

The cytotoxic effects of different concentrations of *Scrophularia striata* extract on human colorectal cancer cells (HT29)

Razieh Bigdeli¹, Fahimeh Baghbani-Arani^{1*}, Reza Ahangari Cohan²

1. Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Department of Pilot Nanobiotechnology, New Technology Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

(Received: 2017/04/26 Accept: 2017/08/9)

Abstract

Background: Today, there are considerable efforts to find plant substances as new drugs in cancer therapy. *Scrophularia striata* plants are well-known in traditional medicine in Iran. This prompted us to investigate the anti-tumor effects of *Scrophularia striata* (an Iranian species) extract on human colorectal cancer (HT29) and normal (HEK 293) cell lines.

Materials and Methods: In this experimental study, an extract of *Scrophularia striata* was prepared by maceration method. Then, the cytotoxicity effect of different concentrations of the *Scrophularia striata* extract was analyzed by MTT assay on HT29 and HEK293 cells and IC₅₀ for extracts was determined. Statistical analysis was done using SPSS software. The resulting data were analyzed using ANOVA test.

Findings: Results of this study showed a significant cytotoxicity activity of *Scrophularia striata* extract against HT29 cells in a dose-dependent manner. So, *Scrophularia striata* extract at a concentration of 10 mg/ml to 0.1 mg/ml have toxic effects on the HT29 cells ($p < 0.05$). However, this extract doesn't have any cytotoxic effect on normal cells.

Conclusion: The *Scrophularia striata* extract has toxic effects on tumor HT29 cell line, so it can be used as an anti-cancer drug with specific concentration and low side-effects.

Keywords: Anticancer effect, colorectal cancer, *Scrophularia striata*, MTT assay

*Corresponding author: Fahimeh Baghbani-Arani
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

ارزیابی اثر سایتوتوکسیک غلظت های مختلف عصاره گل میمونی شیاردار بر رده سلولی سرطان کلورکتال (HT29)

راضیه بیگدلی^۱، فهیمه باغبانی آرانی^{۱*}، رضا آهنگری کهن^۲

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران.

۲. بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، گروه تکنولوژی های نوین، انستیتو پاستور تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۱۸

چکیده:

سابقه و هدف: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان به دلیل عوارض جانبی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه گیاه گل میمون شیاردار در طب سنتی ایران بسیار مطرح می باشد لذا در مطالعه حاضر، اثرات ضد توموری عصاره گیاه بومی گل میمون شیاردار بر روی رده های سلولی سرطان کولون (HT29) و نرمال HEK293 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش بررسی: در این مطالعه تجربی، بعد از جمع آوری گیاه گل میمون شیاردار، عصاره گیری به روش ماستراسیون انجام یافت. سپس غلظت های مختلفی از عصاره با تست MTT بر روی رده های سلولی سرطان کلورکتال HT29 و سلول نرمال کلیه جنینی انسان (HEK293) مورد آنالیز قرار گرفت و میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (IC50) عصاره ها تعیین شد. محاسبات آماری با نرم افزار SPSS انجام شد و مقایسه داده ها با روش آنالیز واریانس (ANOVA) صورت پذیرفت.

یافته ها: نتایج آنالیز سمیت سلولی نشان داد عصاره گیاه گل میمون شیاردار روی رده سلولی سرطان کلورکتال مهار وابسته به دوز داشت. به طوری که عصاره گل میمون از غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تا غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر بر رده سلولی HT29 اثرات توکسیک دارد ($p < 0/05$) در حالی که این عصاره اثرات سمی روی رده سلولی نرمال ندارد.

نتیجه گیری: عصاره گل میمون دارای اثرات توکسیک بر سلول های توموری HT29 می باشد. بنابراین می تواند به عنوان دارویی با پتانسیل ضد سرطانی که در غلظت خاصی موثر بوده و اثرات جانبی کمی دارد مطرح گردد.

واژگان کلیدی: اثر ضد سرطانی، سرطان کلورکتال، گل میمون شیاردار، آنالیز MTT

* نویسنده مسئول: فهیمه باغبانی آرانی

پست الکترونیک: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

مقدمه:

HT29 و سلول نرمال کلیه جنینی انسان (HEK293) پرداخته شده است.

مواد و روشها:

تهیه گیاه و عصاره گیری

این مطالعه تجربی و آزمایشگاهی بوده و از فروردین تا اسفند ماه ۱۳۹۵ انجام پذیرفت. پس از جمع آوری گیاه گل میمون شیاردار در اردیبهشت ۱۳۹۴ با نمونه هرباریومی موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تهران مطابقت داده شده و نام علمی گیاه توسط متخصص مربوطه مورد تأیید قرار گرفت. سپس از بخش هوایی این گیاه به روش ماستراسیون عصاره هیدروالکلی تهیه گردید. برای این منظور ابتدا گیاه تازه را با آب شستشو داده و توسط دستگاه خرد کن به طور کامل خرد شد. سپس گیاه خرد شده (۲۰ گرم) به مدت ۴۸ ساعت در حلال ۸۰٪ اتانول غوطه‌ور و محلول بدست آمده از کاغذ صافی گذرانده می شود و حلال آن توسط دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر می شود. سپس ماده خشک بدست آمده (یک گرم) در آب مقطر حل شد. در نهایت برای انجام تست MTT محلول بدست آمده در محیط کشت رقیق و با فیلتر سرسرنگی ۲۰۰ نانومتر فیلتر شد و در فریزر نگهداری گردید (۲۳).

کشت سلولی

رده سلولی HT29 سرطان کلورکتال و رده سلول های نرمال کلیه جنینی انسان HEK293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Biosera, USA) غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) ۱٪ (v/v) پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شدند و در رطوبت ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور CO2 دار قرار داده شدند (۲۲). تا زمانی که آماده برای تست MTT گردند.

بررسی میزان سمیت سلولی عصاره با روش MTT assay

به منظور بررسی سمیت سلولی عصاره گیاه گل میمون شیاردار، از تست رنگ سنجی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) (Diphenyltetrazolium Bromide) استفاده شد. ابتدا با شمارش سلولی، حدود 5×10^4 سلول در هر چاهک کشت داده شدند. غلظت های ۱، ۱، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های گیاه گل میمون شیاردار در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی HT29 و نرمال HEK293 تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Aldrich Sigma، آلمان) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵٪ نگه داشته شدند. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال های فورمازان تولید شده توسط سلول های زنده در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید. در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الیزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

سرطان یا رشد و تکثیر بی رویه سلول ها عامل بخش عظیمی از مرگ و میرها در دنیا می باشند. در بین انواع مختلف سرطان‌ها، سرطان روده بزرگ، سومین عامل مرگ و میر در جهان است. طبق آمار موجود در حال حاضر سومین سرطان شایع در بین مردان (۵ درصد) و زنان (۵/۵ درصد) است (۱)، (۲). درمان این نوع سرطان اغلب به علت متاستاز های متعدد با محدودیتهایی همراه بوده است و عمده ترین درمان مورد استفاده جراحی به همراه شیمی درمانی می باشد که عوارض جانبی زیادی داشته و در بسیاری از موارد درمان موقفی نمی باشد (۳). بنابراین استفاده از داروهای مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر برای کنترل و نیز درمان این نوع سرطان ها مورد نیاز می باشد. در این راستا اخیراً ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴-۷).

گل میمونی شیاردار (*Scrophularia striata*) یک گیاه دارویی در ایران و برخی کشورهای دیگر نظیر چین می باشد که در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلفی استفاده شده است. این گیاه از تیره گل میمون (*Scrophulariaceae*) بوده، و خواص دارویی آن خصوصاً در رابطه با سل غده ای یا اسکورو فلوز شناخته شده که نام لاتین این گیاه نیز از آن گرفته شده است. جنس *Scrophularia* در ایران دارای ۶۰ گونه است که ۲۸ گونه آن انحصاری ایران است. گیاهانی خودرو غالباً علفی یا دارای اعضای چوبی و به ندرت به صورت درخت اند. این گیاه به نام گل ساروزبی و تشنه داری نیز معروف است. گونه های مختلف اسکروفولاریا جایگاه ویژه ای در درمان بیماری های متفاوت پیدا کرده اند. در اروپا از گونه‌ای از این گیاه برای مداوای غدد متورم، اولسراها و زخم های عفونی، درد گوش، بواسیر و زخم هایی که دیر التیام می یابند، استفاده می شود (۸-۱۰). در ایران این گیاه در درمان درد، التهاب و عفونت چشم، اختلالات گوارشی، زخم های عفونی، کورک و هموروئید به کار می رود (۱۱). این گیاه غنی از ترکیبات گلیکوزیدهای iridoid (مانند aucubin و catalpol) است (۱۲). iridoid ها گروه وسیعی از سیکلو پنتان-پیران مونو تریپنویدها را تشکیل می دهند که در برخی گیاهان تزئینی به وفور وجود دارد و ساختار و ویژگی هایشان به خوبی شناخته شده است (۱۳-۱۵). تاکنون فعالیت ضد میکربی، ضد توموری و ضد التهاب این ترکیبات مشخص شده (۱۶) و گزارش هایی هم از اثر محافظتی geniposide (نوعی iridoid) در مقابل سرطان پوست و ریه وجود دارد (۱۸، ۱۷).

طی مطالعات اخیر، اثرات سایتوتوکسیک عصاره گیاه گل میمونی شیاردار به همراه اثرات آپوپتوتیک آن بر روی رده های سلولی N1۱۳۲۱ (آستروسیتوما) (۱۹)، فیبروبلاست (۲۰) و Jurkat human leukaemia (۲۱) مورد بررسی قرار گرفت و اخیراً دو مطالعه به اثر حفاظتی این عصاره گیاهی روی سلول های عصبی اشاره دارد (۲۳، ۲۲). با توجه به مطالعات اخیر و مشاهده اثر سایتوتوکسیک این گیاه دارویی، فرضیه اثر ضد سرطانی آن تقویت می گردد. که در این راستا مطالعه حاضر برای اولین بار به ارزیابی سمیت عصاره گل میمون شیاردار بر روی رده سلول سرطان کلورکتال

ترتیب مقدار IC50 طی ۲۴ ساعت برای عصاره گل میمون شیاردار مقدار ۱۱/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد.

نتایج بدست آمده از اثر غلظت‌های مختلف از عصاره گل میمون شیاردار بر رده سلول نرمال HEK توسط تست MTT نیز در نمودار ۲ نشان داده شده است. آنالیزهای آماری نشان می‌دهند که عصاره گل میمون شیاردار در مقایسه با گروه کنترل، اثر سیتوتوکسینی روی سلول‌های HEK ندارد ($p > 0.05$).

بحث:

در این مطالعه پس از تهیه عصاره گیاه گل میمون سلول‌های سرطان کولون HT29 و سلول نرمال HEK تحت تیمار غلظت‌های مختلفی از این عصاره قرار گرفت. نتایج نشان دادند که این عصاره اثر کشندگی روی سلول سرطان کولون دارد و این اثر وابسته به دوز می‌باشد بطوری‌که از بین غلظت‌های ارزیابی شده کمترین غلظت موثر ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد و با افزایش غلظت اثر کشندگی نیز افزایش می‌یابد. در مطالعه آزادمهر و همکارانش (۲۰۱۳) که روی رده سلولی لوکمی مطالعه کرده بودند کمترین غلظت موثر ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین در این مطالعه IC50 برابر ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در مقایسه با IC50 مطالعه حاضر (۱۱/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بسیار کمتر می‌باشد (۲۱). این یافته‌ها نشان می‌دهد اگرچه عصاره گیاه گل میمون شیاردار می‌تواند اثر توکسیک روی سلول‌های سرطان کولون داشته باشد اما نسبت به سرطان لوکمی دوز بسیار بالاتری برای مشاهده اثر درمانی نیاز است. در تکمیل این یافته لازم است دوزهای متنوع دیگر روی بقیه رده‌های سلولی نیز بررسی شود.

آزادمهر و همکارانش (۲۰۱۳) همچنین اثر عصاره گیاه گل میمون شیاردار را روی فرایند آپوپتوز سلولی نیز بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه می‌تواند سبب مهار تکثیر سلول‌های لوسمی از طریق القای آپوپتوز شود (۲۱). همچنین در مطالعه دیگری که توسط همین نویسندگان انجام شده است اثرات حفاظتی عصاره گیاه گل میمونی شیاردار در برابر استرس

۱۰۰× (جذب نوری سلول‌های کنترل/ جذب نوری سلول‌های تیمار شده) =
میزان بقای سلولی

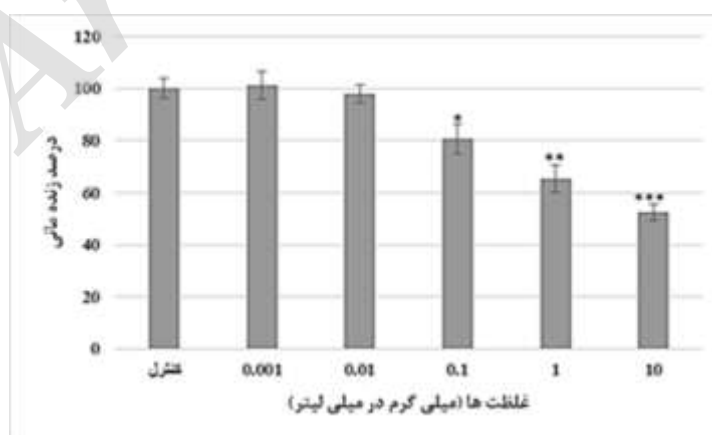
در همه تست‌ها کنترل مثبت و منفی (محیط کشت سلول بدون عصاره)، لحاظ شده و تست‌ها با ۸ بار تکرار انجام شد. همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد (۲۴).

تمامی نتایج بدست آمده در این مطالعه براساس حداقل ۸ تکرار استوار می‌باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و محاسبه P value مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p < 0.05$ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

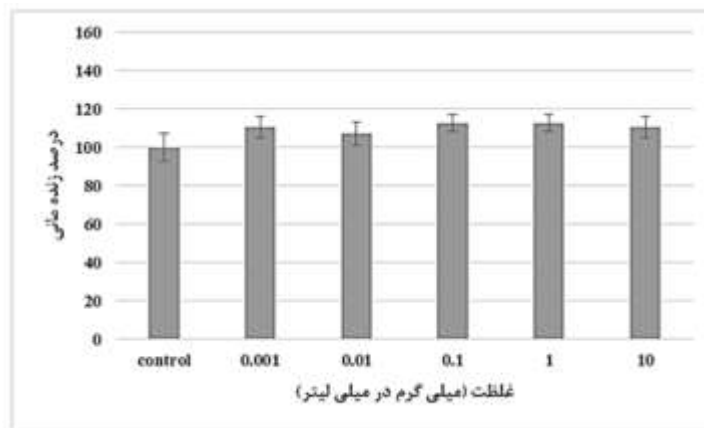
نتایج:

جهت بررسی اثرات عصاره گل میمون شیاردار بر رده سلول سرطانی HT29، غلظت‌های مختلفی از عصاره تهیه شده و هر یک از غلظت‌ها به صورت گروه‌های مستقل بر رده‌های سلولی مورد نظر آزمایش شدند. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است عصاره گل میمون شیاردار در مقایسه با گروه کنترل (محیط کشت سلول بدون عصاره)، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، حدود ۴۸٪ سمیت را نشان می‌دهد و این اثر سمی از لحاظ آماری معنادار می‌باشد ($p < 0.001$). همچنین طبق آنالیزهای آماری مشخص گردید که غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گل میمون شیاردار حدود ۳۵٪ سمیت بر سلول‌های HT29 اعمال می‌کند ($p < 0.01$). غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز حدود ۱۹٪ اثرات توکسیک اعمال کرده است ($p < 0.05$). اما در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گل میمون هیچ اثر توکسیکی بر رده سلولی HT29 مشاهده نشد ($p > 0.05$).

در مجموع مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول سرطانی پس از گذشت ۲۴ ساعت اختلاف معناداری را نشان می‌دهد. به طوری‌که اثر کشندگی بر روی رده سلولی سرطانی HT29 وابسته به غلظت عصاره است و بدین



نمودار ۱ نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره گل میمون شیاردار بر رده سلولی HT29 به روش MTT. داده‌ها به صورت درصد میانگین زنده ماندن \pm درصد انحراف معیار بیان شده‌اند. ***, **, * نشان دهنده اختلاف معناداری با گروه کنترل به ترتیب با $p < 0.001$, $p < 0.01$ و $p < 0.05$ می‌باشد.



نمودار ۲ نتایج اثر غلظت های مختلف عصاره گل میمون شیاردار بر رده سلولی HEK به روش MTT. داده ها به صورت درصد میانگین زنده ماندن \pm درصد انحراف معیار بیان شده اند.

در این بررسی، اثرات عصاره گیاه در بهبود حافظه در موش های سوری با استفاده از متد ماز آبی موریس مطالعه شد. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر بهبود حافظه از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی ناشی از تیمار با عصاره بود (۲۵).

نتیجه گیری:

به طور کلی این نتایج نشان می دهند که به طور قابل توجهی، عصاره هیدروالکی گیاه گل میمون دارای اثرات سمی بر سلول توموری می باشد اما بر سلول نرمال اثرگذار نیست و این یکی از ویژگی های بسیار ارزشمند جهت یافتن یک ترکیب ضد سرطانی مناسب می باشد. زیرا که یکی از مشکلات بسیار بزرگ داروهای شیمی درمانی در این است که تمایزی بین سلول های نرمال و توموری قائل نیستند و هر سلولی که دارای تکثیر بالا باشد را مورد هدف قرار می دهد. مطالعه حاضر برای اولین به مقایسه اثرات عصاره گل میمون شیاردار در سلول های توموری و سلول های نرمال پرداخته است.

تشکر و قدردانی:

تحقیق حاضر حاصل نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک ملکولی (دانشگاه پیشوا واحد ورامین) بوده است که در آزمایشگاه شرکت دانش بنیان بیوتکنولوژی جاوید انجام شده است. نویسندگان از کلیه همکاران و پرسنل گرامی آزمایشگاه و سایر عزیزان بویژه افرادی که در جمع آوری گیاه ما را یاری داده اند، تشکر و قدردانی می نماید.

منابع:

1. Fock MM. The epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40(3): 250-260.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2016; 27: 310912.

اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه پس از تیمار سلول های رده PC12 در محیط کشت با آب اکسیژنه و نیز عصاره گیاه، بقای سلول ها و آپوپتوز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان دادند که عصاره گیاه می تواند اثرات اکسیداتیو حاصل از آب اکسیژنه را مهار کند. همچنین به طرز جالبی در این مطالعه نشان داده شد که عصاره گل میمون شیاردار می تواند القاء آپوپتوز توسط آب اکسیژنه را هم مهار کند. به عبارتی دیگر اگرچه مطالعات قبلی نشان داده بود که گل میمون با القاء آپوپتوز سبب مرگ سلول های سرطانی می شود اما در این مطالعه نشان داده شده است که این گیاه از القاء آپوپتوز جلوگیری می کند (۲۲). در واقع می توان چنین استنتاج کرد که عصاره گل میمون باعث اثرات محافظتی می شود و در شرایط استرس سبب مهار آپوپتوز و در شرایط توموری باعث از بین رفتن سلول های توموری می شود.

در راستای تایید این بحث در مطالعه حاضر مشاهده شد که عصاره این گیاه بر روی رده سلولی نرمال HEK اثر سمی ندارد. به عبارتی این نتایج به طور کامل بیانگر آن است که عصاره گل میمون شیاردار دارای اثرات محافظتی می باشد. خواه این اثرات به صورت توکسیک در سرطان اعمال شود خواه به صورت آنتی اکسیداتیو و ضد آپوپتوز در شرایط استرس های مختلف از جمله استرس اکسیداتیو باشد. در راستای اثرات محافظتی گل میمون شیاردار می توان به تحقیق انجام یافته توسط Jeong و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز اشاره کرد. این محققان به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و افزایش شناخت ادراکی عصاره گونه ای از گیاه گل میمون شیاردار پرداختند.

3. Gralla RJ. Understanding and managing chemotherapy side effects. *Cancer Care Help and Hope*. 2005; Available from: URL://www.cancercare.org.
4. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 347-377.
5. Jacobo-Herrera NJ, Jacobo-Herrera FE, Alejandro ZD, Adolfo AC, Heinrich M, Carlos PP. Medicinal

- plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J Ethnopharmacol* 2015; S0378-8741.
6. Damery S, Gratus C, Grieve R. The use of herbal medicines by people with cancer: a cross-sectional survey. *Br J Cancer* 2011; 104(6): 927-933.
7. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja PS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5892-5908.
8. Galindez JDS, Lanza D and Matellano F. Biologically active substances from the genus *Scrophularia*. *Pharm Biol* 2002; 40: 45-59.
9. Bas E, Recio MC, Manez S, Giner RM, Escandell, JM, Lopez-Gines C et.al. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside A. *Eur J Pharmacol* 2007b; 555: 199-210.
10. Diaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Silvan AM, De Santos J and Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in-vitro anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2004; 74: 2515-2526.
11. Amin Gh. Popular Medicinal Plants of Iran. Iranian Research Institute of Medicinal Plants, Tehran 1991; 80-1.
12. Park SU, Park N, Kim YK, Suh SY, Eom SH and Lee SY. Application of plant biotechnology in the medicinal plant *Rehmannia glutinosa*. *J. Med. Plants Res* 2009; 3: 1258-1263.
13. Boros CA and Stermitz FR. Iridoids, an updated review. Part 1. *J. Nat. Prod* 1990; 53: 1055-1147.
14. Oh CH. Monitoring of residual pesticides in herbal drug materials of Korea and China. *Bull. Environ. Toxicol* 2009; 82: 639-643.
15. El-Nagar LJ and Beal JL. Iridoids, a review. *J. Nat. Prod* 1980; 43: 649-707.
16. Recio MC, Giner RM, Manez S and Rios JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med* 1994; 60: 232-234.
17. Ueda S, Iwashima Y and Tokuda H. Production of antitumor promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. *J. Nat. Prod* 1991; 54: 1677-1680.
18. Ueda S, Tokuda H, Iwashima A and Nishino H. Chemoprevention of skin and lung cancer by *Gardenia Iridoid*. Proceeding of the International Congress on Natural Products Research, Halifax, England 1994.
19. Ardeshiri Lajimi AAR, Rezaei T, Barzegar M, Moghadamnia SH, Rezaei MB. Study of Anti-Cancer Property of *Scrophularia striata* Extract on the Human Astrocytoma Cell Line (1321). *Iran J Pharm Res* 2010; 9(4): 403-410.
20. Ardeshiri Lajimi AAR, Barzegar M, Rezaei Tavirani M, Hashemi M, Heydari S, Moghadamnia SH, et al. Effects of *Scrophularia striata* extract on human fibroblast cells. *Med Sciences J Islamic Azad Uni* 2009; 19: 168-172. [in Persian].
21. Azadmehr A, Hajiaghaee R, Mazandarani M. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by *Scrophularia striata* in a human leukaemia cell line. *Cell Prolif* 2013; 46(6): 637-643.
22. Azadmehr A, Oghyanous KA, Hajiaghaee R, Amirghofran Z, Azadbakht M. Antioxidant and neuroprotective effects of *Scrophularia striata* extract against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(8): 1135-1141.
23. Salavata P, Ramezanib M, Monsef-Esfahanic HR, Hajiaghad R, Parsae M, Tavajohie S, et al. Neuroprotective Effect of Total and Sequential Extract of *Scrophularia striata* Boiss. in Rat Cerebellar Granule Neurons Following Glutamate-Induced Neurotoxicity: An In-vitro Study. *Iran J Pharm Res* 2013; 12(2): 389-394.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
25. Jeong E, Lee K, Kim S, Sung S, Kim Y. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 588(1): 78-84.