

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 <sup>۱\*</sup> Ph.D.، شقایق صالحی زاده <sup>۲</sup> M.Sc.، ریحانه رضانی <sup>۳</sup> Ph.D.، خدیجه کیارستمی <sup>۴</sup> Ph.D.

۱- دانشگاه الزهراء، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

۲- دانشگاه الزهراء، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

۳- دانشگاه الزهراء، گروه پژوهشی بیومدیکال، بخش پژوهشکده زنان، تهران، ایران

۴- دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم زیستی، گروه فیزیولوژی گیاهی، تهران، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱

## چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها 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 اندازه‌گیری شده ریحان و گل حنا با روش FRAP مربوط به حلال آب و روش عصاره‌گیری خیساندن بود که در ریحان  $0/11 \pm 0/878$  میلی‌مولار و در گل حنا  $0/03 \pm 1/30$  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  $0/002 \pm 3/022$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در گل حنا برابر  $0/001 \pm 2/87$  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

## 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 هستند. آن‌ها به‌راحتی می‌توانند به‌شکل خوراکی و به‌عنوان بخشی از غذای مورد مصرف بیمار استفاده شوند (۲).

آنتی‌اکسیدانت‌ها 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 اثرورینوزا نشان داده است. اخیراً با توجه به اثرات مفید آنتی‌اکسیدانت‌ها، به‌ویژه آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی، در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، علاقه به پیدا کردن آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی از منابع گیاهی افزایش پیدا کرده است. مطالعات در مورد گیاهان دارویی نشان می‌دهد که اکثر آن‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی قابل توجهی هستند. گیاهان دارویی با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی 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 او ۴-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.  $\alpha$ -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 کایکول، سیترال، اوژنول، سینئول، ژرانیول، کامفور و متیل سینامات. این گیاه در طب سنتی به‌عنوان ضد اسپاسم معده تجویز می‌شود. با این‌حال، اخیراً از عصاره‌های این گیاه به‌عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده‌های زیادی شده است. اسانس ریحان دارای خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی نیز می‌باشد (۸). ریحان دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی می‌باشد. آنتی‌اکسیدانت‌های 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

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 آنتی‌اکسیدانت‌ها 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 آنتی‌اکسیدانت طبیعی به جای آنتی‌اکسیدانت‌های 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 به روش خیساندن (Maceration):** مقدار ۰/۱ گرم از نمونه را در ۱۰ میلی لیتر حلال آب مقطر، اتانول ۸۰ درصد و متانول

اولیه‌ی بیماری می‌توان به سوزش، درد معده در ناحیه بالای شکم، بی‌اشتهایی 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، رفلکس معده، ورم معده و پولیپ مزمن معده می‌باشند و یا افرادی که پیشینه ابتلا به سایر سرطان‌ها 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 به دلیل 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 به دلیل 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

فیبروبلاستی و تعیین  $IC_{50}$  این ترکیبات، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. نمک MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی که 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) به صورت محلول درآمده است. هرچه سلول‌ها فعالتر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود.

جذب نوری با استفاده از دستگاه جذب نوری (Cytation™ Biotek, USA) Multi-Mode 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 به هر 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 به مدت ۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شد. سپس محلول رویی از هر چاهک حذف و مقدار ۱۰۰ 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).

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

**اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانتی احیا آهن (FRAP):** در این روش توانایی عصاره‌ها در احیای یون‌های فریک ( $Fe^{3+}$ ) در حضور آنتی‌اکسیدانت‌ها اندازه‌گیری می‌شود. با احیای یون فریک و تبدیل آن به یون فرو ( $Fe^{2+}$ ) 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 به مدت ۵ دقیقه درون بن ماری با درجه حرارت ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه به آن 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 به مدت 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 به داخل فالکون منتقل و سانتریفیوژ شدند و پس از خارج کردن محلول رویی شمارش شدند. پس از شمارش میزان ۸۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت 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**

= درصد سلول های زنده

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

IC<sub>50</sub> پس از رسم منحنی با به کارگیری غلظت های مختلف عصاره و درصد سلول های زنده محاسبه شد.

### آنالیز آماری

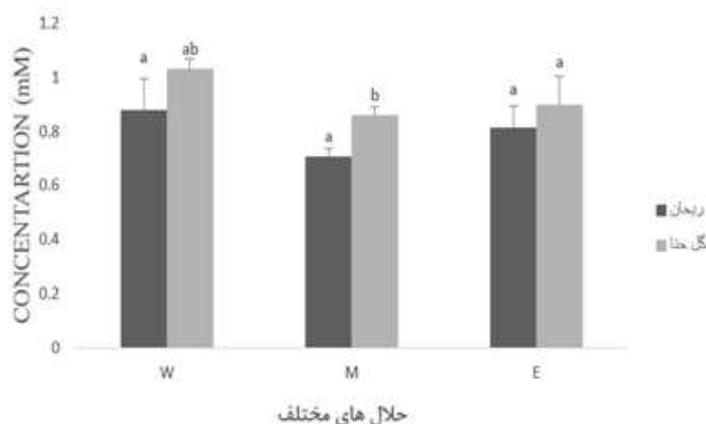
به منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل خود، یعنی حلال (آب، متانول و اتانول) و زمان اثر دهی عصاره ها (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) از آزمون مقایسه میانگین یک متغیر در چندین گروه (One – way ANOVA) در سطح احتمال  $p < 0.05$  استفاده شد که برای این منظور برنامه SPSS نسخه ۲۴ مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش های انجام شده با سه بار تکرار انجام شده است.

### نتایج

#### مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره ها به وسیله

#### اندازه گیری توان آنتی اکسیدانتی احیا آهن (FRAP)

میزان فعالیت عصاره های حاصل از دو گیاه *Ocimum basilicum* و *Impatiens walleriana* در حلال های آب، متانولی، اتانولی که با روش استخراج خیساندن عصاره گیری شده بودند نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی در گیاه ریحان  $0.878 \pm 0.11$  میلی مولار و در گل حنا این فعالیت برابر با  $0.730 \pm 0.03$  میلی مولار می باشد که هر دو تحت اثر حلال آب و روش عصاره گیری خیساندن می باشد که تفاوت معنی داری را در سطح  $p < 0.05$  نشان داد (شکل ۱).

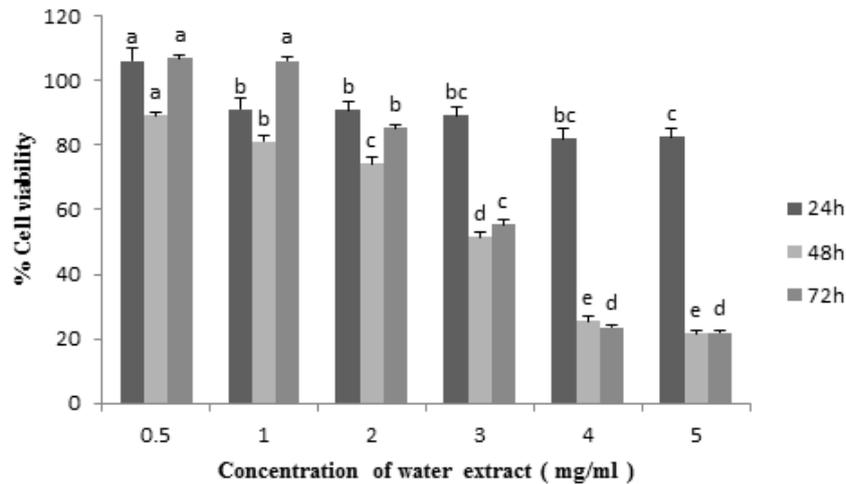


شکل ۱: میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره های به دست آمده از اندام هوایی گیاهان و روش استفاده از خیساندن در سنجش FRAP (W: آب، M: متانول، E: اتانول) مقادیر بین میانگین ها با حروف متفاوت در ستون های مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی در گیاه ریحان  $0.878 \pm 0.11$  mM و در گل حنا این فعالیت برابر با  $0.730 \pm 0.03$  mM می باشد که هر دو تحت اثر حلال آب و روش عصاره گیری خیساندن می باشد.

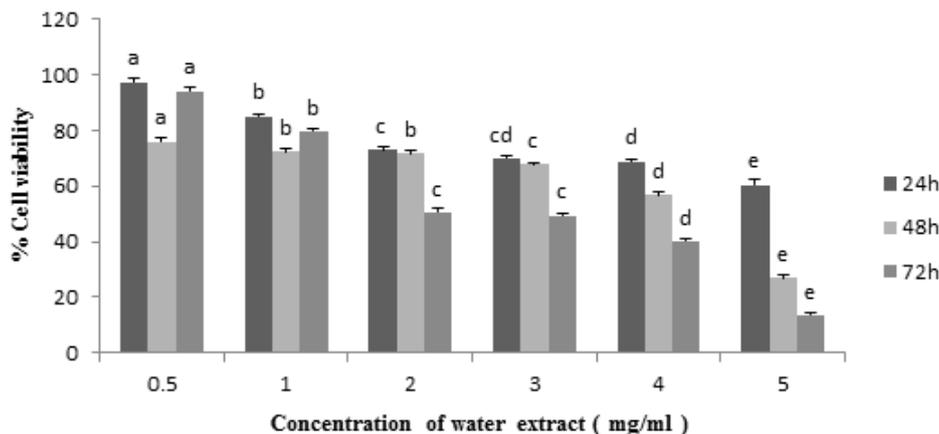
دهی عصاره های آبی ریحان و گل حنا و انجام تست MTT محاسبه گردید. شکل ۲ اثر سیتوتوکسیک غلظت های مختلف ریحان در زمان های مختلف را نشان می دهد و شکل ۳ بیانگر اثر سیتوتوکسیک غلظت های مختلف گل حنا در زمان های مختلف می باشد.

### نتایج به دست آمده از آزمون MTT

استفاده از روش کشت سلولی درک بهتری از تاثیر داروهای مختلف بر روی رده های سلولی سرطان های مختلف به ما می دهد. در طی این پژوهش با استفاده از میزان جذب های خوانده شده در رده های سلولی AGS درصد سلول های زنده مانده (Viability) پس از اثر



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.

میلی‌لیتر، ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت باعث کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده ماندن سلول‌ها و  $IC_{50}$  سلول‌های سرطانی AGS شده‌اند. کمترین میزان  $IC_{50}$  عصاره آبی گیاه ریحان مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت و برابر  $3/022 \pm 0/002$  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

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 بازه زمانی ۲۴ ساعت با این‌که کاهش چشم‌گیری در میزان درصد سلول‌های زنده ماندن و  $IC_{50}$  سلول‌های سرطانی AGS مشاهده نشده است اما شاهد وجود تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال  $p < 0/05$  می‌باشیم. غلظت‌های ۳ میلی‌گرم بر

زمانی ۷۲ ساعت و برابر  $0/001 \pm 2/87$  میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. 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 می دهد.

زنده ماندن سلول ها و  $IC_{50}$  سلول های سرطانی AGS در بازه زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت شده است. در سایر غلظت ها و همچنین زمان های متفاوت اثردهی دارو نیز شاهد تفاوت معنی دار در درصد زنده ماندن سلول ها و  $IC_{50}$  در سطح احتمال  $p < 0/05$  می باشیم. کمترین میزان  $IC_{50}$  عصاره آبی گیاه گل حنا مربوط به بازه

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 می دهد.

سلول سرطانی AGS			گیاه
h۷۲ $IC_{50}$ mg/ml	h۴۸ $IC_{50}$ mg/ml	۲۴h $IC_{50}$ mg/ml	
$3/022 \pm 0/002^*$	$3/334 \pm 0/002^*$	$11/976 \pm 0/173^*$	ریحان
$2/87 \pm 0/001^*$	$3/862 \pm 0/001^*$	$6/207 \pm 0/001^*$	گل حنا

#### بحث

فعالیت ضد رادیکالی گیاهان را می توان به وجود مونوترپن های اکسیژن داری نظیر لینالول و لینالیل استات نسبت داد به شکلی که اگر غلظت این مواد در گیاهان بالا برود، میزان فعالیت مهار کنندگی نیز در آن ها افزایش می یابد (۱۶). از طرفی این ترکیبات با سایر موادی که در اسانس گیاهان وجود دارد خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانتی دارند. مثلاً لینالول و اوژنول در کنار هم دارای خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانتی هستند و همچنین بر روی سایر ترکیبات فعال اثر گذاشته و فعالیت آن ها را نیز افزایش می دهد که می توان قوی عمل کردن ریحان در حضور رادیکال های آزاد را به حضور این دو ماده نسبت داد. اصولاً با افزایش ترکیبات فنولی تام خاصیت آنتی اکسیدانتی آن ها نیز بیشتر می شود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال های آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد

حلقه های آروماتیک و ماهیت گروه های 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 به روش اولتراسونیک و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد که در این تحقیق نیز بیشینه میزان این فعالیت در گیاه ریحان نیز تحت اثر استخراج عصاره به روش اولتراسونیک بود.

سمیعی و همکاران (۱۹) میزان مهار کنندگی رادیکال آزاد گیاه ریحان را  $31/2$  درصد گزارش کردند. همچنین اظهار داشتند که هرچه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی یک گیاه زیاد باشد، میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی آن ها نیز زیاد خواهد بود.

Juliani و همکاران (۲۰) گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی در ریحان بنفش بیشتر از گونه ریحان سبز می باشد بررسی های آن ها نشان داد که میزان

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 بیماری‌های 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 می‌باشد (۲۱).

Kehkashan Arshad و همکارانش (۳) توانستند بر روی سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مطالعه‌ای انجام دهند و اثر ضد سرطانی ریحان را بررسی کنند. آن‌ها در نتیجه‌ی تحقیقات خود به این 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. به این شکل 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 روی این سلول‌ها بررسی شد و به این 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 HepG2، MCF-7 و Caco2 در مقایسه با عصاره‌های دیگر نشان می‌دهد. اثرات آنتی‌اکسیدانتی و ضد انعقادی این گیاه و اثرات سینرژستیکی احتمالی آن با داروهای شیمی‌درمانی معمولی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۳).

بررسی‌های دیگری نشان داده است که ترکیبات موجود در ریحان به‌طور بالقوه منبع خوبی برای آنتی‌اکسیدانت‌ها و مواد ضد سرطانی می‌باشد. در این مطالعه عصاره‌های ریحان را بر روی سلول‌های NB4، HL-60، EACC اثر دادند و نتایج، بیانگر این مساله بود که عصاره ریحان دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانتی بر روی رده‌های سلولی NB4 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).

#### نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش بیانگر این امر است که حلال‌های مورد استفاده که دارای قطبیت و ترکیبات شیمیایی 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

*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*

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 بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و سگته 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*

*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, Tabatabaie-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.

## 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.<sup>1\*</sup>, Salehizadeh Sh, Ms.c.<sup>2</sup>, Kiarostami K, Ph.D.<sup>3</sup> and Ramezani R, Ph.D.<sup>4</sup>

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 *Impatiens 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  $0.778 \pm 0.11$  mM and in *I. walleriana*  $1.30 \pm 0.03$  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  $0.012 \pm 0.002$  mg / ml and in *I. walleriana* extract was  $2.87 \pm 0.001$  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