ORIGINAL ARTICLE

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 Pakravan[1]
Narges Nikoonahad Lotfabadi[2]
Seyed Mohsen Miresmaeili[2]

[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, asteroids, 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 pinnatifid*, kidney cancer, cell cycle, *P53* gene, *CDK2* gene

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

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

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ۲۳۰ اسفند سال ۱۴۰۲ (۳۹-۲۸)

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 روش‌هایی مانند جراحی، شیمی درمانی، ایمونوتراپی و غیره استفاده می‌شود که عوارض زیادی ایجاد می کنند، بنابراین سعی می‌شود از روش‌هایی نظیر ترکیبات گیاهی که عوارض کم‌تری دارند، استفاده شود. گیاهان دارویی ترکیبات بسیاری دارند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده و در نتیجه از پیشرفت سرطان جلوگیری می کنند و فعالیت های ضد التهابی، ضد توموری و ضد جهش‌زایی نیز دارند. با توجه به اهمیت تغییراتی که در عملکرد ژن ها خصوصا ژن‌های حیاتی طی سرطان رخ می‌دهد، در این مطالعه ژن‌های درگیر در چرخه سلولی شامل *P53* و *CDK2* بررسی شدند. هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria pinnatifida*) بر بقاء و میزان بیان ژن های درگیر در چرخه سلولی (*P53* و *CDK2*) در سرطان کلیه بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* به روش خیساندن تهیه و وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره به‌صورت کیفی بررسی گردید. سلول‌های ACHN سرطان کلیه کشت داده شدند. اثر سایتوکسیک عصاره با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰و ۶۲/۵ µg/ml به روش MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide) که یک روش رنگ سنجی برای بررسی تکثیر و بقای سلول‌ها است، در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. سپس استخراج RNA از سلول‌های در معرض تیمار با غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ µg/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 ژن‌های *P53* و *CDK2* با استفاده از Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره از تست DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl) استفاده گردید که بر اساس اندازه‌گیری ظرفیت مهار آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به آن است.

یافته‌ها: طبق نتایج به دست آمده از تست‌های فیتوشیمیایی، عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای حاوی فلاونوئید، تری‌ترپنوئید، آستروئید، استرول و گلیکوزید می‌باشد، اما فاقد آلکالوئید، تانین و ساپونین است. تست MTT نشان داد که عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* بر روی سلول‌های ACHN اثر کشندگی دارد و این اثر وابسته به دوز و زمان است. با کاهش غلظت عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و با افزایش طول مدت تیمار از ۲۴ تا ۷۲ ساعت، میزان بقا در سلول‌های سرطانی کلیه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. Real Time PCR نیز افزایش بیان ژن *P53* و کاهش بیان ژن *CDK2* را در سلول‌های ACHN تحت تیمار با عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* را نشان داد. تغییرات بیان نیز وابسته به دوز و زمان بود. تست آنتی‌اکسیدانی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره را تایید کرد و نشان داد خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه وابسته به غلظت است. سطح معنی‌داری در این مطالعه کم‌تر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) بود.

استنتاج: یافته های این مطالعه نشان می‌دهند که عصاره گیاه *Scutellaria pinnatifida* 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 گیاه *Scutellaria pinnatifida* احتمالاً چرخه سلولی را در سلول‌های سرطانی کلیه مختل کرده و از این طریق باعث کاهش بقای این سلول‌ها می گردد، بنابراین می‌تواند به عنوان ترکیبی با خواص ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد.

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

مولف مسئول: نرگس نیکونهاد لطف- یزد: بلوار دانشجو، دانشگاه علم و هنر، دانشکده علوم پایه E-mail: nikoonahad@sau.ac.ir
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

سرطان کلیه یکی از سرطان‌های شایع در سراسر جهان است و پیش‌بینی می‌شود در سال‌های آینده بروز آن افزایش یابد(۱). شیوع این بیماری در مردان دو برابر بیشتر از زنان است(۲).

شایع‌ترین نوع سرطان که از کلیه منشأ می گیرد RCC (renal cell carcinoma) است(۳). RCC سومین بدخیمی رایج در دستگاه ادراری- تناسلی است(۴). سرطان‌های کلیوی ارثی ۸-۵ درصد از کل سرطان‌های کلیه را تشکیل می‌دهند(۵). برای درمان سرطان از روش‌هایی 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، درمان‌های ضد سرطان گیاهی معرفی می‌شوند. گیاهان دارویی ترکیبات بسیاری دارندکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده و در نتیجه از پیشرفت سرطان جلوگیری می کنند و فعالیت‌های ضد التهابی، ضد توموری و ضد جهش زایی نیز دارند(۶).

Scutellaria گیاهی، بوته‌ای و درختچه‌ای 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 گونه‌های ایرانی گونه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria pinnatifida*) است که دارای پنج زیرگونه است که زیرگونه *Scutellaria pinnatifida subsp. mucida* بومی ایران است(۸). در طب سنتی از این گیاه به‌عنوان دارویی با خاصیت ضد التهاب و ضد درد استفاده می‌شود(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 مواد طبیعی این گیاه جدا شده و به عنوان اجزای ضد سرطان از گیاه پیشنهاد شد(۱۰).

کیناز وابسته به سیکلین 2 (*CDK2*) نقشی اساسی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می کند که در بسیاری از سرطان‌های انسانی از تنظیم خارج شده‌اند. شواهد جدید نشان می‌دهد مهار *CDK2* باعث ایجاد فعالیت ضد توموری در زیر مجموعه‌ای از تومورها با ویژگی‌های ژنتیکی مشخص می‌شود(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 می‌شود، این ژن یک هدف جذاب و جدید برای درمان سرطان است. بنابراین، فعال‌سازی 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 خصوصا مواد موثره طبیعی موجود در آن‌ها برای کاربرد در موارد متعدد خصوصاً در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان می‌باشد. گیاه بشقابی سنبله‌ای یکی از گیاهانی است که دارای ترکیبات فیتوکمیکال موثری جهت کاربردهای درمانی می‌باشد. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria pinnatifidaa*) بر بقاء و میزان بیان ژن‌های درگیر در چرخه سلولی (*P53* و *CDK2*) در سرطان کلیه بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مطالعه تجربی- آزمایشگاهی است.

جمع آوری و عصاره گیری

گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria pinnatifida* subsp.*mucida*) در موقعیت گیلان، شهرستان رودبار، رستم‌آباد، شهر توتکابن، جاده توتکابن به داماش در

ارتفاع ۲۲۷ متر از سطح دریا با مختصات 36°52’45’’N, 49°32’18’’E جمع‌آوری شده و براساس شناسایی انجام شده در دانشگاه تهران، دارای کد هرباریومی 45950-TUH می‌باشد.

ابتدا گیاه در دمای اتاق و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه به‌وسیله آسیاب پودر شدند. عصاره گیری به روش خیساندن بخش‌های 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 ۳۷ °C خیسانده شد).

تست‌های فیتوشیمیایی

برای بررسی وجود یا عدم وجود ترکیبات شیمیایی در عصاره تهیه شده تست‌های 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 آن‌ها اضافه شد. ایجاد مجدد رنگ زرد نشان دهنده‌ی 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، قهوه‌ای 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 بیان‌گر وجود آلکالوئید در عصاره بود و در غیر این صورت عصاره فاقد آلکالوئید بود.

۵۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۱۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر کلروفرم حل و فیلتر گردید. سپس اسیدسولفوریک به آن افزوده شد. تشکیل رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای در لایه‌های پایین‌تر وجود استروئید را تایید و در غیر این صورت عصاره فاقد این ترکیبات بود.

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

برای بررسی وجود استرول، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد. سپس به‌آرامی اسیدسولفوریک غلیظ به محلول‌ها اضافه شد. ایجاد رنگ قهوه‌ای نشانه وجود و در غیر این صورت عدم وجود استرول بود.

۳۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال ترکیب شد سپس ۱ قطره محلول FeCl ۵ درصد و چند قطره اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. تشکیل رنگ قهوه‌ای در وسط و رنگ سبز آبی در لایه فوقانی وجود ترکیبات گلوکوزیدی در عصاره را نشان می‌داد.

تهیه و کشت سلول

این مطالعه در شرایط in vitro و بر روی سلول‌های 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 سلول‌ها 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 آنتی‌بیوتیک

پنی‌سیلین/استرپتومایسین (PEN/STREP) (شرکت Bioidea، ایران) درانکوباتور (شرکت Shel Lab، آمریکا) ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 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 سلول ها 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 مجددا پلیت به مدت یک و نیم ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس جذب چاهک‌ها به‌وسیله الایزا ریدر (شرکت ویراژن، ایران) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد زنده مانی سلول ها به کمک فرمول زیر(۱۳) محاسبه گردید.

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

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 غلظت های 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 کمیت RNA

به منظور بررسی غلظت و کمیت RNA های استخراج شده از نانو دراپ (اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل ScanDrop^2، 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 DNAو RNA استفاده می شود.

سنتز cDNA

برای ساخت cDNA از RNAهای 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 Housekeepng Gene) یک جفت پرایمر اختصاصی (شامل Forward و Reverce) 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.

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

نام ژن	توالی (۳' → ۵')	TM (°C)	تعداد باز
CDK2-F	GGATGCCTCTGCTCTCACTG	63	۲۰
CDK2-R	CTGAGGTTTAAGGTCTCGGTGG	64	۲۲
TP53-F	TAGTGTGGTGGTGCCCTATG	60	۲۰
TP53-R	GCCCATGCAGGAACTGTTAC	60	۲۰
ActinB-F	GAGCATCCCCCAAAGTTCACA	61	۲۱
ActinB -R	GGGACTTCCTGTAACAACGCA	61	۲۱

بررسی بیان ژن با استفاده از واکنش PCR (qPCR) quantitative Real-time

برای بررسی بیان ژن های *P53* و *CDK2* از Real-time PCR (شرکت Analytik jena، آلمان) استفاده شد. جهت انجام این تست از غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ µg/ml از تیمار در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده گردید. به کمک CT های به‌دست آمده از واکنش Real-time PCR میزان تغییرات بیان ژن ها (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 رادیکال های آزاد استفاده می‌شود. در این تست مقدار ۰/۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ µg/ml) با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۰۰۴ درصد مخلوط گردید. برای محلول کنترل ۳/۹ میلی لیتر محلول متانولی DPPH با ۰/۱ میلی‌لیتر 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.

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

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 نرم افزار GraphPad Prism (Ver. 8) انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون های ANOVA و Student t-test استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در گروه زیست شناسی 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، تری ترپنوئید، آستروئید، استرول و گلیکوزید می‌باشد، اما فاقد آلکالوئید، تانین و ساپونین است. نتایج در جدول شماره ۲ درج شده است.

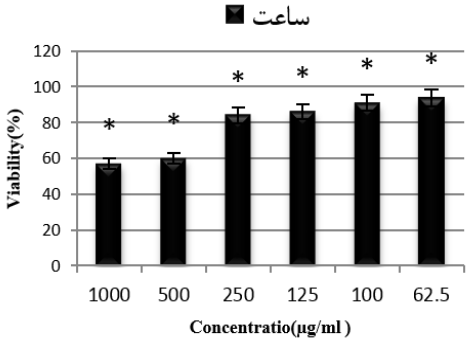
جدول شماره ۲: نتایج تست های فیتوشیمیایی

ترکیب موجود در گیاه	وجود (+)	عدم وجود(-)
فلاونوئید	+	
تری ترپنوئید	+	
آلکالوئید		-
تانین		-
آستروئید	+	
ساپونین‌ها		-
استرول	+	
گلیکوزید	+	

میزان زنده مانی 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

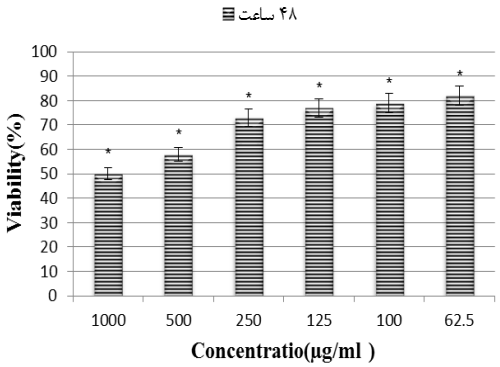
طورکه در نمودار مشخص است با کاهش غلظت عصاره، درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافته و کشندگی سلول‌ها به دوز استفاده شده وابسته است. غلظت ۶۲/۵ µg/ml کم‌ترین کشندگی و غلظت ۱۰۰۰ µg/ml بیش‌ترین کشندگی را دارد.



نمودار شماره ۱: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده مانی سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۲۴ ساعت در غلظت های متفاوت

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

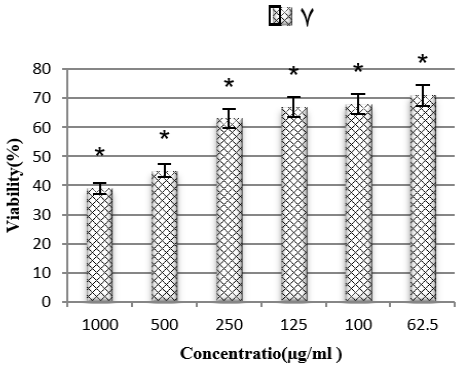
نمودار شماره ۲ اثر عصاره گیاه روی سلول‌های سرطان کلیه بعد از ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج این زمان نیز مثل زمان قبل است و با کاهش غلظت عصاره، درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافته است.



نمودار شماره ۲: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده مانی سلول های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۴۸ ساعت در غلظت های متفاوت.

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد (P<۰/۰۵).

نمودارشماره۳ اثر عصاره گیاه روی سلول‌های سرطان کلیه بعد از ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. همان طورکه در نمودار قابل مشاهده است در این زمان نیز مانند دو زمان قبلی با کاهش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافته است.



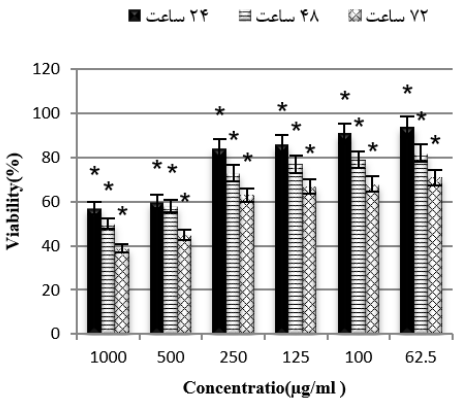
نمودار شماره ۳: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده مانی سلول های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا بعد از ۷۲ ساعت در غلظت های متفاوت

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

همان‌طورکه در نمودار شماره ۴ مشخص است در هر سه زمان با کاهش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافته و میزان کشندگی درسلول‌های سرطانی کلیه به دوز استفاده شده وابسته است. همچنین در طی هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار، غلظت ۶۲/۵ µg/ml کم‌ترین مقدار کشندگی و غلظت ۱۰۰۰ µg/ml، بیش‌ترین مقدار کشندگی را دارد. هم‌چنین با افزایش زمان درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) 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.



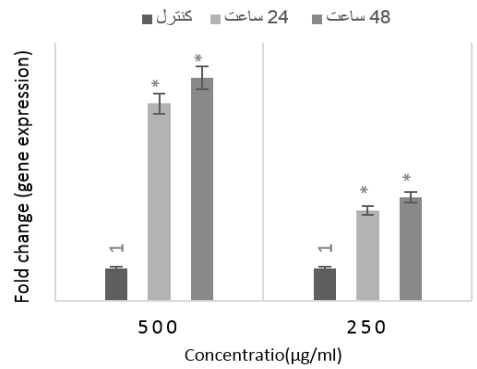
نمودار شماره ۴: اثر عصاره *Scutellaria pinnatifida* بر روی زنده مانی سلول‌های سرطان کلیه (رده ACHN). درصد بقا در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت
* اختلاف معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد (P<۰/۰۵).

جدول شماره ۳: نتایج اندازه گیری غلظت RNA به کمک نانودراپ

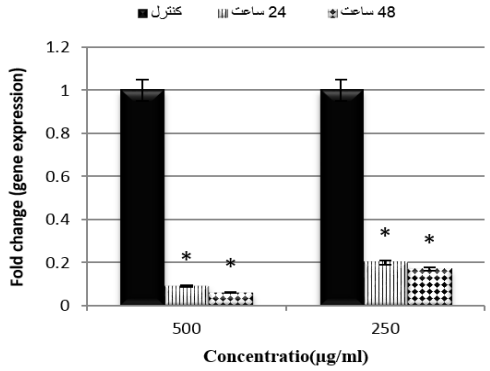
زمان/غلظت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کنترل	۱۴۸۰	۱۴۵۰/۶۲
غلظت ۵۰۰	۸۱۷/۲۹	۲۹۴/۵
غلظت ۲۵۰	۹۷۵/۹۹	۴۴۵/۶۴

ارزیابی تغییرات بیان ژن های P53 و CDK2

نمودارهای شماره ۵ و ۶ به‌ترتیب 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<۰/۰۵) افزایش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان ژن *P53* در هر غلظت افزایش بیش‌تری یافته است.



نمودارشماره 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<۰/۰۵).

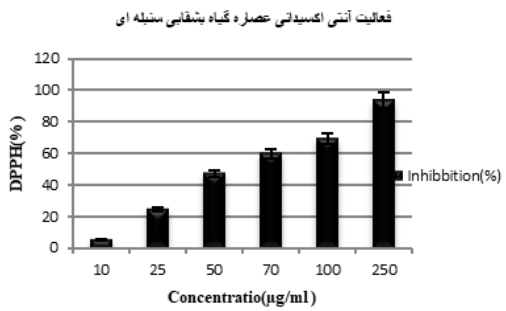


نمودارشماره ۶: تغییرات بیان ژن *CDK2* پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف و طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد(P<۰/۰۵).

CDK2 نیز ژنی است که درچرخه 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<۰/۰۵) کاهش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان ژن *CDK2* در هر غلظت کاهش بیش‌تری یافته است.

ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل ازتست DPPH که خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره را ارزیابی می‌کند در نمودار شماره ۷ قابل مشاهده می‌باشد. مقدار IC_{50} به‌دست آمده ۵۲/۶۴ است. همان‌طور که مشخص است خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه وابسته به غلظت است. بیش‌ترین درصد مهار DPPH (بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی) متعلق به غلظت ۲۵۰ µg/ml است و کم‌ترین درصد مهار DPPH (کم‌ترین خاصیت آنتی اکسیدانی) متعلق به غلظت ۱۰ µg/ml است.



نمودار شماره۷: فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای در غلظت‌های متفاوت

بحث

سرطان، دومین علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و شیوع آن درحال افزایش است. بنابراین یک مشکل جدی و ۷۲ شده و این کشندگی وابسته به دوز و زمان بود. در می‌باشد(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 ازترکیبات 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 می دهند(۷). یکی از گونه‌های ایرانی از این جنس، گونه *Scutellaria pinnatifida* است(۸)، که حاوی فلاونویید 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($P<۰/۰۵$) افزایش یافته است.

درمطالعه حاضر ژن‌های درگیر درچرخه 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($P<۰/۰۵$) 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($P<۰/۰۵$) کاهش یافته است. با افزایش زمان نیز بیان در هر غلظت کاهش بیشتری یافته است.

در این مطالعه خواص‌آنتی‌اکسیدانی 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 وهمکارانش 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. آن ها 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.

دستجردی وهمکارانش درسال 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 درسال 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 اثرکشندگی و سمیت روی تکثیر سلول‌های سرطانی داشته باشند و این اثر وابسته به دوز است.

در مطالعه دیگری پارسافر و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نئوبایکالئین را از *Scutellaria pinnatifida* خالص کردند و ویژگی محافظت در برابر نورون این ترکیب را در بیماری پارکینسون بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند نئوبایکالئین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد(۲۳). یافته پژوهش حاضر با نتایج مطالعه پارسافر و همکاران که فعالیت آنتی اکسیدانی 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 تائید نهایی به‌طور گسترده مورد پرورش و استفاده قرار گیرد. البته یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر این است که کل عصاره

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

تعارض در منافع: وجود ندارد.

سپاسگزاری

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

References

1. 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.
2. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. J Clin Oncol 2018; 36(36): 3574-3581.
3. Graham J, Dudani S, Heng DYC. Prognostication in Kidney Cancer: Recent Advances and Future Directions. J Clin Oncol 2018: JCO2018790147.
4. 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.
5. Kankuri-Tammilehto M. Genetic Susceptibility to Kidney Cancer. Evolving Trends in Kidney Cancer 2020.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. EghbaliFeriz S, Taleghani A, Tayarani-Najaran Z. Scutellaria: Debates on the anticancer property. Biomed Pharmacother 2018; 105: 1299-1310.
11. 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.
12. 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.
13. Gholamian, Nikunhad Lotfabadi, Haghir 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.