

In Vitro Evaluation of the Effects of Astragalus brachycalyx Fisch. Root Methanolic Extract on B16-F10 Cells in Relation to Its Phytochemical Properties

Fatemeh Akbari¹,
 Mohammad Azadbakht²,
 Fatemeh Ebrahimi³,
 Zahra Mahdizadeh⁴,
 Ali Bagheri⁵,
 Setayesh Razavi⁶

¹ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD in Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

⁶ Student Research Committee, School of Pharmacy, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received July 27, 2024; Accepted July 2, 2025)

Abstract

Background and purpose: Skin cancer is a highly prevalent disease, affecting approximately 1 in 33 individuals with fair skin. Melanoma, one of the most aggressive forms of skin cancer, arises from melanin-producing cells known as melanocytes. This study aims to investigate the effect of *Astragalus brachycalyx* on melanoma cells in vitro, with a particular focus on its phytochemical properties.

Materials and methods: In this experimental study, the methanolic root extract was prepared using the maceration method, and total flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method. Genistein content was quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). To evaluate the effect of the extract, a scratch assay was performed on B16-F10 cells. Extract concentrations of 125, 62.5, 32.25, and 16.5 ppm were tested in separate culture media and compared with media lacking the extract (control group). Data were analyzed using a two-way mixed-model ANOVA, and multiple comparisons were performed using Bonferroni post hoc analysis. A P-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results: The total flavonoid content of *Astragalus brachycalyx* root was 0.0454 g per gram of root, and the genistein content in the plant powder was 1.1%. Treatment of B16-F10 cells with 500 ppm of the methanolic extract resulted in significant cell death within 24 hours ($P < 0.001$). Additionally, the extract at 125 ppm caused a significant increase in scratch area ($P < 0.0001$), indicating inhibition of cell growth compared to the control group ($P < 0.001$).

Conclusion: The in vitro results demonstrate that *Astragalus brachycalyx* exhibits rapid and potent cytotoxic effects on B16-F10 melanoma cells.

Keywords: *Astragalus*, Inhibition of cancer cells, Cell death, B16-F10

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (248): 74-81 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

ارزیابی برون تنی اثر عصاره متانولی ریشه *Astragalus brachycalyx* Fisch. بر سلول های B16-F10 بر اساس خصوصیات فیتوشیمیایی

فاطمه اکبری^۱
محمد آزادبخت^۲
فاطمه ابراهیمی^۳
زهرا مهدی زاده^۴
علی باقری^۵
ستایش رضوی^۶

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پوست یکی از بیماری ها با شیوع بالا است که میزان ریسک ابتلا به آن یک نفر در هر ۳۳ نفر با پوست سفید است. ملانوما یکی از خطرناک ترین سرطان های پوست است و از تغییرات سلول های تولیدکننده ملانین ایجاد می شود. این مطالعه اثر *Astragalus brachycalyx* را بر سلول های سرطانی ملانوما در شرایط برون تنی با تمرکز بر خصوصیات فیتوشیمیایی بررسی می کند.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر، عصاره متانولی ریشه با روش ماسراسیون تهیه شد و میزان فلاونوئید تام با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و میزان ژنیستین با HPLC، اندازه گیری شد. برای ارزیابی اثر عصاره، تست خراش بر سلول های B16-F10 انجام شد و غلظت های ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۲/۲۵، ۱۶/۵ ppm از عصاره در محیط های کشت جداگانه بررسی و با محیط های کشت فاقد عصاره (گروه کنترل) مقایسه شدند. داده ها با استفاده از مدل مخلوط دو طرفه ی ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه چند گانه توسط تحلیل تعقیبی Bonferroni انجام شد. P کم تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: مقدار فلاونوئید تام ۰/۴۵۴ گرم در هر ۱ گرم ریشه *Astragalus brachycalyx* بود. میزان ژنیستین ۱/۱ درصد در پودر گیاه بود. تغییرات مساحت خراش با غلظت ۵۰۰ ppm از عصاره متانولی ریشه *Astragalus brachycalyx* در رده سلولی B16-F10 طی ۲۴ ساعت به طور معنی داری مرگ سلولی را نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). هم چنین عصاره با غلظت ۱۲۵ ppm افزایش قابل توجه در مساحت خراش ها (با محدود کردن رشد سلولی) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). **استنتاج:** براساس نتایج برون تنی *Astragalus brachycalyx* دارای سمیت بالا و اثر سریع بر B16-F10 است.

واژه های کلیدی: *Astragalus*، مهار رشد سلول سرطانی، مرگ سلولی، B16-F10

E-mail: azadbakhtm@hotmail.com

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. استادیار، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
 ۲. استاد، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. دکترای تخصصی، گروه رادیوفارمسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. دانشجو کمیته تحقیقات دانشجویی، داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. دانشیار، گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
 ۶. دانشجو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۵/۲۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۴/۱۱

مقدمه

سرطان پوست یکی از بیماری‌های شایع است که به طور مستقیم بر کیفیت زندگی جامعه تأثیر می‌گذارد. تمام لایه‌های پوست می‌توانند به سلول‌های سرطانی تبدیل شوند (۱). ملانوما نوعی سرطان است که از سلول‌های مشتق از ستیغ عصبی تولید کننده ملانین و ملانوسیت‌ها آغاز می‌شود و یکی از انواع جدی سرطان پوست است (۲). ملانوما در اشکال، رنگ‌ها و اندازه‌های مختلفی ظاهر می‌شود که هشدار بر وجود ملانوما هستند (۳). درصد ابتلا به سرطان پوست در ایران ۱۳/۱ درصد است. ولی این سرطان هم‌چنان شایع‌ترین سرطان کشور می‌باشد. میزان بروز آن در زنان و مردان به ترتیب برابر ۶۵/۹ و ۵۹/۱ است (۴).

در سال ۲۰۲۲، ۹۹۷۸۰ مورد جدید ملانوما در ایالات متحده آمریکا تشخیص داده شد که ۵۷/۳ درصد مردان و ۴۲/۶۹ درصد زنان بودند و از این میزان در جمعیت حدود ۷/۶۶ درصد احتمال مرگ وجود دارد (۶۶/۴۰ درصد مردان و ۳۳/۵۹ درصد زنان) (۵). علاوه بر آن، تقریباً ۹۸ درصد از موارد مبتلا در صورت تشخیص زود هنگام ملانوما، شانس دیدن ۵ سال آینده خود را دارند. عوامل خطر ایجاد ملانوما شامل ژنتیک، قرار گرفتن در معرض آفتاب، تابش UV و فاکتورهای خانوادگی و وراثتی است. هم‌چنین، میزان بروز سرطان پوست در نژاد سفیدپوست (غربی) بسیار بیش‌تر از انواع دیگر رنگ پوست است. درمان ملانوما به عوامل مختلفی از جمله مرحله بیماری و محل سلول‌های سرطانی بستگی دارد و شامل جراحی، ایمونوتراپی، شیمی درمانی و پرتو درمانی است.

رده سلولی B16-F10 یک رده سلولی ملانومای موشی است که برای بررسی مدل ملانومای متاستاتیک استفاده می‌شود. از نظر مورفولوژیکی، این رده سلولی دوکی شکل است و در محیط کشت سلولی به صورت یک جمعیت چسبنده با مورفولوژی اپیتلیالی ظاهر می‌شود (۶). ملانومای متاستاتیک یک بیماری تهدید

کننده حیات است. عدم پاسخ به پرتو درمانی و شیمی درمانی، نیاز جدی به درمان‌های جدید را برجسته می‌کند. در مطالعه حاضر، اثر کشنده *Astragalus brachycalyx* در ارزیابی شد. این گیاه متعلق به خانواده *Astragalus* است که یکی از بزرگ‌ترین گونه‌های پراکنده در سراسر جهان است و حدود ۸ درصد پوشش گیاهی ایران را گونه‌های گون تشکیل داده‌اند (۷). عمده ترکیبات موجود در ریشه آن شامل پلی ساکارید، ساپونین و فلاونوئیدها به خصوص ایزوفلاونوئیدها می‌باشد و از ریشه آن به طور سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و شرایطی نظیر درمان اختلالات ایمنی، عفونت‌های ویروسی، لوسمی، نفريت و سرطان رحم کمک کننده هستند (۹-۷). هدف این مطالعه بررسی اثر *Astragalus brachycalyx* بر رده سلولی B16-F10 با تست خراش سلولی است.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر با کد اخلاق IR.MAZUMS. REC.1400.330 به بررسی اثر مهار رشد و مرگ سلولی عصاره گیاه *A. brachycalyx* بر سلول‌های ملانوما موشی B16-F10 پرداخت.

جمع‌آوری و عصاره‌گیری از گیاه

گیاهان از مناطق رشد این گونه گیاهی در بخش‌های غربی استان اصفهان، کوه‌های اطراف چغیورت (عرض جغرافیایی ۵۸°۳۲' شمالی، طول جغرافیایی ۵۰°۱۰' شرقی) جمع‌آوری و توسط متخصص سیتوماتیک گیاهی و با مطالعات مربوطه شناسایی شدند. نمونه‌های هرباریومی تهیه در هرباریوم دانشگاه اصفهان (HUI) نگهداری شدند. عصاره‌گیری با ۵۰۰ گرم ریشه *A. brachycalyx* با روش خیساندن با متانول خالص در دمای محیط به مدت ۳ روز استخراج شد و عصاره تحت خلأ با روتاری اواپراتور و سپس دستگاه فریز دایر خشک گردید. عصاره در ظرفی قرار داده شد و در فریزر -۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷).

بررسی فیتوشیمیایی گیاهان تعیین فلاونوئید تام

برای ارزیابی میزان فلاونوئید کل از روش آلومینیوم کلرید استفاده شد. ۱ میلی لیتر از عصاره با ۱ میلی لیتر محلول متانلی ۲ درصد آلومینیوم کلرید مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه در طول موج ۴۱۵ نانومتر جذب نمونه با دستگاه UV-Visible تعیین شد و براساس کوئرتستین بیان شد (۱۰).

آنالیز HPLC ژنیستین در عصاره

تعیین ایزوفلاون ها مانند روش مطالعه Akbari انجام شد (۱۱). در این روش، از ستون C18 با ابعاد ۵۳×۷ میلی متر استفاده شد. سیستم حلال گرادیان آب-اسید استیک (۱ لیتر آب دیونیزه به همراه ۱٫۲ میلی لیتر اسید استیک) و استونیتریل استفاده شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و استونیتریل از ۰ تا ۱۲ درصد در ۶ دقیقه افزوده شد و سپس از ۲۳ درصد به ۱۰۰ درصد در ۱۵ دقیقه افزایش یافت. سرعت جریان حلال ها ۲٫۵ میلی لیتر بر دقیقه در طول موج ۲۸۰ نانومتر با آشکارساز UV تنظیم شد. استاندارد ژنیستین (استاندارد خارجی) و استاندارد مخلوط با عصاره (استاندارد داخلی) به طور جداگانه به سیستم تزریق شدند تا مقدار این ترکیب در گیاه مقایسه و اندازه گیری شود.

کشت سلولی

برای این منظور رده سلولی B16-F10 در محیط کشت RPMI-1640 با مواد مکمل شامل ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱ درصد مخلوط آنتی بیوتیک/آنتی مایکوبیک، 0.01 M HEPES، 0.02 M L-glutamine و 0.001M پیرووات سدیم نگهداری شد. سپس در انکوباتور (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، محیط مرطوب با ۵ درصد CO2) انکوبه شد (۱۲).

تست تغییرات مساحت خراش

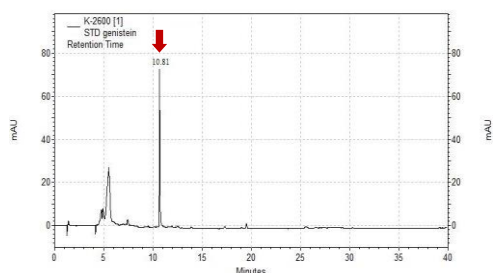
تغییرات مساحت خراش، مهار رشد و مرگ سلولی به روش برون تنی عصاره با تست ترمیم خراش ارزیابی

شد (۱۳، ۱۴). سلول های B16-F10 در ۶ چاهک از پلیت های ۱۲ چاهکی، در شرایط ذکر شده، کشت داده شدند تا از سلول ها بافت یک لایه و یکنواخت در هر پلیت ایجاد شود. پس از چسبندگی سلول ها به پلیت، محیط کشت از چاهک حذف شد و یک خراش مرکزی با نوک میکروپیپت ۲۰۰ p ایجاد شد. پس از خراشیدن، چاهک ها با PBS شستشو داده شدند تا سلول های غیر چسبیده و باقی مانده سلول ها حذف شوند. غلظت های ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۲٫۲۵، ۱۶٫۵ ppm عصاره *Astragalus* در RPMI-1640 حل و به چاهک ها اضافه شدند. در گروه کنترل تنها محیط کشت RPMI-1640 مورد استفاده قرار گرفت. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه (۵ درصد CO2) انکوبه شدند و به کمک میکروسکوپ در ابتدای آزمایش (0 h)، ۲، ۴ و ۶ ساعت از شروع آزمایش با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند. مرگ و میر، تغییر ظاهر سلول و خراش مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳). مساحت خراش به وسیله نرم افزار IC meseure ورژن 3.0.0.503۲ اندازه گیری شد.

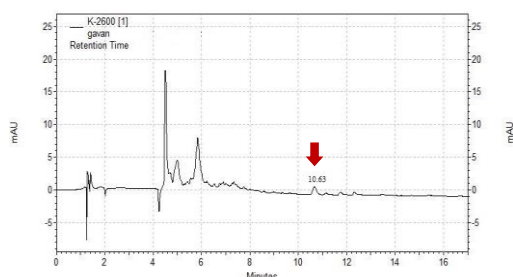
داده ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۵/۰۱) تجزیه و تحلیل شد. داده های گروه های مختلف با استفاده از مدل مخلوط دو طرفه ANOVA (two-way mixed-model ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه چندگانه توسط تحلیل تعقیبی Bonferroni انجام شد. داده ها به عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد و P کم تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها و بحث

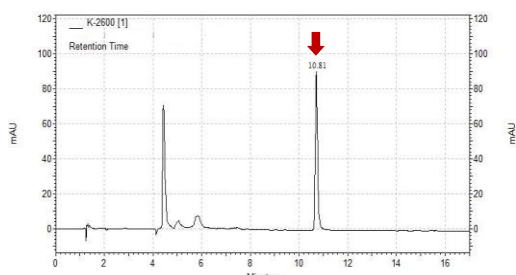
مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره *A. brachycalyx* بر سلول های B16-F10 به روش خراش سلولی پرداخت و نشان داد که این گیاه می تواند موجب مهار رشد و مرگ سلولی شود. ملانوما نوعی سرطان پوست است که از ملانوسیت ها توسعه می یابد و معمولاً در پوست ظاهر می شود، اما می تواند به صورت



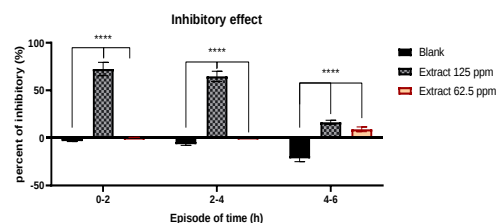
تصویر شماره ۱: آنالیز HPLC برای استاندارد ژنیستین با غلظت ۱۲۵ ppm، در آنالیز HPLC انجام شده برای ژنیستین با غلظت ۱۲۵ ppm. پیک استاندارد ژنیستین در زمان بازداری ۱۰/۸۱ دقیقه مشاهده می شود.



تصویر شماره ۲: دیگرام HPLC عصاره با غلظت ۱۰۰ ppm فلش قرمز رنگ محل پیک ژنیستین را در عصاره مشخص می کند.



تصویر شماره ۳: تجزیه و تحلیل HPLC برای مخلوط استاندارد ژنیستین با عصاره، در نمودار HPLC که از ترکیب استاندارد ژنیستین و عصاره تهیه شده است زمان بازداری ۱۰/۸۱ دقیقه مربوط به پیک ژنیستین می باشد.



تصویر شماره ۴: درصد مهار رشد سلولی در دو گروه خاص در طی سه بازه زمانی، درصد مهاری: (مساحت زمان دوم - مساحت زمان اول) / (مساحت زمان اول) × ۱۰۰ (p < 0.01, ** - p < 0.05, *** - p < 0.001, **** - p < 0.0001 vs Control).

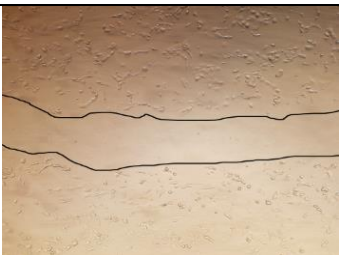
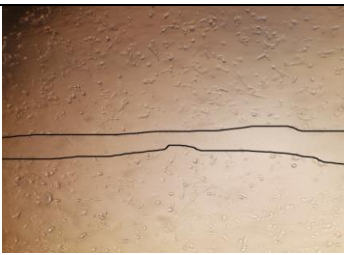
غیر عادی در سراسر بدن پراکنده شود. این عارضه تهدید کننده حیات است و ۹۸ درصد از موارد با تشخیص زود هنگام، ۵ سال آینده خود را می بینند.

فلاونوئیدها با فعالیت ضد رادیکال های آزاد، می توانند به طور بالقوه خطر بروز سرطان را کاهش دهند. محققین نشان داده اند که عصاره *Inonotus obliquus* رشد و مهاجرت سلولی B16-F10 را مهار می کند (۱۵، ۱۶). چالکون ها (پیش سازهای فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها در مسیر بیوسنتز)، بر سرطان های حساس و مقاوم به دارو اثر دارند (۱۷). فلاونوئیدهای استخراج شده از *Glycyrrhiza uralensis* اثرات ضد سرطانی بر سلول های ملانوما نشان داده اند (۱۸). نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعات فوق الذکر بود. آنالیز گیاهی با استفاده از معادله منحنی استاندارد کوئرستین ($y = 0.067x + 0.2365$, $R = 0.9712$), *A. brachycalyx* مقدار بالای محتوای فلاونوئیدی (۰/۴۵۴ گرم در هر گرم ریشه) را نشان داد.

اگرچه ملانوما سرطان وابسته به هورمون نیست، شواهد ارتباط مستقیم بین هورمون های جنسی (استروژن ها) و ملانوما را اثبات کرده اند (۱۹). ژنیستین یکی از فلاونوئیدهایی است که در این خانواده وجود دارد (۷). هم چنین این ترکیب دارای فعالیت شبه استروژنی است، بر تکثیر سلولی اثر گذار است. در مطالعه حاضر حضور ژنیستین با زمان بازداری ۱۰/۶۳ دقیقه در عصاره ظاهر شده است و میزان آن ۱/۱ درصد) مشخص گردید (تصاویر ۱ و ۲ و ۳). با این وجود این میزان ژنیستین نه تنها باعث تکثیر سلول ها نشد بلکه عصاره موجب مهار رشد سلولی و مرگ سلولی شد. این نشان دهنده ی تاثیر مهار رشد و مرگ سلول های سرطانی توسط سایر ترکیبات موجود در عصاره بود. (تصویر شماره ۴ و جدول ۱).

روش های متعددی جهت بررسی سمیت سلولی ترکیبات گیاهی وجود دارد، که می توان به سنجش سمیت با روش ارمیاسالینای پرورشی، زیرا فیش، *mtt* تست خراش سلولی، اشاره کرد (۲۲-۲۰).

جدول شماره ۱: تصاویر میکروسکوپی ($100\times$) بسته شدن خراش در گروه های مختلف مورد آزمایش با غلظت های ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۲٫۲۵، ۱۶٫۵ ppm و ۸٫۵ ppm در زمان های ۴، ۲، ۰ و ۶ ساعت از شروع درمان

گروه ها	زمان (0)	زمان (4h)	زمان (6h)
کنترل			
عصاره 125 ppm			
عصاره 62.5ppm			
عصاره 32.25ppm			
عصاره 16.5ppm			

مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر عصاره‌ی *A. brachycalyx* بر سلول‌های B16-F10 پرداخت و ارزیابی تغییرات مساحت خراش به روش برون‌تنی نشان داد که عصاره با غلظت 500ppm در مجاورت سلول‌ها منجر به مرگ سلولی شد. هم‌چنین هردو غلظت ۱۲۵ ppm و ۶۲٫۵ به‌طور قابل توجهی مساحت محدوده خراش را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دادند. این افزایش مساحت خراش در محیط با عصاره ۱۲۵ ppm به‌طور معنی‌داری

بیش از عصاره با غلظت ۶۲٫۵ ppm بود ($P < 0/05$). گروه ها به غلظت‌های ۳۲٫۵ و ۱۶٫۵ ppm نیز افزایش مساحت خراش را نشان دادند، اما این افزایش معنی‌دار نبود. گروه حاوی عصاره در مقایسه با گروه کنترل در هر بازه زمانی، موجب مهار رشد و مهاجرت سلولی شد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۵). هم‌چنین تمام محیط‌ها پس از ۲۴ ساعت مرگ سلولی را نشان دادند. هم‌چنین عصاره با غلظت ۱۲۵ ppm به‌طور قابل توجهی موجب مهار رشد

عصاره ریشه (*Astragalus brachycalyx*) با مرگ سلولی، مهار رشد و مهاجرت سلول‌های سرطانی برای پر کردن محدوده خراش بر روی سلول‌های ملانوما تاثیر می‌گذارد.

سپاسگزاری

این مطالعه با همکاری انستیتو پاستور شمال ایران انجام شد و نویسندگان کمال تشکر را از همکاری پرسنل هر دو مرکز دارند.

سلول‌ها در تمامی بازه زمانی مورد سنجش نسبت به گروه کنترل گروه عصاره با غلظت ۶۲/۵ ppm بود (بازه‌های ساعتی ۰ تا ۴ و ۴ تا ۶) ($P < 0.0001$).

با توجه به میزان فلاونوئیدهای موجود در این عصاره، ممکن است حضور این دسته ترکیبات مکانیسم احتمالی در مواجهه با سرطان ملانوما باشد. از محدودیت مطالعه می‌توان از عدم بررسی mtt جهت بررسی سمیت عصاره با روش دیگر نام برد. این مطالعه، پیشنهاد می‌کند که عصاره از لحاظ فیتوشیمیایی به صورت پیشرفته مورد ارزیابی قرار گیرد و همچنین اثر آن در شرایط *in vivo* ارزیابی شود.

References

1. Matthews NH, Li W-Q, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of melanoma. In: Exon Publications. 2017;3-22. PMID: 29461782.
2. Obrador E, Liu-Smith F, Dellinger RW, Salvador R, Meyskens FL, Estrela JM. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. Biol Chem 2019; 400(5): 589-612. PMID: 30352021.
3. Urs S. B16-F10. A Murine Melanoma Model. Princeton: Covance; 2019.
4. Afzali M, Mirzaei M, Saadati H, Mazloomi-Mahmood-Abadi S S. Epidemiology of skin cancer and changes in its trends in Iran. Feyz Med Sci J 2013; 17 (5) :501-511. (Persian).
5. Farshidfar F, Rhrissorakrai K, Levovitz C, Peng C, Knight J, Bacchiocchi A, et al. Integrative molecular and clinical profiling of acral melanoma links focal amplification of 22q11.21 to metastasis. Nat Commun 2022; 13(1):1-16.
6. Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. Life Sci 2002; 0(7): 791-798. PMID: 11833741.
7. Akbari F, Azadbakht M, Bagheri A, Vahedi L. In Vitro and In Vivo Wound Healing Activity of *Astragalus floccosus* Boiss. (Fabaceae). Adv Pharmacol Pharm Sci 2022; 2022: 7865015. PMID: 35392504.
8. Avicenna H. Ghanoon Dar Teb [The Canon of Medicine], Bulaq Edition. Sharafkandi A, translator. Tehran: University of Tehran Press; 1978.
9. Wang P, Wang Z, Zhang Z, Cao H, Kong L, Ma W, et al. A review of the botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacology, toxicology, and quality control of the *Astragalus membranaceus*. Front Pharmacol 2023; 14: 1242318. PMID: 37680711.
10. Faradiba F. Spectrophotometric determination of total flavonoid content in *Biancaea Sappan* (*Caesalpinia sappan* L.) leaves. J Fitofarmaka Indones 2021; 8(3):1-4.

11. Akbari F, Azadbakht M, Bagheri A, Vahedi L. In vitro and in vivo wound healing activity of *Astragalus Floccosus* Boiss. (Fabaceae). *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2022; 2022: 7865015. PMID: 35392504.
12. Seif EJM, de França LP, de Oliveira FF, de Oliveira RA, Chaves ALF, Silva LAM, et al. Antioxidant and cytotoxic activity of *diploporis incensis rizzini* & a. Matto's seed oil in b16-f10 murine melanoma. *Braz J Dev* 2021;7(11):106838-106856.
13. Felician FF, Yu R-H, Li M-Z, Li C-J, Chen H-Q, Jiang Y, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Chin J Traumatol* 2019; 22(1): 12-20. PMID: 30827814.
14. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 329-333. PMID: 17406593.
15. Youn M-J, Kim J-K, Park S-Y, Kim Y, Park C, Kim ES, et al. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 121(2): 221-228. PMID: 19041933.
16. Jayakumar T, Chiu C-C, Wang S-H, Chou D-S, Huang Y-K, Sheu J-R. Anti-cancer effects of CME-1, a novel polysaccharide, purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* against B16-F10 melanoma cells. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(1): 43-49. PMID: 24762485.
17. Gao F, Huang G, Xiao J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. *Med Res Rev* 2020; 40(5):2 049-2084. PMID: 32525247.
18. Zheng Y, Wang H, Yang M, Peng G, Dong TTX, Xu ML, et al. Prenylated flavonoids from roots of *Glycyrrhiza uralensis* induce differentiation of B16-F10 melanoma cells. *Int J Mol Sci* 2018; 19(8): 2422. PMID: 30115883.
19. Bhari N, Schwaertz RA, Apalla Z, Salerni G, Akay BN, Patil A, et al. Effect of estrogen in malignant melanoma. *J Cosmet Dermatol* 2022; 21(5): 1905-1912. PMID: 34416066.
20. Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Maced Pharm Bull* 2014;60(1):9-18.
21. Vajrabhaya L-O, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *J Anal Sci Technol* 2018; 9(1):15.
22. Zubair M, Ekholm A, Nybom H, Renvert S, Widen C, Rumpunen K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(3):825-830. PMID: 22465512.