

Evaluation of Antioxidant Properties and Cytotoxic Effect of Scutellaria Pinnatifida Extract on Survival and Expression of Genes Involved in Cell Cycle (P53 and CDK2) in Kidney Cancer

Zahra Pakravan¹
Narges Nikoonahad Lotfabadi²
Seyed Mohsen Miresmaeili²

¹ MSc Student in Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran

(Received November 25, 2023; Accepted February 20, 2024)

Abstract

Background and purpose: To treat kidney cancer, methods such as surgery, chemotherapy, immunotherapy, etc. are used, which cause many side effects, thus, we try to use methods that have fewer side effects, such as the use of plant compounds. Considering the importance of changes in the function of genes, especially vital genes during cancer, in this study, the genes involved in the cell cycle, including *P53* and *CDK2*, were investigated. The purpose of this study was to investigate the antioxidant properties and cytotoxic effect of *Scutellaria pinnatifida* extract on the survival and expression level of genes involved in the cell cycle (*P53* and *CDK2*) in kidney cancer.

Materials and methods: In this experimental-laboratory study, *Scutellaria pinnatifida* extract was prepared by soaking method and the presence of phytochemical compounds in the extract was investigated qualitatively. Kidney cancer ACHN cells were cultured. The cytotoxic effect of an extract with concentrations of 1000, 500, 250, 125, 100, and 62.5 µg/ml was measured by MTT assay (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide) which is a color method. The assay is to check the proliferation and survival of cells, it was measured at 24, 48 and 72 hours. Then, RNA extraction was performed from the treated cells with concentrations of 500 and 250 µg/ml, and the concentration and quantity of the extracted RNAs were measured using nano drops. Then cDNA was made from the extracted RNAs and the expression levels of *P53* and *CDK2* genes were analyzed using Real-Time PCR. DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl) test was used to evaluate the antioxidant properties of the extract which is based on the measurement of antioxidant inhibition capacity.

Results: According to the results obtained from the phytochemical tests, the spike plate plant extract contains flavonoids, triterpenoids, steroids, sterols, and glycosides, but it does not contain alkaloids, tannins, and saponins. MTT assay showed that *Scutellaria pinnatifida* extract has a lethal effect on ACHN cells and this effect is dose and time-dependent. By decreasing the concentration of spike plate plant extract, the survival rate of cells increased significantly, and by increasing the duration of treatment from 24 to 72 hours, the survival rate in kidney cancer cells decreased significantly. Real-Time PCR also showed increased expression of the *P53* gene and decreased expression of the *CDK2* gene in ACHN cells treated with *Scutellaria pinnatifida* extract. Changes in expression are also dependent on dose and time. The antioxidant test confirmed the antioxidant properties of the extract and it showed that the antioxidant properties of this plant depend on the concentration. Value in this study is less than 0.05 ($P < 0.05$).

Conclusion: The findings show that *Scutellaria pinnatifida* extract can have an anti-cancer effect and destroy ACHN cancer cells. Changes in *P53* and *CDK2* gene expression in ACHN cells indicate that *Scutellaria pinnatifida* extract probably disturbs the cell cycle in kidney cancer cells and thereby reduces the survival of these cells. Therefore, it can be considered a compound with anti-cancer properties.

Keywords: *Scutellaria pinnatifida*, kidney cancer, cell cycle, *P53* gene, *CDK2* gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (230): 28-39 (Persian).

Corresponding Author: Narges Nikoonahad Lotfabadi - Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran.
(E-mail: nikoonahad@sau.ac.ir)

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه بشقابی سنبله ای (*Scutellaria pinnatifida*) بر بقاء و میزان بیان ژن های درگیر در چرخه سلولی (*P53* و *CDK2*) در سرطان کلیه

زهرا پاکروان^۱

نرگس نیکونهاد لطف آبادی^۲

سید محسن میراسماعیلی^۲

چکیده

سابقه و هدف: برای درمان سرطان کلیه از روش هایی مانند جراحی، شیمی درمانی، ایمونوتراپی و غیره استفاده می شود که عوارض زیادی ایجاد می کنند، بنابراین سعی می شود از روش هایی نظیر ترکیبات گیاهی که عوارض کم تری دارند، استفاده شود. گیاهان دارویی ترکیبات بسیاری دارند که فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده و در نتیجه از پیشرفت سرطان جلوگیری می کنند و فعالیت های ضد التهابی، ضد توموری و ضد جهش زایی نیز دارند. با توجه به اهمیت تغییراتی که در عملکرد ژن ها خصوصاً ژن های حیاتی طی سرطان رخ می دهد، در این مطالعه ژن های درگیر در چرخه سلولی شامل *P53* و *CDK2* بررسی شدند. هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص آنتی اکسیدانی و اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه بشقابی سنبله ای (*Scutellaria pinnatifida*) بر بقاء و میزان بیان ژن های درگیر در چرخه سلولی (*P53* و *CDK2*) در سرطان کلیه بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* به روش خیساندن تهیه و وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره به صورت کیفی بررسی گردید. سلول های ACHN سرطان کلیه کشت داده شدند. اثر سایتوتوکسیک عصاره با غلظت های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵، ۱۰۰ و ۶۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ به روش MTT (*5-Diphenyltetrazolium Bromide*)، *2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) که یک روش رنگ سنجی برای بررسی تکثیر و بقای سلول ها است، در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. سپس استخراج RNA از سلول های در معرض تیمار با غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ انجام شده و غلظت و کمیت RNA های استخراج شده با استفاده از نانو دراپ سنجیده شد. سپس از RNA های استخراج شده، cDNA ساخته شد و میزان بیان ژن های *P53* و *CDK2* با استفاده از Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره از تست DPPH (*Diphenyl picrylhydrazyl*) استفاده گردید که بر اساس اندازه گیری ظرفیت مهار آنتی اکسیدان ها نسبت به آن است.

یافته ها: طبق نتایج به دست آمده از تست های فیتوشیمیایی، عصاره گیاه بشقابی سنبله ای حاوی فلاونوئید، تری ترپنوئید، آستروئید، استرول و گلیکوزید می باشد، اما فاقد آلکالوئید، تانین و ساپونین است. تست MTT نشان داد که عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* بر روی سلول های ACHN اثر کشندگی دارد و این اثر وابسته به دوز و زمان است. با کاهش غلظت عصاره گیاه بشقابی سنبله ای درصد زنده ماندن سلول ها به طور معنی داری افزایش یافت و با افزایش طول مدت تیمار از ۲۴ تا ۷۲ ساعت، میزان بقا در سلول های سرطانی کلیه به طور معنی داری کاهش یافت. Real Time PCR نیز افزایش بیان ژن *P53* و کاهش بیان ژن *CDK2* را در سلول های ACHN تحت تیمار با عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* را نشان داد. تغییرات بیان نیز وابسته به دوز و زمان بود. تست آنتی اکسیدانی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره را تایید کرد و نشان داد خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه وابسته به غلظت است. سطح معنی داری در این مطالعه کم تر از ۰/۰۵ ($P < 0/05$) بود.

استنتاج: یافته های این مطالعه نشان می دهند که عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* می تواند اثر ضد سرطانی داشته و سلول های سرطانی ACHN را از بین ببرد. تغییرات بیان ژن *P53* و *CDK2* در سلول ACHN نشان دهنده آن است که عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* احتمالاً چرخه سلولی را در سلول های سرطانی کلیه مختل کرده و از این طریق باعث کاهش بقای این سلول ها می گردد، بنابراین می تواند به عنوان ترکیبی با خواص ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: گیاه بشقابی سنبله ای، سرطان کلیه، چرخه سلولی، ژن *P53*، ژن *CDK2*

E-mail: nikoonehad@sau.ac.ir

مؤلف مسئول: نرگس نیکونهاد لطف - یزد؛ بلوار دانشجو، دانشگاه علم و هنر، دانشکده علوم پایه

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۹/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۱

مقدمه

مواد طبیعی این گیاه جدا شده و به عنوان اجزای ضد سرطان از گیاه پیشنهاد شد (۱۰).

کیناز وابسته به سیکلین ۲ (CDK2) نقشی اساسی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می کند که در بسیاری از سرطان های انسانی از تنظیم خارج شده اند. شواهد جدید نشان می دهد مهار CDK2 باعث ایجاد فعالیت ضد توموری در زیر مجموعه ای از تومورها با ویژگی های ژنتیکی مشخص می شود (۱۱).

P53 ژنی است که از چرخه سلولی محافظت و به عنوان سرکوبگر تومور عمل می کند. به دلیل فراوانی بالای جهش در P53 که منجر به رشد سرطانی می شود، این ژن یک هدف جذاب و جدید برای درمان سرطان است. بنابراین، فعال سازی ژن سرکوبگر تومور P53 ممکن است یک رویکرد جذاب برای درمان سرطان در نظر گرفته شود (۱۲). امروزه جهان متمایل به استفاده از ظرفیت های گیاهان خصوصاً مواد موثره طبیعی موجود در آنها برای کاربرد در موارد متعدد خصوصاً در درمان بیماری ها از جمله سرطان می باشد. گیاه بشقابی سنبله ای یکی از گیاهانی است که دارای ترکیبات فیتو کیمیکال موثری جهت کاربردهای درمانی می باشد. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص آنتی اکسیدانی و اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه بشقابی سنبله ای (*Scutellaria pinnatifida*) بر بقا و میزان بیان ژن های درگیر در چرخه سلولی (P53 و CDK2) در سرطان کلیه بود.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع مطالعه تجربی - آزمایشگاهی است.

جمع آوری و عصاره گیری

گیاه بشقابی سنبله ای (*Scutellaria pinnatifida* subsp. *mucida*) در موقعیت گیلان، شهرستان رودبار، رستم آباد، شهر توتکابن، جاده توتکابن به داماش در

سرطان کلیه یکی از سرطان های شایع در سراسر جهان است و پیش بینی می شود در سال های آینده بروز آن افزایش یابد (۱). شیوع این بیماری در مردان دو برابر بیشتر از زنان است (۲).

شایع ترین نوع سرطان که از کلیه منشأ می گیرد RCC (renal cell carcinoma) است (۳). RCC سومین بدخیمی رایج در دستگاه ادراری - تناسلی است (۴). سرطان های کلیوی ارثی ۸-۵ درصد از کل سرطان های کلیه را تشکیل می دهند (۵). برای درمان سرطان از روش هایی مانند شیمی درمانی، ایمنی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی، درمان هدفمند و جراحی استفاده می شود که موفقیت پایین و عوارض جانبی حاد یا مزمن دارند. امروزه برای پیشگیری و درمان سرطان به رویکردهای درمانی جایگزین جدید، مؤثرتر، قوی تر، انتخابی و کمتر سمی نیاز است. از این رو، درمان های ضد سرطان گیاهی معرفی می شوند. گیاهان دارویی ترکیبات بسیاری دارند که فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده و در نتیجه از پیشرفت سرطان جلوگیری می کنند و فعالیت های ضد التهابی، ضد توموری و ضد جهش زایی نیز دارند (۶).

Scutellaria گیاهی، بوته ای و درختچه ای است که تقریباً شامل ۴۶۹-۳۶۰ گونه در کشورهای مختلف است (۷). ۲۰ گونه و دو هیبرید از آنها در ایران رشد می کنند. یکی از گونه های ایرانی گونه بشقابی سنبله ای (*Scutellaria pinnatifida*) است که دارای پنج زیر گونه است که زیر گونه *Scutellaria pinnatifida* subsp. *mucida* بومی ایران است (۸). در طب سنتی از این گیاه به عنوان دارویی با خاصیت ضد التهاب و ضد درد استفاده می شود (۹). از زمانی که مواد شیمیایی گیاهی جایگاه مهمی در درمان سرطان به دست آوردند، *Scutellaria* یکی از گیاهان تأثیرگذار بود که تحقیقات شیمی درمانی سرطان را به خود جلب کرد. پس از معرفی *Scutellaria* به عنوان عامل شیمی درمانی، بسیاری از

ارتفاع ۲۲۷ متر از سطح دریا با مختصات $36^{\circ}52'45''N$, $49^{\circ}32'18''E$ جمع آوری شده و براساس شناسایی انجام شده در دانشگاه تهران، دارای کد هرباریومی 45950-TUH می باشد.

ابتدا گیاه در دمای اتاق و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن قسمت های هوایی گیاه به وسیله آسیاب پودر شدند. عصاره گیری به روش خیساندن بخش های هوایی گیاه در متانول خالص انجام گرفت (۵۰ گرم گیاه خشک و پودر شده در نیم لیتر متانول خالص به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ خیسانده شد).

تست های فیتوشیمیایی

برای بررسی وجود یا عدم وجود ترکیبات شیمیایی در عصاره تهیه شده تست های فیتوشیمیایی انجام گردید. جهت بررسی وجود فلاونوئید ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با ۱۰ میکرولیتر NaOH مخلوط شد و بعد از بوجود آمدن رنگ زرد پررنگ، ۱۰۰ میکرولیتر HCl غلیظ به آن ها اضافه شد. ایجاد مجدد رنگ زرد نشان دهنده ی وجود فلاونوئید است. جهت بررسی وجود تری ترپنوئید، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره با ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آرامی مخلوط شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید. ایجاد رنگ قرمز، قهوه ای و بنفش نشانه وجود تری ترپنوئید و در غیر این صورت عدم وجود این ترکیبات بود. برای بررسی وجود آلکالوئیدها از آزمون معرف مایر استفاده شد. تشکیل رسوب سفیدرنگ بعد از مخلوط ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۵۰۰ میکرولیتر از معرف مایر و چند قطره از محلول آبی HCl بیان گر وجود آلکالوئید در عصاره بود و در غیر این صورت عصاره فاقد آلکالوئید بود.

۵۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۱۰ میلی لیتر آب جوش مخلوط و فیلتر شد. مقدار کمی آهن کلرید ۶ درصد به آن افزوده شد. رنگ سبز تیره در این آزمون معرف وجود تانین بود در غیر این صورت عصاره فاقد تانین

بود. برای بررسی وجود ترکیبات استروئیدی، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره در ۳ میلی لیتر کلروفرم حل و فیلتر گردید. سپس اسیدسولفوریک به آن افزوده شد. تشکیل رنگ قرمز مایل به قهوه ای در لایه های پایین تر وجود استروئید را تایید و در غیر این صورت عصاره فاقد این ترکیبات بود.

۵۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر ترکیب و ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه ساکن گذاشته شد. تشکیل کف پایدار نشان دهنده وجود ساپونین ها و عدم تشکیل کف نشان دهنده عدم وجود آن بود.

برای بررسی وجود استرول، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره در ۱ میلی لیتر کلروفرم حل شد. سپس به آرامی اسیدسولفوریک غلیظ به محلول ها اضافه شد. ایجاد رنگ قهوه ای نشانه وجود و در غیر این صورت عدم وجود استرول بود.

۳۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۱ میلی لیتر اسید استیک گلیسیال ترکیب شد سپس ۱ قطره محلول $FeCl_3$ ۵ درصد و چند قطره اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. تشکیل رنگ قهوه ای در وسط و رنگ سبز آبی در لایه فوقانی وجود ترکیبات گلوکوزیدی در عصاره را نشان می داد.

تهیه و کشت سلول

این مطالعه در شرایط *in vitro* و بر روی سلول های سرطانی کلیه انسان (رده سلولی ACHN) انجام گرفت. سلول سرطان کلیه انسان (رده سلولی ACHN) از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) با شماره NCBI C206 به صورت فلاسک کشت داده شده، خریداری شد. سپس سلول ها در محیط کشت حاوی ۹۰ درصد محیط DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose) (شرکت Bioidea، ایران) با ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (شرکت Gibco، برزیل) و ۱ درصد آنتی بیوتیک

پنی سیلین/استرپتومایسین (PEN/STREP) (شرکت Bioidea، ایران) درانکوباتور (شرکت Shel Lab، آمریکا) ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری، تکثیر و کشت داده شدند.

ارزیابی سمیت سلولی

در این مرحله سه پلیت ۹۶ خانه مخصوص کشت سلول‌های چسبان به منظور تیمار طی سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نظر گرفته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰ هزار سلول ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند تا سلول‌ها بچسبند و بعد از آن سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف عصاره قرار داده شدند. غلظت‌های مورد استفاده از عصاره برای آزمون MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide شامل ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، و ۶۲/۵ μg/ml بود. بعد از گذشت زمان تیمار، پلیت در معرض غلظت مناسبی از محلول MTT قرار گرفته و پس از ۳ ساعت انکوباسیون، ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) (شرکت DNAbiotech، ایران) به هر چاهک اضافه شده و مجدداً پلیت به مدت یک و نیم ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس جذب چاهک‌ها به وسیله الیزا ریدر (شرکت ویراژن، ایران) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد زنده مانی سلول‌ها به کمک فرمول زیر (۱۳) محاسبه گردید.

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب بلانک} - \text{میانگین جذب نمونه}}{\text{میانگین جذب کنترل} - \text{میانگین جذب بلانک}} = \text{درصد بقا}$$

استخراج RNA

برای انجام این مرحله از پلیت ۶ خانه استفاده شد، به صورتی که در هر چاهک سوسپانسیون سلولی حاوی ۵۰۰۰۰۰ سلول ریخته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و

چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک، سلول‌ها در معرض غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ μg/ml از عصاره برای زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از گذشت بازه زمانی مورد نظر، سلول‌ها برداشته شده و برای استخراج RNA آن‌ها از کیت استخراج RNA پارس توس (شرکت پارس توس، مشهد، ایران) و پروتکل استاندارد ارائه شده توسط شرکت استفاده شد.

بررسی کمیّت RNA

به منظور بررسی غلظت و کمیّت RNA های استخراج شده از نانو دراپ (اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل ScanDrop²، شرکت Analytik jena، آلمان) استفاده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ خوانده شد. نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر به عنوان معیاری برای خلوص در استخراج DNA و RNA استفاده می‌شود.

سنتز cDNA

برای ساخت cDNA از RNA های استخراج شده از کیت سنتز cDNA پارس توس (شرکت پارس توس، مشهد، ایران) بر اساس پروتکل استاندارد این شرکت استفاده شد.

طراحی و سنتز پرایمر

برای هر ژن (*CDK2*، *P53* و *β-Actin* به عنوان Housekeeping Gene) یک جفت پرایمر اختصاصی (شامل Forward و Reverse) توسط نرم افزار oligo طراحی شد. جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرها را نشان می‌دهد. توالی‌ها به شرکت Metabion international AG (آلمان) به واسطه شرکت زیست فناوری پیشگام (تهران، ایران) جهت سنتز ارسال شدند. در نهایت پرایمرها به صورت لیوفلیزه تحویل گرفته شدند.

آنالیز آماری داده ها

در مطالعه حاضر شاخص میانگین و انحراف معیار برای متغیرهای کمی گزارش شد. ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 22) و نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism (Ver. 8) انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های ANOVA و Student t-test استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه علم و هنر انجام شد. مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش با کد اخلاق IR.ACECR.JDM.REC.1400.045 قرار گرفت.

یافته‌ها

تست‌های کیفی تشخیص ترکیبات فیتوشیمیایی طبق نتایج به دست آمده عصاره *Scutellaria pinnatifida* حاوی فلاونوئید، تری‌ترپنوئید، آسترئوئید، استرول و گلیکوزید می‌باشد، اما فاقد آلکالوئید، تانین و ساپونین است. نتایج در جدول شماره ۲ درج شده است.

جدول شماره ۲: نتایج تست‌های فیتوشیمیایی

ترکیب موجود در گیاه	وجود (+)	عدم وجود (-)
فلاونوئید	+	
تری‌ترپنوئید	+	
آلکالوئید		-
تانین		-
آسترئوئید	+	
ساپونین‌ها		-
استرول	+	
گلیکوزید	+	

میزان زنده ماندن سلول‌های سرطان کلیه تحت تاثیر عصاره گیاه بشقابی سنبله ای (آزمون MTT)

نمودارهای شماره ۱ تا ۴ نتایج این آزمون را نشان می‌دهد. نمودار شماره ۱، اثر عصاره گیاه روی سلول‌های سرطان کلیه بعد از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. همان

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای ژن‌های CDK2، P53 و β -Actin

نام ژن	توالی (۳' → ۵')	TM (°C)	تعداد باز
CDK2-F	GGATGCCCTCTGCTCTCACTG	63	۲۰
CDK2-R	CTGAGGTTTAAGGTCTCGGTGG	64	۲۲
TP53-F	TAGTGTGGTGGTGCCTATG	60	۲۰
TP53-R	GCCCATGCAGGAAGTGTAC	60	۲۰
ActinB-F	GAGCATCCCCAAAGTTCACA	61	۲۱
ActinB-R	GGGACTTCCTGTAACAACGCA	61	۲۱

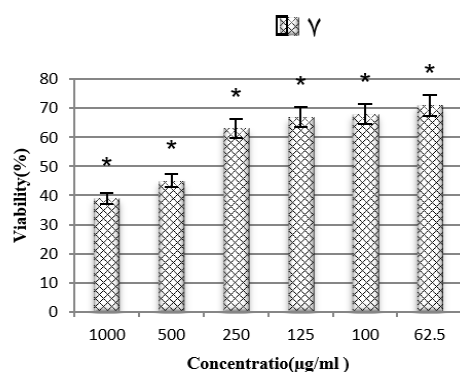
بررسی بیان ژن با استفاده از واکنش *qPCR* (Real-time quantitative PCR) برای بررسی بیان ژن‌های *CDK2* و *P53* از Real-time PCR (شرکت Analytik jena، آلمان) استفاده شد. جهت انجام این تست از غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ از تیمار در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده گردید. به کمک CT‌های به دست آمده از واکنش Real-time PCR میزان تغییرات بیان ژن‌ها (fold change) محاسبه گردید.

تست بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره

جهت تعیین عملکرد آنتی‌اکسیدانی از آزمون DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl) استفاده شد که به طور گسترده در بیوشیمی گیاهان برای ارزیابی خواص ترکیبات گیاهی برای مهار رادیکال‌های آزاد استفاده می‌شود. در این تست مقدار ۰/۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$) با ۳/۹ میلی لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۰۰۴ درصد مخلوط گردید. برای محلول کنترل ۳/۹ میلی لیتر محلول متانولی DPPH با ۰/۱ میلی لیتر متانول مخلوط شد. محلول‌ها ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شده و درصد مهار رادیکال آزاد به کمک فرمول زیر (۱۳) محاسبه شد.

$$\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل} = \frac{\text{درصد مهار رادیکال آزاد}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

نمودار شماره ۳ اثر عصاره گیاه روی سلول‌های سرطان کلیه بعد از ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. همان طور که در نمودار قابل مشاهده است در این زمان نیز مانند دو زمان قبلی با کاهش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافته است.



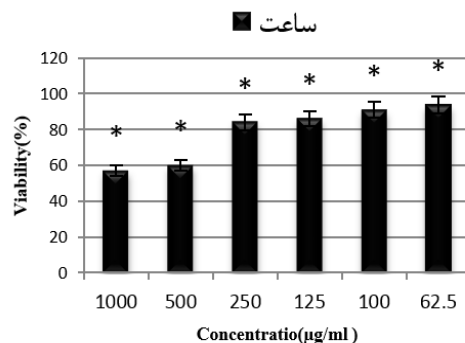
نمودار شماره ۳: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده ماندن سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۷۲ ساعت در غلظت‌های متفاوت
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

همان طور که در نمودار شماره ۴ مشخص است در هر سه زمان با کاهش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافته و میزان کشندگی در سلول‌های سرطانی کلیه به دوز استفاده شده وابسته است. همچنین در طی هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار، غلظت $62.5 \mu\text{g/ml}$ کم‌ترین مقدار کشندگی و غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ بیش‌ترین مقدار کشندگی را دارد. هم‌چنین با افزایش زمان درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت. پس می‌توان نتیجه گرفت که اثر تیمارها علاوه بر دوز، وابسته به زمان نیز می‌باشند.

بررسی کمیت RNA

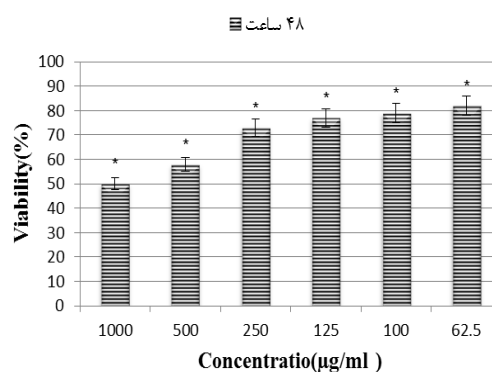
جدول شماره ۳ نتایج اندازه‌گیری غلظت RNA را با دستگاه نانودراپ نشان می‌دهد. غلظت RNA ها بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر است.

طور که در نمودار مشخص است با کاهش غلظت عصاره، درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافته و کشندگی سلول‌ها به دوز استفاده شده وابسته است. غلظت $62.5 \mu\text{g/ml}$ کم‌ترین کشندگی و غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ بیش‌ترین کشندگی را دارد.

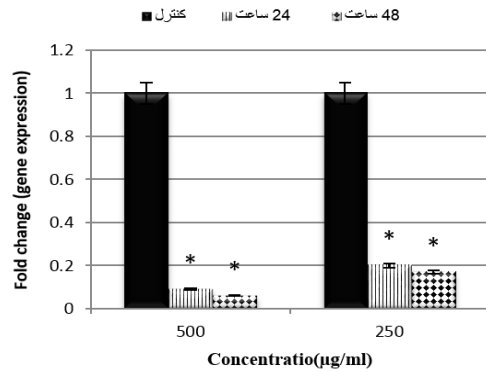


نمودار شماره ۴: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده ماندن سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۴۸ ساعت در غلظت‌های متفاوت
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

نمودار شماره ۲ اثر عصاره گیاه روی سلول‌های سرطان کلیه بعد از ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج این زمان نیز مثل زمان قبل است و با کاهش غلظت عصاره، درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافته است.



نمودار شماره ۲: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده ماندن سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۴۸ ساعت در غلظت‌های متفاوت.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

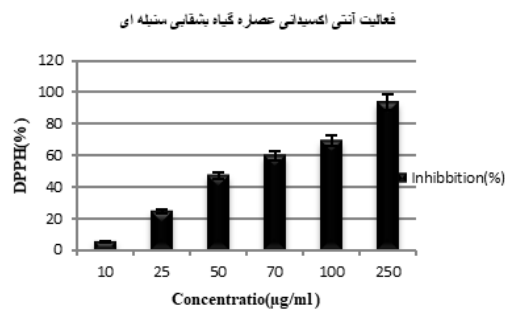


نمودار شماره ۶: تغییرات بیان ژن *CDK2* پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف و طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

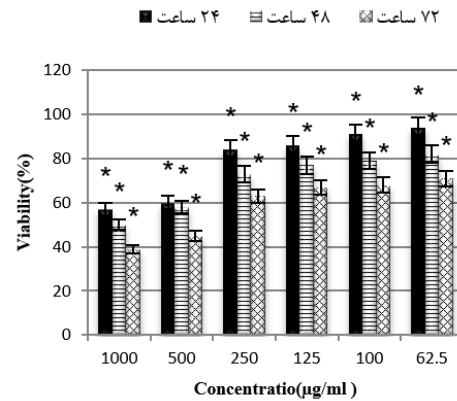
CDK2 نیز ژنی است که در چرخه سلولی دخیل است. مهار ژن *CDK2* شروع فاز S را مسدود می‌کند. نتایج حاصله نشان می‌دهد بیان ژن *CDK2* با افزایش غلظت عصاره نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان ژن *CDK2* در هر غلظت کاهش بیش‌تری یافته است.

ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از تست DPPH که خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره را ارزیابی می‌کند در نمودار شماره ۷ قابل مشاهده می‌باشد. مقدار IC_{50} به دست آمده $52/64$ است. همان‌طور که مشخص است خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه وابسته به غلظت است. بیش‌ترین درصد مهار DPPH (بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی) متعلق به غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ است و کم‌ترین درصد مهار DPPH (کم‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی) متعلق به غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ است.



نمودار شماره ۷: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای در غلظت‌های متفاوت



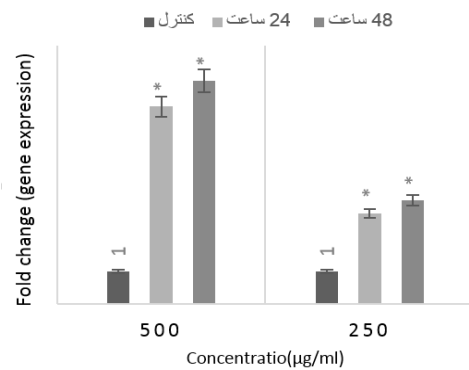
نمودار شماره ۴: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده ماندن سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

جدول شماره ۳: نتایج اندازه‌گیری غلظت RNA به کمک نانودراپ

زمان/غلظت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کنترل	۱۴۸۰	۱۴۵۰/۶۲
غلظت ۵۰۰	۸۱۷/۲۹	۲۹۴/۵
غلظت ۲۵۰	۹۷۵/۹۹	۴۴۵/۶۴

ارزیابی تغییرات بیان ژن های *CDK2* و *P53*

نمودارهای شماره ۵ و ۶ به ترتیب نشان‌دهنده میزان تغییرات بیان ژن‌های *P53* و *CDK2* می‌باشند. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *P53* به نوان یک ژن چرخه سلولی که دارای وظیفه سرکوب می‌باشد، با افزایش غلظت عصاره نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان ژن *P53* در هر غلظت افزایش بیش‌تری یافته است.



نمودار شماره ۵: تغییرات بیان ژن *P53* پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف و طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

بحث

سرطان، دومین علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و شیوع آن در حال افزایش است. بنابراین یک مشکل جدی و ۷۲ شده و این کشندگی وابسته به دوز و زمان بود. در می باشد (۱۴). سرطان کلیه یکی از سرطان‌های شایع است که پیش‌بینی می‌شود بروز آن افزایش یابد (۱). برای درمان این بیماری از روش‌هایی استفاده می‌شود که عوارض جانبی زیادی ایجاد می‌کنند، بنابراین سعی می‌شود از روش‌هایی مثل استفاده از ترکیبات گیاهی نظیر گیاه بشقابی سنبله‌ای استفاده شود که عوارض کم‌تری دارند. گیاهان دارویی هدیه طبیعت به انسان هستند تا زندگی سالم و عاری از بیماری داشته باشد (۱۵). عوارض جانبی داروهای شیمیایی باعث شده گیاهان دارویی و پیدا کردن خواص آن‌ها اهمیت پیدا کنند (۹).

تحقیقات دارویی نشان داده است که عصاره‌ها و ترکیبات شناسایی شده از جنس *Scutellaria* فعالیت‌های بیولوژیکی گسترده‌ای از جمله فعالیت‌های ضدسرطانی از خود نشان می‌دهند (۷). یکی از گونه‌های ایرانی از این جنس، گونه *Scutellaria pinnatifida* است (۸)، که حاوی فلاونوئید و ترکیبات دیگر است که باعث خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی می‌شوند (۱۶).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد عصاره *Scutellaria pinnatifida* باعث کشندگی سلول‌های سرطانی در طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ هر سه زمان با کاهش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافته است.

در مطالعه حاضر ژن‌های درگیر در چرخه سلولی شامل *P53* و *CDK2* بررسی شدند. *P53* اثر سرکوب‌کننده تومور دارد و اغلب در سرطان انسان جهش می‌یابد (۱۲). طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر میزان بیان ژن *P53* با افزایش غلظت عصاره *Scutellaria pinnatifida* به صورت معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان ژن *P53* در هر غلظت افزایش بیش‌تری یافته است.

CDK2 نقشی اساسی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می‌کند (۱۱). مهار ژن *CDK2* شروع فاز S را مسدود می‌کند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد بیان ژن *CDK2* با افزایش غلظت عصاره *Scutellaria pinnatifida* به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کاهش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان در هر غلظت کاهش بیشتری یافته است.

در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی نیز بررسی شد. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که فرآیندهای اکسیداتیو را به تاخیر انداخته، کنترل می‌کنند یا از آن جلوگیری می‌کنند (۱۷). طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با افزایش غلظت عصاره *Scutellaria pinnatifida* خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. در پژوهشی که محمدی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام دادند ریشه گیاه *Scutellaria pinnatifida* را از لحاظ فیتوشیمیایی بررسی کردند و برای اولین بار دو فلاونوئید *Skullcapflavone II* و *wogonin* از این گیاه استخراج کردند (۱۸). نتایج مطالعه حاضر مانند نتایج مطالعه محمدی و همکاران نیز وجود فلاونوئید در این گیاه را تایید کرد. در پژوهش دیگری بوذری و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اثرات سمیت سلولی عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی دو رده سلول متفاوت سرطانی K562 و HL-60 و یک رده سلولی طبیعی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند که *Scutellaria pinnatifida* می‌تواند به‌طور موثری باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی شود (۸). یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های بوذری و همکارانش که نشان دهنده تاثیر مرگ سلولی عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای بر سلول‌های سرطانی بود مطابقت دارد.

دستجودی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تأثیر تیموکینون بر بیان ژن *P53* و پیامد آپوپتوز در سرطان پستان را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تیموکینون می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 از طریق افزایش بیان *P53* با روشی وابسته به زمان القا کند (۱۹). در مطالعه

حاضر نیز مانند پژوهش دستجردی و همکارانش، عصاره گیاه توانست آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی از طریق افزایش بیان ژن *P53* به صورت وابسته به دوز و زمان افزایش دهد.

در مطالعه‌ای فیضی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها و عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی اندام هوایی گیاه دارویی *Scutellaria pinnatifida* را بررسی کردند. نتایج حاصله وجود فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و عدم وجود ساپونین‌ها و تانین‌ها را تایید کرد. هم‌چنین مشخص شد که عصاره گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (۹). مانند پژوهش فیضی و همکاران، وجود فلاونوئیدها و عدم وجود ساپونین و تانین نیز در مطالعه حاضر تایید شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره *Scutellaria pinnatifida* نیز در مطالعه حاضر بررسی شد و نتیجه گرفته شد این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است. در مطالعه‌ای که Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، اثرات *Scutellaria barbata* بر زنده ماندن سلول‌های سرطان تخمدان را بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که *Scutellaria barbata* باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان و ایجاد آپوپتوز و کاهش متاستاز می‌شود (۲۰). در پژوهش دیگری wei و همکارانش در سال ۲۰۱۷ اثر عصاره *Scutellaria barbata* بر رشد سرطان روده بزرگ را بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره به‌طور وابسته به دوز باعث کاهش زنده ماندن سلول HT-29 می‌شود (۲۱). یافته‌های Zhang و همکارانش و پژوهش wei و همکارانش همانند مطالعه حاضر نشان می‌دهد گیاهان جنس *Scutellaria* می‌توانند به صورت وابسته به دوز باعث القا اثر کشندگی و سمیت روی تکثیر سلول‌های سرطانی شوند و سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردند.

Hu و همکارانش در سال ۲۰۱۹ تأثیر عصاره *Scutellaria barbata* را بر آپوپتوز و تکثیر سلول‌های سرطانی ریه بررسی کردند. مشاهدات آن‌ها نشان داد که

توقف چرخه سلولی و آپوپتوز به تدریج با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد (۲۲). پژوهش Hu و همکاران نیز همانند مطالعه حاضر نشان می‌دهد گیاهان جنس *Scutellaria* می‌توانند اثر کشندگی و سمیت روی تکثیر سلول‌های سرطانی داشته باشند و این اثر وابسته به دوز است.

در مطالعه دیگری پارسافر و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نئوبایکالترین را از *Scutellaria pinnatifida* خالص کردند و ویژگی محافظت در برابر نورون این ترکیب را در بیماری پارکینسون بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند نئوبایکالترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد (۲۳). یافته پژوهش حاضر با نتایج مطالعه پارسافر و همکاران که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه را نشان داد نیز مطابقت دارد. بر اساس نتایج حاصل ترکیبات موجود در عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و سمیت علیه سلول‌های سرطان کلیه می‌باشند که وابسته به دوز و زمان می‌باشد. نتیجه دیگری که از این پژوهش گرفته شد اثر عصاره گیاه بر بیان ژن‌های *P53* و *CDK2* است که ژن‌های موثر در سرطان و درگیر در چرخه سلولی هستند. یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره این گیاه می‌تواند اثر ضد سرطانی داشته و سلول‌های سرطانی ACHN را از بین ببرد. تغییرات بیان ژن *P53* و *CDK2* در سلول ACHN نشان‌دهنده آن است که عصاره این گیاه احتمالاً چرخه سلولی را در سلول‌های سرطانی کلیه مختل کرده و از این طریق باعث کاهش بقای این سلول‌ها می‌گردد. بنابراین می‌تواند به عنوان ترکیبی با خواص ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد.

از آنجایی که این گیاه به واسطه فیتوکمیکال‌های موجود مورد توجه قرار گرفته است و این گونه، گونه ایرانی از گیاه می‌باشد، لذا می‌تواند پس از انجام مطالعات تکمیلی و تأیید نهایی به‌طور گسترده مورد پرورش و استفاده قرار گیرد. البته یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر این است که کل عصاره

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا پاکروان با کد اخلاق IR.ACECR.JDM.REC.1400.045 است.

حاصل از گیاه مورد بررسی قرار گرفت و امکان تخلیص اجزا وجود نداشت.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References

- Harrison H, Thompson RE, Lin Z, Rossi SH, Stewart GD, Griffin SJ, et al. Risk Prediction Models for Kidney Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol Focus* 2020; 7(6): 1380-1390.
- Scelo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36(36): 3574-3581.
- Graham J, Dudani S, Heng DYC. Prognostication in Kidney Cancer: Recent Advances and Future Directions. *J Clin Oncol* 2018; JCO2018790147.
- Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap Med Fac Palacky Univ Olomouc Czech Repub* 2016; 160(2): 183-194.
- Kankuri-Tammilehto M. Genetic Susceptibility to Kidney Cancer. *Evolving Trends in Kidney Cancer* 2020.
- Gezici S, Şekeroğlu N. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *AntiCancer Agents Med Chem* 2019; 19(1): 101-111.
- Shen J, Li P, Liu S, Liu Q, Li Y, Sun Y, et al. Traditional uses, Clinical studies, and Ten-years Research Progress in Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Scutellaria*. *J Ethnopharmacol* 2020; 265: 113198.
- Boozari M, Mohammadi A, Asili J, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Growth inhibition and apoptosis induction by *Scutellaria pinnatifida* A. Ham. on HL-60 and K562 leukemic cell lines. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 39(1): 307-312.
- Feyzi P, Ahmadzadeh Sani T, Kamali H, Alesheikh P, Zarghami moghaddam P, Mohammadi A. Evaluation of qualitative and quantitative of antocyanines, carotenoids, flavonoids and antioxidant activity of methanol extract from aerial parts of *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt subsp alpina (Bornm) Rech.f. *Journal of North Khorasan University* 2015; 7(3): 645-655.
- EghbaliFeriz S, Taleghani A, Tayarani-Najaran Z. *Scutellaria*: Debates on the anticancer property. *Biomed Pharmacother* 2018; 105: 1299-1310.
- Tadesse S, Anshabo AT, Portman N, Lim E, Tilley W, Caldon CE, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy. *Drug Discovery Today* 2020; 25(2): 406-413.
- Gupta A, Shah K, Oza MJ, Behl T. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 484-492.
- Gholamian, Nikunhad Lotfabadi, Haghair al-Sadat. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of liposomes containing pineapple fruit extract on melanoma skin cancer (A375 cell line). *Scientific research monthly of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd*. 2020; 28(2): 2411-2424.

14. assanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* 2017; 4(4): 127-129.
15. Velavan S. Phytochemical techniques-a review. *World Journal of Science and Research* 2015; 1(2): 80-91.
16. Delazar A, Nazemiyeh H, Afshar FH, Barghi N, Esnaashari S, Asgharian P. Chemical compositions and biological activities of *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt aerial parts. *Res Pharm Sci* 2017; 12(3): 187-195.
17. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci* 2021; 22(7): 3380.
18. Mohammadi A, Asili J, Emami S, Mighani H, Bibak B. Phytochemical investigation on *Scutellaria pinnatifida* roots. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*. 2013; 4(5): 93-101.
19. Dastjerdi MN, Mehdiabady EM, Iranpour FG, Bahramian H. Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line. *Int J Prev Med* 2016; 7: 66.
20. Zhang L, Ren B, Zhang J, Liu L, Liu J, Jiang G, et al. Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterisation. *J Ethnopharmacol* 2017; 206: 184-192.
21. Wei L-h, Lin J-m, Chu J-f, Chen H-w, Li Q-y, Peng J. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits colorectal cancer growth via suppression of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Chin J Integr Med* 2017; 23(11): 858-863.
22. Hu Z, Jing D. Anti-proliferation effect of *Scutellaria barbata* D. Don extract on lung cancer. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2019; 18(9): 1867-1872.
23. Parsafar S, Nayeri Z, Aliakbari F, Shahi F, Mohammadi M, Morshedi D. Multiple neuroprotective features of *Scutellaria pinnatifida*-derived small molecule. *Heliyon* 2020; 6(8): e04737.