



## Investigating the role of FADD and c-FLIP genes in the induction of apoptosis by ethyl acetate extract of *Artemisia biennis* L. in the colorectal cancer cell line SW480<sup>1</sup>

Maedeh Bazgir Asb Rahani \* , Farah Farahani , Maryam Khoshsookhan Mozaffar

Master's student, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

### Abstract

**Objective:** Due to the resistance of some tumors to common treatments, attention to herbal antitumor drugs has increased. This study investigates the effect of ethyl acetate extract of *Artemisia biennis* L. on the expression of FADD and c-FLIP genes in SW480 colorectal cancer cells.

**Methods:** SW480 cells were treated with ethyl acetate extract of *Artemisia biennis* L. at concentrations of 25, 50, 100, and 200 µg/mL for 24, 48, and 72 hours. Cell viability was assessed by MTT assay and IC50 calculation, apoptosis rate by trypan blue staining, and expression of FADD and c-FLIP genes by Real-Time PCR. Statistical analysis of data was performed by ANOVA test.

**Results:** The results showed that ethyl acetate extract at higher concentrations and times significantly reduced cell viability; The highest inhibitory effect was observed at a concentration of 200 µg/ml and after 72 hours. Gene expression analysis also indicated a significant increase in FADD gene expression, while no significant change was observed in c-FLIP gene expression.

**Conclusion:** *Artemisia biennis* ethyl acetate extract has anticancer potential in the treatment of colorectal cancer by inducing apoptosis through increasing FADD expression. Further studies are necessary to identify the molecular mechanisms and active compounds.

**Keywords:** Apoptosis, Colorectal cancer, *Artemisia biennis* L., MTT, Gene expression, Real-Time PCR

---

<sup>1</sup> Received: 2024/07/17 ; Revised: 2024/09/09 ; Accepted: 2024/11/01 ; Published online: 2025/03/10



## بررسی نقش ژن FADD و c-FLIP در القای آپاپتوز توسط عصاره اتیل استات گیاه *Artemisia biennis* L. در رده سلولی SW480 سرطان کولورکتال<sup>۲</sup>

مائده بازگیر اسب راهانی ، \* فرح فراهانی ،  مریم خوش سخن مظفر

دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

### چکیده

**هدف:** با توجه به مقاومت برخی تومورها به درمان‌های رایج، توجه به داروهای گیاهی ضدتوموری افزایش یافته است. این مطالعه به بررسی تأثیر عصاره اتیل استات *Artemisia biennis* L. بر بیان ژن‌های FADD و c-FLIP در سلول‌های SW480 سرطان کولورکتال می‌پردازد.

**روش‌ها:** سلول‌های SW480 با عصاره اتیل استات گیاه *Artemisia biennis* L. در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. زنده‌مانی سلول‌ها با آزمون MTT و محاسبه IC50، میزان آپاپتوز با رنگ‌آمیزی تریپان بلو، و بیان ژن‌های FADD و c-FLIP با روش Real-Time PCR ارزیابی گردید. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون ANOVA انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که عصاره اتیل استات در غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر، موجب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها گردید؛ به طوری که بیشترین اثر مهاري در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد. بررسی بیان ژن‌ها نیز حاکی



از افزایش معنادار سطح بیان ژن FADD بود، در حالی که تغییر قابل توجهی در بیان ژن c-FLIP مشاهده نگردید. نتیجه‌گیری: عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* با القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان FADD، پتانسیل ضدسرطانی در درمان سرطان کولورکتال دارد. مطالعات بیشتر برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و ترکیبات فعال ضروری است.

کلمات کلیدی: آپپتوز، سرطان کولورکتال، *Artemisia biennis* L. MTT، بیان ژن، Real-Time PCR

#### ۱. مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer; CRC) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در جهان است که از اپیتلیوم روده بزرگ منشأ می‌گیرد و بالاترین میزان بروز و مرگ‌ومیر را در میان سرطان‌های دستگاه گوارش دارد (۱). بر اساس آمار سال ۲۰۲۳، حدود ۱۵۳۰۲۰ مورد جدید ابتلا و ۵۲۵۵۰ مورد مرگ در ایالات متحده گزارش شده است (۲). پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۴۰ شمار مبتلایان جدید و مرگ‌ومیر ناشی از CRC به ترتیب به ۳/۲ و ۱/۶ میلیون نفر در سطح جهان برسد (۳). همچنین افزایش قابل توجه بروز بیماری در افراد زیر ۵۰ سال، نگرانی‌های سلامت عمومی را برانگیخته است (۴). در ایران، سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع محسوب می‌شود و در سال ۲۰۲۲، ۱۲۸۹۹ مورد جدید ثبت گردید (۵). این آمار نشان‌دهنده بار قابل توجه این بیماری و ضرورت توسعه راهکارهای پیشگیری و درمان است.

گونه‌های مختلف گیاه *Artemisia* به دلیل دارا بودن ترکیبات زیستی با خواص ضدسرطانی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. مطالعات متعددی اثر عصاره‌ها و ترکیبات استخراج‌شده از این گیاه را بر سلول‌های سرطان کولورکتال بررسی کرده‌اند. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، اثر ترکیبات آرتیمیسینین (ART) و دی‌هیدروآرتیمیسینین (DHA) بر رده‌های سلولی SW480 و SW620 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ترکیبات، به ویژه در ترکیب با اسید لینولئیک و مهارکننده‌های انتقال آهن، اثرات سمی قوی‌تری بر سلول‌ها دارند (۶). در مطالعه‌ای دیگر، پلی‌فنول‌های استخراج‌شده از *Artemisia annua* موجب



القای آپاتوز در رده HCT116 بدون وابستگی به ROS شدند (۷). همچنین در سال ۲۰۲۵، عصاره متانولی *Artemisia herba-alba* بر رده‌های سلولی مختلف CRC از جمله SW480 اثر ضدسرطانی داشت و با مهار مسیر PI3K/AKT/mTOR باعث آپاتوز و توقف چرخه سلولی شد (۸).

مجموع این مطالعات شواهد قابل‌اتکایی در زمینه اثرات ضدتوموری گونه‌های مختلف *Artemisia* ارائه داده و رده سلولی SW480 را به‌عنوان مدلی مناسب برای بررسی مکانیسم‌های مرگ سلولی القا شده توسط ترکیبات گیاهی معرفی می‌کند. همچنین این نتایج مسیر را برای مطالعات آینده در خصوص ارتباط بین ترکیبات فعال این گیاه و بیان ژن‌های تنظیم‌کننده آپاتوز، نظیر FADD و c-FLIP، هموار می‌سازد.

ژن c-FLIP (Cellular FLICE-like Inhibitory Protein) یکی از بازدارنده‌های کلیدی مسیر آپاتوز است که با مهار کاسپاز-۸، از تشکیل کمپلکس سیگنال‌دهنده مرگ جلوگیری می‌کند. این ژن در بسیاری از تومورها، از جمله CRC، موجب مقاومت سلول‌ها در برابر درمان می‌شود. در سال ۲۰۰۵ نشان داده شد که سلول‌های SW480 بیان بالایی از c-FLIP دارند که این امر مقاومت آنها به آپاتوز را افزایش می‌دهد (۹). کاهش بیان c-FLIP توسط siRNA در سال ۲۰۰۷ القای آپاتوز مستقل از محرک‌های خارجی را در سلول‌های CRC نشان داد، در حالی که بیش‌بیان ایزوفورم بلند این ژن مقاومت به آپاتوز را افزایش داد (۱۰).

از سوی دیگر، ژن FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) تنظیم‌کننده کلیدی در مسیر آپاتوز در CRC و به ویژه در رده SW480 است. در سال ۲۰۰۹، افزایش بیان FADD موجب حساسیت بیشتر سلول‌ها به داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروراسیل و ارتقاء آپاتوز شد (۱۱). همچنین، مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ با استفاده از آدنوویروس حامل FADD، افزایش آپاتوز و کاهش رشد تومور در مدل‌های حیوانی را نشان داد (۱۲). جدیدترین مطالعه در سال ۲۰۲۳ نشان داد که مهار آنزیم FucT-8 باعث افزایش فعال‌سازی FADD و کاسپاز-۸ و افزایش مرگ سلولی القا شده توسط TRAIL در رده‌های SW480 و SW620 می‌شود (۱۳). این داده‌ها نقش محوری FADD در تنظیم آپاتوز و اثربخشی درمان CRC را تأیید می‌کنند.

با وجود پیشرفت‌ها در بررسی اثر ترکیبات گیاهی بر مسیرهای آپاتوز در CRC، هنوز گزارشی درباره تأثیر عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. بر بیان ژن‌های FADD و c-FLIP در رده SW480 منتشر نشده است. پژوهش حاضر به‌عنوان نخستین مطالعه تجربی در این زمینه، به بررسی اثر این عصاره بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی، شاخص آپاتوز و بیان ژن‌های کلیدی در مسیر آپاتوز می‌پردازد. نتایج این تحقیق می‌تواند گامی نوین در توسعه درمان‌های طبیعی و هدفمند سرطان کولورکتال باشد.



## ۱-۲. تهیه عصاره گیاهی

گیاه افسنتین (*Artemisia biennis* L.) از مناطق شمالی ایران جمع‌آوری و در سایه و جریان هوا خشک و سپس پودر شد. جنس و گونه گیاه موردنظر در دانشکده داروسازی و توسط متخصصان فارماکوگنوزی مورد تأیید قرار گرفت. پودر خشک‌شده گیاه *Artemisia biennis* L. در محلول آب-الکل (۵۰:۵۰) به مدت ۷۲ ساعت خیسانده (Maceration) شد. پس از صاف‌سازی، حلال با استفاده از دستگاه روتاری تبخیرکننده (Rotary evaporator) حذف گردید (۱۴). عصاره حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

## ۲-۲. کشت رده سلولی SW480

رده سلولی SW480 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در فلاسک‌های کشت سلولی تحت شرایط استریل (هود لامینار) در محیط کشت DMEM با گلوکز پایین، تکمیل‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین-استرپتومایسین، کشت داده شد (۱۵).

## ۳-۲. تیمار سلولی

سلول‌ها در چاهک‌های ۹۶ تایی با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک قرار گرفتند و با عصاره اتیل‌استات *A. biennis* در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند (۱۶).

## ۴-۲. آزمون زنده‌مانی سلولی (MTT)

پس از تیمار، سلول‌ها با محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محیط رویی جمع‌آوری و رسوب فورمازان با DMSO حل شد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیت‌خوان اندازه‌گیری گردید (۱۷). میزان IC50 با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ محاسبه شد.

## ۵-۲. تعیین شاخص آپاتوز

شاخص آپاتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan blue) تعیین گردید (۱۸). این رنگ تنها به سلول‌هایی با غشای آسیب‌دیده (سلول‌های مرده) وارد می‌شود؛ سلول‌های زنده شفاف و سلول‌های مرده به رنگ آبی در زیر میکروسکوپ دیده شدند. سلول‌های تیمار شده با تریپسین جدا شده، با رنگ تریپان بلو رنگ‌آمیزی و با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ شمارش شدند. شاخص آپاتوز بر اساس نسبت سلول‌های آپاتوتیک به کل سلول‌ها محاسبه شد.

## ۶-۲. استخراج RNA و سنتز cDNA



پس از تعیین IC50، RNA با استفاده از کیت Samzol™ استخراج و cdNA با کیت شرکت پارس طوس سنتز شد.

## ۷-۲. واکنش Real-Time PCR

بیان ژنهای FADD و c-FLIP با استفاده از Real-Time PCR و کیت real Q-plus 2x Master Mix Green انجام گرفت. ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌داری استفاده شد (۱۹). پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای مورد بررسی طراحی شدند که توالی آنها در جدول ۱ ارائه شده است.

## ۸-۲. تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تقریبی LSD در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

## ۳. یافته‌ها

### ۱-۳. تأثیر عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. بر زنده‌مانی سلول‌های SW480

نتایج آزمون MTT نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولورکتال رده SW480 پس از تیمار با عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافت. کاهش زنده‌مانی در غلظت‌های بالاتر و دوره‌های طولانی‌تر تیمار به‌طور معناداری بیشتر شد. بالاترین درصد زنده‌مانی پس از تیمار با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره طی ۲۴ ساعت، معادل ۱۱۲/۰۴ درصد بود. اما پس از ۷۲ ساعت تیمار، زنده‌مانی سلول‌ها به ۶۵/۳۹ درصد کاهش یافت (جدول ۲). این نتایج نشان‌دهنده وابستگی اثر عصاره به غلظت و مدت زمان تماس با سلول‌ها بود.

تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA نشان داد که تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به مدت ۷۲ ساعت، کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد ( $p < 0.01$ ) (جدول ۳). همچنین آزمون مقایسه‌ای LSD تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت در همین غلظت نشان داد (جدول ۴).

### ۲-۳. مقادیر IC50

مقادیر IC50 در زمان‌های مختلف تیمار محاسبه شدند. در تیمار ۲۴ ساعته، مقدار IC50 برابر با ۳۴۵/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این مقدار در زمان ۴۸ ساعت افزایش یافت و به ۴۹۷/۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. در تیمار ۷۲ ساعته، مقدار IC50 کاهش یافت و به ۱۴۱/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید (نمودار ۱).

### ۳-۳. شاخص آپاتوز



بر اساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، میزان سلول‌های مرده در تیمارهای مختلف افزایش یافت. در این آزمون، بیشترین شاخص آپاتوز، معادل ۳۱ درصد، در تیمار با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در مدت ۲۴ ساعت مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت (نمودار ۲).

### ۳-۴. تغییرات بیان ژن‌های FADD و c-FLIP

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر آپاتوز، سطح بیان ژن‌های FADD و c-FLIP با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. بیان ژن FADD در سلول‌های تیمار شده با عصاره افزایش یافت. بیشترین میزان افزایش بیان FADD معادل ۱/۹۴ برابر نسبت به گروه کنترل، در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد. در زمان ۲۴ ساعت، میزان افزایش ۱/۲۱ برابر بود که از نظر آماری معنادار نبود (نمودار ۳). بیان ژن c-FLIP در هیچ‌یک از زمان‌های تیمار، تغییر معناداری نشان نداد. در تیمار ۷۲ ساعته، بیان این ژن ۱/۳ برابر و در ۲۴ ساعت، ۱/۱۵ برابر نسبت به کنترل گزارش شد (نمودار ۴).

### ۴. بحث

در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات طبیعی و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان درمان‌های مکمل و جایگزین در سرطان، به‌دلیل عوارض جانبی کمتر، در دسترس بودن و هزینه‌ی پایین‌تر، توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است (۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره اتیل‌استات گیاه *Artemisia biennis* L. تأثیر قابل توجهی در کاهش زنده‌مانی و افزایش آپاتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال SW480 داشت.

نتایج حاصل از آزمون MTT در این مطالعه نشان داد که عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. به‌صورت وابسته به دوز و زمان، زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولورکتال SW480 را کاهش می‌دهد، به‌طوری‌که تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نسبت به ۲۴ ساعت، کاهش چشمگیرتری در بقاء سلول‌ها ایجاد کرد. این الگوی کاهش زمان-وابسته، با یافته‌های گزارش شده توسط Rinner و همکاران (۲۰۲۲) نیز هم‌راستا است (۶). در آن مطالعه، مشتقات آرتمیسینین در شرایط کشت فیزیولوژیک باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های SW480 به‌صورت وابسته به زمان شدند و مقادیر IC50 با افزایش زمان تیمار کاهش یافتند. هر دو مطالعه نشان می‌دهند که ترکیبات مشتق شده از گونه‌های *Artemisia* دارای اثرات ضدتکثیری تجمع‌ی هستند که در زمان‌های طولانی‌تر تیمار، به‌طور مؤثرتری بروز می‌یابند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که مدت تماس سلول با عصاره نقش کلیدی در القای مرگ سلولی ایفا می‌کند و توجه به پارامتر زمان، در طراحی کاربردهای درمانی بالقوه این ترکیبات، از اهمیت بالایی برخوردار است.

نتایج آزمون ANOVA و تحلیل‌های آماری نشان داد که تیمار سلول‌های SW480 با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *Artemisia biennis* L. به مدت ۷۲ ساعت، کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد. این



کاهش زنده‌مانی به وضوح وابسته به مدت زمان تماس سلول با عصاره بود، به طوری که تفاوت معناداری بین ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار مشاهده شد. روند کاهش پیوسته زنده‌مانی بیانگر اثر تجمعی عصاره و مکانیسم‌های مرتبط با آپاپتوز و مرگ سلولی است.

مطالعات پیشین نیز اثرات سیتوتوکسیک و آپاپتوزی عصاره‌های *Artemisia biennis* L. را در رده‌های سلولی مختلف تایید کرده‌اند؛ برای مثال، Khodarahmi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تیمار سلول‌های K562 و HL-60 با عصاره این گیاه باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی و القای آپاپتوز به ویژه پس از ۴۸ ساعت تیمار شد. اگرچه رده‌های سلولی این دو مطالعه متفاوت است، اما الگوی وابستگی به زمان و دوز در کاهش بقای سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده در هر دو مطالعه مشابه است که اهمیت مدت زمان تماس سلول با عصاره را به عنوان عامل کلیدی در افزایش اثرات ضدسرطانی برجسته می‌کند (۲۱).

مقادیر IC50 محاسبه شده در مطالعه حاضر نیز بیانگر وابستگی تأثیر عصاره به مدت زمان تیمار بود؛ به گونه‌ای که پس از ۲۴ ساعت مقدار IC50 برابر با ۳۴۵/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، این مقدار در ۴۸ ساعت افزایش یافت و به ۴۹۷/۷۴ رسید، اما پس از ۷۲ ساعت کاهش چشمگیری به ۱۴۱/۳۹ گزارش شد. این الگوی تغییرات نشان‌دهنده اثر تجمعی عصاره و کاهش نیاز به غلظت بالاتر برای القای اثر ضدسرطانی با افزایش زمان تماس است که با یافته‌های Khodarahmi و همکاران (۲۰۱۷) نیز همسو است (۲۱).

همچنین، رنگ‌آمیزی تریپان بلو افزایش معنی‌دار میزان سلول‌های آپاپتوتیک را در تیمار با عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. در رده SW480 نشان داد؛ به طوری که بیشترین میزان آپاپتوز (۳۱ درصد) در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت مشاهده شد. این یافته با نتایج کاهش زنده‌مانی سلولی آزمون MTT هم‌راستا بوده و نشان‌دهنده نقش کلیدی القای آپاپتوز در اثر ضدسرطانی عصاره است.

نتایج حاصل از افزایش بیان ژن FADD در سلول‌های SW480 پس از تیمار با عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. نشان داد که این بیان به صورت زمان‌وابسته افزایش یافته و پس از ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به کنترل بیشتر بوده است. این افزایش بیان، احتمال نقش FADD در القای آپاپتوز از طریق مسیر گیرنده مرگ را تقویت می‌کند. یافته حاضر با مطالعات قبلی هم‌راستا است؛ به عنوان نمونه، He و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که بیان بیش از حد FADD نه تنها موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شد، بلکه در مدل حیوانی نیز منجر به کاهش چشمگیر رشد تومور گردید. همچنین، در مطالعه Nguyen و همکاران (۲۰۲۴)، القای FADD در سلول‌های کولورکتال موجب تقویت مسیرهای آپاپتوتیک وابسته به کاسپاز-۸ شد و حساسیت سلول‌ها به درمان را افزایش داد (۱۲، ۲۲). بر این اساس، می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش بیان FADD در پاسخ به تیمار با عصاره *A. biennis* یکی از مکانیسم‌های مؤثر در مهار رشد سلول‌های SW480 بوده و این ژن ممکن است به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در سرطان کولورکتال مطرح شود.

در مطالعه حاضر، مشاهده شد که تیمار سلول‌های SW480 با عصاره اتیل‌استات *A. biennis* منجر به افزایش جزئی و غیرمعنادار در بیان ژن c-FLIP شد؛ به طوری که پس از ۲۴ ساعت ۱/۱۵ برابر و پس از ۷۲ ساعت ۱/۳ برابر نسبت به کنترل



گزارش شد. این یافته نشان می‌دهد که عصاره، برخلاف تأثیر آشکار روی ژن‌های محرک آپتوز مانند FADD، تأثیری واضح بر مسیرهای مهاري آپتوز نداشته است. این نتایج با گزارشاتی همچون Li (۲۰۲۳) و Laudisi (۲۰۲۲) متفاوت است؛ آن‌ها افزایش معنی‌دار c-FLIP را به‌عنوان یک مکانیسم مقاومت سلولی در رده‌های کولورکتال معرفی کرده‌اند، به‌طوری‌که سطح بالای c-FLIP به مقاومت در برابر درمان‌های ضدسرطانی مرتبط شده است (۲۳، ۲۴). علاوه بر این، Zheng و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که کاهش یا مهار c-FLIP، حساسیت سلول‌های CRC را به مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده مانند TRAIL و Fas افزایش می‌دهد (۲۵). بنابراین، اگرچه عصاره اتیل‌استات با افزایش بیان FADD القای آپتوز را تسهیل کرد، اما عدم کاهش معنادار در بیان c-FLIP ممکن است محدودیت این عصاره در غلبه بر مکانیسم‌های مقاومت سلولی را نشان دهد. این نتایج اهمیت بررسی ترکیبی هدف‌گیری FADD و مهار c-FLIP را در طراحی راهکارهای درمانی آینده برجسته ساختند.

بر این اساس، می‌توان فرض کرد که مکانیسم مولکولی اثر ضدسرطانی این عصاره، عمدتاً از طریق افزایش مولکول‌های القاکننده مرگ سلولی مانند FADD اعمال شده است، در حالی‌که سطح بیان بازدارنده‌هایی مانند c-FLIP دستخوش تغییر قابل توجهی نگردیده است. این الگوی بیان ژنی، با کاهش زنده‌مانی سلول‌ها و افزایش شاخص آپتوز که در نتایج دیگر این مطالعه گزارش شد، هماهنگی نشان داد و نقش بالقوه FADD به‌عنوان یک هدف مولکولی برای درمان سرطان کولورکتال را تقویت نمود.

مجموع یافته‌ها نشان داد که عصاره اتیل‌استات *Artemisia biennis* L. توانست به‌صورت وابسته به دوز و زمان، موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولورکتال رده SW480 گردد و بدین ترتیب، اثرات ضدسرطانی قابل توجهی از خود بروز دهد. کاهش معنادار درصد زنده‌مانی سلول‌ها همراه با افزایش شاخص آپتوز در سلول‌های تیمار شده، مشاهده شد که این امر به‌وضوح نشان‌دهنده القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپتوز) بوده است. همچنین، افزایش بیان ژن FADD که یکی از اجزای کلیدی مسیر گیرنده مرگ محسوب می‌شود، ثبت گردید. این تغییرات بیان ژنی، مؤید فعال شدن کمپلکس DISC و به دنبال آن، فعال‌سازی کاسپازهای آغازگر و اجرایی، به‌ویژه کاسپاز-۸ و کاسپاز-۳، بوده است که منجر به وقوع آپتوز در سلول‌های سرطانی شد.

در مقابل، بیان ژن c-FLIP که به‌عنوان یکی از بازدارنده‌های اصلی مسیر گیرنده مرگ شناخته می‌شود، تغییر معناداری را نشان نداد. این یافته نشان داد که عصاره اتیل‌استات، اثرات ضدسرطانی خود را عمدتاً از طریق تحریک مسیرهای القاکننده آپتوز و نه از طریق مهار بازدارنده‌های این مسیر اعمال کرده است. چنین الگویی می‌تواند نشان‌دهنده نقش انتخابی ترکیبات موجود در عصاره در تحریک مولکول‌های فعال‌ساز آپتوز باشد، بدون آن‌که مستقیماً مسیرهای مهاري را هدف قرار دهد.

این نتایج با یافته‌های پیشین در زمینه اثرات ضدسرطانی عصاره‌های گیاهان خانواده *Artemisia*، به‌ویژه در زمینه القای آپتوز از طریق مسیرهای گیرنده مرگ، همخوانی داشت. علاوه بر این، نتایج حاضر، پایه و شواهد مهمی را برای انجام تحقیقات آینده در خصوص شناسایی ترکیبات زیست‌فعال مسئول این اثرات فراهم نمود. با توجه به اثربخشی مشاهده‌شده و ویژگی‌های وابسته به



زمان و دوز، عصاره اتیل استات *A. biennis* می‌تواند به‌عنوان یک کاندید بالقوه در توسعه درمان‌های مکمل یا داروهای جدید علیه سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گیرد.

#### ۵. نتیجه گیری

در مطالعات حاضر نشان داده شد که عصاره اتیل استات گیاه *Artemisia biennis* L. به طور معناداری موجب کاهش زنده‌مانی و افزایش آپتوز در سلول‌های سرطان کولورکتال SW480 گردید. این اثرات عمدتاً از طریق افزایش بیان ژن FADD که نقش کلیدی در القای مسیرهای آپتوز وابسته به گیرنده مرگ ایفا می‌کند، تحقق یافت. تغییرات غیرمعنادار در بیان ژن c-FLIP نیز ممکن است به تسهیل اثرات ضدسرطانی عصاره کمک کرده باشد. بنابراین، عصاره اتیل استات *A. biennis* به‌عنوان یک عامل بالقوه ضدسرطانی جهت درمان سرطان کولورکتال مطرح گردید.

#### ۶. قدردانی

در پایان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و همچنین مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم بابت حمایت از این پروژه و فراهم آوردن امکانات مورد نیاز تشکر می‌گردد.



پيوست

جدول (۱): اطلاعات ژن‌ها و پرایمر آن‌ها

<b>GAPDH</b>	<b><u>NM_001289746.2</u> Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 4, Mrna</b>				
product length	93				
Forward primer	1	TCACTGTTCTCTCCCTCCG	Template	270	.....
		19			288
Reverse primer	1	GCCCAATACGACCAAATCC	Template	362	.....
		19			344
<b>c-FLIP</b>	<b><u>NM_003879.7</u> Homo sapiens CASP8 and FADD like apoptosis regulator (CFLAR), transcript variant 1, Mrna</b>				
product length	126				
Forward primer	1	CCTCACCTTGTTTCGGACTA	Template	714	.....
		20			733
Reverse primer	1	CTCCTTGCTTATCTTGCCTC	Template	839	.....
		20			820
<b>FADD</b>	<b><u>NM_003824.4</u> Homo sapiens Fas associated via death domain (FADD), Mrna</b>				
product length	168				
Forward primer	1	CCTGGGGAAGAAGACCTGT	Template	438	.....
		19			456



Reverse primer 1 GATTCTCAGTGACTCCCGC Template 605 .....  
19 587

جدول (۲): اثر عصاره اتیل استات گیاه *A.biennis* بر رده سلول سرطانی SW480، طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

تیمار عصاره اتیل استات ( $\mu\text{g/ml}$ )	میانگین درصد زیست پذیری رده سلول سرطانی SW480		
	Time /H		
	24	48	72
25	$100.49 \pm 7.74$	$93.41 \pm 11.02$	$94.11 \pm 16.01$
50	$106.47 \pm 10.51$	$103.37 \pm 5.51$	$99.27 \pm 8.97$
100	$106.35 \pm 9.03$	$92.26 \pm 8.85$	$77.42 \pm 5.31$
200	$112.04 \pm 3.98$	$88.61 \pm 10.10$	$65.39 \pm 2.13$



جدول (۳): آنالیز ANOVA اثر عصاره اتیل استات گیاه *A.biennis* بر رده سلول سرطانی SW480 طی زمان‌های مختلف (در سطح احتمال ۰/۰۱)

تیمار عصاره اتیل استات (µg/ml)		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
25	Between Groups	91.269	2	45.634	.104	.903
	Within Groups	2628.531	6	438.089		
	Total	2719.800	8			
50	Between Groups	78.335	2	39.168	.177	.842
	Within Groups	1329.324	6	221.554		
	Total	1407.659	8			
100	Between Groups	1255.115	2	627.558	3.331	.106
	Within Groups	1130.399	6	188.400		
	Total	2385.514	8			
200	Between Groups	3263.423	2	1631.711	13.317	.006
	Within Groups	735.185	6	122.531		
	Total	3998.608	8			

جدول (۴): آنالیز حداقل تفاوت میانگین‌ها (LSD) اثر عصاره اتیل استات گیاه افسنتین بر رده سلول سرطانی SW480 طی زمان‌های مختلف (در سطح احتمال ۰/۰۱)

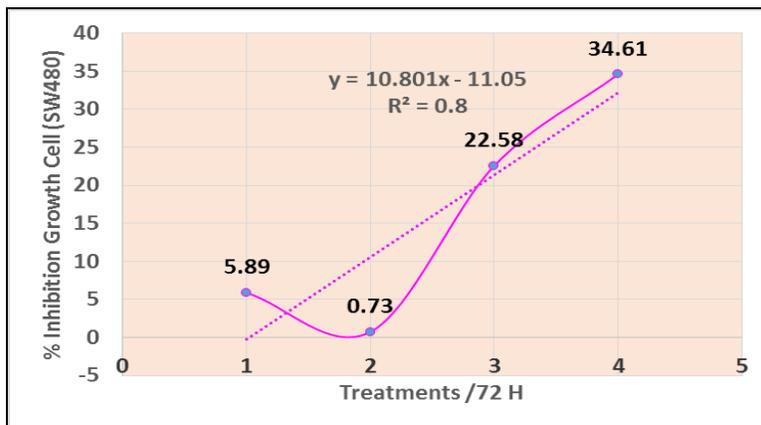
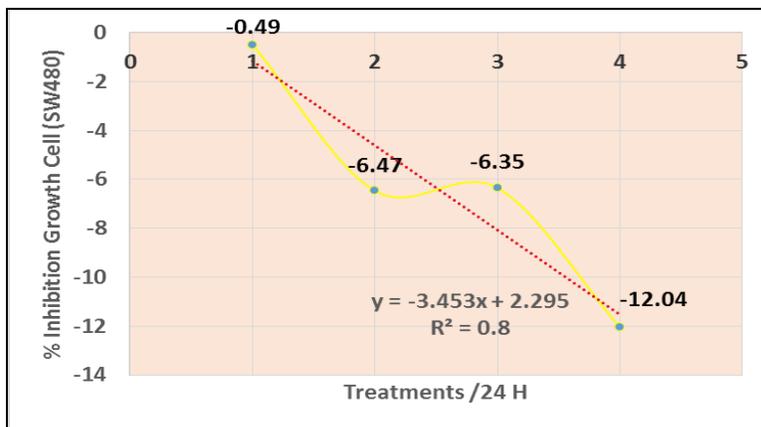
تیمار فراكشن اتیل استات (µg/ml)	(I(26)H)	(J) Time (H)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
25	24	48	7.07667	17.08974	.693
		72	6.38000	17.08974	.722

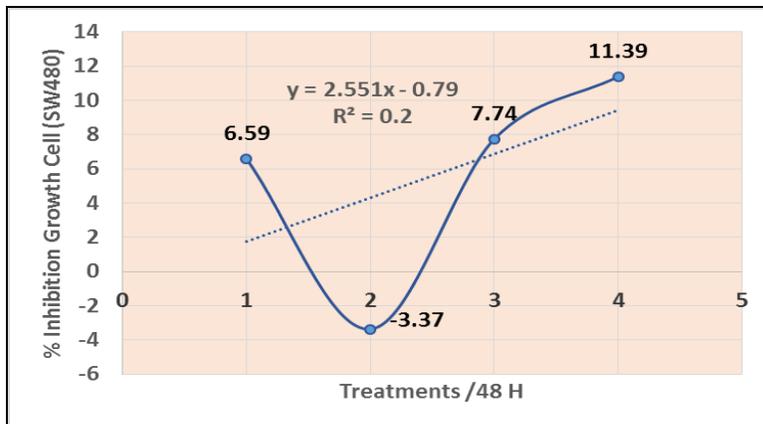


				4	
	48	24	-7.07667	17.0897	.693
				4	
		72	-.69667	17.0897	.969
				4	
	72	24	-6.38000	17.0897	.722
				4	
		48	.69667	17.0897	.969
				4	
50	24	48	3.10000	12.1533	.807
				0	
		72	7.20333	12.1533	.575
				0	
	48	24	-3.10000	12.1533	.807
				0	
		72	4.10333	12.1533	.747
				0	
	72	24	-7.20333	12.1533	.575
				0	
		48	-4.10333	12.1533	.747
				0	
100	24	48	14.09000	11.2071	.255
				3	
		72	28.92333	11.2071	.042
				3	
	48	24	-14.09000	11.2071	.255
				3	
		72	14.83333	11.2071	.234
				3	
	72	24	-28.92333	11.2071	.042
				3	
		48	-14.83333	11.2071	.234
				3	
200	24	48	23.42667	9.03810	.041
		72	46.64333*	9.03810	.002
	48	24	-23.42667	9.03810	.041
		72	23.21667	9.03810	.042
	72	24	-46.64333*	9.03810	.002
		48	-23.21667	9.03810	.042

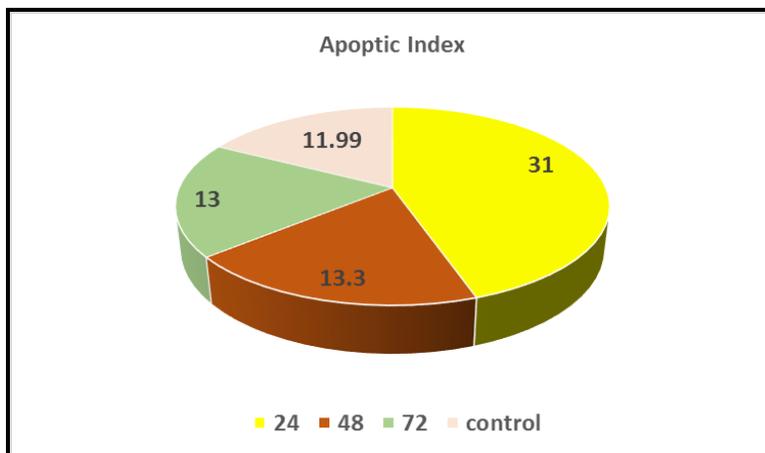
\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

نمودار ۱: تعیین  $IC_{50}$  برای سلول‌های تحت تیمار با عصاره اتیل‌استات

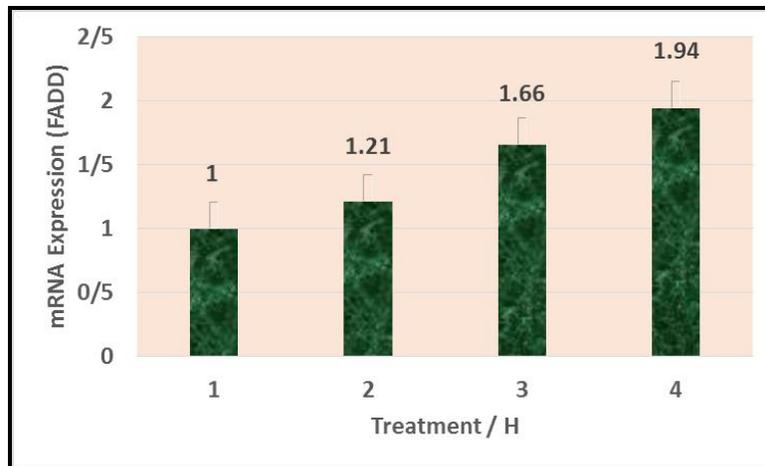




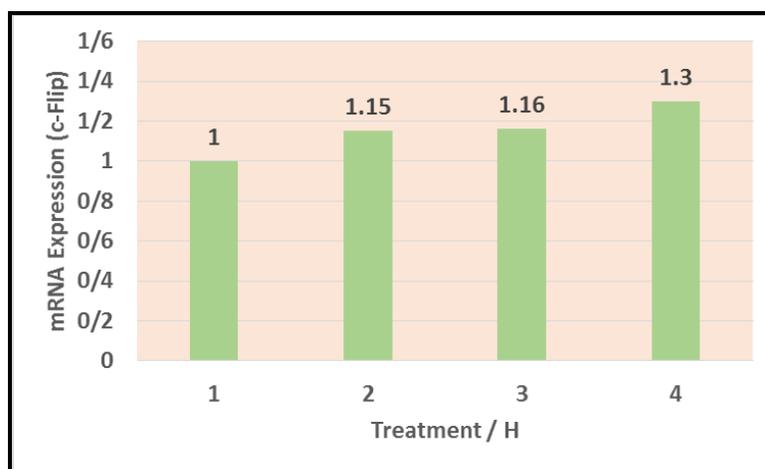
نمودار ۲: میانگین شاخص آپتوتیک رده سلول سرطانی SW480 تحت تاثیر عصاره اتیل استات گیاه *A.biennis* طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



نمودار ۳: مقایسه بیان ژن FADD در رده سلول سرطانی SW480 تحت تاثیر عصاره اتیل استات گیاه *A.biennis* طی زمان‌های کنترل (۱)، ۲۴ ساعت (۲)، ۴۸ ساعت (۳) و ۷۲ ساعت (۴)



نمودار ۴: مقایسه بیان ژن c-FLIP در رده سلول سرطانی SW480 تحت تاثیر عصاره اتیل استات گیاه *A.biennis* طی زمان-های کنترل (۱)، ۲۴ ساعت (۲)، ۴۸ ساعت (۳) و ۷۲ ساعت (۴)





۱. Danpanichkul P, Suparan, K., Tothanasrungraj, P., Dejvajara, D., Rakwong, K., Pang, Y., Barba, R., Thongpiya, J., Fallon, M. B., Harnois, D., Lui, R. N., Wallace, M. B., Yang, J. D., Roberts, L. R., & Wijarnprecha, K. . Epidemiology of gastrointestinal cancers: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021.
۲. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. CA: a cancer journal for clinicians. 2023;73(3):233-54.
۳. Morgan E, Arnold, M., Gini, A ,Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. . 2023.
۴. Spaander MCW, Zauber, A. G., Syngal, S., Blaser, M. J., Sung, J. J., You, Y. N., & Kuipers, E. J. Young-onset colorectal cancer. Nature reviews. Disease primers. 2023.
۵. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229-63.
۶. Otto-Slusarczyk D, Mielczarek-Puta MGn, W. The Real Cytotoxic Effect of Artemisinin on Colon Cancer Cells in a Physiological Cell Culture Setting. How Composition of the Culture Medium Biases Experimental Findings. Medium Biases Experimental Findings Pharmaceuticals 2021, 14.۲۰۲۱ ۹۷۶ ,
۷. Jung EJ, Paramanatham A, Kim HJ, Shin SC, Kim GS, Jung JM, et al. Artemisia annua L. Polyphenol-Induced Cell Death Is ROS-Independently Enhanced by Inhibition of JNK in HCT116 Colorectal Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2021;22.(۳)
۸. Bou Malhab LJ, Harb AA, Eldohaji L, Taneera J, Al-Hroub HM, Abuhelwa A, et al. Exploring the Anticancer Effect of Artemisia herba-alba on Colorectal Cancer: Insights From Eight Colorectal Cancer Cell Lines. Food Sci Nutr. 2025;13(1):e4715.



۹. Xing Bao-cai SWEF. Expression of FLIP in human colon carcinomas: A new mechanism of immune evasion. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2005;Volume , ۱۷ pages 193–198.
۱۰. Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KM, Redmond KM, et al. c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer research*. 2007;67(12):5754-62.
۱۱. Anning Yin 1 YJ, Xianfeng Zhang, Hesheng Luo. Overexpression of FADD enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells *Med Oncol* 2010 Jun;27(2):397-405. 2009.
۱۲. He X, Peng X, Liu Y, Zhang X, Li H, Yin H. Adenovirus-mediated overexpression FADD induces a significant antitumor effect on human colorectal cancer cells both in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64(6):31-5.
۱۳. Rubén López-Cortés 1, Isabel Correa Pardo 2, Laura Muinelo-Romay 3,† , Almudena Fernández-Briera 4,‡, Gil-Martín aE. Core Fucosylation Mediated by the FucT-8 Enzyme Affects TRAIL-Induced Apoptosis and Sensitivity to Chemotherapy in Human SW480 and SW620 Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2023, 24.۲۰۲۳ ۱۱۸۷۹ ,
۱۴. Hatami T, Emami SA, Miraghaee SS, Mojarrab M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2014;13(2):551.
۱۵. Rubén López-Cortés 1, Laura Muinelo-Romay 2,†, Almudena Fernández-Briera 3,‡, Emilio Gil-Martín 3,\* ,‡ Inhibition of  $\alpha(1,6)$ fucosyltransferase: Effects on Cell Proliferation, Migration, and Adhesion in an SW480/SW620 Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Int J Mol Sci* 2022 Jul 30;23(15):8463. 2022.
۱۶. Khan MS, et al. Ethyl Acetate Extracts of Two *Artemisia* Species: Analyses of Phenolic Profile and Anticancer Activities Against SW-480 Colon Cancer Cells. 2019.
۱۷. Marjan ZargarnezhadMarjan Zargarnezhad ORCID1, Seyedeh Nasim MirbahariSeyedeh Nasim MirbahariSeyedeh Nasim Mirbahari ORCID2 ,Rahim AhmadiRahim AhmadiRahim Ahmadi ORCID1. The Cytotoxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on SW480 Cell Lines and Measurement of Nitric Oxide in Cell Culture Medium. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology*. 2022.
۱۸. Filippo Piccinini ۱ # AT, Chiara Arienti 1 , Alessandro Bevilacqua 2. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay .*Biol Proced Online*.۲۰۱۷
۱۹. Young-Mi Lee HC, Ryeo-Ok Kim, Soyeon In, Se-Joo Kim & Eun-Ji Won. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in chemical exposed and at different age's brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Sci Rep* 11, 23691 (2021). 2021.
۲۰. Moalemzadeh S, Rajabbeigi E, Montazeri M. Investigation on cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* on SKBr3cell line. *Cell and Tissue Journal*. 2019;10(4):252-60.
۲۱. Mohammad Ali Khodarahmi MAG, Mohammad Ali Moosavi, Mohammad Ali Shaterian, Mohammad Ali Riazi. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia biennis* Willd. on K562 and HL-60 cell lines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017.
۲۲. Nguyen QM, Dupré PF, Berchel M, Ghanem R, Jaffrès PA, d'Arbonneau F, et al. BSV163/DOPE-mediated TRAIL gene transfection acts synergistically with chemotherapy



against cisplatin-resistant ovarian cancer. *Chemical Biology & Drug Design*. 2024;103(1):e14357.

۲۳. Li T, Li T, Zhang H, Liu C, Li M, Wang C, et al. Maintenance of the Expression of c-FLIP(L) by Hsp70 to Resist Licochalcone A-Induced Anti-Colorectal Cancer Effect through ERK-Mediated Autophagy Induction. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023;28(12):325.

۲۴. Laudisi F, Pacifico T, Maresca C, Luiz-Ferreira A, Antonelli S, Ortenzi A, et al. Rafoxanide sensitizes colorectal cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2022;155:113794.

۲۵. Zheng Y, Zhong G, He C, Li M. Targeted splicing therapy: new strategies for colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1222932.