

Original Paper

Effect of aqueous extract of *Salvia atropatana* leaf on subcutaneous tumor model of CT26 colon carcinoma in Mice

Hoda Radmanesh, M.Sc Student of Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

ORCID 0000-0002-5184-6829

*Maryam Tehranipour (Ph.D), Corresponding Author, Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir & maryam_tehranipour@yahoo.com

ORCID 0000-0001-5302-5808

Ameneh Sazgarnia (Ph.D), Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Medical Physics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

ORCID 0000-0001-9542-6423

Abstract

Background and Objective: Cancer can spread to distant parts of the body through the lymphatic system or bloodstream. Angiogenesis is a fundamental step in the transition of tumors from a dormant state to a malignant. Some changes in cancerous cells can be improved and treated using herbal extracts. *Salvia* species in Iranian traditional medicine were used against various infections, inflammatory diseases. This study was done to evaluate the effect of aqueous extract of *Salvia atropatana* leaf on subcutaneous tumor model of CT26 colon carcinoma in Mice.

Methods: In this experimental study, for the induction of colon carcinoma, 26CT cells were injected into 18 BALB/c male Mice. Subcutaneous injection was done in the right side of the animal. When the size of the tumor was 50 ± 350 mm³, 18 Mice were randomly allocated into 3 groups, including controls, aqueous extracts a breakdown of each dose 50 and 100 mg/kg/bw. The group containing the aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf was injected for 14 days, daily. To monitor the therapeutic effects, the parameters of the stopping rate in the growth of the tumor, the relative volume changes and the doubling of tumor volume were evaluated. After sacrificed the animals at the end the fourteenth day of the study, tumors were dissected for histological study.

Results: The volume of tumors and the mean density of the number of vessels was significantly reduced in treated group 1 (50 mg/kg/bw of aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf) and treated group 2 (100 mg/kg/bw of aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf) in compared to control group ($P < 0.05$). Reduction in density of cells and vascular sections was significantly reduced in treated group 1 (50 mg/kg/bw of aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf) and treated group 2 (100 mg/kg/bw of aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf) in compared to control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Aqueous extracts of *Salvia atropatana* leaf has anti-angiogenesis activity and significant inhibitory effects on tumor growth in animal model.

Keywords: *Salvia atropatana*, Cells CT26, Angiogenesis, Tumor Growth, Aqueous Extract

Received 4 Mar 2020

Revised 19 Jul 2020

Accepted 21 Jul 2020

Cite this article as: Radmanesh H, Tehranipour M, Sazgarnia A. [Effect of aqueous extract of *Salvia atropatana* leaf on subcutaneous tumor model of CT26 colon carcinoma in Mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Spring; 23(1): 38-46. [Article in Persian]

اثر عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی (*Salvia atropatana*)

روی مدل تومور زیرجلدی کارسینومای کولون CT26 موش نژاد BALB/c

ORCID 0000-0002-5184-6829

هدی رادمنش، دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

ORCID 0000-0001-5302-5808

* دکتر مریم طهرانی پور، دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشیار گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

ORCID 0000-0001-9542-6423

دکتر آمنه سازگارنیا، استاد، گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان می‌تواند به قسمت‌های دورتری از بدن از طریق سیستم لنفاتیک یا جریان خون گسترش یابد. آنژیوژنز یک گام اساسی در انتقال تومورها از حالت خفته به بدخیم است. گیاه مریم گلی آذربایجانی متعلق به خانواده نعنا است. گونه‌های *Salvia* در طب سنتی ایران علیه عفونت‌های مختلف، درمان بیماری‌های التهابی و سرطان به کار رفته است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی (*Salvia atropatana*) روی مدل تومور زیرجلدی کارسینومای کولون CT26 موش نژاد BALB/c انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۱۸ سر موش نژاد BALB/c انجام شد. به منظور القای کارسینومای کولون سلول‌های CT26 به صورت زیرجلدی در ناحیه لومبار راست موش‌ها تزریق شد. زمانی که اندازه تومور به 350 ± 50 میلی‌مترمکعب رسید؛ ۱۸ سر موش به‌طور تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی (یک گروه کنترل و دو گروه تیمار) تقسیم شدند. برای گروه کنترل تیماری صورت نگرفت. به گروه‌های تیمار اول و دوم به ترتیب روزانه ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی به مدت ۱۴ روز تزریق شد. برای پیگیری اثرات درمانی، پارامترهای میزان توقف در رشد تومور، تغییرات حجم نسبی و زمان دوبرابر شدن حجم تومورها ارزیابی گردید. پس از قربانی شدن حیوانات در پایان روز چهاردهم، تومورها برای ارزیابی بافت‌شناسی اتوپسی شدند.

یافته‌ها: حجم نسبی تومور در گروه تیمار اول ($216/3 \pm 14/7$)، تیمار دوم ($174/9 \pm 7/5$) در مقایسه با گروه کنترل ($322/5 \pm 5/2$) کاهش آماری معنی‌داری یافت ($P < 0/05$). کاهش آماری معنی‌داری در میانگین دانسیته تعداد عروق در واحد سطح در دو گروه تیمار نسبت به نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0/05$). همچنین نتایج هیستولوژیک کاهش تراکم سلول‌ها و مقاطع عروق در دو گروه تیمار را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن فعالیت آنتی‌آنژیوژنز و اثرات مهارکنندگی قابل توجهی علیه رشد سلول‌های کارسینومای کولون رده CT26 نشان دادند.

کلید واژه‌ها: مریم گلی، سلول‌های CT26، آنژیوژنز، رشد تومور، عصاره آبی

* نویسنده مسؤول: دکتر مریم طهرانی پور، پست الکترونیکی maryam_tehrani@mshdiau.ac.ir و maryam_tehrani@mshdiau.ac.ir

نشانی: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، تلفن و نمابر ۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۴/۲۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۴/۳۱

مقدمه

همچنین عوامل خطر دیگری نظیر نژاد، مکان جغرافیایی، سبک، عوامل بالینی و پاتولوژیکی نظیر شاخص توده بدنی، وضعیت تأهل، درجه تومور، اندازه تومور، میزان وسعت نفوذ دیواره روده، متاستاز دور، متاستاز غدد لنفی و مرحله پاتولوژیک تومور نیز بر میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نقش دارند (۱).

آپویتوز کلمه یونانی است و به معنی برگ‌ریزان است. اغلب منابع دو واژه آپویتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را مترادف هم به کار برده. عده‌ای دیگر نیز آپویتوز را مهم‌ترین نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی قلمداد کرده‌اند (۲). واژه آنژیوژنز به معنی ایجاد مویرگ‌های جدید از عروق موجود برای اولین بار توسط محقق‌ها به نام Hertig در سال ۱۹۳۵ به کار رفت (۳). آنژیوژنز یا

سرطان روده بزرگ یکی از سرطان‌های رایج و از مهم‌ترین تومورهای بدخیم در دنیا است. سرطان کولورکتال شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش است که حدود ۱۰ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان را به خود اختصاص می‌دهد و عامل اصلی بروز آن به طور دقیق شناخته نشده است. این سرطان با توجه به عامل جنسیت در بین زنان، پس از سرطان ریه و پستان رتبه سوم را از نظر شیوع دارد و در بین مردان پس از سرطان ریه و پروستات قرار می‌گیرد (۱). عوامل خطر غیر قابل اصلاح این سرطان شامل سن بالای ۶۵ سال، سابقه فامیلی سرطان، بیماری التهابی روده، پولیپ‌های آدنوماتوی فامیلی، سرطان فامیلی غیرپولیپی روده بزرگ هستند.

ضدتوموری هستند (۱۱). Hogan و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که فلاونوئید (از ترکیبات گیاه جنس *Salvia*) باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی کولون می‌شود (۱۲). Bian و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که تانیشینون I باعث مهار آنژیوژنز در سلول‌های اندوتلیالی جنینی انسان می‌شود (۱۳).

Hawas و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ترکیبات حاصل از گیاه *Salvia* مانند کافنیک سالواجنین اسید با اثر گذاشتن روی سیتوکروم ۱a ۴۵۰ p- و آسیب DNA از ایجاد بدخیمی تومور جلوگیری می‌کند (۱۴). از آنجا که گیاه مریم گلی سابقه طولانی در مصرف پزشکی داشته و ترکیبات عمده آن اثرات فارماکولوژیکی بی‌نظیری مانند اثرات آنتی‌توموریک، آنتی‌دیابتیک، آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی داشته و باتوجه به این که اثر سمیت سلولی بعضی از گونه‌های مریم گلی بر بعضی از رده‌های سلول‌های سرطانی گزارش شده است (۱۵) و باتوجه به این که اثرات ضدتوموری این گیاه به صورت *in vivo* مورد بررسی قرار نگرفته است؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی (*Salvia atropatana*) روی مدل تومور زیرجلدی کارسینومای کولون CT26 موش نژاد BALB/c انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۱۸ سر موش نر نژاد BALB/c خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد.

پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها در شرایط یکسان و استاندارد ۱۲ ساعت نور - تاریکی و درجه حرارت ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات نگهداری شدند. حیوانات در طول آزمایش به آب و غذای کافی (خریداری از شرکت جوانه خراسان) دسترسی داشتند.

گیاه مریم گلی آذربایجانی از اطراف بجنورد جمع‌آوری و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با شماره هرباریوم ۱۹۹۲ شناسایی شد. پس از خشک کردن گیاه در سایه برگ گیاه مریم گلی آذربایجانی توسط دستگاه خردکننده کاملاً آسیاب و پودر آن تا زمان عصاره‌گیری در جای خشک و خنک نگهداری گردید. برای تهیه عصاره آبی از روش سوکسله (Soxhelt) با نوع حلال آب مقطر استفاده گردید (۱۰). پس از گذشت ۸ ساعت عمل عصاره‌گیری متوقف شد و در پایان از عصاره آبی حذف حلال صورت گرفت. به منظور حذف حلال عصاره به دست آمده در انکوباتور با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد و به این وسیله عصاره آبی کاملاً تغلیظ و خشک شد. پس از حذف حلال عصاره خالص به دست آمد. میزان عصاره آبی ۱۲/۷ گرم با بازده ۲۵/۴ درصد بود. این عصاره را می‌توان برای مدت‌ها در فریزر با

رنگ‌زایی به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتریت روماتوئید و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد. اساساً آنژیوژنز یک فرآیند لازم در فیزیولوژی طبیعی است و در صورتی که تعادل بین فاکتورهای القاء کننده و مهارکننده آنژیوژنز بر هم خورد؛ شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید (۴). پولیپ، توده‌ای است که به داخل مجرای روده برجسته شده، ممکن است در اثر کشش ساقه دار، یا اصطلاحاً پرانکوله شود و یا اینکه پولیپ *Sessile* باشد؛ یعنی ساقه مشخصی نداشته باشد (۳).

استفاده از عصاره‌های گیاهی به جهت نداشتن اثرات جانبی بر بافت‌های سالم راه درمانی مناسبی برای بسیاری از بیماری‌هاست (۵). مریم گلی (*Salvia atropatana*) گیاهی علفی و چند ساله از خانواده نعنائیان (Labiatae) است؛ ظاهری پر شاخه دارد و ارتفاع آن ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است (۴). این گیاه از روزگاران کهن مورد توجه خاص بوده و ابتدا به عنوان داروی مؤثر برای معالجه عوارض نیش حشرات، به عنوان ضد سم و همچنین داروی تونیک و مقوی برای تقویت روح و بدن و افزایش طول عمر به کار رفته است. گونه‌های مختلف جنس *Salvia* نشان داده‌اند که دارای خواص ضدباکتری، ضد قارچ، ضدتومور، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بوده اند (۶). از گل‌های آن نیز در سالاد و برگ آن برای تهیه چای که خاصیت ضد عفونی کننده و متعادل کننده خون را دارد استفاده می‌شود. همچنین به واسطه وجود برخی ترکیب‌ها نظیر توجن، سینئول و کامفر که خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و احتمالاً ضد سرطانی دارند؛ در صنایع داروسازی از اسانس مریم گلی استفاده می‌شود (۷). ترکیبات و یا اجزای اصلی تشکیل دهنده مهم این جنس، اسانس‌ها، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپنوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، رزین، ساپونین‌ها و فنول‌ها هستند. به علاوه، ترکیب اصلی تشکیل دهنده گونه‌های سالونولیک اسید است (۸، ۹). سالونال، ترکیب جدا شده از دانشن، (*Salvia multirrhiza*) بازدارنده تشکیل میکروتوبول و داروی فعالیت ضد میتوزی در سلول‌های سرطانی است و بر روی رشد سلول سرطانی فعالیت بازدارندگی نشان داشته و در سلول‌های سرطانی انسان مرگ سلولی را ایجاد می‌کند. سالونال شاید در درمان سرطان‌های انسان مفید باشد؛ به خصوص در بیمارانی که به دارو مقاومند. بنابراین سالونال می‌تواند به عنوان عامل دپلی‌مریزاسیون میکروتوبول شناخته شود و در درمان انواع سرطان مانند سرطان پستان، مثانه، سر و گردن به کار رود (۱۰). Fiore و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر ضدتوموری ۶ گونه از *Salvia* را روی رده‌های سلولی سرطانی متفاوت و مختلف انسانی بررسی و نشان دادند که ۵ گونه از این ۶ گونه دارای خاصیت

دما منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. رده سلولی CT26، محیط کشت RPMI 1640، تریپسین، تریپان بلو و دی متیل سولفو کساید برای مطالعات سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

رده سلولی CT26 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به میزان لازم مورد تکثیر قرار گرفت (۴). این رده سلولی دیفرانسیه نشده کارسینومای کولون، اولین بار با استفاده از N نیترو N متیل اورتال (N-nitroso-N-methyl urethane) در کولون موش BALB/c ایجاد و سپس رده خالص آن استخراج شده است (۱۰).

محیط کشت RPMI 1640 محیطی است که در انستیتو Roswell park Memoria ساخته شده و حاوی کلیه اسیدهای آمینه و ویتامین‌های مورد نیاز است (۱۰). محیط کشت کامل و آماده RPMI 1640 تهیه گردید. برای کندن سلول‌ها از کف فلاسک‌های کشت از محلول تریپسین EDTA آماده (ساخت شرکت بیوژن) استفاده گردید (۱۰).

برای تعیین تراکم سلولی و درصد بقای سلول‌های تریپسین شده تریپان بلو آماده مورد استفاده قرار گرفت (۸). برای فریز کردن سلول‌ها از دی متیل سولفو کساید (DMSO Dimethyl Sulfoxide) آماده استفاده شد (۱۰).

ایجاد تومور در موش‌های BALB/c: زمانی که سلول‌ها به صورت تک لایه کامل سطح فلاسک را پوشانند؛ سلول‌ها تریپسین شده و پس از ۳ بار شستشو، تعداد سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده به روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین گردید. حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم زایلازین (شرکت دارویی بهار سامان، XY) ۲ درصد و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کتامین (Rotex medica GmbH) بیهوش شدند (۱۰).

سپس به هر موش (n=18)، تعداد 1×10^6 سلول CT26 در حجم ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی تزریق شد. تزریق به صورت زیر جلدی در ناحیه لومبار راست حیوان انجام گردید.

گروه‌های درمانی: پس از آن که حجم تومورها به 350 ± 50 میلی متر مکعب رسید؛ حیوانات به طور تصادفی در ۳ گروه ۶ تایی (یک گروه کنترل و دو گروه تیمار) به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: القای تومور به عمل آمد. روزانه ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به همان میزان که گروه‌های درمانی دریافت کردند؛ تزریق شد.

گروه تیمار اول (تیمار آبی A): در ابتدا توموری به حجم 350 ± 50 میلی متر مکعب داشتند. به مدت ۱۴ روز تزریق داخل صفاقی عصاره آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی ۱۴ روز انجام شد.

گروه تیمار دوم (تیمار آبی B): در ابتدا توموری به حجم

$$V = \pi/6 (a.b.c)$$

به منظور مقایسه نهایی، اولین روز درمان روز صفر در نظر گرفته شد و حجم تومورها نسبت به حجم آنها در روز صفر تعیین گردید. با استفاده از حجم تومور در روزهای مورد بررسی، تغییر نسبی حجم

برای ارزیابی رشد تومورها: برای بررسی روند رشد تومورها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار اول و دوم، نتایج درمان از پنج دیدگاه شامل اندازه حجم تومورها (V)، حجم نسبی تومورها (RV)، درصد تغییرات حجم نسبی تومورها (RV%)، درصد توقف رشد تومورها (IR%) و زمان ۲ برابر شدن حجم تومورها (T^2) مورد بررسی قرار گرفتند.

متغیرهای اندازه حجم تومورها و حجم نسبی تومورها طی ۱۴ روز دوره درمان در روز هفتم و چهاردهم درمان بین گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل مقایسه گردید. همچنین درصد تغییرات حجم نسبی تومور و درصد توقف رشد تومورها طی ۱۴ روز درمان بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل مقایسه گردید. برای تخمین زمان دو برابر شدن حجم تومورها برای هر موش از گروه کنترل و گروه‌های تیمار تابعی منطبق بر زمان دو برابر شدن حجم تومورها نسبت به تغییرات حجم نسبی آنها برآورد گردید.

دانشیته تعداد عروق در واحد سطح شاخص مناسبی برای ارزیابی روند آنژیوژنز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل است. با توجه به این که آنژیوژنز یک عامل مهم در رشد تومور بوده و به تغذیه، تکثیر و گسترش بافت تومور کمک می‌کند؛ برای بررسی تغییرات آنژیوژنز در بافت تومور در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل، دانشیته تعداد عروق در واحد سطح (Ln) در بافت توموری گروه‌های مختلف محاسبه گردید.

برای ارزیابی حجم تومورها قبل و بعد از درمان، روزانه اندازه‌گیری ابعاد تومور با کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی متر انجام گردید. قطر بزرگ (a)، قطر کوچک (b) و ضخامت تومورها (c) در نظر گرفته شد و با استفاده از رابطه یک، حجم تومورها (V) محاسبه شد. برای کاهش خطا (خطای زیر ۵ درصد مورد قبول)، اندازه‌گیری اقطار سه بار انجام و میانگین گزارش شد.

به منظور مقایسه نهایی، اولین روز درمان روز صفر در نظر گرفته شد و حجم تومورها نسبت به حجم آنها در روز صفر تعیین گردید. با استفاده از حجم تومور در روزهای مورد بررسی، تغییر نسبی حجم

برای ارزیابی رشد تومورها: برای بررسی روند رشد تومورها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار اول و دوم، نتایج درمان از پنج دیدگاه شامل اندازه حجم تومورها (V)، حجم نسبی تومورها (RV)، درصد تغییرات حجم نسبی تومورها (RV%)، درصد توقف رشد تومورها (IR%) و زمان ۲ برابر شدن حجم تومورها (T^2) مورد بررسی قرار گرفتند.

متغیرهای اندازه حجم تومورها و حجم نسبی تومورها طی ۱۴ روز دوره درمان در روز هفتم و چهاردهم درمان بین گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل مقایسه گردید. همچنین درصد تغییرات حجم نسبی تومور و درصد توقف رشد تومورها طی ۱۴ روز درمان بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل مقایسه گردید. برای تخمین زمان دو برابر شدن حجم تومورها برای هر موش از گروه کنترل و گروه‌های تیمار تابعی منطبق بر زمان دو برابر شدن حجم تومورها نسبت به تغییرات حجم نسبی آنها برآورد گردید.

دانشیته تعداد عروق در واحد سطح شاخص مناسبی برای ارزیابی روند آنژیوژنز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل است. با توجه به این که آنژیوژنز یک عامل مهم در رشد تومور بوده و به تغذیه، تکثیر و گسترش بافت تومور کمک می‌کند؛ برای بررسی تغییرات آنژیوژنز در بافت تومور در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل، دانشیته تعداد عروق در واحد سطح (Ln) در بافت توموری گروه‌های مختلف محاسبه گردید.

$Q =$ نشان دهنده تعداد مقاطع عروق در مساحت A

مساحت A از مساحت مربعی با اضلاع ۲ سانتی متر به دست می آید. ابتدا لازم است تا درشت‌نمایی کل با استفاده از لام میکرومتری (برابر با ۵۰۰) محاسبه گردد.

رابطه پنج $A =$ درشت‌نمایی کل / هر ضلع مربع

$$A = (20 \text{ mm} / 500) \times 2 = 0.08 \text{ mm}^2 = 16 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$$

عدد به دست آمده A همان مساحت فریم مربعی با اضلاع ۲ سانتی متر است که تعداد مقاطع عروقی بر روی صفحه مانیفور در آن شمارش شده است.

با توجه به تعداد تصاویر تهیه شده و عروق شمارش شده در فریم مربعی، میانگین مقاطع عروقی محاسبه گردید و در فرمول پنج به عنوان Q گذاشته شد. بدین طریق می توان تراکم مویرگی را در واحد سطح، در بافت تومور گروه‌های تیمار متفاوت و در گروه کنترل به دست آورد. در هر نمونه ۲۴ بار شمارش از قسمت‌های متعدد بافت تومور انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از جداول توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار توصیف شد و حجم نسبی، درصد تغییرات حجم نسبی، درصد توقف تومورها و زمان دو برابر شدن حجم تومورها در هر گروه با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به معنی دار بودن آزمون کروسکال والیس، آزمون من ویتنی برای مقایسه گروه‌ها در نظر گرفته شد. نرمالیتی متغیرهای کمی (مقایسه حجم تومورها و حجم نسبی و درصد تغییرات حجم نسبی تومورها بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل و نیز مقایسه درصد توقف رشد تومور بین گروه‌های تیمار طی ۱۴ روز) با استفاده از روش کولموگراف - اسمیرنوف تعیین شد. برای تعیین اختلاف معنی داری بین گروه‌های مختلف از آزمون من ویتنی استفاده شد. برای مقایسه دانسیته تعداد عروق در واحد سطح، در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل از آزمون ANOVA استفاده شد سطح معنی داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

درصد تغییرات حجم نسبی تومورها در گروه‌های مورد مطالعه در جدول یک نشان داده شده است.

میانگین و خطای معیار حجم تومورها در هفتمین روز درمان در دو گروه تیمار و گروه کنترل در نمودار یک آمده است. به طوری که در روز هفتم درمان میانگین حجم تومورها در گروه تیمار اول ($P < 0.05$) و گروه تیمار دوم ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و این کاهش حجم در گروه تیمار دوم نسبت به گروه تیمار اول بیشتر بود ($P < 0.05$).

تومور (RV) (رابطه دو) و درصد تغییرات حجم نسبی تومورها (RV%) از رابطه سه به دست آمد (۱۶).

$$RV = V/V0 \text{ رابطه دو}$$

$$\%RV = [(V-V0) / V0] \times 100 \text{ رابطه سه}$$

در این رابطه، V و $V0$ حجم تومور به ترتیب در روزهای پس از درمان و روز شروع درمان است (۱۷).

پارامتر درصد توقف در رشد تومور (IR)، میزان موفقیت پروتکل درمانی در گروه‌های مختلف در روند کاهش رشد تومورها در روزهای متوالی پس از درمان را نسبت به گروه کنترل مطابق رابطه چهار نشان می‌دهد (۱۸).

$$IR = [(V \text{ control} - V \text{ treated}) / V \text{ control}] \times 100 \text{ رابطه چهار}$$

در این رابطه حجم V_{control} ، حجم نرمالیزه شده در همان روز در گروه کنترل است و V_{treated} نشان‌دهنده حجم نرمالیزه شده تومور مورد نظر در گروه مورد نظر پس از درمان است.

روش نمونه‌برداری: پس از اتمام دوره درمان، حیوان در معرض بیهوشی (کتامین و زایلازین) قرار گرفت. سپس روی تشک تشریح قرار داده شد و از ناحیه لومبار راست حیوان به فاصله یک سانتی متری از لبه‌های تومور، پوست همراه با تمامی ضایعات به طور کامل برداشته شد. سپس تومور از آن جدا گردید و از قسمت‌های سطحی و عمقی تومور برش‌های متعددی به اندازه ۸ میلی متر تهیه گردید. نمونه‌ها برای جلوگیری از اتولیز بافت‌ها و پایدار شدن هر چه بیشتر در وضع طبیعی و سهولت رنگ آمیزی و سخت شدن ثابت شدند. بدین منظور نمونه‌ها در محلول فرمالین بافری ۱۰ درصد (Merk)، به میزان حدود ۱۰ برابر حجم نمونه‌ها قرار گرفتند. هر شیشه مختص یک نمونه بود و مشخصات تومور روی شیشه درج شد.

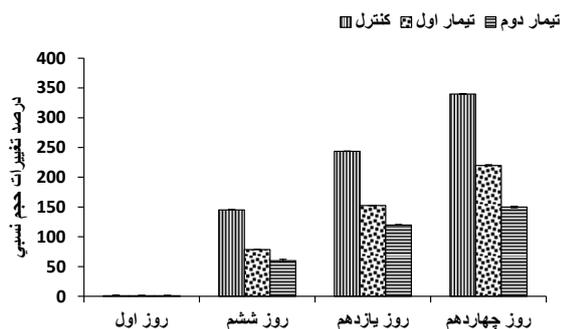
پس از طی مراحل پاساژ بافتی از بافت برش‌های ساژیتال سریال ۴ میکرونی تهیه شد و با هما توکسلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. پس از اتمام مراحل رنگ آمیزی و خشک شدن چسب، تصاویر مربوط به هر نمونه بافتی با استفاده از دوربین دیجیتال که لنز آن بر روی بزرگنمایی ۴ تنظیم شده بود؛ تهیه گردید. تصاویر با عدسی شیئی ۴۰ از برش‌های مناسب هر لام تهیه شد. تصاویر بر روی مانیفور کامپیوتر بررسی شد. فریم مربعی با اضلاع ۲ سانتی متر بر روی تصویر سطح مقطع مورد نظر به صورت تصادفی قرار گرفت. تعداد مویرگ‌های داخل فریم با مجموع نصف تعداد مویرگ‌هایی که بر روی اضلاع قرار داشتند؛ شمارش گردید و به صورت تعداد کل مویرگ‌های مقطع محاسبه شدند (۱۹).

مرحله شمارش مویرگ‌ها و رنگ‌ها: برای تخمین دانسیته تراکم عروق در واحد سطح از فرمول $Ln = 2QA$ استفاده شد (۱۶).

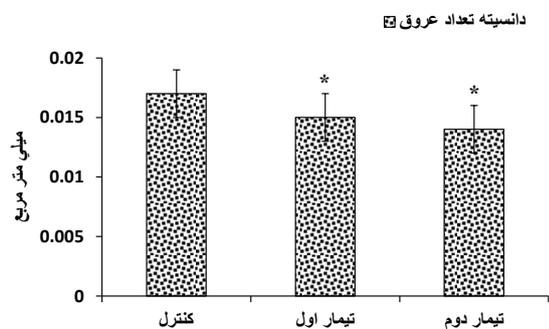
$$Ln = \text{نشان دهنده دانسیته تعداد عروق در واحد سطح}$$

به گروه کنترل کاهش یافت و این کاهش حجم نسبی در گروه تیمار دوم نسبت به گروه تیمار اول بیشتر بود ($P < 0.05$).

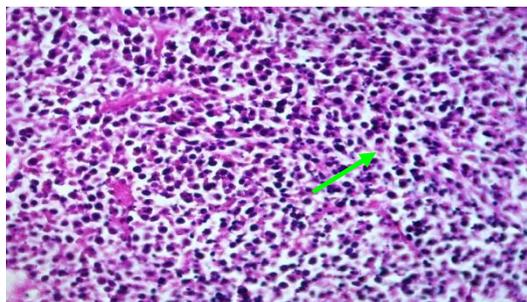
میانگین و خطای معیار درصد تغییرات حجم نسبی طی دوره درمان در گروه‌های تیمار و گروه کنترل در نمودار ۳ آمده است. به طوری که طی دوره درمان تغییرات حجم نسبی تومورها در گروه تیمار اول ($P < 0.01$) و گروه تیمار دوم ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ($P < 0.05$). همچنین گروه درمانی دریافت کننده عصاره آبی با دوز 100 mg/kg/bw کاهش حجم بیشتری نسبت به گروه درمانی دریافت کننده عصاره آبی با دوز 50 mg/kg/bw نشان داد ($P < 0.05$).



نمودار ۳: مقایسه درصد تغییرات حجم نسبی تومورها طی چهارده روز دوره درمان. گروه‌های تیمار اول و دوم دریافت کننده عصاره آبی به ترتیب با دوزهای 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است.

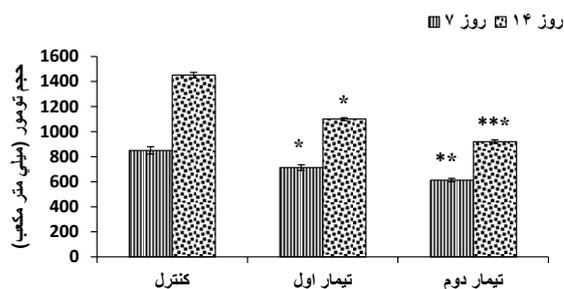


نمودار ۴: مقایسه دانسیته تعداد عروق در واحد سطح (میلی متر مربع) در گروه‌های مختلف ($n=6$). نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. $P < 0.05$ *

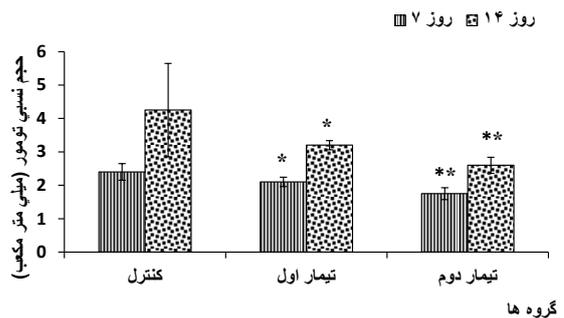


شکل ۱: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیرپوستی در گروه کنترل. فلش رگ خونی را نشان می‌دهد. بزرگ نمایی $40 \times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین

میانگین و خطای معیار حجم تومورها در چهاردهمین روز درمان در گروه‌های تیمار و گروه کنترل در نمودار یک آمده است. به طوری که در روز چهاردهم درمان میانگین حجم تومورها در گروه تیمار اول ($P < 0.05$) و گروه تیمار دوم ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و این کاهش حجم در گروه تیمار دوم نسبت به گروه تیمار اول بیشتر بود ($P < 0.05$).



گروه‌ها
نمودار ۱: مقایسه اندازه حجم تومورها در روز ۷ و ۱۴ پس از درمان (عصاره آبی) با گروه کنترل ($n=6$). گروه‌های تیمار اول و دوم دریافت کننده عصاره آبی به ترتیب با دوزهای 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. $P < 0.05$ * $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ ***



نمودار ۲: مقایسه حجم نسبی تومورها در روز ۷ و ۱۴ پس از درمان (عصاره آبی) با گروه کنترل ($n=6$). گروه‌های تیمار اول و دوم دریافت کننده عصاره آبی به ترتیب با دوزهای 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. $P < 0.05$ * $P < 0.001$ **

میانگین و خطای معیار حجم نسبی تومورها در هفتمین روز درمان در گروه‌های تیمار و گروه کنترل در نمودار ۲ آمده است. به طوری که در روز هفتم درمان میانگین حجم نسبی تومورها در گروه تیمار اول ($P < 0.05$) و گروه تیمار دوم ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و این کاهش حجم نسبی در گروه تیمار دوم نسبت به گروه تیمار اول بیشتر بود ($P < 0.05$).

میانگین و خطای معیار حجم نسبی تومورها در چهاردهمین روز درمان در گروه‌های تیمار و گروه کنترل در نمودار ۲ آمده است. به طوری که در روز چهاردهم درمان میانگین حجم نسبی تومورها در گروه تیمار اول ($P < 0.05$) و گروه تیمار دوم ($P < 0.001$) نسبت

جدول ۱: میانگین و خطای معیار درصد تغییرات حجم نسبی تومور طی ۱۴ روز در گروه‌های کنترل و تیمار با عصاره آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن

روز	میانگین و انحراف معیار		کنترل
	عصاره آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن	عصاره آبی گیاه مریم گلی آذربایجانی دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن	
۱	۱۶/۸±۲/۸	۱۲/۳±۳/۰	۲۵/۸±۹/۴
۲	۳۰/۷±۴/۰	۱۹/۸±۲/۴	۵۰/۲±۱۲/۵
۳	۵۳/۳±۶/۴	۴۰/۳±۷/۸	۷۶/۱±۹/۸
۴	۶۹/۸±۵/۴	۵۸/۶±۷/۷	۹۷/۸±۹/۸
۵	۸۴/۲±۱۰/۰	۶۷/۳±۶/۰	۱۲۵/۳±۹/۶
۶	۱۰۳/۰±۹/۵	۸۰/۳±۶/۴	۱۴۴/۹±۹/۰
۷	۱۳۰/۷±۹/۲	۸۶/۹±۵/۲	۱۶۸/۳±۹/۴
۸	۱۴۳/۷±۱۰/۶	۱۰۰/۸±۶/۲	۱۸۰/۶±۹/۲
۹	۱۵۱/۹±۱۲/۲	۱۱۰/۷±۵/۹	۲۱۱/۴±۱۲/۰
۱۰	۱۶۲/۹±۱۱/۲	۱۳۲/۶±۸/۹	۲۳۸/۱±۸/۰
۱۱	۱۷۳/۵±۱۱/۶	۱۴۵/۱±۷/۱	۲۷۲/۴±۵/۵
۱۲	۱۹۷/۲±۱۳/۵	۱۶۲/۴±۸/۱	۲۹۵/۲±۵/۷
۱۳	۲۱۶/۳±۱۴/۷	۱۷۴/۹±۷/۵	۳۲۲±۵/۲

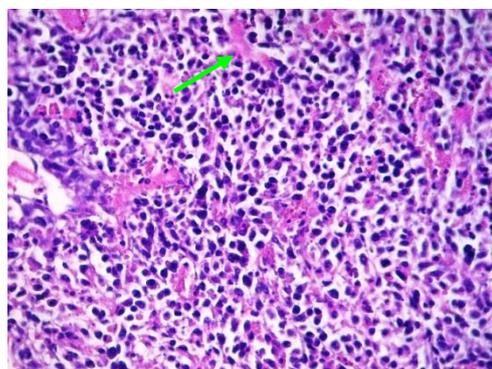
که دانسیته تعداد عروق در واحد سطح در گروه‌های تیمار اول و دوم تقریباً به‌طور مساوی نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ($P < 0.05$).

نتایج هیستولوژیک برش‌های بافتی نمونه‌های گروه کنترل و گروه‌های تیمار در شکل‌های ۳-۱ نشان داده است. عکس‌های گروه‌های تیمار، کاهش تراکم سلول‌ها و مقاطع عروق را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

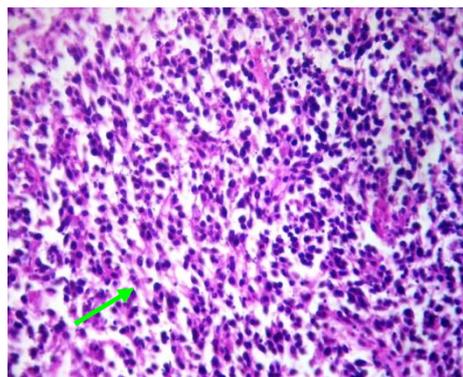
بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، روند رشد تومورها و دانسیته تعداد عروق در واحد سطح در گروه‌های تحت درمان با عصاره‌های آبی گیاه مریم گلی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش نشان دادند.

نتایج حاصل از مطالعات مختلف نشان داده ترکیبات عصاره‌های آبی این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتوموری هستند (۱۶ و ۱۸ و ۱۹). همچنین باعث القاء آپوپتوز شده و به این طریق از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی متعدد جلوگیری می‌کنند (۲۱-۱۹). ترکیبات عصاره‌های گونه‌های مختلف گیاه مریم گلی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند (۲۰). همچنین با اثر گذاشتن روی مکانیسم‌های مختلف سلول سرطانی از رشد و تکثیر و بدخیمی آنها جلوگیری می‌کند. مطالعه Tang و همکاران نشان داد که تانشینون II-A روی سلول‌های کارسینومای کولون رده (H29, SW480) اثر گذاشته و از رشد آن جلوگیری می‌کند (۲۲). مطالعه Lee و همکاران نشان داد که این ترکیب با اثر روی Cyclin-D1 و Bcl-x1 باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۶). همچنین مطالعه Gong و همکاران اثرات ضدتوموری دیگری از این ترکیب را بیان نموده و نشان داده که تانشینون I و II با اثر گذاشتن روی آنزیم کاسپاز-۳ باعث القا



شکل ۲: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیرپوستی در گروه تیمار با عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلش رگ خونی را نشان می‌دهد. بزرگ نمایی $40 \times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین



شکل ۳: برش بافتی سرطانی کولورکتال زیرپوستی در گروه تیمار با عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلش رگ خونی را نشان می‌دهد. بزرگ نمایی $40 \times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین

با توجه به نتایج آنژیوژنز، میانگین و خطای معیار دانسیته تعداد عروق در گروه‌های مورد مطالعه در نمودار ۴ آمده است. به طوری

سلول‌های کارسینومای کولون انسانی (HCT-15, CO115) شده است (۲۷). این ترکیب فسفریلاسیون ERK را مهار می‌کند و اثر مهاری بر مسیر سیگنالینگ MAPK-ERK دارد و به این طریق مانع تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. در حالت عادی این مسیر فاکتورهای نسخه برداری در هسته را فسفریله می‌کند و سبب ایجاد بقای سلولی می‌شود. لذا این ترکیب با مهار این مسیر باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۴). بنابراین عصاره آبی *Salvia* با مهار این مسیر سیگنالینگ، از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها توجهی برای اثر این گیاه بر رشد مدل توموری CT26 است که این اثر در روز ۱۴ درمان مطالعه حاضر مشخص گردید. به طوری که در گروه تحت درمان با این گیاه اندازه حجم تومورها که بیانگر میزان رشد تومورها است؛ در گروه درمانی با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. این نتیجه می‌تواند به علت مهار مسیر سیگنالینگ باشد. به طور کلی می‌توان گفت ترکیبات عصاره آبی گیاه *Salvia* با اثر بر متالوپروتئازهای خارج سلولی، نیتریک اکسید، رشد سلول‌های اندوتلیالی VEGF و FGF باعث مهار آنتیژن‌ز می‌شوند. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم بررسی اثر آنتی‌توموریک عصاره هیدروالکلی گیاه *Salvia atropatana* و تزریق عصاره‌های آبی و الکلی این گیاه قبل از القاء مواد کارسینوژن به موش‌ها اشاره نمود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گروه‌های تحت درمان با عصاره‌های آبی گیاه مریم گلی (دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به خصوص دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن، روند رشد سلول‌های کارسینومای کولون رده CT26 و دانسته تعداد عروق در واحد سطح در مقایسه با گروه کنترل را به طور معنی داری کاهش دادند. از این رو چنین به نظر می‌رسد که عصاره‌های این گیاه باعث مهار آنتیژن‌ز و مانع رشد، گسترش و متاستاز تومور می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۴۶۷۷) خانم هدی رادمنش برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. چکیده مقاله این مطالعه در کنگره بین‌المللی بیولوژی کاربردی سال ۱۳۹۰ مشهد و نیز در چهاردهمین سمینار بین‌المللی علوم پزشکی دانشگاه آزاد مطرح شده است. بدین وسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به‌خاطر همکاری بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

آپوپتوز در محیط کشت سلول‌های سرطان کبد انسان می‌شوند (۱۷) و مطالعه Shi و همکاران نشان داده که تانیشون I روی رشد سلول‌های سرطانی پروستات اثر گذاشته و باعث القاء آپوپتوز می‌شود. این ماده با کاهش آنزیم اوروکیناز A روی رشد سلول‌های سرطانی پروستات اثر می‌گذارد. اوروکیناز A آنزیمی است که میزان آن در سلول‌های سرطانی پروستات افزایش می‌یابد (۲۳). مطالعه Chen و همکاران اثرات مهار کنندگی رشد تومور، چهار ترکیب مهم از این خانواده را مورد ارزیابی قرار دارد. این ترکیبات شامل تانیشون I، تانیشون IIA، دی‌هیدروتانیشون و کریپتوتانیشون بودند. تمام این چهار ترکیب اثر مهار کنندگی روی رده سلولی (SPC-A-1) دارند؛ اما از میان آنها دی‌هیدروتانیشون از همه ترکیبات مؤثرتر بوده است. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که حلقه آروماتیکی باعث افزایش سیتوتوکسیکی می‌شود؛ ولی مکانیسم عمل آن نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۲۴).

مطالعه Sertel و همکاران نشان داد که تانیشون II با اثر گذاشتن روی مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوزی و توقف چرخه سلولی در فاز G2/M از رشد سلول‌های سرطانی معده در *in vivo* و *in vitro* جلوگیری می‌کند (۴).

از دیگر ترکیبات این گیاه، منوتوپین‌ها را می‌توان نام برد. این ترکیبات با اثر روی مسیرهای سیگنالی ژن P53 و مهار چرخه سلولی در فاز G1/S رشد سلول‌های سرطانی دهانی (HNSCC) را مهار می‌کنند (۲۵). کاربوفیلین و آلفاکاربوفیلین، گروه دیگری از ترین‌ها، دارای اثر ضد تکثیر در سلول‌های سرطانی هستند (۲۶). این یافته‌ها می‌تواند توجهی در ارتباط با اثرات آنتی‌توموریک گیاه مریم گلی آذربایجانی در مطالعه حاضر باشد. به طوری که طی دوره درمان با عصاره و آبی این گیاه سرعت رشد مدل توموری CT26 در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت.

مطالعه Jung و همکاران نشان داد که اسکارتول، دیگر ترکیب موثر این گیاه با اثر گذاشتن روی سیستم بدن موجود زنده اندازه تومور سلول سرطانی پستان را کاهش می‌دهد و رشد آن را متوقف می‌سازد. این تحقیق نشان داد که طی ۱۸ روز دوره درمان حجم تومورها که توسط کوئیس اندازه گیری شده بود؛ اندازه حجم تومورهای تحت درمان را نسبت به گروه کنترل کاهش داده بود (۲۷). این یافته‌ها می‌تواند مطابق با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر باشد که در گروه‌های درمانی با این گیاه حجم تومور نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافت.

ترکیب موثر دیگر رزماریک اسید است که فنولی است. تحقیقات روی عصاره آبی دو گونه از *Salvia* شامل *Salvia officinalis* و *Salvia fruticosa* نشان داده که این ترکیب از ترکیبات اصلی این عصاره است و باعث القاء آپوپتوز در

References

- Wang J, Li J, Wang X, Zheng C, Ma W. Downregulation of microRNA-214 and overexpression of FGFR-1 contribute to hepatocellular carcinoma metastasis. *Biochem. Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Sep; 439(1): 47-53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.032
- Chinn SB, Myers JN. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions. *J Clin Oncol.* 2015 Oct; 33(29): 3269-76. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2929
- Katoh M, Nakagama H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev.* 2014 Mar; 34(2): 280-300. DOI: 10.1002/med.21288
- Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. [Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1)]. *HNO.* 2011 Dec; 59(12): 1203-8. DOI: 10.1007/s00106-011-2274-3 [Article in German]
- Ebrahimabadi AH, Mazoochi A, Jookar Kashi F, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss from Iran. *Food and Chemical Toxicology.* 2010 May; 48(5): 1371-76. DOI: 10.1016/j.fct.2010.03.003
- Xavier CPR, Lima CF, Fernandez-Ferreira M, Pereira-Wilson C. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer.* 2009; 61(4): 564-71. DOI: 10.1080/01635580802710733
- Dai ZK, Qin JK, Huang JE, Luo Y, Xu Q, Zhao HL. Tanshinone IIA activates calcium-dependent apoptosis signaling pathway in human hepatoma cells. *J Nat Med.* 2012 Jan; 66(1): 192-201. DOI: 10.1007/s11418-011-0576-0
- Kim KH, Kim JK, Lee DH. Sonodynamic induced antitumor effect of radachlorin on solid tumor. *Current Applied Physics.* 2011 May; 11(3): 559-63. DOI: 10.1016/j.cap.2010.09.016
- Li X, Xu X, Wang J, Yu H, Wang X, Yang H, et al. A system-level investigation into the mechanisms of Chinese traditional medicine: compound Danshen formula for cardiovascular disease treatment. *PLoS ONE.* 2012; 7(9): e43918. DOI: 10.1371/journal.pone.0043918
- Afshari AR, Karimi Roshan M, Soukhtanloo M, Askari VR, Mollazadeh H, Jalili Nik M, et al. [Investigation of Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Terminalia Chebula Hydro-Alcoholic Extract on Glioblastoma Cell Line]. *Shefaye Khatam.* 2018; 6(4): 14-23. DOI: 10.29252/shefa.6.4.14 [Article in Persian]
- Fiore G, Nencini C, Cavallo F, Capasso A, Bader A, Giorgi G, et al. In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytother Res.* 2006 Aug; 20(8): 701-703. DOI: 10.1002/ptr.1911
- Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova NK, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res.* 2007 Nov; 143(1): 58-65. DOI: 10.1016/j.jss.2007.03.080
- Bian W, Chen F, Bai L, Zhang P, Qin W. Dihydro-tanshinone I inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008 Jan; 40(1): 1-6. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00370.x
- Hawas UW, Gamal-Eldeen AM, El-Toumy SAA, Meyer JJ M, Hussein AA. Inhibition of the initiation stage of carcinogenesis by *Salvia disermas* constituents. *Z Naturforsch C J Biosci.* Nov-Dec 2009; 64(11-12): 831-9. DOI: 10.1515/znc-2009-11-1213
- Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Tanshinone IIA inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer. *Cancer Lett.* 2015 Jan; 356(2 Pt B): 536-46. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.037
- Lee WY, Cheung CC, Liu KW, Fung KP, Wong J, Lai PB, et al. Cytotoxic effects of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* on doxorubicin-resistant human liver cancer cells. *J Nat Prod.* 2010 May; 73(5): 854-59. DOI: 10.1021/np900792p
- Gong Y, Li Y, Lu Y, Li L, Abdolmaleky H, Blackburn GL, et al. Bioactive tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* inhibit the growth of prostate cancer cells in vitro and in mice. *Int J Cancer.* 2011 Sep; 129(5): 1042-52. DOI: 10.1002/ijc.25678
- Cheng LC, Wu YH, Liu IH, Ho CL, Lee WC, Chang CH, et al. Pharmacokinetics, dosimetry and comparative efficacy of 188Re-liposome and 5-FU in a CT26-luc lung-metastatic mice model. *Nuclear Medicine and Biology.* 2012 Jan; 39(1): 35-43. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.010
- Huang ST, Huang CC, Huang WL, Lin TK, Liao PL, Wang PW, et al. Tanshinone IIA induces intrinsic apoptosis in osteosarcoma cells both in vivo and in vitro associated with mitochondrial dysfunction. *Sci Rep.* 2017; 7: 40382. DOI: 10.1038/srep40382
- Song C, Fan B, Xiao Z. Overexpression of ALK4 inhibits cell proliferation and migration through the inactivation of JAK/STAT3 signaling pathway in glioma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018 Feb; 98: 440-45. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.039
- Abu-Darwish MS, Efferth T. Medicinal plants from near east for cancer therapy. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 56. DOI: 10.3389/fphar.2018.00056
- Tang C, Xue HL, Huang HB, Wang XG. Tanshinone IIA inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett.* 2010 Feb; 470(2): 126-29. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.12.069
- Shi H, Zhang Q, Li H, Chu T, Jin H, Mao S. [Growth inhibition of tanshinones on SPC-A-1 cell line and their structure-activity relationship]. *Chinese Journal of Lung Cancer.* 2011 Jan; 14(1):7-12. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2011.01.02 [Article in Chinese]
- Chen J, Shi DY, Liu SL, Zhong L. Tanshinone IIA induces growth inhibition and apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo. *Oncology Reports.* 2012 Feb; 27(2): 523-28. DOI: 10.3892/or.2011.1524
- Zhang W, Lu Y. [Advances in studies on antitumor activities of compounds in *Salvia miltiorrhiza*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2010 Feb; 35(3): 389-92. DOI: 10.4268/cjcm20100330
- Noori S, Hassan ZM, Mohammadi M, Habibi Z, Sohrabi N, Bayanolhagh S. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. *Cell Immunol.* 2010; 263(2): 148-53. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.02.009
- Jung HJ, Song YS, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *J Ethnopharmacol.* 2009 Nov; 126(2): 355-60. DOI: 10.1016/j.jep.2009.08.031