Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷

# بررسی خواص آنتی اکسیدانتی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) و گل حنا (*Impatiens walleriana*) و اثر سیتوتوکسیک آنها بر روی سلول‌های سرطانی معده رده AGS

پریچهر حناچی Ph.D.[1*]، شقایق صالحی زاده M.Sc.[2]، ریحانه رمضانی Ph.D.[3]، خدیجه کیارستمی Ph.D.[4]

۱- دانشگاه الزهرا، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۲- دانشگاه الزهرا، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۳- دانشگاه الزهرا، گروه پژوهشی بیومدیکال، بخش پژوهشکده زنان، تهران، ایران
۴- دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه فیزیولوژی گیاهی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: p.hanachi@alzahra.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

## چکیده

**هدف:**. این مطالعه برای بررسی اثر سایتوتوکسیکی عصاره آبی ریحان و گل حنا بر روی سرطان معده رده سلولی AGS انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها از روش FRAP استفاده شد. پس از تهیه عصاره آبی ریحان و گل حنا، اثر ضد سرطانی آن‌ها بر روی رشد سلول‌های سرطانی AGS در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با روش MTT مورد سنجش قرار گرفت.

**نتایج:** بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده ریحان و گل حنا با روش FRAP مربوط به حلال آب و روش عصاره‌گیری خیساندن بود که در ریحان ۰/۱۱ ± ۰/۸۷۸ میلی‌مولار و در گل حنا ۰/۰۳ ± ۱/۳۰ میلی‌مولار اندازه گرفته شد. بر اساس داده‌های به‌دست آمده از تست MTT بیشترین سمیت عصاره ۷۲ ساعت بعد از اضافه نمودن عصاره به سلول‌ها اتفاق می‌افتد. کمترین میزان $IC_{50}$ عصاره آبی گیاه ریحان برابر ۰/۰۰۲ ± ۳/۰۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در گل حنا برابر ۰/۰۰۱ ± ۲/۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه گرفته شد که در سطح احتمال $p<0/05$ دارای اختلاف معنی‌داری بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مربوط به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره آبی ریحان و گل حنا نشان دهنده‌ی این امر است که این گیاهان در غلظت‌های بالاتر دارای خاصیت کشندگی هستند و در مدت زمان طولانی‌تری اثر خود را می‌گذارند.

**واژگان کلیدی:** سرطان معده، روش FRAP، گل حنا، آزمون MTT، گیاه ریحان


www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

گیاهان دارویی سالیان طولانی، نقش مهمی را در درمان بیماری‌ها ایفا کرده‌اند. امروزه به‌علت اثرات جانبی متعدد و هزینه‌ی بالای داروهای شیمیایی، علاقه به مصرف داروهای گیاهی رو به افزایش است. از این‌رو گیاهان برای درمان و یا پیشگیری از بیماری‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱).

داروهای مشتق شده از گیاهان برای درمان سرطان موثر هستند زیرا آن‌ها طبیعی می‌باشند و به آسانی قابل دسترس عستند. آن‌ها به‌راحتی می‌توانند به‌شکل خوراکی و به‌عنوان بخشی از غذای مورد مصرف بیمار استفاده شوند (۲).

آنتی اکسیدانت‌ها در پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو مانند بیماری‌های قلبی و عروقی، عصبی، سرطان و اختلالات استرس اکسیداتیو با هم مرتبط هستند (۳). عصاره آبی ریحان دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی مناسبی می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی است و بنابراین قابل استفاده در صنایع غذایی و صنایع دارویی می‌باشد. عصاره آبی ریحان نیز دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیس بوده است و کمترین خاصیت ضد میکروبی خود را بر روی باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژینوزا نشان داده است. اخیرا با توجه به اثرات مفید آنتی اکسیدانت‌ها، به‌ویژه آنتی اکسیدانت‌های طبیعی، در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، علاقه به پیدا کردن آنتی اکسیدانت‌های طبیعی از منابع گیاهی افزایش پیدا کرده است. مطالعات در مورد گیاهان دارویی نشان می‌دهد که اکثر آن‌ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی قابل توجهی هستند. گیاهان دارویی با فعالیت‌های آنتی اکسیدانتی خود نیز برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی از مسیر کاهش پراکسیداسیون لیپیدها مفید هستند (۴).

گیاه گل حنا متعلق به خانواده بالسامیناسه و بومی شرق آفریقا می‌باشد. البته در آمریکای شمالی و جنوبی، استرالیا و نیوزلند و همچنین جزایر اقیانوس آرام یافت شده است (۵). جنس Impatiens دارای ترکیبی به‌نام ۲-متوکسی ۱و۴ –نفتو کینون است که این ترکیب برای گونه‌های این جنس این ترکیب دارای خواص ضد قارچی و ضد التهابی گزارش شده است (۶). تمامی گونه‌های این جنس دارای مزه ای تلخ هستند که باعث ناراحتی‌های روده‌ای و اسهال و استفراغ می‌شوند این مزه تلخ ممکن است به‌دلیل وجود آلکالوئیدها و گلیکوزیدها باشد. α-پاریناریک اسید که یک اسید چرب غیر اشباع است به‌همراه لینولئیک اسید در برخی از گونه‌های این جنس دیده شده است (۶).

گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از خانواده نعناعیان، گیاهی یک‌ساله و علفی است که از این گیاه برای معالجه نفخ شکم، برخی بیماری‌های قلبی، بزرگ شدن طحال و همچنین کمک به هضم غذا استفاده می‌شود (۷).

ترکیبات استخراج شده از گیاه ریحان مجموعه گسترده و متنوع از ترکیبات شیمیایی را با توجه به تغییرات شیمیایی، رنگ برگ و گل، عطر و منشا گیاهان نشان می‌دهند. اجزای اصلی این ترکیبات عبارتند از: لینالول، متیل کاویکول، سیترال، اوژنول، سینئول، ژرانیول، کامفور و متیل سینامات. این گیاه در طب سنتی به‌عنوان ضد اسپاسم معده تجویز می‌شود. با این‌حال، اخیرا از عصاره‌های این گیاه به‌عنوان آنتی بیوتیک استفاده‌های زیادی شده است. اسانس ریحان دارای خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی نیز می‌باشد (۸). ریحان دارای خواص آنتی اکسیدانتی قوی می‌باشد. آنتی اکسیدانت‌های طبیعی موجود در این گیاه می‌تواند از بدن در برابر آسیب‌های رادیکال‌های آزاد محافظت کرده و به‌این‌ترتیب با اکثر فرم‌های سرطان مبارزه می‌کند (۹).

سرطان معده زمانی ایجاد می‌شود که سلول‌های سرطانی در پوشش داخلی دیواره معده ایجاد شود. از نشانه‌های


www.SID.ir

Archive of SID

اولیه‌ی بیماری می‌توان به سوزش، درد معده در ناحیه بالای شکم، بی اشتهایی و تهوع اشاره کرد. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، سالانه ۷۲۳۰۰۰ نفر بر اثر این بیماری از دنیا می‌روند. در سطح جهانی، این سرطان پنجمین عامل پیشتاز سرطان و سومین عامل مرگ و میر می‌باشد. میزان شیوع این بیماری در مردان، دو برابر زنان می‌باشد؛ همچنین افرادی که دارای گروه خونی A هستند نیز نسبت به افراد با سایر گروه خونی‌ها بیشتر مستعد این بیماری هستند (۱۰).

افرادی که دارای بیماری التهاب مری، رفلاکس معده، ورم معده و پولیپ مزمن معده می‌باشند و یا افرادی که پیشینه ابتلا به سایر سرطان ها را دارند، بیش از سایر افراد در معرض ابتلا به این بیماری قرار می‌گیرند (۱۱).

امروزه گیاهان دارویی تاثیرات مثبتی را در درمان بیماری سرطان داشته‌اند. علاوه بر تاثیر این گیاهان در درمان سرطان، از آن‌ها در درمان بیماری‌هایی از قبیل دیابت، اختلالات تیروئیدی، کم خونی و اختلالات روانی استفاده شده که اثرات مثبتی داشته‌اند. ترکیبات سایتوتوکسیکی این گیاه در درمان سرطان بسیار حائز اهمیت و ضروری است (۱۲).

امروزه روش‌های متنوعی برای درمان سرطان وجود دارد ولی به‌دلیل این‌که در این روش‌های درمان از داروهایی استفاده می‌شود که غیر انتخابی عمل می‌کنند، درصد بالایی از سلول‌های سالم بدن به همراه سلول‌های سرطانی از بین می‌روند. مهم‌ترین مساله در درمان سرطان این است که بتوانیم سلول‌های سرطانی را بدون آسیب رساندن و حذف کردن سلول‌های سالم بدن از بین ببریم. بنابراین در دسترس بودن داروها و مواد طبیعی موثر در درمان با کمترین اثرات جانبی و بیشترین اثر بخشی از اهمیت فراوانی برخوردار است. گیاهان دارویی به‌دلیل دارا بودن مواد شیمیایی گوناگون با خاصیت درمانی دارای اهمیت هستند. درمان‌های متداول سرطان، دارای عوارض جانبی شدیدی بوده و در بهترین حالت تنها چند سال به طول عمر بیمار می‌افزاید. از طرفی مطالعات نشان داده است که مکمل‌های دارویی در کنترل سرطان می‌توانند سودمند باشند. دارو درمانی و شیمی درمانی همچنان یکی از روش‌های مناسب و کارآمد برای درمان سرطان است اما محققان در تلاشند که بتوانند داروهایی را تولید کنند که کمترین اثر جانبی را بر فرد بیمار داشته باشد. گیاهان به‌عنوان منبع طبیعی آنتی اکسیدانت‌ها بهترین انتخاب برای تولید این گونه داروها هستند (۱۳).

هدف از این پژوهش، استفاده از دو گیاه ریحان و گل حنا برای سنجش میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی این دو گیاه با استفاده از روش FRAP است. برای بررسی اثر سایتوتوکسیکی این گیاهان بر روی رده سلولی AGS، از عصاره‌ای استفاده شد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی را با توجه به تست FRAP دارا بود که برای بررسی این اثر از روش MTT استفاده شد. در این مطالعه برای اولین بار اثر عصاره آبی گل حنا را بر روی سلول‌های سرطانی معده بررسی شده و امید است که از گیاه ریحان و گل حنا به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت طبیعی به جای آنتی اکسیدانت‌های مصنوعی که هزینه بر و دارای اثرات جانبی می‌باشند، استفاده شود.

## مواد و روش‌ها

***تهیه نمونه گیاهی:*** اندام هوایی گیاهان از باغ گیاهان دارویی و بازار گل شهید محلاتی خریداری شد. نمونه‌های مورد آزمایش ابتدا در سایه خشک و سپس توسط آسیاب خرد شدند. نمونه‌های مورد استفاده برای آزمایش‌های مرحله استخراج دارای اندازه ذرات بین صفر تا ۲ نانومتر شدند. نمونه‌های الک شده تا زمان انجام آزمایش در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک و سیگما تهیه شدند.

***تهیه عصاره گیاهی به‌روش خیساندن (Maceration):*** مقدار ۰/۱ گرم از نمونه را در ۱۰ میلی لیتر حلال آب مقطر، اتانول ۸۰ درصد و متانول


www.SID.ir

Archive of SID

۸۰ درصد مخلوط شد و درون دستگاه بن ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به‌مدت یک ساعت قرار گرفت (۱۴) پس از یک ساعت، درون دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه و در دور rpm ۲۰۰۰ گذاشته شد و در آخر مخلوط حاصل صاف شد (۱۵).

***اندازه‌گیری توان آنتی اکسیدانتی احیا آهن(FRAP)***: در این روش توانایی عصاره‌ها در احیای یون‌های فریک (+Fe3) در حضور آنتی اکسیدانت‌ها اندازه گیری می‌شود. با احیای یون فریک و تبدیل آن به یون فرو (+Fe2) در pH اسیدی و در حضور TPTZ، کمپلکس Fe- TPTZ تشکیل می‌شود که رنگ این کمپلکس، آبی است (۱۶).

برای رسم منحنی استاندارد از $FeSO_4$ استفاده شد. ابتدا ۳ میلی‌لیتر از معرف FRAP را به‌مدت ۵ دقیقه درون بن ماری با درجه حرارت ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه به‌آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت جذب آن را در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد.

***کشت سلولی:*** رده سلولی AGS (سلول سرطان معده) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس از دفریز کردن در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. پس از پر شدن حدود ۸۰ درصد کف فلاسک، ۱ میلی‌لیتر تریپسین اضافه کرده و به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس جهت کند کردن عملکرد آنزیم تریپسین ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM ۱۰ درصد به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به‌داخل فالکون منتقل و سانتریفیوژ شدند و پس از خارج کردن محلول رویی شمارش شدند.

پس از شمارش میزان ۸۰۰۰ سلول به‌هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۵).

***آزمون MTT:*** جهت بررسی اثر سمیت اندام هوایی ریحان و گل حنا بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی و تعیین IC50 این ترکیبات، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. نمک MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی‌که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS حل می‌شود، ترکیب زرد رنگی را ایجاد می‌کند. اساس این سنجش شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌صورت محلول درآمده است. هرچه سلول‌ها فعالتر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود.

جذب نوری با استفاده از دستگاه Multi-Mode (Cytation™Biotek, USA) Microplate Reader خوانده شده است. رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری شد.

پس از گذشت ۲۴ ساعت، غلظت‌های مختلف عصاره آبی ریحان و گل حنا (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را به‌هر چاهک افزوده و در دوره‌های زمانی متفاوت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT آماده شده اضافه شد و به‌مدت ۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگه‌داری شد. سپس محلول رویی از هر چاهک حذف و مقدار۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک افزوده شد و بلورهای فورمازان توسط سوسپانسیون به‌طور کامل حل شده و سرانجام جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه می‌شود. (۱۵).


www.SID.ir

Archive of SID

= درصد سلول های زنده

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری سلول های تیمار شده با دارو}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} \times 100$$

$IC_{50}$ پس از رسم منحنی با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف عصاره و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد.

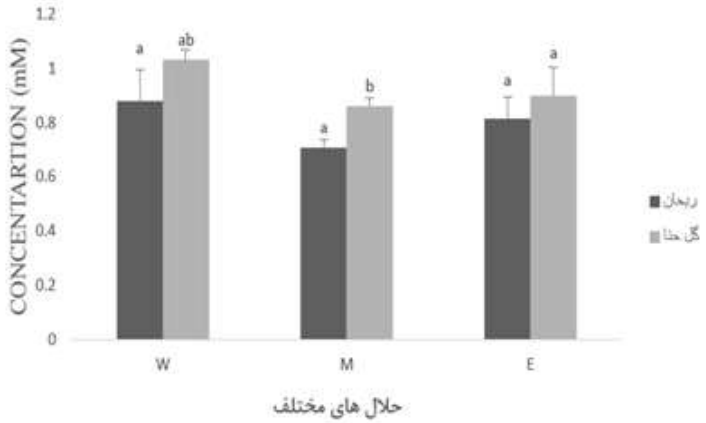
**آنالیز آماری**

به‌منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل خود، یعنی حلال (آب، متانول و اتانول) و زمان اثر دهی عصاره‌ها (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) از آزمون مقایسه میانگین یک متغیر در چندین گروه (One – way ANOVA) در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ استفاده شد که برای این منظور برنامه SPSS نسخه ۲۴ مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش‌های انجام شده با سه بار تکرار انجام شده است.

**نتایج**

***مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ها به‌وسیله اندازه گیری توان آنتی اکسیدانتی احیا آهن (FRAP)***

میزان فعالیت عصاره‌های حاصل از دو گیاه *Ocimum basilicum* و *Impatiens walleriana* در حلال‌های آب، متانولی، اتانولی که با روش استخراج خیساندن عصاره‌گیری شده بودند نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی در گیاه ریحان ۰/۱۱± ۰/۸۷۸ میلی‌مولار و در گل حنا این فعالیت برابر با ۰/۰۳ ± ۱/۳۰ میلی‌مولار می‌باشد که هر دو تحت اثر حلال آب و روش عصاره‌گیری خیساندن می‌باشد که تفاوت معنی‌داری را در سطح $p<۰/۰۵$ نشان داد (شکل ۱).



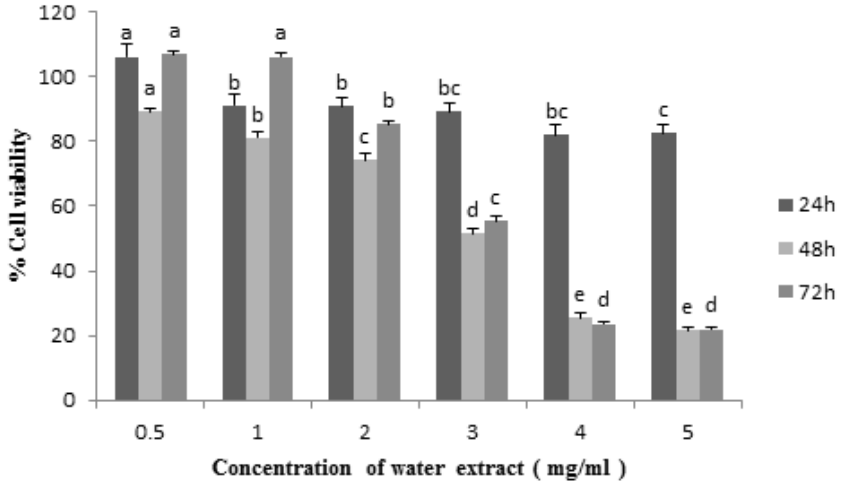

شکل ۱: میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌های به‌دست آمده از اندام هوایی گیاهان و روش استفاده از خیساندن در سنجش FRAP ( W : آب، M: متانول، E: اتانول) مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی در گیاه ریحان ۰/۱۱ mM ± ۰/۸۷۸ و در گل حنا این فعالیت برابر با ۰/۰۳ mM ± ۱/۳۰ می‌باشد که هر دو تحت اثر حلال آب و روش عصاره‌گیری خیساندن می‌باشد.

***نتایج به‌دست آمده از آزمون MTT***

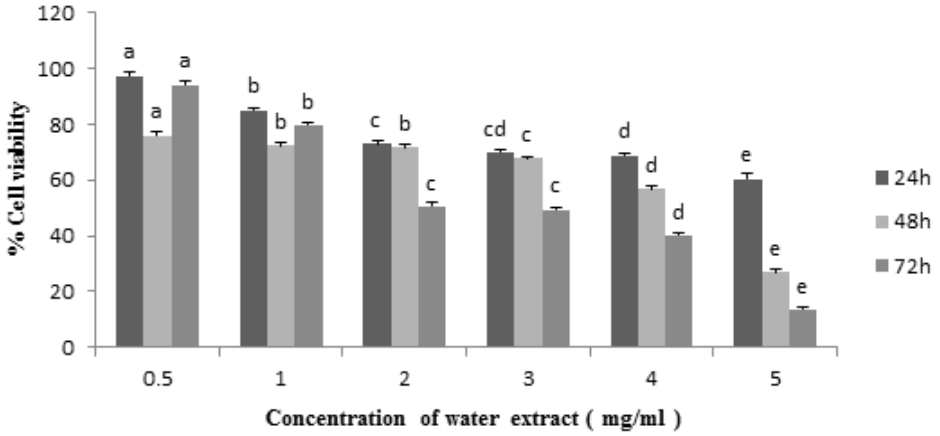
استفاده از روش کشت سلولی درک بهتری از تاثیر داروهای مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف به ما می‌دهد. در طی این پژوهش با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده‌های سلولی AGS درصد سلول‌های زنده مانده (Viability) پس از اثر دهی عصاره‌های آبی ریحان و گل حنا و انجام تست MTT محاسبه گردید. شکل ۲ اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف ریحان در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد و شکل ۳ بیانگر اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف گل حنا در زمان‌های مختلف می‌باشد.


www.SID.ir

Archive of SID




شکل ۲: اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره آبی ریحان در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر روی رده سلولی AGS . مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.




شکل ۳: اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره آبی گل حنا در زمان‌های مختلف (۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر روی رده سلولی AGS . مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج نشان داده است که عصاره آبی گیاه ریحان با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها و $IC_{50}$ سلول‌های سرطانی AGS در بازه زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت شده است. در بازده زمانی ۲۴ ساعت با این‌که کاهش چشم‌گیری در میزان درصد سلول‌های زنده مانده و IC50 سلول‌های سرطانی AGS مشاهده نشده است اما شاهد وجود تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال$p<۰/۰۵$ می‌باشیم. غلظت‌های ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت باعث کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده مانده و $IC_{50}$ سلول‌های سرطانی AGS شده‌اند. کمترین میزان $IC_{50}$ عصاره آبی گیاه ریحان مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت و برابر ۳/۰۲۲ ±۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

در مورد گیاه گل حنا، غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد و همچنین سایر غلظت‌های عصاره آبی این گیاه باعث کاهش معنی‌داری در میزان درصد


www.SID.ir

Archive of SID

زنده ماندن سلول‌ها و IC50 سلول‌های سرطانی AGS در بازه زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت شده است. در سایر غلظت‌ها و همچنین زمان‌های متفاوت اثردهی دارو نیز شاهد تفاوت معنی‌دار در درصد زنده ماندن سلول‌ها و IC50 در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ می‌باشیم. کمترین میزان IC50 عصاره آبی گیاه گل حنا مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت و برابر ۰/۰۰۱ ± ۲/۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. جدول ۱ میزان IC50 مربوط به سلول‌های سرطانی AGS که تحت تاثیر عصاره آبی ریحان و گل حنا در بازه‌های زمانی متفاوت قرار گرفته اند را نشان می‌دهد.

جدول ۱: میزان $IC_{50}$ مربوط به سلول های سرطانی AGS که تحت تاثیر عصاره آبی ریحان و گل حنا در بازه های زمانی متفاوت قرار گرفته اند را نشان می‌دهد.

| | سلول سرطانی AGS | | |
|---|---|---|---|
| گیاه | ۲۴h<br>$IC_{50}$ mg/ml | h۴۸<br>$IC_{50}$ mg/ml | h۷۲<br>$IC_{50}$ mg/ml |
| ریحان | * ۱۱/۹۷۶ ± ۰/۱۷۳ | * ۳/±۳۳۴ ۰/۰۰۲ | * ۳/۰۲۲ ± ۰/۰۰۲ |
| گل حنا | * ۶/۲۰۷ ± ۰/۰۰۱ | * ۳/۸۶۲ ± ۰/۰۰۱ | * ۲/۸۷ ± ۰/۰۰۱ |

**بحث**

فعالیت ضد رادیکالی گیاهان را می‌توان به‌وجود مونوترپن‌های اکسیژن داری نظیر لینالول و لینالیل استات نسبت داد به‌شکلی که اگر غلظت این مواد در گیاهان بالا برود، میزان فعالیت مهار کنندگی نیز در آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۶). از طرفی این ترکیبات با سایر موادی که در اسانس گیاهان وجود دارد خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانتی دارند . مثلا لینالول و اوژنول در کنار هم دارای خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانتی هستند و همچنین بر روی سایر ترکیبات فعال اثر گذاشته و فعالیت آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد که می‌توان قوی عمل کردن ریحان در حضور رادیکال‌های آزاد را به حضور این دو ماده نسبت داد. اصولا با افزایش ترکیبات فنولی تام خاصیت آنتی اکسیدانتی آن‌ها نیز بیشتر می‌شود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جا به جا شونده هیدروکسیل دارد (۱۷).

هاشمی و همکاران (۱۸) گزارش نمودند که بیشینه مقدار فعالیت آنتی اکسیدانتی در گیاه ریحان تحت اثر استخراج عصاره به‌روش اولتراسونیک و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که در این تحقیق نیز بیشینه میزان این فعالیت در گیاه ریحان نیز تحت اثر استخراج عصاره به‌روش اولتراسونیک بود.

سمیعی و همکاران (۱۹) میزان مهار کنندگی رادیکال آزاد گیاه ریحان را ۳۱/۲ درصد گزارش کردند. همچنین اظهار داشتند که هرچه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی یک گیاه زیاد باشد، میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی آن‌ها نیز زیاد خواهد بود.

Juliani و همکاران (۲۰) گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی در ریحان بنفش بیشتر از گونه ریحان سبز می‌باشد بررسی‌های آن‌ها نشان داد که میزان


www.SID.ir

Archive of SID

این فعالیت با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد.

بر اساس گزارشی که سازمان جهانی بهداشت منتشر کرده است حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان از دارو و روش‌های سنتی برای درمان بیماری های خود استفاده می‌کنند. ۷۸ درصد از موادی که دارای خاصیت ضد باکتری هستند و ۷۴ درصد از موادی که دارای ترکیبات و خواص ضد سرطانی هستند، مواد طبیعی هستند و یا از آن‌ها مشتق شدند. برخی از داروهای ضد سرطانی که از گیاهان تهیه شدند شامل: وینکریستین ، آیرینوتکان و اتوپوزاید می‌باشند (۲۱). از گیاهان دارویی به‌عنوان ترکیبات راهنما در سنتز داروها و یا به‌شکل مستقیم استفاده می‌شوند . در آسیا ۴۰ تا ۶۲ درصد از افرادی که به بیماری سرطان مبتلا هستند به استفاده از داروهای گیاهی به‌شکل عصاره تمایل دارند که این امر به این علت است که طی تحقیقاتی که بر روی این بیماران انجام دادند مزایای استفاده از این داروهای گیاهی به مراتب بیشتر از معایب آن‌ها می باشد (۲۱).

Kehkashan Arshad و همکارانش (۳) توانستند بر روی سلول های سرطانی سینه رده MCF – 7 مطالعه‌ای انجام دهند و اثر ضد سرطانی ریحان را بررسی کنند. آن‌ها در نتیجه‌ی تحقیقات خود به‌این موضوع پی بردند که عصاره متانولی ریحان دارای خاصیت ضد سرطانی بوده و توانسته سلول‌های سرطانی سینه را مهار کند. از سویی دیگر این حلال با قطبیت بالا توانسته میزان بالایی از ترکیبات فنولی را استخراج کند و که این بخش از تحقیقات آنها با نتایج ما مشابه بود. به‌این‌شکل که حلال متانول برای ریحان و اتانول برای گل حنا بیشترین میزان ترکیبات فنولی را در بر داشتند.

در مطالعه‌ای که Zarlaha و همکاران (۲۲) بر روی سلول‌های سرطانی HeLa و SKOV3 انجام دادند خاصیت ضد سرطانی و کشندگی عصاره اتانولی گیاه ریحان را بررسی کردند. در این مطالعه اثر برخی ترکیبات موجود در ریحان بر رو ی این سلول‌ها بررسی شد و به‌این نتیجه رسیدند که رزمارینیک اسید، لینالول و کافئیک اسید موجود در گیاه ریحان بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان اثر گذاشته و در یک بررسی مولکولی به این موضوع پی بردند که کافئیک اسید بیشترین خاصیت ضد سرطانی را داشته و نیز دارای خاصیت مهاری بر روی سنتز DNA دارد که اثر آن بر سلول‌های سرطان تخمدان بیشتر از سلول‌های HeLa می‌باشد.

لازم به ذکر است که عصاره ریحان، بیشترین اثر را علیه سلول‌های $HepG_2$، MCF-7 و $Caco_2$ در مقایسه با عصاره‌های دیگر نشان می دهد. اثرات آنتی اکسیدانتی و ضد انعقادی این گیاه و اثرات سینژستیکی احتمالی آن با داروهای شیمی درمانی معمولی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۳).

بررسی‌های دیگری نشان داده است که ترکیبات موجود در ریحان به‌طور بالقوه منبع خوبی برای آنتی اکسیدانت‌ها و مواد ضد سرطانی می‌باشد. در این مطالعه عصاره‌های ریحان را بر روی سلول‌های $NB_4$, HL-60, EACC اثر دادند و نتایج، بیانگر این مساله بود که عصاره ریحان دارای بیشترین اثر آنتی اکسیدانتی بر روی رده‌های سلولی $NB_4$ و HL-60 می‌باشد و حداقل اثر خود را روی رده سلولی EACC نشان داد (۲۴).

از جمله دیگر گیاهانی که دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشند می‌توان به گیاهان خانواده Alliaceae (سیر، پیاز و موسیر) و دیگر گیاهان خانواده نعناعیان (ریحان، نعناع، آویشن و رزماری) اشاره کرد (۲۵).

## نتیجه گیری

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش بیانگر این امر است که حلال‌های مورد استفاده که دارای قطبیت و ترکیبات شمیایی متفاوتی هستند در میزان متابولیت‌های استخراج شده و خواص آن‌ها اثر می‌گذارند. نتایج مربوط به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره آبی ریحان و گل حنا نشان


www.SID.ir

Archive of SID

دهنده‌ی این امر است که این گیاهان در غلظت‌های بالاتر دارای خاصیت کشندگی هستند و در مدت زمان طولانی‌تری اثر خود را می‌گذارند. مزیت این امر این است که می‌توان مطمئن بود که خاصیت کشندگی مربوط به متابولیت‌های گیاه است نه ترکیب شیمیایی حلال چرا که حلال‌های الکلی در غلظت‌های بالا توان آسیب زدن و حتی کشتن سلول‌های سالم را دارا می‌باشند. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدانت‌ها می‌باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانتی بوده می‌توانند باعث حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شوند. آنتی اکسیدانت‌های طبیعی سبب افزایش قدرت آنتی اکسیدانت‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیمارها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می‌شوند. پیشنهاد می‌شود که از این گیاهان به‌عنوان یک داروی گیاهی استفاده شود چرا که داروهای شیمیایی دارای اثرات جانبی و همچنین هزینه‌بر می‌باشند.

## منابع


1. Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants and the human needs. HerbMed Pharmacology. 2012; 1(1): 1–2.
2. Greenwell G, Rahman P. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. Int J Pharm Sci Res. 2015; 6(10): 4103-4112.
3. Kehkashan Arshad Q, Ahsana D, Bina S S, Nurul K, Huma A, et al. Anticancer activity of Ocimum basilicum and the effect of ursolic acid on the cytoskeleton of MCF-7 human breast cancer cells. Letters in Drug Design & Discovery. 2010; 726 -736.
4. Samiei A, Tabatabaei-Yazdi F, Mazaheri Tehrani M. An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacte. 2018; 74(15): 99 –107.
5. Motalleb G, Hanachi P, Kua SH, Fauziah O, et al. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Biological Science. 2005; 5(5): 648-653.
6. Brill, and Dean. Identifying and harvesting edible and medicinal plants in wild (and not-so-wild) places .1st Ed. New York: Harper Collins; 1994.
7. Jahan M, Ghalenoee Sh, Khamooshi A, Amiri MB. Evaluation of Some Agroecological Characteristics of Basil (*Ocimum basilicum* L.) as Affected by Simultaneous Application of Water-Saving Superabsorbent Hydrogel in Soil and Foliar Application of Humic Acid under Different Irrigation Intervals in a Low Input Cropping System. Journal of horticulture science. 2015; 2(29): 240-254.
8. Abou El-Soud NH, Debaes M, Abou El-Kassem L, Khali M. Chemical composition and antifungal activity of Ocimum basilicum L essential oil. Journal of Medical Sciences. 2015; 3(3): 374-379.
9. Sullivan C. Herbs. The Science, Culture, & Politics of Food. 2009; 3(4): 1–18.
10. Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A. et al. Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. Molecules. 2016; 21(8): 1–15.
11. Yeh Lee Y, Derakhshan MH. Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. Archives of Iranian Medicine. 2013; 16(6): 358-365.
12. Mandle L, Warren D, Hoffmann N, Peterson D. et al. conclusions about niche expansion in introduced *Impatiens*



www.SID.ir

Archive of SID

*walleriana* populations depend on method of analysis. 2010; 5(12): e15297.
13. Motavalizadeh Ardekani A, Hashemi M, Safakish M, Alem-Bagheri A, et al. Medical Treatment of Cancer in Traditional Iranian Medicine. Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine. 2012; 3(1): 3-20.
14. Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M. et al. Effective medicinal plant in cancer". Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine. 2017; 22(4): 982–985.
15. Hanachi P, Kua SH, Asmah R, Motalleb G. et al. Cytotoxic effect of *Berberis vulgaris* fruit extract on the proliferation of human liver cancer cell line ( HepG2 ) and its antioxidant properties. International journal of cancer research. 2006; 2(1): 1–9 .
16. Hanachi P, Roshanak Zarringhalami , Reihaneh Ramezani Tamijani. Investigation of Antioxidant Properties of *Polygonatum orientale Desf* and *Tilia dasystyla* Extracts by Different Methods and Solvents. Hormozgan Med J. 2018 ; 22(4):e86504.
17. Tooryan F, Azizkhani M. Antioxidant effect of the aerial parts of basil (*Ocimum basilicum*) and clary sage (Salvia sclarea) essential oils in Iranian white cheese. Iranian Food Science and Technology. 2017; 346-362.
18. Hashemi SMB, Ghorashi SH, Hadizadeh Z, Zarei Z. et al. Effect of amplitude of ultrasound-assisted solvent extraction and extraction temperature on the kinetics, thermodynamics , antioxidant and antimicrobial activity of *Ocimum basilicum L*. extract. Journal of agriculture science and thecnology. 2017; 19: 1517–1526.
19. Sameie A, Tabatabie-Yazdi F, Mazaheri Tehrani M. An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacteria. Food Science and Technology journal. 2018; 15(74): 99-107.
20. Juliani HR, Simon JE. Antioxidant Activity of Basil. Trends in new crops and new uses. 2002; 575–579.
21. Dorosti N, Zarabi S, Ahmadi S, Rostami R, et al. Anticancer activity evaluation of methanolic extract of *Allium Jesdianum* and *Nectaroscordeum Coelzi* against HeLa and K562 cell lines. Yafteh. 2017; 19(1): 31–41.
22. Zarlaha A, Koupkoumelis N, Stanojkovik T. Cytotoxic activity of essential oil and extract of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2014; 10: 907-917.
23. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Archives of Iranian Medicine. 2009; 12(6): 576–583.
24. Mahmoud G. Biological effects, antioxidant and anticancer activities of marigold and basil essential oils. Medicinal Plants Research. 2013; 7(10): 561–572.
25. Abdulsalami N, Javani Jouni F, Abdolmaleki P, Abdolmaleki Z. Assessment of anticancer properties of Rosmarinus officinalis L extract and gamma rays on cell viability of MCF-7, SKBR3, and HU02 cell lines. Pathobiology Research. 2017; 23 -36.


www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2019; 9(4)

# Investigation of Antioxidant properties of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* and their cytotoxic effect on the gastric cancer AGS cell line

Hanachi P, Ph.D.[1*], Salehizadeh Sh, Ms.c.[2] , Kiarostami K, Ph.D.[3] and Ramezani R, Ph.D.[4]

1. Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Alzahra university, Tehran , Iran.
2. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Alzahra university, Tehran, Iran.
3. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra university, Tehran , Iran.
4. Biomedical Research group, Women's Research Center, Alzahra university, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: p.hanachi@alzahra.ac.ir

Received: 22 Dec. 2018 Accepted: 10 Mar. 2019

## Abstract

**Aim:** This study was performed to evaluate the cytotoxic effect of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* aqueous extract on the gastric cancer of AGS cell line.

**Material and methods:** FRAP method was used to measure the antioxidant activity of *Ocimum basilicum* and *Ipatiems walleriana* extracts. After preparation of *O. basilicum* and I. *walleriana* aqueous extract, we measured the anticancer effect on growth of AGS cancer cells at 24, 48 and 72 hours by MTT.

**Results:** The highest antioxidant activity of *O. basilicum* and *I. walleriana* was measured by FRAP method for water solvent and water bath extraction method, which in *O. basilicum* was 0.778 ± 0.11 mM and in *I.walleriana* 1.30 ± 0.03 mM. Based on the obtained data of the MTT test, the highest toxicity of the extract occurs 72 hours after adding the extract to the cells. The lowest amount of IC50 of the aqueous extract of *O. basilicum* was measured at 0.012 ± 0.002 mg / ml and in *I. walleriana* extract was 2.87 ± 0.001 mg / ml., which had a significant difference ( $p < 0.05$).

**Conclusion:** The results of the anticancer study of the aqueous extract of *O. basilicum* and *I. walleriana* indicate that these plants have a cytotoxicity effect in the higher concentrations and need a long duration for their effects.

**Keywords:** *Ocimum basilicum, Impatiens walleriana*, FRAP method, MTT test, Gastric cancer


www.SID.ir