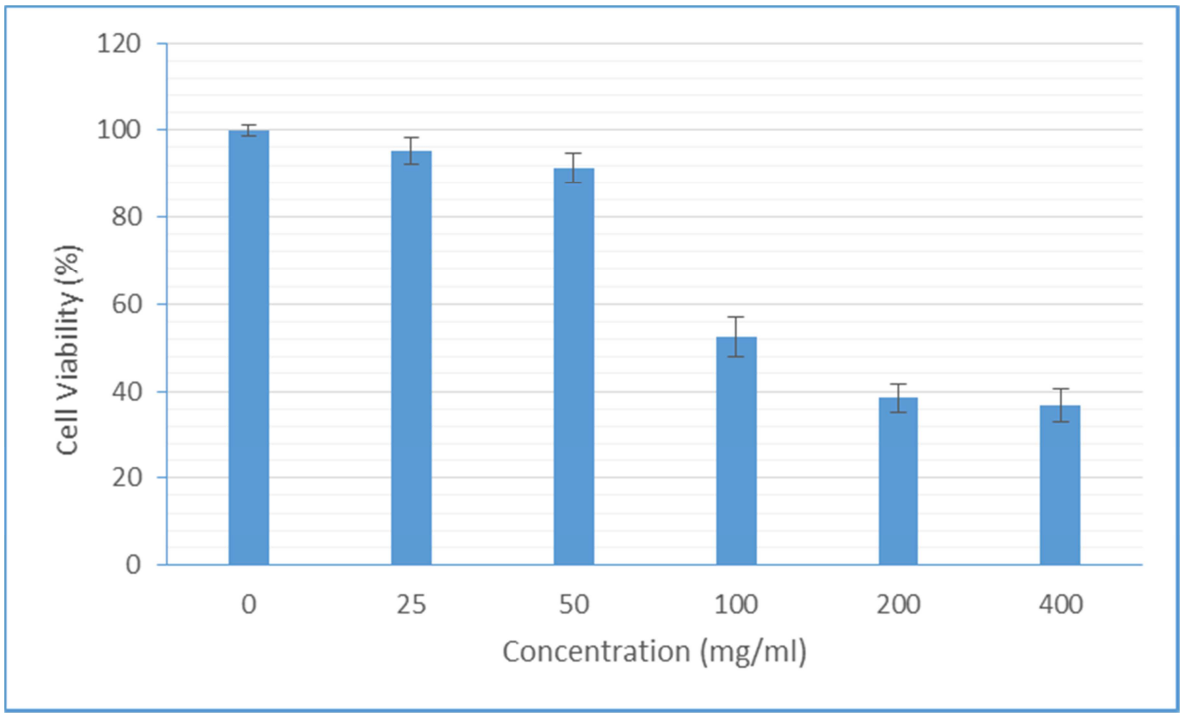
نتایج بررسی عصاره‌های آبی نمونه‌ها روی سلول‌های سرطانی HepG2

در ادامه این تحقیق عصاره نمونه چای ترش وریشه مویینه تراریخته بر روی سلول‌های سرطانی رده HepG2 مورد تست این ویترو قرار گرفتند در این بررسی از غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیترنمونه‌های چای ترش وریشه مویینه تراریخته به سلول‌های سرطانی نوع HepG2 اضافه شده و درصد زنده‌ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد، اساس روش MTT بدین صورت است که برای بیشتر سلول‌های زنده، فعالیت میتوکندریایی ثابت است. بنابراین افزایش یا کاهش در تعداد سلول‌های زنده به‌صورت خطی مربوط به فعالیت میتوکندریایی آن می‌باشد. این آزمون که نوعی آزمون رنگ‌سنجی محسوب می‌شود و بر پایه ی شکسته شدن نمک تترازولیوم (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) زرد به کریستال‌های فورمازون بنفش توسط سلول‌هایی است که از نظر متابولیکی فعال هستند. این احیای سلولی با دخالت کوفاکتور نوکلئوتید پیریدین NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازونی که تشکیل می‌شوند قابل حل‌شدن می‌باشند و جذب نوری محلول رنگی حاصل، با استفاده از دستگاه اسپکتوروفتومتر درطول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. با بررسی نتایج به‌دست‌آمده درصد زنده‌ماندن سلول‌ها در عصاره برگ چای ترش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرمبر میلی‌لیتر به یک باره کاهش زیادی داشته و از ۰/۲۱±۹۲/۲۳ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتربه ۰/۱۸±۵۲/۶۴ درصد رسیده است و این روند کاهش زنده‌ماندن سلول‌ها با افزایش غلظت عصاره برگ چای ترش ادامه پیدا می‌کند. تفاوت زنده‌مانی سلول‌ها در برگ چای ترش و ریشه موئین تراریخته تفاوت معنی‌داری دارند، $P<0/05$ می‌باشد.

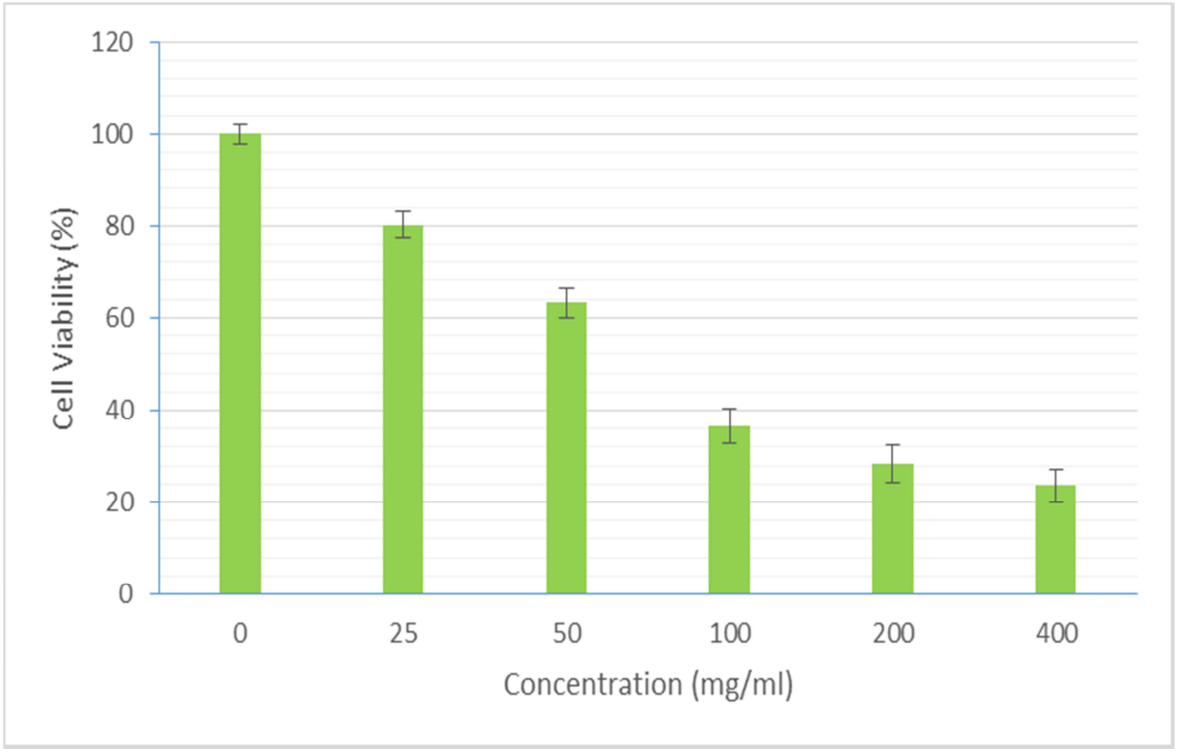
همچنین نتایج به‌دست‌آمده در تیمار با عصاره ریشه موئین نشان داد درصد زنده‌ماندن سلول‌ها در عصاره ریشه مویینه تراریخته در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به یک باره کاهش زیادی داشته و از ۰/۳۴±۶۳/۲۳ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۰/۲۳±۳۶/۶۴ رسیده است و این روند کاهش زنده‌ماندن سلول‌ها با افزایش غلظت ریشه مویین تراریخته ادامه پیدا می‌کرد.

در بررسی کلی نتایج مشخص می‌شود که؛ ۱- میزان کاهش زنده‌مانی سلول‌ها در عصاره ریشه مویینه تراریخته کمتر از عصاره برگ چای ترش می‌باشد و این تفاوت در میزان زنده‌ماندن سلول‌های

سرطانی را به‌دلیل آن را غلظت بالای کاتچین در آن دانست؛ ۲- بر این اساس از نظر مقرون به صرفه بودن غلظت‌های متفاوت و بازدهی بهتر غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به سایر غلظت‌ها کاهش بیشتری در درصد زنده‌ماندن سلول‌ها را دارد و تأثیر بیشتری روی القای آپاپتوز یا مرگ سلولی دارد.



شکل ۷. درصد بقای سلول‌ها در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نمونه برگ گیاه چای ترش



شکل ۸. درصد بقای سلول‌ها در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نمونه ریشه موئین گیاه چای ترش

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی منابع مختلف می‌توان افزایش غلظت آلکالوییدها و متابولیت‌های ثانویه را در ریشه مویینه تراریخته گیاهان مختلف مشاهده کرد. در این بررسی انجام شده میزان کاتچین که یکی از فلاونوییدهای مهم ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدان قوی در ریشه مویینه تراریخته چندین برابر نسبت به گیاه اصلی افزایش پیدا کرده و استفاده از این روش را برای به‌دست آوردن متابولیت‌های ثانویه با درصد خلوص بالا را تأیید می‌کند. همچنین عصاره استخراج شده از برگ و ریشه‌های موئین بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌داد ریشه موئین گیاه چای ترش تأثیر به مراتب بالاتری نسبت به عصاره برگی در القای مرگ سلولی سلول‌ها داشت که در تطابق با نتایج مطالعات قبلی انجام شده بود. بسیاری از مطالعات اثرات ضدسرطانی کاتچین‌های چای در سرکوب برخی سرطان‌ها از جمله سرطان پستان (Xiang *et al*., 2016) سرطان کبد (Shimizu *et al*., 2015) و سرطان پروستات (Adhami *et al*., 2007).

را نشان داده‌اند. به منظور تعیین نحوه تأثیرگذاری و مکانیسم اثر کاتچین موجود در چای نیز تحقیقاتی اخیرا صورت گرفته و نتایج به‌دست‌آمده اثرات قوی ضد آنژیوژنیک (رگ‌زایی) کاتچین‌های چای را از طریق نمایش فعالیت‌های ضدتکثیر و مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی پستان برای به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها نشان داده است (Huang *et al*., 2017). همچنین مطالعات صورت‌گرفته نشان می‌دهد، نقش مهم و عملکرد کاتچین در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد که نقش مهمی در القای مرگ سلولی و توقف رشد سلول سرطانی دارد (Lambert & Elias, 2010).

نکته قابل ملاحظه دیگر این است که کاتچین دارای یک اثر متیلاسیون قوی است و می‌تواند به‌عنوان یک ماده اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیک، از طریق مهار وضعیت متیلاسیون DNA، یا اصلاح هیستون و بیان miRNAها، از طریق مکانیسم‌های ژنتیکی نیز فرآیند سلولی را تنظیم کند و ژن‌های سرکوبگر تومور را تنظیم کند (Mitra & Dash, 2018; Shankar *et al*., 2016).

با این وجود هنوز هم نکات قابل بررسی زیادی در زمینه تحقیقات ضد سرطانی کاتچین‌های چای وجود دارد. تعیین این‌که آیا اثر ضد سرطانی کاتچین‌ها در داخل بدن به به‌وسیله خود این ترکیبات یا به‌وسیله متابولیت‌های آن ایجاد می‌شود دشوار است، زیرا کاتچین‌ها قبل از جذب در خون توسط فلور روده متابولیزه می‌شوند و متابولیت‌های ثانویه به‌وجود می‌آورند. بنابراین پاسخ به این سوال که آیا این متابولیت‌ها هستند که اثر ضد سرطانی در داخل بدن دارند نیاز به درک بیشتر دارد. علاوه بر این، برخی مطالعات نشان داده‌اند که اثر ضدسرطانی کاتچین ممکن است به متابولیسم سلول و مسیرهای سیگنال‌دهی تنظیم‌نشده مرتبط باشد (Cheng *et al*., 2020).

برای بررسی بیشتر مکانیسم عملکرد کاتچین در بدن انسان، ما باید درک جامع‌تری از مکانیسم‌های ضدسرطانی با واسطه کتچین را با بررسی این‌که آیا مولکول‌های خاصی اهداف مستقیم کاتچین‌ها هستند یا خیر، به‌دست آوریم و سپس از طریق آزمایش‌های *in vivo* اثرگذاری آنها را اثبات کنیم. بیشتر مطالعات انجام شده تا کنون، در مورد کاتچین موجود در چای سبز بوده است اما در این مقاله نشان دادیم غلظت کاتچین موجود در چای ترش با استفاده از ریشه‌های مویین القاشده آنها افزایش یافته و سطح بالایی دارد و همچنین طی مطالعات این ویترو تأثیرات ضد سرطانی آن را بر روی سلول‌های سرطان کبد اثبات نمودیم.

REFERENCES

Adhami, V.M.; Malik, A.; Zaman, N.; Sarfaraz, S.; Siddiqui, I.A.; Syed, D.N.; Afaq, F.; Pasha, F.S.; Saleem, M.; Mukhtar, H. (2007). Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo, Clinical Cancer Research, 13: 1611-1619.

Ahmad, N.; Gupta, S.; Mukhtar, H. (2000). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κB in cancer cells versus normal cells, Archives of biochemistry and biophysics, 376: 338-346.

Bettuzzi, S.; Brausi, M.; Rizzi, F.; Castagnetti, G.; Peracchia, G.; Corti, A. (2006).Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study, Cancer Res., 66: 1234-1240.

Cheng, Z.; Zhang, Z.; Han, Y.; Wang, J.; Wang, Y.; Chen, X.; Shao, Y.; Cheng, Y.; Zhou, W.; Lu, X. (2020). A review on anti-cancer effect of green tea catechins, Journal of Functional Foods, 74: 104172.

Crespy, V.; Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models, The Journal of nutrition, 134: 3431S-3440S.

Fuleki, T.; Francis, F. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice, Journal of food science, 33: 78-83.

Hanafy, M.; Matter, M.; Asker, M.; Rady, M. (2016). Production of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* L. and their antimicrobial activity, South African Journal of Botany, 105: 9-18.

Higdon, J.V.; Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.

Huang, C.-Y.; Han, Z.; Li, H.; Xie, H.; Zhu, S. (2017). Mechanism of EGCG promoting apoptosis of MCF-7 cell line in human breast cancer, Oncology letters, 14: 3623-3627.

Ismail, A.; Ikram, E.H.K.; Nazri, H.S.M.; (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds-nutritional composition, protein quality and health benefits, Food, 2: 1-16.

Kaszkin, M.; Beck, K.-F.; Eberhardt, W.; Pfeilschifter, J. (2004). Unravelling green tea's mechanisms of action: more than meets the eye, Molecular pharmacology, 65: 15-17.

Khan, N.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. (2009). Green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies, Nutrition and cancer, 61: 836-841.

Krumov, N.; Perner-Nochta, I.; Oder, S.; Gotcheva, V.; Angelov, A.; Posten, C. (2009). Production of inorganic nanoparticles by microorganisms, Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology, 32: 1026-1035.

Kumazoe, M.; Sugihara, K.; Tsukamoto, S.; Huang, Y.; Tsurudome, Y.; Suzuki, T.; Suemasu, Y.; Ueda, N.; Yamashita, S.; Kim, Y. (2013). 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis, The Journal of clinical investigation, 123.

Kundu, S.; Salma, U.; Ali, M.N.; Hazra, A.K.; Mandal, N. (2018). Development of transgenic hairy roots and augmentation of secondary metabolites by precursor feeding in *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski, Industrial Crops and Products, 121: 206-215.

Lambert, J.D.; Elias, R.J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention, Archives of biochemistry and biophysics, 501: 65-72.

Lee, I.P.; Kim, Y.H.; Kang, M.H.; Roberts, C.; Shim, J.S.; Roh, J.K. (1997). Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans, Journal of Cellular Biochemistry, 67: 68-75.

Li, H.C.; Yashiki, S.; Sonoda, J.; Lou, H.; Ghosh, S.K.; Byrnes, J.J.; Lema, C.; Fujiyoshi, T.; Karasuyama, M.; Sonoda, S. (2000). Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients, Japanese journal of cancer research, 91: 34-40.

Manikandan, R.; Beulaja, M.; Arulvasu, C.; Sellamuthu, S.; Dinesh, D.; Prabhu, D.; Babu, G.; Vaseeharan, B.; Prabhu, N. (2012). Synergistic anticancer activity of curcumin and catechin: An in vitro study using human cancer cell lines, Microscopy research and technique, 75: 112-116.

Mckay, D.; (2009). Can hibiscus tea lower blood pressure, AfroFood Industry Hi-Tech, 20: 40-42.

Mitra, S.; Dash, R. (2018). Natural products for the management and prevention of breast cancer, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018.

Mudgal, V.; Madaan, N.; Mudgal, A.; Mishra, S. (2010). Dietary polyphenols and human health, Asian Journal of Biochemistry, 5: 154-162.

Nishikawa, T.; Nakajima, T.; Moriguchi, M.; Jo, M.; Sekoguchi, S.; Ishii, M.; Takashima, H.; Katagishi, T.; Kimura, H.; Minami, M. (2006). A green tea polyphenol, epigalocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins, Journal of hepatology, 44: 1074-1082.

Oksman-Caldentey, K.-M.; Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, Trends in plant science; 9: 433-440.

Omid, M.; Farzin, N. (2013). Biotechnology solutions to increase the effectiveness of medicinal plants. New genetics; 3: 220-209.

Shankar, E.; Kanwal, R.; Candamo, M.; Gupta, S. (2016) Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: promise and challenges, in: Seminars in cancer biology, Elsevier, , pp. 82-99.

Shimizu, M.; Fukutomi, Y.; Ninomiya, M.; Nagura, K.; Kato, T.; Araki, H.; Suganuma, M.; Fujiki, H.; Moriwaki, H. (2008). Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study, Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 17: 3020-3025.

Shimizu, M.; Shirakami, Y.; Sakai, H.; Kubota, M.; Kochi, T.; Ideta, T.; Miyazaki, T.; Moriwaki, H. (2015). Chemopreventive potential of green tea catechins in hepatocellular carcinoma, International Journal of Molecular Sciences, 16: 6124-6139.

Sonoda, J.I.; Ikeda, R.; Baba, Y.; Narumi, K.; Kawachi, A.; Tomishige, E.; Nishihara, K.; Takeda, Y.; Yamada, K.; Sato, K. (2014). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, attenuates the cell viability of human non-small-cell lung cancer A549 cells via reducing Bcl-xL expression, Experimental and Therapeutic Medicine, 8: 59-63.

Srivastava, S.; Srivastava, A.K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites, Critical Reviews in Biotechnology, 27: 29-43.

Suganuma, M.; Saha, A.; Fujiki, H. (2011). New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs, Cancer science, 102: 317-323.

Tripathi, L.; Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants, Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 2: 243-253.

Wang, M.L.; Morris, B.; Tonnis, B.; Davis, J.; Pederson, G.A. (2012). Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important Hibiscus species, Journal of agricultural and food chemistry; 60: 6620-6626.

Xiang, L. P.; Wang, A.; Ye, J. H.; Zheng, X. Q.; Polito, C. A.; Lu, J. L.; Liang, Y. R. (2016). Suppressive effects of tea catechins on breast cancer. Nutrients; 8: 1-15.

Yamauchi, R.; Sasaki, K.; Yoshida, K. (2009). Identification of epigallocatechin-3-gallate in green tea polyphenols as a potent inducer of p53-dependent apoptosis in the human lung cancer cell line A549, Toxicology in Vitro; 23: 834-839.

Yang, C.S.; Wang, H.; Li, G.X.; Yang, Z.; Guan, F.; Jin, H. (2011). Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies, Pharmacological Research; 64: 113-122.

Yang, C.S.; Wang, X.; Lu, G.; Picinich, S.C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance, Nature Reviews Cancer; 9: 429-439.

Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry; 64: 555-559.

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (http:/creativecommons.org/licenses/by/4.0)