

بررسی اثر سمیت عصاره متانولی *Artemisia absinthium* بر روی دودمان سلولی A2780 (سرطان تخمدان انسانی) و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی

سعیده خدنگ نیک‌فرجام^۱، جواد بهارآرا^{۲*}، خدیجه نژاد شاهرخ‌آبادی^۳

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۱/۱۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان تخمدان سومین سرطان شایع در میان زنان هست. گیاهان جنس *Artemisia* یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی می‌باشند؛ *Artemisia absinthium* از گونه‌های مهم این جنس است. مطالعه حاضر باهدف ارزیابی اثر سمیت سلولی و توانایی القای آپوپتوز عصاره متانولی *A. absinthium* در دودمان سلولی A2780 (سرطان تخمدان انسانی) انجام گردید.

مواد و روش کار: در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی پس از تهیه عصاره متانولی *A. absinthium* برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره *A. absinthium* بر روی تکثیر سلول‌های سرطانی رده A2780 از آزمون MTT استفاده شد؛ برای بررسی توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با عصاره *A. absinthium* از روش‌های رنگ‌آمیزی DAPI و آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد؛ تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3,9, p53" با فن Real-time PCR بررسی شد. داده‌های کمی حاصل توسط آزمون آماری "ANOVA" در سطح معنی‌داری " $p < 0.05$ " تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره متانولی *A. absinthium*، تکثیر سلول‌های سرطانی A2780 را به‌صورت وابسته به غلظت ($p < 0.001$) مهار می‌کند، مشاهدات مورفولوژیک حاصل از روش DAPI و نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیماری بود. بررسی نتایج Real-time PCR نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3,9, p53" در سطح معنی‌داری ($p < 0.001$) و ($p < 0.001$) در گروه‌های تیماری بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره متانولی *A. absinthium*، تکثیر سلول‌های سرطانی رده A2780 را مهار می‌کند و باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سرطان تخمدان، آپوپتوز، *Artemisia absinthium*

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره پنجم، ص ۳۲۸-۳۱۷، مرداد ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. تلفن ۰۵۱۲۸۴۳۷۰۹۲
Email: baharara78@gmail.com

مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده با تغییرات ژنتیکی متعدد است که به شکل تومورها و یا سایر شکل‌های رشد غیرطبیعی بافت دیده می‌شود؛ سلول‌های سرطانی توانایی تکثیر بسیار بالایی نسبت به سلول‌های طبیعی دارند و می‌توانند به بافت‌های مجاور حمله کنند و از این طریق به بافت‌ها و اندام‌های دورتر متاستاز دهند، سرطان بعد از بیماری‌های قلبی دومین عامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است (۱). بر اساس جدیدترین گزارش‌ها در سال ۲۰۲۰، ۱۹/۳

میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان گزارش شده است؛ برآورد شده است گزارش موارد جدید ابتلا به سرطان تا سال ۲۰۴۰ به حدود ۲۸/۴۰ میلیون نفر برسد (۲). در ایران سرطان دومین گروه بزرگ بیماری‌های غیر واگیر مزمن و سومین علت شایع مرگ پس از بیماری‌های قلبی، حوادث و سایر پدیده‌های طبیعی هست (۳).

سرطان تخمدان سومین سرطان شایع در میان زنان پس از سرطان‌های سینه و دهانه رحم می‌باشد؛ باین‌حال، سرطان

سرطان یک بیماری پیچیده با تغییرات ژنتیکی متعدد است که به شکل تومورها و یا سایر شکل‌های رشد غیرطبیعی بافت دیده می‌شود؛ سلول‌های سرطانی توانایی تکثیر بسیار بالایی نسبت به سلول‌های طبیعی دارند و می‌توانند به بافت‌های مجاور حمله کنند و از این طریق به بافت‌ها و اندام‌های دورتر متاستاز دهند، سرطان بعد از بیماری‌های قلبی دومین عامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است (۱). بر اساس جدیدترین گزارش‌ها در سال ۲۰۲۰، ۱۹/۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

با محدود کردن گلیکولیز و تسهیل تنفس میتوکندری، متابولیسم را کنترل می‌کند؛ در نتیجه، با متابولیسم نامنظم و غیرفعال شدن p53 در سلول‌های سرطانی فرآیند آپوپتوز از کار می‌افتد؛ سلول‌های سرطانی اغلب با بیان بیش‌از‌حد یا تثبیت پروتئین‌های خانواده ضد آپوپتوتیک Bcl-2، از آپوپتوز فرار می‌کنند؛ علاوه بر این، مکانیسم مشترک دیگری که به بقای سلول سرطانی کمک می‌کند غیرفعال کردن عوامل رونویسی محرک آپوپتوز مانند غیرفعال کردن ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند p53) است (۱۳)؛ در نتیجه امروزه بسیاری از استراتژی‌های درمانی بر اساس راه‌اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی استوار است (۱۴).

فرآورده‌های طبیعی نقش بسیار مهمی در کشف داروهای ضد سرطان دارند و به اثبات رسیده است که تعداد زیادی از این فرآورده‌های طبیعی دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشند، به طوری که در حال حاضر تقریباً ۸۰ درصد از داروهای ضد سرطان در حال حاضر؛ به صورت مستقیم یا غیرمستقیم از محصولات طبیعی تولید می‌شوند (۱۵). بسیاری از فرآورده‌های طبیعی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی عالی در برابر التهاب، ویروس‌ها، باکتری‌ها، تومورها و غیره می‌باشند (۱۶). همچنین برخی از مطالعات نشان‌دهنده اثرات ضد سرطانی برخی از این فرآورده‌های طبیعی؛ در شرایط آزمایشگاهی در برابر دودمان مختلف سرطانی بوده‌اند (۱۷). از زمان‌های بسیار قدیم، گیاهان منبع مهمی برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها بوده‌اند، این امر به این دلیل است که آن‌ها کارخانه‌های شیمیایی پیچیده‌ای هستند که به طور مداوم در حال تولید محصولات طبیعی هستند و می‌توانند منبع مؤثری برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها باشند، همچنین مشخص شده است که گیاهان دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی و بیولوژیکی هستند (۱۸). مکانیسم‌های مختلف ضد سرطانی در گیاهان دارویی شامل القاء فعالیت آنزیمی سوپر اکسید دیسموتاز، کاهش اکسیداسیون DNA، القاء آپوپتوز توسط توقف چرخه سلولی در فاز S و همچنین کاهش بیان پروتئین‌های ضد پیتوتیک Bcl-2 و Bcl-xL و کاهش بیان آنتی‌ژن تکثیر هسته‌ای می‌باشد، ترکیبات گیاهی همچنین بیان مهارکننده‌های چرخه سلولی مانند p53، p21، p27، BAD، BAX و سطح بیان پروتئین‌های کاسپازهای ۳، ۷، ۸ و ۹ را افزایش می‌دهند (۱۹).

گیاهان جنس *Artemisia* متعلق به خانواده Compositae (Asteraceae) یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی می‌باشد؛ که از حدود ۵۰۰ گونه در سراسر جهان تشکیل شده است، در ایران ۳۴ گونه شناخته‌شده از *Artemisia* وجود دارد؛ *Artemisia absinthium* از جمله گونه‌های مهم این جنس است؛ گیاهان

تخمندان مهم‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در بین این سه نوع از سرطان می‌باشد، که میزان شیوع آن بین ۱۰ تا ۱۰۰ در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر است. همچنین این سرطان پنجمین سرطان کُشنده در زنان در سراسر جهان است (۴). تقریباً هر ساله ۲۲۵/۵۰۰ مورد سرطان تخمدان تشخیص داده می‌شود و از این تعداد ۱۴۰/۲۰۰ نفر فوت می‌کنند (۵). سرطان تخمدان در میان زنان ایرانی هشتمین سرطان شایع است؛ میزان بقای پنج‌ساله بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در ایران ۶۱ درصد تخمین زده می‌شود (۶). سرطان تخمدان به دلیل نداشتن علائم خاص و تشخیص دیر هنگام، از جمله کُشنده‌ترین نوع سرطان‌های زنان محسوب می‌شود و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی که بیماری به مراحل پیشرفته رسیده است تشخیص داده شده و عمدتاً غیرقابل درمان می‌باشد بنابراین، شناسایی عوامل ایجاد و نشانه‌های اولیه سرطان تخمدان برای تشخیص به موقع و مدیریت درمان این بیماری ضروری است (۷). مصرف قرص‌های پیشگیری از بارداری، بستن لوله‌ها، داشتن سابقه خانوادگی سرطان تخمدان و سینه، عوامل هورمونی، داشتن سابقه اندومتزیوز و غیره ریسک ابتلا به سرطان تخمدان را افزایش می‌دهند (۸). درمان مرسوم سرطان تخمدان شامل برداشتن توده توموری توسط جراحی به همراه شیمی‌درمانی کمکی می‌باشد (۹). آزمایش‌های بالینی نشان می‌دهند که شیمی‌درمانی نقش مهمی در درمان سرطان تخمدان دارد و رشد سلول‌ها را مهار می‌کند و باعث از بین رفتن سلول‌های توموری می‌شود؛ با این حال، محققان دریافته‌اند که استفاده مداوم از داروهای شیمی‌درمانی دارای معایب خاصی از جمله سمیت و مقاومت دارویی است؛ متأسفانه، این معایب مهم‌ترین عواملی هستند که باعث عدم موفقیت شیمی‌درمانی و عود مجدد تومور می‌شود (۱۰). بنابراین، یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان تخمدان که کمتر سمی اما مؤثرتر و ایمن‌تر باشند از اهمیت زیادی برخوردار است؛ از این رو، به کارگیری ترکیبات مؤثر فرآورده‌های گیاهی همچون گیاهان دارویی به منظور مهار فرآیند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی؛ امروزه به عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان است که دارای اثرات جانبی و هزینه کمتری می‌باشند؛ مطرح شده است (۱۱).

در شرایط پاتولوژیک، به‌ویژه سرطان، سلول‌ها توانایی خود را برای مرگ ناشی از آپوپتوز از دست می‌دهند که منجر به تکثیر بی‌رویه می‌شود، سلول‌های سرطانی غالباً دارای بیان بیش‌از‌حد بسیاری از پروتئین‌هایی هستند که نقش مهمی در مقاومت در برابر فعال شدن آبشار آپوپتوتیک دارند (۱۲). متابولیت‌های سلولی می‌توانند عملکرد پروتئین‌های پروآپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک را تنظیم کنند، به طور مثال p53 تنظیم‌کننده آپوپتوز است، همچنین

تهیه و کشت سلول‌های رده A2780:

رده سلولی A2780 (سلول‌های سرطانی تخمدان انسانی) از انستیتو پاستور ایران (NCBI Code: C454) تهیه شد و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک؛ کشت داده شد.

تهیه عصاره متانولی *Artemisia absinthium*:

گیاه *Artemisia absinthium* (FUMH) با کد شناسایی ۴۵۹۵۲ از هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد؛ برای تهیه عصاره متانولی *A. absinthium* ابتدا اندام‌های هوایی گیاه خشک و سپس پودر شد، سپس به ازای هر یک گرم از پودر گیاه؛ ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد؛ در طی این مدت مخلوط روزی ۳ بار به‌خوبی هم زده شد؛ پس از گذشت ۷۲ ساعت مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ واتمن صاف شد و در نهایت عصاره گیری توسط دستگاه "Rotary Evaporator" انجام شد؛ برای تهیه استوک اصلی جهت تیمار سلول‌ها، ۰/۰۰۱ گرم از عصاره تام متانولی *A. absinthium* وزن شد و در ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد، سپس با محیط کشت به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد؛ جهت ساخت غلظت‌های تیماری از استوک اصلی از فرمول $N1V1=N2V2$ استفاده شد (۲۲).

آزمون MTT جهت تعیین سمیت سلولی:

به‌منظور بررسی تأثیر سمیت عصاره متانولی *A. absinthium* بر روی تکثیر سلول‌های A2780 از آزمون MTT استفاده شد؛ برای این کار ابتدا تعداد 4×10^3 عدد از سلول‌ها؛ بعد از شمارش توسط رنگ‌آمیزی تریپان به لو؛ در یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد، بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها؛ سلول‌های A2780 با دی‌متیل سولفوکسید "DMSO" (حلال عصاره *A. absinthium*) به‌عنوان گروه شاهد آزمایشگاهی (sham) و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی *A. absinthium* تیمار شدند؛ بعد گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به محیط سلول‌ها اضافه شد، سپس پلیت کشت سلول‌ها برای مدت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد؛ سپس، مایع رویی سلول‌ها را خارج شد و مقدار ۸۰ میکرولیتر؛ دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد؛ در نهایت پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفوتومتر "EPOCH" منتقل شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

جنس *Artemisia* و ترکیبات فعال حاصل از آن؛ به‌عنوان داروهای ضد سرطانی، ضد مالاریا، آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک، ضد اسپاسم، ضدالتهای، ضد میکروبی و غیره بررسی شده‌اند؛ تحقیقات نشان داده است که عصاره برخی از گونه‌های *Artemisia* دارای فعالیت سیتوتوکسیکی و اثر آپوپتوزی در شرایط آزمایشگاهی در برابر رده‌های سلولی سرطانی و مدل‌های حیوانی سرطانی می‌باشد و در مقابل دارای سمیت کم و حتی بی‌تأثیر در برابر سلول‌های طبیعی می‌باشد (۲۰ و ۲۱).

در این راستا؛ Shafi و همکاران در سال ۲۰۱۲؛ به بررسی نقش عصاره *A. absinthium* در مهار تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سینه؛ دودمان‌های MDA-MB-231 و MCF-7 پرداختند، نتایج این مطالعات نشان‌دهنده اثرات ضد تکثیری عصاره *A. absinthium* بر روی سلول‌های سرطانی و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی در هر دو رده سلولی بود (۲۲). Choi و Kim در سال ۲۰۱۳؛ اثر عصاره متانولی هشت گونه مختلف *Artemisia* را بر روند تکثیر سلول‌های سرطانی سینه انسانی رده MCF-7 بررسی کردند و نشان دادند که عصاره تمام هشت گونه *Artemisia* باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۳). در سال ۲۰۱۸؛ Lian و همکاران فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه "*Artemisia vulgaris* (mugwort)" در برابر رده سلولی HCT-15 (سرطان کولون انسانی) بررسی کردند و نشان دادند که عصاره این گیاه به‌صورت وابسته به غلظت دارای اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشد و باعث مهار رشد این سلول‌ها می‌شود (۲۴).

هدف از این پژوهش تجربی؛ بررسی اثر سمیت و توانایی القاء آپوپتوز عصاره متانولی *Artemisia absinthium* بر روی رده سلولی A2780 (سرطان تخمدان) و همچنین ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3,9, p53" می‌باشد.

مواد و روش کار

مواد

محیط کشت RPMI "Gibco"؛ FBS، "Bio-IDEA"؛ Iran؛ USA؛ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین-پنی‌سیلین؛ "Bio-IDEA"؛ Iran؛ تریپسین "Bio-IDEA"؛ Iran؛ محلول تریپان به لو "Bio-IDEA"؛ Iran؛ پودر MTT "Sigma-Aldrich"؛ USA؛ رنگ DAPI "Sigma-Aldrich"؛ USA؛ کیت Annexin V- "Abcam"؛ UK؛ کیت استخراج RNA "Pars tous"؛ Iran؛ کیت سنتز cDNA "Pars tous"؛ Iran؛ سایبرگرین "Pars tous"؛ Iran

"Staining / Detection Kit (ab14085)" استفاده شد به این صورت که ابتدا سلول‌های A2780 در پلیت ۶ خانه کشت شدند و بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها؛ سلول‌ها با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium* تیمار شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ سلول‌ها توسط تریپسین از کف پلیت جدا و به درون ایندروف منتقل شدند و سپس سانتریفوژ انجام شد، با خارج کردن محیط رویی، طبق پروتکل کیت به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه شد و سپس ۵ میکرولیتر آنکسین V و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به هر نمونه اضافه شد؛ در نهایت نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی آنکوبه شدند و سپس نمونه‌های به دست آمده با دستگاه فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

فن Real-time PCR

مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت "Pars tous" صورت گرفت و برای اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج شده، میزان غلظت RNA به صورت کمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر "EPOCH" سنجیده شد؛ در ادامه سنتز cDNA طبق پروتکل کیت "Pars tous" صورت گرفت و در نهایت تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3, 9, p53" در سلول‌های A2780؛ در گروه‌های تیماری (غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره متانولی *A. absinthium*)؛ توسط دستگاه "Bio-Rad CFX96 RT-PCRs" و نرم افزار "Bio-Rad CFX Manager" بررسی شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در فن Rael-time PCR به شرح زیر است:

درصد سلول‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار}}$$

تیمار = درصد سلول‌های زنده

بعد از مشخص شدن نتایج حاصل از آزمون MTT تنها از غلظت‌های مؤثر گروه‌های تیماری (غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ (غلظت مهاری "IC₅₀") و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره متانولی *A. absinthium* به مدت ۲۴ ساعت)؛ در سایر روش‌های آزمایشگاهی استفاده شد.

رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI:

برای رنگ آمیزی هسته سلول‌ها، بررسی آپوپتوز، بررسی میزان تراکم و یا قطعه قطعه شدن کروماتین در هسته سلول‌های تیمار شده و مقایسه آن با گروه کنترل از روش رنگ آمیزی DAPI استفاده شد؛ برای این کار، در ابتدا یک کاور اسلیپ استریل در کف هر چاهک پلیت ۶ خانه قرار داده شد، سپس سلول‌های A2780 بر روی کاور اسلیپ‌ها کشت داده شدند؛ بعد از گذشت زمان مناسب از کشت و چسبیدن سلول‌ها به کاور اسلیپ‌ها به آرامی از گوشه هر چاهک پلیت؛ محیط کشت کامل برای گروه کنترل و محیط‌های تیماری برای گروه‌های تیماری اضافه شد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ محیط رویی تمامی گروه‌ها برداشته شد و مقدار یک میلی لیتر متانول، به عنوان فیکساتور سلولی به پلیت اضافه شد و در نهایت سلول‌ها تحت اثر رنگ DAPI قرار گرفتند و تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

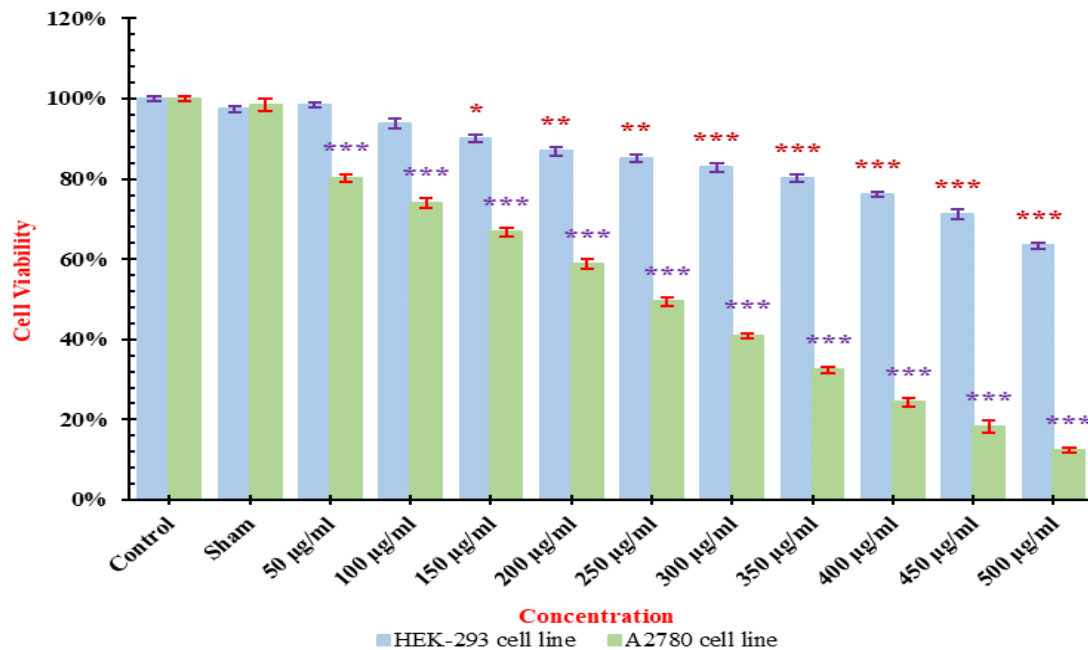
آزمون Annexin V-FITC

از این آزمون به منظور تعیین مرگ سلولی استفاده شد؛ جهت انجام این آزمون از کیت "Annexin V-FITC Apoptosis"

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده در فن Rael-time PCR

Gene	Sens	Antisense
GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACC	TTGCTGTAGCCAAATTCGTT
BAX	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT
Caspase 3	AGACAGACAGTGGTGTGATG	GTTCATCCAGTCGCTTTGTGC
Caspase 9	CCAGAGATTCGCAAACCAGAG	CAATGTGAACTTCTGCCGTGA
p53	TTGCCGTCCCAAGCAATGGA	TCTGGGAAGGGACAGAAGATG

روش تجزیه و تحلیل آماری:

این صورت که با افزایش غلظت عصاره *A. absinthium* تکثیر

سلول‌های سرطانی A2780 به طور قابل توجهی مهار می‌شود و نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را ایجاد می‌کند. با تعیین غلظت مهاری "IC₅₀" مشخص شد که عصاره *A. absinthium* با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی رده A2780 شده است. همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT برای بررسی اثر عصاره *A. absinthium* بر روی رده سلولی نرمال HEK-293 نشان داد که عصاره *A. absinthium* دارای اثر سمیت کمتری بر روی رده سلولی HEK-293 نسبت به رده سرطانی A2780 می‌باشد.

داده‌های آماری حاصل از این مطالعه، در نرم‌افزار "SPSS (Version 26)" و به کمک آزمون آماری واریانس یک‌طرفه "ANOVA" در سطح معنی‌داری " $p < 0.05$ " تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شده‌اند. برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی؛ تمام آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل آزمون MTT:

نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره *A. absinthium* به صورت وابسته به غلظت منجر به مهار تکثیر سلول‌ها می‌شود؛ به

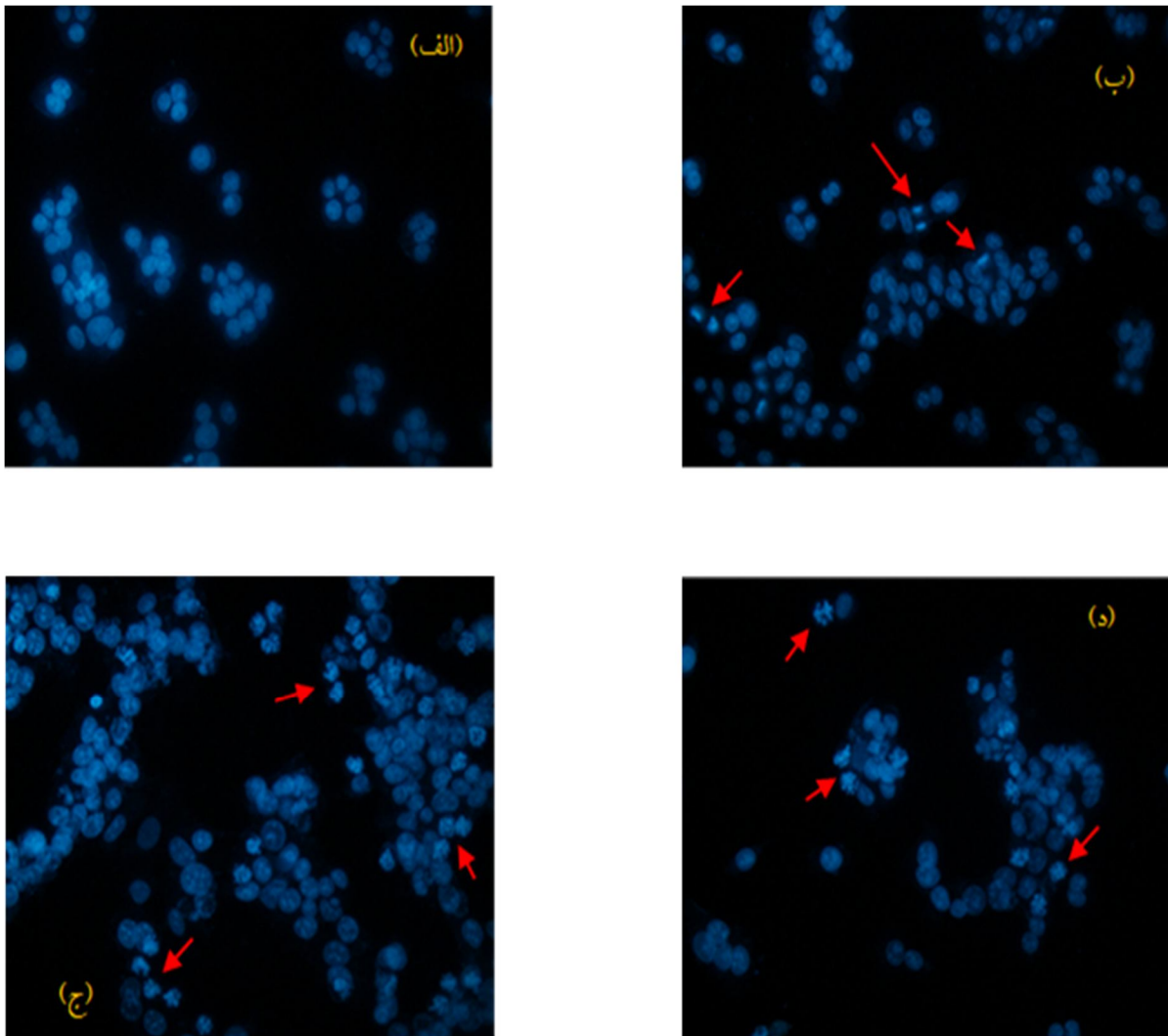
شکل (۱): مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با عصاره *A. absinthium* در غلظت‌های

مختلف در زمان ۲۴ ساعت. ($p < 0.0001^{***}$) ($p < 0.001^{**}$) ($p < 0.05^*$)

آپوپتوز در این سلول‌ها باشد. همچنین بررسی تغییرات مورفولوژیک نشان داد که برخی از سلول‌های تیمار شده؛ قطعه‌قطعه شدن کروماتینی قابل توجهی را دارا می‌باشند، که این تغییرات مورفولوژیکی نشان‌دهنده آسیب سلولی پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار می‌باشد.

نتایج رنگ‌آمیزی DAPI:

همان‌طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که در سلول‌های A2780، پس از تیمار و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هسته‌ها قطعه‌قطعه شده‌اند، شکل هسته‌ها از حالت نرمال خارج شده، که می‌تواند نشانه‌ای برای وقوع



شکل (۲): مشاهده هسته سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی DAPI بعد از گذشت ۲۴ ساعت.

(الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (ج) تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر

میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (د) تیمار با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*.

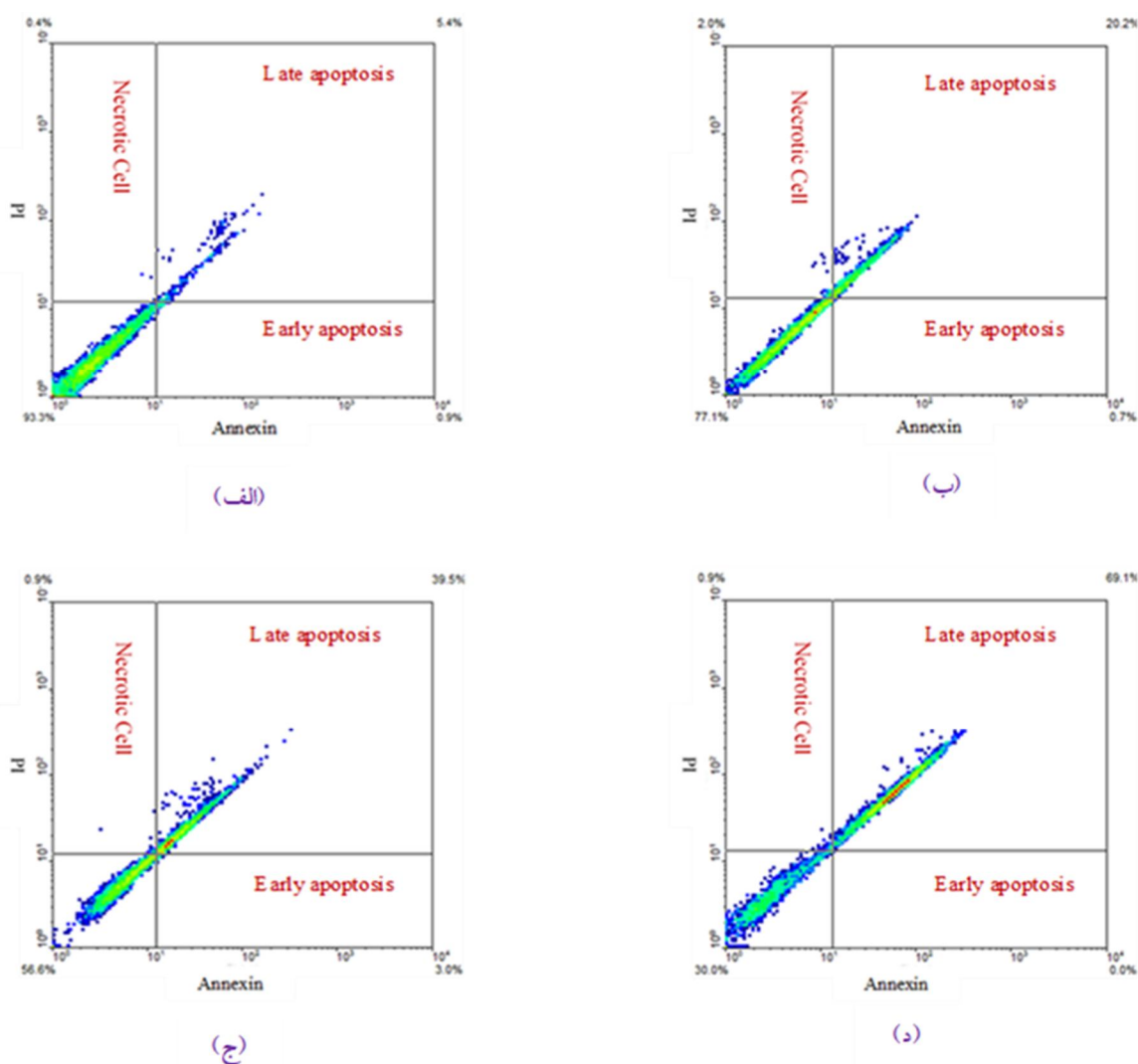
نوک پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌هایی می‌باشد که دچار آپوپتوز شده‌اند.

درشت‌نمایی تصاویر: ۴۰۰ X

نتایج تست Annexin V-FITC:

برای انجام این تست، سلول‌های سرطانی رده A2780 با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و سپس با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شدند. همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود؛ نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان می‌دهد، درحالی‌که در گروه کنترل حدود ۹۳ درصد از سلول‌های سرطانی A2780 زنده می‌باشند، در گروه تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* درصد سلول‌های

زنده به ۷۷/۱ درصد کاهش یافته است و در حدود ۲۷ درصد از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند؛ همچنین در گروه تیماری با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* درصد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند در حدود ۴۲ درصد می‌باشد و در گروه تیماری با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* شاهد بیشترین مرگ سلولی به صورت آپوپتوز ثانویه هستیم، به طوری‌که در این گروه، در ۶۹/۱ درصد از سلول‌های سرطانی A2780 آپوپتوز ثانویه رخ داده است و میزان سلول‌های زنده به ۳۰ درصد کاهش پیدا کرده است.



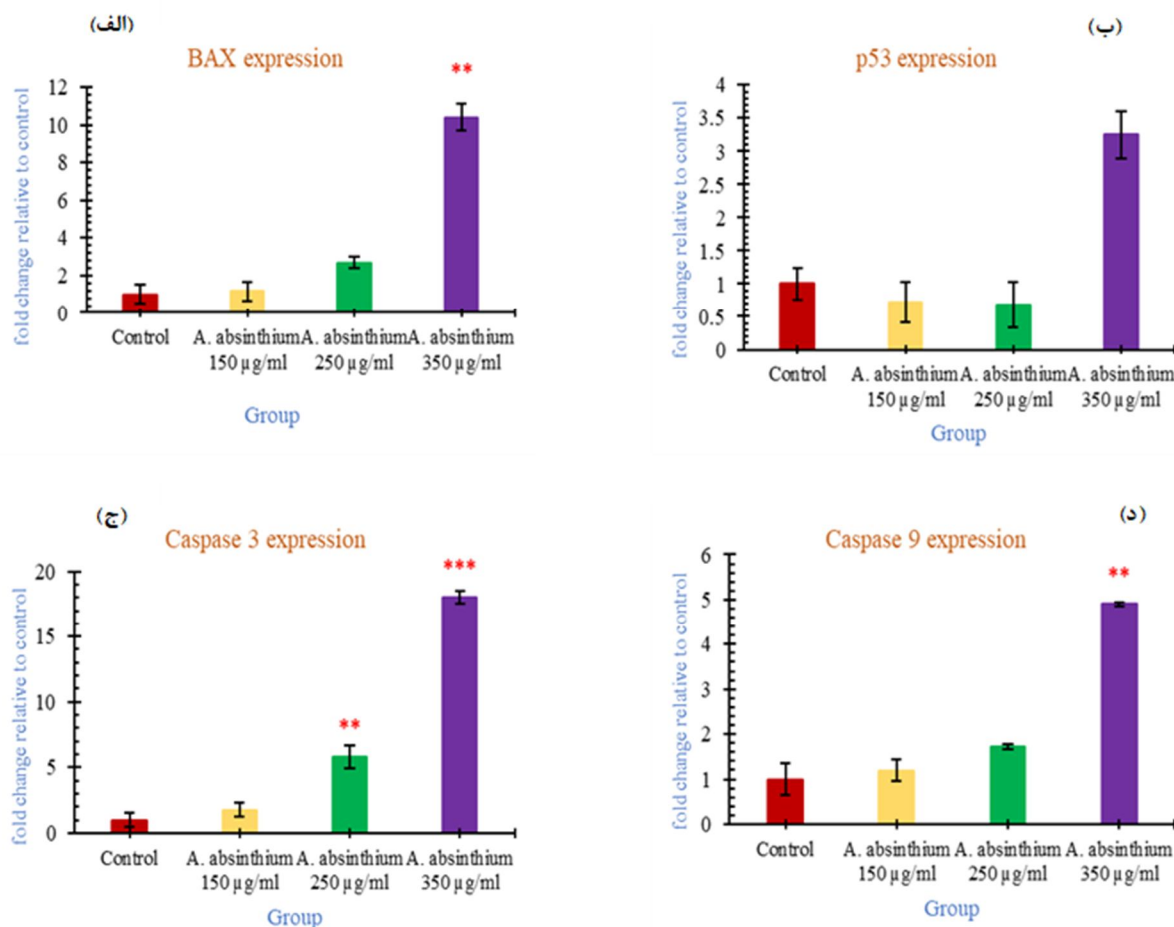
شکل (۳): آنالیز فلوسایتومتری

(الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (ج) تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (د) تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*

"BAX" نیز در گروه‌های تیماری با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است، بررسی نتایج فن Real-time PCR نشان می‌دهد که بیان ژن "p53" در گروه تیماری با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است؛ که این امر نشان‌دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در القاء آپوپتوز و بالابردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های A2780 تحت تیمار می‌باشد.

نتایج بررسی بیان ژن‌ها توسط فن Real-time PCR

همان‌طور که در شکل شماره ۴ مشاهده می‌شود، بیان ژن‌های "Caspase 3" و "Caspase 9" در گروه‌های تیماری با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که این امر نشان‌دهنده القاء آپوپتوز در این گروه‌ها است؛ بیشترین افزایش بیان ژن‌های کاسپاز در گروه تیماری با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* بوده است؛ همچنین بیان ژن



شکل (۴): بررسی میزان تغییرات در بیان ژن‌های آپوپتوزی توسط فن Real-time PCR ($p < 0.001$) ($p < 0.0001$) (الف) بیان ژن BAX؛ (ب) بیان ژن p53؛ (ج) بیان ژن Caspase-3؛ (د) بیان ژن Caspase-9

به غلظت باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی سینه می‌شوند، همچنین نشان دادند که فعالیت سیتوتوکسیک گونه‌های *A. absinthium* و *A. vulgaris* از سایر گونه‌های دیگر بیشتر است (۲۵)؛ نتایج حاصل از آزمون MTT اجرا شده در این پژوهش نیز نشان‌دهنده اثرات مهاری عصاره *A. absinthium* به صورت وابسته به غلظت بر روند تکثیر سلول‌های سرطانی رده A2780 بود. در سال ۲۰۱۸ Kim و همکاران؛ اثرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری عصاره اتانولی برگ‌های گیاه *Artemisia capillaris* در برابر رده‌های سلولی سرطانی Huh7 و HepG2 را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره *A. capillaris* تکثیر این سلول‌ها را به شدت سرکوب می‌کند و با افزایش سطح بیان کاسپاز-۳ باعث القای آپوپتوز در سلول‌های Huh7 و HepG2 می‌شود (۲۶)؛ که با تمامی نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو می‌باشد. بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته‌ها با رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل، تغییرات

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی بعد از تهیه عصاره متانولی *A. absinthium*؛ برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره *A. absinthium* بر روی تکثیر سلول‌های سرطانی رده A2780 از آزمون MTT استفاده شد؛ برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار از رنگ‌آمیزی DAPI و آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد و در نهایت تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3,9, p53" با فن Real-time PCR بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره متانولی *A. absinthium* می‌تواند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی رده A2780 شود. در سال ۲۰۱۴ Gordanian و همکاران به بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره پنج گونه مختلف *Artemisia* (از جمله *A. absinthium*) در برابر رده سرطانی MCF-7 پرداختند؛ نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره پنج گونه مختلف *Artemisia* به صورت وابسته

A2780 تحت تیمار شود؛ با توجه به نتایج حاصل از Real-time PCR می‌توان بیان کرد که عصاره *A. absinthium* از توانایی خوبی جهت بالا بردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی برخوردار است و در آینده می‌تواند با مطالعات و تحقیقات کامل‌تر؛ بیشتر مورد توجه قرار گیرد. Tayarani-najaran و همکاران در سال ۲۰۱۶؛ به بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره دی کلرومتانی *Artemisia biennis* در برابر رده‌های سلولی K562 و HL-60 پرداختند و نشان دادند که عصاره *A. biennis* باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود و با افزایش سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX باعث القای آپوپتوز در سلول‌های K562 و HL-60 می‌شود (۲۸)؛ که با نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در بالا بردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی هم راستا می‌باشد.

یافته‌های حاصل از این پژوهش تجربی نشان داد که استفاده از عصاره متانولی *A. absinthium* تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان رده A2780 را به طور قابل توجهی (در سطح معنی داری $p < 0.001$) مهار نموده و باعث القای آپوپتوز و بالا بردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی در این سلول‌ها می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه اساتید و کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح با کد مصوبه اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC.1399.155 همکاری داشتند تشکر می‌شود.

References

- Vassilev A, DePamphilis ML. Links between DNA replication, stem cells and cancer. *Genes (Basel)* 2017;8(2):1-33.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209-49.
- Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: A review article. *Iran J Public Health* 2018;47(3):309-16.

مورفولوژیکی دیده می‌شود؛ همان‌طور که در شکل شماره یک هم مشخص می‌باشد در گروه‌های تیماری هسته‌ها قطعه‌قطعه شده‌اند و از حالت نرمال خارج شده‌اند، که این امر می‌تواند نشانه‌ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد. نتایج تست Annexin V-FITC نشان داد، درحالی‌که درصد زنده‌بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۳/۳ درصد می‌باشد؛ این میزان در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* به ترتیب به ۷۷/۱، ۵۶/۶ و ۳۰ درصد کاهش داشته است؛ در نتیجه می‌توان بیان کرد عصاره *A. absinthium* توانایی خوبی برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تخمدان انسانی رده A2780 دارد. در سال ۲۰۱۷ Kim و همکاران توانایی القای آپوپتوز عصاره *Artemisia annua* را در رده سلولی HCT116 (سرطان کولون) بررسی کردند و با استفاده از آزمون Annexin V-FITC نشان دادند که در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره *A. annua* درصد سلول‌های آپوپتوتیک افزایش می‌یابد و همچنین تیمار با عصاره *A. annua* می‌تواند بیان ژن آنتی آپوپتیک Bcl-2 را کاهش و بیان ژن آپوپتوزی BAX را افزایش دهد و در نهایت نتیجه گرفتند که عصاره *A. annua* دارای توانایی القای آپوپتوز در رده سلولی HCT116 می‌باشد (۲۷)؛ تمامی نتایج تجربیات آزمایشگاهی حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان‌دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در القای آپوپتوز در رده سلولی A2780 بود.

نتایج Real-time PCR نشان داد که استفاده از عصاره متانولی *A. absinthium* می‌تواند باعث افزایش سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی "BAX, Caspase 3,9, p53" در سلول‌های سرطانی رده

- Ottevanger PB. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. *Semin Cancer Biol* 2017;44:67-71.
- Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-grade serous ovarian cancer: Basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *Int J Mol Sci* 2019;20(4):1-33.
- Rezaianzadeh A, Mokhtari AM, Hassanipour S, Maghsoudi A, Dehghani SL, Nazarzadeh M, et al. The age-standardized incidence rate of ovarian cancer in Iranian women: A systematic review and meta-analysis. *Middle East J Cancer* 2018;9(3):171-8.
- Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* 2019; 11:287-99.

8. Rasmussen CB, Kjaer SK, Albieri V, Bandera E V, Doherty JA, Høgdall E, et al. Pelvic inflammatory disease and the risk of ovarian cancer and borderline ovarian tumors: A pooled analysis of 13 case-control studies. *Am J Epidemiol* 2017;185(1):8–20.
9. Liu J, Bai J, Jiang G, Li X, Wang J, Wu D, et al. Anti-tumor effect of *Pinus massoniana* bark proanthocyanidins on ovarian cancer through induction of cell apoptosis and inhibition of cell migration. *PLoS One* 2015;10(11):1–15.
10. Zhang Y, Zhang Y. *Marsdenia tenacissima* extract inhibits proliferation and promotes apoptosis in human ovarian cancer cells. *Med Sci Monit* 2018; 24:6289–97.
11. Paramee S, Sookkhee S, Sakonwasun C, Na Takuathung M, Mungkornasawakul P, Nimlamool W, et al. Anti-cancer effects of *Kaempferia parviflora* on ovarian cancer SKOV3 cells. *BMC Complement Altern Med* 2018;18(1):1–13.
12. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer* 2015; 35:78–103.
13. Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 327:43–87.
14. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2015;16(6):2129–44.
15. Khalid EB, Ayman E, Rahman H, Abdelkarim G, Najda A. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumor Biol* 2016;37(11):14513–36.
16. Huang XM, Yang ZJ, Xie Q, Zhang ZK, Zhang H, Ma JY. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomed Pharmacother* 2019;117:109142.
17. Ziad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou MA, Mouse HA. More insights into the pharmacological effects of artemisinin. *Phyther Res* 2018;32(2):216–29.
18. Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *J Evidence-Based Complement Altern Med* 2017;22(4):982–95.
19. Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, Ardekan AP, Jouybari L, Daraei N, et al. Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019:1-51.
20. Taleghani A, Emami SA, Tayarani-najaran Z. *Artemisia* a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem* 2019;28:1-22.
21. Martínez-Díaz RA, Ibáñez-Escribano A, Burillo J, de las Heras L, del Prado G, Agulló-Ortuño MT, et al. Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110(5):693–9.
22. Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alshatwi AA, Jyothi A, et al. *Artemisia absinthium* (AA): A novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep* 2012;39(7):7373–9.
23. Choi E, Kim G. Effect of *Artemisia* species on cellular proliferation and apoptosis in human breast cancer cells via estrogen receptor-related pathway. *J Tradit Chinese Med* 2013;33(5):658–63.
24. Lian G, Li F, Yin Y, Chen L, Yang J. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15 human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *J BUON* 2018;23(1):73–8.
25. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Res Pharm Sci* 2014;9(2):91–6.
26. Kim J, Jung KH, Yan HH, Cheon MJ, Kang S, Jin X, et al. *Artemisia Capillaris* leaves inhibit cell proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med* 2018;18(1):1–10.

27. Kim EJ, Kim GT, Kim BM, Lim EG, Kim SY, Kim YM. Apoptosis-induced effects of extract from *Artemisia annua* Linné by modulating PTEN/p53/PDK1/Akt/signal pathways through PTEN/p53-independent manner in HCT116 colon cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2017;17(1):1–12.
28. Zahra Tayarani-Najaran F-SM, Nafiseh-Sadat Alamolhodaie MM, Emami SA. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia biennis* Willd. on K562 and HL-60 cell lines. *Iran J Basic Med Sci* 2016;20(21):167–71.

CYTOTOXIC EFFECTS OF *ARTEMISIA ABSINTHIUM* EXTRACT ON A2780 CELL LINE (OVARIAN CANCER) AND ALTERATION OF APOPTOTIC GENES EXPRESSION LEVELS

Saeedeh Khadang Nikfarjam¹, Javad Baharara^{2*}, Khadijeh Nejad Shahrokhbadi³

Received: 05 April, 2021; Accepted: 26 December, 2021

Abstract

Background & Aims: Ovarian cancer is the third most common cancer in women. *Artemisia* is one of the most commonly used medicinal plants, and *Artemisia absinthium* is one of the important species of this genus. The aim of this study was to evaluate the effect of cytotoxicity and the ability to induce apoptosis methanolic extract of *A. absinthium* in A2780 cell line (human ovarian cancer).

Materials & Methods: In this experimental study, methanolic extract of *A. absinthium* was prepared. MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effects of *A. absinthium* extract on A2780 cancer cell proliferation and DAPI staining and flow cytometry analysis were used to evaluate the ability to induce apoptosis in treated cells with *A. absinthium* extract. Changes in "BAX, Caspase 3,9, p53" genes expression were evaluated by Real-time PCR. Quantitative data were analyzed by one-way ANOVA at a significant level of $p < 0.05$.

Results: The MTT assay results showed that methanolic extract of *A. absinthium*, inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells in a concentration-dependent manner ($p < 0.001^{***}$). Morphological observation with DAPI staining and flow cytometry analysis results showed an increased percentage of apoptotic cells. The real-time PCR results showed an increase in the expression of apoptotic genes "BAX, Caspase 3,9, p53" in treatment groups $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

Conclusion: The results of this study showed that the methanolic extract of *A. absinthium* inhibits the proliferation of A2780 cancer cells and induces apoptosis in these cells.

Keywords: Ovarian cancer, Apoptosis, *Artemisia absinthium*

Address: Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Tel: +985138437092

Email: baharara78@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(5): 328 ISSN: 2717-008X

¹ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding Author)

³ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran