

Investigating the effect of the alcoholic extract of *Pterocarya fraxinifolia* (Poir) spach leaves on inhibiting the proliferation and expression of genes involved in apoptosis in human breast cancer cell line

Sanaz Etemadi Shalkouhi¹, Hassan Hassni Kumleh^{2*}, Mohsen Farhadpour³ and Mohammad Hossein Rezadoost⁴

1- M.Sc. student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

E-mail: kumleh@guilan.ac.ir

3- Department of Phytochemistry, National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4- Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

Received: January 2023

Revised: May 2023

Accepted: June 2023

Abstract

Background and Objectives: Cancer is one of the most serious causes of death, and breast cancer is the most common malignancy among women. Medicinal plants can play a vital role in cancer treatment. Many effective cancer drugs today are derived from natural plant products. This study evaluates the cytotoxic effect of *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanolic extract. It also evaluates its effect on the expression of the *P21*, *BID*, *BCL-2*, *RB1*, and *MDM2* genes in the MCF-7 breast cancer cell line.

Methodology: Extraction was done from 20 grams of dried and powdered leaves exposed to air by the soaking (maceration) method using pure methanol and after 24 hours in an incubator shaker at a speed of 120 rpm, temperature of 25°C and in the dark. After filtering and drying the extract, 5 mg of the resulting dry substance was dissolved in 1 ml of RPMI-1640 medium. After re-filtration, it was stored as a stock to prepare different concentrations. MCF-7 breast cancer cell lines and HGF-1 as a normal cell line were cultured in RPMI1640 medium containing FBS 10% (w/v), penicillin antibiotics, streptomycin 1% (w/v), and at 37°C temperature and 5% carbon dioxide pressure in an incubator. These cells were exposed to various concentrations of methanolic extract from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for 24 hours. Cell survival rate was assessed with MTT colorimetric assay, and expression of genes involved in apoptosis (*P21*, *BID*, *BCL-2*, *RB1*, *MDM2*) in cancer cells treated with IC25 concentration of plant extract was evaluated by real-time PCR technique. RNA extraction from MCF-7 and HGF-1 cells was performed according to the RNX-plus™ kit instructions. cDNA synthesis was performed using Fermentase Company's kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) and according to its instructions. In this study, the GAPDH gene was used as an internal control.

Results: The results of the MTT assay showed that the *Pterocarya fraxinifolia* (Poir) spach leaf methanolic extract had a concentration-dependent cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cells, and during the experiment, with increasing drug concentration, the effect of cytotoxicity increased in both cancer and normal lines and high inhibition was observed at concentrations of 1000 and 1200 µg.ml⁻¹. The IC₅₀ of *Pterocarya fraxinifolia* methanol extract against MCF-7 and HGF-1 cell lines was 452.1 and 479.2 µg.ml⁻¹, respectively. Real-time PCR results showed that treatment with the *Pterocarya fraxinifolia* plant extract enhanced the expression of the *P21* gene, while expression was nearly constant in extract-treated normal cells. The *BID* gene expression was increased in cancer cells treated with the plant extract. In contrast, normal cells under the influence of the extract showed a slight decrease in gene expression. The plant extract



decreased the expression of the *BCL-2* gene in cancer cells, whereas the expression of this gene in normal cells did not change significantly under the extract. The *RB1* gene expression was not significantly altered in healthy cells after plant extract treatment but increased in the cancer cell line MCF-7. *MDM2* gene expression in cancer cells treated with plant extract remained unchanged, whereas it slightly increased in healthy cells treated with extract.

Conclusion: This study provides an overview of how *Pterocarya fraxinifolia* extract can inhibit cancer cell growth. This study confirms the inhibitory activity of the plant's methanolic extract on breast cancer cells. With further investigation, the plant compounds may one day be used to treat cancer.

Keywords: Medicinal plants, cell culture, apoptosis, MTT assay, MCF-7 cell line, anticancer.

بررسی تأثیر عصاره متانولی برگ گیاه *Pterocarya fraxinifolia* (Poir) spach بر بازدارندگی تکثیر و بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در رده سلول سرطان پستان انسان MCF-7

ساناز اعتمادی شالکوهی^۱، حسن حسنی کومله^{۲*}، محسن فرهادپور^۳ و محمدحسین رضادوست^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران، پست الکترونیک: kumleh@guilan.ac.ir

۳- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سرطان یکی از عوامل مهم مرگ و میر و سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان است. گیاهان دارویی می‌توانند نقش مهمی در درمان سرطان داشته باشند. امروزه بسیاری از داروهای مؤثر در درمان سرطان از فرآورده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان بدست می‌آید. هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر سمیت سلولی عصاره متانولی برگ درخت *Pterocarya fraxinifolia* و تأثیر آن بر بیان ژن‌های *MDM2*، *RB1*، *BCL-2*، *BID*، *P21* در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 است. مواد و روش: عصاره‌گیری از ۲۰ گرم برگ خشک شده و پودر شده در معرض هوا به روش خیس کردن (ماسراسیون) با استفاده از متانول خالص و پس از ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انجام شد. پس از فیلتراسیون و خشک کردن عصاره، ۵ میلی‌گرم از ماده خشک حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 حل شده و بعد از فیلتراسیون دوباره، به‌عنوان استوک برای تهیه غلظت‌های مختلف ذخیره شد. رده‌های سلولی سرطان سینه MCF-7 و HGF-1 به‌عنوان رده سلولی طبیعی در محیط کشت RPMI1640 همراه با FBS ۱۰٪ (وزنی/حجمی)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین ۱٪ (وزنی/حجمی)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ دی‌اکسیدکربن در انکوباتور کشت شدند. این سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از عصاره تام متانولی برگ گیاه لرگ قرار گرفتند. بقای سلولی با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTT و بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز (*MDM2*، *RB1*، *BCL-2*، *BID*، *P21*) در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با غلظت IC₂₅ عصاره گیاه با استفاده از روش Real-Time PCR ارزیابی شد. استخراج RNA از سلول‌های MCF-7 و HGF-1، طبق دستورالعمل کیت RNX-plus™ انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand CDNA Synthesis Kit) و طبق دستورالعمل آن انجام گردید. در این پژوهش از ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتایج: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره متانولی برگ درخت لرگ، اثر سمیت سلولی وابسته به غلظت بر روی سلول سرطان سینه رده MCF-7 داشته و در طی آزمایش با افزایش غلظت دارو اثر سمیت سلولی در هر دو لاین سرطانی و نرمال افزایش یافت. بالاترین مهار در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. مقدار IC₅₀ عصاره متانولی برگ *Pterocarya fraxinifolia* برای رده سلولی MCF-7 و HGF-1، به‌ترتیب ۴۵۲/۱ و ۴۷۹/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج حاصل از آزمون بیان ژن نشان داد که بیان ژن *P21* در سلول‌های MCF-7 اثر تیمار عصاره گیاه *Pterocarya fraxinifolia* افزایش داشته و در سلول نرمال تحت تیمار عصاره تقریباً ثابت بوده است. بیان ژن *BID* در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره گیاه افزایش یافت، در صورتی که سلول‌های نرمال تحت تأثیر عصاره کاهش جزئی را در بیان این ژن نشان دادند. در سلول‌های سرطانی اعمال عصاره گیاه سبب کاهش بیان ژن *BCL-2* شده اما بیان این ژن در سلول‌های نرمال تحت تأثیر عصاره تغییر چندانی نداشت. در

سلول‌های نرمال میزان بیان ژن *RB1* تحت تیمار عصاره گیاه تغییر چندانی نکرد اما در سلول‌های سرطانی MCF-7، تیمار عصاره موجب افزایش بیان این ژن شد. بیان ژن *MDM2* در سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاه تقریباً بدون تغییر ماند، در صورتی که در سلول سالم تحت تیمار عصاره، بیان این ژن افزایش اندکی یافت. نتیجه‌گیری: این تحقیق مقدمه‌ای برای رسیدن به کاربرد گیاه *Pterocarya fraxinifolia* در مهار رشد سلول‌های سرطانی است. نتایج حاصل از این پژوهش مؤید اثر مهار عصاره متانولی این گیاه بر سلول‌های سرطان پستان است. از این رو، به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، می‌توان از ترکیبات آن در درمان سرطان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، کشت سلولی، آپوپتوز، آزمون MTT، رده سلولی MCF-7، ضد سرطان.

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین تومور بدخیم و اولین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است و بروز آن در تمام مناطق جهان در حال افزایش است، به همین دلیل با وجود پیشرفت در شناسایی و درمان آن، که منجر به بهبود میزان مرگ و میر می‌شود، روش‌های درمانی جدید، آگاهی بخشی و شناسایی زود هنگام آن حیاتی است (Smolarz et al., 2022). بیشتر سرطان‌ها علائم اساسی مشترک از جمله تکثیر کنترل نشده، مقاوم بودن به مسدودکننده‌های تکثیر، فرار از آپوپتوز و مرگ سلولی، تکثیر نامحدود، افزایش رگ‌زایی و گسترش متاستازی دارند. آپوپتوز، به عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین فرایندهای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، موجب حفظ تعادل بین مرگ و تکثیر سلولی می‌شود و فرایندی چند مرحله‌ای است که از دو مسیر اصلی برای ایجاد یک آبشار از رویدادهایی که منجر به تکه‌تکه شدن کروماتین و غشای هسته‌ای می‌شود، استفاده می‌کند. بنابراین، جستجوی راهی برای القای این فرایند در سلول‌های سرطانی و هدف قرار دادن مولکول‌ها در مسیرهای آپوپتوز می‌تواند اثرهای مفیدی در ممانعت از رشد و پیشرفت سرطان داشته باشد و رویکردی جدید و کارآمد برای شناسایی داروهای جدید ضد سرطان و جلوگیری از مقاومت به درمان است (Rajabi et al., 2021). خانواده پروتئینی BCL-2، نشانگرهای مولکولی مهم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به‌شمار می‌آیند و نقش اساسی را در تنظیم مسیر داخلی آپوپتوز در میتوکندری دارند. این خانواده دارای طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها

هستند و به دو دسته پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و پروتئین‌های ضد آپوپتوزی تقسیم می‌شوند (Pang, 2023). پروتئین‌های پیش آپوپتوزی شامل Bcl-, Bad, Bak, Bax, Bim, Bik, Bid, Xs, Mcl-1 و Bfl-1, Bcl-W, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-2 شامل است. تعادل بین پروتئین‌های پیش آپوپتوز و ضد آپوپتوز است که تعیین می‌کند آیا آپوپتوز آغاز شود یا خیر؟ هنگامی که تعادل بین پروتئین‌ها در خانواده Bcl-2 بهم می‌خورد، در نتیجه تنظیم آپوپتوز در این سلول‌ها دچار اختلال می‌شود و این می‌تواند به دلیل بیان بیش از حد یک یا چند پروتئین ضد آپوپتوز یا کمبود بیان یک یا چند پروتئین پیش آپوپتوزی یا ترکیبی از هر دو باشد (Wong, 2011). پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند BCL-2 با جلوگیری از انتشار سیتوکروم C به داخل سیتوزول و پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند BID از طریق پیشرفت این مسیر، آپوپتوز را تنظیم می‌کنند (Flores-Romero et al., 2022). ژن *MDM2* با فعالیت انکوژنی، عمل تنظیمی منفی بر روی کنترل چرخه سلولی، مسیرهای آپوپتوز، پروتئین سرکوبگر تومور P53 و پروتئین‌های دخیل در اصلاحات DNA دارد و پروتئین سرکوبگر تومور RB1 را مهار می‌کند. این پروتئین در بیشتر سرطان‌ها بیش از حد بیان می‌شود، بنابراین مهار فعالیت ژن *MDM2* هدفی خوب برای درمان سرطان است (Ilic et al., 2022). RB1 سرکوبگر تومور رتینوبلاستوما نام دارد و در سلول‌های سرطانی غیرفعال می‌شود (Subash-Babu et al., 2017). P21 نیز مهار کننده‌ای است که باعث توقف چرخه سلولی

مطالعه اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی برگ درخت لرگ بر لاین‌های سلولی سرطان سینه MCF-7 و سالم HGF-1 و نیز اثر آن بر بیان ژن‌های *P21*، *BID*، *BCL-2*، *RB1* و *MDM2* در لاین‌های مذکور بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاه

برگ گیاه لرگ از جنگل‌های گیلان جمع‌آوری گردید. عصاره‌گیری از ۲۰ گرم برگ خشک شده در معرض هوا به روش خیس کردن (ماسراسیون) با استفاده متانول خالص در ۱۲۰ دور در دقیقه، ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت در تاریکی انجام شد. هر عصاره با استفاده از کاغذهای فیلتر Whatman® Grade 42 (Sigma-Aldrich) حلال آن در دستگاه تقطیر در خلأ دوار تغلیظ و بعد در خشک‌کن انجمادی، جدا شد. ۵ میلی‌گرم از ماده خشک حاصل در محیط RPMI-1640 حل شده و بعد از فیلتراسیون با فیلتر استریل سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون، به‌عنوان استوک برای تهیه غلظت‌های مختلف ذخیره شد.

کشت سلول

رده‌های سلولی سرطان سینه MCF-7 و HGF-1 به‌عنوان رده سلولی طبیعی از مرکز منابع زیستی ایران تهیه شد. این رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI1640 همراه با FBS ۱۰٪ (وزنی/حجمی)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین ۱٪ (وزنی/حجمی) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ دی اکسید کربن در انکوباتور کشت شدند.

آزمون MTT

درصد زنده‌مانی توسط آزمون رنگ‌سنجی MTT (دی متیل تیاژول- دی فنیل تترازولیوم بروماید) تعیین گردید. پس از دستیابی به تعداد و مورفولوژی مطلوب سلول‌ها و پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلولی چسبیده به کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA جدا و

در پاسخ به بسیاری از محرک‌ها می‌شود ولی در شرایط خاص می‌تواند تکثیر سلولی و سرطان‌زایی را افزایش دهد (Abbas & Dutta, 2009). گیاهان دارویی منابع با اهمیتی برای کشف داروهای امیدبخش، ازجمله داروهای شیمیایی پیشگیری کننده سرطان هستند. تقریباً ۵۵٪ از داروهای شیمی‌درمانی اخیر از گیاهان و بر مبنای طب سنتی بدست آمده‌اند (Sahu et al., 2018). هر قسمتی از گیاهان دارای خواص دارویی خاص و انواع متابولیت‌های ثانویه است که نقش مهمی در درمان انواع بیماری‌ها و ساخت داروهای ایفاء می‌کند (Pammi et al., 2023). مواد طبیعی مشتق شده از گیاهان در مقایسه با سایر روش‌های درمانی نتایج بسیار خوبی در مبارزه با سرطان نشان داده‌اند (Balkrishna et al., 2023). بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی مانند وین کریستین و وین بلاستین از گیاهان جدا شده‌اند و موفقیت درمانی قابل توجهی را ثبت کرده‌اند (Ukwubile et al., 2020). لرگ با نام علمی *Pterocarya fraxinifolia* spach (Poir) گیاهی بومی در شمال ایران است. جنس «لرگ» (*Pterocarya* Kunth) از خانواده گردو (Juglandaceae)، راسته سداب (Rutales)، زیر رده بی‌گلبرگ‌ها (Dialypetales) و رده دو لپه‌ای‌ها (Dicotyledones) می‌باشد و چیزی در حدود ۱۵ گونه از این جنس در جهان و ۶ گونه گیاه درختی در شرق و جنوب غربی آسیا وجود دارد و گونه *P. fraxinifolia* از آنها در جنگل‌های شمال کشور (گیلان و مازندران) می‌روید (Abbas & Dutta, 2009). عصاره برگ این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی (Fathi, 2015) و فعالیت ضد قارچی است (Ebrahimi & Parvinzadeh Gashti, 2015). در تحقیقی مشخص شد که عصاره برگ این درخت، به دلیل داشتن میزان بالایی از فنول و فلاونوئید دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین ترکیبات شیمیایی اسانس برگ را مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترین‌ها معرفی کردند (Ebrahimzadeh et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر، محتوای فنلی کل در عصاره برگ و ساقه در گیاه لرگ بسیار بالا گزارش شد (Akhbari et al., 2017). در این

$$IC_{25} = \frac{F}{100-F} \sqrt{H} \times IC_{50}$$

F: مقدار IC مورد نظر و H: Hill Slope

استخراج RNA از سلول‌های MCF-7 و HGF-1 که به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت IC_{25} از عصاره گیاهی قرار گرفته بودند، طبق دستورالعمل کیت RNx-plus™ انجام و RNA استخراج شده به فریزر -۷۰ درجه منتقل شد.

سنتر cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand CDNA Synthesis Kit) و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

طراحی پرایمر برای ژن‌های *RB*, *BCL2*, *BID*, *P21* و *MDM2* براساس پایگاه داده NCBI و از طریق نرم‌افزار primer3 انجام شد. همچنین از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. در جدول ۱ اطلاعات توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف و مرجع آورده شده است.

واکنش‌های Real-time PCR با استفاده از کیت SinaSYBR Blue HS-qPCRMix در ۴۰ چرخه شامل ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C، ۲۰ ثانیه برای اتصال پرایمر در دمای ۵۵-۶۰°C و ۳۰ ثانیه برای طول شدن در دمای ۷۲°C در دستگاه LightCycler (Roche) 96 انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌های MTT در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل انجام شد. داده‌ها از طریق نرم‌افزار SAS نسخه ۹ تجزیه و تحلیل شدند و میانگین‌ها تحت آزمون توکی مقایسه گردیدند. داده‌ها به صورت میانگین انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل ارائه شدند. از دوکسوروبیسین به عنوان داروی استاندارد استفاده شد و سلول‌هایی که تنها با DMSO و RPMI بدون دارو تیمار شدند به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن با استفاده از فرمول لیواک و از طریق رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.

شمارش و ارزیابی سلول‌های زنده با استفاده از آزمون تربیان بلو انجام شد. تعداد 7×10^4 سلول در هر میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه مخصوص کشت سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI-1640 همراه با ۱۰٪ FBS (وزنی/حجمی)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین (وزنی/حجمی) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ دی‌اکسیدکربن به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس عصاره با غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک‌های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان شاهد یا گروه کنترل تنها با ۱۰٪ DMSO (وزنی/حجمی) تیمار شدند. چاهک‌های فاقد سلول و حاوی محیط کشت به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت جدا شده و ۱۰ میکرولیتر از سرم جنین گاوی شامل ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از معرف MTT به هر چاهک از پلیت اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از ۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها جدا شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید ۰/۱٪ اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری ترکیب فورمازان در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

درصد زنده‌مانی سلول‌های تحت تأثیر عصاره نسبت به سلول‌هایی که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\%OD = \frac{OD_{\text{بلانک}} - OD_{\text{چاهک‌های تحت تأثیر عصاره}}}{OD_{\text{بلانک}} - OD_{\text{کنترل}}} \times 100$$

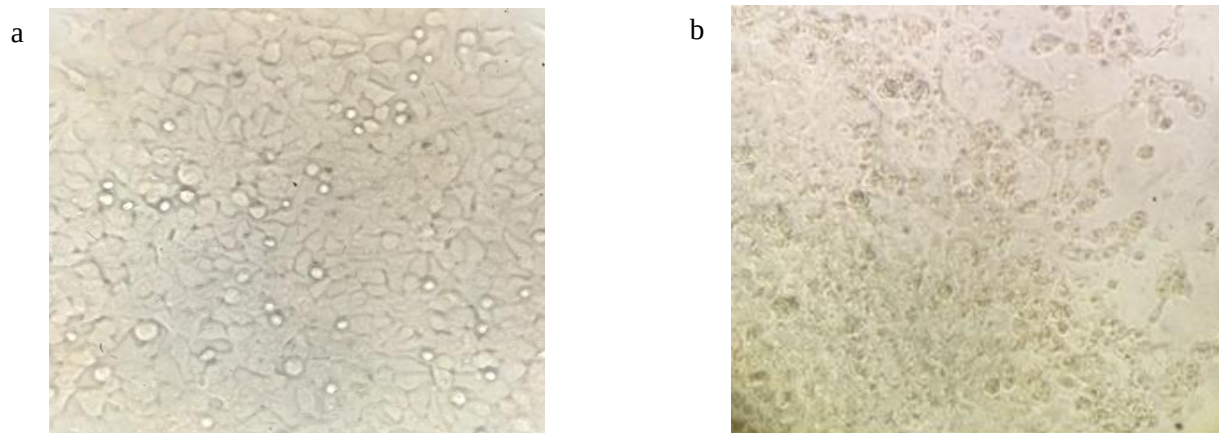
استخراج RNA و Real-Time PCR

به منظور بررسی بیان ژن، ابتدا IC_{50} هر یک از عصاره‌ها از طریق نرم‌افزار GraphPad Prism 8 محاسبه شد. سپس از روی مقدار آن، مقدار IC_{25} محاسبه شده و از این غلظت برای تیمار سلول‌ها استفاده شد. میزان IC_{25} برای لاین سلولی سالم و سرطانی از طریق فرمول زیر بدست آمد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژنهای هدف و مرجع

Table 1. Primer sequences of target and reference genes

Gene name	Gene accession number	Primer sequence	Forward/Reverse	Annealing temperature (°C)
BID	NM_197966.3	5'-CCTACTGGTGTGTTGGCTTCC-3'	F	56
		5'-GCCTCTATTCTTCCCAAGCG-3'	R	
MDM2	NM_002392.6	5'-TCACAGATTCCAGCTTCGGA-3'	F	56
		5'-GCACGCCAAACAAATCTCCT-3'	R	
P21	NM_001374511.1	5'-GGATGTCCGTCAGAACCCAT-3'	F	57.3
		5'-GTGGGAAGGTAGAGCTTGCGG-3'	R	
BCL-2	NM_000633.3	5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGT-3'	F	56
		5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAGA-3'	R	
RB1	NM_001407165.1	5'-GGACCCAGAGCAGGACAG-3'	F	57
		5'-ACAGATTCCCCACAGTTCCT-3'	R	
GAPDH	NM_001357943.2	5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'	F	57
		5'-GGACTCCACGACGTACTCAG-3'	R	



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های سرطانی MCF-7 قبل (a) و بعد (b) از ۲۴ ساعت تیمار با ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

عصاره متانولی برگ گیاه *Pterocarya fraxinifolia*Figure 1. Morphology of MCF-7 cancer cells before (a) and after (b) treatment with 1000 µg.ml⁻¹ of *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanol extract for 24 hours

نتایج

نتایج مورفولوژی سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد که عصاره متانولی برگ درخت لرگ باعث ایجاد تغییرات در شکل دیواره سلولی، کاهش سطح سلولی و مهار رشد سلول‌ها و تغییر چسبندگی سلول‌ها به سطح پلیت و به یکدیگر در مقایسه با سلول‌های فاقد عصاره (کنترل) ایجاد کرده است (شکل ۱- a و b)؛ که نمایانگر مرگ سلول‌های کشت شده، تحت تیمار عصاره می‌باشد. این تغییرات با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت.

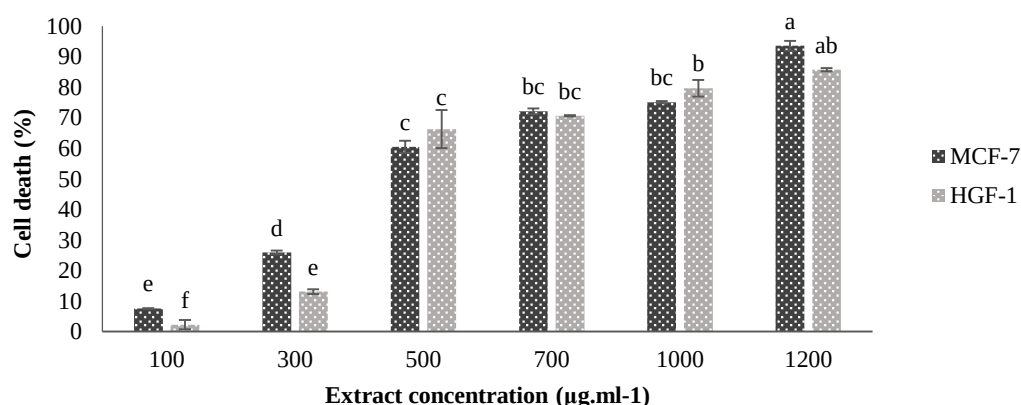
در طی آزمایش با افزایش غلظت دارو اثر سمیت سلولی در هر دو لاین سرطانی و نرمال بالا رفت، به‌طوری که در غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً تمامی سلول‌های سرطانی از بین رفتند. در عین حال، این اثر به مقدار کمتری در سلول‌های نرمال مشاهده شد (شکل ۲). همچنین برای مقایسه میزان کشندگی غلظت‌های مختلف داروی استاندارد دوکسوروبیسین محاسبه شد (شکل ۳). براساس نتایج، مشخص شد که بین غلظت‌های مختلف عصاره و سمیت سلولی رابطه معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ درخت *Pterocarya fraxinifolia* بر مهار رشد رده سلولی نرمال HGF-1 و سرطانی MCF-7

Table 2. ANOVA of different concentrations of *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanol extract effects on growth inhibition of normal HGF-1 and MCF-7 cancer cell lines

S.O.V.	d.f.	S.S.	M.S.
A (Cell line)	1	54.79	54.79 ^{n.s.}
B (Extract concentration)	6	49506.17	8251.03 ^{**}
A×B	6	410.2	68.37 ^{**}
Experimental error	28	481.13	17.18
C.V. (%)		8.87	

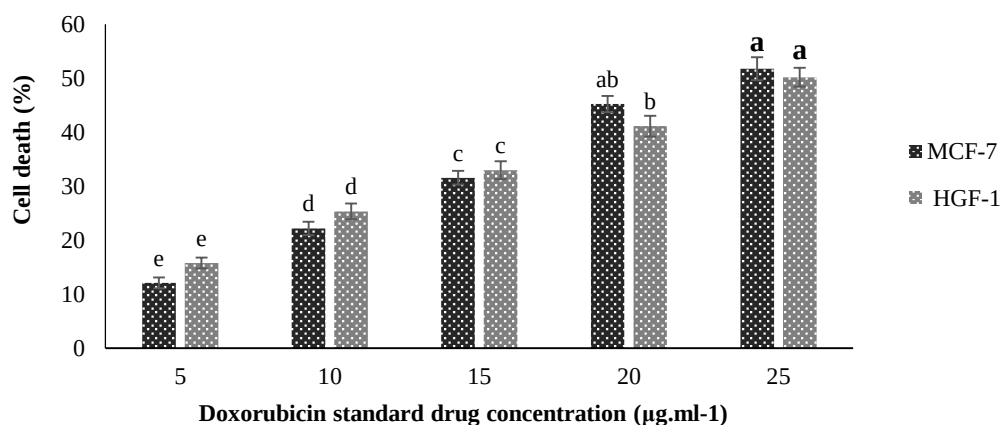
^{n.s.} and ^{**}: non-significant and significant at 1% probability level, respectively



شکل ۲- اثر سمیت سلولی عصاره متانولی برگ درخت *Pterocarya fraxinifolia* روی رده سلولی نرمال HGF-1 و سرطانی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت

Figure 2. Cytotoxic effect of *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanol extract on normal HGF-1 and MCF-7 cancer cell lines after 24 hours

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).



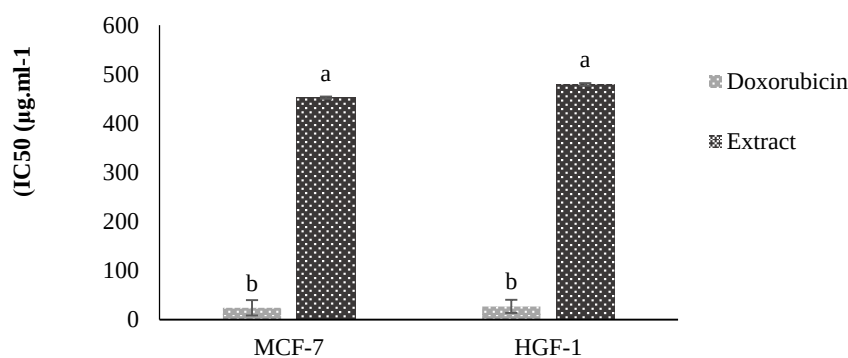
شکل ۳- اثر سمیت سلولی داروی استاندارد دوکسوروبیسین روی رده سلولی نرمال HGF-1 و سرطانی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت

Figure 3. Cytotoxic effect of standard drug doxorubicin on normal HGF-1 and MCF-7 cancer cell lines after 24 hours

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در شکل ۴ مقایسه IC_{50} عصاره متانولی برگ گیاه لرگ در مقایسه با داروی استاندارد دوکسوروبیسین پس از ۲۴ ساعت نشان داده شده است.

مقدار IC_{50} عصاره برگ درخت لرگ برای رده سلولی MCF-7 و HGF-1، به ترتیب ۴۵۲/۱ و ۴۷۹/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقدار IC_{50} دوکسوروبیسین برای رده سلولی MCF-7 و HGF-1 به ترتیب ۲۴/۰۵ و ۲۶/۸۷ میکروگرم



Cancer and normal cell lines

شکل ۴- مقادیر IC_{50} اثر سمیت عصاره متانولی برگ درخت *Pterocarya fraxinifolia* در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین روی رده سلولی نرمال HGF-1 و سرطانی MCF-7 پس از ۲۴ ساعت
Figure 4. IC_{50} values of toxic effect of *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanol extract compared to doxorubicin on normal HGF-1 and MCF-7 cancer cell lines after 24 hours
 Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

بیان ژن *BCL-2* شد. این کاهش به مقدار بیشتر در سلول‌های تحت تیمار داروی استاندارد دوکسوروبیسین مشاهده شد. در سلول‌های نرمال HGF-1 نیز این کاهش در سلول‌های تحت تیمار دوکسوروبیسین مشاهده شد اما بیان این ژن در سلول‌های نرمال تحت عصاره تغییر چندانی نداشته است (شکل ۵- c).

بیان ژن *RB1* تحت تأثیر عصاره در سلول‌های سرطانی MCF-7 افزایش یافته و این افزایش در سلول‌های سرطانی تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بیشتر بوده است. در سلول‌های نرمال نیز میزان بیان این ژن تحت تیمار عصاره تغییر چندانی نداشته ولی تحت تیمار داروی دوکسوروبیسین افزایش بیان در سلول‌های سالم مشاهده شد (شکل ۵- d).
 بیان ژن *MDM2* در سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاه لرگ تقریباً ثابت ماند ولی در این سلول‌ها تحت

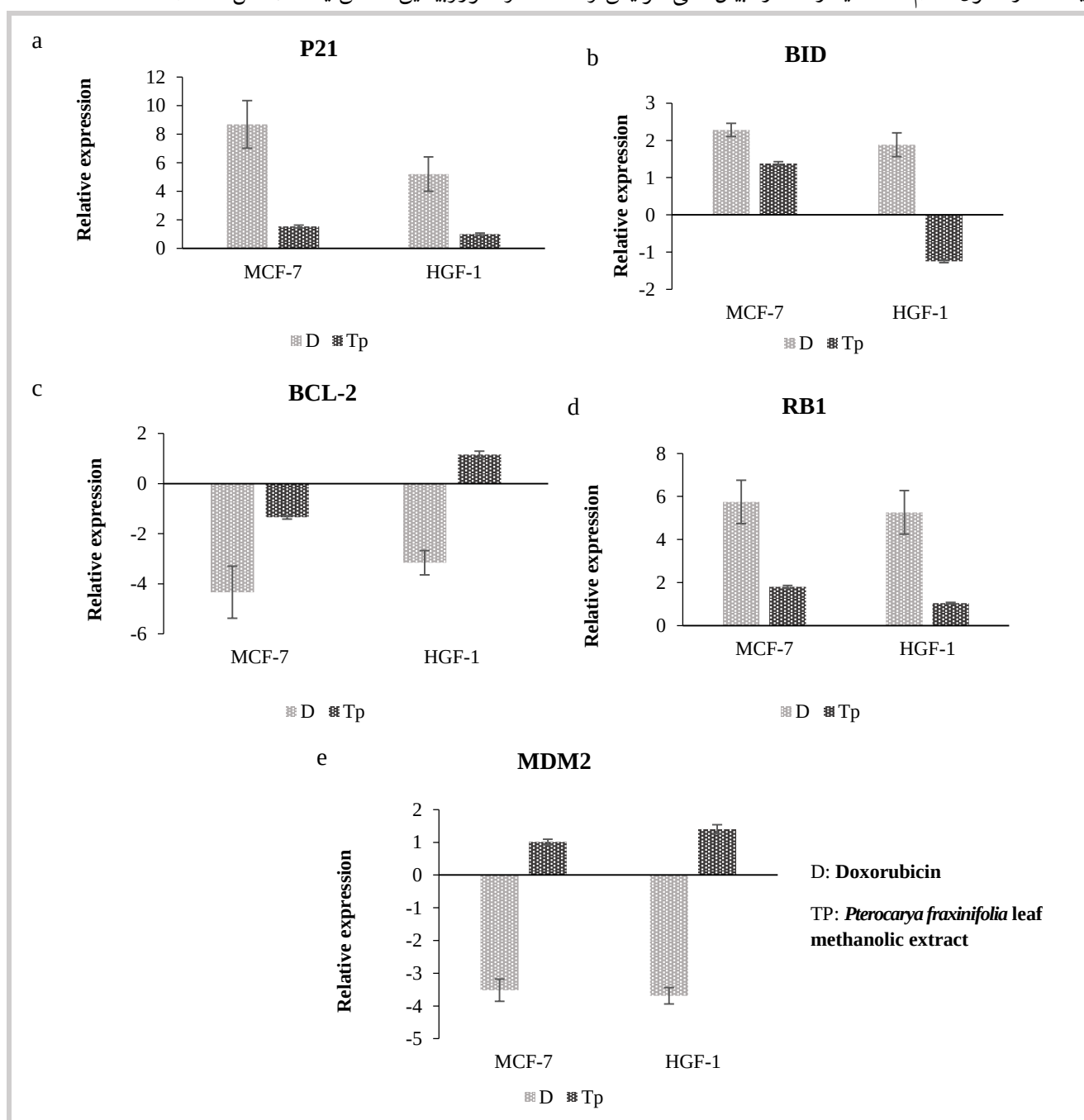
براساس نتایج، بیان ژن *P21* در اثر تیمار عصاره گیاه لرگ افزایش داشته است اما این افزایش در سلول‌های تحت تیمار عصاره کمتر از سلول‌های سرطانی تحت تیمار داروی دوکسوروبیسین بوده است. در سلول نرمال تحت تیمار عصاره، بیان تقریباً ثابت بوده، در حالی که در سلول نرمال تحت تیمار داروی استاندارد دوکسوروبیسین افزایش بیان مشاهده شد (شکل ۵- a).

بیان ژن *BID* در سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه لرگ و داروی استاندارد دوکسوروبیسین افزایش یافت، این افزایش تحت تأثیر داروی استاندارد بیشتر بود. از سویی، سلول‌های سالم تحت تأثیر عصاره کاهش بیان اندکی نشان دادند و تحت تأثیر داروی استاندارد دوکسوروبیسین افزایش یافتند (شکل ۵- b)

در سلول‌های سرطانی اعمال عصاره گیاه سبب کاهش

بیان در سلول سالم تحت تیمار داروی استاندارد دوکسوروبیسین کاهش یافت (شکل ۵- e).

تیمار داروی استاندارد دوکسوروبیسین، بیان این ژن کاهش یافت. در سلول سالم تحت تیمار عصاره بیان کمی افزایش و



شکل ۵- تأثیر عصاره متانولی برگ درخت *Pterocarya fraxinifolia* و داروی دوکسوروبیسین بر بیان ژنهای *p21* (a).

BCL-2 (b)، *RB1* (c)، *BID* (d) و *MDM2* (e) در رده سلولی نرمال HGF-1 و سرطانی MCF-7 پس از ۲۴ ساعت

Figure 5. *Pterocarya fraxinifolia* leaf methanol extract and doxorubicin effects on *p21* (a), *BCL-2* (b), *RB1* (c), *BID* (d), and *MDM2* (e) genes expression in normal HGF-1 and MCF-7 cancer cell lines after 24 hours

بحث

در این تحقیق پس از بررسی اثرهای ضد تکثیری و سمیت عصاره برگ گیاه لُرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) بر بیان برخی از ژن‌های دخیل در آپوپتوز و چرخه سلولی در رده‌های سلول سرطان پستان انسان (MCF-7) مشخص شد که نتایج حاصل با نتایج دیگر پژوهشگران همخوانی دارد. در پژوهشی عصاره‌گیری گیاه لُرگ به روش سوکسله توسط حلال‌های اتانولی، متانولی، آبی و فراکشن آن-بوتانولی مشخص کرد که عصاره اتانولی بالاترین اثر سمیت و عصاره فراکشنی آن-بوتانولی کمترین اثر سمیت وابسته به دوز را روی سلول‌های سرطان خون (K562) نشان می‌دهند. در نهایت عصاره آبی و الکلی برگ‌های این گیاه به‌عنوان یک کاندید برای مطالعات تکمیلی درمان سرطان خون معرفی شد (Abedigheshlaghi et al., 2014).

در این تحقیق مشخص شد که در سلول‌های سرطانی اعمال عصاره گیاه سبب کاهش بیان ژن *BCL-2* می‌شود. از آنجایی که *BCL-2* به‌عنوان یک ژن ضد آپوپتوزی شناخته شده است، کاهش بیان آن را می‌توان نتیجه‌ای مطلوب دانست. در تحقیقات پیشین مشخص شد که در سرطان پستان، آپوپتوز با بیان ژن *BCL-2* رابطه عکس دارد (Gómez-Navarro et al., 1999). در یک مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه *Melissa officinalis* بر روی رده‌های سلولی ریه، پستان و پروستات اعمال شد، نتایج بیانگر اثر این عصاره بر کاهش بیان ژن *BCL-2* در این سلول‌های سرطانی بود (Jahanban-Esfahlan et al., 2017) که با نتایج این تحقیق روی سلول MCF-7 مطابقت دارد. در مطالعات دیگر، مشخص شد که فراکشن بتولینیک اسید از ریشه گیاه *Dillenia suffruticosa* می‌تواند در چرخه سلولی از طریق درگیرکردن پروتئین‌های p21 و p53 وقفه ایجاد کرده و به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش بیان ژن p53 شود؛ همچنین با اثر بر روی مسیر سیگنالینگ میتوکندری و با کاهش مقدار بیان *BCL-2* و افزایش نسبت ژنی *BAX/BCL-2* باعث بروز آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 می‌شود (Foo et al., 2015).

در این پژوهش بیان ژن *P21* در سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاه لُرگ افزایش یافت. پروتئین *P21* نقش مهمی در کنترل پیشرفت چرخه سلولی دارد و عمدتاً با پروتئین p53 با توجه به نقش آن در توقف چرخه سلولی مرتبط است. همچنین در برنامه‌های سلولی مانند آپوپتوز و پاسخ به آسیب DNA دخالت دارد (Shamloo & Usluer, 2019). یکی از وظایف پروتئین *P21* این است که با توجه به موقعیت آن در پایین‌دست مسیر سرکوبگر تومور p53 موجب مهار چرخه سلولی در مرحله G1 چرخه سلولی و در نهایت جلوگیری از تقسیم سلول می‌شود. وظیفه مهم دیگر آن، در ممانعت از آپوپتوز پس از آسیب DNA فرصت دادن برای ترمیم آن است (Rayburn et al., 2005). از آنجایی که سرطان به دلیل عدم تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ سلولی ایجاد می‌شود، ژن *p21* به‌عنوان یک ژن مهار کننده تومور و عامل کلیدی در درمان سرطان است (Parveen et al., 2016). از سوی دیگر، بررسی‌ها نشان داده p21 نقش دوگانه‌ای در سرطان دارد و علاوه بر اینکه یک سرکوب‌کننده تومور است، می‌تواند پروتئینی انکوژن هم باشد. این موضوع، یافتن نقش p21 در سرطان را چالش برانگیز می‌کند. بر حسب مطالعات پروتئین p21 یک اثر هم‌افزایی بر روی سایر درمان‌های سرطان دارد و یافته‌های متعددی وجود دارد که عملکرد p21 در سرکوب تومور را نشان داده است (Shamloo & Usluer, 2019). در پژوهشی بر روی اثرهای ضد سرطانی عصاره *Rhus verniciflua* مشخص شد که عصاره باعث مهار رشد سلول‌های MCF-7 به صورت وابسته به دوز، از طریق القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن‌های *P53* و *P21* می‌شود (Kim et al., 2019). همچنین، مشخص شده که بیان بیشتر p21 در رده سلولی سرطان پستان انسان، می‌تواند منجر به سرکوب رشد تومور و آپوپتوز شود (Gómez-Navarro et al., 1999).

پروتئین RB1، به‌عنوان پروتئین سرکوب کننده تومور شناخته شده است که در این تحقیق بیان آن در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره برگ گیاه لُرگ افزایش یافته

است. از جمله فعالیت‌های ژن *RB1* جلوگیری از رشد بی‌رویه سلول‌ها از طریق مهار چرخه تقسیم سلولی می‌باشد. همچنین با ممانعت از عبور سلول از مرحله G1 به S، همانندسازی DNA غیر طبیعی را مسدود می‌کند. نتایج مطالعه بر روی شماری از سرطان‌ها نشان داده است که این پروتئین عملکرد طبیعی خود را از دست داده است (Weinberg, 2013) و (Giacinti & Giordano, 2006). در مطالعه‌ای متابولیت ثانویه جدا شده از ساقه گیاه *Tinospora cordifolia* (Willd.) در سلول‌های سرطان MCF-7 منجر به افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور *RB1* و *P53* و کاهش بیان ژن‌های *BCL-2* و *MDM2* و القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی می‌شود (Subash- Babu et al., 2017). در پژوهشی مشخص شد که در سرطان ریه، ژن *RB* دچار بیان غیر طبیعی می‌شود (Geradts et al., 1999). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان این ژن اقدامی برای جلوگیری از افزایش تقسیم در سلول‌های سرطان پستان است. بیان ژن *BID* در سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه لرگ افزایش یافت. در تحقیقی، مشخص شد که مهار بیان ژن *BID* در سلول‌های سرطان تخمدان منجر به مقاومت در برابر آپوپتوز می‌شود (Goncharenko-Khaider et al., 2010). بنابراین، افزایش بیان این ژن در این آزمایش می‌تواند مطلوب در نظر گرفته شود. در مطالعه‌ای دیگر، بیان شد که کورکومین منجر به القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی و فعال کردن کاسپاز ۸ شده و این کاسپاز در مسیر داخلی سبب شکسته شدن *BID* می‌شود؛ این پروتئین پس از شکافت از سیتوپلاسم به میتوکندری جابجا شده و در نهایت باعث آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری و تشکیل آپوپتوزوم می‌شود. آپوپتوزوم شامل Apaf-1، کاسپاز ۹ و سیتوکروم c است که منجر به فعال‌سازی کاسپاز اجرایی مانند کاسپاز ۳ می‌شود و در نهایت آپوپتوز رخ می‌دهد (Anto et al., 2002). در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که داروهای ضد التهابی و غیراستروئیدی با اثر بر روی بیان ژن *BID* در سرکوب تومور روده بزرگ نقش دارند (Leibowitz et al., 2014). در تحقیقی دیگر، نشان داده شد که میزان بیان پروتئین *BID* در طبقه‌بندی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ به منظور دریافت شیمی‌درمانی مرتبط با آنها استفاده می‌شود (Sinicrope et al., 2008).

بیان ژن *MDM2* در سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاه لرگ تقریباً ثابت ماند. انکوژن *MDM2* یک تنظیم‌کننده منفی سرکوبگر تومور *p53* است که فعالیت *p53* را مهار کرده و پایداری آن را کاهش می‌دهد. *MDM2*، *p53* و مسیر *p53*-*MDM2* اهدافی مستند برای پیشگیری یا درمان سرطان هستند. بنابراین می‌توان گفت هر چند بیان این ژن در سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره برگ گیاه لرگ همانند سلول‌های سرطانی تحت تیمار داروی دوکسوروبیسین کاهش نداشته، اما عدم تغییر در بیان آن می‌تواند نکته مثبتی در جلوگیری از پیشروی تقسیمات در سلول‌های سرطانی باشد. بسیاری از مهارکننده‌های *MDM2* مشتق از محصولات طبیعی، اثربخشی قوی در برابر سرطان‌های مختلف انسانی نشان داده‌اند (Qin et al., 2018). در پژوهشی به منظور بررسی عملکرد انکوژن *MDM2* در سرطان پروستات، اولیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس به صورت مجزا و همراه با درمان‌های دیگر سرطان در شرایط *In Vitro* و *In Vivo* آزمایش شدند. نتایج حکایت از این بود که این اولیگونوکلوئوتیدها با اثر مهاری بر بیان ژن *MDM2*، از طریق دو سازوکار، یکی وابسته به *p53* و دیگری مستقل از *p53* موجب توقف رشد تومور در سلول‌های سرطان پروستات می‌شود (Wang et al., 2003). در تحقیقی، نتایج حکایت از آن بود که انکوژن *MDM2* می‌تواند نقش مهمی در مقاومت دارویی به شیمی‌درمانی و نیز متاستازهای دوردست داشته باشد، همچنین پروتئین این ژن می‌تواند به‌عنوان یک نشانه تشخیصی برای مراحل سرطان در سرطان‌های مشابه استفاده شود (Rayburn et al., 2005).

بیشتر داروهای ضد سرطان گزینش ضعیفی دارند و در طی اثرگذاری بر روی سلول‌های سرطانی منجر به آسیب سلول‌های سالم می‌شوند، این مشکل اصلی در درمان

است. از جمله فعالیت‌های ژن *RB1* جلوگیری از رشد بی‌رویه سلول‌ها از طریق مهار چرخه تقسیم سلولی می‌باشد. همچنین با ممانعت از عبور سلول از مرحله G1 به S، همانندسازی DNA غیر طبیعی را مسدود می‌کند. نتایج مطالعه بر روی شماری از سرطان‌ها نشان داده است که این پروتئین عملکرد طبیعی خود را از دست داده است (Weinberg, 2013) و (Giacinti & Giordano, 2006). در مطالعه‌ای متابولیت ثانویه جدا شده از ساقه گیاه *Tinospora cordifolia* (Willd.) در سلول‌های سرطان MCF-7 منجر به افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور *RB1* و *P53* و کاهش بیان ژن‌های *BCL-2* و *MDM2* و القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی می‌شود (Subash- Babu et al., 2017). در پژوهشی مشخص شد که در سرطان ریه، ژن *RB* دچار بیان غیر طبیعی می‌شود (Geradts et al., 1999). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان این ژن اقدامی برای جلوگیری از افزایش تقسیم در سلول‌های سرطان پستان است. بیان ژن *BID* در سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه لرگ افزایش یافت. در تحقیقی، مشخص شد که مهار بیان ژن *BID* در سلول‌های سرطان تخمدان منجر به مقاومت در برابر آپوپتوز می‌شود (Goncharenko-Khaider et al., 2010). بنابراین، افزایش بیان این ژن در این آزمایش می‌تواند مطلوب در نظر گرفته شود. در مطالعه‌ای دیگر، بیان شد که کورکومین منجر به القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی و فعال کردن کاسپاز ۸ شده و این کاسپاز در مسیر داخلی سبب شکسته شدن *BID* می‌شود؛ این پروتئین پس از شکافت از سیتوپلاسم به میتوکندری جابجا شده و در نهایت باعث آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری و تشکیل آپوپتوزوم می‌شود. آپوپتوزوم شامل Apaf-1، کاسپاز ۹ و سیتوکروم c است که منجر به فعال‌سازی کاسپاز اجرایی مانند کاسپاز ۳ می‌شود و در نهایت آپوپتوز رخ می‌دهد (Anto et al., 2002). در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که داروهای ضد التهابی و غیراستروئیدی با اثر بر روی بیان ژن *BID* در سرکوب تومور روده بزرگ نقش دارند (Leibowitz et al., 2014).

(HGF-1) نشان داد که درصد زنده‌مانی این سلول‌ها در حضور هر یک از تیمارها در مقایسه با سلول‌های سرطانی MCF-7 بیشتر است.

متعاقب این پژوهش، بیان ژن‌های سرکوبگر تومور و ژن‌های دخیل در فرایند آپوپتوز با واکنش کمی Real-time PCR تحت تیمار با عصاره متانولی گیاه لرگ بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌ها با عصاره لرگ به مدت ۲۴ ساعت منجر به افزایش بیان ژن‌های سرکوب‌کننده تومور *RB1*, *BID*, *p21* و کاهش بیان ژن‌های بازدارنده القاء آپوپتوز *BCL-2* می‌شود، همچنین بر روی بیان ژن *MDM2* در سلول سرطان تأثیری ندارد. این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره متانولی گیاه لرگ دارای نقش کارآمدی در فرایند سرکوب تومور است.

این تحقیق مقدمه‌ای برای رسیدن به کاربرد این گیاه در مهار رشد سلول‌های سرطانی است. البته، مطالعات و تحقیقات بیشتری برای تأیید تأثیرات این گیاه بر سلول‌های سرطانی نیاز است.

Reference

- Abbas, T. and Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9: 400-414.
- Abedigheshlaghi, Z., Monajemi, R. and Yahyaabadi, S., 2014. Cytotoxic effect of aqueous and alcoholic extracts of *Pterocarya fraxinifolia* leaves on K562 cell line. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3): 1-5.
- Aghajani, Z., Engashte-Vahed, A.A. and Akhbari, M., 2015. Identification of Volatile Components and Biological Properties of the extracts of aerial parts of *Pterocarya fraxinifolia* L. In *Biological Forum*, 7: 262.
- Akhbari, M., Tavakoli, S., Ghanbari, Z., Dadgarnia, M. and Mazoochi, A., 2017. Evaluation of Biological Activity and Analysis of Volatile Fraction from *Pterocarya fraxinifolia* in Vegetative Stage from Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 28: 119-126.
- Anto, R.J., Mukhopadhyay, A., Denning, K. and Aggarwal, B.B., 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and

سرطان با استفاده از داروهای ضد سرطان مرسوم است (Ukwubile *et al.*, 2020). روش‌های درمانی متداول مانند عمل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی مبتنی بر آنتی‌بادی، باید با عوامل ضد سرطانی جدید با اثربخشی بهتر و سمیت کمتر همراه باشند و در عین حال در کشورهای در حال توسعه از نظر هزینه مقرون به صرفه باشند (Ochwang'i *et al.*, 2018). عصاره‌های گیاهی و مولکول‌های طبیعی مشتق‌شده از گیاهان، موارد امیدوارکننده‌ای برای استفاده به‌عنوان درمان‌های ضد سرطان هستند. مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که خواص ضد سرطانی متابولیت‌های ثانویه در عصاره‌های گیاهی از طریق آسیب DNA و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اعمال می‌شود (Rajabi *et al.*, 2021). طی مطالعه‌ای که Aghajani و همکاران (۲۰۱۵) بر روی شناسایی اجزای فرار و خواص بیولوژیکی عصاره‌های اندام هوایی *Pterocarya fraxinifolia* L. انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که عصاره استونی گیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره هگزانی است و می‌تواند به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌ها در درمان بیماری‌های عفونی استفاده شود. همچنین دریافته‌اند که عصاره هگزانی گیاه لرگ دارای اثر ضد قارچی و ضد ویروسی است و می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی استفاده گردد. در این تحقیق بررسی اثر سیتوتوکسیسیته عصاره متانولی گیاه لرگ با استفاده از آزمون MTT بر روی سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 برای اولین بار انجام شد. از طریق اعمال غلظت‌های متفاوت دارویی طی زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت نتایج آزمون MTT بررسی و مقایسه شد. محاسبه درصد‌های زنده‌مانی و کشندگی پس از ۲۴ ساعت نشان داد که القای مرگ سلولی در رده سلول‌های MCF-7 در حضور عصاره متانولی گیاه لرگ به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، به‌طوری که در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۹۰٪ سلول‌های سرطانی از بین رفتند. تأثیر هر یک از تیمارها با غلظت‌های مشخص بر سلول‌های نرمال

- Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Monfaredan, A., Shafie-Irannejad, V., Abbasi, M.M., Karimian, A. and Yousefi, B., 2017. The herbal medicine *Melissa officinalis* extract effects on gene expression of p53, Bcl-2, Her2, VEGF-A and hTERT in human lung, breast and prostate cancer cell lines. *Gene*, 613: 14-19.
- Kim, M.S., Lee, C.W., Kim, J.H., Lee, J.C. and An, W.G., 2019. Extract of *Rhus verniciflua* Stokes induces p53-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, Article ID 9407340.
- Leibowitz, B., Qiu, W., Buchanan, M.E., Zou, F., Vernon, P., Moyer, M.P., Yin, X.M., Schoen, R.E., Yu, J. and Zhang, L., 2014. BID mediates selective killing of APC-deficient cells in intestinal tumor suppression by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 16520-16525.
- Ochwang'i, D.O., Kimwele, C.N., Oduma, J.A., Gathumbi, P.K., Kiama, S.G. and Efferth, T., 2018. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Journal of ethnopharmacology*, 215: 233-240.
- Pammi, S.S.S., Suresh, B. and Giri, A., 2023. Antioxidant potential of medicinal plants. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 26: 13-26. doi: 10.1007/s12892-022-00159-z
- Pang, Z., 2023. The main BH3-only proteins in BCL-2 family. *Highlights in Science, Engineering and Technology*, 36: 276-282.
- Qin, J.J., Li, X., Hunt, C., Wang, W., Wang, H. and Zhang, R., 2018. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: recent advances and implications in cancer medicine. *Genes & diseases*, 5: 204-219.
- Rajabi, S., Maresca, M., Yumashev, A.V., Chooapani, R. and Hajimehdipoor, H., 2021. The most competent plant-derived natural products for targeting apoptosis in cancer therapy. *Biomolecules*, 11: 534.
- Rayburn, E., Zhang, R., He, J. and Wang, H., 2005. MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets*, 5: 27-41.
- Sahu, N., Meena, S., Shukla, V., Chaturvedi, P., Kumar, B., Datta, D. and Arya, K., 2018. Extraction, fractionation and re-fractionation of *Artemisia nilagirica* for anticancer activity and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS determination. *Journal of Ethnopharmacology*, 213: 72-80.
- cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 23: 143-150.
- Balkrishna, A., Anjali, S., Neelam, RD., Ashwini, S. and Vedpriya, A., 2023. *Leea indica* (Burm.f.) Merr.: A Systematized Acquaint. *World Journal of Surgery and Surgical Research*, 6: 1468.
- Ebrahimi, I. and Parvinzadeh Gashti, M., 2015. Extraction of juglone from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for dyeing, anti-fungal finishing, and solar UV protection of wool. *Coloration Technology*, 131: 451-457.
- Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S. and Nabavi, S., 2009. Essential oil Composition and Antioxidant Activity of *Pterocarya fraxinifolia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 957-963.
- Fathi, H., 2015. Comparison of the antimicrobial activity of caucasian wingnut leaf extract (*Pterocarya fraxinifolia*) and Walnut (*Juglans regia* L.) plants. *Acta Biologica Indica*, 4(1): 67-74.
- Flores-Romero, H., Hohorst, L., John, M., Albert, M. C., King, L. E., Beckmann, L., Szabo, T., Hertlein, V., Luo, X. and Villunger, A., 2022. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *The EMBO journal*, 41(2): e108690.
- Foo, J.B., Yazan, L.S., Tor, Y.S., Wibowo, A., Ismail, N., How, C.W., Armania, N., Loh, S.P., Ismail, I.S. and Cheah, Y.K., 2015. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. *Journal of ethnopharmacology*, 166: 270-278.
- Geradts, J., Fong, K.M., Zimmerman, P.V., Maynard, R. and Minna, J.D., 1999. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research*, 5: 791-800.
- Giacinti, C. and Giordano, A., 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25: 5220-5227.
- Gómez-Navarro, J., Arafat, W. and Xiang, J., 1999. Gene therapy for carcinoma of the breast: Pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Research*, 2: 32.
- Goncharenko-Khaider, N., Lane, D., Matte, I., Rancourt, C. and Piche, A., 2010. The inhibition of Bid expression by Akt leads to resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 29: 5523-5536.
- Ilic, V.K., Egorova, O., Tsang, E., Gatto, M., Wen, Y., Zhao, Y. and Sheng, Y., 2022. Hinokiflavone inhibits MDM2 activity by targeting the MDM2-MDMX RING domain. *Biomolecules*, 12: 643.

- A.B., Odugu, J.A., Angyu, A.N., Olatu, O., Bingari, M.S. and Netty, H.I., 2020. Cytotoxic effects of new bioactive compounds isolated from a Nigerian anticancer plant *Melastomastrum capitatum* Fern. leaf extract. *Scientific African*, 8: e00421.
- Wang, H., Yu, D., Agrawal, S. and Zhang, R., 2003. Experimental therapy of human prostate cancer by inhibiting MDM2 expression with novel mixed-backbone antisense oligonucleotides: In vitro and in vivo activities and mechanisms. *The Prostate*, 54: 194-205.
 - Wong, R.S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1): 1-14.
 - Weinberg, R.A., 2013. *The Biology of Cancer: Second International Student Edition*. WW Norton & Company, Garland Science, USA, 875p.
 - Shamloo, B. and Usluer, S., 2019. p21 in cancer research. *Cancers*, 11: 1178.
 - Sinicrope, F.A., Rego, R.L., Foster, N.R., Thibodeau, S.N., Alberts, S.R., Windschitl, H.E. and Sargent, D.J., 2008. Proapoptotic Bad and Bid protein expression predict survival in stages II and III colon cancers. *Clinical cancer research*, 14: 4128-4133.
 - Smolarz, B., Nowak, A.Z. and Romanowicz, H., 2022. Breast Cancer Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14: 2569.
 - Subash-Babu, P., Alshammari, G.M., Ignacimuthu, S. and Alshatwi, A.A., 2017. Epoxy clerodane diterpene inhibits MCF-7 human breast cancer cell growth by regulating the expression of the functional apoptotic genes Cdkn2A, Rb1, mdm2 and p53. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87: 388-396.
 - Ukwubile, C.A., Ikpefan, E.O., Malgwi, T.S., Bababe,