

## Investigation of Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Terminalia Chebula Hydro-Alcoholic Extract on Glioblastoma Cell Line

**Amir Reza Afshari<sup>1</sup>, Mostafa Karimi Roshan<sup>2</sup>, Mohammad Soukhtanloo<sup>2</sup>, Vahid Reza Askari<sup>1</sup>, Hamid Mollazadeh<sup>3</sup>, Mohammad Jalili Nik<sup>2</sup>, Amir Ali Jahani Yazdi<sup>2</sup>, Fatemeh Aria Kia<sup>4</sup>, Seyed Hadi Mousavi<sup>1, 4\*</sup>**

<sup>1</sup>Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>3</sup>Natural Products and Medicinal Plants Research Center, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

<sup>4</sup>Medical Toxicology Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

### Article Info:

**Received:** 20 Jan 2018

**Revised:** 20 May 2018

**Accepted:** 29 Jul 2018

## ABSTRACT

**Introduction:** Glioblastoma multiforme is the most prevalent group of primary brain tumors. Terminalia chebula has traditionally been used for its anti-cancer, laxative, diuretic, and anti-oxidant properties. The aim of this study was to investigate the effects of alcoholic extract of Terminalia Chebula (TCAE) on the glioblastoma multiforme (U87) cell line. **Materials and Methods:** Cellular cytotoxicity was measured by MTT assay and intracellular active oxygen species were measured using DCFDA (2'-and 7'-dichloro fluorescein diacetate) assay kit. In addition, apoptotic cells were detected with an Annexin V-FITC early apoptosis staining. **Results:** TCAE reduced the proliferation of U87 cells in a concentration- dependent manner. IC<sub>50</sub> was 145.3 and 192.3 µg/mL after 24 and 48 hours, respectively. Activated reactive species decreased significantly at 2 and 6 hours after treatment compared to the control group. Furthermore, induction of apoptosis occurred in the first 24 hours. **Conclusion:** TCAE caused the destruction of cancer cells enhance the free radical species of oxygen and induce apoptosis on glioblastoma cell line. It seems that TCAE has the potential to use as an adjuvant drug for treatment of glioblastoma.

### Key words:

1. Neoplasms
2. Brain Neoplasms
3. Glioblastoma
4. Apoptosis

**\*Corresponding Author:** Seyed Hadi Mousavi

**E-mail:** Mousavih@mums.ac.ir

## بررسی اثرات سایتو توکسیک و آپوپتوزنیک عصاره هیدرووالکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوما

امیررضا افشاری<sup>۱</sup>، مصطفی کریمی روشن<sup>۲</sup>، محمد سوختانلو<sup>۳</sup>، و حیدرضا عسکری<sup>۱</sup>، حمید ملازاده<sup>۳</sup>، محمد جلیلی نیک<sup>۴\*</sup>  
امیرعلی جهانی یزدی<sup>۱</sup>، فاطمه آریا کیا<sup>۱</sup>، سید هادی موسوی<sup>۱،۴</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> گروه بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

<sup>۴</sup> مرکز تحقیقات سمتشناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

### اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۷ مرداد ۱۳۹۷

اصلاحیه: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۳۰ دی ۱۳۹۶

## چکیده

**مقدمه:** گلیوبلاستوما مولتی فرم شایع‌ترین گروه از تومورهای معزی اولیه است. هلیله کابلی به طور سنتی برای خواص ضد سرطانی، ملین، دیبورتیک و آنتی اکسیدانی استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره الکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوما مولتی فرم بود. **مواد و روش‌ها:** سمیت سلولی به روش زنده‌مانی سلولی و گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی با استفاده از رنگ ۲' و ۷'-دی کلرو فلورسینین دی استات اندازه‌گیری شد. به علاوه سلول‌های آپوپتوزی با رنگ آمیزی آپوپتوز اولیه Annexin V-FITC تشخیص داده شدند. **یافته‌ها:** عصاره الکلی هلیله کابلی زنده‌مانی سلول‌های گلیوبلاستوما مولتی فرم را به صورت وابسته به غلظت کاهش داد. کمترین غلظت مهاری به ترتیب  $145/3$  و  $192/3$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. گونه‌های فعال اکسیژنی در ۲ و ۶ ساعت پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین القای آپوپتوز در ۲۴ ساعت اول رخ داد. **نتیجه‌گیری:** عصاره الکلی هلیله کابلی با افزایش گونه‌های رادیکال آزاد اکسیژن باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز در رده سلول گلیوبلاستوما می‌شود. به نظر می‌رسد که عصاره الکلی هلیله کابلی دارای پتانسیل استفاده به عنوان داروی کمکی برای درمان گلیوبلاستوما است.

### کلید واژه‌ها:

۱. نئوپلاسم‌ها
۲. نئوپلاسم‌های معزی
۳. گلیوبلاستوما
۴. آپوپتوز

\* نویسنده مسئول: سید هادی موسوی

آدرس الکترونیکی: Mousavih@mums.ac.ir

## مقدمه

و ضد دیابتی<sup>(۱۶)</sup> و درمانی جهت آلزایمر<sup>(۱۷)</sup> و مالتیپل اسکلروز<sup>(۱۸)</sup> از این گیاه گزارش شده است. عصاره متانولی هلیله کابلی و ترکیبات آن گالیک اسید<sup>۱</sup>,<sup>۲</sup>,<sup>۳</sup>,<sup>۴</sup>,<sup>۵</sup>,<sup>۶</sup> پنتا-ا-گالوئیل-بتا-دی-گلوکوپیرانوز، اسیدکبولازیک و کبولینیک اسید، سایتوتوکسیستیت متوسطی بر علیه سلول‌های توموری انسان از جمله A-549, SK-MEL-2, SK-OV-3, A-549, ۱۵, ۱۶, XF-389 و HCT-15 را نشان داده است<sup>(۱۵)</sup>. گالیک اسید، استیل گالات و لوئولین استخراج شده از Terminalia arjuna، به عنوان مهار کننده رشد برخی سلول‌های توموری معرفی شده است<sup>(۲۰)</sup>. لوئولین، به عنوان یک فلاونون موجود در هلیله، اثرات مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 نشان داده است<sup>(۲۱)</sup>. عصاره هلیله کابلی با اثر بر برخی رده‌های سلولی شامل سلول‌های انسانی MCF-7 و موشی S115، انسانی-1 HOS و رده سلولی سرطانی پروستات انسانی PC-3 باعث کاهش پایداری و مهار تکثیر سلول‌ها و القای آپوپتوز شده است<sup>(۱۵)</sup>.

تاكنوں اثرات بیولوژیکی هلیله کابلی به طور اختصاصی بر روی گلیوما مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجا که مهار مسیرهای مولکولی در تنظیم پرولیفراسیون سلولی یک راهبرد مهم در توسعه داروهای ضد سرطان است، برای اولین بار در مطالعه حاضر اثرات محافظتی عصاره هیدروکلکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم با تمرکز بر سمتی سلولی و ارزیابی پارامتر ROS<sup>۷</sup> به عنوان شاخصی از استرس اکسیداتیو و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید<sup>۸</sup> جهت بررسی آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## مواد شیمیایی و معرف‌ها

کیت فلورسنت<sup>(۹)</sup> و U-7-Dی کلرو فلوروسئین دی استات DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, (DCFDA) کیت پروپیدیوم یدید<sup>(۱۰)</sup>, کیت<sup>(۱۱)</sup> ab113851, Abcam Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit, #6592, Cell Signaling (MTT) و رنگ<sup>(۱۲)</sup> FBS<sup>(۱۳)</sup> از شرکت Sigma Aldrich و DMEM<sup>(۱۴)</sup> از Gibco تهیه گردید.

## کشت سلول

سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق سلول‌های انسانی گلیوبلاستوما مولتی‌فرم می‌باشد که از بانک سلول انسنتیو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده است. سلول‌های U87 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰٪ و CO<sub>2</sub> ۵٪ نگهداری شده و در محیط DMEM حاوی

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM)<sup>(۱)</sup>, شایع‌ترین گروه از تومورهای مغزی اولیه بوده و گلیوماهای بدخیم، کشنده‌ترین نوع تومورهای مغز بزرگ‌سالان محسوب می‌شوند. گلیوبلاستوما بیش از ۵۰ درصد تمام انواع گلیوماهای را به خود اختصاص داده است. شیوع کلی تومور ۳-۲ نفر در صد هزار نفر و ۲۰ درصد کل تومورهای داخل جمجمه‌ای را تشکیل می‌دهد و در مردان بالای شصت سال شایع‌تر است<sup>(۱)</sup>. در مطالعات سلولی، سلول‌های گلیوبلاستوم مولتی‌فرم (U87)<sup>(۱)</sup> به شکل ستاره‌ای و اندازه بسیار متفاوت هستند و پرولیفراسیون عروقی و میزان بروز نکروز بالایی داشته و دست اندازی سلول‌های تومورال را به نواحی مختلف مغز افزایش می‌دهد. این نوع تومور، دارای پیش آگهی ضعیف با ویژگی‌های بالینی مختلف مانند نقص شناختی، تغییرات شخصیتی، سردرد، از دست دادن حس (پارستزیا) و عدم تعادل در راه رفتن می‌باشد. علی‌رغم افزایش دانش ما در فهم پاتوفیزیولوژی گلیوبلاستوما و پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه درمان بیماری، این نوع سرطان همچنان علاج ناپذیر در نظر گرفته می‌شود، چرا که با وجود درمان‌های رایج شامل خارج کردن تومور با عمل جراحی و به دنبال آن پرتو درمانی به اضافه تیمار دارویی با تموزولوماید (TMZ)<sup>(۱۵)</sup>، افراد مبتلا معمولاً در بازه زمانی ۱۲ تا ۱۵ ماه فوت می‌کنند<sup>(۲)</sup>. یکی از درمان‌های گلیوما ایجاد سمتی سلولی و همچنین القای آپوپتوز می‌باشد تا روند تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار نماید<sup>(۳)</sup>. از این رو نیاز به روش‌های درمانی یا داروهای جدید کاملاً ضروری به نظر می‌رسد<sup>(۴)</sup>.

فراورده‌های طبیعی به دست آمده از گیاهان، به عنوان منابع ارزشمند مواد اولیه دارویی مدرن محسوب می‌شوند. از فراورده‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان می‌توان به ترکیبات پاکلیتاسل، کامپیوتوتین، اتوپوزید، وین بلاستین و وین کریستین<sup>(۵)</sup> که همگی برای درمان انواعی از سرطان تأیید شده‌اند، نام برد<sup>(۵-۸)</sup>. هلیله کابلی<sup>(۶)</sup> یک گیاه بومی در هند و جنوب شرقی آسیا است و به طور سنتی دارای کاربردهای ضد سرطانی، ملین، دیورتیک و درمان کننده بیماری‌های قلبی بوده است<sup>(۹)</sup>. هلیله کابلی در شرایط برون تن<sup>(۱۰)</sup> فعالیت آنتی اکسیدان داشته و از بین برنده رادیکال آزاد معرفی شده است<sup>(۱۰)</sup>. در مطالعات نشان داده شده است که عصاره آبی آن دارای خواص خنثی کننده رادیکال آزاد<sup>(۹)</sup> و محافظت در برابر رادیواکتیو است<sup>(۱۱)</sup>. خاصیت‌های ضد میکروبی، ضد ویروسی<sup>(۱۲)</sup>، ضد قارچ<sup>(۱۴)</sup> ضد سرطانی<sup>(۱۵)</sup>، آنتی آنافیلاکسی

<sup>۱</sup> Glioblastoma multiforme<sup>۲</sup> U87 cell line<sup>۳</sup> Temozolomide<sup>۴</sup> Paclitaxel, Camptothecin, Etoposide, Vinblastine, Vincristine<sup>۵</sup> Terminalia chebul<sup>۶</sup> In vitro<sup>۷</sup> Reactive oxygen species<sup>۸</sup> Propidium Iodide<sup>۹</sup> 2', 7'-dichloro fluorescein diacetate<sup>۱۰</sup> 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide<sup>۱۱</sup> Dulbecco's modified eagles medium<sup>۱۲</sup> Fetal bovine serum

طور خلاصه، حدود ۷۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت شده و اجرازه داده می‌شود سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و غلظت‌های مختلف از عصاره هلیله کابلی را به چاهک‌ها اضافه می‌کنیم و پلیت ۹۶ خانه را به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از محلول MTT (حل شده در بافر فسفات یا آب مقطر) اضافه نموده و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است که یکی از آنزیم‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود. میزان زیر میکروسوکوب به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متabolیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیر محلول بوده و بایستی قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO (۱۰۰ میکرولیتر) به مدت ۲ ساعت به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده را در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها را محاسبه می‌کنیم.

#### بررسی میزان آپوپتوز

بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin V-FITC Cell Signaling Detection Kit Early Apoptosis مورد بررسی قرار گرفت. به صورت خلاصه، ۷۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه قرار گرفت. هیچ تیماری روی نمونه کنترل صورت نگرفت و حجم برایری از محیط کشت دریافت کرد. تیمارها به صورت سه بار تکرار انجام شد. بعد از طی زمان مورد نظر تیمار (۲۴ ساعت)، سلول‌ها به وسیله محیط کشت و بافر فسفات سالین (PBS)<sup>۱۳</sup> شسته شد. به سلول‌ها بافر V1X Annexin اضافه شد. سپس، ۹۶ میکرولیتر از سلول‌ها در تیوب مخصوص فلوسایوتومتری ریخته شد. سپس، ۱ میکرولیتر از Annexin V-FITC کونزروگه ۱۲/۵ میکرولیتر محلول پروپیدیوم ید به سلول‌ها افزوده شد. بعد از انکوباسیون، به مدت ۱۰ دقیقه در جای تاریک و روی یخ با بافراتصالی Annixin V1X به حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده و با دستگاه فلوسایوتومتر bd Facscalibur<sup>TM</sup> Flow Cytometer خوانده شد.

#### بررسی تولید گونه‌های اکسیژن فعال

کیت DCFDA Cellular ROS Detection Assay گونه‌های هیدروکسیل، پروکسیل و سایر گونه‌های فعال ROS را

۱۰ درصد، پنی‌سیلین (ml ۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) کشت داده شده است. سلول‌ها به صورت Overnight کشت شده و با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. بر روی نمونه‌های کنترل هیچ گونه تیماری انجام نشد و حجم برابری از محیط کشت دریافت کردند. همه تیمارها به صورت سه بار تکرار انجام شد.

#### جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

میوه رسیده هلیله کابلی از بخش گیاهان دارویی داروخانه امام (دانشگاه علوم پزشکی مشهد) تهیه شده و در مرکز گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد (با شماره هرباریوم ۹۲۱۵۷) شناسایی گردید. بخش‌های میوه گیاه، بعد از خشک شدن در سایه و در مجاورت هوا پودر گردید و برای تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت. پودر گیاه به مدت سه روز در حلal اتانول ۸۰ درصد در دمای اتاق نگهداری گردید. مخلوط به دست آمده با کاغذ صافی صاف شد و عصاره به دست آمده در مکانی تاریک نگهداری شد. بار دیگر روی تفاله، اتانول ریخته شد و ۲۴ ساعت شیک گردید. حلal عصاره با دستگاه تبخیر کننده چرخشی تبخیر شد. جهت حل کردن رسوب، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. عصاره به دست آمده وزن شده و میزان بازده عصاره معادل ۵۵/۵۲٪ وزنی- وزنی به دست آمد. عصاره در شرایط دمایی یخچال ۲-۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### تهیه رقت‌های مختلف از عصاره گیاه

۱۰ میلی‌گرم عصاره گیاه در ۱۰۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد. رقت‌های بعدی مورد نظر توسط محیط کشت DMEM تهیه گردید. بازه رقت‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل ۰-۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک‌های کشت سلول کمتر از ۱٪ برآورد می‌شود که این مقدار فاقد سمیت می‌باشد.

#### سنجش زنده مانی سلولی با روش رنگ سنجی MTT

جهت بررسی اثر سایوتوکسیسیتی هلیله کابلی بر رشد و تکثیر سلول‌های U87 و تعیین غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC<sub>50</sub>)<sup>۱۴</sup> این ترکیبات، از روش رنگ سنجی ایجاد شد (۲۲). اساس این روش، شکستن نمک تترازولیوم با فرمول شیمیائی ۴-(۴-۵-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۵ و دی‌فیل تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری می‌شود. به

<sup>13</sup> Dimethyl sulfoxide

<sup>14</sup> Fifty percent inhibitory concentration

<sup>15</sup> Phosphate buffer saline

واریانس یکطرفه<sup>۱۶</sup> و برای مقایسه بین گروه‌های از آزمون توکی-کرامر<sup>۱۷</sup> استفاده گردید. مقادیر  $P < 0.05$  به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین میزان آپوپتوز سلولی توسط نرم‌افزار فلو جو جو<sup>۱۸</sup> آنالیز گردید.

#### یافته‌ها

#### اثر هلیله کابلی بر زنده مانی سلولی

سلول‌های U87 با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ۰-۸۰۰ به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. سمتیت عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی با آفرازیش غلظت (۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) همراه با تغییرات ریخت‌شناسی شامل کاهش حجم سلول و گردشدن آن بود (تصویر ۱). همچنین هلیله کابلی زنده مانی سلولی را با آفرازیش غلظت به صورت همراه با تغییرات ریخت‌شناسی شامل کاهش حجم سلول و گردشدن آن بود (تصویر ۱). همچنین هلیله کابلی زنده مانی سلولی را با آفرازیش غلظت به صورت همراه با تغییرات ریخت‌شناسی شامل کاهش حجم سلول و گردشدن آن بود (تصویر ۱). همچنین هلیله کابلی زنده مانی سلولی را با آفرازیش غلظت به صورت همراه با تغییرات ریخت‌شناسی شامل کاهش حجم سلول و گردشدن آن بود (تصویر ۱). همچنین هلیله کابلی زنده مانی سلولی را با آفرازیش غلظت به صورت همراه با تغییرات ریخت‌شناسی شامل کاهش حجم سلول و گردشدن آن بود (تصویر ۱).

#### نقش آپوپتوز

درصد سلول‌های آپوپتویک و نکروتیک توسط

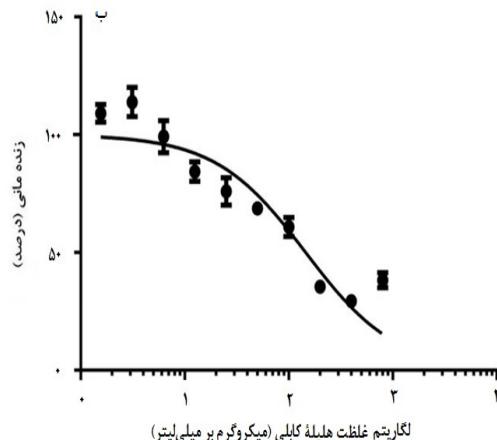
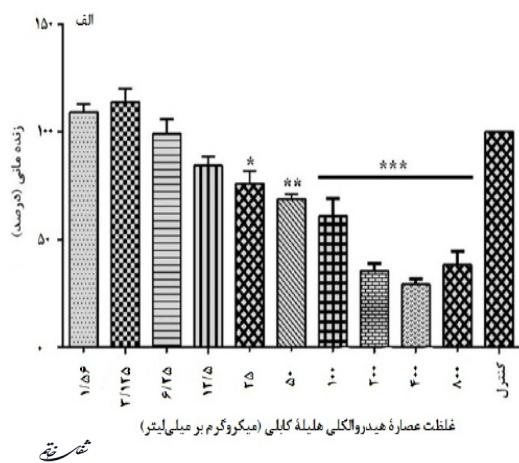
در سلول اندازه می‌گیرد. DCFDA بعد از نفوذ در سلول توسط دی استرازهای سلولی به ترکیبی غیرفلورسنت داستیله می‌شود. در مرحله بعد توسط ROS به  $2.7^{\circ}$  دی کلروفلورسین که ترکیبی با قدرت فلورسنت بالاست تبدیل می‌شود که توسط فلوسایتمتری با طول موج تهییج ۴۹۵ و نشر ۵۲۹ قابل تشخیص می‌گردد. ابتدا سلول‌های U87 در پلیت تیره ریخته شد (۷۰۰۰ سلول در هر چاهک و ۳ چاهک برای هر گروه) و شبانه انکوبه گردید. بعد از آن سلول‌ها با بافر ۱X شسته و با DCFDA به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}$  درجه رنگ شدند و بار دیگر سلول‌ها با بافر ۱X شسته شدند. تیمار سلول‌ها با ۳ غلظت مختلف هلیله کابلی ( $50, 100, 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) به مدت ۲ و ۶ ساعت انجام شد. محیط رویی به لوله فالکون منتقل گردید و سلول‌های چسبنده توسط تریپسین جدا شده و به همان لوله فالکون انتقال داده شد. بعد از دو بار شستشو با PBS، شدت فلورسانس DCFDA با استفاده از دستگاه الایزا ریدر با طول موج تهییج ۴۸۵ nm و طول موج انتشار  $535 \text{ nm}$  اندازه گیری شد.

#### آنالیز داده‌ها

کلیه نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار ذکر گردیده‌اند. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Graph Pad



تصویر ۱- سمتیت عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی با غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل (No treatment). همانطور که مشاهده می‌شود تغییر شکل ساختاری (کاهش حجم سلول و گردشدن آن) به صورت وابسته به غلظت آفرازیش می‌یابد (بزرگنمایی  $40\times$ ) که در تصویر با علامت فلاش مشخص شده است.

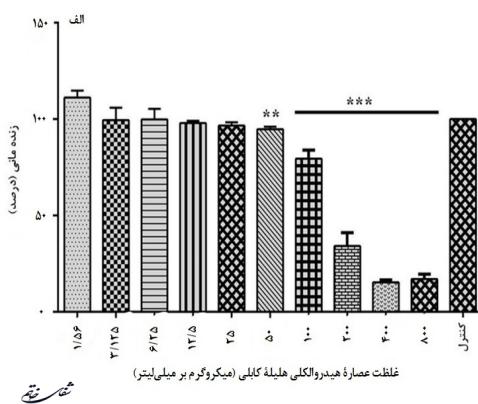


نمودار ۱- سمتیت هلیله کابلی ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) بر میلی‌لیتر) کمترین غلظت مهاری سلولی ( $\text{IC}_{50}$ )  $145/3$  میکروگرم بر میلی‌لیتر میانگین  $\pm$  خطای استاندارد در نمونه‌ها می‌باشد ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل).

<sup>16</sup> One-way ANOVA

<sup>17</sup> Tukey-Kramer

<sup>18</sup> FlowJo vX.0.7

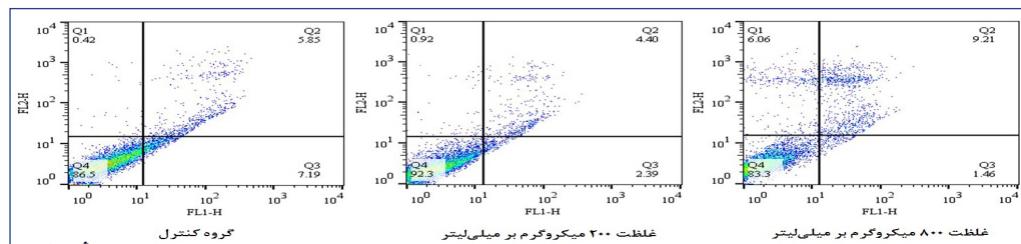


نمودار ۲- سختی هیلیه کابلی در سلول‌های U87 در ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل. سختی سلولی با سنجش MTT بررسی شد. میزان کمترین غلظت مهاری سلولی ( $IC_{50}$ ) ۱۹۲/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. هر سوتون بیانگر میانگین  $\pm$  خطای استاندارد در نمونه‌ها می‌باشد ( $**P<0.01$ ،  $***P<0.001$ ، در مقایسه با گروه کنترل).

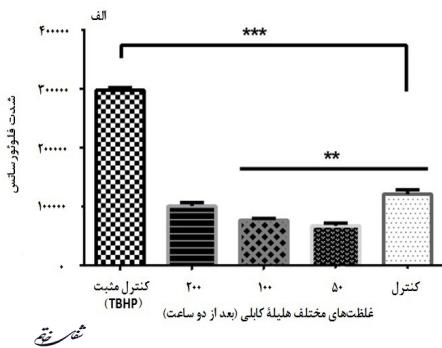
و نکروتیک در غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب  $۰.۵/۳۲$  و  $۱۵/۲۷$ % گزارش گردید. همچنین میزان سلول‌های Early apoptotic با افزایش غلظت، نسبت به گروه کنترل و همچنین مقایسه غلظت‌ها کاهش داشته است.

#### بررسی گونه‌های فعال اکسیژنی

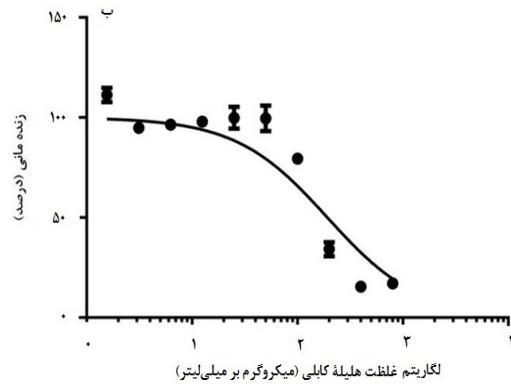
اثر هیلیه کابلی بر تشکیل گونه‌های فعال اکسیژنی در آنالیز الایزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت. سطح ROS در سلول‌های تیمار شده توسط عصاره هیدروالکلی هیلیه کابلی نسبت به گروه کنترل به صورت واپسی به غلظت کاهش معنی دار نشان داد. این نتیجه پیشنهاد می‌کند که عصاره هیلیه کابلی می‌تواند کاهش ROS را القاء کند و نقش معنی داری از طریق فعالیت‌های آنتی اکسیدانی داشته باشد.



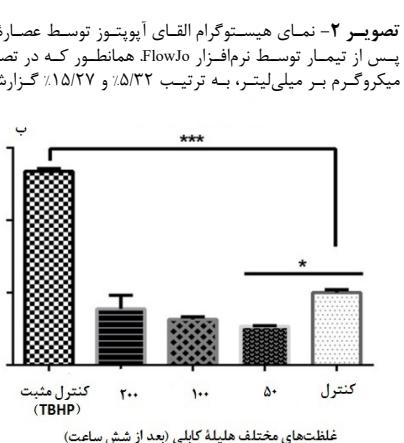
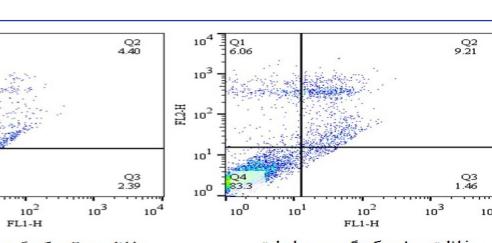
تصویر ۲- نمای هیستوگرام القای آپوپتوز توسط عصاره هیدروالکلی هیلیه کابلی با غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت پس از تیمار توسط نرم‌افزار FlowJo همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود میزان سلول‌های آپوپتوزیک و نکروتیک در غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب  $۰.۵/۳۲$  و  $۱۵/۲۷$ % گزارش گردید.



نمودار ۳- هیلیه کابلی میزان تولید ROS را در سلول‌های U87 در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $**P<0.01$ ،  $***P<0.001$ ). در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌ها به مدت ۲ و ۶ ساعت با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰ هیلیه کابلی تیمار شدند و سطح داخل سلولی ROS توسط سنجاق فلورومیتر مورد بررسی قرار گرفت. نمودار الف بیان کننده شدت فلوروسانس غلظت‌های مختلف هیلیه کابلی پس از ۶ ساعت است. در نمونه کنترل مثبت TBHP (به عنوان القای کننده رادیکال‌های ازاد اکسیژن، با غلظت ۵۰ میکرو‌مولار) شدت فلوروسانس به طور معنی دار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $###P<0.001$ ).



فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین کونژوگه Annexin V-FITC به سطوح سلولی بیان کننده Early apoptosis دلیل سرین متصل شده که یک نشانگر PI است. سلول‌ها توسط Apoptosis غیرقابل نفوذ به است رنگ شده که نشان‌دهنده سلول‌های نکروتیک است. سلول‌های رنگ شده به وسیله Annexin V-FITC و PI نشان‌دهنده فاز انتهاشی آپوپتوز و فاز اولیه نکروز می‌باشد. عصاره هیدروالکلی هیلیه کابلی، باعث القای پیک فسفاتیدیل سرین (یکی از شاخص‌های موثر آپوپتوز) در هیستوگرام فلوسایتومتری در مقابل گروه کنترل گردید (تصویر ۲). درصد آپوپتوز (%) = تعداد سلول‌های آپوپتوزیک/تعداد کل سلول‌های شمارش شده (۱۰۰۰ سلول) نشان داده شد. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود میزان سلول‌های آپوپتوزیک



نمودار ۳- هیلیه کابلی میزان تولید ROS را در سلول‌های U87 در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $**P<0.01$ ،  $***P<0.001$ ). در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌ها به مدت ۲ و ۶ ساعت با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰ هیلیه کابلی تیمار شدند و سطح داخل سلولی ROS توسط سنجاق فلورومیتر مورد بررسی قرار گرفت. نمودار الف بیان کننده شدت فلوروسانس غلظت‌های مختلف هیلیه کابلی پس از ۶ ساعت است. در نمونه کنترل مثبت TBHP (به عنوان القای کننده رادیکال‌های ازاد اکسیژن، با غلظت ۵۰ میکرو‌مولار) شدت فلوروسانس به طور معنی دار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $###P<0.001$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

دوزهای افزاینده عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی ( $\mu\text{g/mL}$ )<sup>۱۹</sup> ۸۰۰ به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان کاهش یافت. ما ۵۰ درصد مهار پرولیفراسیون سلولی را در غلظت  $۱۴۵/۳$  و  $۱۹۲/۳$  میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب مشاهده کردیم. همچنین، مشاهده گردید که با گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، غلظت مهاری به صورت وابسته به دوز تغییر می‌کند به عبارتی با کاهش دوز عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی میزان زنده مانی سلول‌ها افزایش می‌یابد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ما به صورت وابسته به غلظت سلول را از بین می‌برد. از طرف دیگر، سلول‌های گلیوبلاستوما به صورت خوش‌های رشد می‌کنند و زمان دو برابر شدن این سلول‌ها حدود ۳۶ ساعت تخمین زده می‌شود اما در طی درمان ۲۴ ساعت با عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی، تغییرات زیادی در ریخت‌شناسی و الگوی رشد سلولی و همچنین کاهش رشد شاخه‌ای و تجمعات سلولی، ایجاد شده بود.

در مطالعات زیادی به اثرات آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و القای آپوپتوز هلیلۀ کابلی اشاره شده است. هلیلۀ کابلی، رادیکال‌های آزاد ناشی از DPPH<sup>۲۰</sup> را به خوبی جاروب نموده و به صورت معنی‌داری از ایجاد مالون دی‌آلدیئید ناشی از آب اکسیژنه جلوگیری می‌نماید. همچنین مرگ سلولی و تولید رادیکال نیتریک اکسید (NO)<sup>۲۱</sup> ناشی از لیپوپلی ساکارید را به صورت برون تن کاهش می‌دهد (۹، ۳۴). در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره‌آبی هلیلۀ از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی خود از آسیب کبدی ناشی از بوتیل هیدروپراکسید (t-BHP)<sup>۲۲</sup> به صورت برون تن و درون تن جلوگیری می‌نماید (۳۵). یک مطالعه نیز نشان داد که عصاره مтанولی هلیلۀ دارای اثرات قدرتمند آنتی‌اکسیدانی و جاروب کنندگی رادیکال آزاد اکسیژن به صورت برون تن می‌باشد که عمده‌ناشی از محتوی غنی فنولیک اسیدها و فلاونوئیدی آن می‌باشد (۳۶).

اخيراً در مطالعه‌ای نشان داده شد که عصاره‌های آبی، اتانولی و مтанولی هلیلۀ کابلی، غنی از ترکیبات فنلی، تاننی و تری ترپنوئیدی بوده و به اندازه آنتی‌اکسیدانه‌ای شناخته شده ویتامین C و ترولوکس از خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند و از مرگ سلول‌های PC12 ناشی از آب اکسیژنه به صورت معنی‌داری جلوگیری می‌نماید (۳۷). درمان با عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی نشان داد که با گذشت زمان‌های اولیه، تغییرات در کاهش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وجود می‌آید، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت همانطور که مطالعات هم نشان داده است اثرات سمیت سلولی این گیاه می‌تواند بیشتر ناشی از اثرات ضد التهابی (مثلاً

گیاهان منبع بسیاری از مولکول‌های ضد سرطان قوی بالینی هستند. به دلیل تنوع بسیار زیاد گیاهان، بررسی و تحقیق گستره‌های برای کشف مولکول‌های بالقوه درمانی قرار نگرفته است. نیاز به تحقیق و توسعه بر روی گیاهان برای تولید محصولات درمانی طبیعی حتی امروزه با توجه به پیشرفت روش‌ها و فناوری‌ها برای تهیه آنالوگ از محصولات جدا شده طبیعی، بیشتر از پیش محسوس می‌باشد (۲۳-۲۷). در مطالعه حاضر اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم (U87) بررسی گردید. همچنین مطالعات قبلی ما نشان‌دهنده اثرات مهاری بالقوه دیگر ترکیبات طبیعی و شیمیایی بر روی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم نیز می‌باشد (مقالات هنوز منتشر نشده است). همانطور که می‌دانیم سرطان مشکلی رو به رشد در سراسر جهان و از عوامل مهم مرگ و میر در جوامع انسانی می‌باشد. فرآورده‌های گیاهی نیز در طول زمان به دلیل عوارض جانبی زیاد داروهای شیمی درمانی و سایوتوكسیک جهت پیشگیری و درمان بسیاری بیماری‌ها از جمله سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۸). همانطور که می‌دانیم، گیاهان گنجینه‌ای از داروهای مؤثرند که امروزه آگاهی در مورد اهمیت آن‌ها افزایش یافته است (۲۹). داروهای به دست آمده از گیاهان در دسترس، ارزان، ایمن و کارآمد هستند و معمولاً عوارض جانبی کمتری دارند (۳۰). میوه گیاه هلیلۀ کابلی به خاطر فعالیت فارماکولوژیکی خود شناخته شده است. در سال ۲۰۰۳ عصاره آبی این گیاه را به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی مورد مطالعه قرار دادند (۹).

عصاره آبی هلیلۀ کابلی یک مهارکننده مؤثر پراکسیداسیون لیپید و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معرفی شد که می‌تواند از آسیب‌های DNA جلوگیری کند، لذا عصاره هلیلۀ کابلی به عنوان یک خنثی کننده رادیکال آزاد شناخته شده است (۱۱، ۱۷). تا آنجا که دانش محققین اجرازه می‌دهد، این اولین مطالعه‌ای است که اثر عصاره هیدروالکلی هلیلۀ کابلی را بر رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم بررسی می‌کند. نتایج مطالعات قبلی بر روی هلیلۀ کابلی خاصیت ضد توموری آن را بر روی رده‌های سلولی دیگر نشان داده است (۳۱). ردی و همکاران نشان داده‌اند هلیلۀ کابلی می‌تواند باعث مهار پرولیفراسیون سلولی در رده سلولی سرطان کولون شود (۳۲). تنها مطالعه نزدیک، بررسی اثرات کبولازیک اسید بر روی رده سلولی رتینوبلاستوما با مکانیسم‌های القای NF-kB، G1-arrest، مهار آپوپتوز بود (۳۳). در مطالعه حاضر سمتیت هلیلۀ کابلی در رده سلولی U87 نشان داده شد که پرولیفراسیون سلولی U87 در اثر

<sup>۱۹</sup> 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydroxyl

<sup>۲۰</sup> Nitric oxide

<sup>۲۱</sup> Tert-butyl hydroperoxide

نشان دهنده اثر القای آپوپتوز این عصاره به صورت وابسته به دوز می باشد. البته در آپوپتوز نشانگرهای متفاوتی مورد بحث می باشد که یکی از آن ها می تواند عدم تعادل بین پروتئین های Bax و Bcl2 باشد (۴۲، ۴۳).

این مطالعه برای اولین بار تأثیر عصاره هیدرولالکلی هلیله کابلی را بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی فرم مورد بحث قرار می دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره هیدرولالکلی گیاه هلیله کابلی می تواند به عنوان یک داروی مؤثر کمکی در درمان انواع سرطان از جمله تومورهای مغزی (گلیوبلاستوم مولتی فرم) در کنار داروهای استاندارد شیمی درمانی و رادیوتراپی مورد استفاده قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتر روی مکانیسم های مؤثر این گیاه در القای اثرات سایتوکسیک و آپوپتوز نیک بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی فرم ضروری به نظر می رسد.

مهار سیستم های سیکلواکسیزناز و لیپواکسیزناز و یا مهار مسیر NF-kB) و آنتی اکسیدانی باشد که البته دلیل آن را هم می توان به ترکیبات جدید مهارکننده التهاب از جمله کبولاژیک اسید (ترکیب مؤثره موجود در میوه هلیله) نسبت داد (۳۲). همچنین، القاء آپوپتوز یکی از راهبردهای مهم در پیشگیری و درمان سرطان به خصوص تومورهای مغزی است (۳۸-۴۰). بسیاری از موادی که در رژیم های غذایی و گیاهان اثرات پیشگیری کننده از سرطان دارند از طریق القاء آپوپتوز اثرات مهاری خود را بر سرطان اعمال می کنند (۴۱). عصاره هیدرولالکلی هلیله کابلی در زمان ۲۴ ساعت نشان داد که با افزایش غلظت می تواند باعث تبدیل سلول های زنده به سمت سلول های آپوپتوزیک و نکروتیک شود به طوری که با غلظت پایین تر ( $200 \mu\text{g/mL}$ ، مجموع  $5/32$  درصد از سلول ها و با غلظت بالاتر ( $800 \mu\text{g/mL}$ ، مجموع  $15/27$  درصد به سمت آپوپتوز و نکروز پیش روی داشته اند که

#### منابع

- Wang X, Qiu Y, Yu Q, Li H, Chen X, Li M, et al. Enhanced glioma therapy by synergistic inhibition of autophagy and tyrosine kinase activity. *Int J Pharm.* 2018; 536(1): 1-10.
- Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother.* 2017; 92: 681-9.
- Yan Y-Y, Bai J-P, Xie Y, Yu J-Z, Ma C-G. The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Oncol Lett.* 2013; 5(1): 242-8
- Wang X, Jia Y, Wang P, Liu Q, Zheng H. Current status and future perspectives of sonodynamic therapy in glioma treatment. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2017; 37: 592-9.
- Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(2): 143-8.
- Mahdian D, Shafiee-Nick R, Mousavi SH. Different effects of adenylyl cyclase activators and phosphodiesterases inhibitors on cervical cancer (HeLa) and breastcancer (MCF-7) cells proliferation. *Toxicol Mech Methods.* 2014; 24(4): 307-14.
- Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. *Biomed Res Int.* 2014; 2014.
- Tayarani-Najaran Z, Asili J, Parsaee H, Mousavi SH, Mashhadian NV, Mirzaee A, et al. Wogonin and neobaicalin from *Scutellaria litwinowii* roots are apoptotic for HeLa cells. *Rev Bras Farmacogn.* 2012; 22(2): 268-76.
- Cheng H-Y, Lin T-C, Yu K-H, Yang C-M, Lin C-C. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Terminalia chebula*. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26(9): 1331-5.
- Kumar R, Arora R, Agarwal A, Gupta Y. Protective effect of *Terminalia chebula* against seizures, seizure-induced cognitive impairment and oxidative stress in experimental models of seizures in rats. *J Ethnopharmacol.* 2018; 215: 124-31.
- Naik G, Priyadarsini K, Naik D, Gangabhirathi R, Mohan H. Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine.* 2004; 11(6): 530-8.
- Ahn M-J, Kim CY, Lee JS, Kim TG, Kim SH, Lee C-K, et al. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *euphorbia pekinensis*. *Planta Medica.* 2002; 68(05): 457-9.
- Badmaev V, Nowakowski M. Protection of epithelial cells against influenza a virus by a plant derived biological response modifier Ledretan-96. *Phytother Res.* 2000; 14(4): 245-9.
- Dutta B, Rahman I, Das T. Antifungal activity of Indian plant extracts: antimyzetische Aktivität indischer Pflanzenextrakte. *Mycoses.* 1998; 41(11-12): 535-6.

15. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81(3): 327-36.
16. Sabu M, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81(2): 155-60.
17. Afshari AR, Sadeghnia HR, Mollazadeh H. A review on potential mechanisms of *terminalia chebula* in Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol Sci.* 2016; 2016.
18. Sadeghnia HR, Jamshidi R, Afshari AR, Mollazadeh H, Forouzanfar F, Rakhshandeh H. *Terminalia chebula* attenuates quinolinate-induced oxidative PC12 and OLN-93 cell death. *Mult Scler Relat Disord.* 2017; 14: 60-7.
19. Jinukuti MG, Giri A. Anticancer activity of acetone and methanol extracts of *terminalia chebula*Retz and *withania somnifera* (Linn.) dunal on HeLa cell line. *Annals of Phytomedicine.* 2015; 4(2): 88-92.
20. Pettit GR, Hoard MS, Doubek DL, Schmidt JM, Pettit RK, Tackett LP, et al. Antineoplastic agents 338. the cancer cell growth inhibitory constituents of *terminalia arjuna* (combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 1996; 53(2): 57-63.
21. Wang L-M, Xie K-P, Huo H-N, Shang F, Zou W, Xie M-J. Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ER $\alpha$  in human breast cancer MCF-7 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(4): 1431-7.
22. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986; 94(1-2): 57-63.
23. Yuan R, Hou Y, Sun W, Yu J, Liu X, Niu Y, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1401(1): 19-27.
24. Sharifi AM, Mousavi SH, Larjani B. Study of interaction between nitric oxide and ACE activity in STZ-induced diabetic rats: role of insulin. *Pharmacol Res.* 2004; 50(3): 261-6.
25. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Afshari AR. Pomegranate seed oil: a comprehensive review on its therapeutic effects. *Int J Pharm Sci Res.* 2016; 7(2): 430.
26. Mollazadeh H, Boroushaki MT, Soukhtanloo M, Afshari AR, Vahedi MM. Effects of pomegranate seed oil on oxidant/antioxidant balance in heart and kidney homogenates and mitochondria of diabetic rats and high glucose-treated H9c2 cell line. *Avicenna J Phytomed.* 2017; 7(4): 317-33.
27. Mousavi SH, Moallem SA, Mehri S, Shahsavand S, Nassirli H, Malaekh-Nikouei B. Improvement of cytotoxic and apoptogenic properties of crocin in cancer cell lines by its nanoliposomal form. *Pharm Biol.* 2011; 49(10): 1039-45.
28. Smith-Warner SA, Elmer PJ, Tharp TM, Fosdick L, Randall B, Gross M, et al. Increasing vegetable and fruit intake: randomized intervention and monitoring in an at-risk population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(3): 307-17.
29. Tayarani-Najaran Z, Emami SA, Asili J, Mirzaei A, Mousavi SH. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of *Scutellaria litwinowii* root extract on cancer cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011.
30. Yadav R, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *J Phycol.* 2011; 3(12): 10-4.
31. Lee S-H, Ryu SY, Choi SU, Lee CO, No Z, Kim S-K, et al. Hydrolysable tannins and related compound having cytotoxic activity from the fruits of *Terminalia chebula*. *Archives of Pharmacal Research.* 1995; 18(2): 118-20.
32. Reddy DB, Reddy T, Jyotsna G, Sharan S, Priya N, Lakshmipathi V, et al. Chebulagic acid, a COX-LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. *J Ethnopharmacol.* 2009; 124(3): 506-12.
33. Kumar N, Gangappa D, Gupta G, Karnati R. Chebulagic acid from *Terminalia chebula* causes G1 arrest, inhibits NF $\kappa$ B and induces apoptosis in retinoblastoma cells. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14: 319. doi: 10.1186/1472-6882-14-319.
34. Nair V, Singh S, Gupta YK. Anti-arthritis and disease modifying activity of *Terminalia chebula* Retz. in experimental models. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(12): 1801-6.
35. Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharm Biol.* 2013; 51(12): 1515-20.
36. Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Embllica officinalis*. *BMC Complement Altern Med.* 2010; 10: 20. doi: 10.1186/1472-6882-10-20.

37. Chang CL, Lin CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012.
38. Sharma A, Kaur M, Katnoria J, Nagpal A. Polyphenols in food: cancer prevention and apoptosis induction. *Curr Med Chem.* 2017. doi: 10.2174/0929867324666171006144208.
39. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Hersey P. Apoptosis: from signalling pathways to therapeutic tools. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 2008; 11(3): 121-42.
40. Parsaee H, Asili J, Mousavi SH, Soofi H, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Apoptosis induction of *Salvia chorassanica* root extract on human cervical cancer cell line. *Iran J Pharm Res.* 2013; 12(1): 75-83.
41. Kim MJ, Kim DH, Lee KW, Yoon DY, Surh YJ. Jaceosidin induces apoptosis in ras-transformed human breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. *Ann NY Acad Sci.* 2007; 1095(1): 483-95.
42. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(8): 1909-13.
43. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Direct toxicity of rose bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(4): 855-9.