مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۲، صفحه ۲۳۶-۲۲۴ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2023.357854.3143
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.2.6.3

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی *Ephedra major* Host. بر رده سلولی AGS سرطان معده

شیدا آقازاده یامچلو[۱]، فرهنگ مراقبی[۲*] و سیده مهدخت مداح[۳]

۱- دانش‌آموخته ارشد، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: moraghebi@yahoo.com

۳- استادیار، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۰ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

چکیده

سرطان معده یک تومور بدخیم است که یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در جهان و ایران شناخته می‌شود. گیاهان منابعی سرشار از انواع ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که می‌توانند در جهت تولید داروهای ضد سرطانی استفاده شوند. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و اثر سمّیت سلولی عصاره گیاه *Ephedra major* Host.، جمع‌آوری شده از پرندک در شهرستان رباط کریم، استان تهران روی سلول‌های سرطان معده رده AGS بررسی شد. عصاره هیدروالکلی اتانولی و متانولی (۸۰٪) سرشاخه‌های رویشی گیاه به روش خیساندن استخراج شد. محتوی فنلی عصاره‌ها با عامل Folin-Ciocalteu و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با استفاده از تست DPPH مورد سنجش قرار گرفت. همچنین میزان سمّیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره این گیاه روی سلول‌های رده AGS سرطان معده در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. میزان تغییر بیان ژن *BCL2* با استفاده از روش Real time-PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی عصاره اتانولی نسبت به عصاره متانولی بیشتر بود. نتایج تست MTT نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی، زنده‌مانی سلول‌ها کمتر شده و پس از ۴۸ ساعت، IC_{50} به میزان ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بدست آمد. میزان بیان ژن *BCL2* در تیمار با عصاره کاهش یافت هر چند این کاهش معنی‌دار نبود. به‌طور کلی، عصاره اتانولی سرشاخه‌های هوایی این گیاه توانست موجب مهار رشد سلول‌های سرطان معده گردد، اما تأثیر معنی‌داری بر کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی *BCL2* نداشت.

واژه‌های کلیدی: *Ephedra major* Host.، بیان ژن *BCL-2*، سرطان معده، رده سلولی AGS، آپوپتوز.

مقدمه

زمانی که تقسیم سلول‌ها از کنترل طبیعی بدن خارج شود و سلولی بی‌رویه تقسیم شود توده‌ای سلولی ایجاد می‌گردد که تومور نامیده می‌شود. تومورهای بدخیم، سرطان نامیده می‌شوند که می‌توانند بافت اطراف را مورد تهاجم قرار دهند و باعث تخریب ارگان‌ها و سلول‌های اطراف خود شوند (Ghasemi Gerami, 2009). سرطان معده پنجمین تومور بدخیم شایع در جهان در سال ۲۰۲۰ با حدود ۱/۱ میلیون مورد جدید بود و با حدود ۸۰۰۰۰۰ مرگ، چهارمین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان است (Ilic & Ilic, 2022). سرطان معده به دلیل مرگ و میر بالا، یک موضوع فعال در تحقیقات بالینی و آزمایشگاهی است (Biagioni *et al.*, 2019).

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

برای درمان سرطان معده از راه‌هایی مانند عمل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و داروهای هدفمند شیمیایی و گیاهی استفاده می‌شود (Sitarz *et al*., 2018). رده سلولی AGS (Adenocarcinoma Gastric Cell lines) مربوط به سرطان معده از نوع آدنوکارسینوما می‌باشد. کارسینوما (Carcinoma)، بدخیمی سلول‌های اپیتلیال هستند که پرتکرارترین انواع سرطان است. آدنوکارسینوماها ۹۵٪ تومورهای بدخیم معده را شامل می‌شوند و ۵٪ بقیه را لنفوما، تومورهای استرومال و سایر تومورهای نادر تشکیل می‌دهند. این رده سلولی از نوع چسبنده بوده و دارای رشد سریعی است. این رده سلولی مدل in vitro مناسبی برای تعیین قدرت مواد می‌باشد که می‌تواند سبب تمایز شود (Ghasemi Gerami, 2009).

یکی از گیاهان دارویی که در طب سنتی از آن به‌عنوان داروی گیاهی یاد می‌شود، گیاه ریش‌بز یا افدرا ماژور (*Ephedra major* Host) می‌باشد که متعلق به خانواده افدراسه است. گونه‌های افدرا در محیط‌های خشک، شنی یا صخره‌ای رشد می‌کنند، درختچه‌هایی کوتاه، همیشه سبز و تقریباً بدون برگ هستند که در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری مانند ایران، چین، مغولستان، هند، مناطقی از مدیترانه و افغانستان و مناطقی از آمریکای شمالی و مرکزی یافت می‌شوند (Fukushima, 2004). از این عصاره‌ها در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی مانند آسم، سرفه، لرز، آلرژی، سرماخوردگی، ورم، سردرد، تب، آنفولانزا و اختلالات معده استفاده می‌شود. مشخص شده است عصاره این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد سرطانی است (Ismail *et al*., 2020؛ Ghiasvand *et al*., 2019). ترکیب‌های اصلی بدست آمده از عصاره این گیاه، افدرین و سودوافدرین است که بیشترین کاربرد دارویی گیاه افدرا مربوط به آلکالوئیدهای افدرین است که در ساقه‌های آن تجمع می‌یابد (Mofid bojnourdi *et al*., 2016).

Lee و همکاران (۲۰۰۰) عصاره *E. sinica* را با روش‌های مختلف استخراج کردند و نشان دادند که پودر کردن و جوشاندن می‌تواند مقادیر بیشتری از ترکیب‌های توکسیک را استخراج کند، به‌طوری که این عصاره‌ها خاصیت سیتوتوکسیک بر رده سلولی Neuro-2a نوروبلاستومای موش داشت. بررسی خواص ضد سرطانی عصاره اتانولی *E. alata* بر رده‌های سلولی HepG2 سرطان کبد و THP-1 منوسیت نشان داد که رده سلولی THP-1 نسبت به عصاره این گیاه حساس‌تر از رده سلولی HepG2 است (Kmail *et al*., 2015). مطالعه اثر ضد التهابی و سیتوتوکسیک دو گونه افدرا بر رده سلولی MCF-7 سرطان سینه خواص ضد سرطانی و ضد التهابی آن را تأیید کرد (Soumaya *et al*., 2020).

آپوپتوز، یک محافظ طبیعی در مقابل ناهنجاری‌ها و بیماری‌ها محسوب می‌شود که در طول مرگ سلولی رخ می‌دهد. پروتئین‌های بسیاری در مسیر تنظیم آپوپتوز نقش داشته، ازجمله مهمترین آنها می‌توان به پروتئین *BCL-2* (*B-cell lymphoma 2*) اشاره کرد. ژن *BCL-2*، پروتئین جدایی‌ناپذیر غشای میتوکندری خارجی را کد می‌کند که از مرگ آپوپتوز برخی از سلول‌ها مانند لنفوسیت‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین پس از تشکیل آپوپتوزوم نقش کلیدی در فعال‌سازی آنزیم‌های کاسپاز و القای آپوپتوز ایفاء می‌کنند. پروتئین *BCL-2* می‌تواند هم در ایجاد و هم ممانعت از آپوپتوزیس نقش ایفاء کند (Parsa, 2012؛ Majidi Gharenaz *et al*., 2015). داروی تولمتین با کاهش بیان ژن ضدآپوپتوزی *Bcl-2* سبب القای مرگ سلولی در سلول‌های AGS (رده سلولی سرطانی آدنوکارسینومای معده) می‌گردد (Noroozi *et al*., 2020). تحقیقات نشان داده است که بیان ژن *Bcl-2* عامل مهمی در رفتار بیولوژیکی کارسینوم معده است و می‌تواند آپوپتوز را تنظیم کند. *Bcl-2* ممکن است هم در تحریک سرطان معده و هم در توسعه آن بکار رود. اگرچه *Bcl-2* یک مهارکننده قوی برای آپوپتوز است، اما نمی‌تواند سرطان را به تنهایی القاء کند (Xu *et al*., 2001). با توجه به خصوصیات درمانی گیاه دارویی افدرا، در این پژوهش به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره گیاه افدرا بر رده سلولی AGS سرطان معده با توجه به چگونگی تغییرات

بیان ژن *Bcl-2* پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

گیاه *E. major*، در اواخر اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۰ از منطقه‌ای در حوالی معدن منگنز پرندک، واقع در ۹ کیلومتری شهرستان رباط کریم که در جنوب استان تهران قرار دارد جمع‌آوری شد. از نظر موقعیت جغرافیایی این معدن در طول ۵۱ درجه، ۱۰ دقیقه و ۳۰ ثانیه و عرض ۳۵ درجه و ۲۴ دقیقه قرار گرفته است. میانگین دمای این منطقه در تابستان ۳۵+ درجه سانتی‌گراد و در زمستان ۳- درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Sotohian *et al*., 2004). گونه شناسایی شده مطابق با گونه شناسایی شده توسط باباخانلو و امین با شماره ثبت ۷۲۳۹ در هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور بود که از ارتفاع ۱۰۸۰ متری در پرندک جمع‌آوری شده بود (Asadi, 1997). پس از شستشوی سرشاخه‌های سبز و سالم گیاه، آنها به‌مدت ۱۰ روز در دمای اتاق در هوای آزاد و به دور از نور خورشید در سایه خشک شدند. سرشاخه‌های هوایی خشک شده با استفاده از مخلوط‌کن به‌طور کامل پودر شدند (Ismail *et al*., 2020؛ Torabzadeh khorasani *et al*., 2010).

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری به روش خیساندن براساس روش Maddah و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد. ابتدا به‌طور جداگانه ۳۰ گرم از پودر گیاه خشک شده به دو ظرف شیشه‌ای درب‌دار یکی دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ و دیگری دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ اضافه شد. ظرف‌ها در انکوباتور شیکردار (innova42) در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. عصاره با کاغذ صافی واتمن صاف شد و با دستگاه روتاری (Heidolph Laborata Rotary Evaporator, WB eco, Germany) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۸۰-۱۵۰ و دور ۴۰ rpm تغلیظ گردید.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

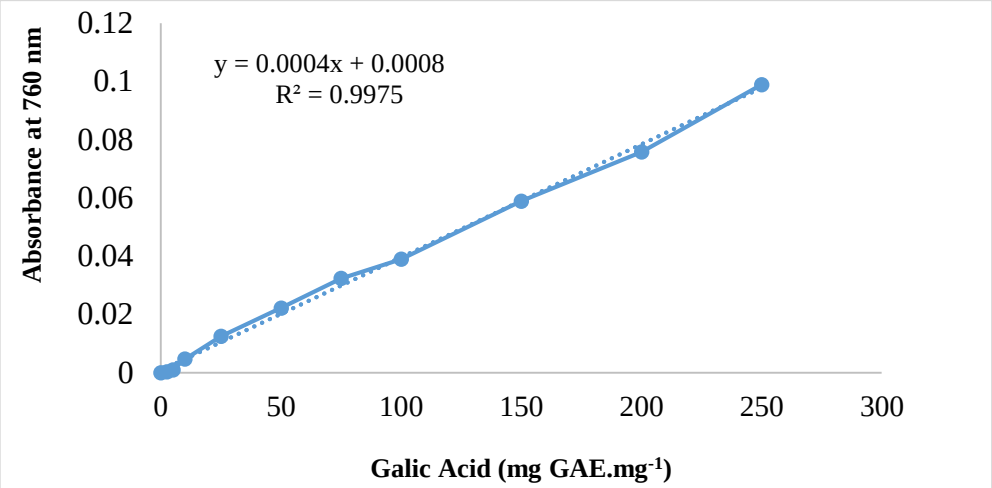
فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها براساس فعالیت مهار DPPH (Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)، با توجه به روش توصیف شده توسط Dudonne و همکاران (۲۰۰۹) تعیین شد. ۱۰ میلی‌گرم از هر یک از عصاره‌ها یک‌بار در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول و بار دیگر در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شد، به‌نحوی که از محلول غلیظ تهیه شده از هر عصاره غلظت‌های ۱۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس با اضافه کردن محلول ۰/۰۰۴٪ DPPH در متانول به هر یک از غلظت‌ها، پس از ۳۰ دقیقه، جذب در ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومترCary 60 UV-VIS مورد سنجش قرار گرفت. درصد مهار DPPH براساس فرمول زیر محاسبه شد که در آن A_0 برابر جذب بدون عصاره و A_e برابر جذب با عصاره است.

$$I = [(A_0-A_e)/A0] \times 100 \text{ (درصد مهار)}$$

برای تهیه نمودار استاندارد به روش بالا، جذب غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک ارزیابی شد (Dudonne *et al*., 2009).

سنجش فنل کل (TP)

محتویات کل فنلی با استفاده از روش Folin-Ciocalteau مشخص شد. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فنلی FolinCiocalteu به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره اتانولی و متانولی اضافه و تکان داده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۱۰٪ به مخلوط اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در برابر بلانک معرف آماده شده در ۷۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Thermo, Waltham, MA, USA) Cary 60 UV-VIS تعیین شد (Azimi *et al*, 2020). اسید گالیک ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان یک استاندارد برای منحنی کالیبراسیون استفاده و داده‌های محتوای فنلی کل به‌صورت معادل‌های اسید گالیک (mg GAE/g DW) بیان شد (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی استاندارد اسید گالیک (mg GAE.mg^{-1})

Figure 1. Gallic acid standard curve(mg GAE.mg^{-1})

کشت سلول

سلول‌های سرطانی معده رده AGS از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شدند. این سلول‌ها درون فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌مترمربعی کشت شدند. فلاسک‌ها حاوی محیط کشت RPMI-1640، همراه سرم جنین گاوی یا FBS ۱۰٪ و ۲ میلی‌مولار گلوتامین (مارک Gibco ساخت آمریکای جنوبی) و نیز آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (BIO-IDEA، ایران) بودند. فلاسک‌ها در انکوباتور CO_2دار حاوی ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این سلول‌های چسبنده هر سه تا چهار روز یک‌بار زیر کشت قرار گرفتند (Naderi *et al.* 2020؛ Maddah *et al.* 2021).

آزمون MTT

پس از رشد و تکثیر مناسب سلول‌ها در فلاسک، 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای توزیع شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری گردید. سپس محیط کشت هر چاهک به آرامی خارج شد و به‌منظور تیماردهی، سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره (هر غلظت سه تکرار) قرار گرفتند. برای سنجش زنده‌مانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی به‌طور جداگانه پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد و پس از خروج مایه رویی، در تاریکی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرد رنگ اضافه و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. سپس رنگ MTT خالی و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و پلیت با فویل آلومینیومی پیچیده شد، آنگاه حدود یک ساعت در انکوباتور انکوبه گردید 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 الیزا ریدر (SrcituroBiiketoiB) اندازه‌گیری شد. شدت رنگ ارغوانی حاصل معرف نسبت سلول‌های زنده در هر چاهک است. درصد زنده‌مانی سلول‌ها براساس فرمول زیر محاسبه شد (Naderi *et al.*, 2020؛ Maddah *et al.*, 2021).

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

استخراج RNA تام سلولی

RNA تام سلولی از سلول‌های کنترل و تیمار شده با غلظت IC_{50} (۲۵۰ µg/ml) پس از ۴۸ ساعت تیماردهی، توسط کیت RiboEX (cat.No.302-001) ساخت شرکت GeneALL کره استخراج گردید. خلوص RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (SrcituroBiiketoiB) تعیین شد (Murphy & Hellwig, 1996).

سنتز cDNA

برای ساخت cDNA از کیت (Cat.No.A101161) Easy cDNA synthesis Kit ساخت شرکت پارس طوس استفاده شد. cDNA سنتز شده تا زمان استفاده برای ریل تایم PCR در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

روش Real-time PCR

در این پژوهش، ژن *BCL2* به‌عنوان ژن هدف و ژن *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*) به‌عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. برای ارزیابی میزان بیان ژن پس از رونویسی پرایمرها، با استفاده از Primer3 (version 0.4.0) و نیز بررسی منابع براساس جدول ۱ طراحی شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با دمای ذوب ۶۰ درجه سانتی‌گراد

Table 1. Specifications of primers used in this research with melting temperature of 60°C

Gene Name	Forward	Reverse	Product length
GAPDH	CTCATTTCCTGGTATGACAACG	CTTCCTCTTGTGCTCTTGCT	122 pb
BCL2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACA	181 pb

واکنش PCR با استفاده از کیت YTA SYBR Green Qpcr Master Mix 2X و رنگ SYBR Green، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۲ pmol/µL) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. به کمک دستگاه Rotor Gene 6000 Qagen تکثیر PCR در ۴۰ چرخه براساس مراحل زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و برای هر چرخه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، برای اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و برای گسترش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد. پس از آن تجزیه‌وتحلیل منحنی ذوب برای هر تکثیر PCR در محدوده دمایی از ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. آزمایش در دو تکرار انجام شد. دیتاهای بلند شدن نمودار (Take off) و تکثیر (Amplification) برای بدست آوردن کارایی واکنش (Efficiency) در نرم‌افزار REST 2009 انجام گردید. بعد از بدست آوردن E، از فرمول زیر برای محاسبه Fold Change هر ژن در Excel 2016 استفاده شد.

$$Fola\ change = \frac{(E_{target})^{\Delta CP\ target(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP\ ref(control-sample)}}$$

یا

$$Fola\ change = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct\ target(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct\ ref(control-sample)}}$$

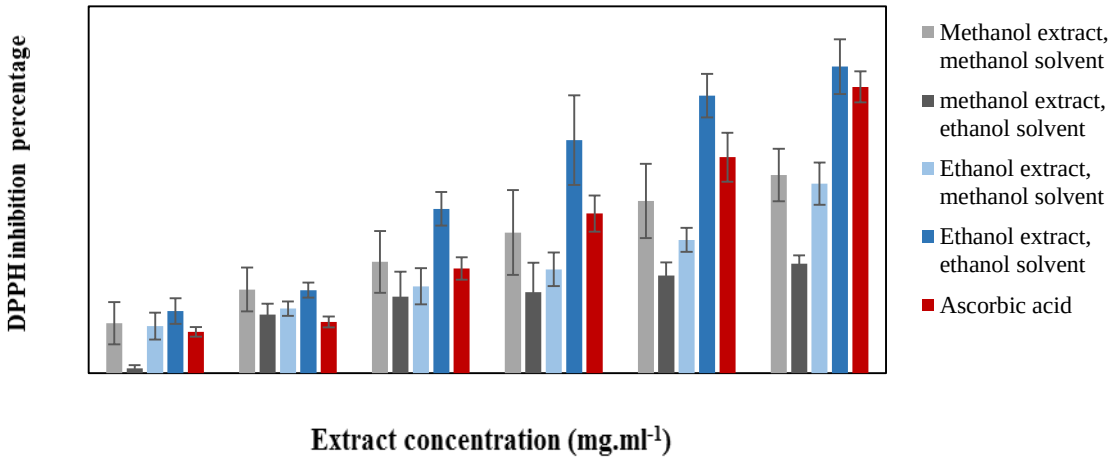
تحلیل‌های آماری

برای محاسبه کارایی واکنش (Efficiency) و مقایسه میانگین دو تکرار بیان ژن‌ها از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. به‌منظور مقایسه سه تکرار، میانگین درصد زنده‌مانی سلول و درصد مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های عصاره با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. برای آنالیز تنظیم بیان ژن و محتوای فنلی با آزمون t-Test از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای رسم شکل از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 و گراف پد پریسم ۸ استفاده شد.

نتایج

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه *Ephedra major* بر پایه (IP)

به‌منظور انتخاب عصاره‌ای با توان آنتی‌اکسیدانی بیشتر، با استفاده از روش DPPH خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و متانولی سنجش شد. با توجه به شکل ۲، غلظت‌های مختلف چهار نوع عصاره تهیه شد که شامل عصاره اتانولی با حلال اتانول، عصاره اتانولی با حلال متانول، عصاره متانولی با حلال اتانول و عصاره متانولی با حلال متانول هستند. توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تهیه شده نسبت به آسکوربیک اسید سنجیده شد. نتایج نشان داد بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به عصاره اتانولی در حلال اتانولی است و در تمامی غلظت‌ها بیشتر از آسکوربیک اسید است، بنابراین توان آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. همچنین در سایر عصاره‌ها نیز مشاهده شد که توان آنتی‌اکسیدانی آنها به‌ویژه در عصاره متانولی با حلال متانولی تقریباً نزدیک به آسکوربیک‌اسید و حتی در غلظت‌های کم بیشتر از اسکوربیک است. بنابراین عصاره اتانولی در حلال اتانولی به‌طور معنی‌داری قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارد ($P<0.05$).

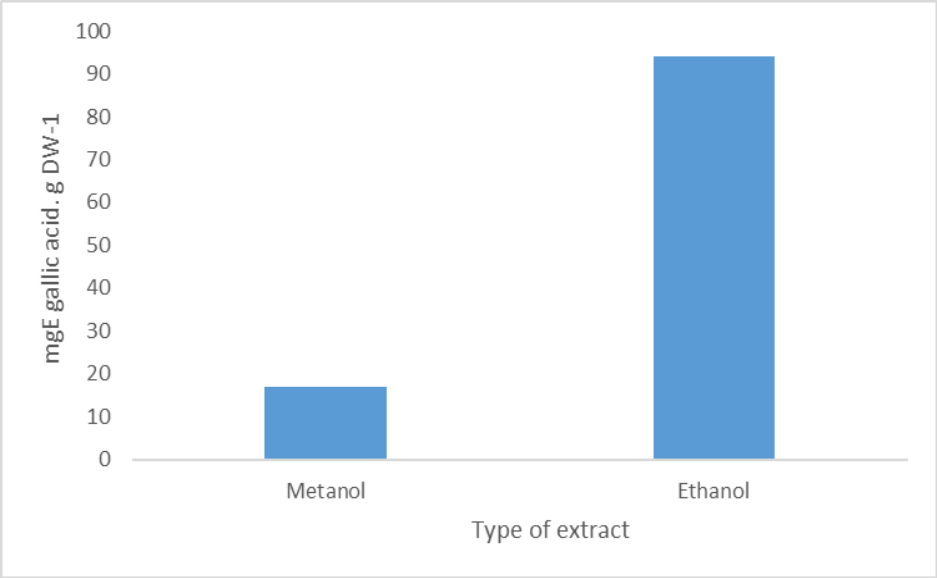


شکل ۲- درصد مهار عصاره‌های گیاه *Ephedra major*

Figure 2. Inhibition percentage of *Ephedra major* extracts

بررسی میزان ترکیب‌های فنلی در عصاره گیاه *Ephedra major*

نظر به اهمیت ترکیب‌های فنلی در میزان خواص آنتی‌اکسیدانی در بیشتر گیاهان، سنجش محتوای فنلی دو نوع عصاره اتانولی و متانولی گیاه افدرا ماژور ارزیابی شد. با توجه به شکل ۳ عصاره اتانولی با ۹۴/۱۳ mg GAE/g DW محتوای فنلی نسبت به عصاره متانولی با ۱۷/۰۳ mg GAE/g DW به‌طور معنی‌داری حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنلی است ($P<0.05$).

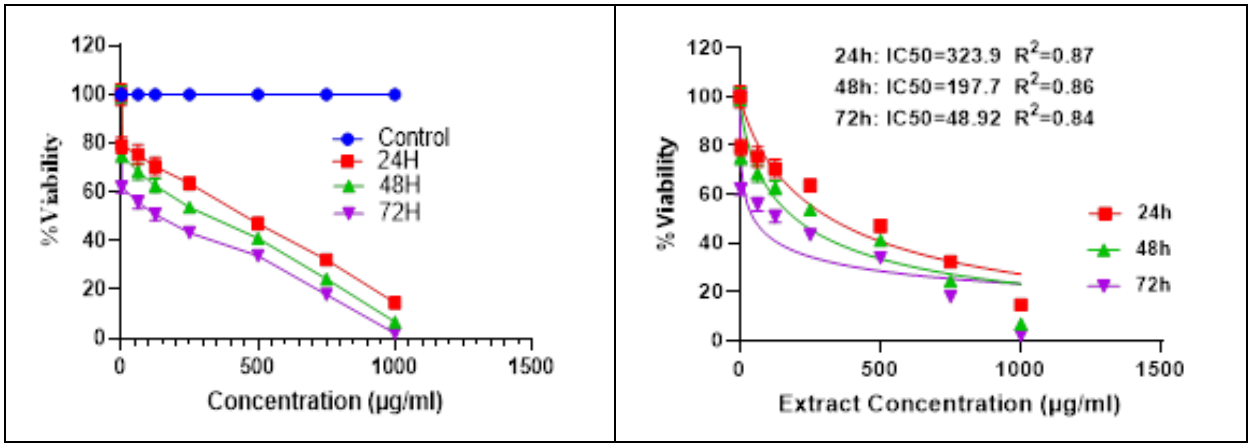


شکل ۳- مقایسه مقدار ترکیب‌های فنلی (**mg GAE.g-1 DW**) عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه ***Ephedra major***

Figure 3. Phenolic compounds (mg GAE.g^{-1} DW) comparison in *Ephedra major* ethanol and methanol extracts

اثر عصاره گیاه افدرا بر درصد زنده‌مانی (Viability) سلول‌های رده AGS سرطان معده

برای بررسی خواص سیتوتوکسیک عصاره اتانولی که قدرت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی بیشتری داشت، درصد زنده‌مانی سلول‌های رده AGS سرطان معده تحت تیمار با غلظت‌های مختلف این عصاره با روش MTT در سه زمان سنجش شد. براساس شکل ۴، با افزایش غلظت عصاره میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش یافته است و درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های بالا تفاوت معنی‌داری را نسبت به غلظت‌های پایین نشان داد ($P<0.05$). ۲۴ ساعت بعد از تیماردهی IC_{50} ۳۲۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. ۴۸ ساعت پس از تیمار IC_{50} به میزان ۱۹۷/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که با توجه به غلظت‌های استفاده شده همان غلظت ۲۵۰ µg/ml، در نظر گرفته شد. اما ۷۲ ساعت پس از تیماردهی IC_{50}، ۴۸/۹۲ µg/ml بدست آمد که با توجه به غلظت‌های استفاده شده در این آزمایش تجربه برابر ۶۲/۵ µg/ml است.

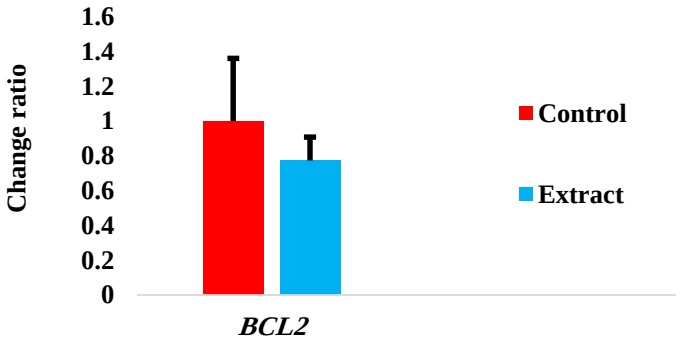


شکل ۴- درصد زنده‌مانی سلول‌های رده AGS تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه ***Ephedra major***

Figure 4. Survival percentage of AGS cells treated with different concentrations of *Ephedra major* ethanol extract

تغییر بیان ژن *BCL2*

از آنجایی که ژن *BCL2* یکی از ژن‌های مؤثر در مسیر آپتوز می‌باشد، مقایسه میانگین بیان ژن *BCL2* در سلول‌های سرطانی AGS در دو گروه شاهد یا بدون دارو (C) و گروه تحت تیمار ۲۵۰ µg/ml عصاره اتانولی افدرا پس از ۴۸ ساعت تیماردهی انجام شد. آنالیز تغییرات بیان ژن *BCL2* در مقایسه با بیان ژن مرجع *GAPDH* و به کمک فرمول‌های مربوط انجام و به‌صورت Fold change بیان شد. بررسی تغییرات بیان ژن‌های *BCL2* تحت تأثیر عصاره افدرا ماژور در شکل ۵ نشان داد، FC (Fold change)، ژن *BCL2*، تحت تأثیر عصاره ۰/۷۷ برابر شاهد کاهش یافت و این کاهش معنی‌دار نبود.



شکل ۵- تغییرات میانگین بیان ژن ***BCL2*** در نمونه‌های شاهد (بدون عصاره) و تیمارشده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گیاه ***Ephedra major***

Figure 5. Average *BCL2* gene expression changes in control (without extract) and treated with 250 μg.ml^{-1} of *Ephedra major* ethanol extract samples

بحث

آنتی‌اکسیدان ترکیبی است که قادر به کاهش یا جلوگیری از اکسیداسیون مولکول‌های دیگر می‌شود. واکنش‌های اکسیداسیونی می‌تواند رادیکال‌های آزاد تولید کند که شروع‌کننده واکنش‌های زنجیره‌ای است و می‌تواند به سلول‌ها صدمه بزند. ویژگی‌های سلامتی بخش آنتی‌اکسیدان‌ها و نقش آنها در پیشگیری از بیماری‌ها از دلایل عمده افزایش توجه به آنها بوده است. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها از فرایند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری‌هایی مانند سرطان است پیشگیری کرده و از این لحاظ اثر خود را بر سلامت انسان‌ها می‌گذارند (Hasannia *et al*., 2016).

امروزه محققان بر این تلاشند تا به مؤثرترین ترکیب‌های ضد سرطان با منشأ گیاهی که کمترین اثر منفی بر سلول‌های سالم را داشته باشند، دست یابند (Mashhadi *et al*., 2021). بدین‌منظور در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره گونه *E. major* بر سرطان معده سنجش شد. بررسی توان آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های متفاوت عصاره‌های اتانولی و متانولی بیانگر این بود که عصاره اتانولی خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد، همچنین عصاره اتانولی محتوای فنلی بیشتری داشت. این نتیجه بیانگر این است که حلال اتانول در استخراج ترکیب‌های فنلی که اصلی‌ترین و مهمترین ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، موفق‌تر عمل کرده است، به‌عبارتی آزمایش سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی را تأیید می‌کند که عصاره اتانولی توان بالاتری برای استخراج ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی دارد و بالاتر بودن درصد ممانعت (درصد مهارکنندگی) در عصاره اتانولی در آزمایش سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌دلیل استخراج ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر مانند ترکیب‌های فنلی در عصاره اتانولی باشد. در تحقیقات جداگانه‌ای نتایج مشابهی بر روی *E. intermedia* و *E. alata* بدست آمد (Mighri *et al*., 2019؛ Ataiee Azimi *et al*., 2017).

بررسی سمّیت سلولی عصاره اتانولی بر سلول‌های رده AGS سرطان معده نشان داد که ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از تیماردهی به‌ترتیب در ۲۵۰ و ۶۲/۵ µg/ml نیمی از سلول‌ها از بین رفتند؛ با توجه به اینکه غلظت ۲۵۰ µg/ml در زمان ۴۸ در میانه غلظت‌هاست و در زمان کمتری مؤثر واقع شده است به‌عنوان IC_{50} مناسب برای ادامه کار انتخاب گردید. همچنین با افزایش غلظت عصاره میزان زنده ماندن سلول‌های تحت تیمار، کاهش یافته است که وابستگی به غلظت خواص سیتوتوکسیک عصاره را نشان داد. نتایج حاصل با یافته‌های محققان دیگر در ارتباط با اثر عصاره گونه‌های مختلف افدرا بر رده‌های سلولی سرطانی Neuro-2a، HepG2 و MCF-7 همسو می‌باشد (Lee *et al*., 2000؛ Kmail *et al*., 2015؛ Danciu *et al*., 2019؛ Soumaya *et al*., 2020).

Mellado و همکاران (۲۰۱۹) عصاره‌های هگزانی، دی‌کلرومتانی و اتانولی سرشاخه‌های *E. chilensis* را بر رده‌های MCF-7 سرطان سینه، HT-29 سرطان روده، CoN سرطان اپیتلیال روده و رده‌های PC-3,DU-145 سرطان پروستات اثر دادند و نتیجه گرفتند عصاره‌های غیر قطبی مانند عصاره هگزانی خواص سیتوتوکسیک قوی‌تری بر بیشتر رده‌های سلولی داشتند. البته آنها همبستگی بین محتوای فیتوشیمیایی عصاره *E. chilensis* و اثر سیتوتوکسیک را مورد بررسی قراردادند، به‌طوری که مشخص شد هیچ رابطه‌ای بین اثر ضد تکثیر و محتوای فیتوشیمیایی یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد. ازاین‌رو به‌نظر می‌رسد در تکمیل این پژوهش برای گونه *E. major* نیز عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف و بررسی دقیق‌تر خواص آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیکی لازم باشد.

محققان مشخص کردند که ترکیب‌های اصلی بدست آمده از عصاره *E. major* افدرین و سودوافدرین می‌باشد. آلکالوئید افدرین و مشتقات ایزومری آن مهمترین ترکیب‌های سازنده افدرا ماژور است. البته تاکنون در عصاره گیاه افدرا مواد شیمیایی یا متابولیت‌های ثانویه متعددی مانند فلاوون‌ها، فلاوونول‌ها، تانن‌ها، نورپسودوافدرین، نورافدرین، متیل افدرین، هیدروکسی کینورنیک اسید، کوئینولین، اسیدهای کربوکسیلیک و ترپن‌ها نیز گزارش شده

است (Aghdasi *et al.*, 2016؛ Mofid Bojnourdi *et al.*, 2016). بنابراین بخش عمده خصوصیات سیتوتوکسیک عصاره این گیاه می‌تواند مربوط به آلکالوئید افدرین و سایر ایزومرها و مشتقاتش باشد.

پژوهش‌های متنوعی در بررسی اثر عصاره گیاهان مختلف بر رده سلولی AGS سرطان معده انجام شده است.

Hanachi و همکاران (۲۰۱۹)، اثرهای سایتوتوکسیکی عصاره آبی ریحان و گل حنا، Kazemi و Beigi Shahrestani (۲۰۱۸) خواص ضد سرطانی عصاره زعفران را بر روی رده سلولی AGS تأیید کردند؛ همچنین Ghazanfari و همکاران (۲۰۱۳) سمّیت سلولی عصاره ۴ گیاه آلوئه‌ورا، زنجبیل، زعفران و کاکوتی را بر روی رده سلولی AGS با یکدیگر مقایسه کردند و نشان دادند عصاره کاکوتی بیشترین اثر را بر سلول‌های سرطانی معده داشته است.

در این پژوهش بیان ژن *BCL2* طی تیماردهی با غلظت (IC_{50}) کاهش یافت ولی این کاهش معنی‌دار نبود. در مطالعه انجام شده توسط Darvishi و همکاران (۲۰۱۷) اثر عصاره متانولی قسمت‌های هوایی *Juniperus excelsa* بر سلول‌های Nalm-6 و Reh نشان داد که سطح بیان برخی از ژن‌های مرتبط با آپوپتوز ازجمله *BCL-2* کاهش یافت که با نتایج تحقیق ما همسو است.

Abdalan و همکاران (۲۰۱۸)، نیز ضمن بررسی اثر سمّیت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو بومی کشور ایران علیه رده سلولی سرطانی کولون HT29 نشان دادند که عصاره آبی برگ این گیاه دارای اثر سمّیت علیه رده سلولی HT29 بوده و بیان ژن آپوپتوتیک *Bax* و *BCL-2* نسبت به ژن مرجع کاهش یافته است.

به‌طور کلی این پژوهش نشان داد عصاره اتانولی *E. major* خواص آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی بیشتری نسبت به عصاره متانولی این گیاه داشت. عصاره اتانولی این گونه افدرا نیز مانند سایر گونه‌های آن دارای خواص ضد سرطانی بوده است، به‌طوری که موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌های رده سلولی AGS سرطان معده شده است ولی با توجه به عدم کاهش معنی‌دار بیان ژن *BCL-2* تغییرات بیان این ژن در این شرایط نیاز به بررسی بیشتری دارد.

References

- Abdalan, S., Baghbani-Arani, F. and Shandiz, A., 2018. Evaluation of anticancer effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Quercus infectoria* leaf against colon cancer HT29 cell line. Journal of Arak University of Medical Sciences, 21(4): 48-56.
- Aghdasi, M., Mofid Bojnourdi, M., Mianabadi, M. and Nadaf, M., 2016. Chemical components of the *Ephedra major* from Iran. Natural product Letters, 30(3): 369-371.
- Asadi, M., 1997. Flora of Iran: Ephedraceae (Volume 22). Publications of Forest and Rangeland Research Institute.
- Ataiee Azimi, O., Delnavaz Hashemloyan, B. and Amirnia, A., 2017. Comparison of alkaloids, phenol and antioxidant activity of natural Middle Armak with isolated in vitro cultures. Plant Process and Function, 21(6): 143-152.
- Azimi, Y., Maddah, S.M. and Mostafavi, G., 2020. 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, 11(3): 3701-3708.
- Biagioni, A., Skalamera, I., Peri, S., Schiavone, N., Cianchi, F., Giommoni, E., Magnelli, L. and Papucci, L., 2019. Update on gastric cancer treatments and gene therapies. Cancer and Metastasis Reviews, 1-12.
- Danciu, C., Muntean, D., Alexa, E., Farcas, C., Oprean, C., Zupko, I., Bor, A., Minda, D., Proks, M., Buda, V., Hancianu, M., Cioanca, O., Soica, C., Popescu, S. and Dehelean, C., 2019. Phytochemical characterization and evaluation of the antimicrobial, antiproliferative and pro-apoptotic potential of *Ephedra alata* Decne. hydroalcoholic extract against the MCF-7 breast cancer cell line. Molecules, 24(13): 1-15.
- Darvishi, M., Esmaeili, S., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P. and Gharehbaghian, A., 2017. Anticancer effect and enhancement of therapeutic potential of vincristine by extract from aerial parts of *Juniperus excelsa* on pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines. American Journal of Cancer Research; 7(5): 1016-1036.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutie RE, P., Woillez, M. and Merillon, J., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH,

- Lee, M., Cheng, W., Che, C. and Hsieh, P., 2000. Cytotoxicity assessment of Ma-huang (*Ephedra*) under different conditions of preparation. Toxicological Sciences, 56: 424-430.
- Maddah, S.M., Moraghbi, F. and Sarhadi, S., 2022. Comparison of cytotoxic properties of essential oil and extract of *Juniperus excelsa* branches of Alborz region on lung cancer cell line A549. Cellular and Molecular Research, 35(4): 655-668.
- Maddah, S.M., Mostafavi, G., Amin Malek, M., Anbarestani, M., Sharif, Y. and Mir Hassani, Z., 2021. Combined application of cisplatin and salicylic acid suppresses cell growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell lines. Biologia, 77: 215-223.
- Majidi Gharenaz, N., Movahedin, M. and Mazaheri, Z., 2015. Evaluating the development and the expression of Bax, Bcl-2, and ErbB4 genes following vitrification of eight cell and blastocyst embryos. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 4(4): 427-435.
- Mashhadi, F., Ghorbani Nohooji, M. and Yaraee, R., 2021. Effects of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. on cancer cells line BCL-1 and immune system cells. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37(5): 781-794.
- Mellado, M., Soto, M., Madrid, A., Montenegro, I., Jara-Gutiérrez, C., Villena, J., Werner, E., Godoy, P. and Aguilar, L., 2019. In vitro antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. BMC Complementary and Alternative Medicine, 19(53): 1-10.
- Mighri, H.A., Akrout, A., Bennour, N., Eljeni, H., Zammouri, T. and Neffati, M., 2019. LC/MS method development for the determination of the phenolic compounds of Tunisian *Ephedra alata* hydro-methanolic extract and its fractions and evaluation of their antioxidant activities. South African Journal of Botany, 124: 102-110.
- Mofid Bojnourdi, M., Aqdasi, M., Mianabadi, M. and Nadaf, M., 2016. A Comparative study on some secondary metabolites of male and female stems of *Ephedra major* Host. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 32(2): 290-300.
- Murphy, N.R. and Hellwig, R.J., 1996. Improved nucleic acid organic extraction through use of a unique gel barrier material. BioTechniques, 21: 934-939.
- Naderi, M., Cherati, M. R., Mohammadian, A., Bidhendy, M.B., Ghiasvand, S., Marzouni, H.Z. and Javidi, M.A., 2020. Hypericin induces apoptosis in the AGS cell line with no significant effect on normal cells. Iranian Journal of Pharmaceutical ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 1768-1774.
- Fukushima, K., 2004. Bioctivity of *Ephedra*: Integrating cytotoxicity assessment with real-time biosensnsing. Thesis submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.
- Ghasemi Gerami, K., 2009. Investigation of biological anti-cancer and antibacterial properties of some nanometer materials and hallucomplexes of intermediate elements. Ph.D. thesis, Department of Biology, Faculty of Science, Mohaghegh Ardabili University, Ministry Science Research and Technology, Ardabil.
- Ghazanfari, T., Yaraee, R., Shams, J., Rahmati, B., Radjabian, T. and Hakimzadeh, H., 2013. Cytotoxic effect of four herbal medicines on gastric cancer (AGS) cell line. Food and Agricultural Immunology, 24(1): 1-7.
- Ghiasvand, M., Makhdoumi, A., M. Matin, M. and Vaezi, J., 2019. Exploring the bioactive compounds from endophytic bacteria of a medicinal plant: *Ephedra foliata* (Ephedrales: Ephedraceae). Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 20(1): 1-10.
- Hanachi, P., Salehizadeh, Sh., Kiarostami, K. and Ramezani, R., 2019. Investigation of Antioxidant properties of *Ocimum basilicum* and Impatiens walleriana and their cytotoxic effect on the gastric cancer AGS cell line. Journal of Cell & Tissue, 9(4): 378-388.
- Hasannia, M., Ariaii, P. and Fattahi, E., 2016. The effect of extraction methods on phenolic and tocophorol content and antioxidant properties of dill extracts (*Anethum graveolens*). Iranian Journal of Food Science and Technology, 13(57): 109-119.
- Ilic, M. and Ilic, I., 2022. Epidemiology of stomach cancer.Word Journal of Gastroenterology, 28(12): 1187-1203.
- Ismail, S., Adwan, G. and jarrar, N., 2020. Evaluation of antimicrobial and genotoxic activity of *Ephedra foeminea* ethanolic and aqueous extracts on *Escherichia coli*. Jordan Journal of Biological Sciences, 13(1): 123-126.
- Kazemi, N. and Beigi Shahrestani, S., 2018. Effect of saffron extract on expression of bax and Bcl-2 genes in Gastric Adenocarcinoma Cell Line (AGS). Gene cell Tissue, 5(3): e63608.
- Kmail, A., Lyoussi, B., Zaid, H. and Saad, B., 2015. In vitro assessments of cytotoxic and cytostatic effects of *Asparagus aphyllus*, *Crataegus aronia*, and *Ephedra alata* in monocultures and co-cultures of Hepg2 and THP-1-derived macrophages. Pharmacognosy Communications, 5(3): 165-172.

Research, 19(3): 349-357.
- Noroozi, S., Ahmadi, R. and Iranshahi, M., 2020. The apoptotic effects of tolmetin on human gastric cancer cells. Journal of Tehran University of Medical Sciences (Payavard Salamat), 14(2): 144-151.
- Parsa, N., 2012. Molecular and cellular basis of human cancer. Journal of Cell & Tissue. 2(4): 365-376.
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G., Maciejewski, R. and Polkowski, W.P., 2018. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. Cancer Management and Research, 10: 239-248.
- Soumaya, B., Yosra, E., Rim, M., Dakhlaoui, S., Sawsen, S., Sarra, B., Kamel, M., Wissem, A., Isoda, H. and Wided, M., 2020. Preliminary phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of two Tunisian *Ephedra* species: *Ephedra alata* and *Ephedra fragilis*. South African Journal of Botany, 135: 1-8.
- Sotohian, F., Sharifi, S. and Ranjbaran, M., 2004. The effects of environmental pollution of Robat Karim manganese mine. The First National Conference on Strategies for Achieving Sustainable Development In The Agricultural Sectors of Natural Resources and The Environment, Tehran Iran, 10 March: 131-137.
- Torabzadeh Khorasani, P., Panahi, P., Salkbar, A. and Mokhtari, A., 2010. Investigation of antibacterial effects of aqueous, alcoholic and acetic extracts of Goat Beard (*Ephedra major* Host.) on standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Comparative Biopathology of Iran, 4: 91-98.
- Xu, A.G., Li, S.G., Liu, J.H. and Gan, A.H., 2001. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology, 7(3): 403-406.

Study on antioxidant and cytotoxic properties of *Ephedra major* Host. hydroalcoholic extract on AGS gastric carcinoma cell line

Sh. Aghazadeh Yamchelo[1], F. Moraghebi[2*] and S.M. Maddah[3]

1- M.Sc. graduated, Department of Biological Sciences and Technologies, Faculty of member, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biological Sciences and Technologies, Faculty of member, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: moraghebi@yahoo.com

3- Department of Biological Sciences and Technologies, Faculty of member, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: March 2022 Revised: December 2022 Accepted: January 2023

Abstract

Gastric cancer is a malignant tumor that is one of the most common types of cancer in the world and Iran. Plants are rich sources of a variety of antioxidant compounds which can be used to produce anti-cancer drugs. In this study, the antioxidant properties and cytotoxicity of *Ephedra major* Host. extract, collected from "Parandak" in Robat Karim city, Tehran province, were investigated on AGS gastric cancer cells. Ethanol and methanol hydroalcoholic extracts (80%) of plant vegetative shoots were extracted by soaking method. Phenolic content of the extracts was measured by Folin-Ciocalteu agent and their antioxidant activity was assessed using DPPH test. Also, the cytotoxicity degree of different concentrations of this plant extract on the AGS gastric cancer cells was evaluated at three times of 24, 48, and 72 hours using MTT method. *BCL2* gene expression change was measured using Real time-PCR. The results showed that the antioxidant properties and phenolic content of ethanol extract were higher than methanol one. The results of MTT test showed that with increasing concentration of ethanol extract, cell viability decreased and after 48 hours, IC_{50} was obtained 250 $\mu g.ml^{-1}$ of extract. The *BCL2* gene expression decreased in the extract treatment, although this decrease was not significant. Overall, the ethanol extract of the aerial shoots of this plant could inhibit the growth of gastric cancer cells, but did not have a significant effect on reducing the expression of *BCL2* anti-apoptotic gene.

Keywords: *Ephedra major* Host., *BCL2* gene expression, Gastric cancer, AGS cell line, Apoptosis.