مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۹
صفحه ۱۰-۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره اتانلی دو گیاه پونه (*Mentha longifolia*) و درمنه (*Artemisia persica*) بر علیه سلول‌های سرطانی معده انسان (*AGS*)

Evaluation of anticancer effect of *Mentha longifolia* and *Artemisia persica* hydro-alcoholic extracts against human gastric cancer cells (AGS)

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

Omid Sofalian[1*], Nasser Zare[1], Saied Latifi Navid[2], Kobra Hasanpour Reyhani[3], Sara Motallebinia[3]

۱- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه محقق اردبیلی
۳- فارغ التحصیل بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی

1. Plant breeding Dept., Faculty of Agricultural and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran
2. Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili
3. MSc graduated of agricultural biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sofalian@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۱۵)

چکیده

درمان سرطان به وسیله گیاهان دارویی، از دیرباز مورد توجه محققان بوده است. دراین میان، برخی گونه‌های گیاهی دارای ترکیباتی هستند که از طریق آپوپتوز و یا نکروز، موجب مهار یا از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شوند. خانواده نعناعیان و کاسنی از جمله این گیاهان بوده که دارای اثرات بیولوژیکی بسیار می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرسمیت عصاره‌های گیاهان پونه و درمنه بر روی رده‌ی سلولی سرطانی معده (AGS) می‌باشد. در این مطالعه از اندام‌های هوایی گیاهان عصاره گیری شده، سپس سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی (۱۰۰۰- ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سمیت سلولی با استفاده از روش MTT و میزان القاء آپوپتوز به روش فلوسایتومتری با رنگ آمیزی Annexin-V ارزیابی گردید. نتایج حاصل از تست MTT مهار قوی و وابسته به غلظت در تکثیر سلول‌های سرطانی را توسط عصاره‌های مختلف پونه و درمنه نشان داد. این اثر وابسته به دوز و زمان بوده، به طوریکه با افزایش غلظت عصاره و در انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده گردید. در بررسی رویداد آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار نیز، عصاره‌پونه تاثیر بیشتری داشت. با توجه به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های هیدرواتانولی بر سلول-های AGS، این گیاهان می‌توانند به عنوان یک پتانسیل بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین تخلیص ماده موثره موجود در این عصاره‌ها و نیز تعیین مکانیسم تاثیر آن‌ها توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی

پونه
درمنه
رده سلولی سرطانی معده (AGS)
عصاره هیدروالکلی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

مقدمه

سرطان گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن‌ها رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن می‌باشد (Weis and Goldenring, 2009). در پژوهشی که توسط هاناهن و وینبرگ در سال ۲۰۰۰ انجام شد، شش علامت اصلی اکثر سرطان‌ها را مشخص کردند. پیشنهاد شد که کسب توانایی ایجاد پیام‌های رشد خودمختار، فرار از پیام‌های مهاری رشد، گریز از مرگ سلولی آپوپتوزی، توان همانندسازی نامحدود، رگ‌زایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید، آنژیوژنز)، تهاجم و متاستاز برای بروز انواع سرطان ضروری هستند (Pecorino 2012). سرطان معده دومین سرطان شایع است و مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده که رتبه دوم مرگ و میر را در جهان بعد از سرطان ریه به خود اختصاص می‌دهد (Weis and Goldenring, 2009). در ایالات متحده آمریکا در سال ۲۰۱٤ آمار کلی مبتلایان به سرطان معده ۱٦٦٥٥٤۰ نفر گزارش شده است که از این تعداد ۵۸۵۷۲۰ فوت کرده‌اند (Siegel *et al.* 2014). سرطان معده در مراحل اولیه اغلب بدون علائم بالینی می‌باشد که فقدان علائم بالینی سبب تاخیر تشخیص می‌شود، بنابراین ۹۰-۸۰ درصد این بیماران در مراحل پیشرفته بیماری مراجعه کرده که دارای متاستاز مجاور هستند. طبق مطالعات اپیدمیولوژی انجام شده شانس زنده بودن در مراحل پیشرفته همراه متاستاز با وجود شیمی درمانی و درمان‌های تهاجمی مانند جراحی به مدت ۵ سال، بسیار ضعیف بوده است (Oliveira *et al.*1998). مطالعات اخیر توجه زیادی به استفاده از محصولات طبیعی در درمان بیماری‌های مختلف داشته و در این رابطه نتایج قابل‌توجهی از جمله تقویت سیستم ایمنی (Lehtihet *et al.* 2000; Bode *et al.* 2015) درمان بیماری‌های صعب العلاج از جمله آلزایمر (Arora *et al.* 2011) آترواسکلروز (Armanini *et al.* 2003) دیابت (Wang *et al.* 1991) گوارش (Pirzadeh *et al.* 2014) و سرطان (Poeta *et al.* 2008; Koh *et al.* 2020) داشته که امید زیادی برای پیشگیری و درمان این بیماری‌ها را بوجود آورده است. مشکلات فعلی در استفاده از شیمی درمانی و پرتو درمانی و عوارض جانبی متعددی که در اثر استفاده از آن‌ها برای بیمار ایجاد می‌شود و همچنین مقاومت سلول‌های سرطانی به درمان‌های رایج، سبب شده است محققین رو به سوی داروهای جدید با اثر بیشتر و سمیت کمتر بیاورند. طبیعت منبع شگفت انگیز از ترکیبات مناسب دارویی جدید با تنوع شیمیایی بسیار زیاد است که در میلیون‌ها گونه گیاهی، جانوری، جانداران دریایی و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود (Cragg *et al.* 2013). متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان از جمله این ترکیبات هستند که بسیاری ار آن‌ها هنوز ناشناخته هستند. ترکیبات گیاهی که خاصیت ضد سرطانی و ضد توموری دارند در گروه‌های شیمیایی آلدهیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی فرار دارند (Amin *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2005). قابل توجه است که هم اکنون بیش از ٦۰ درصد داروهای رایج ضد سرطانی از منابع طبیعی شامل گیاهان، جانداران دریایی و میکروارگانیسم‌ها مشتق شده‌اند (Newman *et al.* 2003).

پونه یک گیاه شناخته شده در طب سنتی ایران برای درمان بیماری‌های مختلف و دارای اثرات ارزشمندی در بهبود عملکرد دستگاه گوارش است که خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد آسم، ضد اسپاسم، ضد نفخ و حشره کشی آن به اثبات رسیده است (Jalilzadeh-Amin *et al.* 2012). گونه‌های مختلف پونه، منابع غنی ترکیبات پلی‌فنلی بوده و لذا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. پونه (*Mentha longifolia*) یکی از گونه‌های جنس نعناع Mentha می‌باشد که متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد. پونه گیاهی کرکدار، پایا با بویی تند، دارای ریزوم، برگ‌های بیضی دوک مانند تا نوک تیز دوک مانند است (Bot 2009). *Mentha longifolia* که در فارسی پونه نامیده می‌شود گیاهی است علفی، چند ساله، با ساقه‌های زیرزمینی رونده و دارای ساقه راست، منشعب، به ندرت ساده و به ارتفاع ٤۰ تا ۱۲۰ سانتیمتر غالبا ساقه چهار گوش و در بخش فوقانی با کرک‌های بلند می‌باشد. این گیاه به حالت وحشی در دشت‌های مرطوب و حاشیه آب‌ها در اغلب نواحی مرکزی، جنوبی و غربی اروپا، نواحی مدیترانه، شرق آسیا و جنوب آفریقا می‌روید (Džamić 2010).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

از گیاهان دارویی که در طب سنتی و طب مدرن اثرات مختلفی برای آن ذکر شده، درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) می‌باشد. درمنه گیاهی از طایفه Anthemideae و خانواده Compositae است ارتفاع این گیاه به ٦٠ سانتی‌متر می‌رسد و برگ‌های آن دارای تقسیمات متعدد و گل‌های زرد و گل آذین کاپیتول است. این گیاه حاوی ترکیبات گوناگونی همانند اسکوپودرنیول، اسکوپوفارنول، قارنزول و چندین سزکوئی ترپن و ترکیبات دیگر می‌باشد (Mozaffarian 2000). درمنه گیاهی کوچک و زرد رنگ می‌باشد و قسمت‌های هوایی آن به عنوان داروی ضد مالاریا استفاده می‌شود. در مقالات مختلف مشخص شده است که آرتیمیسین موجود در این گیاه خواص ضد باکتریایی، ضد قارچ، ضد لیشمانیا، آنتی اکسیدان، ضد تومور و ضد التهابی دارد (Vijay *et al.* 2014). علاوه بر این، ترکیبات مختلفی از جمله سزکوئی ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، فنول، ترپنوئیدها، استروئیدها تاکنون از گیاه درمنه استخراج شده است (Abad 2012).

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی: گیاهان پونه و درمنه در اواخر فصل رویشی از رویشگاه‌های طبیعی در استان اردبیل جمع‌آوری و پس از شستشو در سایه خشک گردیدند. سپس ١٠ گرم از برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار جوان گیاه آسیاب و پودر شدند. پودر گیاه به طور جداگانه با ١٠٠ میلی لیتر حلال اتانولی ٨٥ درصد آب–اتانول اضافه و دو بار به مدت ٤٨ ساعت بر روی شیکر با دور ١٨٠rpm و دمای 25°C عصاره‌گیری شد، عصاره‌های بدست آمده توسط دستگاه روتاری در شرایط خلاء و در دمای ٥٠°C تغلیظ گردیدند. سپس عصاره‌ها با استفاده از فیلتر ٠/٢ تحت شرایط استریل فیلتر شدند (Khosravi 2004).

کشت سلولی: در این مطالعه تجربی رده سلول سرطانی AGS (سلول‌های آدنو کارسینومای معده) از انسیتو پاستور (تهران – ایران) خریداری شد. سلول‌ها در فلاسک‌های ٢٥ میلی‌لیتری محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ١٠ درصد سرم جنینی گاوی و ٢ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنیسیلین–استرپتومایسین کشت داده شدند، در انکوباتور ٣٧ درجه سانتیگراد حاوی CO2 (5%) انکوبه شدند و هر ٢٤ ساعت یکبار تعویض محیط صورت گرفت. ٣–٤ روز بعد از کشت اولیه در زیر میکروسکوپ معکوس تراکم سلولی بررسی و در صورتی که رشد سلول‌ها به حد ٨٠ درصد می‌رسید، پاساژ انجام می‌شد.

اعمال تیمار: پس از چند مرتبه عبور سلول‌ها در فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به صفحات کوچک ٩٦ خانه منتقل شدند، به طوریکه در هر خانه ٢٠٠٠٠ سلول در محیط RPMI حاوی ١٠ درصد FBS قرارگرفت. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهان (١٠٠٠μg/ml، ٧٥٠، ٥٠٠، ٢٥٠، ١٠٠، ٥٠) 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.

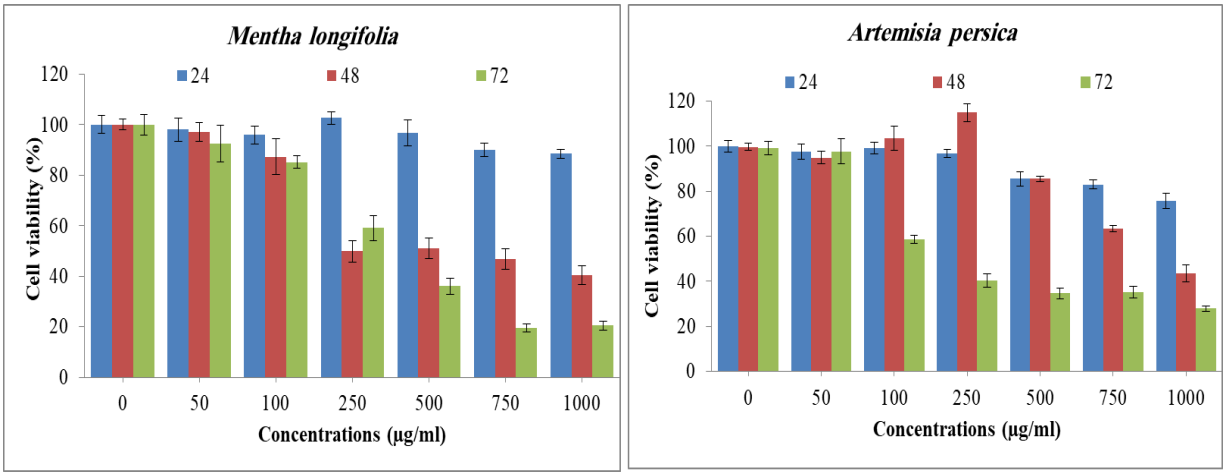
زیست پذیری سلول: تعداد ٢٠٠٠ سلول در ٥٠ میکرولیتر محیط کشت RPMI1640 حاوی ١٠ FBS درصد در هر چاهک از پلیت ٩٦ تایی اضافه شدند و به مدت یک شب در انکوباتور CO_2 دار نگهداری گردید. سپس به هر چاهک غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های پونه و درمنه که در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شده بودند اضافه شد. برای هر ترکیب یک گروه کنترل که فاقد ترکیبات مورد نظر بود و تنها شامل محیط کشت RPMI1640 حاوی ١٠ FBS درصد بود مد نظر قرار گرفت. سلول‌ها در زمان‌های مختلف ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت با مقادیر مختلف دو ترکیب انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون ٢٥ میکرولیتر از محلول MTT (٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ٣ ساعت دیگر انکوبه شد تا کریستال‌های نامحلول فورمازان تشکیل شوند. پس از آن با جایگزینی DMSO به جای محلول MTT کریستال‌ها حل شده و رنگ ارغوانی ایجاد گردید. هرچه شدت رنگ بیشتر باشد نشانگر تعداد سلول‌های زنده‌ی بیشتری است. سپس DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ٥٧٠ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد (Helganson 2003).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

بررسی آپوپتوز و نکروز سلولی: تعداد ۵×۱۰^{٤} سلول سرطانی AGS در هر چاهک پلیت ٦ خانه‌ای ریخته شد و با غلظت‌های مختلف ۲۵،۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره تیمار شدند. بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با انکسین Vکونژگه با FTTC (انکسین FTTC-V) و پروپیدیوم آیودایدا PI انکوبه شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت سلولی انکسین FTTC-V مثبت و PI مثبت به عنوان آپوپتوز ثانویه یا نکروز پس آپوپتوتیک و جمعیت سلولی انکسین FTTC-V منفی و PI مثبت به عنوان نکروز در نظر گرفته شدند. در این آزمون محیط کشت فاقد سیلیبینین به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود (Chiu *et al.* 2006).

نتایج و بحث

براساس آزمون MTT نتایج نوری (OD) بر حسب غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پونه و درمنه در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار در ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت بدست آمد. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت پونه و درمنه بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف و همچنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. شکل ۱ بیانگر درصد بقای سلول‌های AGS بعد از تیمار با پونه در غلظت‌های متفاوت (۵۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای زمان‌های مختلف می‌باشد. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، بیشترین درصد بقای سلول AGS در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ٢٤ ساعت بوده است. کم‌ترین درصد بقای سلول AGS در غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۷۲ ساعت بدست آمد. سمیت سلولی به ترتیب در پونه و درمنه با IC50، ٤٨٨/٢ و ٤٨٦ در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار بوده است (جدول ۱). نتایج نشان می‌دهد که در طول ۳ روز، میزان بقای سلول‌های تیمار شده با عصاره پونه و درمنه در مقایسه با سلول کنترل، به ترتیب تفاوت بارزی به ویژه در غلظت ٤٨٨/٢ و ٤٨٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده است (شکل ۱و ۲). نتایج نشان داد که پایداری سلولی در سلول‌های AGS تحت تاثیر عصاره‌های پونه و درمنه به‌طور معنی‌دار و وابسته به دوز کاهش یافت.



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های هیدرواتانولی گیاهان *Mentha longifolia* و *Artemisia persica* بر زنده‌مانی سلول‌های AGS پس از تیمار در مدت زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت (تکرار=۳، ارور بار نشان دهنده استاندارد ارور SE)

Figure 1. Effect of different concentrations of *Mentha longifolia* and *Artemisia persica* hydroalcoholic extracts on AGS cell viability after treatment for 24, 48 and 72 h (Repeat = 3, Error bars indicate standard error, SE)

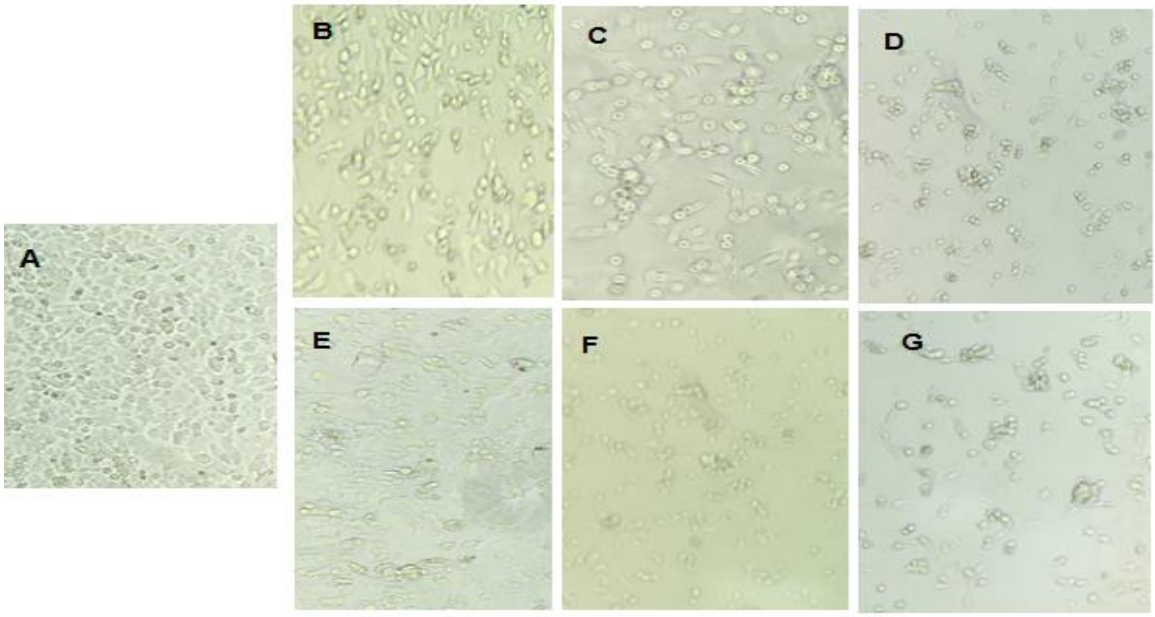
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

جدول ۱- غلظت ۵۰ درصد مهار رشد (IC50) دو عصاره هیدروالکلی بر روی رده سلولی AGS در ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت.

Table1. 50% inhibitory concentration of two hydroalcoholic extracts on AGS cell line over 24, 48, and 72 hours.

عصاره‌های گیاهی	IC50(mg/ml)		
	۲٤ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت
Mentha longifolia	۵/۲۹٤۸٤	۰/٦٦۷۵٦	۰/٤۸۸۲۲
Artemisia persica	۲/۰۹۰۲۱	۰/۹۷٤۹۵	۰/٤۸٦۰٤

بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول‌های تیمار شده با عصاره هیدرواتانولی پونه و درمنه، نشان دهنده تغییرات ریخت‌شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود. نتایج سمیت سلولی غلظت‌ها و زمان‌های مختلف عصاره اتانولی پونه و درمنه بر رده سلولی AGS نشان دهنده‌ی برهم‌خوردگی شکل کروی سلول در غلظتی که بیش‌ترین اثر سیتوتوکسیکی دیده می‌شود، نمایش داده شده است (شکل۲).

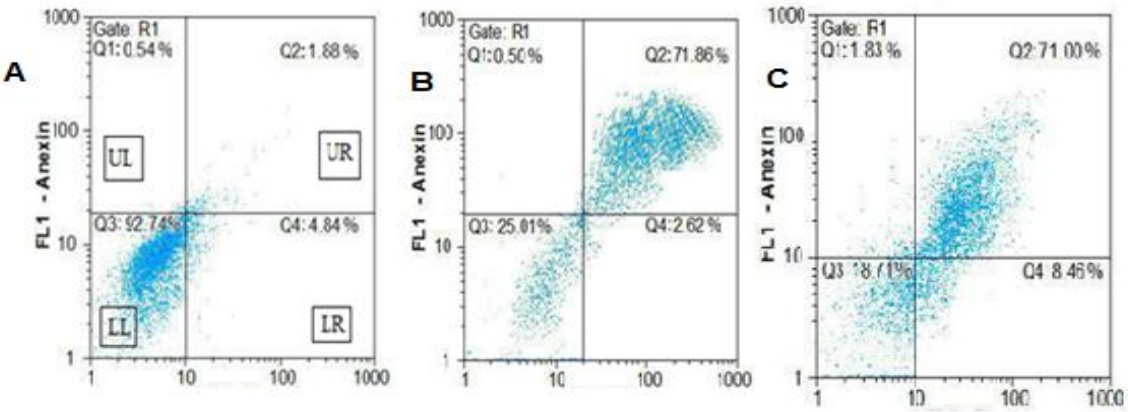


شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی سلول‌های AGS تیمار شده با عصاره‌های گیاهی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سه مدت‌زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت. A: شاهد B: تیمار با عصاره پونه پس از ۲٤ ساعت C: تیمار با عصاره پونه پس از ٤۸ ساعت D: تیمار با عصاره پونه پس از ۷۲ ساعت E: تیمار با عصاره درمنه پس از ۲٤ ساعت F: تیمار با عصاره درمنه پس از ٤۸ ساعت G: تیمار با عصاره درمنه پس از ۷۲ ساعت.

Figure 2. Microscopic images of AGS cells treated by herbal extracts with 500 µg/ml concentrations over 24, 48, and 72 hours. A: control, B: treated by *Mentha longifolia* extract after 24 hours, C: treated by *Mentha longifolia* extract after 48 hours, D: treated by *Mentha longifolia* extract after 72 hours, E: treated by *Artemisia persica* extract after 24 hours, F: treated by *Artemisia persica* extract after 48 hours, G: treated by *Artemisia persica* extract after 72 hours.

نتایج آپوپتوزی سلول‌های AGS با آزمون Annexin V/PI می‌دهد که با گذشت ۲٤ ساعت از تیمار سلول‌های AGS با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر زیادی روی القای آپوپتوز در مقایسه با تیمار شاهد داشته است. 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، به‌طوری‌که در نمونه‌ی شاهد ۹۲/۷٤ درصد از سلول‌ها زنده بودند (شکل۳).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]



شکل۳ - آپوپتوز ناشی از عصاره‌های پونه (B) و درمنه (C) در سلول‌های سرطانی معده (AGS)

LL: جمعیت سلول‌های زنده، LR: جمعیت سلول‌های با اپوپتوز اولیه، UL: جمعیت سلول‌های با نکروز نهایی، UR: جمعیت سلول‌های با آپوپتوز نهایی و نکروز اولیه.

Figure 3. Apoptosis caused by *Mentha longifolia* (B) and *Artemisia persica* (C) in gastric adenocarcinoma cells (AGS) under 600 µg/ml concentrations for 24 hours that was analyzed by Annexin V- /PI method.

بحث

تحقیق و پژوهش در زمینه منابع گیاهی همواره در دستور کار محققان جهان بوده است. در حال حاضر طیف وسیعی از داروهای مشتق شده از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده است که خواص مهار رشدی، التیام بخشی و آنتی‌بیوتیکی موثری از خود نشان داده‌اند (Lee *et al.* 2005). بدین‌منظور مراحل مختلفی مورد نیاز است تا ماده موثر یک گیاه به عنوان یک داروی استاندارد با کمترین خطرات اثر جانبی معرفی شود که این فرآیند از روش‌های مختلف عصاره‌گیری آغاز شده و با انجام آزمایش بر روی سلول‌ها و باکتری‌ها در محیط آزمایشگاه ادامه یافته و در نهایت با انجام آزمایش‌های مختلف بر روی انواع حیوانات آزمایشگاهی و بهینه‌سازی روش انتقال دارو جهت آزمایش روی انسان گسترش می‌یابد. به‌منظور یافتن ترکیبات گیاهی ضد سرطانی قوی و بی‌خطر از میان گیاهان بومی کشور، در این تحقیق تاثیر عصاره‌های جدا شده از پونه و درمنه بر سمیت سلول‌های سرطانی معده (AGS) توسط تست MTT بررسی شد. یافته‌های حاصله نشان دادند که عصاره‌های هیدرواتانولی پونه و درمنه سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شدند. بسیاری از گیاهان خانواده آرتیمیزیا از خواص دارویی سرشاری برخوردار هستند که از جمله آن می‌توان به خواص توموری، ضد میکروبی و ضد مالاریایی برخی از اعضای این خانواده اشاره کرد (Baldi *et al.* 2008). نتایج حاصل از بررسی ترکیبات موجود در گیاه درمنه نشان داده است که این گیاه حاوی طیف وسیعی از ترکیبات دارویی ارزشمند از قبیل توجون، کامفور، یوکالیپتو، بتا-کاریوفیلین، آلکان‌ها، آلکن‌ها و غیره می‌باشد (Nakamura *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005). همچنین وجود ترکیبات ۸، ۱-سینئول و آلفاپین در گیاه درمنه سبب شده است تا این گیاه از خواص ضدمیکروبی مطلوبی در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی برخوردار باشد (Orhan *et al*, 2010). آرتیمیزین یکی از پرکاربردترین داروهای ضدسرطانی است که از آرتیمیزیا تخلیص می‌گردد. نتایج حاصل از تحقیقات گذشته نشان داده است که استفاده روزانه آرتیمیزین می‌تواند در پیشگیری و یا جلوگیری از توسعه سرطان می‌تواند مفید باشد (Lai et al. 2013). این تحقیقات نشان داده‌اند آرتیمیزین از طریق القاء مرگ در سلول‌های پیش سرطانی و همچنین فعال‌سازی مسیر آپپتوز در سلول‌های سرطانی مانع از القاء و یا گسترش سرطان می‌گردد (Lai *et al.* 2006; Li *et al*, 2004; Emami *et al*, 2010). نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی گیاه *Artemisia persica* از خواص ضدتوموری مناسبی بر سلول‌های AGS برخوردار هستند. این نتایج با برخی از گزارش‌های مشابه همخوانی داشت. به‌عنوان مثال تاثیر عصاره برخی از گیاهان خانواده نعناع بر مهار رشد سلول‌های سرطانی سیرویکس (Hela)، پرومیلوسیتیک (HL-60) و معده (AGS) به اثبات رسیده است. نتایج این تحقیقات خواص ضدسرطانی ترکیبات گیاهی را مرتبط با وجود ترکیبات فلاونی جاسئودین (Jaceosidin) و یوپاتیلین (Eupatilin) در این گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

دانسته‌اند (SeoJ *et al.* 2003; Lee *et al.* 2005). عصاره گیاه *Artemisia asiatica* با القاء مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از قبیل سلول‌های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سلول‌های سرطان معده (AGS) سبب جلوگیری از گسترش سرطان می‌شود (Kim *et al.* 2004; Seo and Surh, 2001). علاوه بر گیاه *asiatica Artemisia*، خواص ضدسرطانی سایر گونه‌های *Artemisia* از قبیل *Artemisia capillaries*، *Artemisia iwayomogi* و *Artemisia prince* نیز در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Hu *et al.* 2000; Jeong *et al.* 2004). باتوجه به نقش مضر رادیکال‌های آزاد از قبیل سوپراکساید، هیدروکسیل و پراکسیل در القاء بیماری‌های مزمن از قبیل سرطان، وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی و غیره، از جمله دیگر دلایل خواص ضدتوموری گیاهان خانواده *Artemisia* بیان شده‌اند (Parejo *et al.* 2002; Abotaleb *et al.* 2020). و براساس نتایج این تحقیق گونه *Artemisia persica* که برای اولین بار سمیت سلولی آن مورد بررسی قرار گرفت، نیز داوطلب مناسبی برای بررسی اثرات ضد توموری و جداسازی ترکیبات موثره می‌باشد. فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی در بسیاری بررسی‌ها از جمله بیماری‌های کرونری و سرطان بررسی شده است (Morton 2000; El-Ansari *et al.* 2019). به‌طوری‌که مهمترین دلیل وجود اثر ضدسرطانی عصاره این گیاهان، به اجزای آنتی‌اکسیدان آن‌ها نسبت داده شده است. موادی که به‌طور طبیعی در پونه وجود دارند شامل پولگون، منتون، نئو منتون، ۱و۸- سینئول، پیپریتنون اکسید، کاریوفیلن، منتوفوران، آلفاترپینولن، لیمونن، فلاونون‌ها، ایزوفلاون‌ها و فلاونوئید می‌باشد (Dietz *et al.* 2010; Teixeira *et al.* 2012; Kamkar *et al.* 2010; Razavi *et al.* 2012). این ترکیبات با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد حاصل از برخی متابولیسم‌های موجود در بدن، از آسیب به DNA، پروتئین‌ها و سایر اجزاء مهم سلول جلوگیری می‌کنند. در چند سال اخیر مطالعات زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدان گیاهان دارویی از جمله پونه انجام شده که در طی بررسی، ترکیبات فنولیک با مقدار بالا در آن مشاهده شده که مسئول عملکرد آنتی اکسیدانی گیاه بودند (Nickavar *et al.* 2010). آل علی و همکاران سمیت سلولی *Mentha longifolia* بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 را بررسی کردند که حاکی از تاثیر سیتوتوکسیکی این گونه می‌باشد (Al-Ali *et al.* 2013). مطالعات جامع بر روی دو لاین سلول توموری فیبر سارکوما و لوسمیک مونوسیت حاکی از آن است که خانواده لامیاسه از جمله *Mentha polgium* اثر سمیت سلولی (سیتوتوکسیکی) قوی بر این دو لاین سلولی داشته است (Hajighasemi *et al.* 2011). در مطالعه‌ای که توسط کامکار انجام شده بود عصاره بدست آمده از پونه در طی استخراج با متانول و آب به واسطه‌ی داشتن ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها، عملکرد آنتی‌اکسیدانی داشته است (Kamkar *et al.* 2010). در مطالعه‌ی دیگر حاجی قاسمی سمیت سلولی گونه *Mentha spicata* را روی دو لاین سلول توموری فیبر سارکوما و لوسمیک مونوسیت بررسی کرد که روی هر دو لاین دارای اثر سیتوتوکسیکی بود (Hajighasemi *et al.* 2011). بر اساس مطالعاتی که در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، شش گونه از خانواده نعناعیان (Menthapiperita, M. spicata, M. aquatica, M. crispa, M. pulegium and M. longifolia) بر روی رده سلولی Vero, Hela و Hep2 اثر سمیت سلولی داشته است (Rahimifard *et al.* 2010). شباهت نزدیکی بین پژوهش حاضر با مطالعات صورت گرفته وجود دارد، زیرا در این پژوهش‌ها گیاهان متعلق به خانواده لامیاسه توانسته‌اند خاصیت سمیت سلولی را در لاین‌های سلولی مختلف در الگویی وابسته به دوز و زمان مشخص بروز دهند. نتایج بدست آمده در این تحقیق در توافق با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم اجزای فنولیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گیاهان دارویی می‌توانند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد و به نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به ویژه گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین باشد. از این رو نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدرواتانولی پونه و درمنه دارای اثر ضدسرطانی بوده که می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود. در پایان با توجه به بومی بودن این گیاهان، سازگاری آن‌ها با شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران، پرورش آسان و کم‌هزینه این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

گیاهان، وجود انواع متعدد فلاونوئیدهای گیاهی در آن‌ها، انجام مطالعات بیشتر روی خواص ضدسرطانی این گیاهان جهت استفاده به همراه داروهای شیمیایی و ایفای نقشی بالقوه در پروسه درمان، پیشنهاد می‌شوند.

منابع

Abad MJ, Bedoya LM, Apaz L, Bermejo P. 2012. The *Artemisia L.* genus: a review of bioactive essential oils. Molecules 17: 2542- 2566.

Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Busselberg D. 2020. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. Biomolecules 10: 221-243.

Al-Ali KH, El-Beshbishy HA, El-Badry AA, Alkhalaf M. 2013. Cytotoxic activity of methanolic extract of *Mentha longifolia* and *Ocimumbasilicum* against human breast cancer. Pakistan Journal of Biological Sciences 23:1744-50.

Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. 2009. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. International Journal of Biomedical Science 5: 1-11.

Armanini D, De Palo CB, Mattarello MJ, Spinella P, Zaccaria M, Ermolao A. 2003. Effect of licorice on the reductionof body fat mass in healthy subjects. Journal Endocrinology Investigation 26:646-50.

Arora R, Chawla R, Marwah R, Arora P, Sharma RK, Kaushik V, Goel R, Kaur A, Silambarasan M, Tripathi RP, Bhardwaj JR. 2011. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (Swine flu) pandemic: thwarting potential disasters in the Bud. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011:586506.

Baldi A, Dixit VK. 2008. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. Bioresource Technology 99: 4609-14.

Bode AM, Dong Z. 2015. Chemopreventive effects of licorice and its components. Current Pharmacology Reports 1:60-71.

Bot JL. 2009. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Angiosperm Phylogeny Group 161:105-121.

Chiu LCM, Ho TS, Wong EYL, Ooi VEC. 2006. Ethyl acetate extract of *Patrinia scabiosaefolia* downregulates anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-X_L expression, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation. Journal of Ethnopharmacology 105: 263-268.

Cragg GM, Newman DJ. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1830:3670- 3695.

Dietz BM, Bolton JL. 2010. Biological reactive intermediates (BRIs) formed from botanical dietary supplements. Chemico Biological Interactions 192: 72-80.

Džamić AM, Soković MD, Ristić MS, Novaković M, Grujić-Jovanović S, Tešević V, Marin PD. 2010. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia (L.)* Hudson (Lamiaceae) essential oil. Botanica Serbica 34: 57-61.

El-Ansari MA, Ibrahim LF, Sharaf M. 2020. Natural phenolics: a source of anticancer agents. Egyptian Pharmaceutical Journal 18: 1-7.

Emami A, Zamani Taghizadeh Arba Sh, Ahi A, Mahmoudi M. 2010. The inhibitory effect of *Artemisia annua* extracts on gastric cancer cells via apoptosis induction. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 11: 1-10. (In Farsi with English abstract).

Hajighasemi F, Hashemi V, Khoshzaban F. 2011. Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. Journal of Medicinal Plants Research 5:5142-7.

Helganson CD, Miller CL. 2003. Basic cell culture protocols. Humana press Inc, Springer, Switzerland, 365pp.

Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. 2000. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. Japanese Journal of Cancer Research 91: 113-7.

Jalilzadeh-Amin G, Maham M, Dalir-Naghadeh B, Kheiri F. 2012. Effects of *Mentha longifolia* essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. Journal of Essential Oil Research 24: 61- 69.

Jeong SH, Koo SJ, Ha JH, Ryu SY, Park HJ, Lee KT. 2004. Induction of apoptosis by yomogin in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27: 1106-11.

Kamkar A, Javan AJ, Asadi F, Kamalinejad M. 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology 48: 1796-1800.

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

Kim DH, Na HK, Oh TY, Kim WB, SurhYJ. 2004. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces cell cycle arrest in ras-transformed human mammary epithelial cells. Biochemical Pharmacology 68: 1081-87.

Koh YC, Ho CT, Pan MH. 2020. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. Journal of Food and Drug Analysis 28: 14-38.

Lai H, Singh NP. 2006. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. Cancer Letters 231: 43-48.

Lai HC, Singh NP, Sasaki T. 2013. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. Investigational New Drugs 31: 230-246.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

Lee HG, Yu KA, Oh WK, Baeg TW, Oh HC, Ahn JS. 2005. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. Journal of Ethnopharmacology 98(3): 339-43.

Lehtihet M, Nygren A. 2000. Licorice--an old drug and currently a candy with metabolic effects. Lakartidningen 97: 3892-94.

Li Y, Li MY, Wang L, Jiang ZH, Li WY, Li H. 2004. Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia Annua L*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 35: 337-9.

Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB, Croft KD. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 27:152-9**.**

Mozaffarian V. 2000. Flora of Yazd, Yazd Publication. (In Farsi with English abstract).

Nakamura Y, Kawamoto N, Ohto Y, Torikai K, Murakami A, Ohigashi H. 1999. A diacetylenic spiroketal enol ether epoxide, AL-1, from *Artemisia lactiflora* inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion possibly by suppression of oxidative stress. Cancer letters 140: 37-45

Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period. Journal of natural products 66: 1022-37.

Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. 2010. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 7:203-9.

Oliveira FJ, Ferrão H, Furtad E, Batista H, Conceição L. 1998. Early gastric cancer: report of 58 cases. Gastric Cancer 1: 51- 56.

Orhan IE, Belhattab R, Şenol FS, Gülpinar AR, Hoşbaş S, Kartal M. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulossum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. Industrial Crops and Products 32: 566-571.

Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J. 2002. Comparison between the radicalscavenging activity and antioxidantactivity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6882-90.

Pecorino L. 2012. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics: Oxford University Press, United Kingdom, 433pp.

Pirzadeh S, Fakhari S, Jalili A, Mirzai S, Ghaderi B, Haghshenas V. 2014. Glycyrrhetinic acid induces apoptosis inleukemic HL60 cells through upregulating of CD95/CD178. International Journal of Molecular and Cellular Medicine 3: 272-8.

Poeta DG, Bruno A, Del Principe MI, Venditti A, Maurillo L, Buccisano F. 2008. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. Current Cancer Drug Targets 8: 207-22.

Rahimifard N, Hajimehdipoor H, Hedayati MH, Bagheri O, Pishehvar H, Ajani Y. 2010. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep5 Cell Lines. Journal of Medicinal Plants 9.35: 88-92.

Razavi SM, Zarrini G, Molavi, G. 2012. The evaluation of some biological activity of *Mentha longifolia (L.)* Huds growing wild in Iran. Pharmacologia 3: 535-538.

Seo HJ, Surh YJ. 2001. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 496: 191-8.

Seo JM, Kang HM, Son KH, Kim JH, Lee CW, Kim HM. 2003. Antitumor activity of flavones isolated from *Artemisia argyi*. Planta Medica 69: 218-22.

Siegel R, Ma J, Zhaohui Z, Jemal A. 2014. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 64: 9- 29.

Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. 2005. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic and Medicinal Chemistry 13: 5892-5908.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O. 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products 36: 81-98.

Vijay K, PammiS, Kollu P, Satyanarayana K, Shameem U. 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaaviadiffusa plant extract and their antibacterial activity. Industrial Crops and Products 52: 562-6.

Wang ZY, Agarwal R, Zhou ZC, Bickers DR, Mukhtar H. 1991. Inhibition of mutagenicity in *salmonella typhimurium* and skin tumor initiating and tumor promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetinic acid: comparison of 18α- and 18β-stereoisomers. Carcinogenesis 12: 187-92.

Weis VG, Goldenring JR. 2009. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. Gastric Cancer 12: 189-97.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

Evaluation of anticancer effect of *Mentha longifolia* and *Artemisia persica* hydro-alcoholic extracts against human gastric cancer cells (AGS)

Omid Sofalian[1*], Nasser Zare[1], Saied Latifi Navid[2], Kobra Hasanpour Reyhani[3], Sara Motallebinia[3]

1. Plant breeding Dept., Faculty of Agricultural and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran
2. Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili
3. MSc graduated of agricultural biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili

*Corresponding Author, Email: sofalian@gmail.com

Abstract

Cancer treatment using medicinal plants has long been of interest to researchers. In the meantime, some plant species contain substances which can inhibit or eliminate cancer cells through apoptosis or necrosis. The family of Lamiaceae and Asteraceae are among the medicinal plants that have many biological effects. The purpose of this study was to investigate the anticancer effect of Pennyroyal and Artemisia extracts on gastric cancer cell line (AGS). In this study, aerial parts of plants were extracted. AGS cells were treated with different concentrations of hydro-alcoholic extract (50-1000 µg/ml) over 24, 48 and 72 hours. Cell motility was estimated using MTT assay and rate of apoptosis induction was measured by flow cytometry with The Annexin-V. The results of MTT assay indicated strong and concentration dependent prevention of cancer cell proliferation by various concentrations of Pennyroyal and Artemisia extracts. These extracts had a dose and time dependent anticancer effect on AGS cells. By increasing the concentration of the extract and incubation for 72 hours, the highest percentage of cell death was observed. In the study of apoptosis in treated cells, Pennyroyal extract was more effective. Due to the cytotoxic effects of hydro-alcoholic extracts on AGS cells, these plants could be used as potential option for further studies on cancer treatment. Therefore, the purification of the active substances in these extracts and the determination of their effect mechanism are recommended.

Key words: Artemisia, Gastric cancer cells (AGS), hydro-alcoholic extract, Pennyroyal

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.1.4]