Journal of Animal Biology, Summer 2025; 17(4):129-142

ISSN:1735-9724

Research Article

Induction of Apoptosis in Ovarian Cancer Cell Lines By *Galium verum* Extract

Fatemeh Keshvari[1], Somayeh Arabzadeh[1], Masoomeh Hasanbarani[1], Fatemeh Akbarian[1], Shadi Hajrasouliha[2*]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran
2- Herbal Pharmacology Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Sh.Hajrasouliha@iautmu.ac.ir

Received: 5 January 2025 Accepted: 20 April 2025

DOI:

Abstract

Ovarian cancer has the highest mortality rate among cancers due to its asymptomatic course, late diagnosis, and recurrence. The first treatment approach for ovarian cancer is chemotherapy. However, due to many side effects, the response is transient and accompanied by relapse. Therefore, developing new treatment approaches for this disease is very important. Previous studies showed that milk cheese plant extract has anti-cancer properties and reduces cell proliferation. This study investigated the effect of Galium Verum leaf extract on proliferation behavior and induction of apoptosis in A2780 cancer cells in laboratory conditions. Cells were grown and multiplied in laboratory conditions. Then they were treated with concentrations (6.2-12.5-25-50-100 mM) of milk cheese plant extract for 24, 48, and 72 hours. The percentage of cell viability was evaluated by the MTT method. Changes in the expression levels of SORT1 and BIM genes in treatment and control conditions were evaluated by quantitative Real-Time PCR technique. Our results showed that the concentration of 25mM of the extract caused a 50% decrease in the survival of the ovarian cancer cell line A2780 cells. At the same time, it did not significantly change the survival percentage of the fibroblast cells. Also, treatment with plant extract caused a twofold increase in the expression of the BIM apoptosis gene in cancer cells compared to control cells. The expression of the SORT1 gene in cancer cells treated with plant extract increased by 4 times compared to the control state. Therefore, from the observed results, we can understand the possible role of milk cheese plant extract in controlling the growth of ovarian cancer cells and inducing apoptosis in them.

Keywords: Ovarian cancer, Apoptoiss, *Galium verum*, BIM, SORT1.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره چهارم، تابستان ۱٤۰٤، صفحات ۱٤۲-۱۲۹

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲٤

مقاله پژوهشی

القای آپپتوز در دودمان سلولی سرطان تخمدان توسط عصاره گیاه شیرپنیر (*Galium verum*)

فاطمه کشوری[۱]، سمیه عرب‌زاده[۱]، معصومه حسن بارانی[۱]، فاطمه اکبریان[۱]، شادی حاج‌رسولیها[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل طه، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Sh.Hajrasouliha@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۰/۱٦ تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۱/۳۱

DOI:

چکیده

سرطان تخمدان به دلیل سیر بدون علامت، تشخیص دیرهنگام و عود، بالاترین میزان مرگ و میر را در بین سرطان‌ها دارد. اولین رویکرد درمانی برای سرطان تخمدان، شیمی‌درمانی می‌باشد. اما به علت عوارض جانبی زیاد، پاسخ به آن گذرا و برگشت‌پذیر می‌باشد. بنابراین توسعه‌ی رویکردهای درمانی جدید برای این بیماری بسیار اهمیت دارد. مطالعات قبلی نشان دادند که عصاره گیاه شیرپنیر خواص ضدسرطانی و کاهش‌دهنده تکثیر سلول‌ها را دارد. در این مطالعه تأثیر عصاره برگ گیاه شیر پنیر *Galium verum* بر رفتار تکثیری و القای آپپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 بررسی شد. سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی رشد و تکثیر داده شدند. سپس با غلظت‌های ٦/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از عصاره گیاه شیرپنیر به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها توسط روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات میزان بیان ژن‌های SORT1 و BIM در شرایط تیمار و کنترل توسط تکنیک کمی Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد، غلظت mM۲۵ از عصاره موجب کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی سرطان تخمدان A2780 شد، درحالیکه بر درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست تغییر معناداری ایجاد نکرد. همچنین عصاره گیاه شیرپنیر موجب افزایش دوبرابری بیان ژن آپپتوزی BIM در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های کنترل شد. بیان ژن SORT1 در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره گیاهی به میزان چهار برابر نسبت به حالت کنترل افزایش یافت. بنابراین از نتایج مشاهده شده می‌توان به نقش احتمالی عصاره گیاه شیرپنیر در کنترل رشد سلول‌های سرطان تخمدان و القای آپپتوز در آنها پی برد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، گیاه شیرپنیر، آپپتوز، *Galium verum*، BIM، SORT1.

مقدمه

سرطان تخمدان در میان زنان ایرانی هشتمین سرطان شایع است؛ میزان بقای پنج ساله بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در ایران ۳/٦ درصد می‌باشد (۱). خطر بروز سرطان تخمدان در زندگی خانم‌ها حدود ۵/۱ درصد و خطر مرگ به دلیل سرطان تخمدان تقریباً یک درصد گزارش شده است (۲). سرطان تخمدان به دلیل نداشتن علائم خاص و تشخیص دیرهنگام، ازجمله کشنده‌ترین نوع سرطان‌های زنان محسوب می‌شود و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی که بیماری به مراحل پیشرفته رسیده است، تشخیص داده شده و عمدتاً غیرقابل درمان می‌باشد. بنابراین، شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری و نشانه‌های اولیه سرطان تخمدان برای تشخیص

به‌موقع و مدیریت درمان این بیماری ضروری است (۳). تخمدان دارای سه بخش قشر بیرونی، مدولای مرکزی و شبکه‌ی تخمدانی است. بیرونی‌ترین بخش قشری، تونیکا آلبوژینا نام دارد که با یک لایه اپی‌تلیوم مکعبی پوشیده می‌شود. این لایه، اپی‌تلیوم سطحی تخمدان یا مزوتلیوم تخمدان نامیده می‌شود. تقریباً ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان را سرطان اپی‌تلیال تخمدان تشکیل می‌دهند که هتروژن بوده و رده‌بندی آنها براساس نوع سلول درگیر شامل نوع سروزی، موسینوسی و اندومتریال می‌باشد (۲). هر یک از این تومورها به نوبه‌ی خود به سه گروه خوش‌خیم، بینابینی و بدخیم تقسیم می‌شوند. تومورهای موسینوس و اندومتریال معمولاً کارسینومای بدخیم و مهاجم هستند. اما تومورهای سروزی معمولاً مهاجم نیستند (٤). مصرف قرص‌های پیشگیری از بارداری، بستن لوله‌ها، داشتن سابقه خانوادگی در سرطان تخمدان و سینه، عوامل هورمونی، داشتن سابقه آندومتریوز احتمال ابتلا به سرطان تخمدان را افزایش می‌دهند (۵). آزمایش‌های بالینی نشان می‌دهند که شیمی‌درمانی نقش مهمی در درمان سرطان تخمدان داشته و علاوه بر مهار رشد سلول‌ها قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی هم می‌باشند. محققان دریافتند که استفاده مداوم از داروهای شیمی‌درمانی دارای معایب خاصی ازجمله سمیت و مقاومت دارویی است. متأسفانه این معایب مهم‌ترین عواملی هستند که باعث عدم موفقیت شیمی‌درمانی و عود مجدد تومور می‌شود (۵). بنابراین، یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان تخمدان که دارای سمیت کمتر و ایمنی و اثرگذاری بیشتر باشند از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. از این‌رو، به‌کارگیری ترکیبات مؤثر فرآورده‌های گیاهی همچون گیاهان دارویی برای نیل به اهداف فوق، امروزه به‌عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان مطرح‌گردیده تا اثرات جانبی درمان، هزینه کمتری بدنبال داشته باشد. در دو دهه اخیر توجه محققان به داروهای گیاهی به عنوان عوامل ضدتوموری و ضدسرطانی بیشتر شده است. امروزه داروهای‌گیاهی به عنوان یک شیوه درمانی مکمل یا جایگزین برای معالجه سرطان کاربرد دارند. هدف از تجویز این نوع داروها حفظ سلامت بدن و تنظیم عملکرد دستگاه‌ها می‌باشد (٦). *Galium verum* یک گونه علفی چندساله از خانواده روبیاسه است که بیشتر در اروپا و آسیا، نواحی معتدل و شمال آفریقا پراکنده شده است. ارتفاع گیاه بین ۳۰ تا ۱۸۰۰ متر از سطح دریا در زیستگاه‌های مختلف از جمله علف‌زارهای شنی خشک، فضای خالی سنگ‌ها، کنار جاده‌ها، تپه‌های شنی و سواحل دریا رشد می‌کند. گیاه شیرپنیر درهم تنیده یا درهم پیچیده می باشد (روی یک ساقه، چند ساقه با هم تنیده)، و ساقه‌هایی به ارتفاع ٦۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر دارد که در تماس با خاک اغلب ریشه ایجاد می‌کنند. برگ‌های خطی سوزنی شکل، به رنگ سبز تیره براق، با حاشیه‌های برجسته و چرخشی، در حلقه‌های هشت تا دوازده‌تایی درون خوشه‌های متراکم تجمع یافته‌اند. از خرداد تا شهریور شکوفا می‌شود و گل‌های زرد معطر تولید می‌کند (۷). با توجه به درمان‌های جایگزین سرطان در صنعت گیاه پزشکی رویکرد خوبی برای مطالعه در این زمینه وجود دارد، قسمت‌های هوایی بریده و خشک شده گیاه شیرپنیر برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۸). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یکی از راه‌کارهای اصلی است که بدن، سلول‌های ناخواسته را حذف می‌کند. سیستم ایمنی بدن برای از بین بردن سلول‌های سرطانی از آپوپتوز استفاده می‌کند. مسیر پیام رسانی آپپتوز شامل مولکول های مختلفی است از جمله فاکتور Bim که یک ژن میتوکندریایی با ماهیت نوکلئوتیدی است و جزء خانواده BCL-2 از مهم‌ترین ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشد (۹). BCL-2 یک پروتئین غشایی است که در غشای خارجی میتوکندری

قرار داشته و دارای نوزده عضو است. این خانواده چهار موتیف (BH4-BH3-BH2-BH1) حفاظت شده دارد که با توجه به فعالیت و ساختار به سه دسته تقسیم شده‌اند: پروتئین‌های آپوپتوزی (Bik، Bad،Bim)، پروتئین‌های ضدآپوپتوزی (Bcl، XL-Bcl) و پروتئین‌های پروآپوپتوزی (BCL-2-like protein 11). پروتئین BCL-2 در گروه پروتئین‌های ضد آپوپتوزی قرار دارد که اغلب در سلول‌های بدخیم بیان می‌شود (۱۰). فاکتور BIM پروتئینی است که در انسان توسط ژن BCL2L11 تولید می‌شود و به عنوان یک فاکتور آپوپتوزی عمل می‌کند. این پروتئین یکی از مناطق هومولوگ اعضای خانواده BCL-2 را به نام BH3 دارد. این دومین آغازگر ضروری مرگ سلولی یا آپوپتوز است (۱۱). ژن SORT1 (به عنوان گیرنده NTR3 نیز شناخته می‌شود)، رمزگذار Sortilin3/NTR است که در انسان، دارای ۲۲ اگزون است و روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ قرار دارد. لیگاندهای متفاوتی از جمله فاکتور رشد عصب (proNGF)، لیپوپروتئین لیپاز (LPL)، پرتئین مرتبط با گیرنده (RAP)، نوروتنسین ۳ (NT3) و تیروگلوبولین به این گیرنده متصل می‌شوند. بسته به نوع لیگاند، SORT1 عملکردهای متفاوتی نشان می‌دهد (۱۲، ۱۳). بیان ژن SORT1 اغلب در تیروئید، قلب، مغز، ماهیچه‌های اسکلتی، نخاع، جفت و بیضه‌ها مشاهده می‌شود، در حالی‌که در بافت تخمدان یافت نمی‌شود (۱۲). افزایش بیان چهار برابری در کارسینمای تخمدان برخلاف تخمدان سالم گزارش شده است (۱٤). مسیر سانی ژن Sortilin3 نقش مشخصی در مسیر آپوپتوز ناشی از نوروتروفین در شرایط پاتولوژیک، همچنین در مراحل خاص تکوین و پیری عصبی دارد. ژن Sort1 یکی از انکوژن‌های کاندید در کارسینمای سلول کبدی گزارش شده است، به‌طوری‌که کاهش بیان آن منجر به کاهش سرعت پیشرفت سرطان می‌گردد (۱۵). هدف از این مطالعه تأثیر عصاره برگ گیاه شیر پنیر *Galium verum* بر رفتار تکثیری و القای آپپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان رده‌A2780 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: گیاه شیر پنیر (*Galium verum*) از روستای قودجان (شهرستان خوانسار) جمع‌آوری گردید. سپس در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آل طه مورد شناسایی قرار گرفت و با کد هرباریومی ۰۰۱ ثبت گردید.

تهیه عصاره گیاهی: نمونه مورد نظر پس از خشک شدن توسط آسیاب خرد گردید. سپس عصاره گیری به روش ماسراسیون (خیساندن) انجام شد. برای تهیه عصاره الکلی ۱۰ گرم از پودر خشک شده گیاه را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد حل کرده، به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر مگنتی آلفا (HB850) ساخت ایران قرار گرفت، سپس توسط کاغذ صافی واتمن صاف شد.

تیمار سلول‌ها توسط عصاره گیاهی: رده سلولی (A2780) سرطان تخمدان از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. پس از دفریز کردن سلول‌ها درون فلاسک کشت داده شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد، آنتی‌بیوتیک ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. ٤۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها و رسیدن به تراکم ۷۰ درصد، تیمار سلول‌ها با غلظت های مختلف عصاره گیاهی (٦/۲ – ۱۲/۵ –۲۵ – ۱۰۰–۵۰ میکرومولار) انجام شد. پس از گذشت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT بررسی شد تا بهینه غلظت جهت تیمارهای بعدی بدست آید.

اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT: به منظور بررسی اثرسمیت عصاره گیاه شیر پنیر بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی و تعیین

IC50 از تکنیک MTT استفاده شد. در این روش، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت غلظت-های مختلف عصاره (۶/۲ – ۱۲/۵ –۲۵ – ۵۰–۱۰۰ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد. سپس، نمونه‌ها در دوره‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری شد و میزان IC50 پس از رسم منحنی با به کارگیری غلظت-های مختلف عصاره و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

%Cytotoxicity=1-[(OD extract treated-OD blank)/(OD control-OD blank)]x100

روش Real-Time PCR: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، توسط نرم‌افزار Gene-Runner پرایمرهای اختصاصی هر ژن طراحی و سپس از شرکت سینا کلون خریداری گشت. در جدول زیر توالی پرایمرها ارائه شده است (جدول ۱). RNA کل، از سلول‌ها توسط محلول RNX-plus (;SinaClon RN7713C) استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس (A101161) استخراج و براساس پروتکل شرکت انجام شد. در نهایت با استفاده از کیت و دستگاه PCR (Lab cycler) Sens&uest به تعداد ۳۵ سیکل بیان کمی ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از ژن β-actin به عنوان ژن رفرنس استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد. از آزمون Sample-KS جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد. همچنین برای بررسی معنی داری متغیرها بین گروه‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت مشاهده تفاوت از تست‌های تعقیبی توکی در آزمون ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 23 انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های BCL2، SORT1 و B-actin

Gene	Forward primer	Reverse primer
BCL2	5’-CTCCCTGCTGTCTCGATCCT-3’	5’-TCTCCAATACGCCGCAACTC5-3’
SORT1	5’-TGAGAACTCTGGAAAGGTGGTG-3’	5’-TGAGTGAGAGGATGAAAAGGGAG-3’
β -ACTIN	5’-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3’	5’-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3’

نتایج

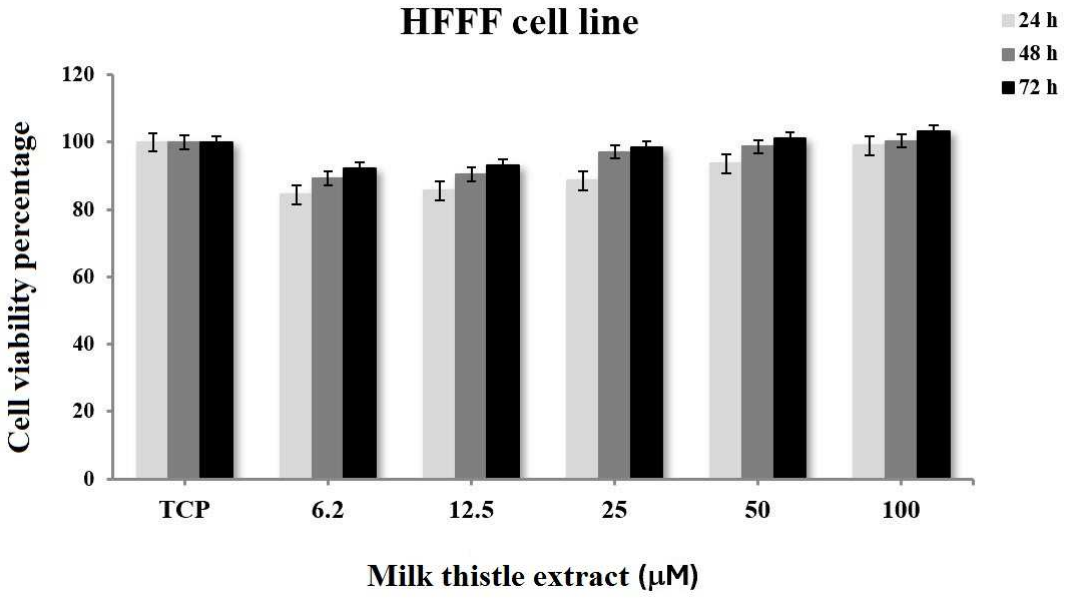
اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های نرمال فیبروبلاست انسانی: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌های نرمال HFFF با غلظت‌های مختلف عصاره، تفاوت معنی داری در میانگین درصد سلول‌های مرده بین زمان‌های مختلف تیمار با عصاره گیاهی مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی داری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها بین غلظت های مختلف تیمار با عصاره گیاهی (۶/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) نیز مشاهده نشد (شکل ۱).

اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های سرطان تخمدان انسانی: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان تخمدانی در شرایط تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p <$ ۰،۰۰). همچنین تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار عصاره گیاهی نسبت به غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲ میکرومولار نیز تفاوت معناداری را در درصد زنده‌مانی سلول‌ها نشان داد ($p <$ ۰/۰۰۱). درصد زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط تیمار

با غلظت ۲۵ میکرومولار عصاره گیاهی بین گروه ۲٤ ساعت و دو گروه دیگر (٤۸ و ۷۲ ساعت) نیز متفاوت بود. این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود (p ۰/۰۵ >). درحالی‌که بین دو گروه ٤۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معناداری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد. سایر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیز نتایجی مانند غلظت ۲۵ میکرومولار نشان دادند (شکل ۲). بنابراین کمترین غلظت موثر عصاره گیاهی (۲۵ میکرومولار) که ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین می‌برد برای ادامه پژوهش انتخاب شد.

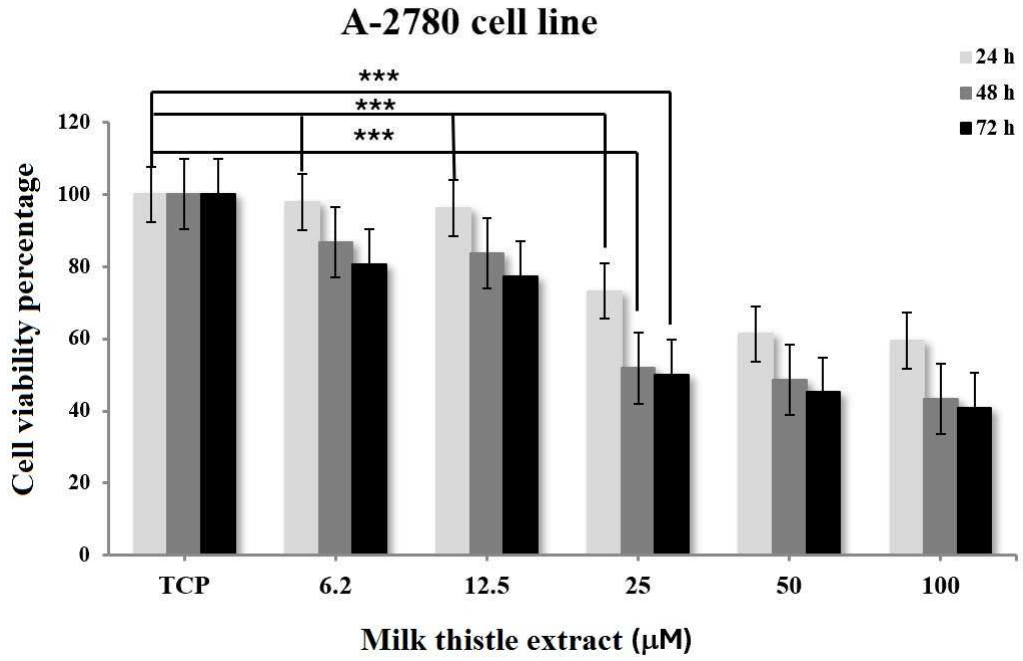
اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *BIM* تیمار سلول‌های نرمال HFFF با عصاره گیاه شیرپنیر تغییر معناداری در میزان بیان ژن BIM ایجاد نکرد. در حالی که در دودمان سلولی سرطان تخمدان انسانی A2780، این عصاره گیاهی موجب افزایش دو برابری در میزان بیان ژن BIM شد که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بود (p < ۰/۰۵) (شکل ۳).

اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *SORT1*: عصاره سیترولوس به تنهایی منجر به کاهش معنی‌دار ۸ برابری در بیان ژن *SORT1* در سلول‌های نرمال HFF شد (p < ۰/۰۵). در حالی که این عصاره گیاهی سبب افزایش دو برابری بیان ژن *SORT1* در سلول‌های سرطان تخمدان شد (p < ۰/۰۵) (شکل ٤).



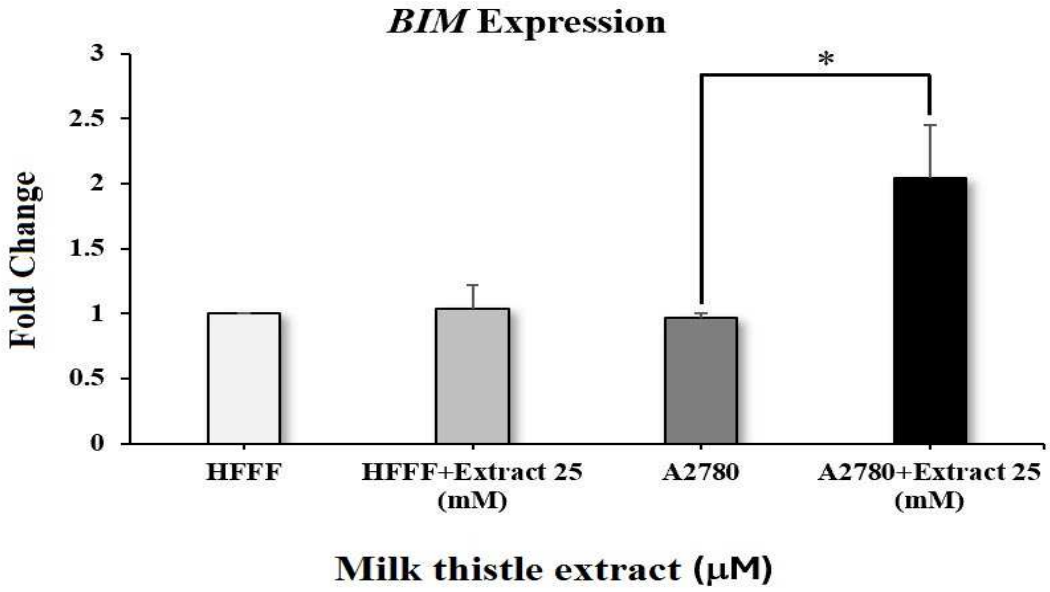
شکل ۱- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های نرمال فیبروبلاست انسانی

Fig 1. Effect of milk thistle plant extract on the growth of normal human fibroblast cells



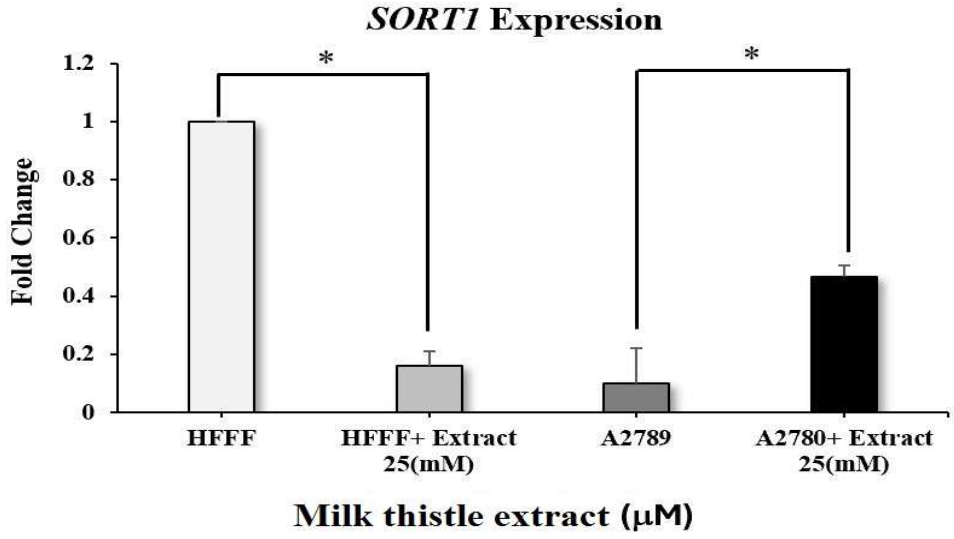
شکل ۲- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های سرطان تخمدان انسانی

Fig 2. Effect of milk thistle plant extract on the growth of human ovarian cancer cells



شکل ۳- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *BIM*

Figure 3- Effect of milk thistle plant extract on BIM gene expression



شکل ٤- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *SORT1*

Fig 4. Effect of milk thistle plant extract on SORT1 gene expression

بحث

سرطان تخمدان سومین بدخیمی شایع زنان در سراسر جهان است. با اینحال، به دلیل سیر بدون علامت، تشخیص دیرهنگام، بالاترین میزان مرگ و میر را در بین سرطان‌ها دارد (١٦). هنگامی که سرطان تخمدان تشخیص داده می شود، معمولا با آسیت بدخیم و متاستاز داخل صفاقی همراه است (۱۷). شایع ترین نوع سرطان تخمدان، سرطان تخمدان اپیتلیال است. از آنجایی که این تومورهای سرطانی به سرعت تکثیر می شوند و اندام های احشایی را درگیر می کنند و فقط به طور موقت به شیمی درمانی حساس هستند، این بیماری یک بیماری کشنده با نرخ درمان حدود۳۰ درصد می باشد (۱۸). اولین رویکرد درمانی برای درمان سرطان تخمدان، شیمی درمانی می باشد، اما به علت عوارض جانبی زیاد، پاسخ به این درمان گذرا و با بازگشت همراه است. امروزه توجه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی شده است. گیاهان دارویی نه تنها به عنوان عوامل درمانی، بلکه برای تحقیقات فارماکولوژیک و توسعه ی دارو کاربرد دارند (۱۷). گیاه *Galium verum* (شیرپنیر) یک گیاه چند ساله علفی از خانواده روبیاسه، بومی اروپا و آسیا است که عمدتا منشأ آن قاره آسیاست، جایی که طب سنتی بیشتر در فرهنگ آن گنجانده شده است. با توجه به درمان‌های جایگزین سرطان در صنعت گیاه پزشکی رویکرد خوبی برای مطالعه در این زمینه وجود دارد، قسمت‌های هوایی بریده و خشک شده گیاه شیرپنیر برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۸). بررسی نتایج این مطالعه نشان داد، عصاره گیاه شیرپنیر با غلظت ۲۵ میلی‌مولار موجوب کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی دردمان سلول‌های سرطان تخمدان انسانی شد. همچنین بیان ژن آپپتوزی BIM را در این سلول‌ها تا دو برابر نسبت به سلول‌های کنترل افزایش داد. میزان بیان ژن SORT1 نیز پس از تیمار با عصاره گیاه شیرپنیر تا ٤ برابر گروه کنترل افزایش یافت. در این راستا امینی فارسانی و همکاران در سال ۱۳۹۵ نشان دادند،

والپروئیک اسید سبب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 می‌شود (۱۹). دکتر نیایی و همکارانش در سال۱٤۰۰ برروی تأثیر اسانس گیاه رزماری بربیان ژن آپوپتوتیک BIM درردہ سلولی MCF-7 سرطان پستان کارکردند و گزارش کردند کمترین میزان بقای سلول‌ها (۱۹ درصد) پس از۷۲ ساعت تیمار مشاهده شد و با افزایش غلظت اسانس، مرگ سلولی نیز افزایش یافت (۲۰). آتماکا و همکاران در آپریل ۲۰۱٦ بر روی اثرات عصاره گالیوم آپارین بر زنده ماندن سلولی، چرخه سلولی و مرگ سلولی در رده‌های سلولی سرطان پستان مطالعاتی انجام دادند و نتیجه گرفتند گونه‌های گالیوم به طور سنتی به دلیل اثرات ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و محافظت از قلب در طب عامیانه استفاده می‌شود. گالیوم آپارین (GA) یک گیاه معمولی بالارونده است که در آناتولی رشد می‌کند (۲۱). امینی و همکاران نشان دادند، عصاره الکلی برگ گیاه به لیمو درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی A2780 را کاهش می دهند و اثراتی بر مهار متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق بازیابی بیان E-Cadherin دارد (۲۲). جوانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثرات ضدسرطانی سم مار را بر سلول‌های سرطانیHeLa در مقایسه با داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین نشان دادند (۲۳). نیک فرجام و همکاران در سال ۱٤۰۰به بررسی اثر سمیت عصاره متانولی آرتیمیسیا(*Artemisia absinthium*) بر سلول سرطان تخمدان انسانی و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی پرداختند و نتیجه گرفتند، اســتفاده از عصــاره متانولی باعث افزایش سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی تحت تیمار می شود(۲٤). منفرد و همکاران در سال۱٤۰۱ بر روی عصاره گیاه اسپند توسط نانو ذرات به بررسی سمیت و القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی رده A2780 پرداختند. تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ درسلول‌های تیمار شده با نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند نشان داد که بیان این ژن در نمونه‌های تحت تیمار به صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد (۲۵). چینگ دینگ و همکاران در ژولای ۲۰۱۵ بر روی سنجش مقاومت ماده شیمیایی ۸-برومو-۷-متوکسی کریزین توسط بیان ژن‌های Akt/FOXO3a در حساسیت به سیس پلاتین در سلول‌های سرطان تخمدان کارکردند و متوجه شدند که سلول‌های تخمدان از طریق تنظیم بیان ژن‌های آپوپتوزی با رونویسی ژن Bim باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان حساس به سیس پلاتین می‌شوند (۲٦). نتایج حاصله از این مقاله بیان ژن آپوپتوزی و مهار رشد سلول‌های سرطانی نتایج مطالعه پیشرو را تایید کرده و نشان داد عوارض ناشی از داروهای شیمیایی می‌تواند با داروهای گیاهی مهارشود تا اثرات بهتری را در بهبود بیماران سرطانی شاهد باشیم. جینگ یوآن و همکاران در ژوئن ۲۰۲۰ حساسیت شیمیایی سلول‌های سرطان تخمدان و بیان ژن2-Bcl را بررسی کردند و پیش‌بینی کردند و بیان داشتند، بیان ژن‌های آپوپتوزی در سرطان تخمدان پتانسیل بالایی در تحقیقات پزشکی دارا می باشد(۲۷). رومن فلورنت و همکاران درسال ۲۰۲۰ اثرات نفتوپیدیل بر سرطان تخمدان را ارزیابی کردند و نشان دادند که نفتوپیدیل رشد سلولی و بیان پروتئین‌های Bim را افزایش می‌دهد. بیان ژن Bim، سلول سرطان تخمدان را به BH3 حساس می کند (۲۸). آلدو تاوا و همکاران بر روی شناسایی اجزای فرار *Galium verum* L مطالعاتی را انجام دادند و نشان دادند که اسانس برگ‌های شیرپنیر دارای مقدار زیادی ۲- متیل بنزآلدئید می باشد. این ماده ترکیبی است که به طور طبیعی در سایر گیاهان معطر نیز وجود دارد (۲۹). با روش کروماتوگرافی ۷ ماده موثره جدید نیز در این گیاه مشاهده شده است. ایروانی و همکاران در اکتبر۲۰۲۱ بر روی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های الکلی

Biebersteinia multifida در تیمار سلول‌های سرطان تخمدان A2780 مطالعه کردند و اثرات آپوپتوزی و نکروزی آن را گزارش کردند. همچنین نتایج آن‌ها اثرات ضد سرطانی عصاره متانولی ریشه این گیاه را تایید کرد (۳۰). دنیسا سمنسکو و همکاران درسال ۲۰۲۳ بر روی غربالگری فیتوشیمیایی اتانول و فازهای اتیل استات *Galium verum* مطالعاتی انجام دادند و مشاهده کردند، مشخصات بیولوژیکی گیاه شیر پنیر و اثر اتانول و اتیل استات با خواص آنتی اکسیدان، اثرات ضد میکروبی و ضد توموری خود، در بهبود سرطان پوست انسان تاثیر گذار بوده است(۳۱). پیل رین لانت و همکاران در سال ۲۰۲۳ ماده موثره و فعالیت آنتی اکسیدانی تمام گونه‌های گالیوم را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند، در عصاره شکوفه‌های *Galium verum*در مقایسه با عصاره گالیوم استونیایی، قسمت هوایی گیاه بیشترین میزان آسپرولوزید دیده می‌شود. همچنین عصاره هیدرواتانولی *گالیوم استونیایی* سرشار از پلی‌فنولیک‌ها به ویژه اسیدکلروژنیک و روتین است که این یک مزیت برای کاربردهای زیستی محسوب می‌شود (۳۲). با توجه به تحقیقات انجام شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی با بیان ژن Bim به اثبات رسیده است. نتایج مطالعات موکان و همکارانش نشان داد که عصاره انواع گالیوم حاوی بالاترین خاصیت فنلی هستند. محتویات فلاونوئیدی عصاره *G. purpureum* و فعال‌ترین عصاره از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره *G. verum* قوی‌ترین اثر بازدارندگی در برابر تیروزیناز را ایفا می کند. نتایج حاصله نشان داد که عصاره های گالیم پتانسیل استفاده به عنوان منبع جایگزین عوامل چند منظوره را دارند (۳۳). مطالعات کروماتوگرافی بر روی خواص عصاره، نشان داد، مواد موثره (سیکلوهپتاسیلوکسان، پنتاسیلوکسان، N–بنزن N–اتیل، بنزوکینولین، تتراسیلوکسان، متیل ایزوتیازولو، ۱،۲ – بیس (تری متیل سیلیل) بنزن، متیل تریس (تری متیل سیلوکسی) سیلان، اسید آرسنوس، اسید سیلیسیک، ۱– دی اتیل) می‌توانند اثر آنتی‌اکسیدانی مورد نظر را روی سلول‌های سرطانی داشته باشد (۳٤). میونا وولتیک و همکاران در سال ۲۰۲۲ به ارزیابی خواص شفابخش گالیوم وروم مبتنی بر ژل خوراکی در استوماتیت آفتی در موش صحرایی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان دادند، ژل خوراکی چسبنده بر پایه عصاره اتانولی این گیاه موجب کاهش قابل توجهی در اندازه زخم از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش محتوای کلاژن در بافت زخم می-شود (۳۵). مطالعات دیگری گزارش کردند که عصاره *G. verum* بر عملکرد انقباض قلب و همچنین تنظیم ریتم قلبی اثر مثبتی دارد. علاوه بر این، عصاره شیرپنیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تعدیل می‌کند و تولید پرواکسیدان‌ها را کاهش می‌دهد (۳٦). اسلان ترک و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی مکانیسم عمل عصاره متانولی *G. verum* بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسان کارکردند و نتیجه گرفتند ترکیباتی مانند فلاونوئیدها دارای فعالیت‌های زیستی هستند. با افزایش تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسان، به نظر می‌رسد که فلاونوئیدهای این عصاره می‌توانند ROS داخل سلولی را افزایش دهند (۳۷). سالیوان و همکاران در سال ۲۰۱٤ به بررسی اثرات آپپتوزی عصاره برگ به لیمو بر روی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 پرداختند و مشاهده کردند که عصاره برگ به لیمو قادر به القای آپوپتوز در شرایط تنش‌های محیطی، فقدان اکسیژن یا مواد مغذی، PHپایین، گونه‌های فعال اکسیژن، بصورت واسطه‌های پاسخ التهابی می‌باشد (۳۸). در مطالعه ما نیز فعالیت آپوپتوزی با افزایش بیان ژن BIM اثبات شد. پاشاپور و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی اثر عصاره متانولی کامل شیرپنیر بر رده سلولی فیبروبلاست AGO کار کردند و نتیجه گرفتند، در بیان ژن BCL_2 در سلول‌های فیبروبلاست کاهش نسبی وجود دارد و

درگروه تیمار شده با عصاره، بیان ژن BAX افزایش می یابد. علاوه بر این، میانگین نسبت بیان ژن BAX به BCL_2LX افزایش می‌یابد (۳۹). اشمیت و همکاران نشان دادند عصاره آبی گیاه شیرپنیر موجب کاهش مهاجرت سلولی در رده سلول‌های سرطانی HLaC78 شدند (۸). همچنین یانگ‌شن و همکاران درسال ۲۰۱٦ بر روی مقاومت الکتروئید پاکلیاکسل در شیمی درمانی بر روی رده سلولی سرطان تخمدان A2780 مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد به تدریج با افزایش غلظت الکتروئید به روش وابسته به غلظت و زمان، تکثیر سلول‌های A2780 مهار شد (۳۱). همچنین ما در این مطالعه در ماده موثره گیاه شیرپنیر، سیکلومتیکون (مخلوط) و سیلوکسان‌های حلقوی با طول زنجیره خاص (n=۷-٤) را مشاهده کردیم. با توجه به اینکه تاثیرگذاری عصاره گیاه شیرپنیر بر روی سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده و بر اساس علم روز که در شیمی درمانی برای سرطان تخمدان معمولاً داروهایی که تجویز می‌شود، دارای ترکیبات پلاتین، مانند پاکلیاکسل یا دوساکسل می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که ماده موثره این گیاه دارای یکی از این ترکیبات سیس پلاتین یا کربوپلاتین و تاکسان‌ها می‌باشد (٤۰). با توجه به اثرگذاری بر روی لایه اپیتلیومی پوست این اثر بر روی سرطان‌هایی که منشا اپیتلیومی دارند دیده شده و به لحاظ کم کردن عوارض مواد شیمیایی داروی بهتری برای درمان سرطان می‌باشد. در سایر مطالعات نیز به اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه شیرپنیر اشاره شده است (٤۱، ٤۲).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شیر پنیر بر کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و القای آپپتوز موثر واقع شده است. ممکن است این فرآیند از طریق مسیرهای مولکولی و یا مکانیسم‌های بیوشیمیایی متفاوتی صورت گرفته باشد. بنابراین عصاره گیاه شیرپنیر می‌تواند به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان و کنترل سرطان درنظر گرفته شود.

منابع

1. Rezaianzadeh A, Mokhtari AM, Hassanipour S, Maharlouei N. The age-standardized incidence rate of ovarian cancer in Iranian women: A systematic review and meta-analysis. Middle East J Cancer. 2018;9(3):171-178.

2. Jonathan S. Berek and Novak's Gynecology. 16th, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2019.

3.Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. Int J Womens Health. 2019;11:287-99.

4. Seidman JD, Cho KR, Ronnett BM, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. In: Blaustein's pathology of the female genital tract. Springer, Boston, MA; 2011.

5. Rasmussen CB, Kjaer SK, Albieri V, Bandera EV, Doherty JA, Høgdall E, et al. Pelvic inflammatory disease and the risk of ovarian cancer and borderline ovarian tumors: A pooled analysis of 13 case-control studies. Am J Epidemiol. 2017;185(1):8-20.

6. Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Gardiner SE.Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. Physiol Mol Biol Plants. 2011;17(3):305-311.

7. Lorenzoni FC, Giorato M, Marcer G. Phenological and aerobiological monitoring of allergenic flora in Padua (Italy). Preliminary data. Aerobiologia. 1998; 14:285-289.

8. Schmidt M, Polednik C, Roller J, Hagen R. *Galium verum* aqueous extract strongly inhibits the motility of head and neck cancer

17. Sari U, Zaman F. Effects of rosmarinic acid and doxorubicine on an ovarian adenocarcinoma cell line (OVCAR3) via the EGFR pathway. Acta Cir Bras. 2024; 39:e390524.

18. Ahn HR, Kim S, Baek GO, Yoon MG, Kang M, Ng JT, et al. Effect of Sortilin1 on promoting angiogenesis and systemic metastasis in hepatocellular carcinoma via the Notch signaling pathway and CD133. Cell Death Dis. 2024;15:634.

19. Semenescu AD, Moacă EA, Iftode A, Dehelean CA, Tchiakpe-Antal DS, Vlase L, et al. Recent updates regarding the antiproliferative activity of *Galium verum* extracts on A375 human malignant melanoma cell line. Life (Basel). 2024; 14(1):112.

20. Shakhseniaie M, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirossadat F. Effect of rosemary essential oil on the expression of BCL-XL, an anti-apoptotic gene, in MCF-7 cell line breast cancer. Daneshvar Med. 2019;27(4): 45-52. [In Persian]

21. Atmaca H, Bozkurt E, Cittan M, Dilek Tepe H. Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle, and cell death in breast cancer cell lines. J Ethnopharmacol. 2016;186:305-310.

22. Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Behzad SB, Seyfi D, Salek F.Investigating the anticancer effect of Lippia citriodora leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression. Cell Tissue J. 2019;10(1):24-33. [In Persian]

23. Javani Jouni F, Zafari J, Shams E, Abdolmaleki P, Rastegari A. Evaluation of anti-cancer effects of caspian viper (*Naja naja oxiana*) venom in comparison with doxorubicin in HeLa cancer cell line and normal HFF fibroblast. J Ilam Univ Med Sci. 2022;29(6):20-27. [In Persian]

24. Khang nikfarjam S, Baharara J, Nejad shahrokhabady K. Cytotoxic Effects of Artemisia Absinthium Extract on A2780 Cell Line (Ovarian Cancer) And Alteration cell lines and protects mucosal keratinocytes against toxic DNA damage. Oncol Rep. 2014;32(3):1296-1302.

9. Mohsin MA, Morris SJ, Smith H, Sweet C. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection, and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations? Virus Res. 2002;85(2).

10. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(1):47-59.

11. Rezaianzadeh A, Mokhtari AM, Hassanipour S, Maharlouei N. The age-standardized incidence rate of ovarian cancer in Iranian women: A systematic review and meta-analysis. Middle East J Cancer. 2018;9(3):171-178.

12. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from the human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. J Biol Chem. 1997;272(6):3599-3605.

13. Staib-Lasarzik I, Gölz C, Bobkiewiecz W, Somnuke P, Sebastiani A, Thal SC, et al. Sortilin is dispensable for secondary injury processes following traumatic brain injury in mice. Heliyon. 2024;10(15):e35198.

14. Donninger H, Bonome T, Radonovich M, et al. Whole genome expression profiling of advanced-stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. Oncogene. 2004;23(49):8065-8077.

15. Amini-Farsani Z, Sangtarash M, Teimori H, Shamsara M. Effect of valproic acid on expression of Bim gene and viability of ovarian cancer cell line A2780. J Gorgan Univ Med Sci. 2017;19(3):60-66.

16. Webb PM, Jordan SJ. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2024;21(5):389-400

33. Mocan A, Diuzheva A, Bădărău S, Moldovan C, Andruch V, Carradori S, et al. Liquid phase and microwave-assisted extractions for multicomponent phenolic pattern determination of five romanian *Galium* species coupled with bioassays. Molecules. 2019;24:1226.

34. Zhao CC, Shao JH, Li X, Xu J, Wang JH.A new anthraquinone from *Galium verum* L. Nat Prod Res. 2006;20(11):981-984.

35. Monfared M, Neamati A, Homayouni M. Loading of pecan smoke extract by chitosan nanoparticles and evaluation of its toxicity and induction of apoptosis on cancer cells A2780. Stud Med Sci. 2022; 33(5):350-360. [In Persian]

36. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, et al. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. Arch Physiol Biochem. 2020;126(5):408-415.

37. Aslantürk ÖS, Çelik TA, Karabey B, Karabey F. Apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. J Pharm Res Int. 2017;15(6):1-16.

38. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer Metab. 2014;2:17.

39. Pashapour Z, Heshmati M, Mousavi Z, Esmaeili S. Effect of whole methanolic extract of *Galium verum* on AGO cell line. Toxicol Commun. 2022;4(2):10.

40. Vuletic M, Jakovljevic V, Zivanovic S, Papic M, Mladenovic R, Zivkovic V, et al. The evaluation of healing properties of *Galium verum*-based oral gel in aphthous stomatitis in rats. Molecules. 2022;27(15): 4680.

41. Turcov D, Barna AS, Trifan A, Blaga AC, Tanas˘a AM, Suteu D. Antioxidants from *Galium verum* as ingredients for the design of new dermatocosmetic products. Plants. 2022;11:2454.

Of Apoptotic Genes Expression Levels. Stud Med Sci. 2021;32(5):317-328.

25. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. Am J Pathol. 2010;177(3):1053-1064.

26. Ding Q, Chen Y, Zhang Q, Guo Y, Huang Z, Dai L, et al. 8□bromo□7□methoxychrysin induces apoptosis by regulating Akt/FOXO3a pathway in cisplatin□sensitive and resistant ovarian cancer cells. Mol Med Rep. 2015; 12(4):5100-5108.

27. Yuan J, Lan H, Jiang X, Zeng D, Xiao S. Bcl□2 Family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer (Review). Int J Mol Med. 2020;46:1255-1265.

28. Florent R, Weiswal LB, Lambert B, et al. Bim, Puma, and Noxa upregulation by naftopidil sensitizes ovarian cancer to the BH3-mimetic ABT-737 and the MEK inhibitor trametinib. Cell Death Dis. 2020;11:380.

29. Tava A, Biazzi E, Ronga D, Avato P. Identification of the Volatile Components of *Galium verum* L. and *Cruciata leavipes* Opiz from the western Italian Alps. Molecules. 2020;25:2333.

30. Irvani Z, Mehrbani M, Farzin H, Majidi B, Mohammadi A, Toroghi R, et al. Cytotoxic effect of *Biebersteinia multifida* alcoholic extracts on MCF-7, HeLa, and A2780 cell lines. Arch Razi Inst. 2021;76(3):609-619.

31. Shen Y, Zhang X, Chen X, Ren M, Cai Y. Octreotide reverses the resistance of A2780/Pacliaxel ovarian cancer cell line to paclitaxel chemotherapy in vitro. J Cancer Res Ther. 2016;12(2):657-662.

32. Laanet PR, Saar-Reismaa P, Jõul P, Bragina O, Vaher M. Phytochemical screening and antioxidant activity of selected estonian *Galium* species. Molecules. 2023;28:2867.

42. Farcas AD, Mot AC, Zagrean-Tuza C, Toma V, Cimpoiu C, Hosu A, et al. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of *Galium verum* extract during acute restraint and dark stress in female rats. PLoS One. 2018;13(7): e0200022.