



## The effect of hydroalcoholic extract of cumin and ginger plants separately and combined on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines

Hoseini Pajoo Khosro<sup>1\*</sup>, Abdollah Mahdiah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

<sup>2</sup>M.Sc., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

| ABSTRACT INFO         | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Research Paper        | <p>This study investigates the toxicity effect of cumin and ginger extracts on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 and compare them with RHDP and Vero as normal cells. The extracts of two plants were added to the medium of these 4 cell lines and after 72 h, cell viability was measured by the MTT method. The cumulative effect of two extracts with a concentration of 100 µg/ml of cumin and different concentrations of ginger extract was investigated. AnnexinV-FITC/PI staining was carried out to determine the level of apoptosis. In MDA cells, the IC<sub>50</sub> of cumin and ginger were 107.4 µg/ml and 158.8 µg/ml, and in the MCF-7 cell line, the IC<sub>50</sub> of cumin and ginger were 197.4 µg/ml and 120.4 µg/ml, respectively. Ginger and cumin extracts in VERO and RHDP cells increased the survival rate of these cells, up to 200 µg/ml. The IC<sub>50</sub> in these cells was around 700 µg/ml or higher. The combined use of these two extracts decreased the IC<sub>50</sub> concentration of both plants. In AnnexinV-FITC/PI staining, a total of about 28 % of the cells under the influence of two extracts became apoptotic after 36 h (vs 10.5 % in control). Therefore, cumin and ginger extracts in harmless titers for normal cells can inhibit the proliferation of cancerous cells.</p> <p><b>Key words:</b> Anti-Cancer, Breast Cancer, Cumin, Ginger.</p> |
| Received: 25 Oct 2022 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Accepted: 08 Jan 2024 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

### How to cite this article:

Hoseini Pajoo Kh, Abdollah M. 2024. The effect of hydroalcoholic extract of cumin and ginger plants separately and combined on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 1 (1): 37-48. (In Farsi)

DOI: 10.30479/ARMP.2024.17911.1005

©The Author(s).  
Publisher: Imam Khomeini International University  
ARMP is an open access journal under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)



## بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاهان زیره سبز و زنجبیل به صورت مجزا و توأمان بر رده‌های سلولی سرطان

### پستان MDA-MB-231 و MCF-7

خسرو حسینی پژوه<sup>۱</sup>، مهدیه عبدالله<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

<sup>۲</sup>کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک سلولی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

| اطلاعات مقاله                                     | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳<br>پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸           | هدف از این مطالعه، بررسی اثر سمیت عصاره زیره سبز و زنجبیل بر رده‌های سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 و MCF-7 و مقایسه با سلول‌های RHPD و Vero به عنوان سلول‌های طبیعی است. عصاره‌های دو گیاه به محیط این رده سلول اضافه، و پس از ۷۲ ساعت، زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT ارزیابی شد. اثر تجمعی دو عصاره با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیره سبز و غلظت‌های مختلف زنجبیل بررسی گردید. برای تعیین میزان آپوپتوز رنگ‌آمیزی AnnexinV-FITC/PI انجام شد. در سلول‌های MDA، $IC_{50}$ برای عصاره زیره ۱۰۷/۴ $\mu\text{g/ml}$ و عصاره زنجبیل ۱۵۸/۸ $\mu\text{g/ml}$ و در رده سلولی MCF-7، $IC_{50}$ برای عصاره زیره ۱۹۷/۴ $\mu\text{g/ml}$ و زنجبیل ۱۲۰/۴ $\mu\text{g/ml}$ بود. عصاره زنجبیل و زیره در سلول‌های غیر سرطانی VERO و RHPD تا ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ باعث افزایش میزان زنده‌مانی این سلول‌ها شد. در سلول‌های VERO و RHPD، $IC_{50}$ حدود ۷۰۰ $\mu\text{g/ml}$ یا بالاتر بود. استفاده توأمان این دو عصاره موجب کاهش غلظت ایجاد کننده $IC_{50}$ از هر دو گیاه شد. رنگ‌آمیزی با AnnexinV-FITC/PI نشان داد که عصاره دو گیاه موجب القای آپوپتوز در ۲۸ درصد سلول‌ها بعد از ۳۶ ساعت شد (در مقابل ۱۰/۵ درصد در کنترل). بنابراین زیره و زنجبیل بر رده سلول‌های سرطانی در مقادیری بی‌ضرر برای سلول‌های طبیعی می‌تواند باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شود. |
| کلمات کلیدی: زنجبیل، زیره، سرطان پستان، ضد سرطان. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

استناد به این مقاله

Hoseini Pajoo Kh, Abdollah M. 2024. The effect of hydroalcoholic extract of cumin and ginger plants separately and combined on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 1 (1): 37-48. (In Farsi)

DOI: 10.30479/ARMP.2024.17911.1005



حق مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

## مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان در زنان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان است که حدود سی درصد سرطان‌ها در بین زنان را شامل می‌شود (Bray et al., 2015). این سرطان، دومین سرطان شایع و پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان‌ها در دنیا است. حدود ۲٫۱ میلیون زن در هر سال به سرطان پستان مبتلا می‌شوند. در سال ۲۰۱۸ تخمین زده شده است که ۶۲۷ هزار زن به علت ابتلا به این سرطان فوت می‌کنند که این تعداد تقریباً حدود ۱۵ درصد از همه مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان است (Bener et al., 2017). طبق تخمین رصدخانه جهانی سرطان، شیوع سرطان پستان از دو میلیون بیمار در سال ۲۰۱۸ به بیش از سه میلیون بیمار در سال ۲۰۴۶ افزایش می‌یابد (Siegel et al., 2019; WHO, 2020).

آمار جهانی حاکی از افزایش میزان بروز سرطان پستان و افزایش سریع‌تر آن در کشورهای درحال توسعه است که تاکنون از میزان پایین سرطان پستان برخوردار بوده‌اند (Curado et al., 2007). بیش از ۵۵ درصد از سرطان‌های پستان منجر به مرگ، در کشورهای با درآمد پایین و متوسط رخ می‌دهد (Porter, 2009; Editorial, 2008). مهم‌ترین عامل افزایش سرطان پستان در این کشورها تغییر در سبک زندگی، استعمال دخانیات، الکل و چاقی است (Jafari et al., 2018). از سوی دیگر، عواملی نظیر تأخیر در فرزندآوری و کاهش تغذیه با شیر مادر در این مناطق، زمینه را برای بروز سرطان پستان افزایش داده است (Pilevarzadeh et al., 2019). هم‌چنین در ایران مانند بسیاری از کشورهای درحال توسعه و پیشرفته از نظر سرطان‌های زنان، سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان بوده، و دارای رتبه اول در کشور است. در ایران، سن بروز سرطان پستان حداقل یک دهه کمتر از کشورهای توسعه‌یافته است. بر اساس آمارهای ایران در سال ۲۰۱۶ از هر ۱۰ تا ۱۵ زن ایرانی یک نفر احتمال دارد به سرطان پستان مبتلا شود (Derakhshanfar et al., 2013; Jafari et al., 2018). مجموع مبتلایان به سرطان پستان در ایران ۴۰ هزار نفر است و سالیانه بیش از هفت هزار بیمار نیز به این تعداد افزوده می‌شود (EnayatRad et al., 2015).

گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در کنار هم با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته هستند؛ بنابراین به ویژه در موارد مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن، بسیار مناسبند. بسیاری از گیاهان دارویی و ادویه‌ها حاوی عواملی برای جلوگیری از

سرطان هستند که می‌توانند اثر خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند. گرچه در طب سنتی ایران، سبب‌شناسی و درمان سرطان با علم پزشکی جدید متفاوت است، درمان دارویی یکی از پایه‌های اصلی درمان سرطان به شمار می‌رود. معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به ویژه گیاهان دارویی، سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی برای دستیابی به داروهای نوین در درمان سرطان است. بسیاری از گیاهان استفاده‌شده در طب سنتی، دارای مواد آنتی‌اکسیدان، و یا در آزمایشگاه و مطالعات حیوانی دارای تأثیرات ضد سرطانی بر رده‌های سلولی هستند (Motavalizadeh Ardekani et al., 2012). هدف اصلی در پیشگیری از سرطان توسط مواد طبیعی یا شیمیایی، کند کردن و یا مهار فرایند سرطانی است. این نگرش به طور هدفمند بر مسیرهای داخل سلولی غیرطبیعی، که موجب عملکرد غیرطبیعی سلولی شده‌اند، متمرکز است (Forouzandeh et al., 2014).

زنجبیل از پارسی میانه سنگیل، گیاهی گلدار از خانواده زنجبیلیان است و زمین‌ساقه (ریزوم) آن به عنوان ادویه در آشپزی و به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه، بومی جنوب شرق آسیا است و برگ‌هایی سرنیزه‌ای به رنگ سبز براق و ساقه‌های باریک و نی‌مانند دارد. گل‌های آن سبز مایل به زرد با لبه‌ای ارغوانی و لکه‌های کرم‌رنگ و گل‌آذین مخروطی و کوچک و سنبله‌ای متراکم است که در تابستان از زمین ساقه بیرون می‌زند.

زنجبیل (Zingiberaceae, *Zingiber officinale* Roscoe.) یکی از ادویه‌های شناخته‌شده در دنیا است. خواص منحصر به فرد زنجبیل از روغن‌های طبیعی آن ناشی می‌شود که مهم‌ترین آنها جینجرول است. تاکنون بیش از ۵۰ نوع ترکیب آنتی‌اکسیدان از ریزوم آن جدا شده است. آنتی‌اکسیدان‌های جداشده به دو گروه تقسیم می‌شود: ترکیبات مرتبط با جینجرول و دی آریل هپتانوئیدها. عمده‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدان زنجبیل، gingerol است که مزه تند زنجبیل ناشی از آن است (Masuda et al., 2004).

جینجرول بر سیستم گزاتین اکسیداز، که مسئول تولید انواع اکسیژن فعال مانند اکسیژن‌های سوپراکسید است، اثر مهاری دارد (Kamkar et al., 2010). جینجرول‌ها ترکیبات فنلی زنجبیل هستند. جینجرول‌ها فراوان‌ترین ترکیبات تند در ریشه‌های تازه هستند و چندین جینجرول با طول‌های زنجیره مختلف (n6 تا n10) در زنجبیل وجود دارد که فراوان‌ترین آنها

از اکسیداسیون لینولئیک اسید، که کارسینوژن هستند، می‌شوند؛ در نتیجه در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مطرح شده است (Madanipour and Sharifi, 2019).

هدف این مطالعه بررسی اثر سمیت عصاره‌های هیدروالکلی زیره سبز و زنجبیل به طور مجزا و توأمان بر رده سلولی سرطان پستان MDA-MB و MCF-231 است.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی

برای تهیه عصاره هیدروالکلی زیره و زنجبیل از روش پراشت (پرکولاسین) استفاده شد. به این منظور ۱۲۰ گرم از پودر این دو گیاه داخل قیف جداکننده یا دکانتور ریخته شد؛ سپس ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به آن اضافه، و ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن، مواد جامد پرس، و قسمت محلول به وسیله فیلتراسیون جدا شد. بعد از عصاره‌گیری، جداسازی حلال اتانول از عصاره توسط دستگاه روتاری به روش تقطیر در خلاء انجام شد.

### کشت سلولی

رده‌های سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 و MCF-7 و هم‌چنین رده‌های سلولی پالپ دندان RHDP و کلیه میمون Vero به عنوان سلول‌های طبیعی از موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

پس از جداسازی سلول‌ها با کمک تریپسین با رنگ‌آمیزی با تریپان بلو تعداد سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده تعیین شد. سپس ۱۰۰۰۰ سلول زنده در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه و در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و قرار گرفتن سلول‌ها در فاز لگاریتمی عصاره‌های مورد نظر به طور جداگانه به هر چاهک به غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر اضافه شد. برای هر تیمار ۴ چاهک (تکرار) در نظر گرفته شد و برای ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT که قبلاً به دمای محیط رسیده بود به هر چاهک اضافه شد. پلیت مورد نظر، ۴ ساعت

gingerol-۶ است. این ترکیبات، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارد (Kamkar et al., 2010). این ماده ترکیب زیست فعال اصلی زنجبیل است که خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قدرتمندی دارد و به کاهش استرس اکسیداتیو، که نتیجه حضور و فعالیت بیش از حد رادیکال‌های آزاد در بدن است، کمک می‌کند. خواص دارویی متعددی برای زنجبیل ذکر شده است؛ از جمله مطالعات اخیر نشان می‌دهد که زنجبیل، خواص ضد توموری دارد. با توجه به اینکه عصاره هیدروالکلی زنجبیل دارای اثر سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی است، اثر سمی در سلول‌های نرمال نداشته است و از عصاره هیدروالکلی آن می‌توان به عنوان یک ماده در درمان سرطان استفاده کرد (Tavakol Afshari et al., 2010).

زیره سبز (*Cuminum Cuminum*)، خواص مختلف دارویی از جمله ضد میکروبی، ضد دیابتی، حشره کشی و همچنین مهار رشد سلولی دارد (Fitzpatrick and Woldemariam, 2017; Iacobellis et al., 2005; Gachkar et al., 2007; Willatgamuwa et al., 1998; Purohit et al., 1983). بنابراین اسانس گیاه زیره سبز می‌تواند جایگاه ویژه‌ای در کاهش علائم بدخیمی‌های سرطانی داشته باشد (Nostro et al., 2013). هنگامی که ویژگی‌های سیتوتوکسیک و ضد سرطانی عصاره زیره سبز بررسی شد، مشخص شد که این عصاره هیچ اثر مهاری بر سلول‌های ماکروفاژ J774 نشان نمی‌دهد؛ در حالی که نیمی از سلول‌های MCF-7 را در غلظت‌های مورد بررسی از بین می‌برد. جالب توجه است که عصاره زیره هیچ اثر بازدارنده‌ای علیه سلول‌های آدنوکارسینوم متاستاتیک AU565 ایجاد نمی‌کند (Dinparvar et al., 2020).

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که فراوان بودن ترکیبات فنولی دلیل عمده زیاد بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها از جمله عصاره‌های متانولی و اتانولی است. بر اساس شواهد، ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که ترکیبات فنولی، که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی زیادی دارند، بیشتر از طریق عصاره‌های گیاهی در مقایسه با اسانس آنها قابل استخراج باشد. ترکیبات فنولی به صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌کنند؛ بنابراین یک عامل آنتی‌اکسیدان مؤثر هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها اکسیداسیون ترکیبات لیپیدی غشاهای سلولی را به حداقل می‌رسانند و یا مانع تشکیل ترکیبات فرار آلی و هیدروپراکسیدهای کونژوگه ناشی

رنگ حیاتی پروپیدیوم یودید ( $\text{Propidium Iodide} = \text{PI}$ ) به داخل سلول ندادند؛ اما غشای سلول‌های آسیب دیده و مرده نسبت به این رنگ نفوذپذیر است.  $\text{PI}$  یک رنگ قرمز فلورسانس است که توانایی اتصال به نوکلئیک اسید را دارد به طوری که سلول‌های زنده از نظر رنگ‌آمیزی با  $\text{AnnexinV-FITC}$  و  $\text{PI}$  منفی بود و در مرحله اولیه آپپتوز  $\text{AnnexinV-FITC}$  مثبت و  $\text{PI}$  منفی و سلول‌های نکروزه و مراحل آخر آپپتوز  $\text{AnnexinV-FITC}$  مثبت و  $\text{PI}$  مثبت است. در صورتی که سلول  $\text{AnnexinV-FITC}$  منفی و  $\text{PI}$  مثبت باشد، سلول‌ها طی مراحل کاری و آماده‌سازی دچار مرگ شده‌اند. برای انجام این تست از کیت  $\text{Annexin V-PE/PI}$  شرکت Merck استفاده شد و در نهایت به وسیله دستگاه فلوسایتمتری نوع  $\text{Facsclibur}$  آنالیز انجام گردید.

### نتایج

#### کشت رده‌های سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 سرطان پستان

پس از ۷۲ ساعت کشت سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 در محیط حاوی هر یک از دو عصاره گیاهی در غلظت‌های نهایی ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نتایج آزمون MTT نشان داد که اثر سمیت عصاره هیدروالکلی زیره و زنجبیل بر رده سلول‌های سرطانی در غلظت‌های مختلف باعث مهار تکثیر این سلول‌ها می‌شود و با افزایش غلظت عصاره، توان زیستی سلول‌ها کاهش می‌یابد. برای رده سلولی MDA،  $\text{IC}_{50}$  عصاره زیره در غلظت ۱۰۷/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره زنجبیل در غلظت ۱۵۸/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و هم‌چنین در رده سلولی MCF-7،  $\text{IC}_{50}$  برای عصاره زیره سبز در غلظت ۱۹۷/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره زنجبیل در غلظت ۱۲۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

#### تأثیر عصاره زنجبیل و زیره سبز بر رده سلولی نرمال VERO

##### RHDP و

اضافه کردن عصاره زنجبیل و زیره سبز به سلول‌های غیر سرطانی VERO در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، باعث افزایش میزان زنده‌مانی این سلول‌ها شد؛ اما در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کاهش زنده‌مانی سلول‌ها را شاهد بودیم و مطابق شکل ۳ در سلول‌های VERO،  $\text{IC}_{50}$  در غلظت حدود ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره زنجبیل و غلظت حدود ۹۰۰ میکروگرم بر

در انکوباتور و به دور از نور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت تا کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان تشکیل شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون و خارج کردن MTT به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO اضافه شد و ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا کریستال‌ها کاملاً حل شود. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۶۹۰ نانومتر توسط الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. از میزان جذب ۴ چاهک مربوط به هر تیمار، میانگین گرفته، و با کنترل مقایسه شد. این آزمایش برای هر رده سلولی دو بار تکرار شد.

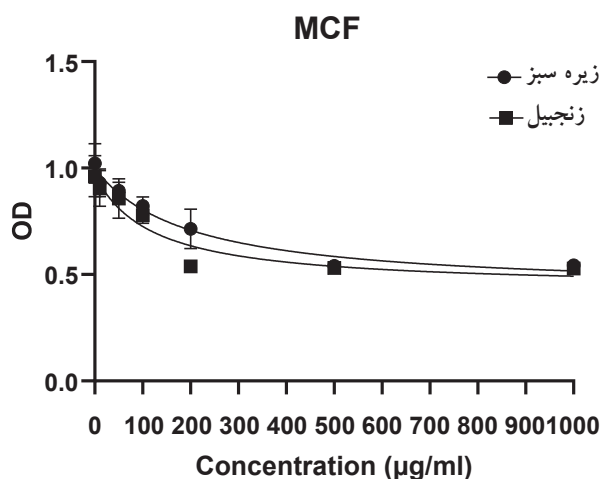
برای ارزیابی اثر حضور توأمان دو عصاره با توجه به نتایج به دست آمده از تأثیر عصاره‌ها به صورت جداگانه، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زیره سبز و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنجبیل استفاده شد. نتایج بررسی MTT در مورد سلول‌های سرطانی با استفاده از نرم‌افزار  $\text{Inhibitor vs. Response}$  (three parameters) و با روش  $\text{IC}_{50}$  برازش شد تا میان غلظت مهارکنندگی (بدست آید).

#### تست $\text{AnnexinV-FITC/PI}$ برای بررسی میزان آپپتوز سلولی

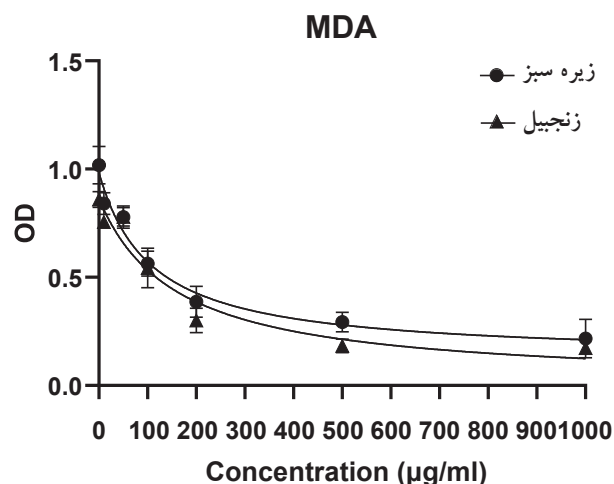
برای مشخص کردن این موضوع که اثر کاهش زنده‌مانی این دو عصاره بر سلول‌های مورد بررسی ناشی از آپپتوز است یا ناشی از نکروز سلولی این رنگ‌آمیزی انجام شد. برای این منظور سلول‌های MDA-MB-231 پس از ۳۶ ساعت قرار گرفتن در محیط کشت حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه زیره سبز و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه زنجبیل و هم‌چنین سلول‌های گروه کنترل (بدون افزودن عصاره) با  $\text{AnnexinV-FITC/PI}$  رنگ‌آمیزی، و با دستگاه فلوسایتمتر خوانده شد. از دست دادن یکپارچگی غشای سلولی و بیرون آمدن فسفاتیدیل سرین از غشای داخلی به لایه خارجی غشای سلول، یکی از مشخصه‌های آپپتوز است. از آنکسین V کونژوگه شده با ماده فلوروسنت  $\text{Fluorescein isothiocyanate (FITC)}$  معمولاً برای تشخیص سلول‌های آپپتوتیک به وسیله توانایی اتصال آن به فسفاتیدیل سرین بر لایه خارجی غشای پلازما استفاده می‌شود. فسفاتیدیل سرین در مراحل اولیه آپپتوز به بیرون غشا منتقل می‌گردد و مقایسه با قطعه قطعه شدن DNA شاخص آپپتوز اولیه است؛ البته در مراحل پایانی آپپتوز و حتی در فرایند نکروز نیز به دلیل در دسترس بودن فسفاتیدیل سرین ممکن است این تست مثبت شود؛ پس این رنگ‌آمیزی به صورت دوگانه انجام می‌شود. سلول‌های زنده اجازه ورود

میلی لیتر از عصاره زیره سبز مشاهده شد. اما در مورد سلول‌های رده RHDP حتی تا غلظت ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر

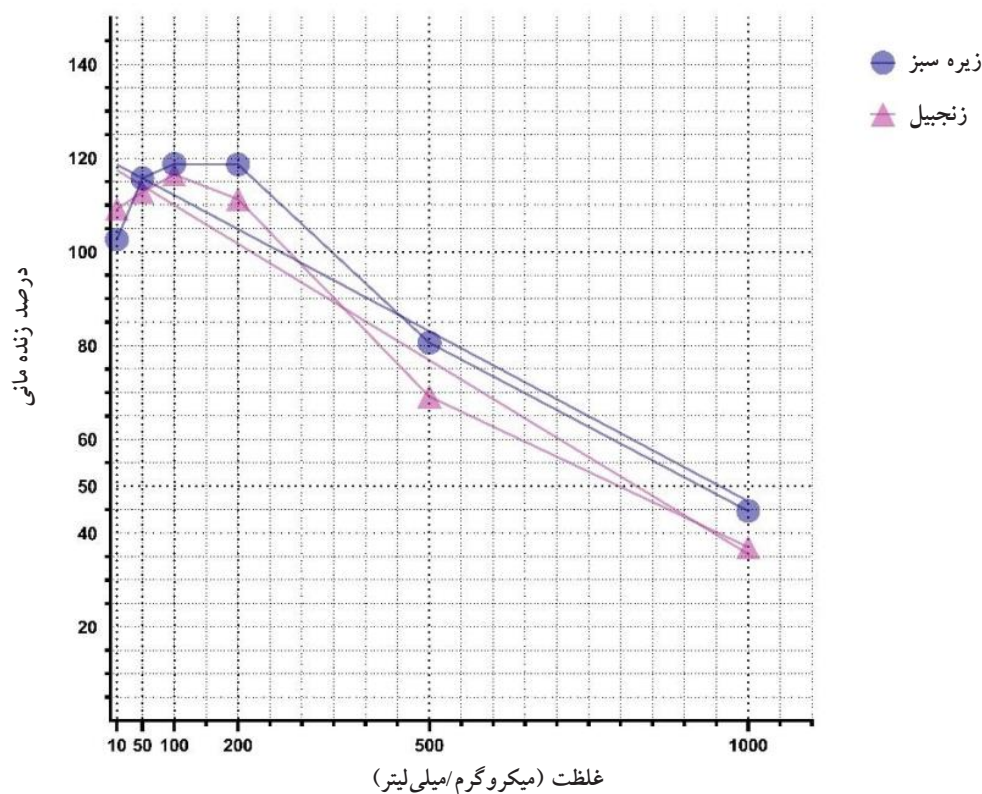
از این دو عصاره، غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد (نیمه حداکثری) ( $IC_{50}$ ) مشاهده نشد (شکل ۴).



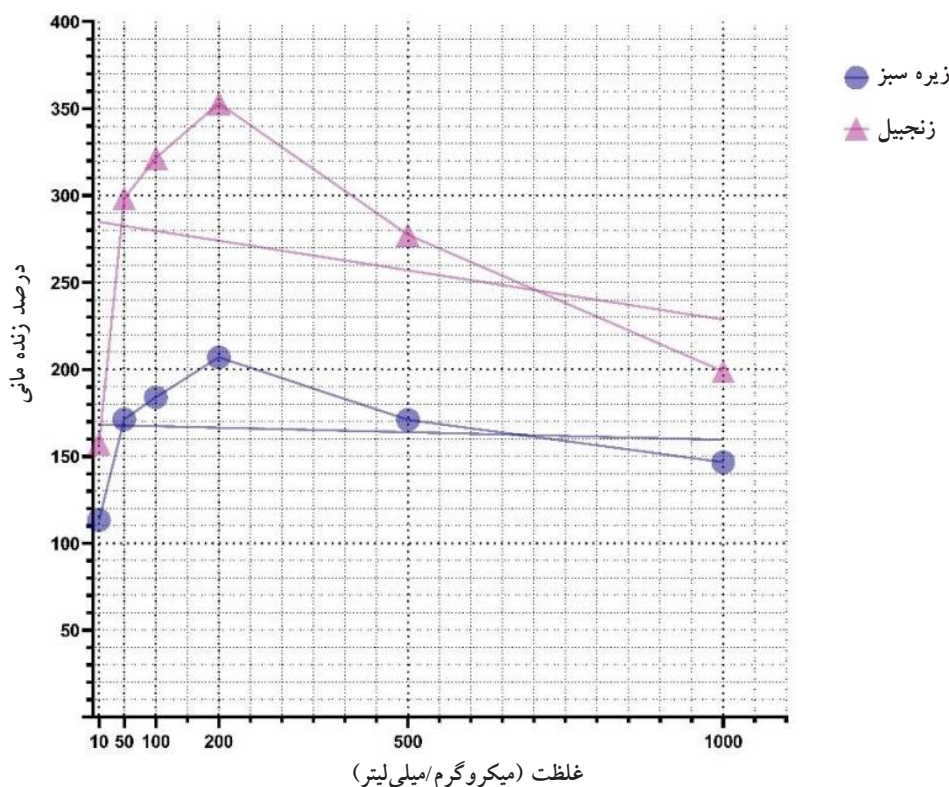
شکل ۲- میانه غلظت مهارکنندگی ( $IC_{50}$ ) عصاره زیره سبز و زنجبیل پس از ۷۲ ساعت در رده سلولی MCF-7 (به ترتیب ۱۹۷/۴ و ۱۲۰/۴ میکروگرم بر میلی لیتر)



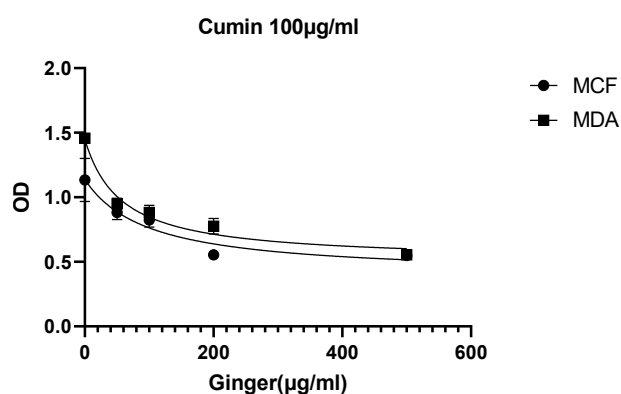
شکل ۱- میانه غلظت مهارکنندگی ( $IC_{50}$ ) عصاره زیره سبز و زنجبیل پس از ۷۲ ساعت در رده سلولی MDA-MB-231 (به ترتیب ۱۰۷/۴ و ۱۵۸/۸ میکروگرم بر میلی لیتر)



شکل ۳- تأثیر عصاره زیره سبز و زنجبیل بر رده سلولی نرمال VERO در دوزهای مختلف پس از ۷۲ ساعت (عصاره هر دو گیاه تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث افزایش زنده مانی سلول‌ها شد).



شکل ۴- تأثیر عصاره زیره سبز و زنجبیل بر روی رده سلولی نرمال RHDP در دوزهای مختلف پس از ۷۲ ساعت (عصاره هر دو گیاه تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش زنده‌مانی سلول‌ها شد).



شکل ۵- میانه غلظت مهارکنندگی ( $IC_{50}$ ) غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زیره سبز و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنجبیل به مدت ۷۲ ساعت در سلولی رده‌های MDA-MB-231 و MCF-7

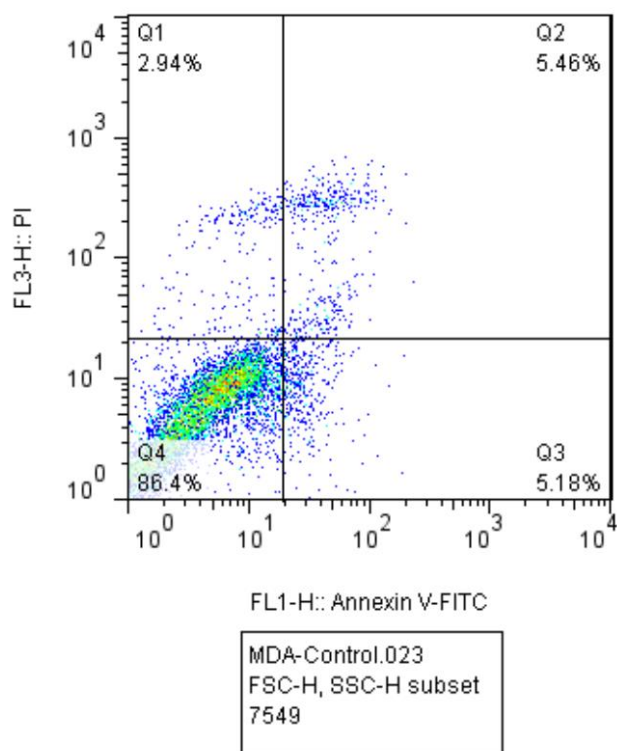
۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه زنجبیل و همچنین سلول‌های گروه کنترل (بدون افزودن عصاره) در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند، فقط رنگ Annexin را جذب می‌کنند

#### بررسی اثر عصاره زنجبیل و زیره سبز به صورت همزمان

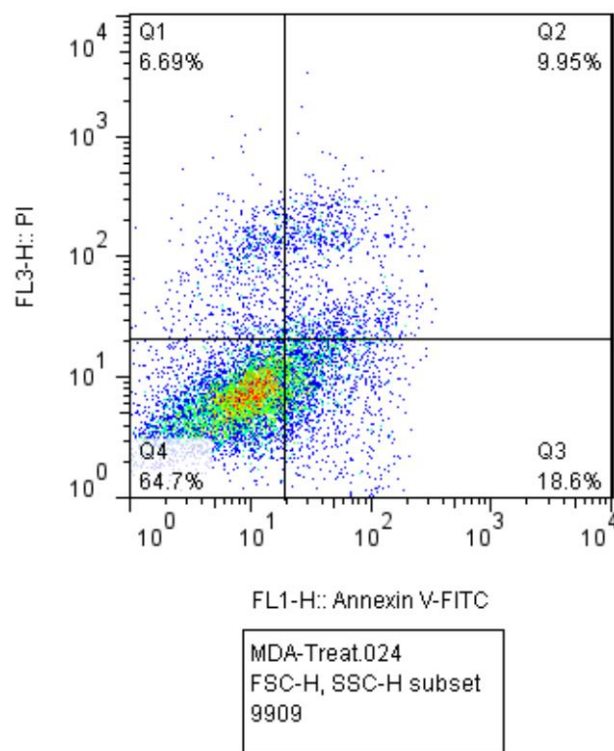
نتایج اثر مهارکنندگی زیره سبز و زنجبیل به طور جداگانه بر سلول‌های مورد بررسی نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا، باعث مهار معنی‌دار تکثیر سلولی می‌شود؛ به همین دلیل از غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زیره سبز و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنجبیل به مدت ۷۲ ساعت برای مشخص شدن اثر توأمان گیاه زیره و زنجبیل بر میزان مرگ سلولی رده‌های MDA-MB-231 و MCF-7 سرطان پستان استفاده شد که نتیجه در شکل ۵ نشان داده شده است. در استفاده توأمان این دو عصاره میزان  $IC_{50}$  زنجبیل در محیط حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زیره در سلول‌های MDA به ۵۶٫۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و در سلول‌های MCF به ۹۸٫۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش یافت.

#### نتایج فلوسایتومتری اثر عصاره زیره سبز و زنجبیل

نتایج بررسی فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 پس از ۳۶ ساعت قرار گرفتن در محیط کشت حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه زیره سبز و



شکل ۷- داده‌های فلوسایتومتری در رده سلولی MDA بدون تیمار (کنترل)



شکل ۶- داده‌های فلوسایتومتری نشان‌دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با عصاره زیره و زنجبیل. جمعیت سلول‌ها برای چهار حالت ممکن (یک چهارم‌ها یا Quadrant؛ Q4: جمعیت سلول‌های زنده (سلول‌هایی که برای Annexin V و PI منفی هستند)، Q3: جمعیت سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده‌اند (PI منفی و Annexin V مثبت)، Q2: سلول‌های درگیر در آپوپتوز تأخیری (مثبت برای هر دو رنگ) و Q1: سلول‌های نکروتیک که به صورت مکانیکی تخریب شده‌اند (فقط از نظر PI مثبت).

در حال گسترش است. با توجه به تنوع بسیار زیاد گیاهانی که ساختارهای متفاوت ترکیبات زیست فعال را سنتز می‌کنند، گیاهان به طور بالقوه منبع بسیار متنوعی از ترکیبات شیمیایی با فعالیت سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی هستند. علی‌رغم استفاده موفق از تعداد کمی مواد شیمیایی گیاهی مانند وین کریستین و تاکسول در شیمی درمانی سرطان، فرمولاسیون‌های ضد سرطان مشتق شده از گیاه فقط یک چهارم کل مجموعه درمان‌ها را شامل می‌شود. اگرچه پیشرفت قابل توجهی در خصوصیات ترکیبات جداشده و فعالیت‌های مرتبط با ساختار آنها حاصل شده است، ترکیب پیچیده عصاره گیاهان همراه با عدم تکرارپذیری فعالیت آنها و هم‌افزایی بین اجزای متفاوت و حتی ناشناس در عصاره، مانع از استفاده کامل از این گیاهان می‌شود.

در مجموع بیش از ۱۸۷ گونه گیاهی به عنوان منبعی فعال یا امیدوارکننده از ترکیبات با خواص ضد توموری شناسایی شده است. در میان آنها، حداقل ۱۵ گونه در شیمی درمانی سرطان در سطح بالینی مورد استفاده قرار گرفته، و بقیه گونه‌های شناسایی شده در مراحل مختلف ارزیابی هستند. چشم‌انداز درمان

و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده و دیواره سلولی آنها اندکی نفوذپذیر شده باشد با دو رنگ Annexin و PI رنگ‌آمیزی شده و سلول‌هایی که دچار نکروز شده‌اند فقط رنگ PI را به خود می‌گیرند که هر کدام در پلات فلوسایتومتری جداگانه (Q1 تا Q4) قرار گرفته‌اند. همانطور که ملاحظه می‌شود در گروه تیمار ۱۸/۶ درصد سلول‌ها در فاز آپوپتوز اولیه و ۹/۹۵ درصد در فاز آپوپتوز تأخیری هستند (مجموعاً حدود ۲۸ درصد)؛ در حالیکه در گروه کنترل این مقادیر به ترتیب ۵/۱۸ و ۵/۴۶ درصد (مجموعاً حدود ۱۰/۵ درصد) است که نشان‌دهنده اثر ایجادکنندگی آپوپتوز عصاره‌ها است.

#### بحث

سرطان از عوامل اصلی مرگ و میر است. تعداد موارد جدید و همچنین تعداد افراد مبتلا به سرطان به طور پیوسته

سرطان مبتنی بر فیتوشیمی، مورد توجه جدی قرار گرفته است؛ به ویژه در منظر شناسایی عوامل ضد سرطانی تعدیل‌کننده ایمنی با حداقل سمیت بر بافت‌های سالم (Spiridon and Kintzios, 2006).

هدف اصلی در درمان سرطان‌های مختلف این است که سلول‌های سرطانی از بین برود؛ اما کمترین میزان آسیب به سلول‌های سالم بدن زده شود. در سال‌های اخیر، علاقه قابل توجهی به شناسایی داروهای پیشگیری‌کننده شیمیایی طبیعی ایجاد شده است؛ از جمله موادی که می‌تواند مراحل سرطان‌زایی را مهار یا معکوس کند. طیف گسترده‌ای از مواد فنلی به ویژه آنهایی که در گیاهان دارویی و غذایی وجود دارند دارای خاصیت ضدسرطانی قابل توجهی هستند. بیشتر این مواد فنلی طبیعی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی هستند (Lusânia, 2010).

یکی از مشکلات در شیوه‌های مختلف درمان سرطان (به ویژه در اشعه درمانی و شیمی درمانی)، مقاوم شدن سلول‌های سرطانی به درمان است؛ به ویژه در سرطان پستان این موضوع بیشتر مشاهده شده است و در طول زمان باعث ایجاد متاستاز در بدن فرد می‌شود. بیماران مبتلا به سرطان پستان به علت ویژگی هتروژن بودن متاستاز در این سرطان در طول زندگی خود در معرض خطر ایجاد متاستاز در بدن قرار می‌گیرند. سلول‌های سرطانی پستان باعث ایجاد متاستاز در اندام‌های متعددی از جمله ریه، کبد و استخوان می‌شوند (Dumont and Arteaga, 2003). ترکیبات طبیعی و فیتوشیمیایی با توجه به فوایدی مانند ایمن‌تر بودن و مقاومت و تداخل دارویی کمتر، جایگاه ویژه‌ای در درمان پیدا کرده‌اند. تلاش‌های بسیاری در راستای توسعه اثربخشی داروهای ضد سرطانی گیاهی در حال انجام است. چیزی حدود ۶۰ درصد داروهای ضد سرطان از منابع طبیعی استخراج شده‌اند (Remesh, 2017). داروهای گیاهی ضد سرطان از طریق مهار تکثیر سلولی، القای آپوپتوز و تنظیم مسیرهای پیام‌دهی سلولی و همچنین تعدیل مکانیسم استرس اکسیداتیو، اثر خود را بروز می‌دهد. استرس اکسیداتیو عامل آسیب‌رسان در سرطان است. استرس اکسیداتیو حالتی است که در نتیجه عدم تعادل نسبت اکسیدان‌ها (رادیکال‌های آزاد) و آنتی‌اکسیدان‌ها به وجود می‌آید که طی آن میزان رادیکال‌های آزاد افزایش، و توان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن کاهش می‌یابد و فرایندهای سلولی مانند متابولیسم سلولی، مسیرهای تنظیم بیان ژن، تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده تحت تأثیر استرس

اکسیداتیو قرار می‌گیرد. افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک، و در نهایت باعث آسیب بافتی می‌شود (Sosa et al., 2013). از این رو آنتی‌اکسیدان‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در درمان سرطان نقش مهمی دارند. در همین راستا آنتی‌اکسیدان‌ها با منشأ طبیعی گزینه مناسب‌تری هستند (Chang et al., 1994).

بررسی‌ها نشان داده است که اسانس زنجبیل می‌تواند از تکثیر سلول‌های MCF-7 سرطان پستان جلوگیری کند و مکانیسم زمینه‌ای ممکن است با فسفوریلاسیون اکسیداتیو مرتبط باشد. این نتایج ممکن است به توسعه استراتژی‌های درمانی آینده برای سرطان پستان ناشی از قرار گرفتن در معرض استروژن محیطی کمک کند (Lei et al., 2021). مطالعات بیانگر این است که تنوع در پروفایل‌های متفاوت انگشت‌نگاری ژنتیکی زنجبیل ناشی از تفاوت در ترکیب شیمیایی آنها می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر کارایی و زیست فعالی عصاره زنجبیل داشته باشد و این روش می‌تواند کاندیدهای قوی ضد سرطان زنجبیل را بدون نیاز به جداسازی اجزای جداگانه از عصاره‌ها شناسایی کند (Zhao et al., 2020).

پتانسیل پیشگیری از سرطان در دانه زیره سبز را می‌توان به توانایی آن در تغییر متابولیسم مواد سرطان‌زا نسبت داد. آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند لیمونن در زیره خواص ضد تومور دارند. در تحقیقات اخیر نیز منتشر شده است که زیره ممکن است از رشد سلول‌های سرطانی پستان و روده بزرگ جلوگیری کند (Prakash and Kumar, 2014).

غالباً ارزیابی اولیه ترکیبات ضد سرطانی بر سلول‌های سرطانی در بررسی برون‌تنی، که در آن غلظت و طول مدت اثر داروها می‌تواند کنترل شده باشد، انجام می‌گیرد به طوری که مهار رشد سلول‌های سرطانی را می‌توان به آسانی اندازه‌گیری کرد. استفاده از ترکیب همزمان داروهای مختلف نیز می‌تواند به معرفی ترکیب جدیدی در مهار رشد سلول‌های سرطانی منجر شود.

در مطالعات حویزی و همکاران (Hoveizi and Mohammadi, 2018) و توکل افشاری و همکاران (Tavakol Afshari et al., 2010) عصاره هیدروالکلی زنجبیل از یک سو توانست بر سلول‌های سرطانی ریه و کبد اثر سمی داشته باشد و باعث القای مرگ در آنها شود که با افزایش دوز و زمان، اثر کشندگی آن افزایش یافت. از سوی دیگر زنجبیل بر سلول‌های

(and Talib, 2022).

بررسی تأثیر توأمان گیاه زیره سبز و زنجبیل بر رده سلولی MCF-7 پس از ۷۲ ساعت نشان داد که اثر مهارکنندگی ترکیب هر دو گیاه بر رشد سلول‌های سرطانی به طور معنی‌داری افزایش یافته است و غلظت ایجاد  $IC_{50}$  برای زنجبیل در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زیره در کشت سلول MDA از ۱۵۸ به ۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مورد سلول‌های MCF از ۱۲ به ۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت که نشانگر اثر تجمعی این دو عصاره است.

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که استفاده از دوزهای مناسب زنجبیل به واسطه ترکیبات آنتی اکسیدانی فراوانی که دارد روی سلول‌های سرطانی که از نظر اکسیدانی در وضعیت غیر طبیعی هستند اثر سمی قابل توجهی دارد که در سلول‌های سالم این اثر کمتر است و این یک مزیت برای استفاده زنجبیل به عنوان داروی ضد سرطان است که با مطالعات بیشتر این امکان وجود دارد که از زنجبیل برای از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی استفاده شود.

بررسی‌ها نشان می‌دهد زیره سبز از گیاهانی است که خواص دارویی مختلف از جمله ضد میکروبی، ضد دیابتی، حشره کشی و مهار رشد سلولی دارد. بر اساس مطالعات فیاض‌فر و همکاران، تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی کولن و کاهش جمعیت در مجاورت با اسانس مشهود است. بقای کلیه سلول‌ها نسبت به کنترل بیرونی (سلول‌های سرطانی کولن و سلول‌های فیروبلاست، انتخاب شده به عنوان شاهد بیرونی) به شدت کاهش یافته است. جمعیت سلول‌های سرطانی با افزایش حجم فاز محلول کاهش یافته است؛ اما همین فاز با افزایش حجم اثر تحریک رشد روی سلول‌های فیروبلاست را نشان داد (Fayaz far et al., 2013).

مشاهدات این مطالعه با نتایج مطالعات مختلف دیگر در این زمینه مطابقت داشته است. با توجه به این خواص دارویی در این مطالعه، اثر سیتوتوکسیکی غلظت‌های مختلف عصاره‌های زیره سبز و زنجبیل مورد ارزیابی قرار گرفت و اینطور نتیجه گرفته شد که با غلظت‌های مناسب می‌تواند دارای خاصیت ضد سرطانی باشد که با افزایش غلظت این اثر افزایش می‌یابد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که استفاده از دزهای مناسب عصاره زنجبیل و زیره سبز به واسطه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

جنبینی سالم نیز اثر سمی داشت ولی در مقایسه با سلول‌های سرطانی این اثر کمتر بود به طوری که حتی با دوز ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۷۲ ساعت بعد از تیمار هم نتوانست نیمی از سلول‌ها را از بین ببرد؛ در حالی که  $IC_{50}$  آن برای سلول‌های سرطانی در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار ۱۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. یک دلیل احتمالی تفاوت نتایج این مطالعه با مطالعه محقی و همکاران (Moheghi et al., 2011) می‌تواند به علت دوزهای متفاوت مورد استفاده در دو مطالعه ناشی از تفاوت روش استخراج باشد. همچنین در آزمایش توکل افشاری و همکاران تغییرات مورفولوژی در سلول‌های سرطانی با مهار رشد سلول‌ها و تغییر چسبندگی سلول‌ها به سطح فلاسک و سلول‌ها به یکدیگر و ایجاد مورفولوژی ستاره‌ای شکل، تغییرات در شکل دیواره سلولی، کاهش سطح سلولی و پیگمانته شدن سلول‌ها همراه بود. این تغییرات مورفولوژیک، بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با زنجبیل است که در سلول‌های غیر سرطانی مشاهده نشد. بعد از ۷۲ ساعت نتایج آماری نشانگر این بود که در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی کبد نسبت به گروه کنترل زنده بودند ولی در نمودار سلول‌های نرمال فیروبلاست موش تغییر چندانی صورت نگرفت و  $IC_{50}$  آن نزدیک به ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (Tavakol Afshari et al., 2010).

بررسی‌ها نشان داد که در مواردی استفاده توأمان ترکیبات ضد سرطانی گیاهی می‌تواند اثر هم‌افزایی داشته باشد. بررسی ارزیابی فعالیت‌های ضد سرطانی و تعدیل‌کننده ایمنی ترکیب لیمو و زنجبیل بر رده‌های سلولی مختلف سرطانی با استفاده از روش MTT و همچنین میزان القای آپوپتوز و بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در موش‌های Balb/C تلقیح شده با سلول‌های سرطان پستان EMT6/P دریافت کننده این ترکیب به مدت ۱۴ روز نشان داد که ترکیب لیمو و زنجبیل اثرات قابل توجهی در القای آپوپتوز و سرکوب رگ‌زایی دارد. تومور ۵۰ درصد از موش‌هایی که از این ترکیب استفاده کردند، گسترش نیافت و درصد کاهش تومور ۳۲/۸ بود. این ترکیب اثری قوی در تحریک پینوسیتوز نشان داد. میزان بالایی از آلفا پینن و آلفا-ترپینول در این ترکیب شناسایی شد. ترکیب لیمو و زنجبیل گزینه امیدوارکننده‌ای برای توسعه تزریق‌های ضد سرطانی است که برای تقویت درمان‌های ضد سرطان مرسوم است (Al-Ataby

خیلی کم اثر سمی از خود نشان می‌دهد. این امر مزیت استفاده از زیره و زنجبیل به عنوان داروی ضد سرطان است که با مطالعات بیشتر این امکان وجود دارد که از این دو گیاه به عنوان داروی مؤثر در درمان سرطان استفاده شود.

## References

- Al-Ataby IA, Talib WH. 2022. Daily consumption of lemon and ginger herbal infusion caused tumor regression and activation of the immune system in a mouse model of breast cancer. *Frontiers in Nutrition* 9: 829101.
- Antunes L, de Lourdes Pires Bianchi M. 2010. Chapter 116 - *In vivo* cytogenetic effects of multiple doses of dietary vegetable oils: position of olive oils. Editor(s): Preedy VR, Watson RR., olives and olive oil in health and disease prevention 1071-1077.
- Bener A, Alsulaiman R, Doodson L, Agathangelou T. 2017. Depression, hopelessness and social support among breast cancer patients: in highly endogamous population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (APJCP)* 18 (7): 1889-1896.
- Bray F, Ferlay J, Laversanne M, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, et al. 2015. Cancer incidence in five continents: inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *International Journal of Cancer* 137 (9): 2060-2071.
- Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang HC. 1994. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Research* 14 (2A): 501-506.
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. 2007. Cancer incidence in five continents Volum IX. IARC Scientific Publication No. 160, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Derakhshanfar A, Niayesh A, Abbasi M, Ghalaeeha A, Shojae M. 2013. Frequency of depression in breast cancer patients: a study in farshchian and besat hospitals of hamedan during 2007-2008. *Iranian Journal of Surgery* 21 (2): 68-74.
- Dinparvar S, Bagirova M, Allahverdiyev AM, Abamor ES, Safarov T, Aydogdu M, Aktas D. 2020. A nanotechnology-based new approach in the treatment of breast cancer: Biosynthesized silver nanoparticles using *Cuminum cyminum* L. seed extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 208: 111902.
- Dumont N, Arteaga CL. 2003. Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* 3 (6): 531-536.
- Editorial. 2009. Breast cancer in developing countries. *Lancet (London, England)* 374 (9701): 1567.
- EnayatRad M, Salehinia H. 2015. An investigation of changing patterns in breast cancer incidence trends among Iranian women. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 22 (1): 27-35. (In Farsi)
- Fayazfar S, Zamanyan Azodi M, Heydari Kashel S, Azizye Jalileyan F. 2013. Evaluation of the cytotoxic effect of *Cuminum cyminum* essential oils on human colon cancer cell line SW742. *Journal of Ilam University of Medical Sciences* 20 (5): 138-148. (In Farsi)
- Fitzpatrick LR, Woldemariam T. 2017. Small-molecule drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. Editor(s): Chackalamannil S, Rotella D, Ward SE. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier 495-510. ISBN: 978-0-12-803201-5.
- Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. 2014. Evaluation of anti-cancer effect of *Peganum harmala* L. hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 16 (4): 1-8. (In Farsi)
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102: 898-904.
- Hoveizi E, Mohammadi T. 2018. Comparison of ginger (*Zingiber officinale*) hydroalcoholic extract on the viability of cancer cells and embryonic fibroblast cells. *Journal of Developmental Biology* 10 (3): 73-80. (In Farsi)
- Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 57-61.
- Jafari A, Goudarzian AH, Bagheri Nesami M. 2018. Depression in women with breast cancer: a systematic review of cross-sectional studies in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (APJCP)* 19 (1): 1-7.
- Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Mohammadian M. 2010. Study of antioxidant functional of the water, methanol and ethanol extracts of endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems. *Internal Medicine Today* 16(2): 37-44.
- Lei D, Hong T, Li L, Chen L, Luo X, Wu Q, Liu Z. 2021. Isobaric tags for relative and absolute quantitation-based proteomics analysis of the effect of ginger oil on bisphenol A-induced breast cancer cell proliferation. *Oncology Letters* 21 (2): 101.
- Madanipour M, Sharifi A. 2019. Evaluation of chemical composition and antioxidant activity of *Cydonia oblonga* extract. *Innovation in Food Science and Technology, Journal of Food Science and Technology* 10 (1): 109-119.

- Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nakatani N. 2004. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *Biofactors* 21 (1-4): 293-296.
- Moheghi N, Afshari JT, Brook A. 2011. The cytotoxic effect of *Zingiber Afficinale* in breast cancer (MCF7) cell line. *Quarterly of Horizon of Medical Sciences* 17 (3): 28-34.
- Motavalizadeh Ardekani A, Hashemi M, Safakish M, Alem Bagheri A, Baradaran Shokoohi S, Mosaddegh M. 2012. Medical treatment of cancer in traditional Iranian medicine. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine* 3 (1): 3-18.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L, Alonzo V. 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research* 19 (3): 198-202.
- Pilevarzadeh M, Amirshahi M, Afsargharehbagh R, Rafiemanesh H, Hashemi SM, Balouchi A. 2019. Global prevalence of depression among breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* 176 (3): 519-533.
- Porter P. 2008. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *The New England Journal of Medicine* 358 (3): 213-216.
- Prakash E, Kumar Gupta D. 2014. Cytotoxic activity of ethanolic extract of *Cuminum cyminum* Linn against seven human cancer cell line. *Universal Journal of Agricultural Research* 2 (1): 27-30.
- Purohit P, Mustafa M, Osmani Z. 1983. Insecticidal properties of plant-extract of *Cuminum cyminum* Linn. *Scientific Culture* 49: 46-49.
- Remesh A. 2017. Toxicities of anticancer drugs and its management. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* 1 (1): 2-12.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2019. CA: a cancer journal for clinicians. *Cancer Statistics* 69 (1): 7-34.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews* 12 (1): 376-390.
- Kintzios SE. 2006. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (2): 79-113.
- Tavakol Afshari J, Moheghi N, Brouk A. 2010. Ethanolic extract cytotoxic effect of *Zingiber officinale* in hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line. *Avicenna Journal of Clinical Medicine* 17 (3): 52-56. (In Farsi)
- WHO. International Agency for Research on Cancer 2020. The Global Cancer Observatory. Globocan 2018. Breast. 2019 [Updated 2019 March]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.
- Willatgamuwa S, Platel K, Saraswathi G, Srinivasan K. 1998. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds (*Cuminum cyminum*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Nutrition Research* 18: 131-142.
- Zhao L, Rupji M, Choudhary I, Osan R, Kapoor S, Zhang H-J, Yang Ch, Aneja R. 2020. Efficacy based ginger fingerprinting reveals potential antiproliferative analytes for triple negative breast cancer. *Scientific Reports* 10 (1): 19182.