



Kharazmi University

Comparative Evaluation of the Anticancer Effects of *Nepeta binaludensis* and *Nepeta glomerulosa* Extracts on AGS Gastric Cancer Cell Line, with a Focus on Changes in *BAX* Gene Expression

Asal Tofangchi Mahyari¹ , Golaleh Mostafavi¹ , Seyyede Mahdokht Maddah¹

1. Department of Biology, YI.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, YI.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0002-1908-7076
3. Corresponding author, Department of Biology, YI.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: sm.maddah@iau.ac.ir – s.m.maddah@gmail.com ORCID:0000-0002-2011-2849

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received 23 June 2024
Received in revised form 27 May 2024
Accepted 27 May 2025
Available online 27 June 2025

Keywords:

apoptosis,
cancer cell proliferation,
Lamiaceae,
Nepeta binaludensis,
Nepeta glomerulosa

ABSTRACT

Objective: Gastric cancer is one of the most common cancers, causing significant mortality worldwide. *Nepeta* species, known for their distinct aroma and taste, have garnered attention in the food industry. Given their phenolic compounds, this study aimed to evaluate the cytotoxic effects of *Nepeta binaludensis* and *N. glomerulosa* extracts on the AGS gastric cancer cell line and assess changes in *BAX* gene expression.

Methods: Both species were collected from the Binalud Mountains in Khorasan, and their hydroalcoholic extracts were extracted through the maceration technique. The amounts of caffeic acid and Rosmarinic acid were measured using HPLC. The cytotoxic effects of the extract were evaluated employing the MTT assay, and apoptosis induction was assessed by DAPI staining. Changes in *BAX* gene expression were measured using real-time PCR.

Results: The IC50 values after 48 hours were 3.70 mg/mL for *N. binaludensis* extract and 6.92 mg/mL for *N. glomerulosa* extract. Apoptosis induction was observed under both treatments, but *N. binaludensis* extract, which contained higher Rosmarinic acid, significantly increased *BAX* expression compared to the control group.

Conclusions: Thus, these extracts may inhibit gastric cancer cell growth, with *N. binaludensis* showing greater efficacy through *BAX*-mediated apoptosis induction compared to *N. glomerulosa*.

Cite this article: Tofangchi Mahyari, A., Mostafavi, G., & Maddah, S.M. (2025). Comparative evaluation of the Anticancer Effects of *Nepeta binaludensis* and *Nepeta glomerulosa* Extracts on AGS Gastric Cancer Cell Line, with a Focus on Changes in *BAX* Gene Expression. *Nova Biologica Reperta*, 12 (X), 1-18.
<http://doi.org/0000000000000000>



© The Author(s).

DOI: <http://doi.org/0000000000000000>

Publisher: Kharazmi University.

Objective

Gastric cancer represents a major global health burden, ranking as the fifth most frequently diagnosed malignancy and the third leading cause of cancer-related mortality worldwide. In 2018 alone, approximately 1.03 million new cases and 783,000 deaths were reported. This burden is especially pronounced in parts of Asia, including Iran, where gastric cancer is the most prevalent malignancy among men and the third most common in women. Its incidence and mortality are influenced by genetic susceptibility and lifestyle factors such as high salt intake and the consumption of processed foods. A critical factor contributing to the high mortality rates is the frequent diagnosis of gastric cancer at advanced stages, when therapeutic interventions are often less effective. Current therapeutic strategies, including surgery, radiotherapy, chemotherapy, and targeted therapies, often have limited efficiency in advanced disease stages. This highlights the urgent need for novel and more effective treatments.

Natural products and plant-derived compounds are increasingly being explored as potential sources of anticancer agents. Among these, the genus *Nepeta* (Lamiaceae), with over 250 species globally and 69 endemic species in Iran, has drawn scientific interest due to its rich phytochemical profiles and traditional medicinal usage. These plants are recognized for their distinct aromas and tastes, leading to their use in the food industry as flavoring agents. Beyond culinary applications, many *Nepeta* species have a long history in traditional Iranian medicine, employed for treating ailments of the nervous, digestive, and respiratory systems. Nepetalactones are among the notable phytochemicals in *Nepeta* species.

Nepeta binaludensis Jamzad is a rare and aromatic plant that is endemic to northeastern Iran and traditionally used to treat sicknesses like headaches, migraines, digestive issues, and rheumatism. Scientific investigations have revealed its richness in phenolic and flavonoid compounds, such as rutin, caffeic acid, and rosmarinic acid, which are associated with its antimicrobial and antioxidant activities. *Nepeta glomerulosa* Boiss. is another herbaceous annual species found in mountainous regions of Iran and Afghanistan, that traditionally used for pneumonia, skin and digestive disorders, and as a sedative and analgesic. Its extracts contain alkaloids, saponins, and phenolic compounds, including caffeic acid and rosmarinic acid, which have confirmed antioxidant and antitumor properties.

A key molecular target in cancer therapy is the BAX gene, a pro-apoptotic member of the BCL2 protein family. The BAX protein plays a crucial role in initiating programmed cell death (apoptosis) by forming heterodimers with anti-apoptotic proteins like BCL2. The balance between BAX and BCL2 is a critical determinant of a cell's fate when exposed to apoptotic stimuli. The primary objective of the present study was to evaluate the cytotoxic effects of the two *Nepeta* species extracts on the AGS human gastric cancer cell line and to investigate the underlying molecular mechanisms, with a particular focus on changes in BAX gene expression.

Methods

The plant materials of *N. binaludensis* and *N. glomerulosa* were collected from the Binalud Mountains in Khorasan province, Iran. Hydroalcoholic extracts were prepared from the dried, ground flowering aerial parts of each species using a maceration technique with 80% ethanol. The resulting extracts were then concentrated and dried. Phytochemical analysis of these extracts was conducted using HPLC to quantify specific phenolic compounds, namely quercetin, caffeic acid, and rosmarinic acid. This allowed for a correlation between the chemical composition of the extracts and their observed biological activities.

The cytotoxic potential of the *Nepeta* species extracts was assessed against the AGS human gastric adenocarcinoma cell line using the MTT assay. AGS cells were treated with various concentrations of each extract for 24, 48, and 72 hours. Cell viability was measured by spectrophotometer, and the IC₅₀ value – the concentration of extract causing a 50% reduction in cell viability – was determined for each extract at each time point. DAPI staining was performed to determine if the observed cytotoxicity was due to apoptosis. AGS cells were treated with the IC₅₀ concentrations of each extract for 48 hours. Nuclear morphology, indicative of apoptosis (e.g., chromatin condensation, nuclear fragmentation), was then visualized using fluorescence microscopy.

To explore the molecular mechanisms, changes in the expression of the pro-apoptotic BAX gene were quantified using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). AGS cells were treated with the IC₅₀ concentrations of the extracts for 48 hours. Total RNA was extracted, converted to cDNA, and BAX mRNA levels were measured relative to the GAPDH reference gene using SYBR Green chemistry. Statistical analyses, including one-way ANOVA, Tukey's test, and T-tests, were employed to evaluate the significance of the findings, with a P-value < 0.05 considered significant.

Results

The results of the phytochemical analysis revealed notable differences in the phenolic profiles of the two *Nepeta* extracts. Quercetin was not detected in either *N. glomerulosa* or *N. binaludensis* extracts. The caffeic acid content was comparable between the two species, measuring 0.75 mg/g in *N. binaludensis* and 0.86 mg/g in *N. glomerulosa*. However, a significant difference was observed in rosmarinic acid concentration: *N. binaludensis* extract contained a significantly higher amount (20.82 mg/g) compared to *N. glomerulosa* extract (1.41 mg/g).

The MTT assay demonstrated that both extracts exhibited dose-dependent cytotoxic effects on AGS cells. The IC₅₀ values indicated that *N. binaludensis* extract became more potent with longer exposure, with IC₅₀ values of 6.18 mg/mL (24 h), 3.70 mg/mL (48 h), and 2.26 mg/mL (72 h). In contrast, *N. glomerulosa* extract showed its lowest IC₅₀ (highest potency) at 24 hours (4.94 mg/mL), with values of 6.92 mg/mL at 48 hours and 6.88 mg/mL at 72 hours. Overall, *N. binaludensis* extract exhibited a more pronounced reduction in cell viability.

DAPI staining provided morphological evidence of apoptosis. AGS cells treated with the IC₅₀ concentrations of both extracts for 48 hours exhibited characteristic apoptotic features, including reduced cell number, chromatin condensation, and nuclear fragmentation, compared to the uniform nuclei of untreated control cells.

The analysis of BAX gene expression revealed that treatment with *N. binaludensis* extract (3.70 mg/mL for 48 hours) led to a significant 1.83-fold increase in BAX mRNA levels compared to the control group (P=0.01). While *N. glomerulosa* extract (6.92 mg/mL for 48 hours) resulted in a 1.30-fold increase in BAX expression, this change was not statistically significant.

Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that hydroalcoholic extracts of both *Nepeta binaludensis* and *Nepeta glomerulosa* possess cytotoxic properties against AGS human gastric cancer cells. However, *N. binaludensis* extract exhibited significantly stronger and more sustained cytotoxic

and pro-apoptotic effects. This superior anticancer activity is strongly correlated with its substantially higher content of rosmarinic acid. Mechanistically, the enhanced efficacy of *N. binaludensis* is linked to its ability to significantly upregulate the expression of the pro-apoptotic gene BAX, thereby promoting programmed cell death in the cancer cells. These findings underscore the therapeutic potential of *N. binaludensis* as a source for anticancer compounds. Given the traditional use of *Nepeta* species in food, their demonstrated anticancer properties may also enhance their nutritional and flavoring value, potentially leading to the development of functional foods or nutraceuticals for gastric cancer prevention or adjunctive therapy. Further research, including in vivo studies and bioactivity-guided fractionation, is warranted to fully elucidate the therapeutic potential of *N. binaludensis* and its active constituents.

ارزیابی مقایسه ای خواص ضد سرطانی عصاره های *Nepeta* و *Nepeta binaludensis* بر رده سلولی AGS سرطان معده با تأکید بر تغییرات بیان ژن *BAX* و *glomerulosa*

عسل تفنگچی مهبیاری^۱، گلاره مصطفوی^۲ و سیده مهدخت مداح^۳✉

۱. گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. نویسنده مسئول، گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: sm.maddah@iau.ac.ir -

s.m.maddah@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	مقدمه: سرطان معده به عنوان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌هاست که منجر به مرگ و میر افراد بسیاری در سر تا سر جهان می‌شود. گونه‌های <i>Nepeta</i> به دلیل طعم و عطر خاص خود در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند.
مقاله پژوهشی	با توجه به وجود ترکیبات فنلی در این جنس، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره گونه های <i>Nepeta binaludensis</i> و <i>N. glomerulosa</i> بر روی رده سلولی AGS سرطان معده و نیز بررسی تغییرات بیان ژن <i>BAX</i> بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۳	مواد و روش‌ها: هر دو گونه نپتا از کوه‌های بینالود خراسان جمع‌آوری شد و عصاره هیدروالکلی آنها به روش خیساندن استخراج گردید. مقادیر اسید کافئیک و اسید رزمارینیک با استفاده از دستگاه HPLC اندازه گیری شد.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۶	اثر سمیت سلولی عصاره‌ها با تست MTT و بررسی وقوع آپوپتوز با رنگ آمیزی DAPI مورد ارزیابی قرار گرفت.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۶	تغییرات بیان ژن <i>BAX</i> به کمک Real time-PCR، مورد سنجش قرار گرفت.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۶	نتایج: مقدار IC ₅₀ پس از ۴۸ ساعت، برای عصاره گونه <i>N. binaludensis</i> ۳/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر و برای عصاره گونه <i>N. glomerulosa</i> ۶/۹۲ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. القای آپوپتوز تحت هر دو تیمار مشاهده شد؛ اما افزایش معنی دار بیان ژن <i>BAX</i> نسبت به گروه کنترل تحت تاثیر عصاره <i>N. binaludensis</i> که مقدار بیشتری اسید رزمارینیک داشت، مشاهده گردید.
کلیدواژه‌ها:	نتیجه‌گیری: بنابراین، استفاده از عصاره این دو گونه می‌تواند در مهار رشد سلول‌های سرطانی معده موثر باشد.
آپوپتوز	عصاره <i>N. binaludensis</i> با افزایش معنی دار بیان ژن <i>BAX</i> موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده شده است و عملکرد موثرتری نسبت به عصاره <i>N. glomerulosa</i> داشته است.
پونه‌سای انبوه	
پونه‌سای بینالودی	
تکثیر سلول سرطانی	
تیره نعنایان	

استناد: تفنگچی مهبیاری، عسل؛ مصطفوی، گلاره؛ و مداح، سیده مهدخت (۱۴۰۴). ارزیابی مقایسه ای خواص ضد سرطانی عصاره های *Nepeta binaludensis* و *Nepeta glomerulosa* بر رده سلولی AGS سرطان معده با تأکید بر تغییرات بیان ژن *BAX*. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۱۲ (۱)، ۲۰-۱.



<http://doi.org/10.22034/NBR.12.1.6>

© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه خوارزمی.

مقدمه

سرطان معده، پنجمین سرطان شایع تشخیص داده شده و سومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (Bray et al., 2018). در حال حاضر، سالانه ۱۸,۰۸ میلیون مورد جدید سرطان در جهان گزارش می‌شود. از این تعداد، حدود ۱,۰۳ میلیون (۵,۷٪) سرطان معده هستند. همچنین، از حدود ۹ میلیون مرگ ناشی از سرطان، سرطان معده مسئول حدود ۷۸۳,۰۰۰ هزار مرگ در سراسر جهان در هر سال است (Ferlay et al., 2018). مانند بسیاری از کشورهای آسیایی، ایران نیز دارای نرخ بالای بروز و مرگ و میر سرطان معده است. سرطان معده به عنوان اولین سرطان شایع در مردان و سومین سرطان در زنان شناخته شده است (Roshandel et al., 2019). شیوع سرطان معده در جمعیت‌های مختلف اختلاف چشمگیری دارد که برای این اختلاف دو دلیل عمده ذکر می‌گردد: یکی زمینه‌های ژنتیکی متفاوت جمعیت کشورهای مختلف است و دیگری متفاوت بودن سبک زندگی بخصوص عادات‌های نادرست غذایی مانند مصرف بیش از حد نمک و استفاده از غذاهای آماده است (Akbarpour et al., 2021). البته شیوع سرطان معده با میزان مرگ و میر ناشی از آن متفاوت است و مرگ و میر ناشی از این سرطان بیشتر به علت تشخیص دیر هنگام آن است. سرطان معده از نظر بالینی و با هدف انجام مناسب‌ترین مداخله درمانی، به دو گروه اولیه و پیشرفته تقسیم می‌گردد. دسته‌بندی انواع سرطان معده بر اساس ویژگی‌های آناتومیک مشکل‌تر است. سرطان می‌تواند در فرد بصورت تک گیر ایجاد گردد و یا منشأ ارثی داشته باشد (Iravani et al., 2013). برای درمان سرطان معده از راه‌هایی نظیر عمل جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی، داروهای هدفمند شیمیایی و گیاهی استفاده می‌شود (Sitarz et al., 2018).

ژن *BAX* در موقعیت 19q13.33 قرار گرفته و دارای ۷ اگزون هست. پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن‌های *BAX* و *BCL2* از خانواده پروتئین‌های *BCL2* هستند. اعضای خانواده *BCL2* هترو یا هومودایمر تشکیل می‌دهند و به عنوان تنظیم‌کننده‌های ضد آپوپتوتیک و یا آپوپتوتیک عمل می‌کنند که در طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سلولی نقش دارند. پروتئین *BAX* با *BCL2* یک هتروداایمر تشکیل می‌دهد و به عنوان یک فعال‌کننده آپوپتوتیک عمل می‌کند. تحت تاثیر یک محرک آپوپتوز ارتباط و نسبت *BAX* به *BCL2* نیز تعیین‌کننده بقا یا مرگ سلول است (Qian et al., 2022, Bloch et al., 2021).

جنس نپتا دارای بیش از ۲۵۰ گونه در جهان و از اعضای خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. این جنس در ایران دارای ۶۹ گونه است (Motaghd et al., 2022). برخی از گونه‌های نپتا نیز در طب سنتی ایران در درمان بیماری‌های عصبی، گوارشی، تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nasr & Saad, 2021). از مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های مختلف نپتا، لاکتون‌ها هستند (Shakeri et al., 2014; Formisano et al., 2011).

گونه *Nepeta binaludensis* Jamzad گیاهی معطر، نادر و انحصاری مناطق محدودی از شمال شرق ایران در رشته کوه‌های بینالود واقع در استان خراسان است. این گیاه در ارتفاعات بین ۲۳۰۰-۲۷۰۰ متر از سطح دریای این رشته کوه‌ها در محدوده دمایی ۶-۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند. گونه پونه‌سای بینالودی به طور گسترده در طب سنتی برای سردرد، میگرن، اختلالات گوارشی، روماتیسم استفاده می‌شود (Jamzad et al., 2003; Khaladgi et al., 2018; Jafari et al., 2024). بررسی‌ها نشان داده است که انواع عصاره گونه پونه‌سای بینالودی دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند و فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی دارند. خواص آنتی اکسیدانی عصاره پونه‌سای بینالودی به ترکیبات فنلی مانند روتین، کافئیک اسید و رزمارینیک اسید نسبت داده شده است (Azimi Mahalleh et al., 2020; Hashemi moghaddam et al., 2020; Khaladgi et al., 2018; Jafari et al., 2023). نپتالاکتون (۵۲,۲٪) و ۸ سینئول (۴۲,۵٪) به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات موجود در اسانس بخش‌های هوایی این گیاه هستند (Afshar et al., 2017; Amirzadeh et al., 2022).

گونه *Nepeta glomerulosa* Boiss. گیاهی علفی، یکساله و دارای ساقه‌های ایستاده است. پونه‌سای/نبوه در ارتفاعات ۱۵۰۰-۴۰۰۰ متری در کوه‌های زاگرس، البرز و خراسان-کپه داغ ایران و همچنین کوه‌های افغانستان رویش می‌کند. مجموع گل‌ها به نحوی است که در قسمت انتهایی ساقه، به علت فشردن، ظاهر کاپیتول مانند پیدا می‌کنند. این گونه به طور سنتی برای درمان ذات‌الریه، خارش و انواع اختلالات پوستی و گوارشی و نیز به عنوان تسکین‌دهنده، ضد درد و ضد عفونی‌کننده

استفاده می شود (Karami et al., 2022; Hosseinzadeh et al., 2006; Hosseini et al., 2016). اسانس آن شامل ۳۵ ترکیب است که اصلی ترین آنها آلفا پینن، ۸۱ سینئول و لیمونن می باشد. عصاره این گونه محتوی الکاوئید، ساپونین و ترکیبات فنلی است (Hosseinzadeh et al., 2006; Hosseini et al., 2016). خواص آنتی اکسیدانی، ضد فشار خون، ضد فیبروز، ضد ویروسی و ضد تومور ترکیبات فنلی مانند اسید کافئیک و رزمارینیک اسید این گونه تأیید شده است (Ci et al., 2016; George et al., 2016; Moore et al., 2016; Matejczyk et al., 2018).

در سال های اخیر استفاده از عصاره و اسانس های گیاهی در صنایع غذایی، به عنوان بهبود دهنده کیفیت و ماندگاری مود غذایی علاوه بر طعم دهندگی آنها، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Shamekhi et al., 2023). با توجه به کاربرد انواع پونه سایی در صنایع غذایی و نظر به اینکه تاکنون گزارشی در ارتباط با خواص سیتوتوکسیک عصاره پونه سایی بینا/لودی و پونه سایی /نبوه ارائه نشده است، در پژوهش حاضر ضمن بررسی خواص ضد سرطانی عصاره این گیاهان بر سرطان معده به بررسی نقش عصاره آنها در القای آپوپتوز از طریق تغییرات بیان ژن BAX پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه

گونه *N. binaludensis* از ارتفاع ۲۵۱۷ متری و گونه *N. glomerulosa* از ارتفاع ۲۲۰۳ متری کوه های بینالود نیشابور در استان خراسان جمع آوری شدند. گیاهان جمع آوری شده در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به ترتیب با کدهای هرباریومی (FUMH) ۳۶۸۰۶ و (FUMH) ۳۶۸۰۹ توسط جوهرچی شناسایی شد. سپس در شرایط مناسب و در سایه قرار داده شدند تا در مجاورت با هوا خشک شوند.

استخراج عصاره

به منظور عصاره گیری با روش خیساندن، ۴۰ گرم از سرشاخه های گلدار آسیاب شده هر یک از گونه ها، به شیشه های دردار حاوی ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ افزوده شد. سپس شیشه ها در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی گراد با ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. عصاره به وسیله کاغذ صافی واتمن ۱ و پارچه تنظیف صاف گردید. جهت تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری با دمای بین ۴۰-۵۰ درجه سانتی گراد و ۶۰ دور در دقیقه استفاده شد. عصاره های غلیظ شده با استفاده از باد سرد سشوار خشک شدند و در شیشه های تیره و دردار در یخچال نگهداری شدند (Azimi et al., 2020).

سنجش مقدار برخی ترکیبات عصاره ها با HPLC

مقدار ۰/۱ گرم از هر نمونه عصاره خشک در ۲ میلی لیتر حلال متانول حل شد و سپس به آن ۲ میلی لیتر بافر فسفات اضافه شد و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و به دستگاه HPLC مجهز به دتکتور UV-شماره RIFR-WI-PHYT-29 تزریق شد. دستگاه HPLC با فناوری سریع ۱۲۶۰ تمایلی دو با ستون Ultisil XB-C18, 5 μm با طول ۲۵۰ میلی متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی متر مورد استفاده قرار گرفت. ستون با متانول به عنوان محلول شستشوی اول و بافر فسفات با pH برابر با ۲/۳ به عنوان محلول شستشوی دوم شستشو داده شد. شستشوی گرادیان در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد. آشکارساز PDA ۲۵۴، ۲۸۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر استفاده شد. نتایج مقادیر کوئرتستین، کافئیک اسید و رزمارینیک اسید بر اساس رقت های اعمال شده به ازای وزن عصاره خشک محاسبه شد (Azizian et al., 2021).

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره با تست MTT

سلول های رده سلولی AGS سرطان معده از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شدند. سلول ها درون فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربعی حاوی محیط کشت RPMI-1640 با ۱۰٪ FBS کشت شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. جهت انجام تست MTT، در هر یک از چاهک های شش پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰^۴ سلول، معادل ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی کشت شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا بدین ترتیب سلول ها به کف چاهک بچسبند. سپس هر سه

پلیت با غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۴۷، ۰/۹۴، ۱/۹۰، ۳/۷۵، ۷/۵۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از یکی از دو نوع عصار با سه تکرار تحت تیمار قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد، دو پلیت اول از هر یک از دو نوع عصاره، از انکوباتور خارج شد و پس از خروج مایه رویی، در تاریکی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر زرد رنگ، اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. سپس رنگ MTT خالی و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و حدود ۱ ساعت در انکوباتور انکوبه شد تا کریستال‌های ارغوانی رنگ حاصل از احیاء MTT در آن حل شود و در نهایت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Milton Roy- Spectronic 21D- USA) اندازه گیری شد. شدت رنگ ارغوانی حاصله معرف نسبت سلول‌های زنده در هر چاهک است. این مراحل ۴۸ ساعت بعد برای پلیت دوم و ۷۲ ساعت بعد برای پلیت سوم تکرار شد. درصد بقای سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظتی خاص از عصاره قرار گرفته بودند، با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰، و منطبق بر معادله زیر محاسبه گردید. و غلظتی از عصاره مورد بررسی که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش دهد، به عنوان IC₅₀ در نظر گرفته شد (Naderi et al., 2020; Maddah et al., 2021).

۱۰۰ × (میانگین جذب نوری کنترل/ میانگین جذب نوری نمونه) = میزان بقای سلولی

سنجش میزان آپوپتوز با رنگ آمیزی DAPI

DAPI با فرمول شیمیایی C₅H₁₆N₅ یک ترکیب شیمیایی است که به نقاط غنی از آدنین و تایمین در ساختار DNA متصل می‌شود و رنگ فلوئورسنت از خود ساطع می‌کند و برای مطالعات و تحلیل چرخه سلولی و بررسی وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز کاربرد دارد. در این رنگ آمیزی سلول‌های طبیعی به صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های دستخوش آپوپتوز به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده است. برای تهیه این محلول، ۱ میلی گرم DAPI در ۱ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. برای بررسی مرگ سلولی، سلول‌های رده سلولی AGS سرطان معده در دو گروه، یکی شاهد یا بدون دارو و دوم گروه تحت تیمار با غلظت IC₅₀ عصاره *N. binaludensis* و یا عصاره *N. glomerulosa* پس از ۴۸ ساعت تیماردهی کشت شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با PBS شسته و با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت و با استفاده از رنگ دپی با غلظت ۳۰۰ نانومولار رنگ آمیزی شد (USA, Sigma D). سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (فیلتر آبی Nikon آلمان) مشاهده و عکسبرداری گردیدند (Han et al. 2022).

روش استخراج RNA

سلول‌های رده سلولی AGS سرطان معده در پلیت ۶ خانه تحت تیمار غلظت (IC₅₀) عصاره‌ها و نیز بدون تیمار کشت داده شدند. ۴۸ ساعت بعد تعداد ۵ × ۱۰^۶ سلول از هر یک از تیمارها و کنترل در ۷۰۰ میکرولیتر محلول RiboEX لیز شد. مراحل استخراج بر اساس دستورالعمل کیت RiboEX (cat.No.302-001) ساخت شرکت GeneALL کره انجام شد. خلوص RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (SrcituroBiiketoib) تعیین گردید. باتوجه به میزان RNA استخراج شده، ۵۰ میکرولیتر DEPC treated water اضافه شد و سپس نمونه‌ها تا زمان انجام ادامه کار به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند (Gospodinova et al. 2024).

سنتز cDNA

به منظور سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده، کیت Easy cDNA synthesis Kit (Cat.No.A101161) ساخت شرکت پارس طوس مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده تا زمان استفاده برای ریل تایم PCR در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

سنجش تغییرات بیان ژن با روش Real-time PCR

توالی ژن BAX به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع، از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov دریافت گردید. توالی پرایمرها توسط نرم افزار Gen runner و ابزار Primer3 (version 0.4.0) و نیز بررسی منابع بر اساس جدول ۱ طراحی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها و طول محصول با دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد

Table 1. Primer sequences and product lengths at an annealing temperature of 58 °C

Gene	Forward	Reverse	Length product (bp)
GAPDH	CTCATTTCCTGGTATGACAACG	CTTCCTCTTGCTCTTGCT	122
BAX	TGCCTCAGGATGCGTCCACC	CCCCAGTTGAAGTTGCCGTC	175

برای انجام واکنش PCR در دستگاه ریل تایم، کیت YTA SYBR Green QPCR Master Mix 2X و رنگ SYBR، مورد استفاده قرار گرفت. محلول واکنش آماده شده در ویال های کوچک شامل ۱۲/۵ میکرولیتر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰/۱ pmol/μL) و ۹،۵ میکرولیتر آب مقطر بود که در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده شد. سپس ویال ها به دستگاه Rotor Gene 6000 Qagen منتقل شد. ۴۰ سیکل تکثیر بر اساس برنامه دمایی و زمانی زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس برای هر سیکل به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، برای اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و برای گسترش در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد (Maddah et al., 2021). پس از آن تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای هر تکثیر PCR در محدوده دمایی از ۷۰ درجه سانتی گراد تا ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد، آزمایش در دو تکرار انجام شد. داده های بلند شدن نمودار (Take off) و تکثیر (Amplification) جهت بدست آوردن کارایی واکنش (Efficiency) در نرم افزار REST 2009 بکار گرفته شد. بعد از بدست آوردن E، از فرمول زیر برای محاسبه Fold Change هر ژن در Excel 2016 استفاده شد.

$$Fold\ change = \frac{(Et)^{\Delta Ct\ target\ (control-sample)}}{(Eref)^{\Delta Ct\ ref\ (control-sample)}}$$

آنالیزهای آماری

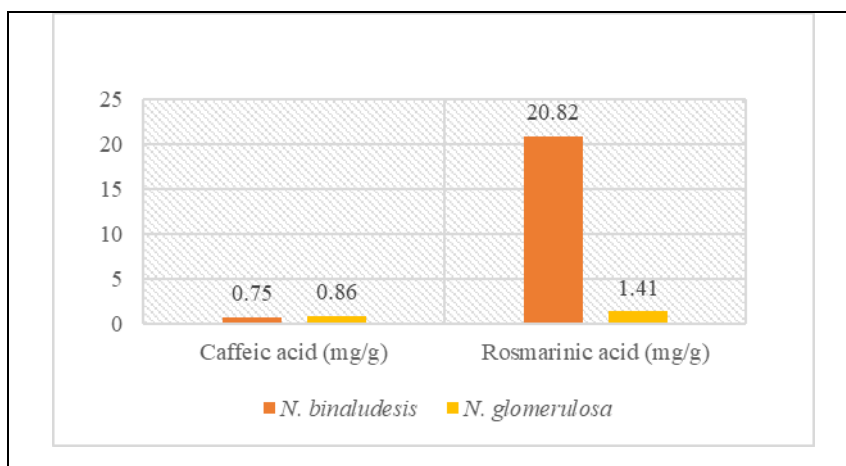
به منظور تعیین معنی داری اختلاف میانگین های درصد زنده مانگی سلول از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه one-way ANOVA استفاده شد و مقایسه میانگین ها با آزمون Tukey انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-time شامل CT نمونه ها به همراه Amplification آن ها، به وسیله نرم افزار REST مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری تغییرات بیان ژن از آزمون T-Test استفاده شد. جهت انجام آنالیزهای آماری و رسم نمودارها از نرم افزارهای Microsoft Excel 2016، SPSS، و GraphPad Prism 9.5.1 version 20 استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها در سطح معناداری (P value < 0.05) انجام شده است.

نتایج

نتایج بررسی مقدار برخی ترکیبات عصاره ها با دستگاه HPLC

مقایسه مقدار فلاونوئید کوئرستین و دو ترکیب فنولی کافئیک اسید (3,4-dihydroksycinnamic acid) و رزمارینیک اسید (3,4-dihydroxy-enzenepropanoic acid) در عصاره دو گونه پونه ساسی بینالودی و پونه ساسی انبوه با مقادیر استاندارد این ترکیبات در دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که هر دو عصاره فاقد فلاونوئید کوئرستین بودند. مقدار کافئیک اسید در عصاره پونه ساسی بینالودی ۰/۷۵ میلی گرم

برگرم و در عصاره پونه‌سای/انبوه ۰/۸۶ میلی گرم برگرم بدست آمد. مقدار رزمارینیک اسید در عصاره پونه‌سای بینالودی به میزان ۲۰/۸۲ میلی گرم برگرم به طور معنی داری بیشتر از مقدار آن در عصاره پونه‌سای/انبوه به میزان ۱/۴۱ بدست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- مقدار دو ترکیب فنلی کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در عصاره‌های پونه‌سای بینالودی و پونه‌سای/انبوه

Figure 1. The amounts of two phenolic components i.e., Caffeic acid and Rosmarinic acid, in *N. binaludensis* and *N. glomerulosa* extracts

نتایج بررسی درصد زنده مانی سلول‌های رده AGS

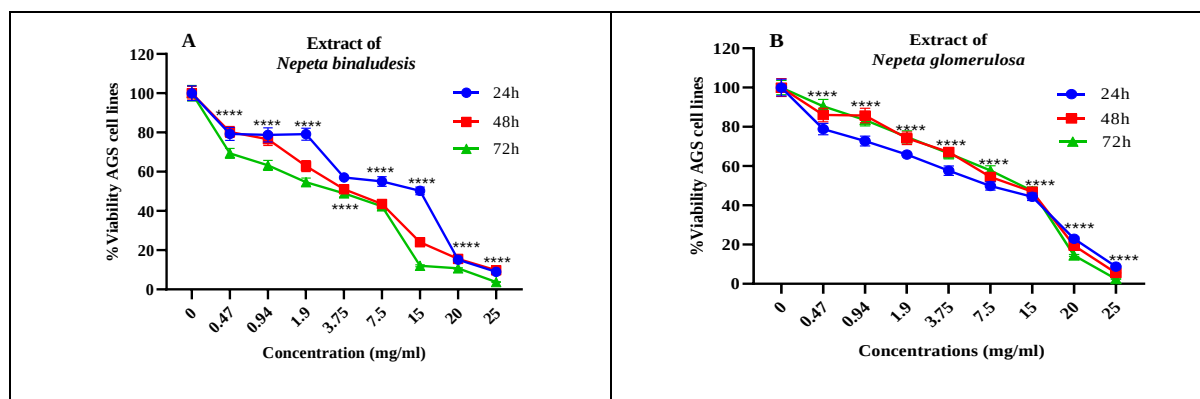
به منظور تعیین میزان خواص سیتوتوکسیک عصاره هر یک از دو گونه، سلول‌های سرطان معده رده AGS کشت شده هر یک به طور جداگانه تحت تیمار غلظت‌های مختلف هر یک از عصاره‌ها (۰/۴۷، ۰/۹۴، ۱/۹۰، ۳/۷۵، ۷/۵۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. میزان زنده مانی سلول‌ها ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج محاسبه IC_{50} در هر سه زمان برای تیماردهی با هر دو نوع عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین غلظت از عصاره پونه‌سای بینالودی که ۵۰ درصد سلول‌ها در آن غلظت از بین رفتند، ۲/۲۶ میلی گرم بر میلی لیتر ۷۲ ساعت پس از تیماردهی بود و مقدار موثر این عصاره با خواص سیتوتوکسیک، با افزایش زمان کاهش یافت. اما کمترین IC_{50} تحت تیمار عصاره هیدروالکلی پونه‌سای/انبوه به میزان ۴/۹۴ میلی گرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت بدست آمد.

جدول ۲- مقدار IC_{50} تحت تاثیر عصاره پونه‌سای بینالودی و عصاره پونه‌سای/انبوه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار

Table 2. IC_{50} level under the influence of *N. binaludensis* and *N. glomerulosa* extract after 24, 48 and 72 hours of treatment

Extract types	Parameters	24 h	48 h	72 h
<i>N. binaludensis</i>	$IC_{50}(mg/ml)$	6.18	3.70	2.26
	95% CI (IC_{50})	4.62-8.15	3.25-4.18	1.75-2.86
	R^2	0.87	0.98	0.93
<i>N. glomerulosa</i>	$IC_{50}(mg/ml)$	4.94	6.92	6.88
	95% CI (IC_{50})	3.85-6.28	5.54-8.56	5.37-8.69
	R^2	0.91	0.91	0.90

مقایسه معنی داری اختلاف میانگین درصد زنده ماندن سلول ها با تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد که بین درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.0001$ وجود دارد (شکل ۲). تحت تأثیر هر دو عصاره با افزایش غلظت درصد زنده ماندن کاهش می یابد؛ اما این کاهش تحت تأثیر عصاره پونه سایی بینا لودی بیشتر از پونه سایی انبوه است.

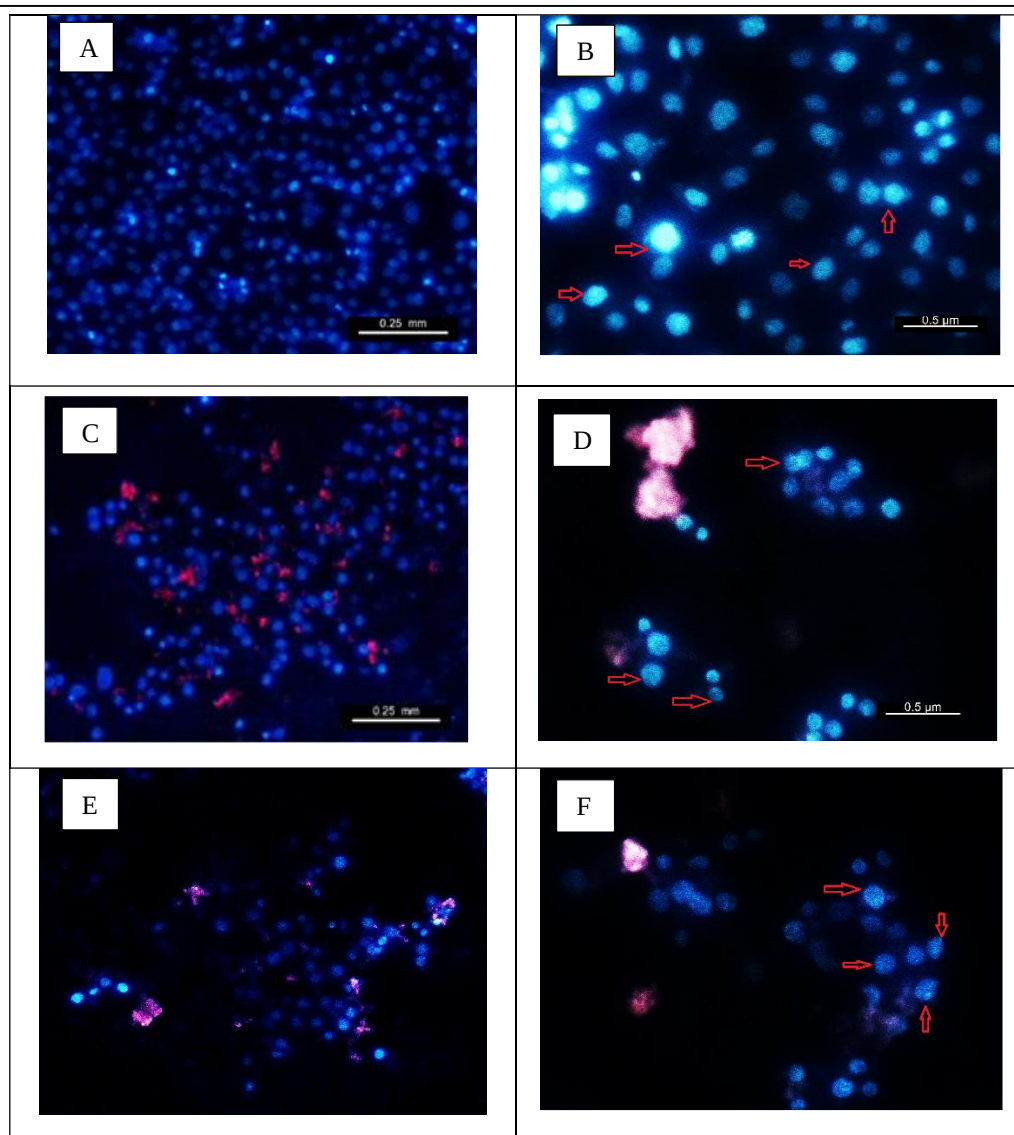


شکل ۲- مقایسه معنی داری اختلاف میانگین نشان دهنده درصد زنده ماندن سلول ها با تجزیه واریانس یک طرفه، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی: (A) درصد زنده ماندن سلول ها تحت تیمار با عصاره نپتای بینا لودی. (B) درصد زنده ماندن سلول ها تحت تیمار با عصاره نپتای انبوه. ($P < 0.0001$:****)

Figure 2. The significant comparison of mean differences in cell viability percentage, as determined by one-way ANOVA, after 24, 48, and 72 hours of treatment. A) Cell viability percentage under *N. binaludensis* extract treatment. B) Cell viability percentage under *N. binaludensis* extract treatment (Significant compared with control: **** $p < 0.0001$)

نتایج بررسی میزان آپوپتوز سلول ها

به منظور بررسی میزان آپوپتوز القا شده در سلول های تحت تیمار با عصاره پونه سایی بینا لودی به میزان ۳/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره پونه سایی انبوه به میزان ۶/۹۲ میلی گرم بر میلی لیتر ۴۸ ساعت پس از تیمار دهی، رنگ آمیزی DAPI انجام شد. تصاویر سلول ها در شکل ۳ برای هر دو گروه شاهد و تیمار در دو بزرگنمایی ۰/۲۵ میلی متر و ۰/۵ میکرومتر نشان داده شده است. به طور کلی هسته ها تحت تأثیر رنگ DAPI آبی رنگ شد. در نمونه های شاهد یا کنترل هسته ها سالم و شکل آنها بطور یکنواخت است (شکل ۳ A, B). در نمونه های تحت تیمار با عصاره تعداد سلول ها کمتر شده و هسته تعدادی از سلول ها تحت تیمار با عصاره ها غیر یکنواخت و نقطه نقطه است که نشان دهنده بروز آپوپتوز است. شکل های ۳ C و D، سلول های تحت تیمار با عصاره پونه سایی بینا لودی و شکل های ۳ E و F سلول های تحت تیمار با عصاره گیاه پونه سایی انبوه را نشان می دهند.



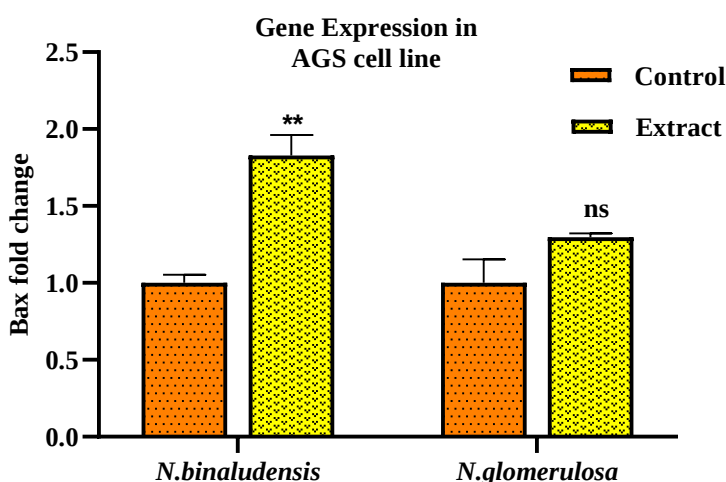
شکل ۳- سلول‌های رده AGS سرطان معده رنگ آمیزی شده با رنگ DAPI (سمت چپ مقیاس ۰/۲۵ میلی‌متر و سمت راست مقیاس ۰/۵ میکرومتر). A) سلول‌های شاهد، تعداد سلول‌ها زیاد است. B) سلول‌های شاهد در بزرگنمایی بالاتر، هسته‌ها یکنواخت می‌باشند. C) سلول‌ها تحت تیمار با عصاره نپتای بینالودی، تعداد سلول‌ها نسبت به شاهد کمتر است بخش‌های قرمز بقایای عصاره است. D) سلول‌ها تحت تیمار با عصاره نپتای بینالودی در بزرگنمایی بالاتر، یکنواخت نبودن ماده ژنتیکی هسته با فلش نشان داده شده است. E) سلول‌ها تحت تیمار با عصاره نپتای انبوه، تعداد سلول‌ها نسبت به شاهد کمتر است بخش‌های صورتی بقایای عصاره است. F) سلول‌ها تحت تیمار با عصاره نپتای انبوه در بزرگنمایی بالاتر، هسته‌های غیر یکنواخت نشان دهنده بروز آپوپتوز است.

Figure 3. AGS Gastric Cancer Cells Stained with DAPI Dye (Left: scale 0.25 mm; Right: scale 0.5 μm):

- A) **Control cells:** The number of cells is high. B) **Control cells at higher magnification:** The nuclei are uniform. C) **Cells treated with *N. binaludensis* extract:** The number of cells is lower compared to the control; the red sections are remnants of the extract. D) **Cells treated with *N. binaludensis* extract at higher magnification:** The non-uniformity of nuclear genetic material is indicated by arrows. E) **Cells treated with *N. glomerulosa* extract:** The number of cells is lower compared to the control; the pink sections are remnants of the extract. F) **Cells treated with *N. glomerulosa* extract at higher magnification:** The non-uniform nuclei indicate the onset of apoptosis.

نتایج تغییر بیان ژن BAX

در شکل ۴ تغییرات بیان ژن BAX در سلول‌های AGS سرطان معده تحت تیمار با عصاره پونه‌سای بینالودی به میزان ۳/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره پونه‌سای انبوه به میزان ۶/۹۲ میلی گرم بر میلی لیتر ۴۸ ساعت پس از تیمار دهی بصورت جداگانه آنالیز شده اند و نتایج در یک نمودار ارائه شده است. در این نمودار گروه کنترل یا شاهد بعنوان مرجع محاسبه Fold change در نظر گرفته شد. مقایسه با آزمون تی تست، نشان داد افزایش بیان این ژن در سلول‌های رده AGS سرطان معده تحت تیمار عصاره پونه‌سای بینالودی به میزان ۱/۸۳ برابر نسبت به کنترل در سطح ۱ درصد معنی دار بوده است؛ در حالیکه افزایش بیان ژن تحت تیمار عصاره پونه‌سای انبوه به میزان ۱/۳۰ برابر نسبت به شاهد معنی دار نبوده است.



شکل ۴- تغییرات بیان ژن BAX در سلول‌های AGS سرطان معده تحت تیمار با ۳/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره پونه‌سای بینالودی و ۶/۹۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره پونه‌سای انبوه پس از ۴۸ ساعت (**P= 0.01; ns= بدون معنی).

Figure 4. BAX gene expression changes in AGS gastric cancer cells under the treatment with 3.70 mg/mL of *N. binaludensis* extract and 6.92 mg/mL of *N. glomerulosa* extract after 48 hours. (** P=0.01; ns: non-significant)

بحث

نقش محصولات طبیعی با منشاء گیاهی، از جمله پلی فنول‌ها، بر پیشگیری از شیمی درمانی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و به عنوان یک رویکرد مهم در مبارزه با سرطان، ارائه حفاظت غیرمستقیم با فعال کردن سیستم‌های دفاعی درون‌زا به کار گرفته شده است. جنس *Nepeta* L. یا پونه‌سا دارای گونه‌های متعددی در ایران است که در طب سنتی در درمان انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های گوارشی بکار برده می‌شود. همچنین، گونه‌های معطر این جنس به طور گسترده بعنوان طعم دهنده در صنایع غذایی کاربرد دارند. لذا در پژوهش حاضر، ضمن بررسی خواص سمیت سلولی عصاره دوگونه از پونه‌سای بر سرطان معده، نقش ضد آپوپتوزی آن با سنجش تغییرات بیان ژن BAX مورد ارزیابی قرار گرفت.

بعضی از ترکیبات انواع پونه‌سای شامل ایریدوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و دی‌ترپن‌ها هستند (Formisano et al., 2011) که می‌توانند در خاصیت سیتوتوکسیک آنها موثر باشند. در تحقیق حاضر، پس از استخراج عصاره‌ها، در ابتدا مقدار فلاونوئید کوئرستین و دو ترکیب فنلی کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در عصاره دو گونه پونه‌سای بینالودی و پونه‌سای انبوه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که، هر دو عصاره فاقد کوئرستین بوده و مقدار کافئیک اسید در آنها کم بود، اما رزمارینیک اسید در

عصاره پونه‌سای بینالودی بسیار بیشتر از پونه‌سای انبوه بود که این نتایج با یافته‌های Azimi-Mahalleh و همکاران (۲۰۲۰) همسو است. کافئیک اسید و رزمارینیک اسید خواص آنتی اکسیدانی دارند. کافئیک اسید، واحد سازنده انواع متابولیت‌های فنولی از مونومرهای ساده تا انواع فراورده‌های الیگومری است و رزمارینیک اسید فراوان‌ترین دایمرکافئیک اسید و مهمترین ترکیب فنولی به ویژه در زیر خانواده Nepetoideae است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را بیشتر به علت وجود این ترکیب می‌دانند. در حال حاضر، رزمارینیک اسید به عنوان افزودنی‌های دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. فعالیت آنتی اکسیدانی رزمارینیک اسید قوی‌تر از ویتامین E، اسید کافئیک، کلرژنیک اسید، و فولیک اسید است (Matejczyk et al., 2018; Ghasimi, 2020; Hagh et al., 2018; Azimi Mahalleh et al., 2020). پلی فنول‌های طبیعی مانند کافئیک اسید و رزمارینیک اسید، فواید بالقوه‌ای در سلامت، برای بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو (مانند سرطان) دارند. به واسطه خواص آنتی اکسیدانی آنها، در آزمایش‌های در شرایط طبیعی و در شیشه، این ترکیبات طبیعی توانایی القاء مرگ سلولی تومور، تداخل با سرطان‌زایی، رشد و انتشار تومور را دارند. برخی از آزمایش‌های بالینی نشان داده است که پلی فنول‌ها در ترکیب با شیمی درمانی معمولی یا با پلی فنول‌های دیگر از طریق القای آپوپتوز و جلوگیری از گسترش سرطان عمل می‌کنند (Ci et al., 2016; George et al., 2016; Moore et al., 2016; Matejczyka et al., 2018; Koraneekit et al., 2016; Tundis et al., 2013). محققین نشان دادند ترکیبات تری‌ترپنوئیدی اسید اورسولیک و اولئانولیک استخراج شده از دو گونه *Nepeta crassifolia* و *Nepeta binaludensis* قادرند از اکسیداسیون جلوگیری کنند و در واقع خاصیت آنتی اکسیدانی دارند (Tundis et al., 2013).

نتایج بررسی خواص سیتوتوکسیک عصاره‌ها در پژوهش حاضر نشان داد که، عصاره پونه‌سای بینالودی در مدت زمان بیشتری توان ضد سرطانی داشته است؛ در حالیکه عصاره پونه‌سای انبوه بیشترین توان ضد سرطانی خود را ۲۴ ساعت پس از تیماردهی نشان داد. احتمال دارد که، خصوصیات ضد سرطانی پایدارتر و بیشتر عصاره پونه‌سای بینالودی به دلیل مقادیر بالای رزمارینیک اسید آن باشد. همچنین، بررسی وضعیت آپوپتوز سلول‌های رده AGS سرطان معده نشان داد که، القای آپوپتوز در این سلول‌ها تحت تأثیر هر دو عصاره اتفاق افتاده است. بررسی تغییرات بیان ژن آپوپتوزی BAX نیز افزایش بیشتر و معنی دار بیان این ژن را تحت تأثیر عصاره پونه‌سای بینالودی در سلول‌های رده AGS نشان داد. این نتایج با یافته‌های سفالیان و همکاران (۲۰۲۰) همسو بوده است. آنها با تأثیر عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاهان بومادران و مریم‌گلی بر سلول‌های AGS نشان دادند که این عصاره‌ها اثر ضدسرطانی وابسته به دوز و زمان بر سلول‌های AGS دارند و عصاره مریم‌گلی از خانواده نعنایان بیشتر باعث القای آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار شده است (Sofalian et al., 2020). در تحقیقی مشابه، محققین با بررسی اثرات ضد سرطانی پلی فنول‌های کاتچین در چای سبز نقش کلیدی آنها را در القای آپوپتوز همراه با افزایش بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در سلول‌ها AGS تیمار شده با عصاره چای سبز نشان دادند (Haghgoo Khomami et al., 2021).

محققین نشان دادند که در سلول‌های MDA-MB-231 سرطان سینه، در حضور رزمارینیک اسید بیان ژن Bcl-2 کاهش می‌یابد؛ در حالی که بیان ژن BAX افزایش می‌یابد (Li et al., 2018). بیان ژن BAX توسط پروتئین p53 سرکوبگر تومور کنترل می‌شود و با آپوپتوز با واسطه p53 مرتبط است. پروتئین p53 یک عامل رونویسی است که بسیاری از ژن‌های هدف پایین‌دستی از جمله BAX را هنگامی که به عنوان بخشی از پاسخ سلول به استرس فعال می‌شود، کنترل می‌کند (Gospodinova et al., 2024). پروتئین Bcl-2 مقاومت به مرگ سلولی را در فنوتیپ‌های متاستاتیک تهاجمی با بیان خارج از کنترل افزایش می‌دهد. بنابراین، ارتباط و نسبت BAX به Bcl-2 شاخص‌های تعیین‌کننده بقا یا مرگ یک سلول به دنبال یک محرک آپوپتوز است (Ghasemi et al., 2018; Konstantinou et al., 2024).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش عصاره هر دو گونه خواص سیتوتوکسیک دارند؛ اما عصاره پونه‌سای بینالودی خواص سیتوتوکسیک قوی‌تری داشته که یکی از دلایل آن ممکن است وجود مقادیر بیشتر رزمارینیک اسید در این عصاره باشد. همچنین، عصاره پونه‌سای بینالودی با افزایش معنی دار بیان ژن BAX موجب القای آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

شده است. با توجه به کاربرد گونه‌های مختلف گیاه نپتا در صنایع غذایی و نظر به خواص ضد سرطان معده آنها، ارزش غذایی و طعم دهنده‌گی آنها بیشتر شد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش نیاز به دریافت کد اخلاق نداشته و نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: دانش آموخته پایان نامه، تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها، انجام آزمایش و گردآوری داده‌ها، تهیه پیش‌نویس مقاله

نویسنده دوم: استاد مشاور پایان‌نامه، مشارکت در طراحی پژوهش، نظارت بر پژوهش و مطالعه و بازبینی مقاله
نویسنده سوم: استاد راهنمای پایان‌نامه، طراحی پژوهش، نظارت بر مراحل انجام پژوهش، بررسی و کنترل نتایج، انجام محاسبات، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج، اصلاح، بازبینی و نهایی‌سازی مقاله

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

مقاله حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری انجام شد.
حمایت مالی از این پژوهش از طرف دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری، دانشکده علوم پایه در قالب پژوهانه پایان‌نامه دانشجویی نویسنده اول و همچنین پژوهانه برای سایر نویسندگان انجام شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که، از مساعدت های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری و همکاری کلیه مسئولین این دانشگاه که در انجام آزمایش همکاری داشته‌اند، و نیز از حمایت های آزمایشگاه ژینوزن تشکر و قدردانی نمایند.

References

- Afshar A S, Nematpour F S, Meshkani M, & Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by *Nepeta binaloudensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2017; 27: 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.07.005>
- Akbarpour E, Sadjadi A, Derakhshan MH, Roshandel G, Alimohammadian M. Gastric Cancer in Iran: An Overview of Risk Factors and Preventive Measures. *Archives of Iranian Medicine*. 2021; 24(7):556-567. <https://doi.org/10.34172/aim.2021.79>
- Amirzadeh M, Soltanian S, Mohamadi N. Chemical composition, anticancer and antibacterial activity of *Nepeta mahanensis* essential oil. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2022; 22(1): 173. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03642-w>

Azimi Mahalleh A, Sharayei P, Azarpazhooh E. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from Nepeta (*Nepeta binaludensis* Jamzad). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14: 668-678. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00314-1>

Azimi Y, Maddah SM, Mostafavi G. The comparative study of the antioxidant activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of an Iranian endemic species *Rhabdosciadium aucheri* Boiss. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 2020;11(3): 3701-3708.

Azizian T, Alirezalu A, Hassani A, Bahadori Sh, Sonboli, A. Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC-MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15: 2417-29. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00819-8>

Bloch NB, Wales TE, Prew MS, Levy HR, Engen JR, Walensky LD. The conformational stability of pro-apoptotic BAX is dictated by discrete residues of the protein core. *Nature Communications*. 2021;12(1): 4932. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25200-7>

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal Clinicians*. 2018;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Ci Y, Qiao J, Han M. Molecular mechanisms and metabolomics of natural polyphenols interfering with breast cancer metastasis. *Molecules*. 2016;17(12):35-55. <https://doi.org/10.3390/molecules21121634>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M. Global Cancer Observatory: Cancer Today. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*. 2018.

Formisano C, Rigano D, Senatore F. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. *Chemistry & biodiversity*. 2011;8(10), 1783-1818. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000191>

Ghasimi Hagh Z, Jokar S, Bodaghi H, Modarres M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth. *Journal of Plant Biological Sciences*. 2018;10(1), 67-80. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2018.108819.1071>

George VC, Dellaire G, Rupasinghe HP. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;28(45):1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.007>

Ghasemi A, Khanzadeh T, Zadi Heydarabad M, Khorrami A, Jahanban Esfahlan A, Ghavipankeh S, Gholipour Belverdi M, Darvishani Fikouhi S, Darbin A, Najafpour M. Evaluation of BAX and BCL-2 Gene Expression and Apoptosis Induction in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line CCRFCM after High-Dose Prednisolone Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2018; 19:2319-2323. <https://doi.org/10.22034/apjcp.2018.19.8.2319>

Gospodinova Z, Antov G, Stoichev S, Zhiponova M. In Vitro Anticancer Effects of Aqueous Leaf Extract from *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda*. *Life*. 2024; 14(12), 1539. <https://doi.org/10.3390/life14121539>

Haghighi Khomami M, Deilami Z. Effect of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Bcl-2 and Bax Gene Expression in Gastric Cancerous Cell Line (AGS). *Journal of Plasma & Biomarkers*. 2021; 14 (4): 115-124. (*In Persian*). <https://sid.ir/paper/1066504/en>

Han SH, Lee JH, Woo JS, Jung GH, Jung SH, Han EJ, Jung JY. Myricetin induces apoptosis and autophagy in human gastric cancer cells through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Heliyon*. 2022; 8(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09309>

Hashemi Moghaddam H, Sefidkon F, Jafari AA, Kalate Jari S. Effects of Drying Methods on the Essential Oil Content and Composition of *Nepeta binaludensis* Jamzad. *Journal of Medicinal Plants and Byproduct*. 2020;9: 207-214. <https://doi.org/10.22092/JMPB.2020.123121>

Hosseini A, Forouzanfar F, Rakhshandeh H. Hypnotic Effect of *Nepeta glomerulosa* on Pentobarbital-Induced Sleep in Mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2016;11(1): e25063. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-25063>.

Hosseinzadeh H, Ziaee T. Effect of *Nepeta glomerulosa* Boiss. Aerial Parts Aqueous Extraction Morphine Withdrawal Syndrome in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 2(1): 41-46.

Iravani Sh. Gastric cancer is a multifactorial disease. *Annals of military and health sciences research*. 2013;11(2:42), 157-164. (In Persian). <https://sid.ir/paper/96843/en>

Jafari F, Ganjeali A, Amjadi E. Investigating the effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on the morphological, biochemical, and nutrient absorption characteristics of *Nepeta binaludensis* Jamzad. *Nova Biologica Reperta* 2024; 10 (4): 75-87. (In Persian) <http://nbr.khu.ac.ir/article-1-3618-en.html>

Jamzad Z, Grayer RJ, Kite GC, Simonds MSJ, Ingrounille M, Jallili A. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochemical Systematics Ecology*. 2003;31(6): 587 - 600. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00221-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00221-1)

Karami S, Ejtehadi H, Moazzeni H. Minimal climate change impacts on the geographic distribution of *Nepeta glomerulosa*, a medicinal species endemic to southwestern and central Asia. *Scientific Reports*. 2022;12, 19893. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24524-8>

Khaladgi M, Jamzad M, Mirahmadpour P. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Nepeta binaludensis* Jamzad extracts. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2018; 13(2): e58500. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.58500>

Konstantinou EK, Panagiotopoulos AA, Argyri K, Panoutsopoulos GI, Dimitriou M, Gioxari A. Molecular Pathways of Rosmarinic Acid Anticancer Activity in Triple-Negative Breast Cancer Cells: A Literature Review. *Nutrients*. 2023;19;16(1):2. <https://doi.org/10.3390/nu16010002>

Koraneekit A, Limpaiboona T, Sangka A, Boonsiri P, Daduanga J. Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid on cervical cancer cell lines. *European Journal Cancer*. 2016;60(1):18-29. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8256>

Li H, Zhuang HL, Lin JJ, Zhang YF, Huang H, Luo T, Yu WT, Ni F. Effect of rosmarinic acid from *Sarcandra glabra* in inhibiting proliferation and migration and inducing apoptosis of MDA-MB-231 cells via regulation of expressions of Bcl-2 and Bax. *China Journal Chinese Materia Medica*. 2018; 43:3335-3340. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20180508.001>

Maddah SM, Mostafavi G, Seifi Z. The Synergic Cytotoxicity Effect of Cisplatin and Salicylic Acid on the A2780 cp Ovarian Carcinoma Cell Line, and the Evaluation of p21 and ZEB1 Expression Levels. *Indian Journal of Gynecological Oncology*. 2021; 19, 73. <https://doi.org/10.1007/s40944-021-00574-0>

Matejczyk M, Świsłocka R, Golonko A, Lewandowski W, Hawrylik E. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*. 2018;63(1):14-21. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.07.003>

Moore J, Yousef M, Tsiani, E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients*. 2016; 17 (11):2–32. <http://hdl.handle.net/10464/10724>

Motaghed M, Nili-Ahmadabadi A, Moradkhani S. Assessment of the antioxidative potential of *Nepeta crispa* Willd. (Lamiaceae) and its effects on oxidative stability of virgin sunflower oil under accelerated storage conditions. *Journal of Medicinal Plants*. 2022; 21: 13- 27. <http://jmp.ir/article-1-3310-en.html>

Naderi M, Cherati MR, Mohammadian A, Bidhendy MB, Ghiasvand S, Marzouni HZ, Aryan H, Jangholi E, Javidi MA. Hypericin induces apoptosis in the AGS cell line with no significant effect on normal cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(3), 349-357. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.14904.12735>

Nasr SA, Saad A.A EM. Evaluation of the cytotoxic anticancer effect of polysaccharide of *Nepeta septemcrenata*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2021; 10, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00135-6>

Qian Sh, Wei Zh, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncology*. 2022; 12: 985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>

Roshandel G, Ghanbari-Motlagh A, Partovipour E, Salavati F, Hasanpour-Heidari S, Mohammadi G. Cancer incidence in Iran in 2014: results of the Iranian National Population-based Cancer Registry. *Cancer Epidemiology*. 2019; 61:50-8. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.05.009>

Shakeri A, Khakdan F, Soheili V, Sahebkar A, Rassam G, Asili J. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. *Industrial Crops and Products*. 2014; 58, 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.009>

Shamekhi MA, Rashidi G. Comparing the effect of *Nepeta glomerulosa* essential oil and its nanoemulsion on quality properties of mayonnaise. *Innovative Food Technologies*. 2023;10(3): 229-248.(In Persian). <https://doi.org/10.22104/ift.2022.5863.2124>

Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer management and research*. 2018;10: 239-248. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>

Sofalian O, Zare N, Latifi S, Motalebinia S, Hasanpour K. Effects of hydroalcoholic extract of *Achilla millefolium* and *Salvia officinalis* against human gastric Cancer cells. *Developmental Biology*. 2020; 12 (3):52-43. (In Persian).

Tundis R, Nadjafi F, Menichini F. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity and Antioxidant Properties of *Nepeta crassifolia* Boiss & Buhse and *Nepeta binaludensis* Jamzad. *Phytotherapy Research*. 2013; 27 (4): 572-580. <https://doi.org/10.1002/ptr.4757>