فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۲ ص. ۵۴-۴۷

مقاله پژوهشی

اثر ضد سرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) بر رده سلولی سرطان پستان *(MCF-7)*

سیده نرگس نعیمی[۱]، زهرا کشتمند*[۱،*]، اردشیر حسام پور[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): zkeshtmand2001@gmail.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/JDB.2022.1959151.1304 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.3.3

چکیده

شیوع سرطان و عوارض جانبی روش‌های درمانی، علاقه رو به رشدی برای استفاده از گیاهان به عنوان یک منبع امیدوارکننده درمان فراهم کرده است. استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی از دیرباز حائز اهمیت بوده و بسیاری از این گیاهان دارویی دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی *(Artemisia turcomanica)* بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و اثر آن بر بیان ژن‌های *bcl2* و *Bax* می‌باشد. در این مطالعه تجربی، اثر عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه ترکمنی بر زنده‌مانی و بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* در سلول‌های سرطان پستان *MCF-7* بررسی شد. بدین منظور سلول‌های سرطان پستان رده*MCF-7* کشت شده و توسط عصاره هیدروالکلی درمنه ترکمنی(با غلظت‌های مختلف)، به مدت ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تاثیر عصاره بر زنده‌مانی سلول‌ها با روش*MTT* ارزیابی‌شد. در ادامه استخراج *RNA* انجام و پس از سنتز *cDNA* ، میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* با روش *Real-time PCR* سنجیده شد. این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان،زنده‌مانی سلول‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل داشتند. همچنین نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل تغییر یافت.نتایج نشان داد که عصاره گیاه درمنه ترکمنی دارای اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک بر رده سلولی *MCF-7* می‌باشد، به‌طوری که با انجام مطالعات بیشتر می‌توان از عصاره این گیاه به عنوان یک محصول بیولوژیک ضد سرطانی در درمان سرطان بهره برد.

کلیدواژه‌ها: درمنه ترکمنی، زنده مانی، آپوپتوز، رده سلولی سرطان پستان (MCF-7).

مقدمه

سرطان به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جوامع امروزی شناخته شده و داروهای متعددی جهت درمان این بیماری معرفی شده اند ولی هنوز اکثر سرطان‌های شایع قابل کنترل نبوده و این بیماری هزینه‌های بسیار زیادی به بیمار و جامعه تحمیل می‌کند [۱, ۲].

عامل اصلی در ایجاد و پیشرفت سرطان هنوز به طور دقیق مشخص نشده است ولی اطلاعات موجود حاکی از آن است که اختلالات متابولیسمی در بافت و اختلالات ایمنی احتمالا در ایجاد و تشدید این بیماری تاثیرگذار می‌باشند. به علاوه

اختلالات متابولیسمی در تولید و دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن از عوامل مهمی است که می‌تواند بر سلول‌های سرطانی تاثیرگذار باشد [۴،۳].

آپوپتوز یک فرایند بیوشیمیایی هماهنگ است که به مرگ سلولی منتهی می‌شود و به سه نوع آپوپتوز، شبه آپوپتوز و شبه نکروز تقسیم بندی می‌شود، مهم‌ترین حالت مرگ برنامه‌ریزی شده آپوپتوز است که نقش کلیدی را درتکامل، سیستم ایمنی و زندگی طبیعی موجودات پرسلولی بازی می‌کند[۵]. چندین ژن در تولید آپوپتوزیس نقش مهمی را ایفا می‌کنند، از جمله: *Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bak, Bad, Bim،P53* و *Mcl-1 [۶]*. بهم خوردن سرعت وقوع پدیده آپوپتوز چه به صورت افزایشی و چه کاهشی باعث ایجاد سرطان یا بیماری‌هایی مختلف می‌شود. شناسایی این فرایند سلولی و راه‌های کنترل آن در دستیابی به داده‌های ضدسرطانی و ضدالتهابی راه گشاست [۷]. امروزه درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می‌باشد که اغلب موارد سلول‌های سالم نیز از بین میروند که این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از عصاره‌های گیاهی است [۸].

درمان دارویی یکی از پایه‌های اصلی درمان سرطان است، به نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به ویژه گیاهان دارویی، سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی، جهت دستیابی به داروهای نوین در درمان سرطان می‌باشد [۹, ۱۰].

داروهای مورد استفاده در طب سنتی از نظر منشاء به ۳ دسته‌ی گیاهی، معدنی و جانوری تقسیم می‌گردند. علاوه براین، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که عوامل موثر موجود در این ترکیبات طبیعی همچنین قادر به مهار تکثیر و رشد تومور از طریق دیگر مسیرهای فیزیولوژیک مثل مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی هستند [۱۱،۱۲].

بالغ بر ۲۵ هزار ماده شیمیایی گیاهی (فیتوکمیکال) در گیاهان وجود دارند که دارای اثرات و خواص بیولوژیک هستند [۱۳]. یکی از پرکاربردترین گیاهان به عنوان گیاهان دارویی جنس آرتمیزیا از خانواده کاسنی‌ها می‌باشد که از نوع گیاهان بوته‌ای است [۱۴].

آرتمیزیا گیاهی از شاخه *plantae* راسته *Asteraceae* تحت خانواده‌ی *Asteroideae* و جنس *Artemisia* است که در فارسی به آن درمنه گفته می‌شود [۱۵]. آرتمیزیا دارای گونه‌های متعددی است به طوری که از میان ۲۰۰۰ گونه آرتمیزیا، ۳۴ گونه در ایران وجود دارد که درمنه ترکمن (*Artemisia turcomanica*) یکی از گونه‌های بومی ایران بوده و دارای محتوای بالایی فلاونوئید، ترپنوئید و همچنین دارای ماده شیمیایی به نام تانن است که در درمان سرطان‌ها نقش بسزایی دارند [۱۶]. تاکنون مطالعات بسیار گسترده‌ای در زمینه‌ی ترکیبات شیمیایی گونه‌های مختلف جنس ارتمیزیا به عمل آمده است [۱۷]. آرتمیزیا به دلیل ترکیبات شیمیایی و فتوشیمیایی در سراسر جهان مورد توجه بوده و به دلیل اجزا و ترکیبات منحصربه فرد از جمله آرتمیزین، ترکیبات آروماتیك و یا مشتقات فنل در داروسازی، طب سنتی و مواد آرایشی و صنعتی مورد استفاده می‌باشد [۱۵]. ترکیبات موثر آن آلفاتیوجون، کامفور، بتاتیوجون، ۱ و ۸ سینئول می‌باشد. گیاه آرتمیزیا در درمان بیماری‌های مختلف انگلی، باکتریایی، قارچی، التهابی و توموری نقش دارد و قادر به القای آپوپتوزیس و فعالیت ضدتکثیری آنتی‌اکسیدانتی نیز می‌باشد [۱۸]. تاکنون مطالعات مختلفی جهت بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است. در سال ۲۰۱۱، تقی‌زاده و همکاران به بررسی اثر ضدتکثیری عصاره گونه‌های مختلف جنس درمنه در ایران بر روی رده‌های سلول سرطانی معده، رحم و سینه پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گونه‌های مختلف جنس درمنه خاصیت ضدتکثیری از خود نشان می‌دهند [۱۹].

با توجه به اینکه در تحقیقات نشان داده شده است که عصاره برخی از گونه‌های آرتمیزیا دارای فعالیت سیتوتوکسیکی در شرایط آزمایشگاهی در برخی از رده‌های سلول سرطانی و مدل حیوانی سرطانی می‌باشد و نیز سمیت کم و حتی بی تأثیر در سلول‌های طبیعی را دارا می‌باشد و وجود ترکیباتی چون آرتمیزین در برخی از گونه‌های این گیاه عامل ضدرگزایی و فعالیت ضدسرطانی و دارای اثر آپوپتوزی است [۲۰, ۲۱] واز سویی سرطان در حال

حاضر یک معضل کشنده‌ی جهانی است، به گونه‌ای که این بیماری کشنده دومین علت مرگ و میر در جهان و سومین علت مرگ و میر در ایران است[۲۲]. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره درمنه ترکمنی بر رده سلول سرطان پستان *MCF-7* می‌باشد.

روش‌ها

تهیه گیاه

گونه درمنه‌ی ترکمنی *(Artemisia turcomanica)* از موسسه‌ی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه‌شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه ترکمنی

گیاه درمنه ترکمنی از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، گیاه را ابتدا در جریان هوا قرار داده، سپس در سایه کاملا خشک و با آسیاب پودر گردید. از پودر تهیه شده برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر گیاه درمنه‌ی ترکمنی(*Artemisia turcomanica*) به ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت. پودر جامد بدست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره ی تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده برای بررسی تاثیر بر سلول سرطانی نگهداری شد[۲۳].

تهیه رده سلولی *MCF-7*

رده سلول‌های سرطانی سینه *MCF-7* از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران - ایران) تهیه شد.

بررسی سمیت سلولی عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر زنده مانی رده سلول سرطان پستان

رده سلولی تهیه شده در محیط حاوی *RPMI1640* کشت مایع غیر فعال شد، ۲ میلی مولار گلوتامین، محلول سرم جنین گاو بین ۱۰ تا ۱۵ درصد، پنی سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و در دمای ۳۷ درجه و ٪۹۵ رطوبت $5\%CO_2$ سانتی گراد کشت و پاساژ داده شد تا سلول‌ها از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند پس از جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک توسط تریپسین شمارش و ارزیابی حیات سلول انجام شد و تعداد حدود 10^5 سلول در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای، غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی درمنه ترکمنی (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵/۶۲، ۵ و۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد [۲۳]. تعداد حدود 10^5 سلول *MCF-7* به همراه محیط کشت (کامل) به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (که سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و حالت پایدار پیدا کردند)محلول‌های عصاره با غلظت‌های تهیه‌شده به هر چاهک اضافه شد. به‌منظور دقت بیشتر و صحت تکرارپذیری داده‌ها برای هر غلظت حداقل پنج چاهک اختصاص داده شد. در تعدادی از حفره‌ها به‌عنوان شاهد تنها محیط کشت و در تعدادی دیگر به‌عنوان کنترل فقط سلول بدون عصاره اضافه گردید. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، رنگ *MTT* با غلظت ۲۰ لاندا به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. طی مدت انکوباسیون رنگ زرد تترازولیوم بروماید (*MTT*) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری احیاشده وکریستال‌های بنفش رنگ فرمازان تشکیل گردید. سپس کریستال‌های فرمازان در ۱۵۰میکرولیتر حلال ایزوپروپانول حل‌شده و درنهایت میزان جذب (*OD*) توسط دستگاه خوانشگر الایزا در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شده و درصد زنده ماندن سلولی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد زنده ماندن سلولی = (میانگین جذب نوری تست/میانگین جذب نوری کنترل)×۱۰۰

فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمن بر رده *MCF-7* سلول سرطانی پستان در زمان تأثیر مورد بررسی، در غلظت‌های مختلف به‌صورت درصد زنده ماندن سلولی گزارش شد[۲۴].

بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی

در این مطالعه به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* از روش *Real time PCR* استفاده شد. در ابتدا کلّ *RNA* سلول‌های تیمارشده و نشده با عصاره با استفاده از کیت استخراج *RNA* (کیاژن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد.

به منظور بررسی کیفیت و کمیت *RNA* استخراج شده از نظر غلظت و میزان خلوص از الکتروفورز و نانودراپ استفاده شد. ساخت مولکول‌های *DNA* مکمل با کیت سنتز *cDNA* (*Fermentas*، لیتوانی) انجام گرفت. برنامه زمانی گرمایی دستگاه در سه مرحله شامل: مرحله اول که منجر به واسرشت شدن مولکول‌های *cDNA* و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌شود؛ در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی انجام شد.

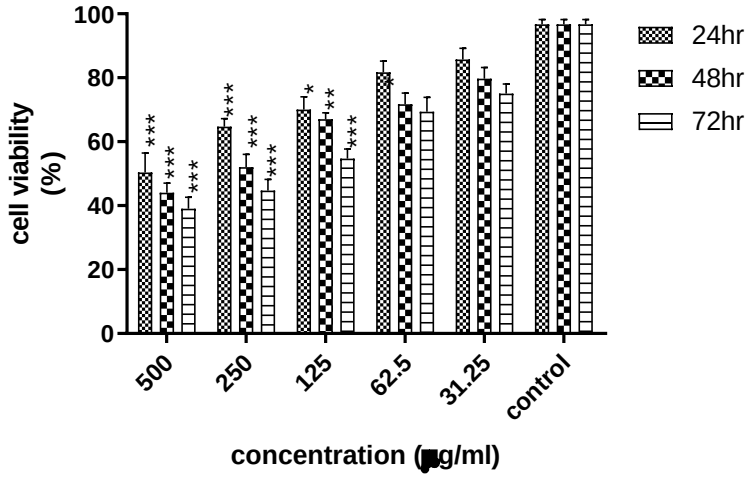
جهت انجام*Real time PCR* ،از پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های هدف *Bax*، *Bcl2* و ژن بتااکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که توالی ژن‌ها در جدول ۱ نمای داده شده است [۲۵].

تجزیه و تحلیل داده ها:

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه بار تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرات محاسبه شد. با استفاده از نرم افزار(Graph pad prism 8 Software, Inc. LA Jolla, CA, USA)، مقدار IC_{50} نمونه‌ها [غلظتی از عصاره است که منجر به مهار رشد ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی می‌شود] محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر رده سلولی سرطانی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) برای مقایسه گروه‌ها با کنترل استفاده شد. همچنین ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار درنظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده

ژن	توالی پرایمر	Accession number	اندازه پرایمر	طول قطعه محصول	دمای انصال
Bactin	Forward: 5'- AGAGCTATGAGCTGCCTGAC-3' Revers: 5'- AATTGAATGTAGTTTCATGGATG-3'	NM-001101.5	۱۹ ۲۱	bp۱۲۹	۵۵
Bax	Forward:5'- GAGCTGCAGAGGATGATTGC -3′ Revers: 5'- AAGTTGCCGTCAGAAAACATG -3'	NM-138764.5	۱۸ ۱۹	bp۹۲	۵۷
Bcl2	Forward: 5'- ATTGGGAAGTTTCAAATCAGC -3' Reverse: 5'- CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG -3'	NM-000657.3	۲۰ ۲۱	bp۱۵۰	۵۵



نمودار ۱. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره درمنه ترکمن در مدت زمان‌های ۲۴،۴۸و۷۲ ساعت بر زنده مانی رده‌ی سلولی *MCF- 7* . نتایج به صورت میانگین درصد زنده ماندن سلولی ± انحراف معیار بیان شده‌است.

* $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل

*** $P < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل

یافته‌ها

تیمار سلول‌های *MCF-7* سرطان پستان با غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره با روش *MTT* طی مدت ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. مطابق نمودار۱ درصد زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گیاه درمنه ترکمنی ($P < ۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری پیدا کرده است. بر اساس نتایج بدست آمده درصد زنده مانی سلول ها با افزایش غلظت و زمان کاهش پیدا کرده است. در این بررسی غلظت ۵۰ درصد کشندگی عصاره گیاه درمنه ترکمنی در ۲۴ ساعت ۴۹۳/۶۸ میکروگرم بر میلی لیتر،در ۴۸ ساعت ۲۹۵/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۷۲ ساعت ۱۵۰/۷۶ میکروگرم بر میلی لیترتعیین شد.

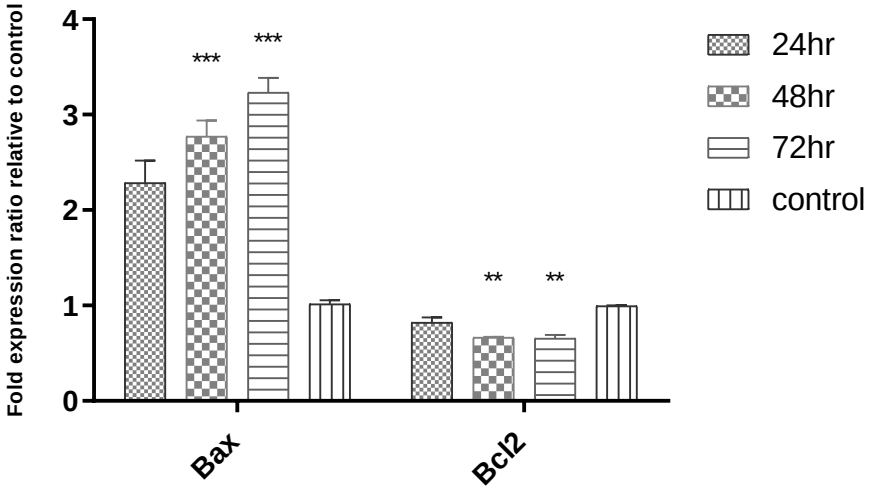
بررسی تاثیر غلظت‌های *IC50* (۱۵۰/۲۹۵،۷۶/۴۳،۴۳/۶۷) میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2*

در رده‌ی *MCF-7* سرطان پستان، همان‌طور که در نمودارنشان داده شده است، میزان بیان ژن*Bax* و *bcl2* در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل آن‌ها افزایش و کاهش یافته است و این تغییرات در مدت زمان ۲۴ ساعت اولیه معنا داری نبوده اما با افزایش زمان(۴۸، ۷۲ ساعت) تغییرات به صورت معنا دار نشان داده شد.

بحث

به طور کلی عصاره گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم در طبّ سنتی جهت اهداف درمانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۶،۲۷]. در این مطالعه، تاثیر عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر زنده مانی و بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2*رده‌ی *MCF-7* سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تست *MTT* نشان داد که خاصیت ضدتکثیری عصاره از الگوی وابسته به دوز و زمان پیروی می‌کند. به طوری که بیشترین خاصیت ضدتکثیری عصاره درمنه ترکمنی بر روی رده سلولی در مدت زمان ۷۲ ساعت بود یعنی با افزایش مدت زمان تیمار از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت، افزایش فعالیت ضدتکثیری دیده شد. همچنین با افزایش غلظت عصاره در هر سه زمان، افزایش فعالیت ضدتکثیری و مهار سلولی دیده شد. همچنین تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در گروه تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد کشندگی عصاره نیز نشان داده شد.



نمودار ۲. بررسی تاثیر غلظت های *IC50* (۱۵۰/۲۹۵،۷۶/۴۳،۴۳/۶۷ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* در رده‌ی *MCF-7* سرطان پستان . نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌است.

**$P < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل

***$P < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل

معلّم زاده و همکارانش اثرات سمّیت سلولی عصاره گیاه درمنه دشتی(*Artemisia sieberi*) بر رده سلولی سرطان پستان (*SKBr3*) را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای خاصیت سلول کشی ۵۰ درصد می‌باشد و می‌تواند منجر به متوقف شدن چرخه سلولی شود[۱۴]. فتحی و همکارانش در سال ۱۳۹۹ اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*)را علیه رده سلولی سرطان معده (*AGS*) مورد مطالعه قرار دادند [۱۸]. سفالیان و همکارانش در سال ۱۳۹۹ اثرات ضدّسرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) را علیه رده سلولی سرطان معده (*AGS*) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره درمنه ایرانی دارای سمّیت سلولی وابسته به دوز و زمان میباشد و میتواند آپوپتوز را القا کند [۳]. نتایج حاصل از بررسی تاثیر عصاره در این مطالعه نیز هم جهت با مطالعات پیشین است.

تفویضی و همکاران در ۲۰۲۰ در بررسی اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی عصاره درمنه ترکمنی*Artemisia turcomanica* بر رده سلولی سرطان معده (*AGS*)و برهم کنش آن بر بیان ژن‌های *Cyclin D1* و *Cyclin E* نشان داد که عصاره گیاه درمنه دارای اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک بر روی رده سلولی *AGS* می‌باشد [۲۶].

نتایج این بررسی نشان داد که خاصیت ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی درمنه وابسته به دوز بوده است. در تحقیق دیگری نشان داده شد که اثر مهاری عصاره آبی A. princeps بر رده سلولی سرطان پستان *MCF-7* وابسته به دوز بوده و منجر به مهار رشد این نوع از سلول‌های سرطانی شده است [۲۷]. گزارش شده است که اثر مهاری عصاره اتیل استاتی گیاه A.capillaris **بر** سلول‌های سرطانی هپاتوسلولار (*HCC*) وابسته به دوز بوده است و علاوه بر القای آپوپتوزیس، قابلیت مهار رشد سلول‌ها و مهاجرت آن‌ها به نواحی دیگر را نیز دارا می‌باشد [۲۸].

میرکین و همکارانشان دادند که گیاه A.absinthum می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک مزمن القا کند [۲۹] . عصاره متانولی گیاه A.annua با غلظت‌های مختلف سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌های *Reh* و *Nalm-6* می‌شود و تشان داده شده است که عصاره متانولی A. annua سبب کاهش رشد تمام رده‌های سلولی سرطانی معده (*AGS*)، سرویکس (*Hela*)، کولون (*HT-29*) و پستان (*MCF-7*) با غلظت‌های مختلف به‌مدت ۷۲ ساعت شده است [۳۰]. محققان نشان دادند که عصاره‌های مختلف A. turanica و A. biennis در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین اثر ضدتکثیری بر رده‌های سلولی سرطان خون (*HL-60*) و (*K562*) را داشته است[۳۱, ۳۲]. تحقیقات امامیو همکاران نشان داد که عصاره متانولی A. annua موجب القای مرگ سلولی در رده سلولی *MCF-7* می‌شود. همچنین نشان داده شده است که مهم‌ترین مواد موثره گیاه آرتمیزیا لیمونن، اوژنول، آلفاپینن، توژون، بورنئول، پیپریتون، کامفور و مقادیر زیادی آرتمیزین است. همچنین این ترکیبات موجب القای آپوپتوزیس، مهار رشد سلول‌های توموری و توقف چرخه سلولی در مرحله *G2/M*می‌شوند [۳۳]. آرتمیزینین درحضور آهن فرو یا هم احیا شده به رادیکال سیتوتوکسیکی تبدیل می‌شود که در سلول‌های سرطانی استرس اکسیداتیو را القا می‌کند. همچنین گزارش شده است که این ترکیب آپوپتوزیس و فروپتوز را القا می‌کند و متاستاز سرطانی را مهار می‌کند [۳۴]. نتایج تحقیق ما نیز با پژوهش‌های قبلی همسو است. نتایج این تحقیقات خاصیت القای آپوپتوزی حاصل از مطالعه حاضر روی رده سلولی MCF-7 را تایید می‌کند. مکانیسم‌های احتمالی اثرات ضد سرطانی عصاره درمنه ترکمنی در رده سلول سرطان پستان مربوط به وجود ترکیبات متنوع با خاصیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانتی موجود در گیاه است. آرتیمیزین یکی از پرکاربردترین داروهای ضدسرطانی است که از آرتیمیزیا تخلیص می‌گردد. نتایج حاصل از تحقیقات گذشته نشان داده است که استفاده روزانه آرتیمیزین می‌تواند در پیشگیری و یا جلوگیری از توسعه سرطان می‌تواند مفید باشد [۳۵]. تحقیقات نشان داده‌اند آرتیمیزین از طریق القاء مرگ در سلول‌های پیش سرطانی و همچنین فعال سازی مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مانع از القاء و یا گسترش سرطان می‌گردد [۳]. باتوجه به نقش مضر رادیکال‌های آزاد از قبیل سوپراکساید، هیدروکسیل و پراکسیل در القاء بیماری‌های مزمن از قبیل سرطان، وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی از قبیل فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی و غیره، از جمله دیگر دلایل خواص ضدتوموری گیاهان خانواده *Artemisia* بیان شده‌اند [۳۶, ۳۷]. این ترکیبات با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد حاصل از برخی متابولیسم‌های موجود در بدن، از آسیب به *DNA*، پروتئین‌ها و سایر اجزاء مهم سلول جلوگیری می‌کنند[۳].

نتیجه گیری

براساس نتایج این تحقیق گونه *Artemisia turcamaniea* که برای اولین بار سمیت سلولی آن مورد بررسی قرار گرفت، اثر بیولوژیکی قابل قبولی از عصاره گیاه درمنه ترکمنی را در شرایط آزمایشگاهی در مدل سرطان پستان بر زنده‌مانی و بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* نشان داده شد از این رو احتمالا میتواند داوطلب مناسبی برای بررسی اثرات ضدتوموری و جداسازی ترکیبات موثره می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گیاهان دارویی می‌توانند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد و به نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به ویژه گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین باشد. از این رو نتایج این مطالعه نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه دارای ضدسرطانی بوده که می‌تواند باعث مهار رشد این سلول شود. در پایان با توجه به بومی بودن این گیاهان، سازگاری آن‌ها با شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران، پرورش آسان و کم هزینه این گیاهان، وجود انواع متعدد فلاونوئیدهای گیاهی در آن‌ها، انجام مطالعات بیشتر روی خواص ضدسرطانی این گیاهان جهت استفاده در پروسه درمان به همراه داروهای شیمیایی و ایفای نقشی بالقوه پیشنهاد می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ژنتیک با کد پایان‌نامه ۱۰۱۲۹۳۳۶۹۸۳۸۱۹۲۱۴۰۰۱۶۲۴۳۱۰۸۹ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافع ندارند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش این مطالعه، با کد اخلاق IR.IAU.CTB.REC.1400.019 **در** تاریخ ۱۴۰۰/۰۶/۳۰، مورد تایید کمیته اخلاق قرار گرفته است.

مشارکت نویسندگان:

هر سه نویسنده در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

منابع

[1] Tahergorabi Z, Moodi M, Mesbahzadeh B. Breast Cancer: A preventable disease. *Journal* of *Birjand University* of *Medical Sciences* 2014; 21 (2) :126-141.

[2] Lee MM-L, Chan BD, Wong W-Y, Qu Z, Chan M-S, Leung T-W, et al. Anti-cancer activity of Centipeda minima extract in triple negative breast cancer via inhibition of AKT, NF-κb, and STAT3 signaling pathways. Front Oncolology. 2020; 10:491.

[3] Sofalian O, Zare N, Latifi S, Hasanpour K, Motalebinia S, Journal B. Evaluation of anticancer effect of Mentha longifolia and Artemisia persica hydro-alcoholic extracts against human gastric cancer cells (AGS). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2020; 9(1): 1-10.

[4] Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J, biochemistry c. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular* and *Cellular Biochemistry*. 2004; 266(1): 37-56.

[5] Al-Zharani M, Nasr FA, Abutaha N, Alqahtani AS, Noman OM, Mubarak M, et al. Apoptotic induction and anti-migratory effects of Rhazya stricta fruit extracts on a human breast cancer cell line. Molecules. 2019; 24(21): 3968.

[6] Purnamasari R, Winarni D, Permanasari AA, Agustina E, Hayaza S, Darmanto W.Anticancer activity of methanol extract of Ficus carica leaves and fruits against proliferation, apoptosis, and necrosis in Huh7it cells. *Cancer Informatics*. 2019; 18: 1176935119842576.

[7] Ayromlou A, Masoudi Sh, Mirzaie A .S*corzonera calyculata* Aerial Part Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Evaluation of Their Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Activities. Journal of Cluster Science. 2019; 30: 1037–1050.

[8] Raúl Ortiz R, Consolación Melguizo C,Prados J, J Alvarez P, Caba O, Rodríguez-Serrano F, et al. New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2012; 7(3): 297-312.

[9] Ichikawa H, Nakamura Y, Kashiwada Y, Aggarwal BB. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. Current pharmaceutical design. *Current Pharmaceutical Design*. 2007; 13(33): 3400-3416.

[10] Behdad R, Mirzaei A , Zare Karizi Sh. Green synthesis of silver nanoparticle using Acroptilon repens extract and evaluation of its anti-efflux activity against Acinetobacter bumanni clinical isolates. Journal of microbial world. 2017; 10(3): 210-223.

[11] Bagheri Farahani Z, Mirzaie A, Ashrafi F, Rahimpour Hesari M, Chitgar A, Noorbazargan H, Rahimi A. Phytochemical composition and biological activities of Artemisia quettensis Podlech ethanolic extract. Natural *Product Research*. 2017; 31(21): 2554-2558.

[12] Benjumea D, Abdala S, Hernandez-Luis F, Pérez-Paz P, Martin-Herrera D. Diuretic activity of Artemisia thuscula, an endemic canary species. Journal of *Ethnopharmacology*. 2005; 100(1-2): 205-209.

[13] Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PY, Wong RN. Angiogenesis: from plants to blood vessels. Trends in pharmacological sciences. *Trends* in Pharmaceutical Sciences. 2006; 27(6): 297-309.

[14] Moalemzadeh S, Rajabbeigi E, Montazeri M. Investigation on cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of Artemisia sieberi on SKBr3cell line. Cell and tissue. 2019; 10(4): 252-260.

[15] Xing X-H, Zhang Z-M, Hu X-Z, Wu R-Q, Xu C. Antidiabetic effects of Artemisia sphaerocephala Krasch. gum, a novel food additive in China, on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. Journal of *Ethnopharmacology*. 2009; 125(3): 410-416.

[16] Tan RX, Zheng W, Tang HQ. Biologically active substances from the genus Artemisia. Planta Media. 1998; 64(04): 295-302.

[17] Youssefi M, Tabari MA, Moghadamnia AJ. In vitro and in vivo activity of Artemisia sieberi against Trichomonas gallinae. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2017; 18(1): 25-29.

[18] Hosseinzadeh L, Malekshahi A, Ahmadi F, Emami SA, Hajialyani M, Mojarrab M. The Protective Effect of Different Extracts of Three *Artemisia* Species against H_2O_2-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in PC12 Neuronal Cells. *Pharmacognosy Research.* 2018 r; 10(1): 64-71.

[19] Taghizadeh Rabe SZ, Mahmoudi M ,Ahi A, Emami SA. Antiproliferative effects of extracts from Iranian Artemisia species on cancer cell lines. *Pharmaceutical Biology*. 2011; 49(9): 962-969.

[20] Mosafer Haghighi S Tafvizi F, Mirzaie A.Encapsulation of artemisia scoparia extract in chitosan-myristate nanogel with enhanced cytotoxicity and apoptosis against hepatocellular carcinoma cell line (Huh-7). Industrial Crops and Products.2020;155: 112790.

[21] Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P The Artemisia L. genus: a review of bioactive essential oils. Molecules. 2012; 17(3): 2542-2566.

[22] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nature Reviews *Clinical Oncology*. 2018; 15(2): 81-94.

[23] Aboeepoor S, Dehghani Ashkezari M, Aboee-Mehrizi F, Haghiralsadat BF, Nikoonahad Lotfabadi NL. Designing and Characterizing Nano-carriers Containing Nepeta Persica Extract and Their Effect on Bone Cancer. *Internal Medicine Today* .2020; 26 (2) :142-155.

[24] Noorbazargan, H., Amintehrani, S., Dolatabadi, A, Mashayekhi A, Nazanin K, Moulavi P, *et al*. Anti-cancer & anti-metastasis properties of bioorganic-capped silver nanoparticles fabricated from *Juniperus chinensis* extract against lung cancer cells. *AMB* Express. 2021; 11(61).

[25] Ali Asgari E, Mirzaie A, Noorbazargan H, Bagheri Kashtali A. Cytotoxicity Effect of Lactobacillus casei Cell Extract as Indigenous Probiotic Bacterium on Colon Cancer Cell Line (HT29) and Analysis of Bax and Bcl2 Apoptosis Gene Expression. Armaghan Danesh. 2017; 21 (12):1192-1120.

[26] Michel J, Abd Rani NZ, Husain K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. Frontiers in *Pharmacology.* 2020; 11(852).

[27] Fathi N, Tafvizi F, Mirzaie A. Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on *cyclin D1* and *cyckin E* genes. *Journal* of *Medicinal Plants*. 2020; 19 (74) :163-176.

[28] Vasiraju J, Sarath, Chang-Sok So, Young Doo Won, Sastry Gollapudi. Artemisia princeps var orientalis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Anticancer Research. 2007; 27(68): 3891-3898.

[29] Mirkin V, Berrebi A, Rakhman I, Haran M, Shvidel L. The role of the plant Artemisia in survival and induction of apoptosis of B cells in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Harefuah. 2017; 156(2): 86-88.

[30] Sarath VJ, So C-s, Won YD, Gollapudi S. Artemisia princeps var orientalis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Anticancer Research. 2007; 27(6B): 3891-3898.

[31] Kim J-H, Jung S-H, Yang Y-I, Ahn J-H, Cho J-G, Lee K-T, et al. Artemisia leaf extract induces apoptosis in human endometriotic cells through regulation of the p38 and NFκB pathways. Journal of Ethnopharmacology. 2013; 145(3): 767-775.

[32] Mashati P, Esmaeili S, Dehghan Nayeri N, Darvishi M, Gharehbaghian A. The effect of methanolic extract of aerial parts of Artemisiaannua on proliferation and apoptosis of acute lymphoblasticleukemia cell lines, Nalm-6 and Reh. Scientific Journal of Iranian Blood Transfusion Organization. 2017; 14(1): 34-43.

[33] Emami A, Zamani Taghizadeh Rabe S, Ahi A, Mahmoudi M. Cytotoxic effects of Artemisia annua methanol extract on cancer cell lines in vitro. Journal of Kerman University of Medical Sciences. ;17(3): 215-225.

[34] Tayarani-Najaran Z, Sareban M, Gholami A, Emami SA, Mojarrab M. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of Artemisia turanica Krasch. on K562 and HL-60 cell lines. Scientific *World Journal*. 2013; 2013.

[35] Dabaghian Amiri A, Mirzaie A, Ali Asgari E, Mahmoudzadeh A. Preparation of niosome loaded Artemisia chamamelifolia extract: antibacterial and anti-cancer activities and apoptosis gene expression analysis in breast cancer cell line (MCF-7). Feyz .2021; 25 (2): 839-838.

[36] Efferth T, From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy. Seminars in cancer biology .2017; 46: 65-83.

[37] Lai HC, Singh NP, Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Seminars in Cancer Biology*. 2013; 31(1): 230-246.

Anti-cancer effect of *Artemisia turcomanica* extract on *breast cancer* cell line (MCF-7)

Naimi S. N.[1], Keshtmand Z.[1,*], Hesampour A.[1]

[1] Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): zkeshtmand2001@gmail.com

DOI: 10.30495/JDB.2022.1959151.1304 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.3.3

Received: May 2022 Accepted: December.2022

Abstract

The prevalence of cancer and the side effects of treatment methods have provided a growing interest in the use of plants as a promising source of treatment. The use of medicinal plants in traditional medicine has been important for a long time and many of these medicinal plants have antioxidant and anticancer effects. The purpose of this study is to investigate the anticancer effects of *Artemisia turcomanica* extract on breast cancer cell line (MCF-7) and its effect on *Bcl2* and *Bax* gene expression. In this experimental study, the effect of the hydroalcoholic extract of *Artemisia turcomanica* on viability and expression of *Bax* and *Bcl2* genes in MCF-7 breast cancer cells was examined. For this purpose, MCF-7 breast cancer cells were cultured and treated with the hydroalcoholic extract of *Artemisia turcomanica* (with different concentrations) for 24, 48 and 72 hours. The effect of the extract on cell viability was evaluated by MTT method. Next, RNA extraction was performed and after cDNA synthesis, the expression level of *Bax* and *Bcl2* genes was measured by Real-time PCR method. This research showed that with the increase in concentration and time, the viability of the cells decreased significantly compared to the control samples. Also, the results of real-time PCR showed that the expression of *Bax* and *Bcl2* genes changed significantly compared to the control sample at 48 and 72 hours. The results showed that the extract of *Artemisia turcomanica* has cytotoxic and apoptotic effects on the MCF-7 cell line, so that by conducting more studies, the extract of this plant can be used as an anti-cancer biological product in the treatment of cancer.

Keywords: *Artemisia turcomanica*, viability cell, Apoptosis, Breast cancer cell line (MCF-7).