فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۹ ص.۵۲-۴۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی دو گیاه بومادران (*Achilla millefolium L.*) و مریم گلی (*Salvia officinalis L.*) بر علیه سلول‌های سرطانی معده انسان

امید سفالیان[۱*]، ناصر زارع[۲]، سعید لطیفی نوید[۳]، سارا مطلبی نیا[۴]، کبری حسن‌پور ریحانی[۴]

[۱] گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی

[۲] گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی

[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه محقق اردبیلی

[۴] فارغ التحصیلان بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی

[*] Email: sofalian@gmail.com

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

چکیده

بیماری سرطان از دلهره‌آورترین بیماری‌های قرن بیستم و دومین علت مرگ در سراسر جهان است. در این میان، استفاده از داروهای گیاهی برای مراقبت‌های پایه بسیار مورد توجه محققین و مردم بوده است. گونه‌های مختلف بومادران و مریم‌گلی از جمله گیاهان دارویی هستند که دارای اثرات بیولوژیکی فراوان می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسي اثر سمیت عصاره‌های گیاهان بومادران و مریم‌گلی بر روی رده‌ی سلولي سرطانی معده (AGS) مي‌باشد. در این مطالعه از اندام‌های هوایی گیاهان عصاره گیری شده، سپس سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی (۵۰ -۱۰۰۰ μg/ml) تیمار گشته و تاثیر عصاره‌ی اتانولی و سمیت سلولي بوسیله روش MTT در سه مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و میزان القاء آپوپتوز به روش فلوسایتومتري با رنگ آمیزي Annexin-V ارزیابي گردید. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره‌ها اثر ضدسرطاني وابسته به دوز و زمان بر سلول‌هاي AGS دارد، به طوري که با افزایش غلظت عصاره و در انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولي مشاهده شد (P< ۰/۰۰۱). غلظت مهارکنندگي 50 درصد رشد سلول‌ها (IC50) براي سلول-هاي سرطاني در سه زمان محاسبه و در بررسی رویداد آپوپتوز درسلول‌های تحت تیمار نیز عصاره مریم‌گلی تاثیر بیشتری داشت. لذا به نظر مي‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، مي‌توان از ترکیبات این عصاره‌ها در درمان سرطان بهره جست. گرچه تحقیقات بیشتری نیاز است.

کلیدواژه‌ها: بومادران، مریم‌گلی، رده‌ی سلولي سرطانی معده (AGS)، عصاره هیدروالکلی، سمیت سلولی.

مقدمه

میلیون‌ها گیاه در سراسر جهان وجود دارند که هر کدام دارای ترکیبات و خواص مفید بسیاری هستند. برای قرن‌ها، گیاهان منبع اصلی کشف داروهای مختلف بودند. امروزه بیماری سرطان عامل یکی از هر هشت مرگ و میر در سراسر جهان است. که در این میان سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و آدنوکارسینوما یا سرطان غده‌ای معده شایع‌ترین شکل آن است که منشاء آن سلول‌های آستر معده می‌باشند [۲]. این بیماری هر ساله حدود ۱ میلیون نفر در سراسر جهان را می‌کشد و شیوع آن در مردان دو برابر بیشتر از زنان است. از آنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی، آسیب‌های کلیوی و غیره می‌شوند، دانشمندان به دنبال یافتن داروهایی هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشد، در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. از اوایل دهه‌ی ۱۹۵۰ تاکنون شناسایی ترکیبات جدید رهبر برای شیمی‌درمانی سرطان و مشتق‌سازی از آن‌ها، از برنامه‌های وسیع غربالگری گیاهان شده است. در این راه عوامل ضد نئوپلاسم جدید نظیر مشتق تاکان Paclitaxel که بعدها تاکسول Taxol نامیده شد (از گیاه سرخدار برگریز با نام علمی *Taxus brevifolia* و آلکالوئید Camptothecin (از درخت چینی Camptotheca acuminata) شناسایی شدند[۳۷]. حدود ۳/۲ میلیون سرطان در سال ۱۳۸۰ در دستگاه گوارش در ناحیه گلو، مری، معده و کولورکتال گزارش شد [۳۹]. علل توزیع سرطان‌های معده-روده‌ای، فاکتورهای محیطی و ارثی هستند، فاکتورهایی مانند عادت‌های غذایی، عدم فعالیت فیزیکی و کشیدن سیگار نقش بسیار مهمی در ابتلا به این سرطان‌ها ایفا می‌کنند. این سرطان در شمال و شمال‌غربی ایران از جمله اردبیل نیز دارای نرخ بالایی است [۲۵]. عفونت با هلیکوباکتر پیلوری، مصرف غذای پرنمک و کشیدن سیگار از جمله فاکتورهای محیطی دخیل در سرطان معده در ایران می‌باشند [۲۷].

بومادران (*Achilla millefolium L.*) یا برنجاست دارای تاریخچه طولانی به عنوان داروی گیاهی سنتی حتی در دامپزشکی است [۱۵]. استفاده در قالب تزریق، جوشانده و یا آبمیوه‌های تازه در برابر بی‌اشتهایی، گرفتگی عضلات معده، فتق، التهاب معده، خونریزی داخلی و خارجی (خون سرفه، خون‌ریزی بینی، خون‌ریزی مربوط به هموروئید و قاعدگی، ادرار خونین)، زخم‌ها، التهاب پوست و همچنین نیش مار و گاز سگ صورت می‌گرفت. بخش‌های مورد استفاده گیاه، سرشاخه‌های گلدار آن است که طعم تلخ و بوی قوی دارد و در زمان گلدهی در تابستان جمع‌آوری می‌گردد [۳۶].هم‌ترین مواد متشکله موثر موجود در این گیاه شامل گلیکوزیدهای سیانوژنیک (اکسی لئین)، کولین، اسید والریک، اسید فورمیک، تانن، روغن فرارکامازولین، آلکالوئید (بتوتیسین و استاخیدرین)، فلاونوئید، رزین، صمغ، اسیدهای آمینه، ترکیبات پلی فنلی،سزکوئی ترپن، لاکتون‌ها، بتاپین‌ها، آشیلین، فسفات، نیترات، نمک‌های پتاسیم و اسیدهای عالی هستند [۳۳، ۳۶]. بررسی تاثیر این گیاه بر روی رده‌های سرطانی مختلف مانند رده‌های سلولی HeLa و MCF-7 پیش از این انجام گرفته است [۴]. از دیگر گیاهان دارویی مورد توجه در بحث درمان سرطان مریم‌گلی (*Salvia officinalis L.*) است که گیاهی علفی، پایا و متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد، این جنس در ایران ۵۸ گونه گیاه علفی یک ساله و چند ساله دارد که در سراسر کشور پراکنده‌اند و ۱۷ گونه آن انحصاری ایران می‌باشد [۱۲]. گونه‌های مختلف جنس مریم‌گلی دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدتوموری، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بوده و در طب سنتی به منظور درمان سرماخوردگی، برونشیت، ناراحتی‌های گوارشی و سل مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه حاوی ترکیبات متنوعی مانند فلاونوئیدهای مختلف، تانن‌ها و ترپنوئیدها (مونوترپن، دی ترپن، سسکوئی ترپن، تترا ترپنوئید) هستند [۱۷]. در واقع، بسیاری از دی‌ترپن‌های جدا شده از چندین گونه از جنس Salvia، خواص دارویی جالب مانند آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی [۸]، ضد التهابی و ضد درد [۱۶]، تب بر، انعقاد خون [۱۴]، تنظیم قند خون [۲۲]و ضد سرطان (۲۳) نشان داده‌اند. هم‌چنین تاثیر عصاره‌ی این گیاه بر روی سلول‌های

لنفاوی و سرطان خون انسانی بررسی شده است [۳۵]. در مطالعه‌ی سلمانی جماعت و یعقوبی، ترکیبات Glycyrrhiza glabra و Mentha pulegium با استفاده از اسپکترومتر جرم کروماتوگرافی گاز (GC-MS) برای تعیین اثرات درمانی ترکیبات بر روی هلیکو پیلوری و سلول‌های سرطانی معده (AGS) با استفاده از آزمون MTT و شرایط آزمایشگاهی انجام شد [۲۸]. به همین ترتیب خاصیت ضدتکثیری و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه چای سیاه (*Camellia sinensis* Kuntze) بر روی سلول‌های سرطانی معده (AGS) با استفاده از آزمون MTT و شرایط آزمایشگاهی انجام گردید (۱۱).

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی عصاره‌های گیاهی: گیاهان بومادران و مریم‌گلی در اواخر فصل رویشی از مرکز تحقیقات سامیان اردبیل جمع‌آوری گردید. سپس ۱۰ گرم از برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار جوان گیاه پودر شده و به طور جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدرواتانول ۸۵ درصد و آب مقطر اضافه گردید و دو بار به مدت ٤٨ ساعت روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردید تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا، تا عصاره‌های اولیه به‌دست آمد. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حلال آنها به آرامی تقطیر گردید و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. سپس عصاره‌ها با استفاده از فیلتر ۰/۲ در زیر هود لامینار تحت شرایط استریل فیلتر شدند [۱۹].

تعیین وزن خشک عصاره‌ها: جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری آن وزن خشک عصاره‌ها تعیین گردید. بدین صورت که برای هر عصاره به صورت جداگانه ۳ لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد. سپس از هر کدام از عصاره‌های اتانولی ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. پس از انکوباسیون ٢٤ ساعته در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد عصاره‌ها کاملا خشک شده و ۳ لوله مربوط به هر کدام از عصاره‌ها مجددا توزین گردید و با کم کردن وزن لوله‌های خالی، میانگین وزن خشک عصاره‌های آبی الکلی در میلی‌لیتر به‌دست آمد [۱۹].

آماده‌سازی سلول سرطانی معده: رده‌ی سلولی سرطان معده (AGS) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و به منظور انجام آزمایش در محیط کشت RPMI1640، حاوی ۱۰% سرم جنینی گاوی و ۲% آنتی بیوتیک‌های پنیسیلین-استرپتومایسین تکثیر داده شد.

اعمال تیمار: پس از چند مرتبه عبور سلول‌ها در فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به صفحات کوچک 96 خانه منتقل گردیدند؛ به طوری که در هر خانه ۲۰۰۰۰ سلول درمحیط RPMI حاوی 10 درصد FBS قرار گرفت. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهان (۱۰۰۰ ،۷۵۰ ،۵۰۰ ،۲۵۰ ،۱۰۰ ،۵۰ μg/ml) قرار گرفتند. کشت یکسری از سلول‌ها با تمامی شرایط، بدون حضور عصاره به عنوان کنترل در فاصله‌های زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت انجام شد و میزان اثر کشندگی سلولی با استفاده از آزمون MTT بررسی گردید.

بررسی اثر عصاره‌های گیاهان بومادران و مریم گلی بر سلول‌های AGS بر اساس تست MTT[1]: به منظور بررسی بقای سلول‌ها در غلظت‌های مختلف و در بازه‌های زمانی متفاوت از روش MTT استفاده شد. MTT از شرکت مرک آلمان خریداری شد. MTT نمک محلول زرد رنگی است که میتوکندری‌های سلول توانایی احیاء آن را دارد که از احیاء آن کریستال‌های بنفش رنگ نامحلولی به نام فورمازان تولید می شود. به منظور بررسی بقای سلول‌ها با تست MTT در پایان بازه‌های زمانی تیمار، محیط کشت رویی سلول‌ها تعویض و به سلول‌ها محیط کشت جدید حاوی ۱۰% محلول اضافه شد؛ پس از آن سلول ها به مدت ۳-٤ ساعت در انکوباتور و در شرایط تاریکی نگهداری شدند تا کریستال‌های نامحلول فورمازان تشکیل شوند، پس از آن با جایگزینی DMSO[2] به جای محلول MTT کریستال‌ها حل شده و رنگ ارغوانی ایجاد گردید، هرچه شدت رنگ بیشتر باشد نشانگر تعداد سلول‌های زنده‌ی بیشتری است.

[1] 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
[2] Dimethyl sulfoxide

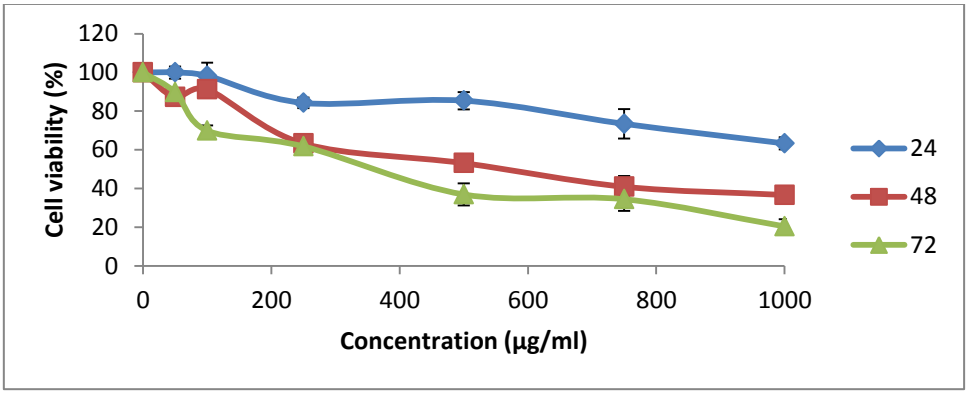
جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۵، ۱۳).

فلوسایتومتري و بررسی آپوپتوز: در پليت ٦ خانه‌اي در هر چاهک به طور متوسط $۱۰^{٤}\times۵$ سلول مورد تيمار قرار گرفتند. ظرف کشت حاوي ٦ چاهک بوده غلظت‌هاي ۲۵،۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ ميکروگرم در ليتر براي ٤٨ ساعت جهت بررسی آپوپتوز استفاده شد. سلول‌ها پس از شستشو با PBS و یک واحد آنزیم تریپسین (Invitrogen، آمریکا) از پلیت جدا و سانتریفوژ شدند. سپس با محلول ۱۰ درصد بافر باندینگ (Ebioscience، آمریکا) شستشو داده شده و ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محلول(Fluorescein isothiocyanate) FITS متصل به(Annexin-VEbioscience، آمریکا) به میزان ۵ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دماي اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند. رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین‌هاي موجود در غشاي سلول آپوپتوزیافته چسبیده و آن‌ها را نشان‌دار می‌نماید. سپس با استفاده از ۵ میکرولیتر محلول PI (Propidum iodide؛ Ebioscience ، آمریکا) آماده شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتري شمارش سلولی در واحد $۱۰^{۴}$ شدند. در این آزمون محیط کشت فاقد سیلیبینین به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود [۳].

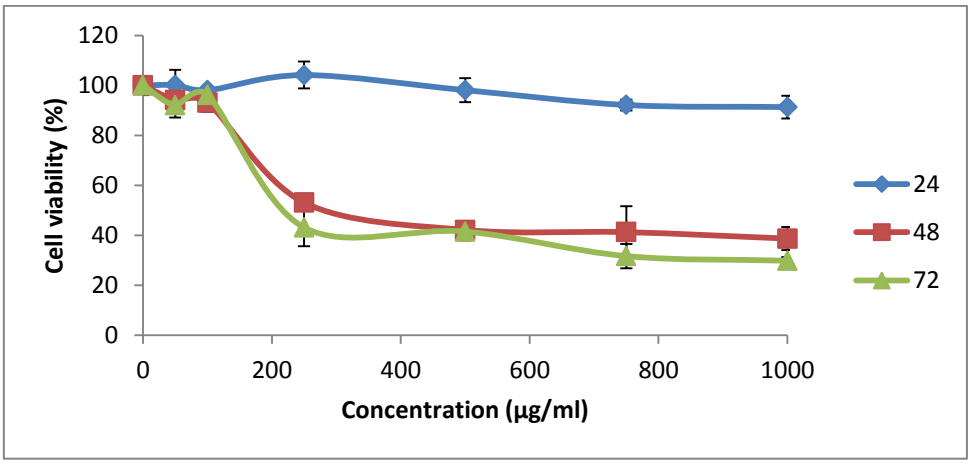
نتایج

اثرات عصاره‌های هیدرواتانولی *Salvia officinalis* L. و *Achilla millefolium* L. بر تکثیر سلول‌های سرطان معده (AGS): براساس آزمون MTT نتایج نوری (OD) بر حسب غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بومادران و مریم‌گلی در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بدست آمد. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت این گیاهان بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف و همچنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. نتایج نشان داد که پایداری سلولی در سلول‌های AGS تحت تاثیر عصاره‌ی بومادران (شکل ۱) و عصاره‌ی مریم‌گلی (شکل ۲)، در غلظت‌های µg/ml ۵۰ تا ۱۰۰۰ به طور معنی‌دار و وابسته به دوز کاهش یافت. به طوري که به تدریج و با افزایش دوز کمترین درصد زیستایي مشاهده شد؛ اما سلول‌هاي سرطاني بدون تأثیر عصاره تغییرات مشخصي را نشان ندادند. جدول شماره ۱ غلظت مهارکنندگي 50 درصد رشد سلول‌ها را در سه زمان نشان می‌دهد که بیشترین متعلق به عصاره مریم‌گلی در ٢٤ ساعت بود.

بررسی مورفولوژیکی سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس: پس از تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ اینورت نشان داد که با افزایش غلظت عصاره گیاهی مورفولوژی سلول‌ها تغییر کرده به طوری که از حالت دوکی خارج شده و به شکل گرد شده در می‌آیند و اتصالات بین سلولی و ارتباط سلول‌ها از هم گسسته می‌شود. عصاره در غلظت‌های پایین‌تر باعث تغییرات مورفولوژیکی خاصی نشده است (شکل ۳).



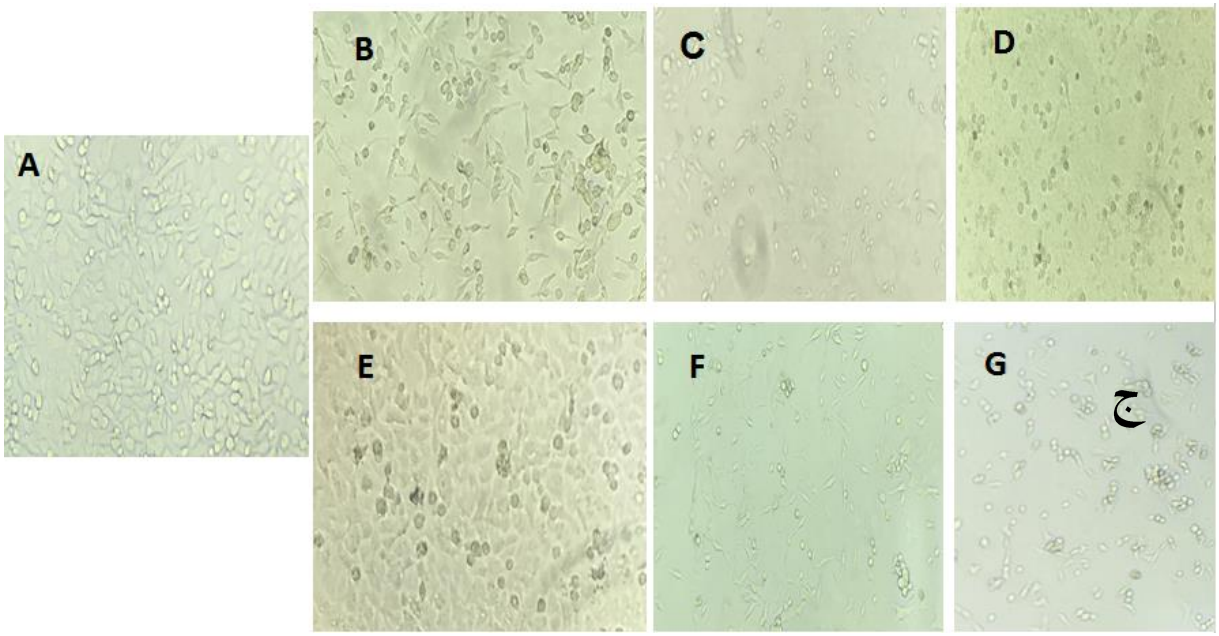
شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف عصاره هیدرواتانولی *Achilla millefolium L.* در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. مقادیر نشان دهنده میانگین سه آزمایش است.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی *Salvia officinalis L.* در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مقادیر نشان دهنده میانگین سه آزمایش است.

جدول ۱- غلظت ۵۰٪ مهار رشد (IC50) دو عصاره هیدروالکلی بر روی رده سلولی AGS در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

عصاره‌های گیاهی	IC50(mg/ml)		
	۲۴ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
Achilla millefolium L.	۱/۳۸۵۸۷	۰/۶۵۶۵۳	۰/۵۰۱۳۶
Salvia officinalis L.	۵/۲۹۴۸۴	۰/۶۱۸۰۱	۰/۵۴۲۵۵



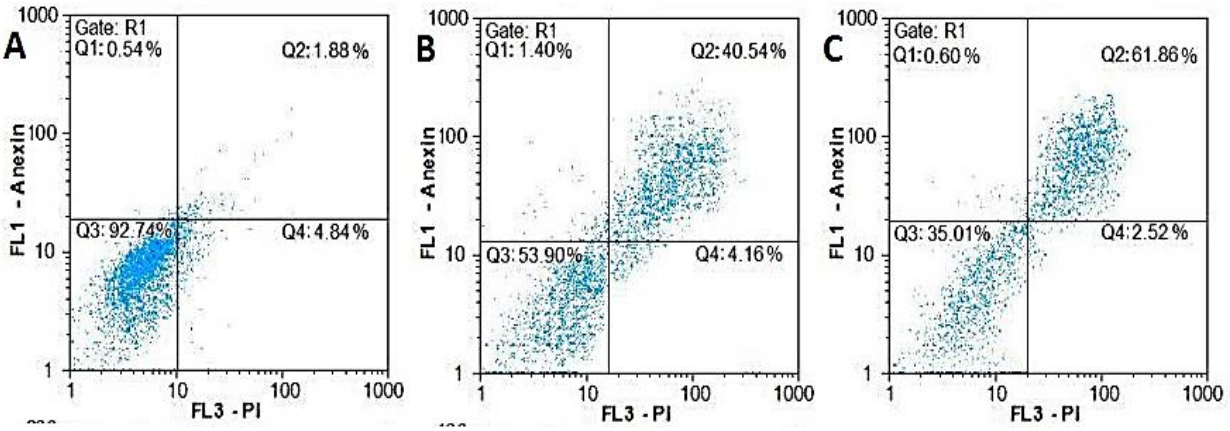
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی سلول‌های AGS تیمار شده با عصاره‌های گیاهی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سه مدت‌زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. **A:** شاهد **B:** تیمار با عصاره بومادران پس از ۲۴ ساعت **C:** تیمار با عصاره بومادران پس از ۴۸ ساعت **D:** تیمار با عصاره بومادران پس از ۷۲ ساعت **E:** تیمار با عصاره مریم‌گلی پس از ۲۴ ساعت **F:** تیمار با عصاره مریم‌گلی پس از ۴۸ ساعت **G:** تیمار با عصاره مریم‌گلی پس از ۷۲ ساعت

نتایج آپوپتوزی سلول‌های AGS با آزمون Annexin V/PI: نتایج بدست آمده از آزمون فلوسیتومتری نشان می‌دهد که با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌های AGS با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر زیادی روی القای آپوپتوز در مقایسه با تیمار شاهد داشته است. در نمودار بدست آمده از آزمون فلوسیتومتری جمعیت سلول‌های زنده

در سمت چپ پایین، سلول‌های در مرحله آپوپتوز اولیه در سمت چپ بالا، سلول‌های با آپوپتوز ثانویه در سمت راست بالا و سلول‌های نکروز در سمت راست پایین دیده می‌شوند. بررسی میزان رویداد آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار از طریق فلوسایتومتری و با استفاده از Anexin V/ PI نشانگر تاثیر قابل توجه این استخراج در فرآیند مرگ سلولی بود، به طوریکه در نمونه‌ی شاهد ۹۲/۷۴ درصد از سلول‌ها زنده بودند (شکل۴).

بحث

در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل‌توجهی برای شناسایی ترکیبات طبیعی و عوامل مرتبط با آن که می‌توانند از پیشرفت سرطان جلوگیری کنند، انجام شده است. گیاهان دارویی متعددی که دارای توانایی تاثیر روی تکثیر سلول‌های سرطانی بودند، معرفی شده‌اند [۳۱]. این گیاهان می‌توانند از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، سبب ایجاد آپوپتوز در سلول‌های مختلف تومور شوند [۳۲]. این تاثیر در عصاره‌های گیاهی ناشی از مواد فیتوشیمیایی تشکیل دهنده آن‌ها شامل پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها و ترکیبات نیتروژن و گوگرد است. این مواد فیتوشیمیایی در حقیقت مواد شیمیایی عالی هستند که قابل دسترس، ارزان و غیر سمی‌اند [۱۸]. در واقع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، منابع غنی برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها هستند [۲۹، ۳۰]. نتایج ما نشان داد که پایداری سلول AGS به صورت وابسته به دوز به طور قابل توجهی پس از تیمار با عصاره بومادران و مریم‌گلی کاهش می‌یابد و به تدریج با افزایش دوز کمترین درصد زیستایي مشاهده گردید؛ اما سلول‌هاي سرطاني بدون تأثیر عصاره تغییرات مشخصي را نشان ندادند. در بررسی ما گیاه بومادران نسبتا سمی‌تر از گیاه دیگر بود. گونه‌های Achillea به عنوان یک داروی عمومی برای درمان سرطان‌ها و زگیل‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۰]. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف Achillea و ترکیبات جدا شده آن‌ها دارای فعالیت سیتوتوکسیک روی سلول‌های مختلف انسانی، از جمله سرطان ریه (A549، RERF-LC-kj و QG-90)، کارسینوم اپیتلیال گردن رحم (HeLa)، سرطان خون (K562)، آدنوکارسینومای پستان (MCF-7، MDA-MB-231، MDA-MB-468)، گلیوبلاستومای چندگانه (T98G)، آدنوکارسینومای معده (AGS)، آدنوکارسینومای پروستات (PC-3)، ملانوما (A375، Fem-X) و هپاتومای کبدی (PLC / PRF / 5) هستند [۷؛ ٤؛ ۱؛ ۲۰؛ ۲۱]. تازیو و همکاران فعالیت ضد توموری سسکوئیترپن‌های بومادران را گزارش کردند [۳٤]. فعالیت این ساختار بر علیه سلول‌های لوکمیا P-388 در بدن موش نیز اثبات شده است [۶]. همچنین *Salvia officinalis*از محبوب‌ترین داروهای گیاهی در خاورمیانه برای درمان بیماری‌های شایع است. گونه‌های *Salvia* (Labiatae)



شکل ٤ - آپوپتوز ناشی از عصاره‌های مریم‌گلی (B) و بومادران (C) در سلول‌های سرطانی معده (AGS) تحت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ٤٨ ساعت و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی annexin V-FITC/PI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

به واسطه داشتن اثر ضد توموری شناخته شده‌اند [۲۳]. به نظر می‌رسد فعالیت عصاره‌های مریم‌گلی، حداقل تا حدی، مربوط به مهار مسیر MAPK / ERK می‌باشد [۳۸]. تأثیر مصرف چای گیاهی مریم‌گلی (*S. officinalis*) بر پیشگیری از سرطان روده‌ی بزرگ در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که عصاره‌ی آبي *S. officinalis* به طور چشمگیري سبب کاهش آسیب DNA اکسیداتیو ناشي از H_2O_2 در محیط آزمایشگاهي مي‌شود [۲۶]. بعضی از دی‌ترپنوئیدهای جدا شده از ریشه‌های *S. officinalis* بر روی سلول‌های کارسینومای روده‌ی بزرگ انسان (Caco-2) و سلول‌های تومور کبدی انسان (HepG2) در شرایط آزمایشگاهی دارای فعالیت‌های سیتوتوکسیک و تخریبی DNA هستند [۹]. قسمت سسکوئی ترپن از *S. officinalis* حاوی α-humulene، دارای فعالیت قوی سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی پروستات LNCaP است [۹]. همچنین، *trans*-caryophyllene که جزء اصلی قسمت سسکوئی‌ترپن در *S. officinalis* است، فعالیت سیتوتوکسیک بالا در برابر سلول‌های ملانوما ملانوسی و آدنوکارسینوم کلیه دارد. حضور α-humulene به عنوان جزئی از *S. officinalis*، فعالیت قوی سیتوتوکسیک روی سلول‌های کارسینوم پروستات انسان LNCaP نشان داد [۲۴]. نتایج ما نیز به عنوان مدارک بیشتر در جهت تایید تاثیر احتمالی این گیاهان در در درمان سرطان به شمار می‌روند.

نتیجه‌گیری

گیاهان نقشی مهم و اساسی در بقا و معیشت انسان‌ها ایفا می‌کنند. استفاده مستقیم از آنها در کاهش، پیشگیری و درمان بیماری سرطان به وضوح ثابت شده است. گونه‌های متعددی از گیاهان دارویی مفید و خودرو از جمله گیاهان مطالعه‌ی حاضر، بدون هیچ گونه کاربردی در مناطق کوهستانی اردبیل نابود می‌شوند. نتایج این مطالعه نشان مي‌دهد که عصاره هیدرواتانولی بومادران و مریم‌گلی داراي اثر ضدسرطاني بوده که مي‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود. بر اساس نتایج این گیاهان می‌توانند به همراه داروهای شیمیایی در پروسه‌ی درمان استفاده شوند. تحقیقات بیشتری برای تبدیل این نقش بالقوه و امیدوار کننده در درمان سرطان به شکلی قابل قبول برای ایجاد گزینه‌های درمان با کم‌ترین عوارض جانبی یا بدون عوارض پیشنهاد می‌شود.

منابع

[1] Abu-Dahab R., Afifi F. 2007, Anti-proliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF-7). Scientia Pharmaceutica, 75:121-36.

[2] Alberts SR., Cervantes A., Van de Velde C. J. 2003, Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. Ann Oncol, 14 Suppl 2:ii31-6 carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation. Journal of Ethnopharmacology, 2006; 105: 263-8.

[3] Chiu L. C. M., Ho T.S., Wong EYL., Ooi VEC. 2006, Ethyl acetate extract of Patrinia scabiosaefolia downregulates anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-XL expression, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation. Journal of Ethnopharmacology, 105: 263-8.

[4] Csupor-Loffler B., Hajdu Z., Zupko I., Rethy B., Falkay G., Forgo P., Hohmann J. 2009, Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* on cultured human tumour cell lines. Phytotherapy Research, 23(5): 672-676.

[5] Doyle A., Griffiths J.B. 1998, Cell and tissue culture. Laboratory procedures in biotechnology. John Wiley and Sons Ltd, England. 345.

[6] Falk A.I., Smolenski S.J., Bauer L., Bell C.L. 1975, Isolation and identificatioll o f three new flavones from Achillea mille/olilll1l L. Pharmaceutical Sciences, 64: 1838-42.

[7] Ghavami G., Sardari S., Shokrgozar M.A. 2010, Anti-cancerous potentials of *Achillea*

species against selected cell lines. Journal of Medicinal Plants Research, 4:2411-7.

[8] González A., Abad T., Jiménez I., Ravelo A. 1987, A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some Salvia species. Biochemical Systematics and Ecology, 17: 293-6.

[9] Hadri A., Gomez Del Rio M., Sanz J., Coloma A., Idaomar M., Ozanas B. 2010, Cytotoxic activity of α-humulene and transcaryo-phyllene from Salvia officinalis in animal and human tumor cells. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 76: 343-56.

[10] Hartwell J. 1968, Plants used against cancer. Journal of Natural Products, 31: 71-170.

[11] Hashemi L., Asadi-Samani M., Moradi M.T., Alidadi S., Soltani A. 2017, In vitro anti proliferative activity, antioxidant potential and total phenolic compounds of black tea extract. Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 7: 19-25.

[12] Hedge I.C. 1982. *Salvia L.* In P.H. Davis (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 7, University Press, Edinburgh, 400-461.

[13] Helganson C.D., Miller C.L. 2003, Basic cell culture protocols. Human press Inc, vol 290, 365pp.

[14] Hernandez-Perez M., Rabanal R.M., de la Torre M.C., Rodriguez B. 1995, Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from salvia aethiopis roots and two hemisynthetic derivatives. Planta Medica, 61(6): 505-9.

[15] Hirtl U. 2000, Phyotherapie bei der Katze. Anwendungsmöglichkeiten und Anwendungshäufigkeiten durch den Besitzer. Dissertation, University of Veterinary Medicine Vienna

[16] Hosseinzadeh H., Haddadkhodaparast M.H., Arash A.R. 2003, Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of salvia leriifolia benth seed extract in mice and rats. Phytotherapy Research, 17(4): 422-5.

[17] Karami M., Hossini E., Shahbi Majd N., Ebrahimzadeh M.A., Alemy S. 2015, Salvia limbata: botanical, chemical, pharmacological and therapeutic Effecte. Journal of clinical excellence, 3(2): 1-109. (In Farsi with English abstract)

[18] Karna P., Gundala S.R., Gupta M.V., Shamsi S.A., Pace R.D., Yates C., Narayan S., Aneja R. 2011, Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells in vitro and in vivo. Carcinogenesis, 32(12): 1872-1880.

[19] Khosravi A., Malecan M. 2004, Effects of lavandula stoechas extracts on staphylococcus aureus and other gram negative bacteria. The Journal of Qazvin Univercity of Medical Science, 29: 3-9. (In Farsi with English abstract)

[20] Kundakovic T., Stanojkovic T., Juranic Z., Kovacevic N. 2005, Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*. Pharmaziem, 60: 319-20.

[21] Li Y., Zhang M.L., Cong B., Wang S.M., Dong M., Sauriol F., Achillinin A. 2011, A cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75:1554-6.

[22] Lima C.F., Andrade P.B., Seabra R.M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. 2005, The drinking of a salvia officinalis infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology, 97(2): 383-9.

[23] Liu J., Shen H.M., Ong C.N. 2000, Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma hepg(2) cells. Cancer Letters, 153(1-2): 85-93.

[24] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. Anticancer Res 27: 3293-9.

[25] Malekzadeh R., Derakhshan M.H., Malekzadeh Z. 2009, Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Archives of Iranian Medicine, 12(6): 576-83

[26] Pedro D.F., Ramos A.A., Lima C.F., Baltazar F., Pereira-Wilson C. 2010, Modulation of DNA damage prevention and signaling pathways in diet induced colon cancer prevention. BMC Proceedings, 2: P58.

[27] Pourfarzi F., Whelan A., Kaldor J., Malekzadeh R. 2009, The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran—a population based study. International journal of cancer, 125(8): 1953-1960.

[28] Salmani Jamaat F., Yaghoubi H. 2017, An Investigation of Compositions and Effects of Local Herbal Glycyrrhiza glabra and Mentha pulegium extracts on Helicobacterpylori and Cell Line of stomach Cancer (AGS) by MTT assays. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs), 8(1): 41-49.

[29] Samarghandian S., Azimi-Nezhad M., Afshari R., Farkhondeh T., Karimnezhad F. 2015, Effects of buprenorphine on balance of oxidant/antioxidant system in the different ages of male rat liver. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 29(6): 249- 253.

[30] Samarghandian S., Azimi-Nezhad M., Borji A., Farkhondeh T. 2016, Effect of crocin on aged rat kidney through inhibition of oxidative stress and proinflammatory state. Phytotherapy Research, 30(8):1345-1353.

[31] Samarghandian S., Borji A. 2014, Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus L.*) and its ingredients. Pharmacognosy Research, 6(2): 99-107.

[32] Schilling T., Kairat A., Melino G., Krammer P.H., Stremmel W., Oren M., Mü ller M. 2010, Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. Biochemical and Biophysical Research Communications, 394(3): 817-823.

[33] Semsam Shariat H. 2007, Medicinal plants. 2nd ed. Esfahan: Chaharbagh, p. 114.

[34] Tazyo T., Yoshimura Y., Sakurai K., Uchida N., Takeda Y., Nakai H., Ishii H. 1994, Novel antitumor sesquiterpenoids in Achillea mille/olium. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 212: 1096-/100.

[35] Valiyari S., Baradaran B., Abdolalizadeh J., Bandehagh A., Azadmehr A., Hajiaghaee R. 2013, Inhibitory and cytotoxic activities of Salvia officinalis L. extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. Advanced pharmaceutical bulletin, 3(1): 51.

[36] Valnet J. 2002, Herbal medicine, treatment of illness with plant. Trans. Emami A., Shams Ardakani M.R., Nekoei N. 1st ed. Tehran: Rahe Kamal, p. 253-5.

[37] Voss C., Eyol E., Berger M.R. 2006, Identification of potent anticancer activity in Ximenia americana aqueous extracts used by African traditional medicine. Toxicology and Applied Pharmacology, 211: 177 - 87.

[38] Xavier C.P., Lima C.F., Fernandes-Ferreira M. 2009, Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid Salvia fruticosa, Salvia offici-nalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. Nutrition and Cancer, 61(4): 564-571.

[39] Zende-Del A., Ahmadvand H., Abdollah-Pour F., Abdolahian M., Ahmadi-Nejad M., Alie-Poor A., Safari M. 2013, Cerium lanthanide effect on growth of AGS cell line with the presence of transferrin in vitro. Zahedan journal of research in medical science, 15(10): 41-44.

Effects of hydroalcoholic extract of *Achilla millefolium* and *Salvia officinalis* against human gastric Cancer cells

Sofalian O.[1*], Zare N. [2], Latifi Navid S.[3], Motallebinia S. [4], Hasanpour Reyhani K.[4]

[1] Plant breeding, Faculty of Agricultural and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili
[2] Plant breeding, Faculty of Agricultural and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili
[3] Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili
[4] MSc graduated of agricultural biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili

* Email: sofalian@gmail.com

Received: February 2020 Accepted: December 2020

Abstract

Cancer is one of the most frightening diseases of the twentieth century and the second leading cause of death worldwide. Meanwhile, the use of herbal medicines for basic care has been highly regarded by researchers and the public. Different species of yarrow and sage are among the medicinal plants that have many biological effects. The objective of this study was to evaluate and stablish the anticancer potential of two medicinal plants (Yarrow and Sage) using gastric cancer cell line (AGS) as model system. In this study, plant aerial parts were extracted, then AGS cells were treated with different concentrations of hydro-alcoholic extract (50-1000 g / ml). The effect of hydro-alcoholic extracts and cell toxicity was evaluated by MTT assay in 24, 48 and 72 hours, and the rate of apoptosis induction was assessed by flow cytometry using Annexin-V/PI staining method. The results of MTT assay indicated that these extracts had a dose and time-dependent manner on AGS cells, so the maximum percentage of cell death was observed with highest concentration and 72 hours incubation ($P < 0.001$). The inhibitory concentration of 50% cell growth (IC50) for cancer cells was calculated in three times. *Salvia officinalis* extract had the stronger effect. Both herbal extracts indicated anticancer activity. Hence, these extracts might be good sources of potential anticancer agents. However, more researches are required.

Keywords: Yarrow, Sage, Gastric cancer cells (AGS), Hydro-alcoholic Extract, Cytotoxicity.