Comparison of the apoptotic and cytotoxic effects of *Astragalus hamosus* in the two- and three-dimensional cultures of human umbilical vein endothelial cells

Mozaffar Mahmoodi [1], **Golara Nasiri** [2]

1. Assistant Professor, Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, (Corresponding Author), Tell: +989183794640, Email: (m.mahmoodi@muk.ac.ir) , ORCHID ID: 0000-0002-0253-5725

2. Assistant Professor, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ORCHID ID: 0000-0003-1966-0319

ABSTRACT

Background and aim: Angiogenesis is necessary for solid tumors to grow and metastasize because it provides oxygen and nutrients for the tumors. Many drugs have been identified for anti-angiogenic therapy, which is one of the most important drug mechanisms in cancer treatment. Considering similar anti-tumor activity by a similar mechanism in a herbal medicine, *Astragalus hamosus* (*A. hamosus*) we compared apoptotic and cytotoxic effects of this herbal medicine on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) between a 3D fibrin gel model and a 2D culture model.

Materials and Methods: *A. hamosus* extract was tested for its cytotoxicity on HUVECs using MTT assay. Flow cytometry was used to examine apoptosis, cell cycle, and proliferation. Also, by qPCR, we assessed the expression of genes related to apoptosis, such as caspase-9, -8, -3, and Bcl-2.

Results: Angiogenic activities of HUVECs were significantly decreased after treatment with IC_{50} concentration of *A. hamosus* extract. Flow cytometry analysis revealed that cell cycle arrest in G0/G1 phase in HUVECs in the 3D model higher than in 2D culture. Anti-proliferation activity of the extract decreased the expression of Ki-67, especially in the 3D culture. Also, after *A. hamosus* treatment, apoptosis level increased in the 3D culture model compared to that in the 2D culture which was confirmed by flow cytometry and qPCR.

Conclusion: Based on our results, *A. hamosus* extract can be used to treat tumors by inhibiting angiogenesis. Also, 3D fibrin gel can simulate anti-proliferative and anti-apoptotic properties of tumors better than 2D culture.

Keywords: *Astragalus hamosus*, Angiogenesis, Apoptosis.

Received: Sep 22, 2023 **Accepted:** Nov 12, 2023

How to cite the article: Mozaffar Mahmoodi, Golara Nasiri. Comparison of the apoptotic and cytotoxic effects of *Astragalus hamosus* in the two- and three-dimensional cultures of human umbilical vein endothelial cells .ŚJKU 2024;29(1):9-21.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳/۲۱-۹

مقایسه اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک عصاره *Astragalus hamosus* با پاکلیتاکسل در مدل کشت دو بعدی و سه بعدی سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان

مظفر محمودی [۱]، **گل آرا نصیری** [۲]

۱. استادیار، گروه پزشکی مولکولی و بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، (نویسنده مسئول)، تلفن: ۹۱۸۳۷۹۴۶۴۰، پست الکترونیک: m.mahmoodi@muk.ac.ir، کد ارکید: ۵۷۲۵-۰۲۵۳- ۰۰۰۲- ۰۰۰۰

۲. استادیار، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، کد ارکید: ۰۳۱۹- ۱۹۶۶- ۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: رگ‌زایی برای متاستاز و رشد تومورهای جامد لازم است؛ زیرا اکسیژن و مواد غذایی را برای تومور فراهم می‌کند. اثر ضد رگ‌زایی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دارویی در درمان سرطان است و بسیاری از داروهای دارای اثر ضد رگ‌زایی شناسایی شده‌اند. با در نظر گرفتن فعالیت ضد توموری با مکانیسم مشابهی که در گیاه دارویی ناخنک (*Astragalus hamosus* با نام اختصاری (*A. hamosus*) شناسایی شده است، اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک این گیاه بر روی سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان (HUVEC) در یک مدل ژل فیبرین سه بعدی در مقایسه با مدل کشت دو بعدی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ی ناخنک جهت تست سمیت سلولی بر روی HUVEC با استفاده از آنالیز MTT مورد بررسی قرار گرفت. فلوسایتومتری برای بررسی آپوپتوز، چرخه سلولی و تکثیر سلولی استفاده شد. همچنین با استفاده از آزمایش ریل‌تایم، بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز مانند کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ و همچنین Bcl-2 ارزیابی شد.

یافته‌ها: بقا و تکثیر سلول‌های HUVEC بعد از تیمار با غلظت IC_{50} عصاره‌ی ناخنک به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که چرخه‌ی سلولی در HUVEC در فاز G0/G1 در مدل سه بعدی بیشتر از مدل دو بعدی متوقف شد. فعالیت ضد تکثیر سلولی عصاره، بیان Ki-67 را بخصوص در کشت سه‌بعدی کاهش داد. همچنین بعد از تیمار با عصاره‌ی ناخنک، سطوح آپوپتوز در مدل کشت سه‌بعدی در مقایسه با مدل کشت دو بعدی افزایش پیدا کرد که این امر توسط فلوسایتومتری و ریل‌تایم تائید شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، عصاره‌ی ناخنک می‌تواند با اعمال اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک با جلوگیری از تکثیر سلول‌های عروقی جهت درمان تومور استفاده شود. همچنین، ژل فیبرین سه‌بعدی می‌تواند خصوصیات ضد تکثیر سلولی و ضد آپوپتوزی تومورها را بهتر از محیط کشت دو بعدی شبیه سازی کند.

کلمات کلیدی: ناخنک، رگ‌زایی، آپوپتوز، پاکلیتاکسل

وصول مقاله:۱۴۰۲/۶/۳۱ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۲/۸/۱۸ پذیرش:۱۴۰۲/۸/۲۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است. (۱, ۲). در تمامی انواع سرطان‌ها مجموعه تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها و بافت سرطانی اتفاق می‌افتد که مکانیسم مولکولی سلول‌های سالم را تغییر می‌دهد و تعادل بین سلول‌های ایمنی و سلول‌های سالم را به هم زده که منجر به التهاب مزمن و در نهایت تومورهای بدخیم می‌شود (۳-۵). ریز محیط تومور نقش مهمی در شروع تشکیل تومور، رگ‌زایی، تکثیر سلول، آپوپتوز و نیز پاسخ به درمان دارد (۶). جوانه‌زنی عروقی تشکیل عروق خونی جدید از عروق پیشین است (۷) و از نظر فیزیولوژیکی نقش زیادی در فرایندهای مختلف پاتولوژیکی شامل رشد تومور و متاستاز دارد (۸).

در تومورهای جامد، مواد غذایی و مسیرهای بالقوه برای گسترش تومور از طریق رگ‌زایی فراهم می‌شود و دلیل اصلی پیش‌آگهی ضعیف در بیماران سرطانی است (۹). امروزه بسیاری از مطالعات در تلاش هستند تا فاکتورهای ترویج کننده و حمایت‌کننده‌ی رگ‌زایی را شناسایی کنند تا مانع از رشد تومور و متاستاز شوند (۱۰, ۱۱).

پاکلیتاکسل (Paclitaxel, PTX) یک داروی شیمی درمانی سرطان است که به طور گسترده‌ای به عنوان اولین خط درمانی برای بسیاری از سرطان‌های بدخیم استفاده می‌شود. همچنین فعالیت ضد توموری بالایی علیه بعضی از سرطان‌های بدخیم نادر مانند آنژیو سارکوما و سارکوم کاپوسی (Kaposi's Sarcoma) دارد. پاکلیتاکسل به گروه داروهای تاکسان تعلق دارد و اولین تاکسانی بود که وارد کارآزمایی بالینی شده و تاییدیه‌ی FDA را گرفت. پاکلیتاکسل به زیر واحد بتای توبولین پلیمریزه شده متصل شده و سرعت تفکیک زیر واحدهای توبولین را در توبول مهار می‌کند؛ بنابراین، تزریق میکرومولار آن به سلول‌ها منجر به تشکیل باندل‌های میکروتوبول شده و سلول‌ها را در مرحله‌ی میتوز متوقف می‌کند (۱۲). همچنین پاکلیتاکسل فعالیت ضد رگ‌زایی قابل توجهی داشته و نسبت به سلول‌های اندوتلیال فعال شده فعالیت سایتوتوکسیک دارد و می‌تواند مهاجرت سلولی و تشکیل مویرگ‌ها را مهار کند. به علاوه، نشان داده شده که پاکلیتاکسل رهایش VEGF و Ang-1 را توسط سلول‌های توموری مهار کرده و ترشح ترومبواسپوندین -۱ (TSP-1) را به ریز محیط تومور افزایش می‌دهد (۱۲).

با در نظر گرفتن اینکه داروهای شیمی‌درمانی ضد سرطان به سلول‌های نرمال نیز آسیب می‌زنند، تلاش‌های زیادی برای شناسایی ترکیبات طبیعی و عوامل سنتزی مرتبط برای جلوگیری از گسترش و عود سرطان انجام گرفته است (۱۳). شواهد زیادی مزایای بالقوه‌ی پیش رگ‌زایی داروهای گیاهی را نشان داده‌اند، درحالی‌که رگ‌زایی تومور نیز ممکن است توسط اجزای فعال آن‌ها مهار شود (۱۴, ۱۵). به عنوان مثال فعالیت ضدرگ‌زایی برای Rehmannia glutinosa، Cimicifuga foetida و Albatrellus confluens از طریق مسیرهای مختلف شناسایی شده است (۱۶).

تعدادی از ترکیبات دارویی سنتی در درمان التهاب و درد در مدل حیوانی مؤثر بوده‌اند که از آن جمله می‌توان به ناخنک (*A. hamosus*) اشاره کرد (۱۷). مطالعات فارماکولوژیکی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی ناخنک را تأیید کرده‌اند (۱۸) به طوری که ترکیبات فرار آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی را بر ضد لوکمی لنفوسایتیک حاد در انسان دارند که شدت فعالیت آن به غلظت بستگی دارد (۱۹). ارزیابی اثر ضد تکثیر سلولی عصاره‌ی متانولی ناخنک مهار تکثیر سلول‌های سرطانی را برحسب غلظت این عصاره نشان داده است (۲۰). فلاونوئیدهای مشتق شده از این گیاه می‌توانند تیمار کارسینومای سلول‌های کبدی را در رت بهبود ببخشند. نتایج نشان داده است که این عصاره با تشدید سرکوب مارکرهای آنزیمی موجود در سرم و رادیکال‌های آزاد باعث ممانعت کارسینومای سلول‌های کبدی می‌شود (۲۱). نتایج متاآنالیز مطالعات تصادفی نیز نشان دادند که داروی گیاهی بر پایه‌ی ناخنک می‌تواند اثر بخشی درمان سرطان را در ترکیب با شیمی درمانی افزایش دهد (۲۲). محققان در زمینه‌ی تحقیق سرطان اکنون از مدل‌های کشت سه بعدی استفاده می‌کنند

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

که می‌توانند برهمکنش‌های فیزیولوژیکی سلول – سلول و سلول – ماتریس خارج سلولی انواع بافت‌ها را بهتر نشان دهند (۲۳). هیدروژل‌ها به عنوان شبکه‌های پلیمری آب‌دوست برای ایجاد مدل‌های سه بعدی از بافت‌ها استفاده می‌شوند. انواع هیدروژل ساخته شده از مواد طبیعی و سنتزی برای ایجاد ریز محیط‌های تومور سه‌بعدی مهندسی شده استفاده شده‌اند که از رگ‌زایی و رشد سلول‌های سرطانی حمایت کرده و حمایت مکانیکی و شیمیایی را برای تنظیم رفتار تومور درون ماتریس فراهم می‌کنند (۲۴). فیبرینوژن گلیکوپروتئین بزرگی است که در پلاسما یافت می‌شود و نقش حیاتی را در انعقاد خون، فیبرینولیز، برهمکنش سلول و ماتریس، پاسخ التهابی، ترمیم زخم و نئوپلاسم ایفا می‌کند (۲۵). هیدروژل‌های فیبرینی به دلیل داشتن ساختار فیبری در ابعاد نانومتری یا میکرومتری و تقلید ماتریس خارج سلولی به طور گسترده‌ای به عنوان ریز محیط مصنوعی استفاده می‌شوند (۲۶).

در مقاله‌ی قبلی ما (۲۶)، عصاره ناخنک را استخراج کرده و استروئیدهای کلی آن را شناسایی کردیم، IC_{50} آن را بر ضد سلول‌های MCF-7 سرطان سینه محاسبه کردیم و یک مدل ژل فیبرین سه‌بعدی را برای ارزیابی اثر مهاری بهتر عصاره روی اسفروئیدهای انکپسوله شده‌ی MCF-7 درون مدل ایجاد کردیم. در این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره‌ی ناخنک مؤثر در مهار رگ‌زایی در یک مدل سه‌بعدی بررسی شده و با پاکلیتاکسل مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره ناخنک

تهیه و مشخصه یابی عصاره‌ی ناخنک در مقاله‌ی قبلی ما توضیح داده شده است (۲۶). به طور خلاصه، میوه‌ی گیاه ناخنک (کد هرباریوم گونه به صورت PMP-3610 توسط هرباریوم داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران اختصاص داده شده است) در اتانول ۷۰ درصد ماساژ داده شد و عصاره به دست آمده پس از فیلتر شدن برای فزایش غلظت در وکیوم خلاء قرار داده شد. سپس عصاره‌ی خشک شده در آب دیونیزه به صورت سوسپانسیون درآمد تا غلظت‌های مختلف از آن ساخته شود. مقدار کل استروئیدها (مقدار استروئیدها و کلسترول) برحسب درصد وزنی با تست Lieberman-Bouchard تعیین شد و به صورت ۰/۱۶۶ درصد وزنی–وزنی گزارش شد.

کشت سلول‌ها

سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان (HUVEC) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران (تهران، ایران) خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین- استرپتومایسین (همگی از شرکت Gibco) کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور و شرایط عمومی کشت سلول (دمای $37\ ^oC$، رطوبت ۹۵٪ و CO_2 به مقدار ۵٪) نگهداری شدند، محیط کشت هر سه روز یک بار تعویض شد و سلول‌ها بعد از رسیدن به تراکم سلولی ۶۵–۸۰ درصد پاساژ داده شدند.

تعیین غلظت‌های IC_{50} با استفاده از آنالیز MTT

سلول‌های HUVEC با غلظت ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و تحت شرایط عمومی کشت سلول به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس غلظت‌های ۶۲,۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ µg/ml از عصاره‌ی ناخنک *(۲۷)* و غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱µmol/ml از پاکلیتاکسل (۲۸) تهیه شدند و جداگانه برای محاسبه‌ی IC_{50} (غلظت مهارکننده) بررسی شدند. بعد از ۷۲ ساعت، مایع روی سلول‌ها با محلول MTT جایگزین شدند (۰/۵ mg/ml در محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS)) و به مدت ۴ ساعت در $37\ ^oC$ انکوبه شد. بعد از حذف مایع رویی، کریستال‌های فورمازان در ۱۵۰ µl از DMSO (Sigma-Aldrich) حل شدند و سپس جذب نوری در ۵۷۰ nm با استفاده از میکروپلیت خوان EL340 (BioTek, USA) اندازه‌گیری شد تا غلظت‌های IC_{50} محاسبه شوند.

سنجش سه بعدی رگ‌زایی تومور در شرایط آزمایشگاهی

سنجش تشکیل لوله برای رگ‌زایی در شرایط آزمایشگاهی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

در مقاله منتشر شده‌ی قبلی (۲۶)، ما ترکیبات مختلفی از ژل‌های فیبرین را برای ساخت یک مدل سه‌بعدی که خصوصیات ویسکوالاستیک نزدیک به بافت طبیعی سرطان سینه را داشت آنالیز کردیم. با توجه به یافته‌های ما، ترکیب زیر برای یک مدل ژل فیبرین سه‌بعدی مناسب قابل قبول بود: ۶ mg فیبرینوژن در ۱ ml محلول M199، ۳۰ µl ترومبین (۱۲۰ U/ml در ۱ M بافر سدیم)، ۴۵ µl کلسیم کلراید ($CaCl_2$) (w/v) ۱٪ و ۱۵ µl(FBS). برای ساخت یک مدل فیبرین سه‌بعدی، محلول فیبرینوژن به یک پلیت کشت منتقل شد، سایر اجزاء اضافه شدند و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شد.

فعالیت‌های رگ‌زایی سلول‌های HUVEC با استفاده از یک محیط کشت اولیه (محیط فاقد فاکتورهای رشد یا FBS) به مدت ۲۴ ساعت قبل از انجام سنجش تشکیل لوله مویرگی در محیط کشت کامل (DMEM با گلوکز بالا + FBS ۱۰٪ + آنتی بیوتیک‌ها ۱٪) تحریک شد. بعد از جدا کردن سلول‌های HUVEC از سطح فلاسک با استفاده از تیروزیناز و ساخت مدل ژل فیبرین سه‌بعدی (۲۰۰ µl/well در پلیت ۹۶ خانه)، سلول‌های جدا شده (2×10^{5} cell/ml) مجددا در محیط کشت کامل قرار گرفته و ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی به هر چاهک اضافه شد. با تشکیل یک شبکه‌ی عروقی بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها به صورت جداگانه با غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل برای ۷۲ ساعت تیمار شدند. سر انجام، تأثیر هر تیمار روی شبکه‌ی عروقی با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX61 (Olympus Corporation, Japan) phase-contrast بررسی شد. برای بررسی اثر عصاره‌ی ناخنک بر تشکیل لوله مویرگی در آزمایشگاه، طول لوله‌ها در سه ناحیه مجزا و از هر نمونه سه بار بعد از ۷۲ ساعت با میکروسکوب نوری بررسی شدند. ابعاد لوله‌ها با استفاده از نرم افزار ImageJ بررسی شدند.

آنالیز فلوسایتومتری چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوز

بعد از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌های HUVEC با غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک (۵۳۳/۷ µgr/ml) و پاکلیتاکسل (۰/۰۱۲ µM/ml) در پلیت ۶ خانه، مایع رویی جمع‌آوری شد، سلول‌های چسبنده با تریپسینه کردن جدا شدند و به مایع رویی جمع‌آوری شده انتقال داده شدند. سپس، سلول‌های برداشت شده درون PBS سرد فرو برده شده و سپس به مدت یک شب درون ۵۰۰ µl اتانول ۷۰٪ نگهداری شده تا چرخه‌ی سلولی یکسان شود. بعد از این مرحله، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند، در ۵۰۰ µl PBS حاوی ۵۰ µg از RNase A (۰/۱ µg/ml) و Propidium Iodide(۰/۰۱ µg/ml ، PI) به مدت نیم ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ ^{o}C انکوبه شده و چرخه‌ی سلولی آنالیز شد. محتوای DNA توسط فلوسایتومتر FACS Caliber (CyFlow SL, Partec, Germany) تعیین شد و سلول‌ها در فازهای مختلف G0، G1 ، S و M آنالیز شدند. همه‌ی آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار شدند.

برای آنالیزهای تکثیر سلول، بعد از ۷۲ ساعت، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ ^{o}C با پارافرمالدهید فیکس شدند. سپس سلول‌ها در PBS سرد حاوی آنتی‌بادی anti-Ki-67 نشان‌دار شده با FITC (BD Biosciences, USA) به حالت تعلیق درآمدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C انکوبه شدند. سپس سلول‌های تیمار شده با PBS شسته شدند و سانتریفیوژ شدند تا مولکول‌های آنتی‌بادی واکنش نداده حذف شوند.

آنالیز PI- آنکسین V برای شناسایی درصد سلول‌های HUVEC در فاز آپوپتوز به کار گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌های HUVEC با غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل، واکنشگرهای آنکسین V و PI به سلول‌های HUVEC برداشته شده اضافه شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ و در تاریکی نگه‌داری شدند. سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند و تحت تکنیک فلوسایتومتری قرار گرفتند. فلوئورسانس سلول‌های نشان‌دار شده با استفاده از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

یک فلوسایتومتر اندازه‌گیری شدند (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) و داده‌ها توسط نرم‌افزار FlowJo آنالیز شدند.

آنالیز ریل‌تایم (qPCR) برای آنالیز آپوپتوز

آنالیز qPCR برای ارزیابی بیان ژن‌های آپوپتوز initiative و executive انجام شد. به همین منظور، محلول ترایزول (Invitrogen, USA (Invitrogen, USA)) برای استخراج RNA از سلول‌های کشت داده شده روی ژل‌های فیبرین که با غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل تیمار شدند، طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. پس از سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (Takara, Korea) بیان کاسپازهای ۳، ۸ و ۹، Bcl-2 و β-globin به عنوان ژن کنترل داخلی با استفاده از کیت SYBR-Green (Takara, Korea) و سیستم StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) آنالیز شدند. در جدول ۱ توالی پرایمرهای پیشرو (فوروارد) و پیرو (ریورس) ژن‌های فوق الذکر آمده است. در جدول ۲ برنامه زمانی و تعداد سیکل‌های qPCR بیان شده است. همه‌ی مقادیر Ct محاسبه شده از ژن‌های هدف با ژن β-globin نرمالایز شدند و روش Ct مقایسه‌ای، $2^{-\Delta\Delta Ct}$، برای آنالیز بیان نسبی ژن استفاده شد.

آنالیزهای آماری

همه‌ی آزمایش‌ها در سه آزمایش مستقل انجام شدند و داده‌ها به صورت mean ± standard deviation (SD) گزارش شدند. پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها به روش شاپیرو–ویلک، مقایسه‌های آماری با استفاده از آزمون one-way ANOVA به همراه آزمون Tukey's post hoc با سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شدند.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای ریل‌تایم

Gene	Accession No.	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)	Annealing(°C)
Caspase 9	NM_001278054.2	**F:** GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	۱۲۹	۶۲
		R: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT		
Caspase 8	NM_001372051.1	**F:** GAAGAGGGTCATCCTGGGAGA	۱۴۲	۶۱
		R: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC		
Caspase 3	NM_001354783.2	**F:** GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	۱۴۶	۶۱
		R: GCATCGACATCTGTACCAGACC		
BCL2	NM_000633.3	**F:** ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	۱۲۷	۶۲
		R:GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC		
β-globin	NM_000518	**F:** CACCTTTGCCACACTGAGTGAG	۱۰۰۲	۶۱
		R: CCACTTTCTGATAGGCAGCCTG		

جدول۲. برنامه دمایی-زمانی واکنش Real-Time PCR

Cycle Step	Temperature(ºC)	Time(S)	Cycles
Initial Denaturation	95	600	1
Denaturation phase	95	10	45
Annealing phase	60-65	60	
Extension phase	72	20	

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

نتایج

غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل روی سلول‌های HUVEC

برای بهینه‌سازی غلظت عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل برای استفاده در آزمایش‌های بیشتر، مقدار IC_{50} روی سلول‌های HUVEC به مدت ۷۲ ساعت محاسبه گردید. با در نظر گرفتن سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان گروه کنترل، جذب نرمال شده برای عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل روی نمودار نشان داده شد تا مقادیر IC_{50} با انطباق منحنی بر داده‌های MTT به دست آید. نتایج MTT (شکل ۱) نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل زنده‌مانی سلول‌های HUVEC کاهش پیدا کرد. با توجه به شکل ۱، مقادیر IC_{50} برای عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل به ترتیب ۵۳۳/۷ µgr/ml و ۰/۰۱۲ µM/ml بودند.

اثر ضدرگ‌زایی عصاره‌ی ناخنک بر تشکیل لوله مویرگی

بعد از نشاندن سلول‌های HUVEC روی سطح ژل فیبرین، سلول‌ها طی ۲-۱ روز شروع به جوانه زدن کردند و ساختارهای طناب مانند کوتاه و باریکی را تشکیل دادند (شکل ۲-A) در حالی که تیمار با عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده منجر به اختلال در تشکیل شبکه لوله مویرگی شد (شکل ۲-B و C). غلظت‌های IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل از تشکیل لوله به میزان قابل ملاحظه‌ای ($p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ به ترتیب برای عصاره ناخنک و پاکلیتاکسل) ممانعت به عمل آوردند ؛ البته پاکلیتاکسل اثر قویتری نسبت به عصاره ناخنک ($p<۰/۰۵$) داشت (شکل ۲-D).

فازهای چرخه‌ی سلولی در سلول‌های HUVEC

برای بررسی اثر سرکوب‌کنندگی عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل بر تکثیر سلولی طی توقف چرخه‌ی سلولی، سلول‌های HUVECدر کشت دو بعدی و سه‌بعدی با غلظت‌های IC_{50}تیمار شدند و اختلال در چرخه‌ی سلولی با فلوسایتومتری آنالیز شد. شکل ۳ تغییرات آشکار را در درصد فازهای چرخه‌ی سلولی و در صد سلول‌ها در هر فاز چرخه‌ی سلولی (فازهای G1/G0، S و G2/M) نشان می‌دهد. عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل توانستند توقف را در فاز G0/G1 تحریک کنند و در صد فاز G0/G1 در کشت‌های دو بعدی و سه‌بعدی در مقایسه با گروه کنترل به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرد ($p<۰/۰۰۰۱$). در مقایسه، عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل موجب افزایش در فازهای G2/M و S در هر دو کشت دو بعدی ($p<۰/۰۰۰۱$ برای عصاره ناخنک در هر دو فاز و $p<۰/۰۵$ برای پاکلیتاکسل در فاز S) و سه‌بعدی ($p<۰/۰۰۰۱$ برای هر دو ماده در هر دو فاز) شدند.

اثر ضد تکثیر سلولی عصاره‌ی ناخنک روی سلول‌های HUVEC

سرعت تکثیر سلول‌های HUVEC تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل در غلظت‌های IC_{50} تحت شرایط کشت دو بعدی و سه‌بعدی با آنالیز بیان Ki-67 تعیین شد. همانگونه که در شکل ۴ نشان داده شده است، بیان Ki-67 در سلول‌های تیمار شده‌ی HUVEC، بخصوص در کشت سه‌بعدی، در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت ($p<۰/۰۰۰۱$). علی‌رغم تأثیر بیشتر شرایط کشت سه‌بعدی روی قابلیت ضد تکثیر سلولی هر دو عامل، بیان Ki-67 در سلول‌های HUVEC تیمار شده با پاکلیتاکسل نسبت به سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک کمتر بود.

القای آپوپتوز در سلول‌های HUVEC

شاخص آپوپتوز سلول‌های HUVEC تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل در غلظت‌های IC_{50}با PI- آنکسین V توسط فلوسایتومتری آنالیز شد. گروه کنترل پایین‌ترین سطح آپوپتوز را دارا بود که آپوپتوز دو بعدی و سه‌بعدی کلی آن به ترتیب ۲۱/۹٪ (۳/۱٪ آپوپتوز اولیه و ۱۸/۸٪آپوپتوز ثانویه) و ۷/۸۸٪ (۱/۹۳٪ آپوپتوز اولیه و ۵/۹۵ ٪آپوپتوز ثانویه) بودند (شکل۵). در هر دو مدل کشت دو بعدی و سه‌بعدی، تیمار با پاکلیتاکسل موجب افزایش قابل ملاحظه در آپوپتوز ($p<۰/۰۰۰۱$) و کاهش زنده‌مانی سلولی ($p<۰/۰۰۰۱$) در مقایسه با گروه ناخنک شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

علاوه بر این، ژن‌های آپوپتوزی (کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ و بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2) در سلول‌هایHUVEC بررسی شدند. نتایج ریل‌تایم (شکل ۶) نشان دادند که بیان ژن‌های کاسپاز در سلول‌های HUVEC تیمار شده با پاکلیتاکسل نسبت به سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک در مدل کشت دو بعدی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود (۰/۰۰۱>p، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱>p به ترتیب برای کاسپازهای ۹، ۸ و ۳). اگرچه بیشتر ژن‌ها به طور قابل‌ملاحظه‌ای در کشت سه‌بعدی در مقایسه با کشت دو بعدی افزایش بیان داشتند، میزان بیان ژن‌های کاسپاز۳ و ۹ در سلول‌های HUVEC تیمار شده با پاکلیتاکسل بیشتر بود.

بحث

رگ‌زایی یکی از مهم‌ترین فرایندهایی است که اکسیژن و مواد غذایی کافی را برای سلول‌های تومور فراهم می‌کند و نقش مهمی را در القای متاستاز و پیشرفت سرطان ایفا می‌کند (۸). در این مطالعه ما اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک عصاره‌ی ناخنک را در مدل ژل فیبرین سه‌بعدی آنالیز کرده و آن را با اثر پاکلیتاکسل مقایسه کردیم. به همین منظور، دوزهای IC_{50} عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل تعیین شدند و سپس چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوز سلول‌های HUVEC در غلظت‌های IC_{50} مطالعه شدند.

تیمار سلول‌های HUVEC با عصاره‌ی ناخنک در ژل فیبرین سه‌بعدی منجر به تشکیل ناکامل ساختار لوله مویرگی شد، به طوری که لوله‌ها در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده به طور قابل توجهی نقاط انشعاب کمتر و طول لوله کوتاه‌تری داشتند. به علاوه، نتایج نشان دادند که عصاره‌ی ناخنک توانست تکثیر سلول‌ها را طی توقف چرخه‌ی سلولی در هر دو مدل دو بعدی و سه‌بعدی سرکوب کند. علی‌رغم G0/G1 کمتر و S و G2/M بیشتر در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک و پاکلیتاکسل نسبت به گروه کنترل، مدل فیبرین سه‌بعدی اثر قابل ملاحظه‌ای روی توقف G0/G1 در سلول‌های HUVEC تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک در مقایسه با گروه تیمار شده با پاکلیتاکسل داشت. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئیدهای موجود در عصاره ناخنک مهارکننده‌های بالقوه‌ی آنزیم‌های کلیدی مسیر انتقال پیام می‌باشند. آن‌ها پروتئین کیناز C، تیروزین کیناز و لیپید کیناز را مهار می‌کنند. آن‌ها همچنین بر روی بسیاری از مسیرهای متابولیکی مانند مسیر گلیکولیز و سنتز پروتئین تأثیر می‌گذارند و موجب القا توقف چرخه سلولی در G0/G1 و G2/M می‌شوند.

همچنین، بیان Ki-67 به‌عنوان مارکر تکثیر سلولی بخصوص در سلول‌های کشت سه‌بعدی در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش یافت. آنالیزهای فلوسایتومتری و ریل‌تایم تائید کردند که تیمار با عصاره‌ی ناخنک آپوپتوز را افزایش و زنده مانی سلول را در هر دو مدل دو بعدی و سه‌بعدی کاهش داد. آپوپتوز ثانویه در مدل سه‌بعدی به طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از مدل دو بعدی بود، درحالی‌که آپوپتوز اولیه در مدل سه‌بعدی به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از مدل دو بعدی بود. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که فلاونوئیدهای موجود در عصاره ناخنک ممکن است اثراتشان را از طریق آن اعمال کنند اثر متقابل بر روی آنزیم‌های متابولیزکننده فاز۱ (مانند سیتوکروم P450) است. این آنزیم‌ها قادرند تعداد زیادی از پروکارسینوژن‌ها را فعال کنند که نهایتاً منجر به کارسینوژنزیس می‌شوند. فلاونوئیدها ایزوآنزیم‌های متعدد P450 مانند CIP1 و CIP2 را مهار می‌کنند؛ بنابراین فلاونوئیدها احتمالاً بر علیه آسیب سلولی که توسط فعال شدن کارسینوژن‌ها بوجود می‌آید، نقش محافظتی دارند. القا آنزیم‌های متابولیز کننده فاز۲ مانند گلوتاتیون S ترانسفراز، کوئینون ردوکتاز و UDP گلوکورونیل ترانسفراز یکی دیگر از مکانیسم‌های عمل فلاونوئیدها است. همان‌طور که می‌دانیم این آنزیم‌ها در سم‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد از بدن نقش دارند(اثر بازدارندگی فلاونوئیدها برعلیه کارسینوژن ها). علاوه بر این برخی از فلاونوئیدها به‌عنوان مهارکنندگان قوی آروماتازها گزارش شده‌اند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

بر اساس آنالیز qPCR، بیان ژن‌های کاسپاز ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های HUVEC تیمار شده با عصاره‌ی ناخنک یا پاکلیتاکسل بیشتر از سلول‌های تیمار نشده بود. بعد از تیمار با عصاره‌ی ناخنک یا پاکلیتاکسل، کاسپاز۸ در مدل کشت سه‌بعدی بیشتر از مدل کشت دو بعدی افزایش یافت. اگرچه سطح بیان Bcl-2 در مدل کشت سه‌بعدی افزایش یافت، بیان آن برای هر دو گروه تیمار قابل ملاحظه نبود.

فقدان استروما که درصد بالایی از حجم بافت‌های مختلف را شامل می‌شود، عمده‌ترین محدودیت کشت دوبعدی است که باعث نقص ساختاری و نیز نقص انتقال مواد می‌شود. همچنین رشد سلول‌ها به‌صورت دوبعدی داخل ظرف کشت و عدم ارتباط لایه زیرین سلول‌ها با لایه‌های دیگر از دیگر محدودیت‌های کلیدی کشت دوبعدی است به طوری که سلول به طور واقعی با یکدیگر ارتباط ندارند. در کشت دو بعدی ارتباط سلول‌ها با یکدیگر، ارتباط سلول با ماتریس و تأثیر مایع میان بافتی به درستی صورت نگرفته و درنتیجه رشد و تمایز بافتی نیز به طور صحیح انجام نمی‌گیرد. برای طراحی و شبیه‌سازی ریزمحیط تومور و ساخت داربست سه‌بعدی مناسب برای سلول‌های بافت‌های مختلف از پلیمرهای طبیعی و سنتزی مختلفی استفاده می‌شود که در این میان فیبرین به دلیل خصوصیات بارزش مطلوب تر است. فیبرین دارای کاربردهای کلینیکی فراوانی بوده؛ اما بیشترین شهرت آن استفاده از آن به صورت ژل است (۲۹). فیبرین یکی از اجزای ماتریس خارج سلولی بسیاری از تومورهای جامد است که تولید آن به نوع تومور و مرحله شکل‌گیری آن بستگی دارد. حضور اختصاصی فیبرین در تومورها آن را به موضوع جذابی در درمان‌های ضد سرطان (۳۰) و ماده مناسبی برای ساخت مدل‌های سه‌بعدی زیست‌تقلید برای شبیه‌سازی ریزمحیط تومور (۳۱) یا شبکه‌های عروقی (۳۲) تبدیل کرده است. طبق یافته‌های این تحقیق، ژل فیبرینی سه‌بعدی توانست زنده‌مانی سلول‌های HUVEC را بهبود بخشد و تعداد سلول‌های زنده را افزایش دهد (شکل ۲) که اطمینان‌پذیری و پایایی ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک پاکلیتاکسل و ناخنک در این تحقیق را تضمین می‌کند.

مطالعات مختلفی تاکنون درباره‌ی اثرات گیاه ناخنک انجام‌شده است. در طب سنتی، عصاره‌ی ناخنک به خاطر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی آن برای درمان بیماری‌های وابسته به التهاب تجویز شده است (۳۳, ۹). برخی از مطالعات آزمایشگاهی فعالیت ضد التهابی ناخنک را روی التهابات حاد به اثبات رسانده‌اند (۳۴). انصاری و همکارانش روغن ناخنک را روی آرتروز بررسی کردند و اعلام کردند که این روغن می‌تواند درد را در بیماران مسن با آرتروز خفیف تا متوسط تسکین دهد (۱۵). بسیاری از مطالعات غربالگری اخیر نشان داده‌اند که ترکیبات مختلف موجود در عصاره‌ی ناخنک مانند پلی‌ساکاریدها، اسپانونین‌ها و فلاونوئیدها خاصیت ضد توموری دارند. در مطالعه‌ای که توسط Tian و همکاران انجام شد، تأثیر ضد سرطانی پلی ساکاریدهای ناخنک را روی موش‌های دارای تومور H22 بررسی و اثر سینرژیک ضد توموری را بین پلی‌ساکاریدهای آستراگالوس و آدریامایسین مشاهده کردند و دریافتند که اثرات جانبی آدریامایسین روی طحال و تیموس در موش‌های دارای تومور H22 کاهش یافت (۱۴). تحقیقات نشان داده است که astragaloside IV می‌تواند بیان Vav3.1 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. ژن Vav3.1 به میزان زیادی در سلول‌های بنیادی سرطان تخمدان بیان می‌شود که از نظر بالینی با پیش‌بینی این سرطان مرتبط است (۱۶). محققان همچنین دریافته‌اند که astragaloside II می‌تواند مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی را کاهش و نقش کمکی در پاسخ به درمان شیمی‌درمانی سرطان کبد را داشته باشد (۱۷). داده‌های تجربی نشان دادند که فلاونوئیدهای ناخنک می‌توانند تکثیر سلول‌های لوکمی K562 myelogenous را مهار کنند (۱۸).

اگرچه فعالیت سمیت سلولی اکثر داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند تا حدی باعث ضدرگ‌زایی شود، چون عوامل متعددی ممکن است واسطه رگ‌زایی باشند ترکیبات دارای

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

خاصیت ضدرگ‌زایی به تنهایی اثربخشی محدودی دارند (۳۵). عصاره‌های طبیعی از مخلوطی از ترکیبات شیمیایی فعال تشکیل شده‌اند که اثرات هم‌افزایی دارند و مسیرهای متعددی را که در شروع و تداوم رگ‌زایی دخیل هستند، تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۵, ۳۶). تحقیقات نشان داده است مشتقات گیاهی علیرغم جلوگیری از تشکیل عروق در تومورها هیچ اثر سمی عمده‌ای بر بافت طبیعی و عوارض جانبی قابل توجه ندارند(۳۵) . ترکیبات فنلی یا پلی‌فنلی متابولیت‌های گیاهی ثانویه هستند (۳۷) که نقش آن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رگ‌زایی یا مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال به اثبات رسیده است (۳۸). فلاونوئیدها به عنوان بزرگترین گروه از ترکیبات پلی‌فنلی به طور گسترده در گونه های مختلف آستراگالوس یافت می شوند (۳۹). فعالیت ضدرگ‌زایی فلاونوئیدها با مهار بیان فاکتورهای اصلی پیش‌رگ‌زایی و جلوگیری از تکثیر و مهاجرت سلول های اندوتلیال به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۷, ۴۰). عصاره هیدروالکلی ناخنک شامل اجزای بسیاری است که فعالیت های ضد سرطانی و ضدرگ‌زایی آن‌ها ممکن است مربوط به خود آن‌ها یا متابولیت‌های آن‌ها در بدن باشد. علاوه بر این، اثرات مشاهده شده از این عصاره در شرایط آزمایشگاهی در مقادیر میکروگرم بررسی شد که لازم است برای تعیین غلظت‌های مؤثر در داخل بدن تحقیقات بیشتری انجام شود. علیرغم نتایج بهتر مدل ژل فیبرین سه بعدی، آزمایش‌های آزمایشگاهی به تنهایی نمی‌توانند اثرات فارماکوکینتیک واقعی در شرایط درون‌تنی را به طور کامل نشان دهند و ارزیابی بیشتر در یک مدل حیوانی نباید نادیده گرفته شود.

نتیجه گیری

در این مطالعه در مورد اهمیت ضدرگ‌زایی برای کنترل پیشرفت سرطان صحبت کردیم و اثر عصاره‌ی ناخنک را روی تکثیر HUVEC و تشکیل لوله عروقی بررسی کردیم. ژل فیبرین به عنوان یک ریز محیط سه‌بعدی مناسب توانست عملکرد آپوپتوز عصاره‌ی ناخنک را بهبود ببخشد. عصاره‌ی هیدروالکلی ناخنک به طور قابل ملاحظه‌ای بقای سلول‌های HUVEC را در مدل ژل فیبرین سه‌بعدی در مقایسه با کشت دو بعدی کاهش داد و نشان دهنده‌ی فعالیت آپوپتوزی ترکیبات استروئید در عصاره ناخنک بود. بررسی فعالیت کاسپاز در هر دو مدل کشت دو بعدی و سه‌بعدی نشان داد که عصاره‌ی ناخنک اثرات آپوپتوزی خودش را در مسیر داخلی آپوپتوز به کار گرفته است (مثلاً کاسپاز۹) این اثر به ویژه در ژل فیبرین سه بعدی مشخص بود. به علاوه، این عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر سلول‌های HUVEC را در محیط کشت سه‌بعدی در مقایسه با مدل کشت دو بعدی کاهش داد و اثر مثبت شرایط سه‌بعدی را روی تشدید اثر ضد تکثیر سلولی عصاره‌ی ناخنک تائید کرد. در این مطالعه، اثرات مختلف سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره‌ی ناخنک و اثر آن روی توقف چرخه‌ی سلولی در ژل فیبرین به وضوح مشاهده شد و در مقایسه با کشت دو بعدی نشان داده شد. در نتیجه، ژل فیبرین توانست به عنوان یک داربست مناسب ارزیابی پاسخ دارویی در مطالعه سرطان به کار رود. داده‌های ما نشان داد که استفاده از داروی گیاهی ممکن است با جلوگیری از تکثیر سلول‌های عروقی، توقف چرخه سلولی و فعال کردن مسیرهای مختلف آپوپتوز در جلوگیری از رگ‌زایی اثر مثبت داشته باشد هر چند که مکانیسم ضدرگ‌زایی عصاره‌ی ناخنک و فعالیت‌های ضد تکثیر سلولی و مسیر سیگنالینگ دقیق اعمال این اثرات هنوز مشخص نیستند. همچنین، تحقیقات بیشتر برای تعیین پتانسیل ضد نئوپلاستیک آن ضروری است.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر می‌کنند. همچنین مطالعه فوق با کد اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1397.980 در دانشگاه علوم پزشکی تهران به ثبت رسیده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

منابع

1.Abbastabar H, Hamidifard P, Roustazadeh A, Mousavi SH, Mohseni S, Sepandi M, et al. Relationships between breast cancer and common non-communicable disease risk factors: An ecological study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013;14(9):5123-5.
2.Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. The Lancet. 2017;389(10071):847-60.
3.Montazeri A, Vahdaninia M, Harirchi I, Harirchi AM, Sajadian A, Khaleghi F, et al. Breast cancer in Iran: need for greater women awareness of warning signs and effective screening methods. Asia Pacific family medicine. 2008;7(1):1-7.
4.Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nature reviews immunology. 2009;9(4):259-70.
5.Menbari MN, Rahimi K, Ahmadi A, Mohammadi-Yeganeh S, Elyasi A, Darvishi N, et al. miR-483-3p suppresses the proliferation and progression of human triple negative breast cancer cells by targeting the HDAC8> oncogene. Journal of cellular physiology. 2020;235(3):2631-42.
6.Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nature medicine. 2013;19(11):1423-37.
7.Mahmoodi M, Ferdowsi S, Ebrahimi-Barough S, Kamian S, Ai J. Tissue engineering applications in breast cancer. Journal of Medical Engineering & Technology. 2020;44(4):162-8.
8.Wei C, Yang C, Wang S, Shi D, Zhang C, Lin X, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. Molecular cancer. 2019;18(1):1-23.
9.Pleşca-Manea L, Pârvu AE, Pârvu M, Taa˘maş M, Buia R, Puia M. et al. Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation. Phytotherapy research. 2002;16(4):316-9.
10.Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Spallino A, Falchi M, Bertelli A, et al. Antioxidant activity of Calendula officinalis extract: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy. Pharmacology. 2009;83(6):348-55.
11.Narimani R, Tarakemeh A, Moghaddam M, Mahmoodi Sourestani M. Phytochemical variation within aerial parts of ferula cupularis populations, an endangered medicinal plant from Iran. Chemistry & Biodiversity. 2021;18(12):e2100551.
12.Bocci G, Di Paolo A, Danesi R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. Angiogenesis. 2013;16:481-92.
13.Greenwell M, Rahman P. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2015;6(10):4103.
14.Tian Q-E, Yan M, Cai H-L, Tan Q-Y, Zhang W-Y. Astragalus polysaccharides can regulate cytokine and P-glycoprotein expression in H22 tumor-bearing mice. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2012;18(47):7079.
15.Ansari G, Delbari A, Karimi M, Akbari Kamrani AA, Abolfathi Momtaz Y, Sahaf R. et al. The effect of Melilotous Officinalis oil on the physical function of older adults with mild to moderate knee osteoarthritis: A double-blind randomized controlled trial. Iranian Journal of Ageing. 2019;14(2):132-43.
16.Qi H, Wei L, Han Y, Zhang Q, Lau AS-Y, Rong J. et al. Proteomic characterization of the cellular response to chemopreventive triterpenoid astragaloside IV in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. International journal of oncology. 2010;36(3):725-35.
17.Huang C, Xu D, Xia Q, Wang P, Rong C, Su Y. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by Astragaloside II. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012;64(12):1741-50.
18.Zhang D, Zhuang Y, Pan J, Wang H, Li H, Yu Y, et al. Investigation of effects and mechanisms of total flavonoids of Astragalus and calycosin on human erythroleukemia cells. Oxidative medicine and cellular longevity. 2012;2012:1-5.
19.Umer KH, Zeenat F, Ahmad W, Vakil A. Therapeutics, phytochemistry and pharmacology of Iklilul Malik (Astragalus hamosus Linn): A natural Unani Remedy. International Journal of Herbal Medicine .2017; 5(5): 01-05

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

20.Krasteva I, Momekov G, Zdraveva P, Konstantinov S, Nikolov S. Antiproliferative effects of a flavonoid and saponins from Astragalus hamosus against human tumor cell lines. Pharmacognosy Magazine. 2008;4(16):269-72.
21.Saleem S, Shaharyar MA, Khusroo MJ, Ahmad P, Rahman RU, Ahmad K, et al. Anticancer potential of rhamnocitrin 4′-β-d-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. Molecular and cellular biochemistry. 2013;384:147-53.
22.McCulloch M, See C, Shu X-j, Broffman M, Kramer A, Fan W-y, et al. Astragalus-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non–small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials. Journal of Clinical Oncology. 2006;24(3):419-30.
23.Song M, Yin Y, Zhang J, Zhang B, Bian Z, Quan C, et al. MiR-139-5p inhibits migration and invasion of colorectal cancer by downregulating AMFR and NOTCH1. Protein & cell. 2014;5(11):851-61.
24.Chen W, Yuan Y, Li C, Mao H, Liu B, Jiang X. et al. Modulating tumor extracellular matrix by simultaneous inhibition of two cancer cell receptors. Advanced Materials. 2022;34(10):2109376.
25.MOSESSON MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. Journal of thrombosis and haemostasis. 2005;3(8):1894-904.
26.Mahmoodi M, Ebrahimi–Barough S, Kamian S, Azami M, Mehri M, Abdi M, et al. Fabrication and characterization of a three-dimensional fibrin gel model to evaluate anti-proliferative effects of Astragalus hamosus plant extract on breast cancer cells. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2022;23(2):731.
27.Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Zupkó I, Réthy B, Falkay G, Forgo P, et al. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from Achillea millefolium sl on cultured human tumour cell lines. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2009;23(5):672-6.
28.Zuo K, Zhang X, Zou J, Li D, Lv Z. Establishment of a paclitaxel resistant human breast cancer cell strain (MCF-7/Taxol) and intracellular paclitaxel binding protein analysis. Journal of International Medical Research. 2010;38(4):1428-35.
29.Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. Physiology. 2017;32(4):266-77.
30.Seo J, Do Yoo J, Kim M, Shim G, Oh Y-K, Park R-W, et al. Fibrinolytic nanocages dissolve clots in the tumor microenvironment, improving the distribution and therapeutic efficacy of anticancer drugs. Experimental & Molecular Medicine. 2021;53(10):1592-601.
31.Kniebs C, Luengen AE, Guenther D, Cornelissen CG, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, et al. Establishment of a pre-vascularized 3D lung cancer model in fibrin gel—influence of hypoxia and cancer-specific therapeutics. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2021;9:1-11.
32.Campisi M, Shin Y, Osaki T, Hajal C, Chiono V, Kamm RD. 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. Biomaterials. 2018;180:117-29.
33.Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African journal of biotechnology. 2006;5(11): 1142-1145.
34.Shojaii A, Motaghinejad M, Norouzi S, Motevalian M. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of the extract and fractions of Astragalus hamosus in animal models. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2015;14(1):263.
35.Yance Jr DR, Sagar SM. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. Integrative cancer therapies. 2006;5(1):9-29.
36.Hoseinkhani Z, Norooznezhad F, Rastegari-Pouyani M, Mansouri K. Medicinal plants extracts with antiangiogenic activity: where is the link? Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2020;10(3):370.
37.Subbaraj GK, Kumar YS, Kulanthaivel L. Antiangiogenic role of natural flavonoids and their molecular mechanism: an update. The Egyptian Journal of Internal Medicine. 2021;33(1):1-10.
38.Gacche R. Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. Oncogenesis. 2015;4(6):1-8.
39.Li X, Qu L, Dong Y, Han L, Liu E, Fang S, et al. A review of recent research progress on the astragalus genus. Molecules. 2014;19(11):18850-80.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]

40.Khater M, Greco F, Osborn HM. Antiangiogenic activity of flavonoids: a systematic review and meta-analysis. Molecules. 2020;25(20):4712.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.9]