مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۷، مهر ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه دغدغک (*Colutea Persica*) بر رده‌های سلول‌های سرطانی معده و کلون

ناهید عسکری: استادیار، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری، کرمان، ایران (* نویسنده مسئول) nahidaskari@gmail.com

کیان آقاعباسی: پردیس بین‌الملل دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است. در سال‌های اخیر، به‌علت عوارض جانبی داروها و تحمل دارویی ضرورت توجه به گیاهان دارویی افزایش یافته است. گیاه دغدغک در طب سنتی مصرف دارویی داشته و به‌عنوان یک ضد التهاب برای درمان اختلالات گوارشی استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر سمیت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه دغدغک بر رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS)، کولون (HT-29) و رده سلولی فیبروبلاست نرمال (SKM) انجام شد.

روش کار: برگ‌های تازه گیاه دغدغک از منطقه دلفارد استان کرمان در سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شدند. اثر غلظت‌های مختلف (۱۰۰µg/ml و ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵) عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه دغدغک بر رده‌های سلولی HT-29, AGS و SKM به مدت ۲۴ ساعت با آزمون MTT بررسی شد. میزان القاء آپوپتوز به روش فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin-V/ PI بررسی و تغییر بیان ژن‌های (BAX و BCL-2) توسط Real-time PCR ارزیابی شد. محتوای فنلی کل گیاه به روش معرف Folin-Ciocalteu تعیین شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند (p<۰/۰۵).

یافته‌ها: عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه دغدغک به ترتیب دارای ۵/۰±۸۵/۰۸ mg/g و ۵/۰±۰۲/۰۵mg/g محتوای ترکیبات تام فنلی بودند که بر رده‌های سلولی HT-29 و AGS اثر سایتوتوکسیک داشته و باعث القای آپوپتوز شدند. در تیمار عصاره هیدروالکلی و آبی گیاه دغدغک (با غلظت ۱۰۰ µg/ml) در مدت ۲۴ ساعت در HT-29, AGS میزان بیان ژن‌های BCL2 و BAX به ترتیب کاهش و افزایش یافت (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: گیاه دغدغک با اثر اختصاصی بر سلول‌های سرطانی (HT-29 و AGS) توانایی مهار رشد این سلول‌ها را داشته و از آنجا که بومی مناطقی از کشور می‌باشد، بررسی دقیق آن اهمیت دارد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

ترکیبات تام فنلی،

سرطان معده،

سرطان کلون،

سمیت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹

شیوه استناد به این مقاله:

Askari n, Aghaabbasi K. Evaluation of Cytotoxic Effect of *Colutea persica* on Human Gastric and Colon Cancer Cell Lines. Razi J Med Sci. 2022;29(7):73-84.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(7):73-84. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of Cytotoxic Effect of Colutea persica on Human Gastric and Colon Cancer Cell Lines

Nahid Askari: Assistant Professor, University of Advanced Technology, Kerman, Iran (* Corresponding author) nahidaskari@gmail.com
Kian Aghaabbasi: Post-graduate student, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Background & Aims: Cancer is one of the most important issues in the world which affects public health as an important problem. Cancer is the third cause of death in Iran with an annual occurrence of 51,000 new cases [1]. Previous studies demonstrated the considerable increasing trends in the mortality of gastrointestinal cancer in Iran, especially for Gastric cancer and colorectal cancer [2]. In general, incidence rates of these two cancers are high in Eastern Europe, Eastern Asia, and South America and the lowest rates are in North America, and most parts of Africa [3]. The most critical factors that increases the risk of gastrointestinal cancer are aging, inappropriate diet, biological factors, and infectious diseases which contribute to the cancer occurrence [4]. Colon cancer is studied to be one of the most critical digestive diseases and is the second leading cause of cancer deaths [5]. Gastric cancer is important cancer in the world and the prevalence of gastric cancer is raised with aging in both men and women [6]. Colon cancer is a disorder in which malignant cells form in the large intestinal tissues [7]. On the other hand, in gastric cancer the malignant cells form in the lining layer of the stomach caused it. The risk of gastric cancer is high in Iran, and unlike in Western countries it is not under the control, thus it is on a *dramatically increasing* trend in *Iran* [8]. Secondary metabolites and phenolic compounds of plants can play an important role in reducing the side effects of chemotherapy drugs and have some positive effects on cancer cells, as well as in the expression of apoptotic pathway genes [9]. *Colutea persica* was used in traditional medicine as an anti-inflammatory agent in gastrointestinal problems [10]. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Colutea persica* on gastric cancer (AGS), colon cancer (HT-29), and normal fibroblast (SKM) cell lines.
Methods: Fresh *Colutea persica* leaves were collected from the Delfard region of Kerman province in 1399. Dried leaves of *Colutea persica* were ground into a fine powder by the electronic grinder. At the next step, the ground powder was extracted using ethanol by the maceration. Then, it was placed on a shaker at room temperature. After that, the collective extracted was filtered using a filter membrane. The solvent extracted was evaporated in the rotary evaporator. Finally, to completely remove the solvent, the extract was placed in an oven, and the hydroalcoholic extract was maintained at -20 °C until use. In order to measure the total flavonoid content (TFC) of the extracts the aluminum chloride complex-forming assay was applied. In this method, quercetin was applied as the standard which flavonoid content was distinguished based on the quercetin equivalent. Briefly, *Colutea persica* extract was added to the aluminum chloride hexahydrate and mixed with potassium acetate and distilled water. After 30 minutes, the absorbance of the reaction was checked using a UV-Vis spectrophotometer at 415 nm. The blank sample was made by replacing aluminum chloride with deionized water. Before measuring, all of the solutions were filtered by using Whatmann filter papers (number 41). Total

Keywords
Total Phenolic Contents,
Gastric Cancer,
Colon Cancer,
Cytotoxic

Received: 01/08/2022
Published: 01/10/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

flavonoid content in *Colutea persica* extract was measured using the standard calibration curve which is achieved from different concentrations of the standard reference.
The total phenolic content (TPC) of organic crude extracts was calculated using the Folin-Ciocalteu reagent method. In this method, gallic acid was used as a reference standard (20-100 µg/mL) for plotting the calibration curve. 0.5 mL of the *Colutea persica* extract was added to 1.5 mL of Folin-Ciocalteu solution. Then, it was diluted (1:10) with deionized water and added to the sodium carbonate solution.
The absorbance was recorded after one hour at 765 nm by using a UV-Vis spectrophotometer. Finally, the total phenolic content was calculated based on gallic acid equivalents (mgGAE/g). All the experiments were done in triplicate.
Cytotoxic effects of 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml concentrations of aqueous and hydroalcoholic extracts were evaluated on the cells for 24 hours using MTT assay. The apoptosis induction was monitored using flowcytometry by annexin-V FITC/PI double-staining. Cells were seeded and after 24 h they were incubated with a 1.25 mg/ml concentration of the extract and for each treated cell line, one control cell was considered. The annexin V/PI assay was performed to confirm the cytotoxic activity of the plant extracts against AGS and HT-29 cell lines. Total RNA was isolated from cells using RNX-plus TM Reagent before and after treatment. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using M-MuLV-RT and random hexamers. The cDNA was assayed by real-time PCR using primers for BAX and BCL-2 genes. Data were analyzed using SPSS software, one way ANOVA, Tukey test at $p \leq 0.05$...
Results: The MTT assay revealed the cytotoxicity against both two cell lines (HT29 and AGS) in comparison to the HT29 and AGS normal cell line (SKM). The expression level of *BAX* gene increased and *BCL2* gene decreased in AGS cell line after treatment by plant extract. ($p<0.05$). The total phenolic content was expressed in terms of milligram gallic acid equivalent per gram dry weight of plant extract. The total phenolic content of hydroalcoholic and aqueous extracts of Colutea persica were 5.02±.05 and 5.85.±0.08 mgGAE/g respectively.
Conclusion: In conclusion, our findings show that *Colutea. persica* has anti-cancer effects in vitro against AGS and HT-29 cancer cell lines. Induction of apoptosis by using plant extract was achieved by down-regulation of *BCL2* and up-regulation of *BAX*. Finally, the current study suggests that *Colutea. persica* may have cancer-fighting properties and could be a promising new candidate in this field. Besides, the molecular target of *Colutea. persica* and its mechanism are unknown, and the author intends to use animal models and bioinformatics methods to discover the active ingredients of *Colutea. persica*.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Askari n, Aghaabbasi K. Evaluation of Cytotoxic Effect of *Colutea persica* on Human Gastric and Colon Cancer Cell Lines. Razi J Med Sci. 2022;29(7):73-84.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

مقدمه

سرطان های دستگاه گوارش حدود ۲۰٪ از کل سرطان‌های موجود را به خود اختصاص داده‌اند (۱۱) و در این میان، سرطان معده یکی از مرگ‌آورترین سرطان‌ها می‌باشد (۱۲) که چهارمین سرطان رایج در دنیا و با مرگ‌ومیری بالای ۷۰۰ هزار نفر در سال و دومین عامل فوت به علت سرطان، بعد از سرطان ریه است (۱۳). از سوی دیگر، سرطان کولون یا کولورکتال که به عنوان سرطان روده هم شناخته می‌شود، از رشد کنترل نشده سلول‌های روده بزرگ، راست روده و یا آپاندیس ایجاد می‌شود. این سرطان، به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های دستگاه گوارش شناخته شده است. سالانه حدود ۴۰۰۰۰۰ نفر در جهان بر اثر این بیماری جانشان را از دست می‌دهند (۱۴). در سال‌های اخیر دانشمندان از گیاهان و یا بعضی از ترکیبات مشتق شده از گیاهان برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کنند چراکه این ترکیبات علاوه بر اینکه در درمان بیماری و تأثیر بر میزان مرگ سلولی مؤثر می‌باشند (۱۵)، اثرات جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند. آنالیزهای شیمیایی نشان داده است که تنوع وسیعی از ترکیبات زیستی فعال مانند تانن، پلی‌ساکارید و فلاونوئید در گیاهان وجود دارد. علاوه بر این، یکی از بزرگ‌ترین مشکلات داروهای مورد استفاده در مبارزه با سرطان این است که سلول‌های سالم به میزان زیادی تحت تأثیر داروهای شیمیایی قرار گرفته و آسیب می‌بینند (۱۶).

از سوی دیگر، ژن‌های متعددی در فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول درگیر هستند و تحریک بیان ژن های پروآپوپتوزی و یا مهار ژن های ضد آپوپتوزی بستگی به نوع سلول و محرک دارد (۱۷). دو مسیر اصلی آپوپتوز، مسیر خارجی یا وابسته به گیرنده‌های مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی است (۱۹ - ۱۸). از سوی دیگر، سلول‌های توموری استراتژی های مختلفی را برای محدود کردن فرایند آپوپتوز به کار می‌گیرند. تومور ها می‌توانند از طریق افزایش بیان تنظیم‌کننده‌های ضد آپوپتوزی (BCL2 و Bcl-XL) و یا به واسطه کاهش فاکتورهای آپوپتوتیک (BIM،BAX و PUMA)، آپوپتوز را مهار کنند (۲۰). از سوی دیگر، در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی رواج یافته است (۲۱). یکی از این گیاهان، گیاه دغدغک با نام علمی Colutea Persica است. این گیاه، گیاهی چند ساله به شکل درختچه‌ای یا بوته‌ای و دارای گل های زرد و به ندرت ارغوانی است و در محدوده نواحی مدیترانه‌ای، جنوب شرقی اروپا، شمال غربی آفریقا و جنوب غربی و مرکز آسیا پراکندگی دارند. در تقسیم‌بندی فلور ایرانیکا حدود ۳۱ گونه برای این جنس آورده شده است که فقط ۷ گونه در مناطق استپی مرتفع، در نقاط مختلف ایران از جمله جنوب استان کرمان پراکنش دارند (۲۲). دغدغک یکی از گیاهان دارویی است که به صورت خشک شده یا عصاره در کشورمان استفاده می‌گردد (۲۳). از جمله کاربردهای سنتی آن می‌توان به استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌های گوارشی اشاره کرد (۲۴). از این رو، در این پژوهش عصاره گیاه دغدغک از رویشگاه‌های اصلی استان کرمان جمع‌آوری شد و عصاره‌های آبی و هیدروالکلی آن تهیه و تأثیر آن بر رده سلول های سرطان معده، سرطان کلون و سلول‌های فیبروبلاست نرمال مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

تهیه نمونه گیاه دغدغک و عصاره گیری: در این پژوهش گیاه دغدغک از رویشگاه اصلی استان کرمان (از منطقه سردسیر دلفارد، از توابع بخش ساردوئیه شهرستان جیرفت، با مختصات جغرافیایی ۵۷ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی و ۲۹ درجه و ۱ دقیقه عرض شمالی) در سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری و برای تهیه عصاره هیدروالکلی و آبی از روش خیساندن (ماسراسیون) استفاده شد (۲۵). به این صورت که ابتدا ۴۰ گرم از برگ خشک گیاه به کمک دستگاه آسیاب کاملاً پودر شد. پودر حاصل در ۳۰۰ سی سی اتانول ۷۰٪ (عصاره هیدروالکلی) و ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر (عصاره آبی) حل گردید و به مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه شیکر با سرعت متوسط در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد، با کمک کاغذ صافی واتمن ۱ عصاره‌ها صاف شد. به منظور جدا سازی حلال از دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس برای جدا سازی کامل حلال از عصاره، نمونه‌ها در داخل اون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

در نهایت عصاره‌های حاصل از حلال‌های آبی و هیدروالکلی به صورت خشک در آمد و تا زمان استفاده در فرایند آزمایشگاهی، در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول و انجام تست MTT: رده سلول‌های سرطانی معده (AGS)، سرطان کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاست (SKM) در داخل فلاسک 25 cm^2 به صورت کشت شده از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های سرطانی AGS و HT-29 در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و سلول‌های فیبروبلاست نرمال در محیط کشت MEMα حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، پنی سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml) و آمفوتریسین B (۱ µg/ml) کشت داده شد و در انکوباتور (BINDER، آلمان) مرطوب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵٪ CO_2 انکوبه گردید. تعویض محیط کشت هر ۳ روز یک بار انجام شد (۲۶).

برای انجام تست MTT تعداد $۱۰^۴$ ×۱ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سلول‌ها به صورت گروه‌های مختلف تیمار و کنترل تقسیم‌بندی و برای هر گروه سه چاهک اختصاص داده شد و آزمایش سه بار تکرار گردید. در گروه‌های تیمار، ۵ غلظت از هر یک از عصاره‌های آبی و هیدروالکلی (µg/ml ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵) به سلول‌ها اضافه شدند. پس از انکوباسیون به مدت زمان ۲۴ ساعت، به هر چاه پلیت ۲۰ میکرو لیتر MTT ساخت شرکت سیگما با غلظت 5 mg/ml اضافه شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد و سپس محیط روی سلول‌ها به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. پس از حدود ۲۰ دقیقه، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. غلظتی از عصاره که باعث مهار رشد سلولی به میزان ۵۰٪ می‌شود به عنوان IC50 در نظر گرفته شد و میزان بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

(۱۰۰× میانگین جذب کنترل / میانگین جذب سلول‌های تحت اثر عصاره) -۱=میزان بقای سلولی

انجام واکنش RT- qPCR: بر اساس نتایج حاصل از تست MTT جهت سنجش میزان تغییر در بیان ژن‌های BAX و BCL-2، سلول‌های سرطانی معده(AGS)، سرطان کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاست (SKM)، به مدت ۲۴ ساعت، تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. استخراج RNA از نمونه‌های سلولی، با استفاده از محلول RNX-plusTM (شرکت سیناکلون، ایران) انجام شد. پس از استخراج RNA به منظور تعیین کمیت و کیفیت آن، از طیف‌سنجی و الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. میزان جذب RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد که برای نمونه خالص RNA این نسبت ۲-۱/۸ است. در مرحله بعد ۱µg از RNA کُل برای ساخت cDNA استفاده گردید (۲۷) واکنش ساخت cDNA مطابق دستورالعمل کیت شرکت یکتا تجهیزآزما انجام شد. به این صورت که، برای حذف DNA ژنومیک احتمالی، ۱ میکرولیتر DNaseI و ۱ میکرولیتر بافر DNaseI درون لوله عاری از RNase ریخته شد و با آب DEPC به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای غیر فعال شدن DNaseI، ۱ میکرولیتر EDTA اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن، به هر کدام از لوله‌ها ۲ میکروگرم پرایمر رندوم هگزامر اضافه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از ۵ دقیقه سریعاً به روی یخ منتقل شدند.

پس از این مرحله، cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در فرایند ساخت cDNA، یک لوله به عنوان کنترل منفی وجود داشت که حاوی تمام اجزای واکنش به جز RNA بود که برای اطمینان از عدم آلودگی مواد به‌کار رفته، استفاده شد.

واکنش RT-qPCR در ۴۵ سیکل و حجم ۱۵ میکرولیتر با حضور ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ و ۷/۵ میکرولیتر محلول کیت SYBR-Green یکتا تجهیز آزما و ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل در دستگاه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-time RT-qPCR

نام ژن	شماره ثبت شده بانک ژن	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
β- ACTIN	NM_001101	۶۴	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	۱۸۹
BCL2	NM_138578	۶۱	F:GTGGATGACTGAGTACCTGA R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	۱۱۹
BAX	NM_004324	۶۱	F:TTTGCTTCAGGGTTTCATCC R:CAGCTCCATGTTACTGTCCA	۱۵۴

(Corbett- Real time ROTOR GENE 3000) اجرا و از ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (۲۸). با توجه به اهمیت تمایز موارد منفی حقیقی، استفاده از کنترل‌های داخلی از اهمیت زیادی برخوردار است، به همین دلیل بررسی بیان این ژن‌ها نسبت به ژن (β-actin) به‌عنوان ژن کنترل داخلی انجام شد.

Ct نمونه‌ها در فاز لگاریتمی گرفته شد و غلظت اولیه هر نمونه بر علیه غلظت اولیه ژن کنترل داخلی متناظر با آن (ژن بتا اکتین) نرمالیزه شد. سپس با استفاده از روش ΔΔCT بررسی و نسبت ژن هدف به ژن مرجع بتااکتین از طریق $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ محاسبه گردید (۲۹).

تعیین مقدار ترکیبات فنلی کل: برای سنجش مقدار ترکیبات فنلی کل، به ml ۰/۵ از عصاره رقیق شده (۱:۱۰g/ml) ml ۵ فولین رقیق شده (۱:۱۰) (رقیق شده با آب مقطر) اضافه شد و سپس Na2co3 آبی (۱M) به مقدار ml ۴ به آن اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و سپس جذب آن در nm ۷۶۰ با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۲۴). منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی (۰-۵۰۰mg/l) از اسید گالیک در متانول تهیه و منحنی با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط y=bx+a بدست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x یا همان غلظت بدست آمد (۱۴).

تعیین میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی: بر اساس نتایج حاصل از تست MTT جهت سنجش میزان آپوپتوز، رده‌های سلول‌های سرطانی معده (AGS)، سرطان کلون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاست (SKM)، به مدت ۲۴ ساعت، تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. رده سلول‌های تیمار شده و بدون تیمار (کنترل) با استفاده از روش Annexin/PI با کیت تشخیصی (BD Kit I Pharmingen™, USA) و با کمک دستگاه فلوسایتومتری (CYFlow شرکت partec G mbH، ساخت آلمان) بررسی شد. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها توسط تریپسن جدا شده و با FBS خنثی شد و بعد از آن سلول‌ها در دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، سپس به سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد بافر باندینگ اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ annexin V اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سلول‌ها با محلول بایندینگ شستشو و در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد و در پایان کار آنالیز و میزان مرگ سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده ها: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS(نسخه-۲۰)، آنالیز شد و واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

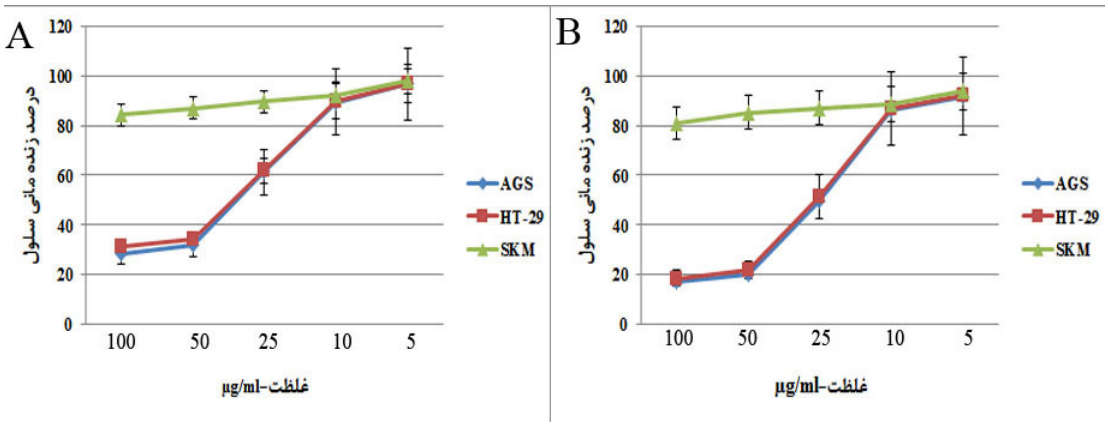
یافته‌ها

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که هر دو نوع عصاره هیدروالکلی و آبی به صورت معنی‌داری (p<۰/۰۵) در غلظت µg/ml ۱۰۰ سبب القای آپوپتوز

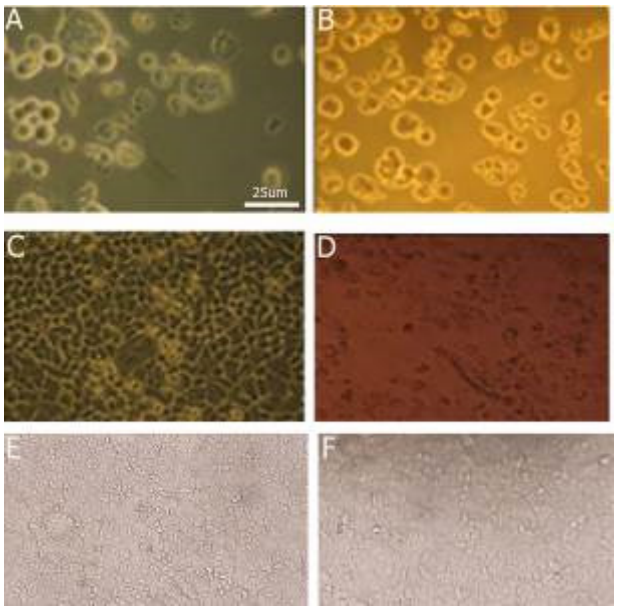
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

(۷۰٪) در سلول‌های سرطان معده و روده می‌شوند (شکل ۱). از سوی دیگر هر دو نوع عصاره هیدروالکلی و آبی در غلظت ۱۰۰ µg/ml سبب القای آپوپتوز در سلول‌های نرمال نیز شدند ولی این مقدار از نظر آماری خیلی کمتر از مقدار مشاهده شده در سلول‌های AGS و HT-29 بود (شکل ۲) با توجه به نتایج مشاهده شده در این پژوهش، استفاده از عصاره دغدغک برای کاهش تعداد سلول های سرطانی مفید بوده و جمعیت سلول‌های سرطانی کاهش یافت ولی سلول‌های سالم به میزان خیلی کمتری تحت تأثیر قرار گرفتند.

نتایج بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک RT-qPCR نشان داد که بیان ژن BCL2 در رده سلولی AGS و HT-29 با تیمار با غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره هیدروالکلی و آبی گیاه در مدت ۲۴ ساعت نسبت به ژن کنترل بتااکتین به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) و بیان ژن BAX نسبت به ژن کنترل بتااکتین به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p<0/05$) بنابراین نسبت BAX/BCL2 نیز در نمونه‌های سرطانی



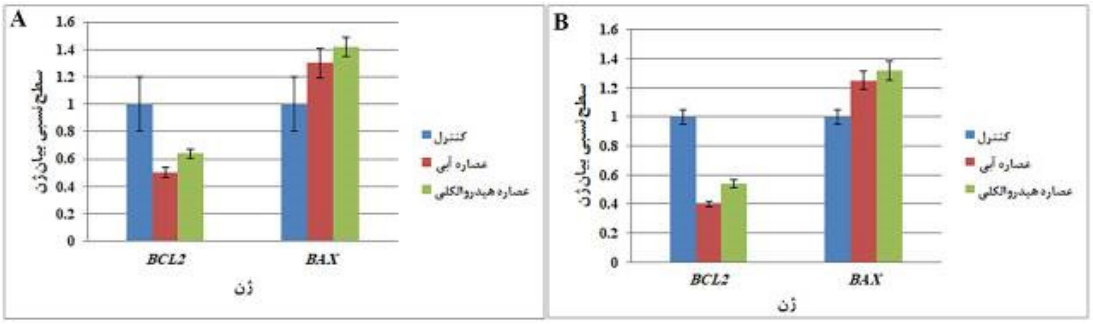
شکل ۱- میانگین توان زیستی سلول ها در زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با نمونه کنترل. (A): تأثیر عصاره آبی، (B): تأثیر عصاره هیدروالکلی بر رده‌های سلولی (AGS, HT-29, SKM). داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است



شکل ۲- اثر عصاره هیدروالکلی گیاه دغدغک بر سلول‌های سرطانی در غلظت ۱۰۰ µg/ml

A: سلول‌های HT-29 قبل از تیمار،B: بعد از تیمار، C: سلول‌های AGS قبل از تیمار،D: بعد از تیمار،E: سلول‌های SKM قبل از تیمار،F: بعد از تیمار

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]



شکل ۳- میزان بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* در سلول‌های (A: HT-29، B: AGS) تیمار شده با عصاره هیدروالکلی و عصاره آبی گیاه دغدغک (µg/ml ۱۰۰) در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۲- نتایج فلوسایتومتری شامل درصد جمعیت سلول‌های زنده، نکروزه، آپوپتوزیس (آپوپتوز اولیه و ثانویه) برای سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاهی (با غلظت ۵µg/ml) در مدت ۲۴ ساعت.

نوع سلول	سلول‌های زنده (٪)	نکروزه (٪)	آپوپتوز اولیه (٪)	آپوپتوز ثانویه (٪)
HT-29	۹۴/۲۵	۱/۱۱	۲/۰۴	۲/۰۹
AGS	۹۲/۱۸	۱/۰۹	۳/۶۸	۳/۴۱

بعد از تیمار با عصاره دغدغک افزایش یافت (شکل ۳).

عصاره گیاه دغدغک باعث کاهش بیش از پنجاه درصد میزان بقای سلول‌ها می‌شود که مقادیر (IC50) محاسبه شده برای سلول‌های AGS، HT-29 و SKM در زمان ۲۴ ساعت به ترتیب ۱/۲۱±۴۸/۶۹، ۰/۹۸±۵۱/۰۹ و ۱۰۰ < میکروگرم بود.

نتایج ارائه شده در فلوسایتومتری شامل درصد جمعیت سلول‌های زنده، نکروزه، آپوپتوز (آپوپتوز اولیه و ثانویه) برای سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاهی با غلظت µg/ml ۵ در ۲۴ ساعت می‌باشد (جدول ۲).

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث ۹۲/۱۸، ۹۴/۲۵ درصد سلول‌های زنده، ۳/۶۸، ۲/۰۴ درصد آپوپتوز اولیه، ۳/۴۱، ۲/۰۹ درصد آپوپتوز تأخیری و ۱/۰۹ و ۱/۱۱ درصد نکروز به ترتیب در سلول‌های AGS و HT-29 شده است.

از آنجا که در گیاهان مختلف، ترکیبات فنلی وجود دارد که خاصیت ضدسرطانی آنها ثابت شده است. از این رو، محتویات فنلی گیاه دغدغک به صورت میانگین ± S.D در سه تکرار اندازه‌گیری شد (۲۲) که به ترتیب بر اساس معادله گالیک اسید در عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برابر با ۰/۰۸mg/g ۵/۸۵ و ۰/۰۵mg/g ۵/۰۲ (GAE) بود.

بحث

شیوع بسیار زیاد سرطان در ایران و جهان نیاز به داروهایی با عوارض جانبی کمتر و اثرات درمانی بهتر را مورد توجه پژوهشگران قرار داده است. به‌طوری‌که امروزه بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی برای درمان بیماران سرطانی از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیسم‌ها به‌دست می‌آیند. بسیاری از گیاهان بومی ایران نیز دارای خواص درمانی گسترده همچون پیشگیری از سرطان، ممانعت از تشکیل تومور، درمان زخم و عفونت‌ها می‌باشند. در پژوهش حاضر به دلیل اهمیت گیاه دغدغک و استفاده از آن در اقلیم‌های متفاوت ایران به بررسی اثرات ضد سرطانی این گیاه توجه شده است. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات فنلی موجود در گیاهان خاصیت ضدسرطانی دارند (۱۶) و عصاره گیاه دغدغک مورد استفاده در این پژوهش نیز سبب کاهش جمعیت سلول‌های سرطانی شد که می‌تواند به علت ترکیبات فنلی در عصاره گیاه دغدغک باشد. سوری و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک روش آزمایشی برای غربالگری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۶۰ گیاه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

ایرانی معرفی کردند و با آزمایش پراکسیدا سیون ا سید لینولئیک با ا ستفاده از ۱، ۳-دی اتیل-۲-تیوباربیتوریک اسید به عنوان معرف نشان دادند که گیاه دغدغک خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (۳۰). مطالعات زیادی بر روی گیاه دغدغک و گیاهان هم خانواده این گیاه انجام شده ا ست (۳۱). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، مشخص شد که D-pinitol جدا شده از عصاره برگ‌های Colutea cilicica یک عامل ضد التهابی برای درمان سرطان سلول‌های میلوییدی خون انسان K562 است، هر چند که در تکثیر سلولی و آپوپتوز در سلول‌های K562 تأثیر نمی‌گذارد (۳۲) در پژوهشی دیگر، در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که عصاره آبی Colutea cilicicaدر ترمیم زخم مؤثر است (۳۳). مقدار فنل موجود در گیاه دغدغک یکی از مهم‌ترین ترکیباتی است که می‌تواند خاصیت ضدسرطانی داشته باشد که این مقدار در عصاره های آبی و هیدروالکلی برابر با ۵/۸۵±۰/۰۸mg/g و ۵/۰۲±۰/۰۵mg/g (GAE) م شابه مقدار فنل گزارش شده در Colutea persica Boiss بود که در سال ۲۰۱۶ توسط جهرمی و همکاران گزارش شده بود (۳۴).

علاوه بر این، مطالعات بسیاری بر روی میزان تأثیر ترکیبات گیاهی مختلف بر سرطان‌های د ستگاه گوارش انجام شده است. چندین ماده شیمیایی گیاهی مانند ر سوراترول، لیکوپن، سولفورافان یا سیلی بینین دارای فعالیت ضد توموری و سمیت نسبتاً کم برای سلول‌های طبیعی هستند؛ بنابراین آنها را می‌توان در ترکیب با داروهای ضد تومور معمولی استفاده کرد که اثرات هم‌افزایی در درمان سرطان نشان دهد (۳۵). پاکلیتاکسل با نام تجاری تاکسول یک ترکیب دی ترپنوئیدی سه حلقه‌ای طبیعی است که از پوست درخت سرخدار در اقیانوس آرام جدا شده که مکانیسم ضد سرطانی منحصربه‌فردی را در انواع سرطان از جمله سرطان معده نشان داده است (۳۶). کیم و همکاران اثرات سیلیمارین را بر تکثیر و آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده ان سان (AGS) ارزیابی کردند و م شخص شد که زنده ماندن و مهاجرت سلول‌های AGS به صورت وابسته به دوز پس از تجویز سیلیمارین به طور قابل توجهی کاهش، میزان آپوپتوز و تعداد اجسام آپوپتوزی به صورت وابسته به غلظت افزایش و بیان Bcl-2 و p-ERK1/2 کاهش یا فت (۳۷). یافته های پژوهش دلالی اصفهانی و همکاران در سال ۲۰۱۲، نشان داد که عصاره متانولی برگ گیاه بومادران به‌علت وجود ترکیبات فنولی اثر مهاری روی رده سلولی سرطان کولون HT-29 دارد (۳۸). خسروی و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که کمترین میزان بقای سلول کولون در غلظت ۶/۴ mg/ml عصاره ا تانولی برگ Achillea wilhelmsii مشاهده شد (۳۹). مشاطی و همکاران در سال ۲۰۱۷، نشان دادند که عصاره متانولی A. annua سبب کاهش رشد رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS) وکولون (HT-29) با غلظت های مختلف در مدت ۷۲ ساعت می‌شود (۴۰).

مقدار مرگ‌ومیر مشاهده شده در سلول‌های سرطانی در غلظت‌های بالای عصاره گیاه دغدغک مورد ا ستفاده در این پژوهش قابل توجیه است، چراکه ترکیبات فنلی در غلظت بالا سبب آسیب به سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شود هر چند که ممکن است همان ماده در غلظت‌های کمتر تأثیر نامطلوبی بر ساختار سلولی نداشته باشد. با توجه به نتایج حاصل (شکل ۱ و ۲) مشاهده شد که تأثیر عصاره دغدغک بر سلول‌های سالم خیلی کمتر از سلول‌های سرطانی است و می‌توان از این ترکیب به تنهایی و یا در ترکیب با داروهای ضد سرطان استفاده کرد به‌طوری‌که هم‌زمان با نابودی سلول‌های سرطانی، سلول‌های سالم آسیب کمتری ببینند.

به‌طورکلی، میزان ابتلا به سرطان معده در ایران به طور چشمگیری رو به افزایش است، به‌طوری‌که در مناطق ساحلی دریای خزر شیوع بیشتری دارد و اکثراً از نوع آدنوکارسینومای اپیدمیک است و میزان ابتلا نسبت مستقیمی با سن دارد. به‌طوری‌که هر چه سن بالاتر می‌رود میزان ابتلا به آن افزایش می یا بد؛ این نسبت در مردها نیز نسبت به خانم‌ها بیشتر است (۴۱ و ۴۲). سرطان معده عموماً یک بیماری خاموش است که تا اواخر سیر خود بدون نشانه باقی می‌ماند. تشخیص به موقع بیماری دشوار می‌باشد و بهترین راه تشخیص سرطان معده و حتی تشخیص زخم خوش‌خیم آن

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

نیازمند ارزیابی دقیق از جمله رادیوگرافی، آندوسکوپی، سیتولوژی و نهایتاً مطالعه بیوپسی است (۴۳). درمان این سرطان در مراحل اولیه به کمک جراحی بوده و در صورت نیاز شیمی درمانی و پرتودرمانی به عنوان درمان های تکمیلی استفاده خواهند شد (۴۴). آدنوکارسینوم از انواع مختلف سرطان معده است که از کشنده‌ترین انواع سرطان در ایران محسوب می‌شود (۴۵). در چند دهه اخیر مطالعه گیاهان دارویی به عنوان یک منبع مفید از ترکیبات فعال بیوشیمیایی و دارویی افزایش یافته است. بسیاری از گیاهان و ترکیبات آن‌ها در طب سنتی در اکثر نقاط دنیا برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان استفاده می شوند (۴۶) در این بین استفاده از ترکیبات دارویی مشتق شده از گیاهان قدمت زیادی دارد و به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی رشد قابل توجهی داشته است (۴۷). از طرف دیگر، ترکیبات و مشتقات به دست آمده از گیاهان نقش مهمی در سلامت انسان و درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان ایفا کرده است (۴۸).

نتیجه‌گیری

در این بررسی نشان داده شد که عصاره دغدغک با تغییر در میزان بیان ژن های BAX و BCL2 سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطان معده و کولون می‌شود.

بر اساس نتایج حاصل مشخص شد که آثار سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی دغدغک بر رده سلولی AGS و HT-29 بیشتر از عصاره آبی است. به‌طورکلی، این اثر می‌تواند مربوط به ترکیبات فنلی موجود در این گیاه باشد بنابراین می‌توان از این گیاه به صورت کامل و یا ترکیبات مشتق از آن (مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها) در کاهش تعداد سلول‌های سرطان معده و سرطان کلون استفاده کرد. با توجه به این نکته که گیاه دغدغک از جمله گیاهانی است که در مناطق جنوبی ایران توسط بومیان به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند گزینه مناسبی برای مطالعه درمانی روی سرطان‌های دستگاه گوارش باشد. نتایج به دست آمده از پژوهش انجام شده نشان‌دهنده خاصیت پروآپوپتوتیک دغدغک و اثربخشی این گیاه علیه سلول سرطان معده و روده می‌باشد. کم بودن اثرات جانبی، هزینه پائین فراورده گیاهی، دارا بودن اثرهای مفید، خاصیت دارویی گیاهان و عصاره‌های به دست آمده از آنها در درمان بیماری‌ها شناخته شده است و ترجیح استفاده از آن‌ها به دلیل میزان دوز پایین‌تر و اثرات جانبی کمتر آن‌هاست. استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره به همراه داروی شیمیایی ضدسرطان می‌تواند موجب افزایش اثرات این داروها شود. از این رو امروزه محققین به داروهای گیاهی روی آورده‌اند. در این راستا، تعیین داروهایی که اثر اختصاصی بر سلول‌های سرطانی دارند و توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشند و بومی مناطقی از کشور باشند اهمیت بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر

از همکاری مسئولین محترم دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته صمیمانه تشکر می‌شود.

References

1. Rayegani SM, Tabibian E, Rahimi Dehgolan S. A review on the role of physical activity in cancer prevention: middle east reports. Int J Cancer Manag. 2017 31;10(7).
2. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies. J Cancer Epidemiol. 2015 15;2015.
3. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. Eur Urol. 2020 Jan 1;77(1):38-52.
4. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. Nature Med. 2019;25(12):1822-32.
5. O'keefe SJ. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. Nature Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(12):691.
6. Shin A, Kim J, Park S. Gastric cancer epidemiology in Korea. J Gastr Cancer. 2011 Sep;11(3):135.
7. Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, Nowrouzi A,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

Herbst F, Zavidij O. Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. Cell Stem Cell. 2011;4;9(4):357-6

8. Yang K, Lu L, Liu H, Wang X, Gao Y, Yang L, et al. A comprehensive update on early gastric cancer: defining terms, etiology, and alarming risk factors. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2021; 15(3):255-73.

9. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines. 2018;5(3):93.

10. Kazemi M, Kazempour Osaloo S, Asghar Maassoumi A, Rastegar Pouyani E. Molecular phylogeny of selected Old World Astragalus (Fabaceae): incongruence among chloroplast trnL-F, ndhF and nuclear ribosomal DNA ITS sequences. Nordic J Botany. 2009; 27(5):425-36.

11. Tapia C, Zlobec I, Schneider S, Kilic E, Güth U, Bubendorf L, et al. Deletion of the inhibitor of growth 4 (ING4) tumor suppressor gene is prevalent in human epidermal growth factor 2 (HER2)-positive breast cancer. Hum Pathol. 2011;42(7):983-90.

12. Xiang SY, Yu C, Aggarwal A, Reinhard C. Genomic alterations and molecular subtypes of gastric cancers in Asians. Chin J Cancer. 2016;35(1):1-7.

13. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer J Clin. 2018. 68(6):394-424.

14. Yu H, Harris R, Gao Y, Gao R, Wynder E. Comparative epidemiology of cancers of the colon, rectum, prostate and breast in Shanghai, China versus the United States. Int J Epidemiol. 1991;20(1):76-81.

15. Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Adv Pharm Bull. 2014;(1):421.

16. Yarley OP, Kojo AB, Zhou C, Yu X, Gideon A, Kwadwo HH, et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. Int J Biol Macromol. 2021;31:183:2262-71.

17. Albaayit SF, Khan MA, Abdullah R, Noor MH. Ethyl acetate extract of Clausena excavata induces growth inhibition of non-small-lung cancer, NCI-H460, cell line via apoptosis. J Appl Biomed. 2021;1:19(1):40-7.

18. Chen YH, Yang SF, Yang CK, Tsai HD, Chen TH, Chou MC, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. Mol Med Rep. 2021;1:23(1):1.

19. Zhang J, Zhang J, Zhao C, Hong S, Feng Li C, Zhong L, et al. Green walnut husk extracts Proliferation and Migration in Gastric Cancer. J Cancer. 2022;13(4):1130.

20. Huang T, Gao Y, Cao Y, Wang Q, Dong Z. Downregulation of mmu_circ_0000943 ameliorates renal ischemia reperfusion-triggered inflammation and oxidative stress via regulating mmu-miR-377-3p/Egr2 axis. Int Immunopharmacol. 2022;1:106:108614.

21. Yu HE, Harris RE, Gao YT, Gao R, Wynder EL. Comparative epidemiology of cancers of the colon, rectum, prostate and breast in Shanghai, China versus the United States. Int J Epidemiol. 1991;20(1):76-81.

22. Pooyan P, Ghahremaninejad F, Assadi M. A synopsis of the genus Colutea (Fabaceae) in Iran. Edinb J Bot. 2014;71(1):35-49.

23. Gazzaneo LR, De Lucena RF, de Albuquerque UP. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). J Ethnobiol Ethnomed. 2005;1(1):9.

24. Mohamadi N, Sharififar F, Koohpayeh A, Daneshpajouh M. Traditional and Ethnobotanical uses of medicinal plants by ancient populations in Khabr and Rouchon of Iran. J Appl Pharm Sci. 2015 Nov;5(11):101-7.

25. Azmir J, Zaidul IS, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J. Food Eng. 2013. 1;117(4):426-36.

26. Butler M. Animal cell culture and technology. Taylor & Francis; 2004 Aug 2.

27. Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Curr Protoc Immunol. 2017;116: 13.

28. Ye RS, Li M, Li CY, Qi QE, Chen T, Cheng X et al. miR-361-3p regulates FSH by targeting FSHB in a porcine anterior pituitary cell model. Reproduction. 2017;153(3):341-9.

29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402-8.

30. Souri E, Amin GH, Dehmobed-Sharifabadi A, Nazifi A, Farsam H. Antioxidative activity of sixty plants from Iran. Iran J Pharma Res. 2010; 20(1):55-9.

31. Parton K. Response to Protocol Review Scenario: Replication should be independent. Lab Anim. 2008;37(1):14-17.

32. Eser F, Altundag EM, Gedik G, Demirtas I, Onal A, Selvi B. Anti-inflammatory effect of D-pinitol isolated from the leaves of Colutea cilicica Boiss et Bal. on K562 cells. Turk J Biochem. 2017;42(4):445-50.

33. Tumen I, Akkol EK, Suntar I, Erbey G, Kurtca M, Keles H, et al. Evaluation Of The Wound Healing And Anti-Inflammatory Activities And Phytochemical Analysis Of Myrtus Communis L. Fresenius Envir Bull. 2017 1;26(7):4420-8.

34. Jahromi MA, Moein MR, Etemadfard H, Zebarjad Z. In vitro free radical scavenging effect and total phenolic and flavonoid contents of 30 iranian plant species. Trends Pharma Sci. 2016:1;2(3):229-38.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]

35. Al-Harbi SA, Abdulrahman AO, Zamzami MA, Khan MI. Urolithins: The Gut Based Polyphenol Metabolites of Ellagitannins in Cancer Prevention, a Review. Front Nutr. 2021;8:258.
36. Mamadalieva NZ, Mamedov NA. Taxus brevifolia a High-Value Medicinal Plant, as a Source of Taxol. Med Aromat Plants North Am. 2020:201-218.
37. Kim SH, Choo GS, Yoo ES, Woo JS, Han SH, Lee JH, et al. Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells. Oncol Rep. 2019;42(5):1904-14.
38. Dalali Esfahani L, Monjemi R, Amjad L. Effect of cytotoxicity of Achillea wilhelmsii C. Koch extract and leaf essential oil on human colon cancer cells. J Experiment Animal Biol. 2012;1(3):1-6.
39. Khosravi F, Moshtaghian J, Zarkesh SH. The effect of ethanolic extract of Achilleawilhelmsii on the survival of three cancer cell lines in vitro culture. J Cell Tissue. 2021; 19;11(4):302-11.
40. Mashati P, Esmaeili S, Dehghan Nayeri N, Darvishi M, et al.The effect of methanolic extract of aerial parts of Artemisiaannua on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2017;14(1):34-42.
41. Nouraie M, Pietinen P, Kamangar F, Dawsey SM, Abnet CC, Albanes D et al. Fruits, vegetables, and antioxidants and risk of gastric cancer among male smokers. Cancer Epidemiol Biomark Prev. 2005;14(9):2087-92.
42. Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. Gastric Can. 2002;5(1):5-11.
43. Kintzios SE. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. Crit Rev Plant Sci. 2006;25(2):79-113.
44. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, Yin S, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Can Res. 1995;55(24):6063-70.
45. Yazdani Charati J, Zare SO, Ghorbanpour EL, Shabankhani B. Demographic and geographical pattern of mortality rate from stomach cancer and related factors in Mazandaran province from 2001 to 2005. Journal of Mazandaran Uni Med Sci. 2010;20(79):2-7.
46. Wali AF, Majid S, Rasool S, Shehada SB, Abdulkareem SK, Firdous A, et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. Saudi Pharm J. 2011;25(1):1-11.
47. Shah U, Shah R, Acharya S, Acharya N. Novel anticancer agents from plant sources. Chinese J Nat Med. 2013;11(1):16-23.
48. Shoeb M. Anti-cancer agents from medicinal plants. Bangladesh J Pharmacol. 2006;1(2):35-41.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-18]