Nova Biologica Reperta 6(1): 10-19 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۱۰ الی ۱۹ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

اثر عصاره‌های آبی و اتانولی ناز سفید بر سلول‌های سرطان معده و سرطان پستان انسان در شیشه

کتایون میمندی و محمدمهدی یعقوبی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران
مسئول مکاتبات: محمدمهدی یعقوبی، m.yaghoobi@kgut.ac.ir

چکیده. در این تحقیق اثر سمّی عصاره‌های آبی و اتانولی ناز سفید (*Sedum album* L.) بر دو سلول سرطان معده (AGS) و پستان (MCF-7) انسان بررسی شد. ناز سفید از روستای دلیر شهرستان چالوس نمونه‌برداری شد و هشت غلظت مختلف از عصاره‌های آبی و اتانولی به‌مدت ۴۸ ساعت بر سلول‌های سرطانی اعمال شد. اثر کشندگی و مهاری عصاره‌ها روی سلول‌ها به روش‌های MTT، BrdU و TUNEL بررسی شد. یافته‌ها نشان داد هر دو عصارهٔ اثر وابسته به غلظت ضد تکثیر سلول و القای آپوپتوز دارند. نتایج MTT نشان داد سلول AGS نسبت به سلول MCF-7 متحمل کشندگی بیشتری شده بود و اثر عصارهٔ اتانولی قوی‌تر از عصارهٔ آبی بود. داده‌های روش BrdU نشان داد در بالاترین غلظت عصارهٔ آبی، تکثیر سلول AGS به ۵۰ درصد و تکثیر سلول MCF-7 به ۴۳ درصد کاهش یافت. همچنین عصارهٔ اتانولی در بالاترین غلظت، تکثیر دو سلول AGS و MCF-7 را به ترتیب به ۷۵ درصد و ۶۰ درصد کاهش داد. نتایج روش TUNEL نیز حاکی از آن بود که ۵۲ درصد از سلول‌های AGS و ۱۲درصد از سلول‌های MCF-7 تحت تیمار با عصارهٔ اتانولی دچار آپوپتوز شدند. عصارهٔ آبی نیز در دو سلول فوق به‌ترتیب ۲۸ درصد و ۲۵ درصد آپوپتوز القا کرد. هم مهار تکثیر سلول و هم القای مرگ، از راهکارهای مطلوب محققان در درمان سرطان هستند. شناسایی ترکیبات موجود در ناز سفید و بررسی اثر آنها در مدل‌های حیوانی سرطان می‌تواند به درک بیشتر خواص ضد سرطانی این گیاه کمک کند.

واژه‌های کلیدی. آپوپتوز، تکثیر سلول، تیرهٔ گل‌نازیان، کوئرستین، گیاهان ضد سرطان

The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Sedum album* L. on human stomach and breast carcinoma cell lines *in vitro*

Katayoon Meimandi & Mohammad Mehdi Yaghoobi
Department of Biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
Correspondent author: Mohammad Mehdi Yaghoobi, m.yaghoobi@kgut.ac.ir

Abstract. In this study, the cytotoxic effects of aqueous and ethanolic extracts of *Sedum album* L. on human stomach cancer cell line (AGS) and breast cancer cell line (MCF-7) were evaluated by MTT, BrdU and TUNEL assays. The results demonstrated that both extracts had antiproliferative and apoptotic effects in a dose-dependent manner. The MTT assay data revealed that the AGS cell underwent more cytotoxicity in comparison with the MCF-7 cell. It also revealed that ethanolic extract was more potent than aqueous extract. The BrdU assay results showed that the proliferation of AGS and MCF-7 cells was reduced to 50% and 43%, respectively, at the highest concentration of the aqueous extract. In addition, the ethanolic extract reduced the proliferation of AGS and MCF-7 cells to 75% and 60%, respectively. The AGS and MCF-7 cells underwent 52% and 12% apoptotic death upon treatment by the ethanolic extract as TUNEL assay showed. The aqueous extract induced 28% and 25% apoptosis in the AGS and MCF-7 cells, respectively. Both inhibition of proliferation and induction of apoptosis are desirable strategies for cancer treatment among researchers. Identification of *S. album* compounds and analyzing their effects in animal model of cancer can help us with understanding its anti-cancer properties.

Keywords. anticancer plants, apoptosis, cell proliferation, Crassulaceae, quercetin

Received 09.07.2017/ Revised 21.10.2017/ Accepted 04.12.2017/ Published 01.05.2019
دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸/ اصلاح: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹/ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۳/ انتشار: ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

مقدمه

براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، در بین عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر دنیا، سرطان بعد از بیماری‌های قلب و عروق در جایگاه دوم قرار دارد (WHO, 2014). باوجود پیشرفت‌هایی که در سال‌های اخیر در زمینه درمان سرطان اتفاق افتاده است، هنوز مؤسسات تحقیقاتی و شرکت‌های دارویی و پژوهشگران در سراسر دنیا به دنبال کشف داروهای جدید و ابداع روش‌های نوین در درمان سرطان هستند. روش‌های متداول مانند شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی عوارض خاص خود را دارند و اغلب مقاومت دارویی در سلول‌های توموری و بروز توانایی مهاجرت و متاستاز، درمان سرطان را با شکست مواجه می‌کند. گیاهان یکی از منابع طبیعی و خدادادی برای جستجو و شناسایی ترکیباتی هستند که در پیش‌گیری، به تاخیرانداختن رشد تومور یا درمان سرطان مؤثرند. صدها هزار گیاه گل‌دار درمجموع میلیون‌ها ترکیب و متابولیت ثانویه را تولید می‌کنند که خواص زیستی بسیاری از آنها ناشناخته است. این منبع عظیم طبیعی برای شناسایی داروهای جدید همواره هدف توجه محققان بوده است. هم‌اکنون نیز انسان‌ها در سرتاسر دنیا برای درمان بیماری‌های مختلف به طب گیاهی روی می‌آورند (Atanasov *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2014; Tariq *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016). جالب توجه است که نزدیک به ۷۵ درصد از داروهای تأییدشدهٔ جهانی در درمان سرطان از گیاهان و منابع طبیعی مشتق شده‌اند، اما کمتر از ۱۰ درصد از گیاهان برای شناسایی ترکیبات ضدسرطان تحت مطالعه قرارگرفته‌اند (Newman & Cragg, 2016). ازاین‌رو ضرورت بررسی گیاهان جدید و مطالعه‌نشده برای شناسایی اثرها و ترکیبات احتمالی ضدسرطان احساس می‌شود.

گیاه ناز سفید (*Sedum album* L.) با نام انگلیسی وایت استون کراپ گونه‌ای از تیرهٔ گل‌نازیان (Crassulaceae) است که در اکثر مناطق کرهٔ زمین گسترش دارند و در همهٔ محیط‌ها قادر به رشد هستند. این گیاهان بیشتر گیاه زینتی و آپارتمانی شناخته شده‌اند. از گل‌های ناز سفید معروف می‌توان به *Sedum album* و *Sedum acre* L. اشاره کرد. گیاه ناز سفید (*S. album*) گیاهی علفی، گوشت‌دار با گل‌هایی به رنگ سفید و مجتمع به تعداد زیاد در قسمت انتهایی ساقه است که در نواحی شمالی ایران، آذربایجان، دیلمان، و مناطق دیگر می‌روید. از بخش‌های هوایی این گیاه کوئرستین و سه گلیکوزید فلاونول ایزورامنتین جدا شده‌اند (Wolbis, 1989). *Sedum sarmentosum* Bunge گونهٔ دیگری از همین سرده است که چند مطالعه دربارهٔ اثر دارویی و ضدسرطانی آن منتشر شده است. این گیاه در طب سنتی چین و کره برای درمان التهاب مزمن ویروسی کبد استفاده می‌شود. کانگ و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که آلکالوئیدهای گیاه *S. sarmentosum* بر سلول‌های سرطانی کبد موشی و انسانی اثر ضدتکثیری دارند. آلکالوئیدهای این گیاه با مهار تکثیر سلول‌های سرطان کبد باعث تجمع آنها در فاز G_1 چرخهٔ سلولی شدند، اما مرگ سلولی از نوع نکروز یا آپوپتوز را القا نکردند (Kang *et al.*, 2000).

Jung و همکاران (2008) اثر ضدالتهابی، ضددرد و ضدرگ‌زایی عصارهٔ متانولی *S. sarmentosum* را گزارش کردند. Huang و همکاران (2010) اثر ضدتوموری عصارهٔ آبی همین گونه را بر سلول‌های توموری کبد انسان HepG2 گزارش کردند. براساس این گزارش عصارهٔ آبی *S. sarmentosum* بعد از تیمار ۴۸ ساعته سبب القای آپوپتوز و کاهش سطح بیان Bcl-2 در این سلول‌ها شد. Bai و همکاران (2016) نشان دادند که عصارهٔ همین گیاه در آزمایشگاه و بدن موجود زنده اثر ضدسرطان لوزالمعده دارد. خواص گزارش‌شده شامل القای مسیر داخلی آپوپتوز، مهار EMT و توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ G_2/M است. به غیراز موارد پیش‌گفته، هیچ مطالعهٔ دیگری دربارهٔ ترکیبات یا خواص دارویی ناز سفید منتشر نشده است. با توجه به اینکه این گیاه بومی ایران است، در این تحقیق تاثیر عصارهٔ آن بر سلول‌های سرطانی انتخاب بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

گیاه ناز سفید از روستای دلیر شهرستان چالوس استان مازندران (۳۶/۳۲ درجهٔ شمالی و ۵۱/۰۹ درجهٔ شرقی) در خرداد ماه ۱۳۸۹جمع‌آوری و به‌کوشش کارشناسان باغ گیاه‌شناسی نوشهر تأیید و با شمارهٔ ۶۴۷۷ در هرباریوم این مرکز ثبت شد. گل‌ها در سریع‌ترین وقت به‌کمک بسته‌های مخصوص یخ و در فریزر۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

تهیهٔ عصارهٔ آبی

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

حدود ۴۰ گرم از سرشاخه‌های هوایی ناز سفید با آب مقطر شسته و در هاون چینی و با کمک نیتروژن مایع آسیاب شد. سپس، ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شیکر با دمای۴ درجه سانتیگراد و دور از نور برای نفوذ حلال قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ برابر شتاب جاذبهٔ زمین و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاصل در دستگاه فریز درایر به‌صورت پودر خشک شد و برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش دور از نور و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تهیهٔ عصارهٔ اتانولی

۲۰۰ گرم از گل‌ها به روش ذکرشده در بخش قبل آسیاب و ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول به آن اضافه شد. سپس، برای نفوذ حلال به مدت ۴۸ ساعت در شیکر با دمای ۴ درجه سانتیگراد و دور از نور قرار گرفت. بعد از این مدت، محلول رویی با پمپ خلأ وکاغذ واتمن شمارهٔ یک فیلتر شد. محلول حاصل در دستگاه روتاری تغلیظ شد و باقیماندهٔ حلال با قراردادن در معرض هوا تبخیر شد. عصارهٔ حاصل برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش در فریزر۲۰- درجه سانتیگراد و دور از نور نگهداری شد.

تهیهٔ رده‌های سلولی و کشت آنها

رده‌های سلولی سرطان آدنوکارسینومای معدهٔ انسان (AGS) و سرطان آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در شرایط استریل در محیط کشت RPMI1640 حاوی۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۵۰µg/mL آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، ۵۰U/mL پنی‌سیلین و ۲µg/mL آمفوتریسینB در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد وCO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. وضعیت سلول‌ها هر روز زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده می‌شد و سلول‌های در مرحلهٔ رشد لگاریتمی در محیط انجماد (شامل محیط کشت به اضافهٔ ۲۰ درصد سرم جنین گاو و۱۰ درصد DMSO) منجمدشده و در ازت مایع نگهداری شدند.

سنجش سمّیت عصارهٔ گیاهی روی سلول‌ها به‌روش رنگ-آمیزی MTT

تعداد ۵۰۰۰ سلول AGS و MCF-7 در چهار ردیف افقی از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کف صاف با ۵۰µL محیط کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور با همان شرایط رشد داده شدند تا بین ۷۰-۶۰ درصد سطح چاهک پر از سلول شود. ردیف بالا، پایین، چپ و راست به‌منزلهٔ بلانک بدون سلول خالی نگه داشته شد. محلول‌های اصلی عصارهٔ آبی در محیط کشت و عصارهٔ اتانولی در DMSO حل شدند. هشت غلظت متفاوت از عصارهٔ آبی (۰/۳-۴/۲ µg/mL) و هشت غلظت از عصارهٔ اتانولی (۰/۲-۲/۸ µg/mL) در حجم نهایی حداکثر ۵ µL به هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه و ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. غلظت صفر برای چاهک شاهد (محیط کشت بدون عصاره) و غلظت‌های ۲/۶µg/mL و ۰/۶µg/mL داروی رایج ۵-فلوروواوراسیل (نزدیک به IC_{50} این دارو به ترتیب برای سلول های AGS و MCF-7) نیز اعمال شد (Nakatsu *et al.*, 2005). سپس، با کیت Cell Proliferation Kit (MTT) طبق روش شرکت سازندهٔ (Roche applied science ,Germany) آزمون MTT انجام شد. پلیت‌ها با روش اسپکتروفتومتری و با دستگاه الایزاریدر مدل ELX808 (شرکت BioTek) در طول موج‌های ۴۹۰ و ۶۸۰ نانومتر خوانده و OD هر چاهک ثبت شد. درصد سلول‌های زنده از طریق فرمول زیر تخمین زده شد:

درصد سلول‌های زنده = 100 × (OD سلول‌های کنترل /ODسلول‌های تیمارشده)

غلظتی از عصاره که رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را پس از ۴۸ ساعت متوقف کند به‌مثابهٔ IC_{50} محاسبه شد.

بررسی میزان اثر عصارهٔ گیاهی بر تکثیر سلول با استفاده از BrdU

تعداد پنج‌هزار از سلول‌های AGS، MCF-7 در چهار ردیف از چاهک پلیت ۹۶ خانه کف صاف با حجم ۵۰µL از محیط کشت، کشت داده شده و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس، همان هشت غلظت از عصاره‌های آبی و اتانولی که در روش MTT به‌کار رفت، به سلول‌ها افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در همان وضعیت قرار گرفتند. غلظت صفر از عصاره برای شاهد بدون عصاره و همان غلظت‌های داروی ۵-فلوروواوراسیل نیز به‌کار رفت. بعد از این مدت، با استفاده از کیت Cell Proliferation ELISA, BrdU kit طبق دستور شرکت سازنده (Roche Applied Science, Germany) میزان مصرف BrdU محاسبه شد. پلیت‌ها توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج‌های ۴۹۰ و ۴۰۵ نانومترخوانده و OD هر چاهک ثبت شد.

بررسی اثر عصاره در القای مرگ سلولی آپوپتوز به‌روش TUNEL

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

سلول‌های AGS و MCF-7 روی لامل و در پلیت‌های شش خانه در انکوباتور با همان ویژگی‌های کشت داده شدند. پس از رسیدن به رشد حدود ۶۰ درصد ، مقدار ۱/۶µg/mL از عصارهٔ اتانولی و ۲/۴µg/mL از عصارهٔ آبی به سلول‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند. این غلظت از وسط محدودهٔ غلظتی مورد استفاده در آزمایش‌های سنجش MTT و BrdU انتخاب شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت با کیت *In situ* cell death detection TMR Red طبق دستور شرکت سازنده (Roche applied science, Germany) روش TUNEL انجام شد. در نمونهٔ کنترل منفی آنزیم ترمینال ترانسفراز حذف شد و در نمونهٔ کنترل مثبت از آنزیم DNase I برای ایجاد شکستگی در DNA سلول استفاده شد. برای محاسبهٔ درصد آپوپتوز، از سلول‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با میکروسکوپ فلورسانس (Axioplan 2, Zeiss) عکس‌برداری و سلول‌های رنگ‌گرفته و رنگ‌نگرفته در پنج میدان تصادفی شمارش و درصد آپوپتوز محاسبه شد. به‌جهت مقایسه در همان میدان با میکروسکوپ نوری معمولی هم از سلول‌ها عکس‌برداری شد.

روش‌های آماری

آزمایش برای روش MTT و BrdU در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد و نتایج به‌ترتیب به‌صورت درصد زنده‌ماندن و میزان جذب برآورد شد. در روش TUNEL میزان آپوپتوز براساس درصد از طریق شمارش سلولی برآورد شد. ۵۰ درصد سمیت سلولی (IC_{50}) با استفاده از نرم‌افزار plus ED_{50} V1.0 (INER,V1.0) محاسبه شد. تجزیهٔ واریانس داده‌های حاصل از این آزمون به‌صورت تجزیهٔ واریانس (ANOVA) و مقایسهٔ میانگین در طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS بررسی شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها با تیمار کنترل نیز با استفاده از آزمون دانت در سطح احتمال ٪۵ تحت بررسی قرار گرفت.

نتایج

در ابتدا سلول‌های سرطان معده و پستان به مدت ۴۸ ساعت در معرض تیمار با عصاره‌های آبی و اتانولی ناز سفید قرار گرفتند. مشاهدهٔ سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های بالا از دو عصارهٔ آبی و اتانولی نشان داد که ظاهر و مورفولوژی سلول‌ها در این مدت تغییر کرده است. این تغییرات ظاهری که در سلول‌های گروه کنترل دیده نشد شامل گردشدن و جداشدن سلول‌ها از کف ظرف و وجود لاشه‌های سلولی بود که حاکی از نوعی مرگ سلولی است. با افزایش غلظت چنین تغییراتی محسوس‌تر بود. تغییرات ظاهری که حاکی از نوعی کشندگی و سمیت بود، با توجه به نوع سلول متفاوت بود، به‌طوری‌که به‌نظر می‌رسید سمّیت عصارهٔ آبی کمتر از عصارهٔ اتانولی است و سلول سرطان معده نیز بیشتر از سلول سرطان پستان تحت تأثیر قرار گرفته بود (شکل ۱).

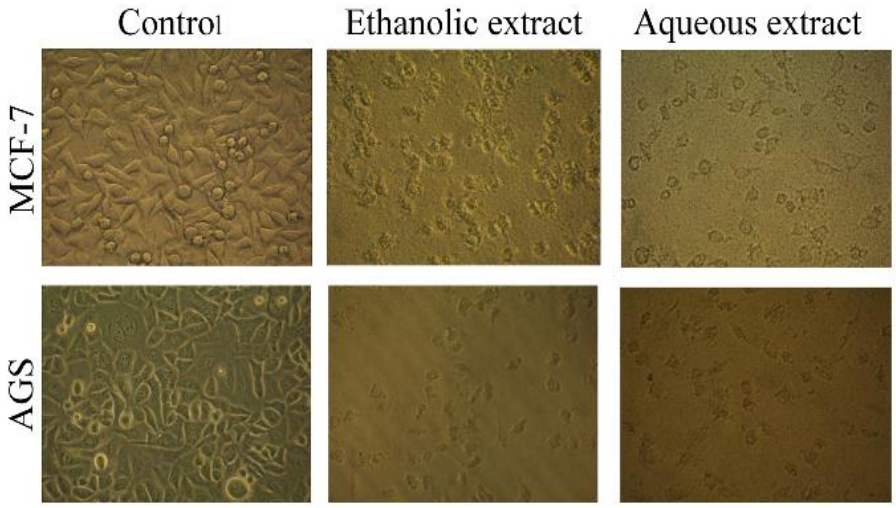
محاسبهٔ میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌روش MTT

محاسبهٔ میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌روش MTT نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۳ µg/mL از عصارهٔ آبی به‌طور معنی‌داری رشد سلول‌های AGS را مهار کرده بود. همین عصاره در غلظت ۳/۶µg/mL و بالاتر جلوی رشد سلول‌های MCF-7 را به‌طور معنی‌داری گرفت. درحالی‌که عصارهٔ اتانولی در غلظت‌های ۲ µg/mL و بالاتر از آن رشد سلول‌های AGS را مهار کرد، این عصاره اثر معنی‌داری بر سلول‌های MCF-7 نداشت (شکل ۲). در کُل از داده‌های MTT چنین برمی‌آید که سلول AGS نسبت به سلول MCF-7 حساس‌تر است و متحمل کشندگی بیشتری شده بود. همچنین اثر عصارهٔ اتانولی بر سلول AGS بیشتر از عصارهٔ آبی بود (شکل ۲ و جدول ۱). داروی 5-FU در غلظت اعمال‌شده بر هر دو سلول مؤثر بود و رشدشان را مهار کرد، اما حساسیت دو سلول نسبت به این دارو برخلاف هر دو عصاره بود؛ یعنی سلول MCF-7 به داروی ۵-فلواوراسیل حساس‌تر بود تا سلول AGS. ارزش IC_{50} دو عصاره بر دو سلول سرطانی در جدول ۱ آمده است. داده‌های این جدول نیز تأیید می‌کند که سلول AGS حساس‌تر از MCF-7 است و اثر کشندگی عصارهٔ اتانولی قوی‌تر از عصارهٔ آبی است.

نتایج میزان اثر عصاره بر سنتز DNA با استفاده از روش BrdU

در بخش دوم میزان تکثیر سلول‌ها به‌روش اندازه‌گیری مصرف BrdU (آنالوگ تیمین که به‌جای آن هنگام ساخت DNA مصرف می‌شود) محاسبه شد. یافته‌های این بخش نیز نشان داد میزان تکثیر هر دو سلول تحت تأثیر عصارهٔ آبی و اتانولی کم می‌شود و این کاهش به غلظت عصاره وابسته است، به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره میزان تکثیر نیز به‌طور معنی‌داری کم می‌شود. در بالاترین غلظت عصارهٔ آبی تکثیر سلول AGS به ۵۰ درصد و تکثیر سلول MCF-7 به ۴۳ درصد کاهش یافت. عصارهٔ اتانولی در بالاترین غاظت تکثیر دو

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]



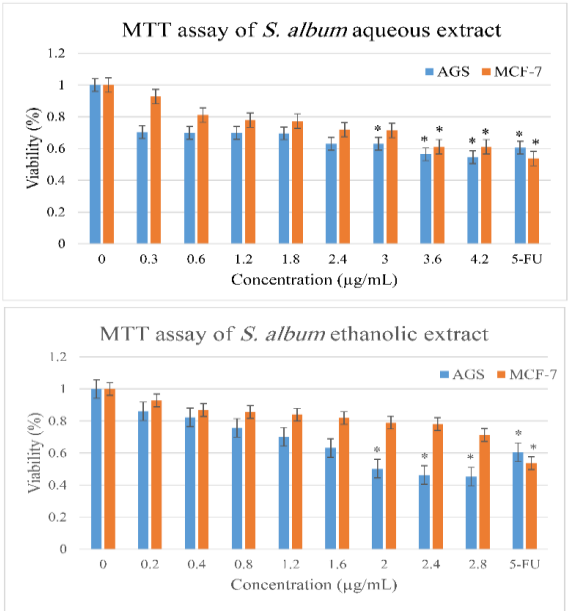
شکل ۱- تغییر ظاهر سلول‌های AGS و MCF-7 که به مدت ۴۸ ساعت در معرض عصارهٔ آبی (۳/۶ µg/mL) و اتانولی (۲/۴ µg/mL) ناز سفید قرار گرفته اند. تغییرات ظاهری سلول‌ها و نشانه‌های مرگ و لاشه سلول‌ها به خوبی مشهود است (بزرگ‌نمایی X ۳۲۰).

Fig. 1. Morphological changes in AGS and MCF-7 cells treated by the aqueous (3.6 µg/mL) and ethanolic extracts (2.4 µg/mL) of *S. album* for 48 h. Some obvious alterations and signs of cell death and cell debris are evidently observable (Magnification 320 X).

جدول ۱- شاخص IC_{50} دو عصارهٔ آبی و اتانولی ناز سفید بر سلول‌های سرطان پستان و معدهٔ انسان که به‌روش MTT به‌دست آمده است.

Table 1. IC50 values of two aqueous and ethanolic extracts against human breast cancer and stomach cancer cell lines obtained by the MTT assay.

سلول / عصارهٔ ناز سفید	MCF-7	AGS
عصارهٔ آبی (µg/mL)	۵/۲۲۶	۴/۵۲۱
عصارهٔ اتانولی (µg/mL)	۵/۵۴۹	۲/۲۶۸



شکل ۲- نتایج زنده‌مانی سلول‌های سرطان معده (AGS) و سرطان پستان (MCF-7) به‌روش MTT که به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف از دو عصارهٔ آبی (نمودار بالا) و اتانولی (نمودار پایین) ناز سفید و همچنین داروی ۵- فلواوراسیل قرار گرفته‌اند.

Fig. 2. The results of viability of AGS and MCF-7 cells treated by different concentrations of aqueous and ethanolic extracts of *S. album* and 5-FU for 48 h by MTT assay.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

سلول AGS و MCF-7 را به ترتیب به ۷۵ درصد و ۶۰ درصد کاهش داد. داروی ۵-فلواوراسیل تکثیر دو سلول فوق را به ترتیب به ۷۰ درصد و ۴۶ درصد کاهش داده بود و از این جهت اثر دارو ضعیف‌تر از بالاترین غلظت عصارهٔ آبی روی سلول AGS (۷۰ درصد در مقابل ۵۰ درصد) و قوی‌تر از بالاترین غلظت عصارهٔ اتانولی روی سلول MCF-7 (۴۶ درصد در مقابل ۶۰ درصد) بود (شکل ۳).

یافتهٔ جالب‌توجه در این بخش آن بود که هر دو عصاره میزان تکثیر در سلول MCF-7 را بیشتر از سلول AGS مهار کرده بودند. به‌عبارت دیگر سلول MCF-7 نسبت به سلول AGS حساس‌تر بود و این برخلاف یافته‌های بخش MTT است که در آن سلول AGS حساس‌تر از MCF-7 بود و میزان زنده‌مانی آن تحت تأثیر عصاره‌ها کمتر از MCF-7 بود. داده‌های این بخش نشان داد که عصارهٔ آبی در تمام غلظت‌ها اثر مهاری بیشتری بر تکثیر سلول AGS دارد تا عصارهٔ اتانولی. اثر مهاری عصارهٔ آبی بر سلول MCF-7 نیز به‌ویژه در چهار غلظت انتهایی بیشتر از اثر عصارهٔ اتانولی بود و در چهار غلظت اولیه اثر مهاری دو عصاره نزدیک به‌هم بود (شکل ۳).

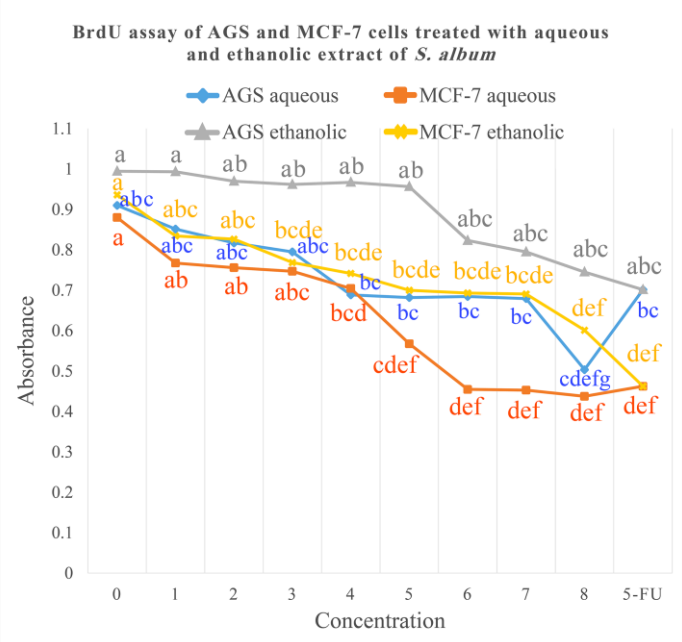
نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره در القاء مرگ سلولی آپوپتوز به روش TUNEL

پس از انجام آزمون‌های سنجش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها به‌روش MTT و BrdU برای تعیین نوع مرگ سلولی از روش TUNEL استفاده شد. در این روش، درصد آپوپتوز با محاسبه میانگین سلول‌های رنگ‌گرفته به کل تعداد سلول‌ها، که ۴۸ ساعت تحت تأثیر عصارهٔ آبی یا اتانولی ناز سفید بوده‌اند، در پنج میدان تصادفی دید به‌دست آمد (شکل ۴). نتایج حاکی از آن بود که سلول‌های AGS تحت تیمار با غلظت ۱/۶µg/mL عصارهٔ اتانولی ناز سفید متحمل ۵۲ درصد آپوپتوز و تحت تیمار غلظت µg/mL ۲/۴ عصارهٔ آبی آن متحمل ٪۲۸ آپوپتوز می‌شوند. همچنین، پس از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت ۱/۶µg/mL عصارهٔ اتانولی ۱۲ درصد آپوپتوز و تیمار با غلظت ۲/۴µg/mL عصارهٔ آبی ۲۵ درصد آپوپتوز در این سلول‌ها مشاهده شد.

بحث

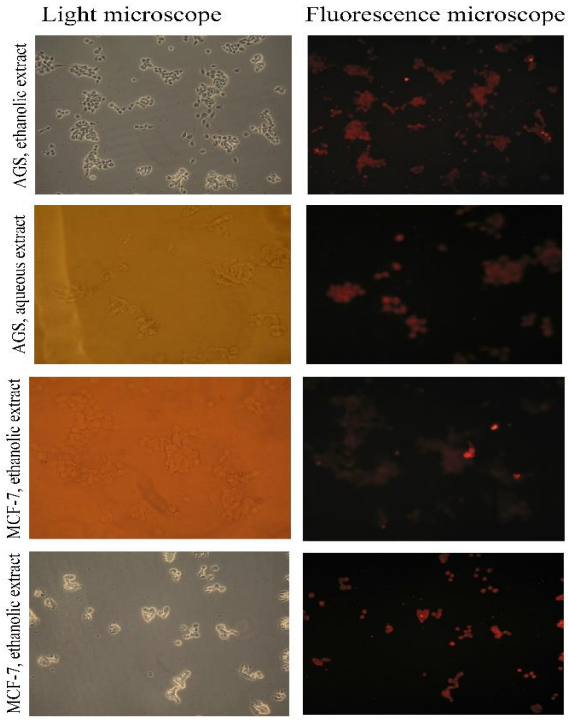
هدف تحقیق آن بود که اثر احتمالی ضدسرطانی دو عصارهٔ آبی و اتانولی گیاه ناز سفید را روی دو سلول سرطان معده و سرطان پستان انسان بررسی کند. در این قسمت نتایج سه بخش MTT، BrdU و TUNEL تحلیل و مقایسه می‌شود. سنجش به‌روش MTT، که برای اندازه‌گیری میزان سمیّت و کشندگی یا زنده‌مانی سلول‌ها به‌کار می‌رود نشان داد که هر دو عصاره به‌طور معنی‌داری اثر سمی و کشنده بر سلول‌های سرطانی تحت بررسی دارند. این اثر وابسته به مقدار است و با افزایش غلظت اثر کشندگی بیشتر می‌شود و همچنین اثر عصاره در برخی غلظتها با داروی رایج شیمی درمانی 5-FU قابل‌مقایسه بود. روش MTT می‌تواند مرگ سلولی را تا حدی نشان دهد، اما قادر به تمییز بین نوع مرگ نکروزی یا آپوپتوزی نیست. در آپوپتوز یک آنزیم DNase توسط آنزیم کاسپاز فعال می‌شود و قطعات DNA را در فواصل منظم می‌بُرد، اما در نکروز چنین اتفاقی نمی‌افتد. به‌همین‌منظور از روش TUNEL، که انتهاهای بریده‌شده DNA را رنگ می‌کند و قادر به تشخیص مرگ آپوپتوزی است، استفاده شد. نتایج آزمون TUNEL تأییدکننده نتایج اولیهٔ MTT بود. به‌طوری‌که در هر دو روش سلول AGS نسبت به سلول MCF-7 حساس‌تر بود و بیشتر دچار مرگ شده بود. همچنین، هر دو روش نشان دادند که عصارهٔ اتانولی مؤثرتر از عصارهٔ آبی است. یادآور می‌شود برای تعیین میزان اثر احتمالی حلال عصارهٔ اتانولی (DMSO) چاهک حاوی سلول و محیط کشت با DMSO نیز در طراحی آزمایش در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد سمیّت بیشتر عصارهٔ اتانولی نسبت به عصارهٔ آبی ناشی از ترکیبات حل‌شده در آن است نه حلال (داده‌ها نشان داده نشده است). گیاهان ده‌ها ترکیب مؤثر زیستی و متابولیت ثانویه تولید می‌کنند که خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی آنها با هم متفاوت است. این ترکیبات، بسته به قطبی‌بودن یا نبودن، در آب یا الکل بهتر حل می‌شوند (Srivastava *et al.*, 2005). ازاین‌رو، تأثیر متفاوت دو عصارهٔ اتانولی و آبی به‌دلیل نوع ترکیبات متفاوتی است که در آن دو حل شده‌اند. احتمالاً ترکیباتی که اثر مرگ‌آور و آپوپتوزی دارند بیشتر در عصارهٔ اتانولی حل شده‌اند. شناسایی شیمیایی ترکیبات موجود در دو عصاره می‌تواند به شناسایی علت تفاوت در اثر زیستی آنها کمک کند. نتیجهٔ دیگری که در دو بخش MTT و TUNEL به‌دست آمد، حساسیت بیشتر سلول سرطان معدهٔ AGS نسبت به سلول سرطان پستان MCF-7 بود. سلول AGS منشأ اپیتلیال دارد و از کارسینومای معدهٔ یک خانم ۵۴ ساله که تحت درمان نبوده جدا شده است. کاریوتیپ این سلول همانند بسیاری از سلول‌های سرطانی غیرعادی است (Barranco *et al.*, 1983).

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]



شکل ۳- میزان تکثیر سلول‌های AGS و MCF-7 تحت تیمار با هشت غلظت از دو عصارهٔ آبی و اتانولی ناز سفید به‌همراه داروی 5-FU به مدت ۴۸ ساعت به‌روش BrdU. معنی‌داربودن تغییرات که با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

Fig. 3. The proliferation rate of AGS and MCF-7 cells under treatment by eight different concentrations of aqueous and ethanolic extracts of *S. album* together with 5-FU for 48h by BrdU assay. The significance level of variations as obtained by Ducann's multiple range test was performed at $P < 0.05$.



شکل ۴- تصویر سلول‌های MCF-7 و AGS تیمارشده با دو عصارهٔ آبی و اتانولی ناز سفید در روش TUNEL. سلول‌های آپوپتوزی با رنگ قرمز در تصویر سمت راست که با میکروسکوپ فلورسانس گرفته‌شده مشهود است. تصویر سمت چپ همان میدان با میکروسکوپ نوری را نشان می‌دهد. (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ X).

Fig. 4. The figure of AGS and MCF-7 cells treated by two aqueous and ethanolic extracts of *S. album* in TUNEL assay. The apoptotic red stained cells are evident in photo on the right, taken by means of fluorescence microscope. The photo on the left shows the same field by means of an optical microscope. (Magnification 200 X).

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

MCF-7 نیز یک سلول سرطان کارسینومایی با منشأ اپیتلیالی است که از بافت تومور پستان یک خانم ۶۹ ساله جدا شده است و کاریوتیپ آن غیرعادی است (Soule *et al.*, 1973). هر دو سلول فوق منشأ بافتی مشابهی دارند، اما باید توجه داشت که مسیرهای فعال‌شده در هر تودهٔ سرطانی مخصوص خود آن توده است و حتی درون سلول‌های یک تومور نیز هتروژنیتی وجود دارد (Meacham & Morrison, 2013). از طرف دیگر، ده‌ها سال از جداسازی این سلول‌ها می‌گذرد و چنین سلول‌هایی اختلالات متعدد کروموزومی و ژنتیکی دارند که طی سالیان گذشته در اثر کشت‌های متوالی بیشتر هم شده است. تفاوت در پاسخ آنها به داروهای شیمی‌درمانی و ازجمله عصاره‌های تحت مطالعه می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و مسیرهای فعال در دو سلول پیش‌گفته باشد. یادآور می‌شود در این تحقیق سلول فیبروبلاست طبیعی انسان (HSkMC) نیز به موازات سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره‌ها قرار گرفت و حساسیت آن از هر دو سلول سرطانی کمتر بود (داده‌ها نشان داده نشده است). این خود حاکی از آن است که عصاره‌ها بر سلول طبیعی اثر کشندهٔ کمتری دارند و به نوعی سلول‌های سرطانی را بیشتر هدف قرار می دهند. این خود یک مزیت کاربردی برای ادامه تحقیق درباب ترکیبات ضدسرطان این گیاه است.

یکی دیگر از یافته‌های تحقیق تفاوت در نتایج روش BrdU با دو روش دیگر بود. درحالی‌که دو روش MTT و TUNEL حساسیت بیشتر سلول AGS نسبت به سلول MCF-7 و همچنین قدرت کشندگی بیشتر عصارهٔ اتانولی را نشان دادند. نتایج سنجش تکثیر به‌روش BrdU برعکس بود؛ یعنی تکثیر سلول MCF-7 بیشتر سرکوب شده بود و قدرت مهاری عصارهٔ آبی بیشتر از عصارهٔ اتانولی بود. باید توجه کرد که مهار تکثیر سلول و ساخت DNA در فاز S چرخهٔ سلولی، الزاماً به مرگ منجر نمی‌شود. برخی ترکیبات ممکن است چرخهٔ سلولی را در مرحلهٔ G_1 مهار کنند و این از طریق افزایش بیان پروتئین p21 و به‌صورت توقف گذرای سلول در مرز عبور از G_1 به S اتفاق می‌افتد. اما چنین توقفی به آپوپتوز منجر نمی‌شود، بلکه گاهی با فعال‌شدن عامل رونویسی E2F سلول از چک‌پوینت مربوط عبور می‌کند و وارد مرحلهٔ S می‌شود. Kang و همکاران (2000) یافتهٔ مشابهی داشتند. آنان گزارش کردند که آلکالوئیدهای خام و تخلیص‌نشده گیاه *S. sarmentosum* (گونهٔ نزدیک به *S. album*) به مهار تکثیر چرخهٔ سلولی در سلول‌های سرطان کبد انسان و موش منتهی شد. اینکار از طریق افزایش تعداد سلول‌ها در مرحلهٔ G_1 چرخهٔ سلولی و بدون القای آپوپتوز یا نکروز انجام شد. براساس گزارش دیگری، عصارهٔ آبی *S. sarmentosum* بعد از تیمار ۴۸ ساعته سبب القای آپوپتوز و کاهش سطح بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 در سلول‌های سرطان کبد انسان، HepG2، شد (Huang *et al.*, 2010). اخیراً نیز اثر ضدسرطانی متنوعی برای عصارهٔ همین گیاه *S. sarmentosum* شامل مهار رشد سلول سرطان لوزالمعده با کاهش سطح PCNA، مهار مسیر پیام‌رسان Hedgehog، مهار بیان انکوژن C-MYC، القای بیان ژن سرکوبگر تومور P53، القای مسیر داخلی آپوپتوز، مهار EMT و توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ G_2/M گزارش شده است (Bai *et al.*, 2016)؛ بنابراین، می‌توان استنتاج کرد که برخی مواد موجود در عصارهٔ آبی ناز سفید مهارکنندهٔ چرخهٔ سلولی باشند و از این طریق اثر خود را بر سلول‌های سرطان پستان بگذارند. برخی دیگر که القاکنندهٔ مرگ سلولی هستند در عصارهٔ اتانولی حل می‌شوند و بر سلول سرطان معده مؤثرتر هستند. دو آزمون BrdU و TUNEL در این تحقیق تفاوت عمل‌کرد این مواد را بر سلول سرطانی نشان داد. مهم این است که هر دو استراتژی پیش‌گفته در درمان سرطان کاربرد دارد و این اهمیت ترکیبات ناشناختهٔ موجود در ناز سفید برای درمان سرطان را بیشتر نمایان می‌کند.

در بارهٔ ترکیبات موجود در گیاه ناز سفید، به‌جز گزارشی که حدود ۳۰ سال پیش منتشر شده است، اطلاعات بیشتری در دست نیست (Wolbis, 1989)، اما مقالاتی که به آنها اشاره شد همگی دربارهٔ گونهٔ دیگری از همین سرده کار کرده‌اند که در طب سنتی چین و کره کاربرد زیادی دارد. همان‌طور که این مقالات نشان می‌دهند، ترکیبات گیاه *S. sarmentosum* اثر ضدسرطانی وسیعی دارند که هم شامل مهار تکثیر سلول می‌شود و هم القای آپوپتوز را شامل می‌شود. ازاین‌رو، دیدن چنین اثرهایی از عصارهٔ گیاه ناز سفید چندان دور از انتظار نیست. شاید مواد فعال زیستی مشابهی در هر دو گونه وجود داشته باشد که منشأ چنین اثرهایی است. یکی از ترکیبات شناخته‌شده‌ای که وجودش در هر دو گونهٔ *S. sarmentosum* و *S. album* گزارش شده است کوئرستین است (Ma *et al.*, 2017, Wolbis, 1989). کوئرستین یک فلاوئوئید پلی‌فنولی است که در بسیاری از گیاهان خوراکی و دارویی یافت می‌شود و خواص آنتی‌اکسیدانت و ضدتکثیری دارد. هرچند سازوکار عمل کوئرستین کاملاً شناخته‌شده نیست، از

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

اثرهای ضدسرطانی کوئرستین می‌توان به کاهش بیان P53 جهش-یافته، کاهش بیان انکوژن ras، توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ G_1، القای آپوپتوز، مهار رگ‌زایی و متاستاز، اثر سم‌زدایی و ضدالتهابی اشاره کرد (Kashyap *et al.*, 2016). اثر ضدسرطانی ناز سفید که در این تحقیق مشاهده شد ممکن است ناشی از وجود کوئرستین یا ترکیبات مشابه باشد. برای ایزورامنتین نیز، که فرم متیله‌کوئرستین است و در گیاه ناز سفید دیده شده است، اثرهای ضدسرطانی مشابهی همچون ممانعت از تکثیر سلول و القای آپوپتوز در سلول سرطان مری انسان گزارش شده است (Ma *et al.*, 2007). نکته‌ای که نباید مغفول بماند این است که در یک عصارهٔ خام ده‌ها ترکیب ناشناخته وجود دارد که برخی از آنها اثر مشابه دارند و بین این ترکیبات همکاری سینرژی وجود دارد. همچنین، یک ترکیب منفرد مثل کوئرستین اثرهای متنوع زیادی دارد که به برخی از آنها اشاره شد. ازهمین‌رو است که گاهی اوقات اثر عصاره از یک داروی رایج شیمی‌درمانی قوی‌تر ظاهر می‌شود.

نتیجه‌گیری

داده‌های این پژوهش درمجموع اثرهای ضدسرطانی گیاه ناز سفید را بر دو سلول سرطان معده و سرطان پستان انسان نشان داد. این اثرها به‌واسطهٔ ترکیباتی مانند کوئرستین و سایر مواد ضدسرطان ناشناخته و از طریق مهار چرخهٔ سلولی یا از طریق القای آپوپتوز انجام می‌شوند. متأسفانه، اطلاعات ما در مورد ترکیبات ناز سفید اندک است و این تحقیق جزو اولین کارهایی بود که در ایران دربارهٔ این گیاه انجام شد. با توجه به بومی‌بودن ناز سفید، مطالعات بیشتر دربارهٔ خواص دارویی آن و شناسایی و جداسازی ترکیباتی که مولکول‌ها و مسیرهای زیستی فعال در سرطان را هدف قرار می‌دهند لازم به‌نظر می‌رسد. مطالعات بیشتر درباب مدل‌های حیوانی سرطان در موش نیز می‌تواند خواص ضدسرطانی این گیاه را روشن کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان با قرارداد شماره ۱/۲۷۰۸ انجام شده است. نویسندگان از کارشناسان باغ گیاه‌شناسی نوشهر برای همکاری در نمونه‌برداری و تأیید ناز سفید تشکر می‌کنند.

REFERENCES

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch ,V.M. and Stuppner, H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. – Biotechnol Adv. 33**:** 1582-1614.

Bai, Y., Chen, B., Hong, W., Liang, Y., Zhou, M. and Zhou, L. 2016. Sedum sarmentosum bunge extract induces apoptosis and inhibits proliferation in pancreatic cancer cells via the hedgehog signaling pathway. – Oncol. Rep. 35**:** 2775-2784.

Barranco, S., Townsend, C., Casartelli, C., Macik, B., Broerwinkle, W. and Gourley, W. 1983. Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. – Cancer Res**.** 43: 1703-1709.

Huang, D., Zhang, W., Huang, D. and Wu, J. 2010. Antitumor activity of the aqueous extract from sedum sarmentosum bunge in vitro. – Cancer Biother. Radiopharm. 25**:** 81-88.

Jung, H. J., Kang, H. J., Song, Y. S., Park, E. H., Kim, Y. M. and Lim, C. J. 2008. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of sedum sarmentosum extract. – J. Ethnopharmacol. 116**:** 138-143.

Kang, T. H., Pae, H.O., Yoo, J. C., Kim, N.Y ,.Kim, Y. C., Ko, G.I. and Chung, H.T. 2000. Antiproliferative effects of alkaloids from sedum sarmentosum on murine and human hepatoma cell lines. – J. Ethnopharmacol. 70**:** 177-182.

Kashyap, D., Mittal, S., Sak, K., Singhal, P. and Tuli, H. S. 2016. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. – Tumour Biol. 37**:** 12927-12939.

Ma, G., Yang, C., Qu, Y., Wei, H., Zhang, T. and Zhang, N. 2007. The flavonoid component isorhamnetin in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in eca-109 cells. – Chem. Biol. Interact. 167**:** 153-160.

Ma, X., Yang, J., Deng, S., Huang, M., Zheng, S., Xu, S., Cai, J., Yang, X. and Ai, H. 2017. Two new megastigmanes from chinese traditional medicinal plant sedum sarmentosum. – Nat. Prod. Res. 31**:** 1473-1477.

Meacham, C.E. and Morrison, S.J. 2013. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. – Nature 501**:** 328-337.

Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y. and Yamori, T. 2005. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cdna arrays. – Mol. Cancer Ther. 4**:** 399-412.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]

Newman, D. J. and Cragg, G. M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. – J. Nat. Prod. 79**:** 629-661.

Ouyang, L ., Luo, Y., Tian, M., Zhang, S. Y., Lu, R., Wang, J. H., Kasimu, R. and Li, X. 2014. Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. – Cell Prolif. 47**:** 506-515.

Soule, H., Vasquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. – J. Natl. Cancer Inst. 51**:** 1409-1416.

Srivastava, V., Negi, A. S., Kumar, J. K., Gupta, M. M. and Khanuja, S. P. 2005. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. – Bioorg Med. Chem. 13**:** 5892-5908.

Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O. O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B. B., Kumar, B., Islam, R. and Adnan, M. 2017. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. – Phytother Res. 31**:** 202-264.

WHO. 2014. Global status report on noncommunicable diseases. *In:* MENDIS, H. (Ed.). Geneva: World Health Organization.

Wolbis, M. 1989. Flavonol glycosides from sedum album. – Phytochem. 28**:** 2187-2189.

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M. and Li, H.B. 2016. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. – Nutrients 8: 515.

*****

How to cite this article:

Meimandi. K. and Yaghoobi, M.M. 2019. The Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Sedum album* L. on human stomach and breast carcinoma cell lines *in vitro*. – Nova Biol. Reperta 6:.10-19.

میمندی، ک. و یعقوبی، م.م. ۱۳۹۸. اثر عصاره‌های آبی و اتانولی ناز سفید بر سلول‌های سرطان معده و سرطان پستان انسان در شیشه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۱۹-۱۰.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.7.2]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.10]