

## بررسی تغییرات بیان ژن *p53* در سلول‌های رده A549 (سرطان ریه) و AGS (سرطان معده) تحت تاثیر عصاره هیدروالکلی گونه *Nepeta glomerulosa*

سپیده صاحبی، سیده مهدخت مداح\* و گلانه مصطفوی

ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹

### چکیده

سرطان‌های ریه و معده از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در جهان و نیز در ایران هستند. برای یافتن راه‌های درمانی محققان روی تغییرات در سطح مولکولی در سلول‌های سرطانی متمرکز شدند. برخی ترکیبات شیمیایی گیاهی طبیعی بر مسیر پیام‌رسانی آپوپتوزیس تاثیر گذاشته و در ایجاد و تنظیم فرایندهای درگیر در سرطان نقش مهمی را ایفا می‌کنند. لذا در تحقیق حاضر اثر سمیت سلولی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه *Nepeta glomerulosa*، بر روی رده‌های سلولی A549 و AGS و نیز تاثیر عصاره بر تغییرات بیان ژن *p53* در این سلول‌های سرطانی بررسی شد. سرشاخه‌های گیاه از منطقه‌ی بینالود در استان خراسان جمع‌آوری شد و عصاره اتانولی ۸۰٪ آن به روش خیساندن تهیه گردید. خاصیت سیتوتوکسیک عصاره بر روی دو رده سلولی در سه زمان، یعنی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از سنجش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان القای آپوپتوز با رنگ آمیزی DAPI ارزیابی شد. تغییرات بیان ژن *p53* با کمک Real-time PCR تعیین گردید. بر طبق نتایج بدست آمده  $IC_{50}$  برای رده‌های سلولی A549 و AGS به ترتیب ۱۵ mg/ml و ۷/۵ mg/ml بدست آمد ( $P < 0/05$ ). نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI نشان داد تحت تاثیر عصاره در غلظت‌های  $IC_{50}$  القای آپوپتوز در هر دو رده نسبت به شاهد بیشتر بود. افزایش بیان ژن *p53* تحت تاثیر عصاره در سلول‌های رده AGS بیشتر از سلول‌های رده A549 بود ( $P < 0/05$ )؛ که نشان دهنده بیشتر بودن اثر مهارکنندگی تکثیر عصاره این گونه بر روی سلول‌های سرطان معده از طریق افزایش بیان ژن *p53* و القای آپوپتوز است.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، ژن *p53*، سمیت سلولی، *Nepeta glomerulosa*

\* نویسنده مسئول، تلفن ۰۹۱۲۲۱۲۳۷۱۲، پست الکترونیکی: s.m.maddah@iau.ac.ir

### مقدمه

سرطان ریه عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۲۰). نورسته‌های (نئوپلاسم‌های) ایجاد شده در سرطان ریه از نظر بافت‌شناسی بسیار ناهمگن هستند. تقریباً ۹۸ درصد از سرطان‌های ریه از نوع کارسینوم (تومورهای ایجاد شده از سلول‌های اپیتلیال) می‌باشند. سلول‌های سرطانی کارسینوم ریه بر اساس سایز به دو دسته تقسیم می‌شوند: SCLC (Small Cell Lung Cancer) سرطان ریه با سلول‌های کوچک و سیتوپلاسم اندک که ۱۰-۱۵٪ مبتلایان را شامل می‌شوند؛ گروه دوم NSCLC

سرطان، تمام جنبه‌های زندگی بشر را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار داده است، به دلیل عدم درمان قطعی سرطان و افزایش تومورهای مقاوم به دارو و شیوع زیاد سرطان، تعداد مبتلایان به انواع این بیماری رو به افزایش است. آمارها نشان می‌دهد در سال ۲۰۲۰، حدود ۱۰ میلیون مرگ مربوط به سرطان بوده است. پیش‌بینی شده است تعداد مبتلایان به سرطان از ۱۹/۳ میلیون در سال ۲۰۲۰ به ۳۰/۲ میلیون نفر در سال ۲۰۴۰ خواهد رسید (۱۳).

نقص مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی مختلف می‌تواند منجر به اختلال در تنظیم آپوپتوز و بروز سرطان شود، ژن سرکوب‌گر تومور *p53* چرخه سلولی را تنظیم می‌کند و گسترده‌ترین ژن جهش یافته در تومورزایی انسان است (۸). در پاسخ آسیب به DNA، به واسطه عمل پروتئین *p53*، چرخه سلولی متوقف می‌شود و اجازه می‌دهد سیستم‌های ترمیم سلولی فعال شود. فعال شدن سیستم‌های ترمیمی مانع تثبیت دائمی جهش‌ها در ژنوم، بعد از میتوز می‌شود و در مواردی که آسیب جبران‌ناپذیر است، آپوپتوز را القا می‌کند که با افزایش رونویسی از ژن *BAX* انجام می‌شود. پروتئین *BAX* می‌تواند با مهارکننده‌های آپوپتوز دایمر تشکیل دهد و آنها را غیرفعال کند تا سلول بتواند دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شود (۳۰).

در بین بیماران مبتلا به سرطان ریه جهش در ژن *p53* شایع است. در سرطان ریه سلول‌های غیر کوچک (NSCLC) تا ۵۰٪ و در نوع سلول‌های کوچک (SCLC) تا ۸۰٪ ژن *p53* دارای جهش است (۲۱). با توجه به مطالعه‌های انجام شده روی جهش‌های ژنی، *p53* قابل توجه‌ترین ژن جهش یافته در بدخیمی‌ها از جمله سرطان معده است (۲۲). جوشقانی و همکاران مطالعه‌ای را برای تعیین جهش‌های *p53* در مبتلایان سرطان معده سه مرکز بیمارستانی در تهران به روش PCR-SSCP انجام دادند که در آن میزان بروز جهش در ژن *p53* در سرطان معده ۲۰/۵ درصد به دست آمد که بیانگر فراوانی متوسط جهش ژن *p53* در جامعه مورد مطالعه است (۱۸). طبق گزارش‌های شیائو در ایتالیا، میزان جهش در ژن *p53* مبتلایان به سرطان معده ۶۶ درصد گزارش شد (۳۱).

برخی شواهد حاکی از تاثیر ترکیبات گیاهی طبیعی بر مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز می‌باشد که در ایجاد و تنظیم فرایندهای درگیر در سرطان نقش مهمی را ایفا می‌کند. این تاثیر می‌تواند بر مسیر داخلی یا خارجی آپوپتوز از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تغییر فعالیت پروتئین‌های پروآپوپتوتیک یا آنتی‌آپوپتوتیک و هم‌چنین آنزیم‌های کاسپاز

(Non-small Cell Lung Cancer) که در این نوع، سلول‌ها از نظر اندازه بزرگتر و نسبت هسته به سیتوپلاسم بیشتر است. ۸۵-۹۰ موارد ابتلا از نوع دوم یعنی NSCLC می‌باشند (۲۳ و ۳۴). رده A549 سرطان ریه از دسته دوم می‌باشد. در کشور ما آلودگی هوا، سیگار و وجود آزیست از عوامل اصلی ایجاد و بروز سرطان ریه هستند. بر طبق آماری در سال ۲۰۱۴ تعداد مبتلایان به سرطان ریه در کشور حدود ۸ هزار نفر برآورد شده است. پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۳۰ این تعداد به ۲۸ هزار نفر برسد و در صورت عدم توجه، مشکل اصلی کشور در سال ۲۰۳۰، خواهد بود (۳).

سرطان معده یکی از علل عمده مرگ و میر ناشی از سرطان در کل دنیاست و در حال حاضر پس از سرطان ریه مقام دوم را دارد. کارسینوما که در واقع بدخیمی سلول‌های اپیتلیالی است از پرتکرارترین انواع سرطان‌هاست. آدنوکارسینوماها ۹۵٪ تومورهای بدخیم معده را شامل می‌شود و شایع‌ترین فرم سرطان معده است. انواع دیگر مانند لنفوما، تومورهای استرومال و سایر تومورهای نادر ۵٪ باقی‌مانده انواع سرطان معده را شامل می‌شوند (۱۴). رده سلولی AGS (Adenocarcinoma Gastric Line)، رده سلولی سرطان معده از نوع آدنوکارسینوما می‌باشد. در ایران، عفونت ناشی از هلیکوباکتریلوری، مصرف دخانیات، رژیم غذایی پر نمک و عدم دریافت کافی آنتی‌اکسیدان از عوامل ابتلا به این بیماری گزارش شده‌اند (۱۷ و ۳۵).

برای یافتن راه‌های درمانی، محققان روی تغییرات در سطح مولکولی در سلول‌های سرطانی متمرکز شدند. در انسان در ۵۰٪ یا بیش از ۵۰٪ سرطان‌ها ژن سرکوب‌گر تومور *p53* جهش یافته است و در نتیجه سنتز پروتئین آپوپتوزی *p53* صورت نمی‌گیرد؛ بنابراین عملکرد این پروتئین برای فعال کردن ژن‌های هدف که مربوط به چرخه سلول و آپوپتوز هستند مختل می‌شود (۳۴). ژن *p53* در موقعیت 17p13.1 قرار گرفته است و یک فسفو پروتئین با عملکرد چندگانه را کد می‌کند که این پروتئین با سرطان‌زایی ارتباط دارد (۳۳).

پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. به منظور خشک شدن گیاه، سرشاخه‌های گلدار جمع آوری شده در مجاورت با هوا در شرایط و مکان مناسب و در سایه به مدت یک هفته قرار داده شدند و سپس با خردکن پودر شدند.

**عصاره‌گیری:** عصاره‌گیری از گیاه نپتا گلومرولوزا به روش خیساندن انجام شد. ۴۰ گرم از پودر خشک شده گیاه در ظرف شیشه‌ای دردار ریخته شد و سپس ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ به آن اضافه گردید. ظرف به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار (innova42) ساخت شرکت اپندورف آلمان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰ rpm قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت عصاره‌ی رویی با کاغذ صافی واتمن ۱ و پارچه‌ی نظیف صاف شد، عصاره‌ها در چند پلیت ریخته و با کمک هیتر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و باد سرد سشوار تغلیظ و خشک گردید (۷).

**کشت سلول:** سلول‌های رده‌ی A549 سرطان ریه، سلول‌های رده‌ی AGS سرطان معده و رده سلولی نرمال فیروبلاست HFD، از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شدند. محیط کشت DMEM برای رده‌ی A549 و محیط کشت RPMI-1640 برای رده‌ی AGS به همراه سرم جنین گاوی یا FBS ۱۰٪ (همگی مارک Gibco ساخت آمریکای جنوبی) استفاده شد. برای رده نرمال محیط رشد فیروبلاست PCS-201-030 بکار رفت. همچنین آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر (BIO-IDEA، ایران) به محیط اضافه گردید. فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی سلول‌های کشت شده تا زمان استفاده در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار حاوی ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سلول‌ها هر سه روز یک بار پاساژ داده شدند (۲۵ و ۲۷).

**بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره با آزمون MTT:** پس از رشد و تکثیر مناسب سلول‌ها در فلاسک‌ها سلول‌ها به کمک لام نئوبار شمارش شد. سه پلیت ۹۶ خانه برای زمان‌های

باشد. بنابراین استفاده از مواد فیتوشیمیایی برای تنظیم این مسیر پیام‌رسانی به عنوان راهکار امیدوارکننده‌ای در تکمیل و کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی بیماری سرطان مطرح می‌باشد (۱).

جنس نپتا از خانواده Lamiaceae با حدود ۳۰۰ گونه پراکنده در مرکز و جنوب اروپا، شرق نزدیک و آسیای مرکزی و جنوبی است. بسیاری از گونه‌های این جنس از جمله ۷۶ گونه بومی ایران هستند (۶). تنوع زیاد و محتوای غنی از ترپنوئید، فلاونوئید و ترکیبات فنلی گونه‌های نپتا اثرات فارماکولوژیکی دارند و توجهی برای استفاده سنتی آنها برای اهداف دارویی است (۱۲ و ۳۲). گونه *Nepeta glomerulosa* معروف به پونه سای انبوه، گیاهی چند ساله به ارتفاع ۳۰-۵۰ سانتیمتر پوشیده از کرک‌های تار مانند و ساقه بلند و باریک و متعدد است که در قسمت انتهایی فاقد برگ می‌باشد (۵). اندام‌های هوایی نپتا گلومرولوزا به طور تجربی در طب عامیانه به عنوان ضد سرفه استفاده می‌شود (۱۶). مواد تشکیل‌دهنده عصاره نپتا گلومرولوزا آلکالوئید، ساپونین و روغن است (۱۱).

از آنجائیکه که ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی این جنس ممکن است خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری داشته باشد و تاکنون تاثیر عصاره نپتا گلومرولوزا بر سلول‌های A549 سرطان ریه و رده سلولی AGS سرطان معده مورد مطالعه قرار نگرفته است، در پژوهش حاضر ضمن بررسی خواص سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی بخش‌های هوایی این گیاه تاثیر آن بر تغییرات بیان ژن *p53* مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روشها

**جمع‌آوری گیاه:** سرشاخه‌های گلدار گیاه نپتا گلومرولوزا (*Nepeta glomerulosa*) از ارتفاع ۲۲۰۳ متر کوه‌های بینالود در استان خراسان رضوی (شمال شرق نیشابور و غرب مشهد) N=36°, 16,826 و E= 0.59°, 0.7,484 در اوایل تیر ماه جمع‌آوری گردید. با کد (FUMH) ۳۶۸۰۹ توسط

سالین فسفات PBS شسته شدند و سپس با فرمالدئید/PBS ۴٪ (پارافرمالدئید)، به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. ۲/۱ میلی‌لیتر از محلول استوک DAPI (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را به ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه نموده تا رقت ۳۰۰ میکرومولار ساخته شود. محلول DAPI آماده شده روی سلول‌ها ریخته شد تا آنها را کامل بپوشاند. ۵ دقیقه دور از نور انکوبه کرده و سپس محلول را دور ریخته و در نهایت ۲-۳ بار سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (فیلتر آبی Nikon آلمان) مشاهده و عکسبرداری گردیدند.

**استخراج RNA:** سلول‌های رده‌های A549 و AGS تحت تیمار غلظت (IC<sub>50</sub>) ۱۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره کشت داده شدند. تعداد ۵×۱۰<sup>۶</sup> سلول در ۷۰۰ میکرولیتر محلول RiboEX (cat.No.302-001) ساخت شرکت GeneAll کره هضم شدند و ادامه مراحل استخراج بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. خلوص RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Milton Roy-) Spectronic 21D- USA تعیین شد (۲۶).

**سنتز cDNA:** نمونه الگو در واکنش‌های Real-time PCR مولکول cDNA می‌باشد که بایستی مولکول RNA به DNA تبدیل گردد برای این منظور از کیت Easy cDNA synthesis (cat.A101161) ساخت شرکت پارس طوس ایران استفاده شد و مطابق با دستورالعمل آن سنتز cDNA انجام شد. به طور خلاصه، در یک میکروویال در حجم واکنش ۱۰ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر اولیگو (dT) پرایمر با ۴/۵ میکرولیتر (mRNA+آب) مخلوط شد، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس به مدت حداقل ۱ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس ۵ میکرولیتر مخلوط Master و ۱۰ میکرولیتر مخلوط سنتز cDNA به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و واکنش‌ها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در نهایت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه پایان یافت.

۴۸، ۷۲ و ۱۰۰ ساعت آماده گردید؛ به طوریکه در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ۱۰۰۰۰ سلول کشت شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی هر چاهک خارج شد. مقدار ۲ گرم از عصاره تغلیظ و خشک شده *نپتا گلمرولوزا* با ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت رقیق شد. از استوک ساخته شده برای عصاره غلظت-های ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵، ۱/۶۲، ۰/۸۱، ۰/۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از تیماردهی پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شد. پلیت اول ۲۴ ساعت بعد از انکوباتور خارج شد و پس از خروج مایه رویی، در تاریکی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرد رنگ، اضافه گردید. پس از ۴ ساعت انکوبه شدن پلیت در انکوباتور، رنگ MTT خالی و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و پلیت با فویل آلومینیومی پیچیده شد؛ سپس پلیت، حدود ۱ ساعت، در انکوباتور انکوبه شد تا کریستال-های ارغوانی رنگ حاصل از احیاء MTT در آن حل شود. در نهایت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Epoch Microplate Spectrophotometer) شرکت Biotek هند، اندازه‌گیری شد (۴ و ۳۱). شدت رنگ ارغوانی حاصله معرف نسبت سلول-های زنده در هر چاهک است. این مراحل ۴۸ ساعت بعد برای پلیت دوم و ۷۲ ساعت بعد برای پلیت سوم تکرار شد. درصد زنده مانی سلول‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

۱۰۰× (میانگین جذب نوری کنترل/میانگین جذب نوری نمونه) = میزان بقای سلول

**سنجش میزان آپوپتوز با روش DAPI:** بر اساس نتایج تست MTT رده‌های سلولی A549 و AGS به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب با غلظت ۱۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (غلظت‌های IC<sub>50</sub>) تحت تیمار عصاره گیاه *نپتا گلمرولوزا* در پلیت های ۹۶ خانه کشت شدند. سپس محلول رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با بافر شستشوی

www.ncbi.nlm.nih.gov با کدهای دسترسی مندرج در جدول ۱، بدست آمد. با توجه به بررسی منابع و طراحی پرایمر با نرم‌افزارهای Gene runner و ابزار Primer3 (version 0.40) توالی مناسب مطابق جدول ۱ انتخاب گردید (۲۹) و توسط شرکت ژن فناوری ستنتر گردید.

نمونه روی یخ سرد شد و ۱ میکرولیتر RNase H به لوله اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول واکنش سنتز cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

**Real-time PCR:** توالی ژن *p53* به عنوان ژن هدف و ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع از سایت

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن هدف و ژن مرجع و طول محصول هر جفت پرایمر

نام ژن و A.N	توالی پرایمر (دمای اتصال ۶۰ درجه)	طول محصول bp
<i>GAPDH</i> NM_001357943.2	Forward	CTCATTTCTGGTATGACAACG
	Reverse	CTTCTCTTGTGCTCTTGCT
<i>p53</i> NC_000017.11	Forward	GCGAGCACTGCCCAACAACAC
	Reverse	TCACGCCACGGATCTGAAGG

**بررسی تکثیر اختصاصی محصولات Real-time PCR**  
توسط ژل الکتروفورز: محصولات تکثیر شده ژن هدف و مرجع طی Real-time PCR روی ژل آگارز ۲٪ بارگذاری و الکتروفورز شد. این مرحله جهت تایید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی انجام گرفت.

در این مطالعه از کیت YTA SYBR Green qPCR, Master Mix 2X و رنگ SYBR Green استفاده شد. واکنش qPCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۲ pmol/μl) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. میکروویال ها در دستگاه Rotor Gene 6000 Qagen جهت تکثیر قطعات در ۴۰ چرخه با برنامه دمایی زیر قرار داده شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ C° به مدت ۱۵ دقیقه و برای هر چرخه به مدت ۱۵ ثانیه، در همین دما، برای اتصال پرایمرها در ۶۰ C° به مدت ۱ دقیقه و برای گسترش در دمای ۷۱ C° به مدت ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد. پس از آن تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای هر تکثیر PCR در محدوده دمایی از ۲۴ C° تا ۳۵ انجام شد (۲۹). آزمایش در دو تکرار انجام شد. داده‌های بلند شدن نمودار و تکثیر برای بدست آوردن کارایی واکنش در نرم افزار REST ۲۰۰۹ انجام گردید. بعد از بدست آوردن E، از فرمول زیر برای محاسبه Fold Change ژن از ۲۰۱۶ Excel استفاده شد.

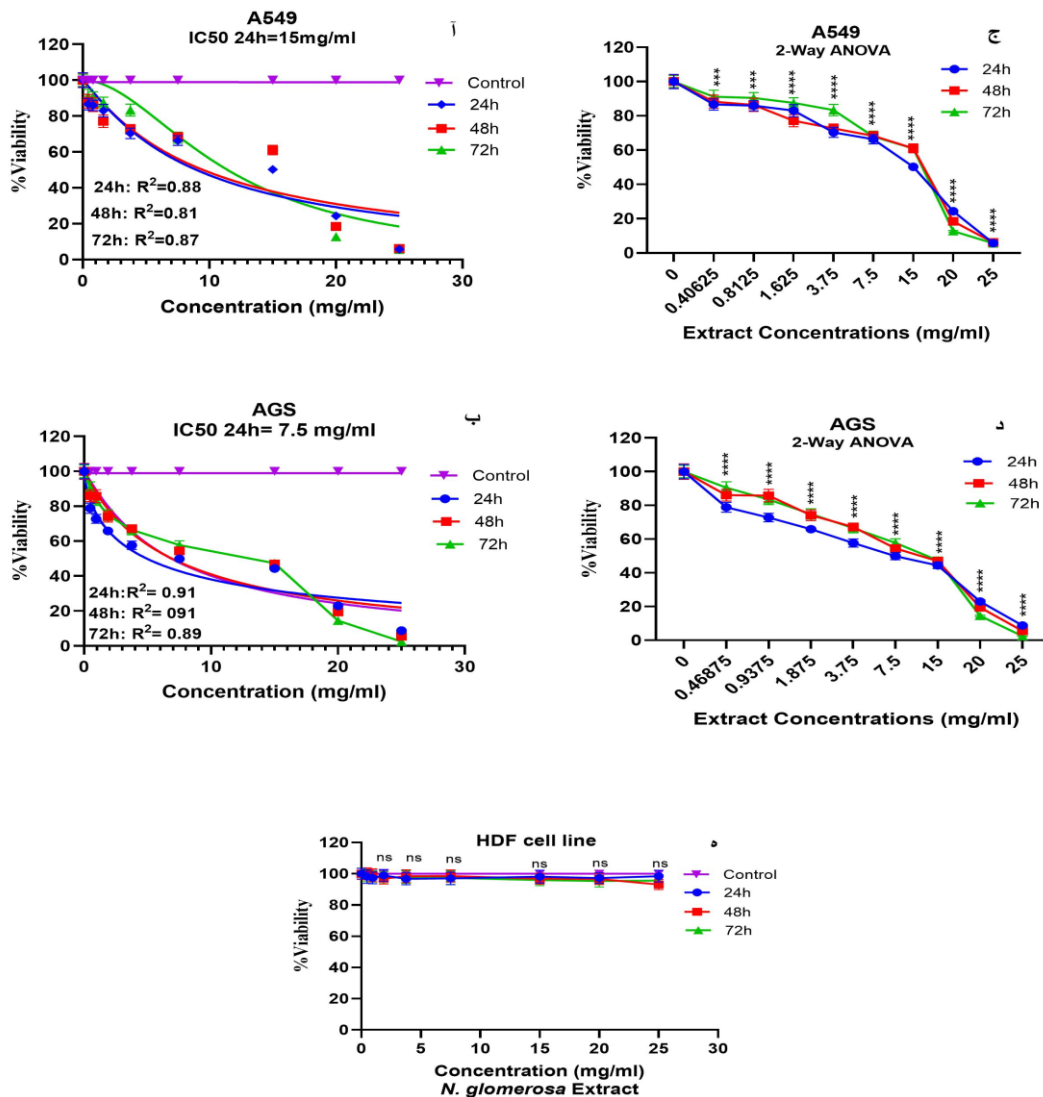
**تجزیه و تحلیل آماری:** پس از محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها و IC<sub>50</sub> به کمک نرم افزار Excel 2016 و GraphPad Prism 9.5.1 به منظور مقایسه میانگین زنده‌مانی بین ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت به کمک همان نرم افزارها از آزمون Two way ANOVA استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-time شامل CT نمونه‌ها به همراه Amplification آن‌ها، به وسیله نرم افزار REST مورد ارزیابی قرار گرفت. از داده‌های به دست آمده برای رسم نمودار و انجام آزمون‌های آماری T Test جهت مقایسه تغییرات بیان ژن بین دو رده سلولی و شاهد به طور مجزا به کمک نرم افزار GraphPad Prism 9.5.1 استفاده شد. مقایسه معنی داری اختلاف میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. تمام آزمون‌ها در سطح معناداری (p value < 0.05) به انجام رسید.

$$Fola\ change = \frac{(E_{target})^{Act\ target(control-sample)}}{(E_{ref})^{Act\ ref(control-sample)}}$$

## نتایج

سلول‌ها ضمن نرمال‌سازی داده‌ها درصد زنده‌مانی نمونه‌های کنترل (بدون تاثیر عصاره) صددرصد در نظر گرفته شد. بمنظور یکسان بودن حجم در همه چاهک‌ها در نمونه‌های کنترل به جای عصاره همان حجم محیط کشت اضافه شد.  $IC_{50}$  برای سلول‌های رده A549، ۱۵ mg/ml عصاره پس از ۲۴ ساعت تیماردهی بدست آمد (شکل ۱- الف).

نتایج خواص سیتوتوکسیک عصاره: خواص سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی نیتا گلومرولوزا در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه و رده سلولی AGS سرطان معده و رده نرمال HDF مورد بررسی قرار گرفت. به منظور محاسبه و مقایسه درصد زنده‌مانی



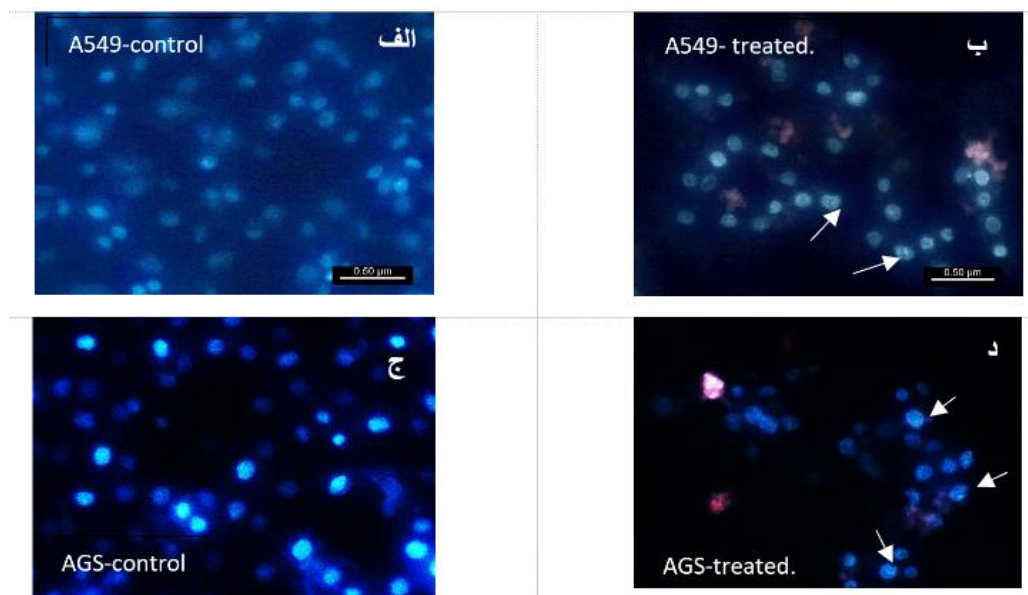
شکل ۱- نمودارهای درصد زنده‌مانی سلول‌ها: الف) نمودار  $IC_{50}$  در رده سلولی A549 ب) نمودار  $IC_{50}$  در رده سلولی AGS ج) و د) نمودارهای مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌های رده A549 (ج) و سلول‌های رده AGS (د) با تجزیه واریانس دو طرفه (اثر متقابل زمان در غلظت). درصد زنده‌مانی در همه غلظت‌ها در هر دو رده ۲۴ ساعت پس از تیماردهی نشان داده شده است) اختلاف معنی‌دار با شاهد داشتند ( $P=0.05$  تا  $P=0.0001$ ). ه) نمودار درصد زنده‌مانی رده سلولی نرمال HDF که  $IC_{50}$  ندارد و بین غلظت‌های مختلف عصاره تفاوت معنی‌داری بین درصد زنده‌مانی سلول‌ها وجود ندارد. ( $P=0.001$  =\*\*\* و  $P=0.0001$  =\*\*\*\* و ns=بی معنی).

(شکل ۱- ج و د). کاهش تعداد سلول‌های نرمال تحت تاثیر عصاره گیاه کم بود و به میزان  $IC_{50}$  نرسید (شکل ۱- ه).

**نتایج بررسی وضعیت آپتوز سلول‌ها با رنگ آمیزی DAPI:** به منظور بررسی میزان آپتوز القا شده با توجه به نتایج بدست آمده از تست MTT سلول‌ها در دو گروه شاهد و ۲۴ ساعت تیمار با غلظت ۱۵ mg/ml و ۷/۵ عصاره تام گیاه *نیپا گلومرولوزا* کشت شدند؛ سپس رنگ آمیزی DAPI انجام شد. تصاویر سلول‌ها در شکل ۲ برای هر گروه در بزرگنمایی  $50\ \mu\text{m}$  نشان داده شده است. به طور کلی هسته‌ها تحت تاثیر رنگ DAPI آبی رنگ شده است. در نمونه‌های شاهد یا کنترل هسته‌ها سالم و شکل آنها بطور یکنواخت است (شکل ۲- الف-ج). در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره تعداد سلول‌ها کمتر شده و هسته تعدادی از سلول‌ها تحت تیمار با عصاره‌ها غیر یکنواخت و نقطه نقطه است که نشان دهنده بروز آپتوز است (شکل ۲- ب و د).

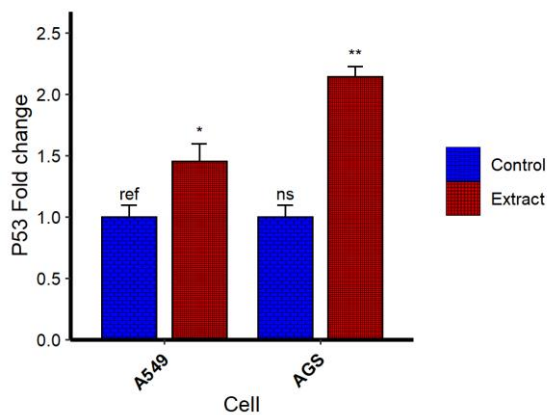
۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی در همین غلظت حدود ۶۱ درصد سلول‌ها زنده بودند که نشان دهنده آن است که قدرت سیتوتوکسیک ترکیبات عصاره این گیاه با گذر زمان کمتر شده است.  $IC_{50}$  برای سلول‌های رده AGS، ۷/۵ mg/ml عصاره پس از ۲۴ ساعت تیماردهی بدست آمد (شکل ۱- ب). اما پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی  $IC_{50}$  مقداری بین ۱۵ و ۷/۵ می‌باشد. اثر سمیت سلولی عصاره بر روی هر دو رده با افزایش غلظت افزایش یافت. با توجه به کمتر بودن مقدار  $IC_{50}$  در رده سرطان معده تاثیر سیتوتوکسیک عصاره بر سلول‌های سرطان معده بیش از سلول‌های سرطان ریه بوده است.

تجزیه و تحلیل آماری اثر زمان و غلظت بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌ها با تجزیه واریانس دوطرفه معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها را در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف در سطح کمتر از ۵ درصد نشان داد



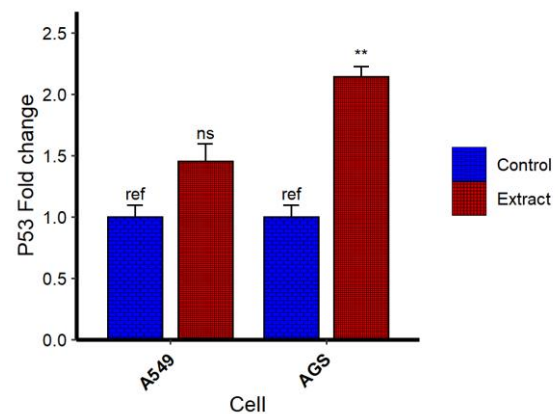
شکل ۲- تصاویر رنگ‌آمیزی سلول‌ها با DAPI: الف) سلول‌های رده A549 کنترل، ب) سلول‌های رده A549 تیمار شده با ۱۵ mg/ml عصاره نیپا گلومرولوزا ج) سلول‌های رده AGS کنترل، د) سلول‌های رده AGS تیمار شده با ۷/۵ mg/ml عصاره نیپا گلومرولوزا. فلش‌ها سلول‌هایی که غیر یکنواخت و نقطه نقطه هستند که نشان دهنده بروز آپتوز است را نشان می‌دهند.

در شکل ۴ گروه A549: کنترل، به عنوان مرجع محاسبه Fold change در نظر گرفته شده است و همه گروه‌ها با آن مقایسه شده است. در این حالت بیشترین میزان بیان *p53* در گروه AGS: با عصاره، مشاهده گردید که میانگین بیان آن در این گروه برابر با  $0.0841 \pm 2/1435$  می باشد. بیان ژن در گروه‌های A549 با عصاره و AGS با عصاره نسبت به گروه A549: کنترل بترتیب افزایش معنی‌داری در سطح  $0.05$  و  $0.01$  نشان دادند.



شکل ۴- مقایسه تغییرات بیان ژن بین دو رده سلولی. در این مقایسه گروه A549: کنترل، بعنوان مرجع محاسبه fold change در نظر گرفته شده است. در سلول‌های هر دو رده سلولی تحت تیمار با عصاره نیتا گلوومرولوزا بیان ژن *p53* افزایش معنی‌دار داشته است. ns: معنی‌دار نیست، \* در سطح ۵ درصد معنی‌دار است، \*\* در سطح ۱ درصد معنی‌دار است.

نتایج تغییر بیان ژن *p53*: در شکل ۳ تغییرات بیان ژن *p53* در گروه‌های A549 و AGS بصورت جداگانه آنالیز شده اند، اما نتایج در یک نمودار ارائه شده اند. در این نمودار گروه کنترل یا شاهد بعنوان مرجع محاسبه Fold change در نظر گرفته شده است. مقایسه با آزمون تی تست (جدول ۲)، نشان داد افزایش بیان این ژن در سلول‌های رده A549 سرطان ریه که تحت تیمار  $15 \text{ mg/ml}$  عصاره بودند نسبت به کنترل معنی‌دار نبوده است. در حالیکه این افزایش بیان به میزان  $2/1435$  برابر در سلول‌های رده AGS تحت تیمار  $7/5 \text{ mg/ml}$  عصاره نسبت به کنترل، در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است ( $P < 0.01$ ).



شکل ۳- مقایسه تغییرات بیان ژن *P53* بین سلول‌های رده A549 و نمونه شاهد و نیز بین سلول‌های رده AGS و نمونه کنترل یا شاهد به طور مجزا، اما نتایج در یک نمودار ارائه شده اند.

جدول ۲-مقایسه نمونه شاهد با تیمار شده با عصاره برای هر رده سلولی به طور مجزا با آزمون T

مقایسه	آزمون	خلاصه	P.value	Fold change	شرح
تیمار با شاهد در A549	T	ns	۰/۰۶۲۲۵	۱/۴۵۴	بیان ژن $1,454$ برابر شده
تیمار با شاهد در AGS	T	**	۰/۰۰۹۴۵	۲/۱۴۳۵	بیان ژن $2,1435$ برابر افزایش یافته

ns: معنی‌دار نیست، \* در سطح ۵ درصد معنی‌دار است، \*\* در سطح ۱ درصد معنی‌دار است.

## بحث

سرطان سینه نشان دادند ساپونین و تریپنوییدهای این عصاره-ها خواص سیتوتوکسیک دارند (۱۹).

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره کلروفورم نپتا دفلریانا نشان داد میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه MCF-7 و سلول‌های سرطانی ریه A549 کاهش یافت و مورفولوژی سلول‌ها دستخوش تغییرات قرار گرفت (۲۴). نتایج این تحقیق همسو با نتایج پژوهش حاضر است. اما در پژوهش دیگری که امامی و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند عصاره گیاه نپتا گلومرولوزای منطقه چهارمحال و بختیاری بین ۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برچندین رده سلولی سرطانی مانند کبد تخمدان پروستات سینه خواص سیتوتوکسیک نداشت (۹). در پژوهش حاضر نیز مقادیر کم عصاره مورد سنجش قرار گرفت که خواص سیتوتوکسیک نداشت لذا مقدار غلظت‌های بکار رفته شده در این تحقیق از میکروگرم بر میلی‌لیتر به میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. در پژوهشی مشابه غلظت‌های مختلف عصاره هیدروآتانولی پونه (*Mentha longifolia*) و درمنه (*Artemisia persica*) نیز مهار تکثیر قوی و وابسته به غلظت سلول‌های سرطانی AGS را نشان دادند و در انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده گردید (۲).

تصاویر بدست آمده از رنگ آمیزی DAPI کاهش تعداد سلول‌های زنده و القای آپوپتوز را در سلول‌های تحت تیمار با عصاره نشان داد هر چند انجام تست‌های تکمیلی و دقیق‌تر مانند فلوسایتومتری جهت اطمینان از میزان آپوپتوز توصیه می‌گردد.  $IC_{50}$  عصاره اتیل استات و عصاره اتانولی گل‌های *Nepeta paulsenii* Briq بر روی رده سلولی ریه A549 مقادیر ۵۱/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و نتایج رنگ‌آمیزی Hoechst 33342 نشان دهنده آپوپتوز یعنی شکستگی در کروماتین و تکه تکه شدن هسته بود (۱۵).

براساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر میزان بیان ژن *p53* در سلول‌های هر دو رده تحت تیمار عصاره تام گیاه

با توجه به شیوع سرطان ریه و معده و نیز سختی درمان آنها محققین در پی یافتن ترکیبات دارویی جدید هستند تا راهی برای درمان این سرطان‌ها بیابند. اخیراً گیاهان دارویی و فرآورده‌های مشتق شده از آنها به عنوان یک منبع ارزشمند فارماکولوژیکی و عوامل درمانی با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف در نظر گرفته می‌شوند (۲۸). در پژوهش حاضر به بررسی میزان سمیت سلولی عصاره هیدروآکللی نپتا گلومرولوزا بر رده A549 سرطان ریه و رده AGS سرطان معده و تاثیر آن بر بیان ژن *p53* پرداخته شد.

نتایج نشان داد خواص سیتوتوکسیک عصاره گیاه نپتا گلومرولوزا بر روی سلول‌های رده AGS سرطان معده بطور معنی داری بیشتر از سلول‌های رده A549 سرطان ریه است زیرا  $IC_{50}$  در رده AGS ۷/۵ mg/ml بود و در رده A549 ۱۵ mg/ml بود و عصاره این گیاه در غلظت‌های کمتری توانسته موجب مرگ ۵۰٪ سلول‌های سرطان معده شود. از آنجائیکه گیاه نپتا گلومرولوزا به سبب عطر و طعم خود بعنوان طعم دهنده در صنایع غذایی و بهداشتی استفاده می‌گردد، می‌توان امید داشت استفاده از عصاره این گیاه در برخی مواد غذایی بتواند نقش مهار تکثیر سلول‌های سرطان معده را نیز ایفا کند بویژه که تاثیر خاصی بر سلول‌های نرمال نداشت. حتی نقش پیشگیری از سرطان ترکیبات تشکیل دهنده عصاره این گیاه می‌تواند مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد. تنوع زیاد و محتوای غنی از تریپنویید، فلاونوئید و ترکیبات فنلی گونه‌های نپتا اثرات فارماکولوژیکی دارند که استفاده سنتی آنها برای اهداف دارویی را توجیح می‌کند (۱۲). مواد تشکیل‌دهنده عصاره نپتا گلومرولوزا آلکالوئید، ساپونین و روغن گزارش شده است (۱۱) که می‌تواند خواص سیتوتوکسیکی عصاره این گیاه را به این ترکیبات نسبت داد. کانگول و همکاران در سال ۲۰۲۲ با بررسی خواص سیتوتوکسیک چندین گونه از نپتا بر رده‌های سلولی

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعات حاضر نشان داد عصاره گیاه نپتا گلومرولوزا یا همان پونه‌سای انبوه موجب کاهش تکثیر سلولی هر دو رده سرطانی ریه و معده شد. در حالیکه تأثیری بر سلول‌های نرمال نداشت. در رده سلولی AGS سرطان معده در غلظت ۷/۵ mg/ml نقش مهارکنندگی تکثیر داشت که نشان دهنده تأثیر مهارکنندگی رشد بیشتر این عصاره بر روی این رده است. لذا با توجه به طعم و بوی این گیاه و کاربرد آن بعنوان طعم دهنده می‌توان از خواص درمانی آن نیز بهره برد. البته بررسی غلظت‌های دیگر آن و نیز بررسی روش‌های بهبود کارایی و کاهش غلظت مورد نیاز از عصاره مانند استفاده از آن در ساخت نانو ذرات برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌گردد. همچنین در پژوهش حاضر مشخص گردید که این عصاره با کاهش بیان ژن *p53* در هر دو رده سلولی موجب سمیت سلولی گردید.

## تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم که از کلیه عزیزانی که ما را در انجام آزمایش‌ها در دانشگاه آزاد واحد یادگار امام (ره) شهرری و نیز آزمایشگاه ژینوزن یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

نپتا گلومرولوزا افزایش یافته است و این افزایش میزان بیان ژن در سلول‌های رده AGS سرطان معده تحت تأثیر عصاره به طور معنی‌داری هم بیشتر از نمونه‌های شاهد و هم بیشتر از سلول‌های رده A549 سرطان ریه بوده است. به این ترتیب بنظر می‌رسد عصاره گیاه نپتا گلومرولوزا از طریق تأثیر بر بیان ژن *p53* موجب القای آپوپتوز شده است. ژن *p53* فاکتور رونویسی 53KD را کد می‌کند که به طور طبیعی در غلظت‌های پایین در سلول‌ها وجود دارد و در شرایط استرس سلولی مانند هیپوکسی، آسیب DNA و کاهش ریپونوکلئوتید غلظت پروتئین P53 به سرعت بالا می‌رود و فعالیت P53 افزایش یافته و اتصال اختصاصی آن به DNA افزایش می‌یابد فعال شدن *p53* روی بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در توقف چرخه سلولی و آپوپتوز تأثیر می‌گذارد (۳۰). مطالعه فان و همکاران (۲۰۱۷) بر روی اثر فلاونوئید کل *Nepeta cataria* L بر رده سلولی A549 سرطان ریه نشان داد، فلاونوئید کل این گونه می‌تواند بیان ژن miR-126 را مختل کند و مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT را برای پاسخگویی به اثر ضد سرطانی تنظیم کند (۱۰). در تحقیقی که امیرزاده و همکاران (۲۰۲۲) بر روی اثر ضد سرطانی اسانس *Nepeta mahanesis* انجام دادند، مشخص شد که این ترکیب باعث افزایش نسبت بیان Bax / Bcl2 در سلول‌های MCF-7 و القای آپوپتوز (۲۷ درصد) و نکروز (۱۸ درصد) در سلول‌ها شد (۶).

## منابع

- ۱- جوانمرد، ا. ۱۴۰۰. نقش مواد فیتوشیمیایی در درمان سرطان از طریق راه‌اندازی مسیر آپوپتوزیس. اولین همایش ملی گیاهان دارویی، کارآفرینی و تجاری سازی، دانشگاه جیرفت.
- ۲- سفالیان، ا، زارع ن، لطیفی ن، حسن پور، س، ریحانی، ک، مطلبی نیا، س. ۱۳۹۹. بررسی اثر ضد سرطانی عصاره اتانلی دو گیاه پونه (*Mentha longifolia*) و درمنه (*Artemisia persica*) بر علیه سلول‌های سرطانی معده انسان (AGS). مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ۹: ۱-۱۰.
- ۳- ولی‌اله، ص. ۱۳۹۴. تخمین بروز استاندارد شده سنی سرطان ریه در ایران برای سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۳۰، مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی ۱۰: ۱.
- ۴- مداح، س. م، مراقبی، ف، سرحدی، س، ۱۴۰۱. مقایسه خواص سیتوتوکسیک اسانس و عصاره *Juniperus excelsa* در دو منطقه البرز بر رده‌ی سلولی سرطان ریه A549. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۴: ۳۵.

- ۵- نجف پور نوایی، م. ۱۳۷۹. بررسی اکولوژیک گیاهان اسانس‌دار روی سه جنس *Thymus*, *Mentha*, *Nepeta* در استان تهران. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۵، ۱ - ۲۵.
- 6- Amirzadeh, M., Soltanian S., & Mohamadi N. **2022**. Chemical composition, anticancer and antibacterial activity of *Nepeta mahanensis* essential oil. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22,173.
- 7- Azimi, Y., Maddah, S. M., & Mostafavi, G. **2021**. 'The comparative study of the antioxidant activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of an Iranian endemic species *Rhabdosciadium aucheri* Boiss.' *Iranian Journal of Plant Physiology*, 11 (3), 3701- 3708.
- 8- Elmore S. **2007**. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.
- 9- Emami, S. A., Khashami S., Ramazani E., Akaberi M., Iranshahy M., Kazemi S.M., Tayarani-Najaran Z. **2018**. Cytotoxic Activity of Thirteen Endemic and Rare Plants from Chaharmahal and Bakhtiari Province in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(4),1912-1920.
- 10- Fan, J., Bao, Y., Meng, X., Wang, S.H., Li, T., Chang, X., Yang, G., & Bo, T. **2017**. Mechanism of modulation through PI3K-AKT pathway about *Nepeta cataria* L.'s extract in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(19), 31395-31405.
- 11- Fazly Bazzaz B.S., Haririzadeh, G., Imami, S.A., & Rashed, M.H. **1997**. Survey of Iranian plants for alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins (Khorasan province). *International Journal of Pharmacy*, 35, 17-30.
- 12- Formisano, C., Rigano, D., Arnold, N. A., Piozzi, F., & Senatore, F. **2013**. GC and GC-MS analysis of the essential oil of *Nepeta cilicica* Boiss. ex Benth. from Lebanon. *Natural Product Research*, 27(21), 1975-1981.
- 13- Ganjouzadeh, F., Khorrami, S., & Gharbi, S. **2022**. Controlled cytotoxicity of Ag-GO nanocomposite biosynthesized using black peel pomegranate extract against MCF-7 cell line. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, 71, 103340.
- 14- Ghasemi Gerami, K. **2009**. Investigation of biological anti-cancer and antibacterial properties of some nanometer materials and halloo complexes of intermediate elements. Ph.D. thesis, Department of Biology, Faculty of Science, Mohaghegh Ardabili University, Ministry Science Research and Technology, Ardabil.
- 15- Hanif, A., Ibrahim, H., Sidra I., Sawsan S., Al-Rawi, J., Nazeer, A., Mansoor H., Ghulam, M., & Samina, T. **2023**. Cytotoxicity against A549 Human Lung Cancer Cell Line via the Mitochondrial Membrane Potential and Nuclear Condensation Effects of *Nepeta paulsenii* Briq., a Perennial Herb Aqsa. *Molecules*, 28 (6), 2812.
- 16- Hosseinzade, H., & Ziaee T. **2006**. Effect of *Nepeta glomerulosa* Boiss. Aerial Parts Aqueous Extract on Morphine Withdrawal Syndrome in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 41-46.
- 17- Ison, D.H., Bains, M., Kelsen, D.P., O'Reilly, E., Karpeh, M., Coit, D., Rusch, V., Gonen, M., Wilson, K., & Minsky, B.D. **2003**. Aug, Phase I trial of escalating-dose irinotecan given weekly with cisplatin and concurrent radiotherapy in locally advanced esophageal cancer. *Journal of clinical oncology* 21(15), 2926-32.
- 18- Joshaghani, H.R., Koochaki, E., Amini, R., Derakhshandeh, P., Ehsani, A., Shabani, M., & Kadivar, M. **2003**. Determination of P53 gene mutations in gastric cancer by PCR-SSCP. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 5(2), 36-42.
- 19- Kongul S.E., Seker K.G., Dirmenci, T., Duman, H., & Kucukboyaci, N. **2022**. Cytotoxic Effects of Some *Nepeta* Species against Breast Cancer Cell Lines and Their Associated Phytochemical Properties. *Plants (Basel)*, 11(11), 1427.
- 20- Leiter, A., Veluswary, R., & Wisnivesky, J. **2023**. The global burden of lung cancer: status and future trends, *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- 21- Liu, X., Lin, X.J., Wang, C.P., Yan, K.K., Zhao, L.Y., & Lin, X.D. **2014**. Association between Smoking and p53 Mutation in Lung Cancer: A Meta-analysis. *Clinical Oncology*, 26(1),18-24.
- 22- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. **2007**. *Molecular Cell Biology* (Lodish. *Molecular Cell Biology*, sixth ed. WH Freeman.
- 23- Lu, X.X., Ji, X.X., Bao, J., Li, Q.Q., Ji, D.D., & Luo, L. **2016**. Inhibition of proliferation, migration, and invasion of human non-small cell lung cancer cell line A549 by phlomisioside F from *Phlomis younghusbandii* Mukerjee.

- Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 1413-21.
- 24- Mai, M., Al-Oqail, E., Al-Sheddi, S., Siddiqui, M.A., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., & Farshori, N.N. **2015**. Anticancer Activity of Chloroform Extract and Sub-fractions of *Nepeta deflersiana* on Human Breast and Lung Cancer Cells: An In vitro Cytotoxicity Assessment Pharmacognosy Magazine Published by Wolters Kluwer – Medknow.
- 25- Maddah, S.M., Mostafavi, G., Amin Malek, M., Anbarestani, M., Sharif, Y., & Mir Hassani, Z. **2021**. Combined application of cisplatin and salicylic acid suppresses cell growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell lines. *Biologia*, 77, 215–223.
- 26- Murphy, N.R., & Hellwig, R.J. **1996**. Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier material. *Biotechniques* 21 (5), 934-6, 938-9.
- 27- Naderi, M., & Cherati, M.R., Mohammadian, A., Bidhendy, M.B., Ghiasvand, S., Marzouni, H.Z., Aryan, H., Jangholi, E., & Javidi, M.A. **2020**. Hypericin induces apoptosis in the AGS cell line with no significant effect on normal cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 19(3), 349-357.
- 28- Parham, S., Kharazi, A.Z., Bakhsheshi-Rad, H.R., Nur, H., Ismail, A.F., Sharif, S., et al. **2020**. Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants*, 9 (12),1309.
- 29- Safarian, Sh., Erfani, A. **2022**. Study of autophagy and cell death induction in MCF-7 cells in the presence of quercetin. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 35(3), 465-477.
- 30- Sak, K., Lust H., Kase M., & Jall, J. **2018**. Cytotoxic action of methylquercetins in human lung adenocarcinoma cells. *Oncology Letters*, 15(2), 1973- 1978.
- 31- Shiao, Y.H., Rugge, M.A., Correa, P.E., Lehmann, H.P., & Scheer, W.D. **1994**. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *The American journal of pathology*, 144(3), 511.
- 32- Poulsen, T., Pedersen, N.S., & Poulsen, H. **2005**. Replacement and Suicide Gene Therapy for Targeted Treatment of Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 6(4), 227-36.
- 33- Vähäkangas, K. **2011**. Molecular Epidemiology of Human Cancer Risk Gene–Environment Interactions and p53 Mutation Spectrum in Human Lung Cancer. *Methods of Molecular Medicine*, 74, 43-59.
- 34- Venkat, S.G., Swati, P.D., Sumitra, D., & Raj, R.R. **2014**. Lung Cancer Stem Cells, p53 Mutations and MDM2. *Subcellular Biochemistry*, 85, 359-70.
- 35- Zhang, W., Na, C., Jin, Y., Bingyou, Y., Yanping, S., & Haixue, K. **2022**. Curcumin's prevention of inflammation-driven early gastric cancer and its molecular mechanism, *Chinese Herbal Medicines*, 14, 244–253.

## Evaluation of *p53* gene expression changes on Lung (A549) and gastric (AGS) cancer cell lines under the impression of hydroalcoholic extract of *Nepeta glomerulosa* species.

Sahebi S., Maddah S.M.\* and Mostafavi G.

Dept. of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Lung and Gastric cancer are one of the most common types of cancer in the world and in Iran. For finding therapeutic ways, researchers have been focused on changes in carcinoma cells at molecular level. Some natural phytochemical compounds affect apoptosis path and play an important role in producing and regulating processes involved in cancer. In the present research, the toxic effect of hydro-alcoholic extract of *Nepeta glomerulosa* on A549 and AGS cell lines, and *p53* expression changes have been evaluated. The plant shoots were collected from Binalud region from Khorasan Province and 80% ethanolic extract was prepared by maceration technique. The cytotoxic properties of extract on two cell lines in three times, i.e., 24, 48, and 72 hours were assessed by MTT assay. Apoptosis induction amount was evaluated by DAPI staining. *p53* gene expression alterations were determined using Real-time PCR. According to the results, the IC<sub>50</sub> was 15 and 7.5 mg/mL, for A549 and AGS respectively (P<0.05). The results of DAPI staining showed that under the influence of the extract at IC<sub>50</sub> concentrations, apoptosis was induced in both strains compared to the control. The increasing effect of *p53* gene expression on AGS was more than that of reported for A549 cell line (P<0.05) that demonstrates the more antiproliferative effects of this species on gastric cancer cells through increasing *p53* gene expression and apoptosis induction.

**Key words:** apoptosis, *p53* gene, cellular toxicity, *Nepeta glomerulosa*.